

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

**γ -ORIZANOL PROTEGE CONTRA DANO
OXIDATIVO AGUDO INDUZIDO POR CÁDMIO EM
TESTÍCULOS DE CAMUNDONGOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cristiano Chiapinotto Spiazzi

Uruguaiana, RS, Brasil

2012

CRISTIANO CHIAPINOTTO SPIAZZI

**γ -ORIZANOL PROTEGE CONTRA DANO OXIDATIVO AGUDO INDUZIDO POR
CÁDMIO EM TESTÍCULOS DE 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

2012

CRISTIANO CHIAPINOTTO SPIAZZI

**γ -ORIZANOL PROTEGE CONTRA DANO OXIDATIVO AGUDO INDUZIDO POR
CÁDMIO EM TESTÍCULOS DE 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: Bioquímica Toxicológica

Dissertação defendida e aprovada em: 23 de outubro de 2012.

Banca examinadora:

Prof.^a. Dr.^a. Francielli Weber Santos Cíbin
Orientadora
(UNIPAMPA)

Prof. Dr. Ricardo Brandão
(UFSM)

Prof. Dr. Robson Luiz Puntel
(UNIPAMPA)

Dedico esta dissertação à minha família que sempre esteve ao meu lado para o que eu precisasse e nunca me deixaram desistir.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente aos meus pais, Carlos e Evani, e também minha irmã Sendi, por todo apoio e incentivo que eles me deram durante esse tempo, mesmo estando longe. Obrigado pela educação, carinho e pelo suporte, sem isso eu nunca teria conseguido me tornar o que sou hoje.

Um agradecimento especial à minha orientadora, Francielli, por ser essa pessoa incrível, e por ter tido paciência comigo e ter me ajudado durante todo o mestrado. Mesmo quando eu não tinha certeza do que eu estava fazendo, ela nunca me deixou desacreditar do trabalho. Fico grato pela oportunidade de ter trabalhado contigo e por todo conhecimento que foi passado. Isso fez com que toda a vivência da pós-graduação se tornasse muito mais proveitosa.

Aos meus colegas de laboratório Flávio, Leandra, Maiquel, Isis, e em especial à Laura, Melina e Aryele, que estiveram trabalhando comigo desde o começo. Durante esse período essas pessoas tornaram-se mais do que apenas colegas, e sim verdadeiros amigos, com os quais eu compartilhei alguns dias sofridos e muitos outros felizes. Os meus dias no laboratório jamais seriam os mesmo sem vocês.

Aos meus colegas de UNIPAMPA, e que de certa forma também foram meus colegas de mestrado, especialmente à Simone, Suzi, Jefferson e Anderson. Eles me apoiaram e me auxiliaram sempre que puderam, compartilharam dos mesmos problemas e dificuldades que eu e tiveram que aprender tudo sobre Bioquímica junto comigo. Sou grato a tudo isso e também aos vários momentos alegres que me foram proporcionados.

Aos professores Vanusa Manfredini, Fabiana Farias e Érico Flores que contribuíram para a qualidade do trabalho, e deram todo o suporte necessário.

E por último, mas não menos importante, ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e à UNIPAMPA por proporcionarem essa oportunidade incrível, e toda a estrutura para que isso ocorresse.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Fundação Universidade Federal do Pampa

γ -ORIZANOL PROTEGE CONTRA DANO OXIDATIVO AGUDO INDUZIDO POR CÁDMIO EM TESTÍCULOS DE CAMUNDONGOS

AUTOR: Cristiano Chiapinotto Spiazzi

ORIENTADORA: Francielli Weber Santos Cibin

Data e Local da Defesa: Uruguaiiana, 23 de outubro de 2012

O cádmio é um metal pesado não-essencial presente em baixas concentrações principalmente em alimentos e água potável, mas também está presente na fumaça do cigarro. A exposição aguda ao cádmio causa dano testicular severo em camundongos, que está relacionado com o estresse oxidativo. O presente estudo avaliou o dano oxidativo em testículos causado por uma exposição aguda ao cádmio e verificou o papel protetor do γ -orizanol (ORY). Os camundongos receberam uma única dose de CdCl_2 2,5 mg/kg administrada via intraperitoneal, e então tratados com ORY (50 mM óleo de canola, 5 mL/kg) administrado via oral. Os testículos foram removidos após 24 horas e testados quanto aos níveis de peroxidação lipídica (TBARS), carbonilação proteica, fragmentação do DNA, ácido ascórbico, cádmio e tióis não-proteicos, e para a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) e δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D). O grupo tratado com cádmio mostrou um acúmulo desse metal no tecido testicular, assim como aumento significativo nos níveis de peroxidação lipídica, carbonilação proteica e fragmentação do DNA, que confirmam o dano oxidativo causado no tecido. Além disso, notou-se inibição significativa na atividade das enzimas SOD, GST e δ -ALA-D, e também uma redução nos níveis de ácido ascórbico e tióis não-proteicos. A terapia foi capaz de reduzir significativamente a concentração de cádmio nos testículos (cerca de 23%). O ORY restaurou a atividade das enzimas SOD e GST bem como a produção de TBARS aos níveis do controle. Além disso, o ORY recuperou parcialmente a atividade da enzima δ -ALA-D que estava inibida pelo cádmio. Esse estudo fornece a primeira evidência das propriedades terapêuticas do ORY na proteção contra a toxicidade testicular induzida por cádmio.

Palavras-chave: Cádmio; γ -orizanol; testículo; estresse oxidativo; antioxidante

ABSTRACT

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

 **γ -ORYZANOL PROTECTS AGAINST ACUTE CADMIUM-INDUCED
OXIDATIVE DAMAGE IN MICE TESTES**

AUTHOR: CRISTIANO CHIAPINOTTO SPIAZZI

ADVISOR: FRANCIELLI WEBER SANTOR CIBIN

Date and Place of Defense: Uruguaiana, October 23rd, 2012

Cadmium is a non-essential heavy metal that is present at low levels mainly in food and water and also in cigar smoke. Acute cadmium exposure cause severe testicular damage in mice, which involves oxidative stress. The present study evaluated the testicular oxidative damage caused by acute cadmium exposure and verified the protective role of γ -oryzanol (ORY). Mice received a single dose of 2.5 mg/kg of CdCl₂ administrated via intraperitoneal, and then treated with ORY (50 mM in canola oil, 5 mL/kg) administrated via oral. Testes were removed after 24 hours and tested for lipid peroxidation (TBARS), protein carbonylation, DNA breakage, ascorbic acid, cadmium and non-proteic thiols contents, and for the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) and δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D). Cadmium treated group presented an accumulation of this metal in testicular tissue, as well as an increase in lipid peroxidation, protein carbonylation and DNA fragmentation contents, which confirms the oxidative stress. Furthermore, it was noted a significant inhibition in SOD, GST and δ -ALA-D activities, and also a reduction in ascorbic acid and non-proteic thiols content. Therapy reduced significantly cadmium concentration in testes (around 23%). ORY restored SOD and GST activities as well as TBARS production to the control levels. Furthermore, ORY partially recovered δ -ALA-D activity inhibited by cadmium. This study provides the first evidence on the therapeutic properties of ORY in protecting against cadmium-induced testicular toxicity.

Key-words: Cadmium; γ -oryzanol; testes; oxidative stress; antioxidant

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão Bibliográfica

Figura 1. Participação dos estados brasileiros na produção de arroz nacional.....	20
Figura 2. Estrutura do grão de arroz.....	21
Figura 3. Principais componentes do γ -orizanol.....	22

Artigo

Figure 1 – Comet assay results of mice testes exposed to cadmium and the following treatment with γ -oryzanol (ORY).....	42
Figure 2 – Superoxide dismutase activity (SOD) in mice testes exposed to CdCl ₂ and the effect of γ -oryzanol (ORY).....	42
Figure 3 – Aminolevulinic acid dehydratase(δ -ALA-D) activity in mice testes exposed to CdCl ₂ and the effect of γ -oryzanol (ORY).....	43
Figure 4 – Glutathione S-Transferase activity (GST) in mice testes exposed to CdCl ₂ and the effect of γ -oryzanol (ORY).....	43
Figure 5 – Glutathione Peroxidase activity (GPx) in mice testes exposed to CdCl ₂ and the effect of γ -oryzanol (ORY).....	44
Figure 6 – Catalase activity (CAT) in mice testes exposed to CdCl ₂ and the effect of γ -oryzanol (ORY).....	44

LISTA DE TABELAS

Artigo

Tabela 1 – Experimental model for cadmium-induced testes injury in mice (n = 5), using γ -oryzanol (ORY) as treatment.....	45
Tabela 2 – Effect of γ -oryzanol (ORY) on non-enzymatic parameters evaluated on testes of mice exposed to cadmium.....	45
Tabela 3 – Degrees of damage according to migration of DNA strands on comet assay...	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMVN - 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrila)

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

BHT - Butil-hidróxitolueno

CAT - Catalase

Cd - Cádmi

CdCl₂ - Cloreto de cádmio

CDNB - 1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno

DI - Índice de dano

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNPH - Dinitrofenilhidrazina

DPPH[•] - Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DTNB - Ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico)

EROs - Espécies reativas de oxigênio

GPx - Glutaciona peroxidase

GSH - Glutaciona reduzida

GSSG - Glutaciona dissulfeto

GST - Glutaciona S-transferase

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

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

ICP-MS - Espectrômetro de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado

LDL-C - Lipoproteína transportadora de colesterol de baixa densidade

LH - Molécula de lipídio

MDA - Malondialdeído

MT - Metalotioneína

MT-I - Metalotioneína do tipo I

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NPSH - Tiól não-proteico

O₂ - Oxigênio molecular

O₂^{•-} - Ânion superóxido

OFA - Óleo do farelo de arroz

OH[•] - Radical hidroxila

ORY - γ -Orizanol

RO[•] - Radical alcoxila

RO₂[•] - Radical peroxila

ROOH - Peróxido orgânico

SOD - Superóxido dismutase

TBARS - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, thiobarbituric acid reactive species)

TCA - Ácido tricloroacético

δ -ALA - Ácido δ -aminolevulínico

δ -ALA-D - δ -Aminolevulinato desidratase

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	17
2.3 γ-Orizanol	20
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral	24
3.2 Objetivos específicos	24
4 ARTIGO CIENTÍFICO	25
Abstract	27
1. Introduction	28
2. Methods and Materials	29
2.1. Reagents	29
2.2. Treatment.....	29
2.3. Non-enzymatic assay.....	30
2.3.1. <i>Lipid peroxidation (TBARS)</i>	30
2.3.2. <i>Determination of non-protein thiols (NPSH)</i>	30
2.3.3. <i>Cadmium analysis</i>	30
2.3.4. <i>Ascorbic acid</i>	30
2.3.5. <i>Carbonyl groups determination</i>	30
2.4. Single cell gel electrophoresis (comet assay)	31
2.5. Enzymatic assay.....	31
2.5.1. <i>Superoxide dismutase (SOD) activity</i>	31
2.5.2. <i>δ-Aminolevulinic acid dehydratase activity</i>	32
2.5.3. <i>Glutathione peroxidase (GPx) activity</i>	32
2.5.4. <i>Glutathione S-transferase (GST) activity</i>	32
2.5.5. <i>Catalase (CAT) activity</i>	32
2.6. Protein determination	33
2.7. Statistical analysis	33
3. Results	33
3.1. Non-enzymatic assay.....	33
3.2. Comet assay	34
3.3. Enzymatic assays	34
4. Discussion	34
Acknowledgements	37
Conflict of interest	37

References	37
5 CONCLUSÕES	46
6 PERSPECTIVAS	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
APÊNDICE A – Esquema representativo dos resultados	54
ANEXO A – Protocolo de aprovação do projeto pelo CEUA-UNIPAMPA	55
ANEXO B – Carta de submissão do artigo à revista Food and Chemical Toxicology	56

1 INTRODUÇÃO

O arroz é um alimento básico para um grande número de pessoas na Terra, sendo o seu cultivo uma das atividades econômicas mais importante no mundo (Maclean, et al., 2002). Através do seu processamento é obtido o farelo de arroz, que é removido do endosperma amiláceo do grão (Lakkakula, et al., 2004). O óleo do farelo de arroz contém um número significativo de compostos antioxidantes (ou biologicamente ativos), incluindo cerca de 0,1-0,14% de componentes da vitamina E e 0,9-2,9% de γ -orizanol (ORY); as concentrações podem variar substancialmente de acordo com a origem do farelo de arroz (Diack & Saska, 1994; Hu, et al., 1996; Lloyd, et al., 2000).

O ORY é uma fração do óleo do farelo de arroz que contém uma mistura de ésteres do ácido ferúlico com esteróis e outros triterpenóis (Rogers, et al., 1993; Orthofer, 2005), no qual o cicloartenilferulato, 24-metilenocicloartenilferulato, β -sitosterilferulato e campesterilferulato são os principais compostos (Lloyd, et al., 2000; Xu & Godber, 1999). O ORY é dito ser o principal componente do óleo do farelo de arroz. Xu & Godber (2001) compararam a atividade antioxidante dos componentes da vitamina E (α -tocoferol, α -tocotrienol, γ -tocoferol e γ -tocotrienol) contra os principais componentes do ORY. Foi demonstrado que o ORY obteve atividades melhores que a vitamina E, sendo o 24-metilenocicloartenilferulato o que apresentou maior atividade.

Embora os testículos expressem várias enzimas antioxidantes, eles são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo. Já foi bem estabelecido que o estresse oxidativo testicular é comumente induzido sob diferentes condições normais e/ou patofisiológicas, levando a infertilidade masculina (Siu, et al., 2009). Os testículos são muito sensíveis a exposição aguda por cádmio e a toxicidade testicular seguida da exposição a esse metal geralmente é atribuída ao dano oxidativo (Santos, et al., 2004a; Santos, et al., 2004b; Yang, et al., 2006). Na verdade, muitos autores relacionaram a toxicidade do cádmio no tecido testicular ao estresse oxidativo, tanto pela formação de radicais livres quando pela inibição de defesas celulares (Santos, et al., 2004a; Acharya, et al., 2008; Ognjanović, et al., 2010). Os mecanismos para tais reações ainda não são bem compreendidos já que o cádmio não participa diretamente de reações do tipo Fenton (Moriwaki, et al., 2008). Por essas razões, o uso de substâncias antioxidantes como o ORY poderiam ajudar a prevenir ou reduzir os danos oxidativos causados pelo

cádmio. Não há conhecimento de trabalhos disponíveis sobre o efeito do ORY no danos oxidativo testicular induzido por cádmio.

Dessa forma, considerando que: (a) a exposição ao cádmio causa dano testicular como já evidenciado por diversos autores; (b) que não existe até o momento nenhum tratamento totalmente eficaz contra a toxicidade deste metal; (c) a potencialidade de nutracêuticos, entre eles o ORY na proteção e prevenção de transtornos relacionados ao estresse oxidativo; o presente estudo avaliou o possível efeito protetor do ORY frente ao estresse oxidativo testicular induzido pela exposição aguda ao cádmio em camundongos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cádmio

A intoxicação por metais pesados é um motivo de preocupação mundial. O cádmio, por exemplo, é um metal pesado e um elemento não-essencial utilizado industrialmente. Normalmente ele está presente em baixas concentrações no ambiente, mas atividades antropogênicas fizeram com que sua concentração aumentasse na atmosfera e se tornasse um contaminante de água e alimentos (ATSDR, 2008; WHO, 2010).

Portanto, a principal forma de contaminação para a maior parte da população é através da alimentação e do consumo de água. Contudo, para uma parcela bastante expressiva da população, outra forma bastante importante de exposição é pela fumaça do cigarro, sobretudo porque a absorção de cádmio pelos pulmões é cerca de 10 vezes maior do que no sistema gastrointestinal (Goering, et al., 1994). Deste modo, uma pessoa ingere em média 1 µg/dia de cádmio via alimentação, e um adicional de 1-3 µg/dia é absorvido ao fumar um maço de cigarro por dia (ATSDR, 2008), por isso fumantes ativos apresentam aproximadamente o dobro da carga corporal de cádmio comparados a indivíduos não-fumantes (Lewis, et al., 1972). Além disso, o contato com o cádmio também pode ocorrer por meio de exposição ocupacional como mineração de metais, metalúrgicas, e também na manufatura de baterias níquel-cádmio, pigmentos, estabilizadores plásticos e produtos anticorrosivos (Salgado, 1996).

O cádmio foi descoberto no início do século XIX por Friedrich Strohmeier, e já no final deste século (XIX) e início do século XX houve várias evidências dos efeitos tóxicos deste metal (Nordberg, 2009). Uma das principais evidências do efeito deletério do cádmio foi evidenciada pela doença *itai-itai* em moradores da região do rio Jinzu na Província de Toyama, Japão, por volta dos anos 1950. A doença é principalmente caracterizada pela disfunção tubular renal, osteomalácia severa, pseudofraturas e anemia. Isso se deve à alta ingestão de cádmio (cerca de 1000 µg/dia) através do consumo de alimentos contaminados com esse metal pelos moradores da região (Shuto, 2005).

Atualmente o cádmio está em 7º lugar na lista prioritária de substâncias perigosas da Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (na sigla em inglês, 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 (na sigla em inglês, IARC) (Waalkes, 2003; IARC, 1993).

Um dos principais motivos para o cádmio ser considerado de grande risco para a saúde humana é devido ao fato que ele pode se acumular em órgãos como o pulmão (Luchese, et al., 2007; Klimisch, 1993), fígado (Johansen, et al., 2006), rim (Jihen, et al., 2008), testículo (Haouem, et al., 2008), cérebro, ossos, sistema sanguíneo, etc. (Messaudi, et al., 2010). Esse acúmulo está relacionado à longa meia-vida que o cádmio apresenta no corpo humano, cerca de 20 a 30 anos, e uma baixa excreção (1-2 µg/dia) (Goering, et al., 1995). Esse longo tempo de permanência no organismo é atribuído às fortes ligações com a metalotioneína (MT), principalmente em órgãos como fígado e rins onde os níveis dessa proteína são maiores, e ela propicia, pelo menos temporariamente, uma desintoxicação do metal (Klaassen, et al., 1999).

A MT é uma proteína de baixo peso molecular rica em cisteína que tem uma alta afinidade por metais essenciais (zinco e cobre) e não-essenciais (cádmio e mercúrio) (Cai, et al., 2010). A conjugação da metalotioneína com o cádmio ocorre através de grupos sulfidrila presentes na estrutura da proteína. A afinidade que o cádmio apresenta por grupos sulfidrila faz com que ele também possa formar associações com outras moléculas como albumina, cisteína, glutatona e proteínas ricas em sulfidrilas (Klaassen, et al., 2009).

Embora o papel da MT já tenha sido estabelecido como um importante protetor do organismo contra o cádmio em tecidos como fígado e rim, tanto na intoxicação aguda quanto crônica, o mesmo não é observado para os danos causados por uma intoxicação aguda do metal em testículos de animais experimentais. Apesar de os níveis dessa proteína em estado estacionário ser mais elevada em testículos do que em outros órgãos de roedores (De, et al., 1991; Salehi-Ashtiani, et al., 1993; Suzuki, et al., 1998), ela não parece protegê-los da intoxicação por cádmio mesmo em camundongos transgênicos da MT-I, onde houve uma superexpressão da proteína (Dalton, et al., 2005). Fatores genéticos envolvidos no transporte celular de cádmio parecem estar mais envolvidos com a sensibilidade testicular do que os níveis de MT (Klaassen, et al., 2009).

Talvez por esse motivo o sistema reprodutivo seja um dos principais órgãos afetados pela intoxicação com cádmio. Ele tem o potencial de afetar a reprodução e o desenvolvimento de muitas formas diferentes, e em todos os estágios do processo reprodutivo (Thompson & Bannigan, 2008). Já foi demonstrado que tanto uma intoxicação aguda quanto sub-crônica causam danos testiculares. Por exemplo, um tratamento com injeção subcutânea de cloreto de

cádmio (CdCl_2) à 2,5 mg/kg mostrou, já na primeira semana, sinais de necrose por coagulação em células dos túbulos seminíferos, bem como acidofilia citoplasmática, picnose nuclear, necrose vascular multifocal e fibrina no interstício (Santos, et al., 2006). Outro estudo utilizando cádmio a 1,5 mg/100g por dia por via oral mostrou um aumento da peroxidação lipídica nos testículos, assim como uma diminuição nos níveis de glutathione, superóxido dismutase e catalase, evidenciando um aumento no dano oxidativo e uma diminuição na capacidade da célula de revertê-lo (Ola-Mudathir, et al., 2008).

Esse dano ao sistema reprodutivo foi associado ao estresse oxidativo por muitos autores, tanto por formação de radicais livres ou pela inibição de defesas celulares enzimáticas e não-enzimáticas (Santos, et al., 2004a; Acharya, et al., 2008; Ognjanović, et al., 2010). Entretanto, como esse metal não é ativo em reações do tipo redox ele não pode, por si só, produzir reações como as de Fenton (Moriwaki, et al., 2008), por isso acredita-se que as espécies reativas de oxigênio (ROS) são geradas indiretamente pelo cádmio. Dependendo da sua concentração, ocorre uma diminuição nos níveis de antioxidantes celulares e também pode ocorrer a ligação do Cd^{2+} com grupos sulfidríla em moléculas críticas, como já supracitado, levando à inativação desses grupos e conseqüentemente a um estresse oxidativo (Rikans & Yamano, 2000)

2.2 Estresse oxidativo

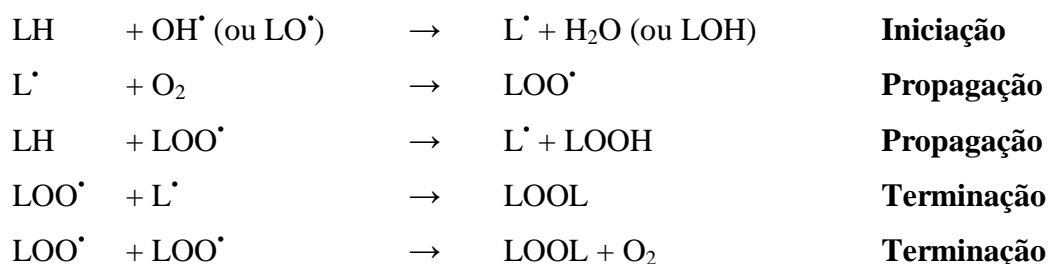
Quando um elétron encontra-se sozinho em um orbital atômico, ele é dito desemparelhado. Espécies que contenham um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada de valência são chamadas de radicais livres e geralmente são altamente reativas (Halliwell, et al., 1990). Nos organismos aeróbios isso geralmente ocorre com a redução de uma molécula de oxigênio (O_2) a ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). 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 ocorrem principalmente onde há alto fluxo de elétrons como, por exemplo, na mitocôndria, onde os elétrons podem passar diretamente dos transportadores de elétrons para o oxigênio durante a cadeia respiratória (Halliwell, 1991).

Entretanto, o termo radical livre não é ideal para designar esses agentes reativos, pois alguns destes não possuem elétrons desemparelhados, como é o caso do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Como a maioria desses agentes são derivados do metabolismo do

oxigênio, eles são usualmente chamados de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Ferreira & Matsubara, 1997), mas há também espécies reativas de nitrogênio e cloro (Halliwell & Whiteman, 2004). As EROs mais estudadas são o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mas há também aquelas provenientes de moléculas orgânicas como os radicais peroxila (RO_2^{\cdot}) e alcoxila (RO^{\cdot}), e peróxidos orgânicos (ROOH) (Sies, 1991). 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^{\cdot} que é altamente reativo (Halliwell, 1991).

As EROs possuem um papel importante em seres vivos. Um exemplo de suas funções no organismo é na resposta imune a infecções. Os fagócitos em geral possuem um mecanismo de defesa contra corpos estranhos onde ocorre um alto consumo de oxigênio, geralmente denominado queima ou explosão respiratória. Nesse processo, o oxigênio consumido é convertido em ânion superóxido através do complexo da NADPH oxidase, que é usado para eliminar bactérias e partículas engolfadas pelos fagócitos, no processo chamado de fagocitose (Halliwell, 1991; Halliwell & 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-radicais 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). Uma das características desse tipo de reação é que elas tendem a proceder como uma reação em cadeia. Uma das reações mais comuns que ocorre em organismos vivos é a peroxidação lipídica, que é uma reação que ocorre quando um radical livre reage com um lipídio de membrana, a exemplo a reação do radical hidroxil com uma molécula de lipídio (LH), tendo as etapas de iniciação, propagação e terminação (Halliwell, 1991; Ferreira & Matsubara, 1997):



Para evitar que esse tipo de reação ocorra, as células possuem mecanismos de defesa contra a formação de espécies reativas. As defesas antioxidantes compreendem (Halliwell & Gutteridge, 1999):

- (a) Agentes que removem cataliticamente radicais livres e outras espécies reativas. Exemplos: superóxido dismutase, catalase, peroxidases e antioxidantes tiol-específicos.
- (b) Proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes tais como ferro, cobre e heme. Exemplos: transferrinas, haptoglobina, hemopexina e metalotioneína. Essa categoria também inclui proteínas que oxidam os íons de ferro, como a ceruloplasmina.
- (c) Proteínas que protegem biomoléculas contra danos (incluindo dano oxidativo) por outros mecanismos. Exemplo: proteínas de choque térmico.
- (d) Agentes de baixo peso molecular que capturam EROs. Exemplos: glutathiona, α -tocoferol e ácido ascórbico.

Quando ocorre um desequilíbrio entre a formação de EROs e as defesas antioxidantes celulares, acontece o que chamamos de estresse oxidativo. As EROs tem sido atribuídas 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, AIDS, 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 masculina (Makker, et al., 2009; Bansal, et al., 2011).

Embora os testículos expressem várias enzimas antioxidantes, eles são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo. Já foi bem estabelecido que o estresse oxidativo testicular é comumente induzido sob diferentes condições normais e/ou patofisiológicas, podendo levar a infertilidade masculina (Siu, et al., 2009).

Os espermatozóides, por apresentarem uma alta proporção de ácidos graxos poli-insaturados (Vernet, et al., 2004), também são muito sensíveis a produção de EROs. Essas espécies reativas têm sido associadas com a diminuição da motilidade, morfologia anormal e diminuição da capacidade de penetração espermatozóide-ovócito (Aitken, et al., 1994; Aitken, 1995).

Por esse motivo, o uso de compostos antioxidantes poderia auxiliar na prevenção ou proteção contra danos causados pelo estresse oxidativo no sistema reprodutivo. Alguns desses antioxidantes de baixo peso molecular vêm da dieta, especialmente ácido ascórbico e α -tocoferol (Halliwell & Gutteridge, 1999), porém há outras substâncias provenientes de alimentos que também possuem propriedades antioxidantes, polifenóis, carotenóides e outros constituintes (Liu, et al., 2008). Por derivarem de alimentos, esses tipos de compostos são normalmente denominados de nutraceuticos e possuem não só atividade antioxidante, como muitas outras propriedades benéficas à saúde (Moraes & Colla, 2006).

2.3 γ -Orizanol

Atualmente, o estudo sobre nutraceuticos tem chamado atenção de pesquisadores. O nutraceutico é um alimento ou parte de um alimento que proporciona benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de doença (Moraes & Colla, 2006). O arroz (*Oryza sativa*), por exemplo, é um dos principais cereais cultivados no mundo, sendo a fonte de alimento primária para mais da metade da população (Bao & Corke, 2004) e tem sido alvo de vários estudos relacionados às suas propriedades benéficas.

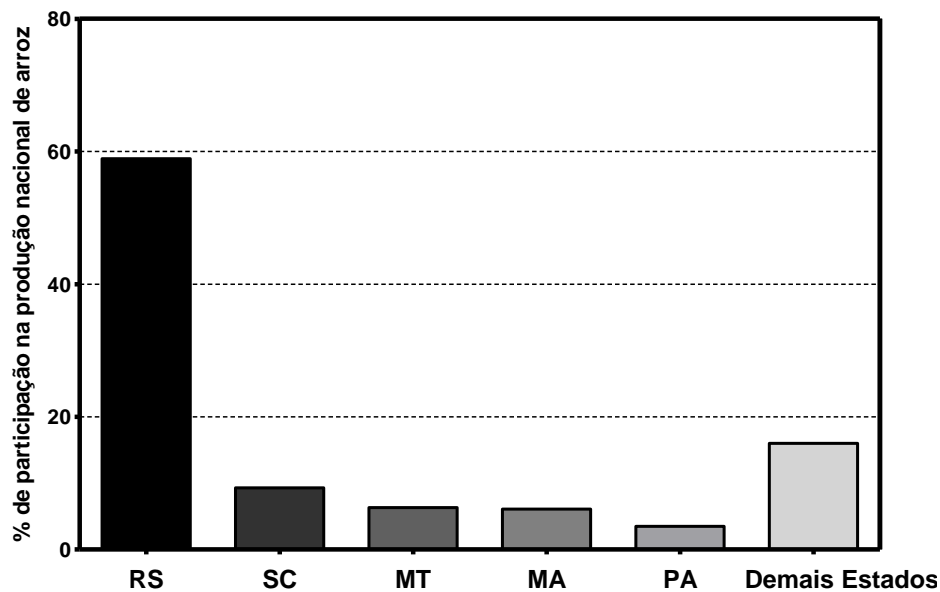
Em 1999 foram produzidos aproximadamente 596 milhões de toneladas do grão, sendo que cerca de 90% desse total é cultivado e consumido na Ásia, tendo a China, Índia, Indonésia, Bangladesh, Vietnã e Tailândia como os maiores produtores no ano mencionado (Bao, et al., 2004; Juliano, 2004). A estimativa é que em 2009 foram gerados cerca de 678 milhões de toneladas do cereal, representando um aumento de 13,75% no cultivo (Faostat, 2010).

O Brasil está entre os 10 maiores produtores de arroz no mundo, com cerca de 11,2 milhões de toneladas produzidas em 2010 (Faostat, 2010). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2007), o Rio Grande do Sul é o estado com a maior participação na produção nacional (Figura 1), e Uruguaiana é a cidade com a maior produção nacional do grão, correspondendo a 5,1% do total produzido no país em 2006, seguida por Itaqui (4%), Alegrete (3,4%) e Dom Pedrito (2,9%), fazendo do arroz um dos principais cultivos na região do Pampa gaúcho.

No beneficiamento do arroz é gerado um subproduto de alto valor nutritivo, o farelo. Ele é formado a partir do pericarpo e do gérmen do grão (Figura 2), que são extraídos na etapa

de brunição e polimento, representando cerca de 10% do peso total do grão (Parrado, et al., 2006), e constitui uma ótima fonte de fibras e proteínas apresentando em torno de 13 g% e 12,25 g%, respectivamente (Dal Moro, et al., 2004). A partir desse subproduto é extraído o óleo, que tem sido amplamente estudado devido aos seus efeitos benéficos (Ha, et al., 2005; Ausman, et al., 2005; Wilson, et al., 2007).

Figura 1. Participação dos estados brasileiros na produção de arroz nacional



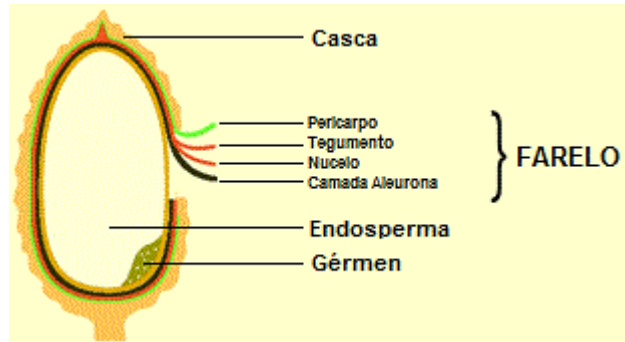
Fonte: IBGE, 2007

Uma das propriedades atribuídas ao óleo do farelo de arroz (OFA) por Wilson et al. (2007) é a capacidade de reduzir o nível da lipoproteína transportadora de colesterol de baixa densidade (LDL-C) no soro sanguíneo e também o acúmulo de colesterol esterificado na artéria aorta em hamsters. Nesse mesmo trabalho, os efeitos do OFA foram comparados com os do gama-orizanol e do ácido ferúlico, que fazem parte da fração não-saponificante do óleo juntamente com outros fitoterápicos de grande interesse como tocoferóis, tocotrienóis e flavonoides (Chotimarkorn, et al., 2008; Iqbal, et al., 2005). O γ -orizanol (ORY) isolado demonstrou efeitos similares aos do OFA, e em alguns casos melhores, por isso ele tem sido atribuído como um dos principais componentes ativos do OFA.

Esse componente do OFA é, na verdade constituído por uma mistura de compostos, formada principalmente por ésteres de ácido ferúlico com fitoesteróis. Os principais componentes da mistura são cicloartenilferulato, 24-metilenocicloartenilferulato,

campesterilferulato e β -sistosterilferulato (Figura 3), representando cerca de 80% do total (Rogers, et al., 1993; Xu & Godber, 1999).

Figura 2. Estrutura do grão de arroz



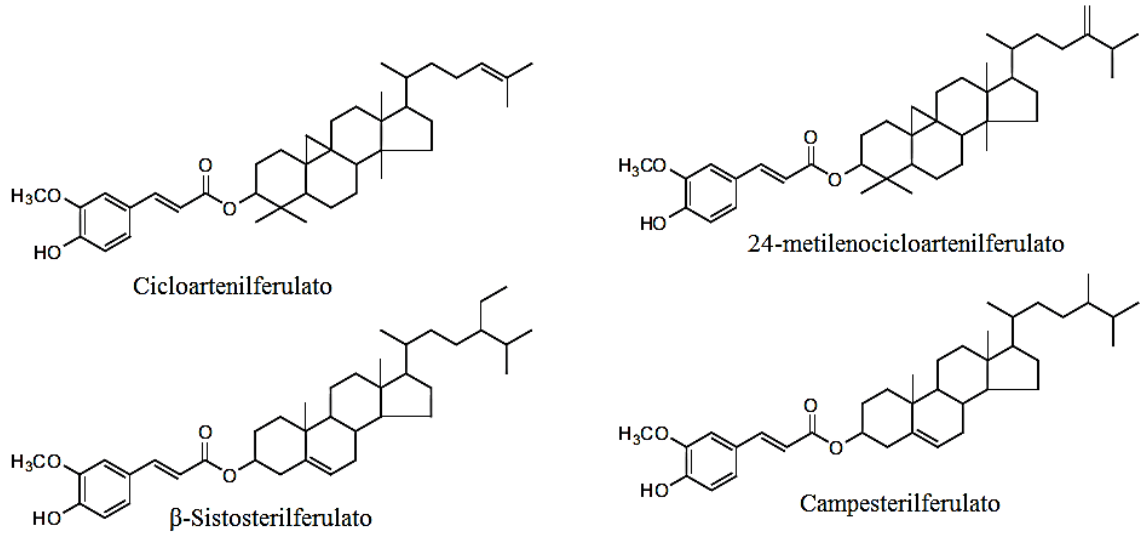
Fonte: RITO Partnership, 2012

Além das propriedades hipolipidêmicas e hipocolesterolêmicas, o ORY tem sido estudado por suas propriedades antioxidantes. Um ensaio foi realizado *in vitro* para avaliar a atividade antioxidante e sugerir possíveis mecanismos para o ORY. Ele foi capaz de capturar radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•), bem como reduzir a taxa de peroxidação lipídica iniciada pelo 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrila) (AMVN) em óleos de uso farmacêutico e cosmético, porém com menor intensidade que antioxidantes sintéticos como o butil-hidróxitolueno (BHT) (Juliano, et al., 2005). Outro estudo, no entanto, demonstrou o potencial antioxidante do ORY no tratamento de dano hepático induzido por etanol em ratos. Os animais tratados com ORY conseguiram recuperar completamente a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e os níveis de glutatona (GSH) em tecidos hepáticos, e também foi capaz de reduzir os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) quando comparados aos ratos tratados apenas com etanol (Chotimarkorn, & Ushio, 2008).

Já foi demonstrado também, por Arlas et al. (2008), que garanhões suplementados com óleo do farelo de arroz comercial (Gama-Horse, HT Nutri®, Brasil) contendo ORY (1%) demonstraram uma melhora significativa na qualidade espermática em parâmetros como concentração, motilidade e funcionalidade da membrana.

Entretanto, com exceção dos estudos supracitados, há poucas evidências do efeito antioxidante do ORY *in vivo*, principalmente relacionado ao sistema reprodutivo, e nenhum trabalho envolvendo esse tratamento em um modelo de exposição ao cádmio.

Figura 3. Principais componentes do ORY



Fonte: Ohara, et al., 2011

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Esse trabalho propõe avaliar a participação de um produto naturalmente encontrado no óleo do farelo de arroz, o ORY, na proteção contra o dano oxidativo induzido pela exposição aguda ao cádmio em testículos de camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar o efeito do ORY sobre dano oxidativo causado por uma exposição aguda ao cádmio em tecido testicular de camundongos por meio da determinação da peroxidação lipídica, carbonilação proteica e fragmentação do DNA.
- Avaliar a decorrência do tratamento com ORY sobre os níveis de ácido ascórbico e tióis não-proteicos como marcadores das defesas antioxidantes não-enzimáticas em testículos de camundongos expostos ao cádmio
- Medir implicação do ORY sobre a atividade das enzimas δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferase (GST) em testículos de camundongos expostos ao cádmio.
- Quantificar o acúmulo de cádmio nos testículos de camundongos expostos ao metal, e a decorrência do tratamento com ORY sobre esse parâmetro.

4 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 à Revista *Food and Chemical Toxicology*.

**γ -Oryzanol protects against acute cadmium-induced oxidative
damage in mice testes**

Cristiano C. Spiazzi^a, Vanusa Manfredini^b, Fabiana E. Barcellos da Silva^c, Érico M. M. Flores^d, Aryele P. Izaguirry^a, Laura M. Vargas^a, Melina B. Soares^a, Francielli W. Santos^{a*}

* 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

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

^bLaboratório de Hematologia e Citologia Clínica, Campus Uruguaiana, Universidade Federal do Pampa, CEP 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil

^cNúcleo de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, Campus Uruguaiana, Universidade Federal do Pampa, CEP 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil

^dDepartamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105900, Santa Maria, RS, Brazil

Abstract

Cadmium is a non-essential heavy metal that is present at low levels mainly in food and water and also in cigar smoke. The present study evaluated the testicular damage caused by acute cadmium exposure and verified the protective role of γ -oryzanol (ORY). Mice were administrated with a single dose of 2.5 mg/kg of CdCl₂, and then treated with ORY (50 mM in canola oil, 5 mL/kg). Testes were removed after 24 hours and tested for lipid peroxidation (TBARS), protein carbonylation, DNA breakage, ascorbic acid, cadmium and non-proteic thiols contents, and for the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) and δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D). Cadmium presented a significant alteration in all parameters, except GPx and CAT activities. Therapy reduced in a slight degree cadmium concentration in testes (around 23%). ORY restored SOD and GST activities as well as TBARS production to the control levels. Furthermore, ORY partially recovered δ -ALA-D activity inhibited by cadmium. This study provides the first evidence on the therapeutic properties of ORY in protecting against cadmium-induced testicular toxicity.

Key-words: Cadmium; γ -oryzanol; testes; oxidative stress; antioxidant

1. Introduction

Cadmium is a non-essential heavy metal present in the environment at low levels, however anthropogenic activities has greatly increased its concentration in the atmosphere (ATSDR, 2008; WHO, 2010). Its emission in the atmosphere has been a health concern due to its long biological half-life in many living beings, including humans (10-35 years) (WHO, 2011). It may accumulate in many organs, such as liver and kidneys (Jihen, et al., 2008), lungs (Klimisch, 1993; Luchese, et al., 2009) and testes (Haouem, et al., 2008). Contamination occurs mainly through food intake, but cigar smoke is also one of the major sources of exposures, bearing in mind the fact that lung absorption of cadmium is almost 10-fold higher than gastrointestinal absorption (Goering, et al., 1994; Waalkes, 2003). Thus, an average person absorbs roughly 1 µg Cd/day via food, while an additional 1-3 µg Cd/day is absorbed by smoking one pack of cigarettes per day (ATSDR, 2008), therefore heavy smokers have more than twice the Cd body burden (Lewis, et al., 1972).

This heavy metal has the potential to affect reproduction and development in many different ways, and at every stage of reproductive process (Thompson and Bannigan, 2008). Testes seem to be greatly affected by cadmium (Santos, et al., 2004a; Santos, et al., 2004b). Cadmium can cause significant pathologies, such as haemorrhage, oedema, atrophy and calcification (Santos, et al., 2006; Brandão, et al., 2009). Many authors have related these tissue damages to oxidative stress, either by formation of free radicals or inhibition of cellular defenses (Santos, et al., 2004a; Acharya, et al., 2008; Ognjanović, et al., 2010). The mechanisms for such interactions are not fully understood, since cadmium cannot participate directly in Fenton reactions (Moriwaki, et al., 2008). Consequently, the use of antioxidant compounds could help to prevent or reduce the damages caused by cadmium.

Rice is the staple food for the largest number of people on Earth, being the most important economic activity in the world (Maclean, et al., 2002). Through its milling process, rice bran is obtained when removed from the starchy endosperm of raw rice (Lakkakula, et al., 2004). Rice bran oil (RBO) contains a significant number of the antioxidant compounds (or biological active compounds), including about 0.1–0.14% vitamin E components and 0.9–2.9% γ -oryzanol; the concentrations can diverge substantially according to the origin of the rice bran (Diack and Saska, 1994; Hu, et al., 1996; Lloyd, et al., 2000).

γ -Oryzanol is a fraction of RBO containing a mixture of steryl and other triterpenyl esters of ferulic acid (Rogers, et al., 1993; Orthofer, 2005), in which cycloartenyl ferulate, 24-methylenecycloartenyl ferulate, β -sitosterol ferulate and campesterol ferulate are the major

compounds (Lloyd, et al., 2000; Xu and Godber, 1999). γ -Oryzanol is thought to be the main antioxidant component of RBO. Xu et al. (2001) compared the antioxidant activities of vitamin E components (α -tocopherol, α -tocotrienol, γ -tocopherol and γ -tocotrienol) against γ -oryzanol major constituents. It was demonstrated that the last had higher activities, being 24-methylenecycloartenyl ferulate the one with the highest.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the possible protective role of the nutritional source ORY in testicular oxidative damage induced by acute cadmium exposure. Thus, we evaluated enzymatic (SOD, CAT, GPx, GST, δ -ALA-D) and non-enzymatic (ascorbic acid and non-proteic thiols) antioxidant defenses as well as lipid peroxidation, proteins oxidation, DNA damage and cadmium accumulation in mice testes.

2. Methods and Materials

2.1. Reagents

γ -Oryzanol was purchased from Tokyo Chemical Industry Co., LTD. (Tokyo, Japan). Cadmium chloride, glutathione reductase from baker's yeast, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced tetrasodium salt (NADPH), 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) 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. Treatment

Male adult Swiss albino mice (25-30g) 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 and water *ad libitum*. The animals were separated in four groups: control; cadmium; ORY; cadmium/ORY. ORY treatment was given orally through gavage at a dose of 5 mL/kg b.w.; saline and cadmium (2.5 mg Cd/kg b.w.) were administrated intraperitoneally, according to our previous works (Santos, et al., 2004a; Ardaís, et al., 2008). Canola oil was used as control and also as diluent for ORY (50 mM). ORY concentration was similar to the dose used by Nagasaka et al. (2011) (Nagasaka, et al., 2011). Therapy was given just after the administration of cadmium solution. The experimental scheme can be better visualized at Table 1. The animals were euthanized 24 hours after cadmium administration using sodium pentobarbital (100 mg/kg, i.p.). The testes were

removed, homogenised in buffer and stored at negative 20°C until analysis, except for δ -ALA-D activity, which was assessed shortly after testes removal. This study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of Federal University of Pampa (Protocol n° 004/2011).

2.3. Non-enzymatic assay

2.3.1. Lipid peroxidation (TBARS)

The testes were rapidly homogenized in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 (1/10, w/v) and centrifuged at 2400 x g for 15 min. An aliquot (100 μ L) of homogenized was incubated at 95 °C for 2 h. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) were determined as described (Ohkawa, et al., 1979).

2.3.2. Determination of non-protein thiols (NPSH)

NPSH levels were determined by the method of Ellman (1959) (Ellman, 1959). To determine NPSH, a sample aliquot was mixed (1:1) with 10% trichloroacetic acid. After the centrifugation, the protein pellet was discarded and free -SH groups were determined in the clear supernatant. An aliquot of supernatant was added in 1 M potassium phosphate buffer pH 7.4 and 10 mM DTNB. The colour reaction was measured at 412 nm. NPSH levels were expressed as nmol NPSH/g tissue.

2.3.3. Cadmium analysis

Cadmium concentration was analysed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (PerkinElmer SCIEX, Elan DRC II model, Thornhill, Canada). The samples were digested with nitric acid for 30 min at 90°C, followed by 90 min at 120°C and then more 30 min at 120°C with addition of hydrogen peroxide.

2.3.4. Ascorbic acid

Ascorbic acid was determined according to method previously described (Jacques-Silva, et al., 2001). Proteins were precipitated with 10 volumes of ice-cold 5% TCA solution, and then incubated at 37 °C for 3 hours with a system containing dinitrophenylhydrazine (DNPH). The reaction was ended with sulphuric acid, and the assessed at 520 nm.

2.3.5. Carbonyl groups determination

The formation of carbonyl groups, a parameter of oxidative damage to proteins, was measured based on the reaction of these groups with dinitrophenylhydrazine (DNPH), as

previously described (Levine, et al., 1990). Samples were incubated at laboratory temperature in the dark for 60 min, stirring at 15-minute intervals. After centrifugation, the samples were washed three times with 1 mL of ethanol-ethyl acetate (1:1; v/v) to remove the residual DNPH reagent. The final precipitates were dissolved in 6 N guanidine hydrochloride solution (1 mL). The absorption of the product of reaction was measured in a spectrophotometer at 370 nm. Results were expressed as nmol carbonyl/mg protein.

2.4. Single cell gel electrophoresis (comet assay)

The alkaline comet assay was performed as described (Singh, et al., 1988) in accordance with general guidelines for use of the comet assay (Tice, et al., 2000; Hartmann, et al., 2003; Bajpayee, et al., 2005). Homogenized testes were suspended in agarose and spread into a glass microscope slide pre-coated with agarose. Agarose was allowed to set at 4°C for 5min. Slides were incubated in ice-cold lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10.0, and 1% triton X-100 with 10% DMSO) to remove cell proteins, leaving DNA as ‘nucleoids’. After the lysis procedure, slides were placed on a horizontal electrophoresis unit, covered with a fresh solution (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH>13) for 20 min at 4°C to allow DNA unwinding and the expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was performed for 20 min (25 V; 300 mA; 0.9 V/cm). Slides were then neutralized, washed in bi-distilled water and stained using a silver staining protocol (Maluf and Erdtmann, 2000; Nadin, et al., 2001). After drying at room temperature overnight, gels were analysed using an optical microscope. One hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analyzed. Cells were visually scored according to tail length and receive scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration) according to tail intensity (Tice, et al., 2000). Therefore, the damage index (DI) for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). The slides were analysed under blind conditions at least by two different individual. Median values of the scores were presented.

2.5. Enzymatic assay

2.5.1. *Superoxide dismutase (SOD) activity*

Superoxide dismutase activity was measured as described (Misra and Fridovich, 1972). This method is based on the ability of SOD to inhibit the auto-oxidation of epinephrine to

adrenochrome. The colour reaction can be monitored at 480 nm. One enzymatic unit (1 UI) is defined as the amount of enzyme necessary to inhibit the auto-oxidation rate in 50% at 26 °C.

2.5.2. *δ-Aminolevulinic acid dehydratase activity*

δ-Aminolevulinic acid dehydratase (*δ*-ALA-D) activity was assessed by measuring the formation of porphobilinogen (PBG), according to Sassa (1982) (Sassa, 1982) method, except that 45mM sodium phosphate buffer and 2.2mM 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 2 h at 37 °C. PBG formation was detected with the addition of modified Erlich's reagent at 555 nm.

2.5.3. *Glutathione peroxidase (GPx) activity*

Glutathione peroxidase (GPx) activity is measured in a system containing reduced glutathione (GSH), reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) and glutathione reductase (GR). GPx acts oxidizing GSH into glutathione disulphide (GSSG). To complete the cycle, GR reduces GSSG back to GSH at the expenses of NADPH. The decline in the concentration of NADPH can be monitored at 340 nm. The activity of GPx is given by the consumption of NADPH in nmol/min/mg of protein.

2.5.4. *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, 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.

2.5.5. *Catalase (CAT) activity*

CAT activity in samples was assayed spectrophotometrically as described (Aebi, 1984), which involves monitoring the disappearance of H₂O₂ in the presence of the sample at 240 nm. An aliquot was added in 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 and the enzymatic reaction was initiated by adding H₂O₂. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required for monitoring the disappearance of H₂O₂. The enzymatic activity was expressed as Units (U)/mg protein (1 U decomposes 1 µmol H₂O₂/min at pH 7 at 25 °C).

2.6. Protein determination

Protein concentration was measured by the method of Bradford (1976) (Bradford, 1976), using bovine serum albumin as the standard.

2.7. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm S.D. Statistical analysis was performed using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Duncan's multiple range test when appropriate. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant. For the comet assay, a non-parametric Kruskal–Wallis test, followed by Mann-Whitney U test was applied.

3. Results

3.1. Non-enzymatic assay

Cadmium administration produced an increase in testicular MDA levels (23%) when compared with the control group ($p < 0.05$). ORY treatment was able to restore the lipid peroxidation enhance induced by cadmium to the control levels (Table 2).

Non-proteic thiols levels were significantly reduced in testes of mice exposed to cadmium (35%) when compared to control group ($p < 0.001$). ORY therapy did not ameliorate this parameter (Table 2).

Acute cadmium exposure caused a significant accumulation of metal in testes (0.26 ± 0.0087 $\mu\text{g/g}$ tissue) (Table 2). ORY treatment presented a significant ($p < 0.05$) reduction on cadmium accumulation (around 27%). Control group, as well as ORY group, presented no sign of cadmium accumulation on testes tissue, therefore those groups were under quantification limits of the instrument (< 0.0006 $\mu\text{g/g}$).

Ascorbic acid level was markedly reduced in testes of mice treated with cadmium by 51% (Table 2). ORY treatment was not able to restore ascorbic acid levels of cadmium-exposed mice. Therapy administrated concomitantly with cadmium exhibited a slight decrease on its levels compared to cadmium-treated group.

Cadmium enhanced protein carbonylation in testes about 1.5-fold ($p < 0.001$) when compared with the control group. Therapy with ORY was not efficient in protecting proteins from carbonylation (Table 2).

3.2. Comet assay

Comet assay demonstrates the damage caused on DNA strand. Higher DNA strand migration through the electrophoresis gel represents a pronounced DNA fragmentation. In Fig. 1, it's possible to see that control group presented an average damage index (DI) of 9.60 ± 1.82 , similar to those of ORY (DI = 11.20 ± 1.30). Cadmium group presented a significantly higher damage index (DI = 42.20 ± 2.28) compared with the control group ($p < 0.001$). Therapy with ORY presented no sign of improvement on DNA fragmentation compared with the cadmium group, displaying a damage index of 42.00 ± 2.74 . Table 3 shows the sum of cells counted for each class of fragmentation found in slides prepared for each group.

3.3. Enzymatic assays

Cadmium reduced in 31% the SOD activity in mice testes compared with the control group ($p < 0.05$). ORY therapy was able to restore to the control levels the enzyme activity cadmium-inhibited (Fig. 2).

δ -ALA-D activity was strongly reduced (about 56%) in testes of cadmium-treated group when compared with control group ($p < 0.001$). γ -Oryzanol treatment partially recovered the inhibition in δ -ALA-D activity caused by cadmium (Fig. 3).

GST activity was compromised in the cadmium-treated group. There was a decrease of almost 40% in its activity compared with control group ($p < 0.05$). γ -oryzanol therapy was effective in restoring testicular enzyme activity cadmium-injured (Fig. 4).

Cadmium exposure did not alter the testicular GPx activity, as well as the therapy evaluated had no effect in this parameter (Fig. 5). No alteration in CAT activity in Cd-exposed group compared to control group was observed, however there was a small increase in its activity in Cd+ORY group when compared to control (around 38%) (Fig. 6).

4. Discussion

Cadmium is an environmental and industrial pollutant that adversely affects male reproductive system in humans and animals. Cd causes severe damage to embryos and the reproductive organs in adults including the ovary and testes, which are sensitive to Cd toxicity (Thompson and Bannigan, 2008). The generation of reactive oxygen species (ROS) and consequent oxidative damage to macromolecules have been established as a mechanism of cadmium toxicity. The reactive intermediates interact with the cellular macromolecules and

cause lipid peroxidation, DNA damage and membrane protein degradation (Szuster-Ciesielska, et al., 2000). Importantly, in the present study we verified that a single dose of cadmium (2.5 mg/kg b.w.) administered via intraperitoneal had a negative effect in the three parameters aforementioned in mice testes. Additionally, we also observed a reduction in the ascorbic acid and NPSH levels as well as an inhibition on SOD, δ -ALA-D and GST enzyme activities.

Since most of the damage caused by cadmium can be related to oxidative stress, antioxidant therapies could provide a potential means to treat conditions in which the formation of reactive oxygen species exceeds the capability of natural protective mechanisms. World interest in natural sources of antioxidant compounds, such as γ -oryzanol, has been constantly increasing. In this way, the present study provides the first evidence on the therapeutic properties of ORY in protecting against acute cadmium-induced oxidative damage in mice testes. γ -Oryzanol (ORY) is one of major bioactive components in rice bran and has been suggested to show serum cholesterol lowering (Wilson, et al., 2007; Rong, et al., 1997), anti-inflammatory (Akihisa, et al., 2000), and anti-cancer effects (Yasukawa, et al., 1998) and to function as an antioxidant (Xu, et al., 2001; Xu and Godber, 2001).

Considering our results, we believe that cadmium may affect the antioxidant barrier from testes via inhibiting the functional thiol groups of enzymes such as SOD, GST, δ -ALA-D as well as in reducing the NPSH levels. In fact, several studies have demonstrated that cadmium has a high affinity by thiol groups compared to other metals (Leverrier, et al., 2007; Thevenod, 2009). Therefore, one mechanism by which Cd causes oxidative stress can be related to depletion of SH-group-containing compounds, such as glutathione, the major NPSH in tissues (Stohs and Bagchi, 1995). Since glutathione is the most important antioxidant molecule present in cells, and plays a major role in detoxification of Cd and, therefore, protecting cells against Cd toxicity (Joseph, 2009), it reasonable to assert that a NPSH depletion such as the one demonstrated in our work could significantly contribute to the oxidative damage observed in lipids, proteins and DNA.

In fact, Cd-induced oxidative stress causes the production of typical oxidatively generated mutagenic lesions such as 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), contributing to DNA strand breaks (Mikhailova, et al., 1997). In the same way, Cd concentration has been positively correlated with 8-OHdG concentration in human seminal plasma (Xu, et al., 2003), while an inverse correlation was also found in human seminal plasma between ascorbic acid and 8-OHdG (Fraga, et al., 1991). Decreased GSH content might also reflect a decreased

concentration of vitamin C, which enters the cell mainly in the oxidized form where it is reduced by GSH. The loss of this vitamin has serious consequences, because in addition to its antioxidant function, it also plays a role in regenerating other antioxidants (Lee, 1999). This shows the importance of non-enzymatic antioxidants in DNA damage prevention. Our treatments were not able to restore GSH and ascorbic acid levels, which could explain why the treatments could not prevent DNA damage and protein carbonylation.

On the other hand, the therapy tested in our study was able to completely inhibit lipid peroxidation caused by cadmium administration. Spermatozoa are extremely susceptible to oxidative damage because of the high polyunsaturated fatty acids content in the plasma membrane (Vernet, et al., 2004), indeed peroxidative damage is currently regarded as the single most important cause of impaired testicular function (Aitken and Roman, 2008).

ORY was also effective in recover SOD activity. This enzyme keeps the concentration of superoxide radicals at low levels and therefore plays an important role in the defense against oxidative stress (Fridovich, 1997) and it is essential in testes defense strategies. Furthermore, ORY was also able to restore GST activity and partially improved δ -ALA-D activity. GST is a cytosolic enzyme involved in the detoxification of a range of xenobiotic compounds by conjugation to GSH which is essential in the maintenance of normal physiological processes (Dagget, et al., 1998). Thus, the decrease in the NPSH levels could be related with the reduction of this enzyme activity. Previously, we verified that δ -ALA-D activity was inhibited by cadmium exposure in testes (Santos, et al., 2004a; Santos, et al., 2004b; Brandão, et al., 2009) and ovary (Vargas, et al., 2012). In fact, it seems that δ -ALA-D activity is an important toxicological marker on reproductive systems. Taking into account that δ -ALA-D is a thiol enzyme, cadmium could be decreasing its activity by oxidation of thiol groups.

Therapy with ORY presented a slight but important decrease in cadmium accumulation on mice testes (approximately 23%). Although the decrease in cadmium accumulation could explain somehow the improvement demonstrated in some aspects of cadmium-induced injury, we believe that the main reason for this improvements are that γ -oryzanol have proved to be a potent antioxidant *in vitro*, for instance, different solvent extracts from *Japonica* rice containing γ -oryzanol demonstrated a chelating activity against Fe^{2+} ions, as well as DPPH scavenging ability, reducing power and linoleic acid peroxidation inhibition (Lai, et al., 2009). In another study, Chotimarkorn and Ushio (2008) have tested the effect of γ -oryzanol and ferulic acid in an ethanol-induced liver injury model in C57BL mice. Both treatments helped

to recover SOD activity, and it also presented a decrease in lipid peroxidation and an increase in reduced glutathione (GSH) levels.

In addition, Arlas et al. (2008) (Arlas, et al., 2008) have found that stallions supplemented with commercial rice oil (Gama-Horse, HT Nutri®, Brazil) containing γ -orizanol (1%) presented an improvement in its sperm quality regarding concentration, total motility and hypo-osmotic test (HOST) evaluating functionality of membrane. They have also noticed and increase in total antioxidant potential in the sperm of treated stallions, which would probably prevent lipid peroxidation of sperm membranes conferring the characteristics above-mentioned.

In conclusion, our study demonstrated that ORY have an antioxidant activity in testes of cadmium-exposed mice acutely. It was able to slightly reduce cadmium concentration in testes, prevent lipid peroxidation and recover SOD and GST activities. Nevertheless, ORY partially improved δ -ALA-D activity inhibited by cadmium. In fact, this study provides evidences of protective role of a nutritional substance in attenuating the cadmium toxicity and in lowering cadmium accumulation in mice testes.

Acknowledgements

The financial support by CNPq and FAPERGS is gratefully acknowledged. F.W.S. is the recipient of CNPq fellowship. CAPES is also acknowledged for financial support (M.Sc. Fellowship) to A.P.I. and L.M.V.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Acharya, U., Mishra, M., Patro, J., Panda, M., 2008. Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. *Reprod Toxicol.* 25, 84-88.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121-126.
- Aitken, R., Roman, S., 2008. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev.* 1, 15-24.
- Akihisa, T., Yasukawa, K., Yamaura, M., Ukiya, M., Kimura, Y., Shimizu, N., Arai, K., 2000. Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects. *J Agric Food Chem.* 48, 2313-2319.
- Ardais, A.P., Santos, F.W., Nogueira, C.W., 2008. Ebselen attenuates cadmium-induced testicular damage in mice. *J Appl Toxicol.* 28, 322-328.

Arlas, T., Pederzoli, C., Terraciano, P., Trein, C., Bustamante-Filho, I., Castro, F., Mattos, R., 2008. Sperm quality is improved feeding stallions with a rice oil supplement. *Anim Reprod Sci.* 107, 306.

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2008. Toxicological Profile for Cadmium (Draft for Public Comment). U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta.

Bajpayee, M., Pandey, A., Parmar, D., Dhawan, A., 2005. Current status of short-term tests for evaluation of genotoxicity, mutagenicity, and carcinogenicity of environmental chemicals and NCEs. *Toxicol Mech Methods.* 15, 155-180.

Bradford, 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.

Brandão, R., Santos, F.W., Oliveira, R., Roman, S.S., Nogueira, C.W., 2009. Involvement of non-enzymatic antioxidant defenses in the protective effect of diphenyl diselenide on testicular damage induced by cadmium in mice. *J Trace Elem Med Biol.* 23, 324-333.

Chotimarkorn, C., Ushio, H., 2008. The effect of trans-ferulic acid and gamma-oryzanol next term on ethanol-induced liver injury in C57BL mouse. *Phytomedicine.* 15, 951-958.

Dagget, D.A., Oberley, T.D., Nelson, S.A., Wright, L.S., Kornguth, S.E., Siegel, F.L., 1998. Effects of lead on rat kidney and liver: GST expression and oxidative stress. *Toxicology.* 128(3), 191-206.

Diack, M., Saska, M., 1994. Separation of vitamin E and γ -oryzanol from rice bran by normal-phase chromatography. *J Am Oil Chem Soc.* 71, 1211-1217.

Ellman, G., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 82, 70-77.

Fraga, C., Motchnik, P., Shigenaga, M., Helbock, H., Jacob, R., Ames, B., 1991. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88, 11003-11006.

Fridovich, I., 1997. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem.* 272, 18515-18517.

Goering, P., Waalkes, M., Klaasen, C., 1994. Toxicology of cadmium, in: Goyer, R., Cherian, M., (Eds), *Handbook of Experimental Pharmacology: Toxicology of Metals, Biochemical Effects*, Vol. 115. Springer-Verlag; New York, pp. 189-214.

Habig, W., Pabst, M., Jokoby, W., 1974. Glutathione S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 249, 7130-7139.

Haouem, S., Najjar, M., Hani, A., Sakly, R., 2008. Accumulation of cadmium and its effects on testis function in rats given diet containing cadmium-polluted radish bulb. *Exp Toxicol Pathol.* 59, 307-311.

Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R., 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis.* 18, 45-51.

Hu, W., Wells, J., Shin, T., Godber, J., 1996. Comparison of isopropanol and hexane for extraction of vitamin E and oryzanol from stabilized rice bran. *J Am Oil Chem Soc.* 73, 1653-1656.

Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Flores, E.M., Rocha, J.B.T., 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol Toxicol.* 88, 119-125.

Jihen, E., Imed, M., Fatima, H., Abdelhamid, K., 2008. 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.* 46, 3522-3527.

- Joseph, P., 2009. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 238, 272-279.
- Klimisch, H., 1993. Lung deposition, lung clearance and renal accumulation of inhaled cadmium chloride and cadmium sulphide in rats. *Toxicology.* 84, 103-124.
- Lai, P., Li, K., Lu, S., Chen, H., 2009. Phytochemicals and antioxidant properties of solvent extracts from Japonica rice bran. *Food Chem.* 117, 538-544.
- Lakkakula, N., Lima, M., Walker, T., 2004. Rice bran stabilization and rice bran oil extraction using ohmic heating. *Bioresour Technol.* 92, 157-161.
- Lee, I., 1999. Antioxidant vitamins in the prevention of cancer. *P Assoc Am Physician.* 111, 10-15.
- Leverrier, P., Montigny, C., Garrigos, M., Champeil, P., 2007. Metal binding to ligands: cadmium complexes with glutathione revised. *Anal. Biochem.* 371, 215-228.
- Levine, R., Garland, D., Oliver, C., Amici, A., Climent, I., Lenz, A., Ahn, B., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464-478.
- Lewis, G.P., Jusko, W.J., Coughlin, L.L., Hartz, S., 1972. Cadmium Accumulation in Man: Influence of Smoking, Occupation, Alcoholic Habit and Disease. *J Chronic Dis.* 25, 717-726.
- Lloyd, B., Siebenmorgen, T., Beers, K., 2000. Effects of commercial processing on antioxidants in rice bran. *Cereal Chem.* 77, 551-555.
- Luchese, C., Pinton, S., Nogueira, C., 2009. Brain and lungs of rats are differently affected by cigarette smoke exposure: Antioxidant effect of an organoselenium compound. *Pharmacol Res.* 59, 194-201.
- Maclean, J., Dawe, D., Hardy, B., Hettel, G., 2002. Rice Almanac - Source Book for the Most Important Economic Activity on Earth. CABI Publishing, Wallingford
- Maluf, S., Erdtmann, B., 2000. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res.* 471, 21-27.
- Mikhailova, M., Littlefield, N., Hass, B., Poirier, L., Chou, M., 1997. Cadmium-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation, DNA strand breaks and antioxidant enzyme activities in lymphoblastoid cells. *Cancer Lett.* 115, 141-148.
- Misra, H., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 247, 3170-3175.
- Moriwaki, H., Osborne, M., Phillips, D., 2008. Effects of mixing metal ions on oxidative DNA damage mediated by a Fenton-type reduction. *Toxicol In Vitro.* 22, 36-44.
- Nadin, S., Vargas-Roig, L., Ciocca, D., 2001. A silver staining method for singlecell gel assay. *J Histochem Cytochem.* 49, 1183-1186.
- Nagasaka, R., Yamsaki, T., Uchida, A., Ohara, K., Ushio, H., 2011. γ -Oryzanol recovers mouse hypoalbuminemia induced by animal fat ingestion. *Phytomedicine.* 18, 669-671.
- Ognjanović, B., Marković, S., Đorđević, N., Trbojević, I., Štajn, A., Saičić, Z., 2010. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. *Reprod Toxicol.* 29, 191-197.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95, 351-358.
- Orthofer, F.T., 2005. Rice Bran Oil, in: F. Shahidi (Ed), *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, sixth ed. John Wiley & Sons, Inc., New Hersey, pp. 465-89.
- Rogers, E., Rice, S., Nicolosi, R., Carpenter, D., McClelland, C., Romanczyk, L., 1993. Identification and quantitation of γ -oryzanol components and simultaneous assessment of tocopherols in rice bran oil. *J Am Oil Chem Soc.* 70(3), 301-307.
- Rong, N., Ausman, L., Nicolosi, R., 1997. Oryzanol decreases cholesterol absorption and aortic fatty streaks in hamsters. *Lipids.* 32, 303-309.

Santos, F.W., Graça, D.L., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Weis, S.N., Favero, A.M., Nogueira, C.W., 2006. Sub-chronic administration of diphenyl diselenide potentiates cadmium-induced testicular damage in mice. *Reprod Toxicol.* 22, 546-550.

Santos, F.W., Oro, T., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nascimento, P.C., Nogueira, C.W., 2004a. Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. *Toxicol Lett.* 152, 255-263.

Santos, F.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nascimento, P.C., Marques, M.S., Nogueira, C.W., 2004b. Efficacy of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice. *Food Chem Toxicol.* 152, 255-263.

Sassa, S., 1982. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme.* 28, 133-145.

Singh, N., McCoy, M., Tice, R., Schneider, E., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175, 184-191.

Stohs, S., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Bio Med.* 18, 321-336.

Szuster-Ciesielska, A., Stachura, A., Słotwińska, M., Kamińska, T., Sniezko, R., Paduch, R., Abramczyk, D., Filar, J., Kandefer-Szerszeń, M., 2000. The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology.* 145, 159-171.

Thevenod, F., 2009. Cadmium and cellular signaling cascade: to be or not to be?. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 221-239.

Thompson, J., Bannigan, J., 2008. Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reprod Toxicol.* 25, 304-315.

Tice, R.R., Agurell, E., Anerson, D., Burlinson, B., Hartemann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 35, 206-221.

Vargas, L.M., Soares, M.B., Izaguirry, A.P., Lüdtke, D.S., Braga, H.C., Savegnago, L., Wollenhaupt, S., Brum, D.D., Leivas, F.G., Santos, F.W., 2012. Cadmium inhibits the ovary δ -aminolevulinic acid dehydratase activity in vitro and ex vivo: Protective role of selenofuranoside. *J Appl Toxicol.*, In Press (doi: 10.1002/jat.2783).

Vernet, P., Aitken, R., Drevet, J., 2004. Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol Cell Endocrinol.* 216, 31-39.

Waalkes, M., 2003. Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res.* 533, 107-120.

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

WHO, World Health Organization, 2011. Chemical fact sheets: Guidelines for Drinking-water Quality. 4th ed. World Health Organization, Geneva.

Wilson, T., Nicolosi, R., Woolfrey, B., Kritchevsky, D., 2007. Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters. *J Nutr Biochem.* 18, 105-112.

Xu, D.X., Shen, H.M., Zhu, Q.X., Chua, L., Wang, Q.N., Chia, S.E., Ong, C.N., 2003. The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutat Res.* 534, 155-163.

Xu, Z., Godber, J., 1999. Purification and Identification of Components of γ -Oryzanol in Rice Bran Oil. *J Agric Food Chem.* 47(7), 2724-2728.

Xu, Z., Godber, J., 2001. Antioxidant activities of major components of γ -oryzanol from rice bran using a linoleic acid model. *J Am Oil Chem Soc.* 78, 645-649.

Xu, Z., Hua, N., Godber, J., 2001. Antioxidant Activity of Tocopherols, Tocotrienols, and γ -Oryzanol Components from Rice Bran against Cholesterol Oxidation Accelerated by 2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) Dihydrochloride. *J Agric Food Chem.* 49, 2077–2081.

Yasukawa, K., Akihisa, T., Kimura, Y., Tamura, T., Takido, M., 1998. Inhibitory effect of cycloartenol ferulate, a component of rice bran, on tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Biol Pharm Bull.* 21, 1072-1076.

Legends

Figure 1 – Comet assay results of mice testes exposed to cadmium and the following treatment with γ -oryzanol (ORY). DNA breakage is expressed as Damage Index (DI), which varies from 0 to 400. Data are expressed as mean \pm SD, $n = 5$. Significant difference was considered when $p < 0.05$, and each letter was attributed to different statistical groups.

Figure 2 – Superoxide dismutase activity (SOD) in mice testes exposed to CdCl_2 and the effect of γ -oryzanol (ORY). Data are expressed as mean \pm SD, $n = 5$. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine autoxidation by 50% at 26 °C. Significant difference was considered when $p < 0.05$, and each letter was attributed to different statistical groups.

Figure 3 – Aminolevulinic acid dehydratase(δ -ALA-D) activity in mice testes exposed to CdCl_2 and the effect of γ -oryzanol (ORY). Activity is expressed as nmol of porphobilinogen formed per gram of protein in one hour as mean \pm SD, $n = 5$. One-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 testes exposed to CdCl_2 and the effect of γ -oryzanol (ORY). Activity are expressed as nmol of conjugated CDNB per milligram of protein in one minute, mean \pm SD, $n = 5$. One-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 – Glutathione Peroxidase activity (GPx) in mice testes exposed to CdCl_2 and the effect of γ -oryzanol (ORY). Activity are expressed as nmol of NADPH consumed per milligram of protein in one minute, mean \pm SD, $n = 5$. One-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 – Catalase activity (CAT) in mice testes exposed to CdCl_2 and the effect of γ -oryzanol (ORY). Activity are expressed as Units of catalase per milligram of protein, mean \pm SD, $n = 5$. One-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.

Figures

Fig. 1.

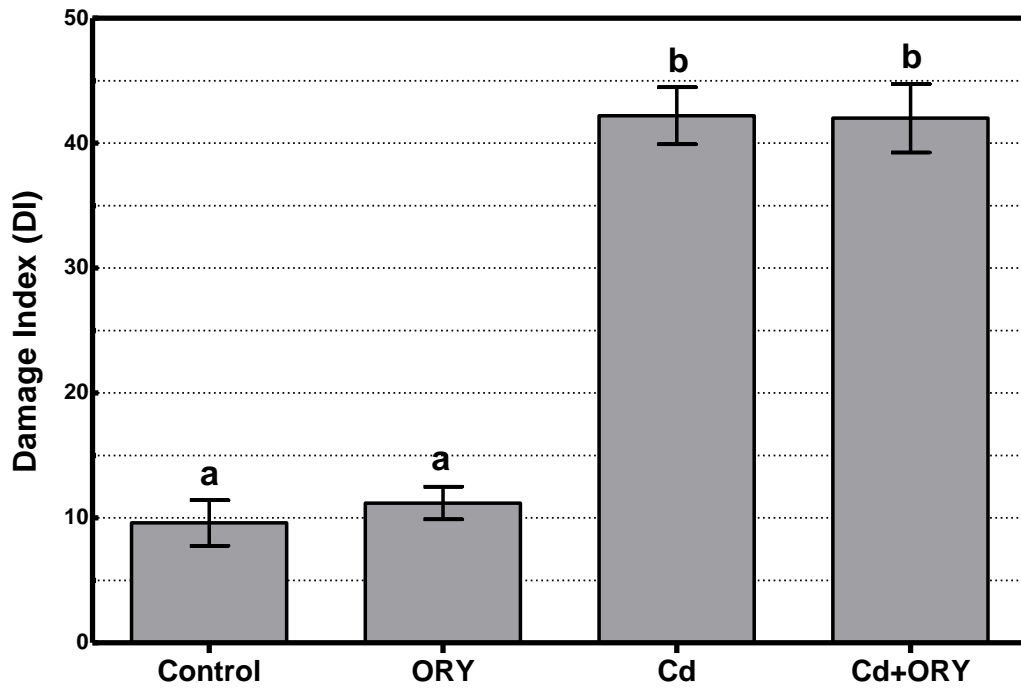


Fig. 2.

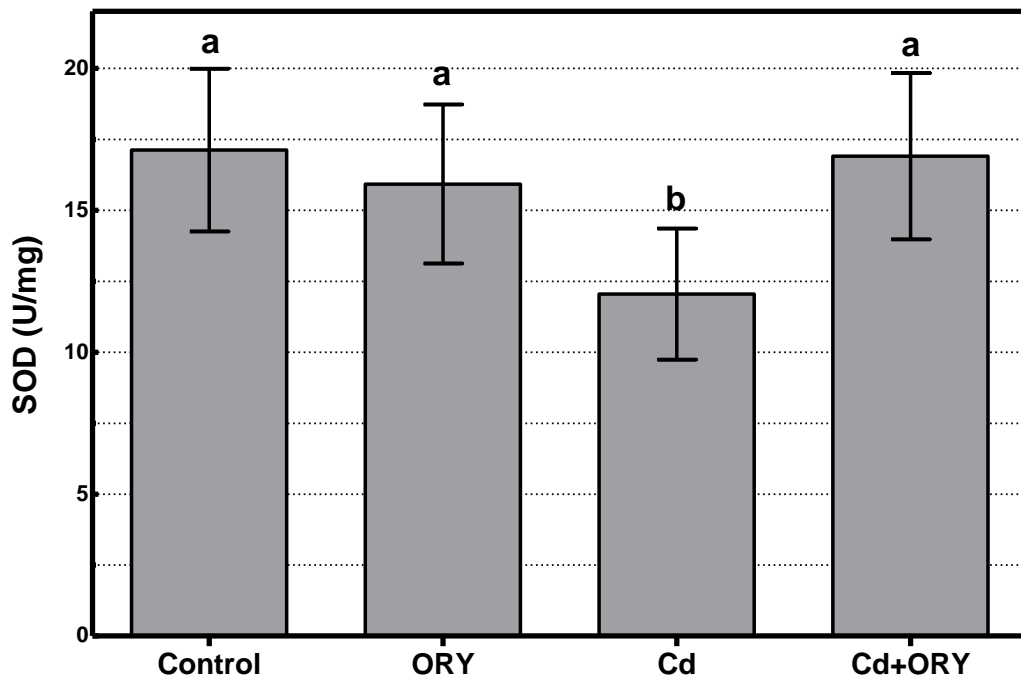


Fig. 3.

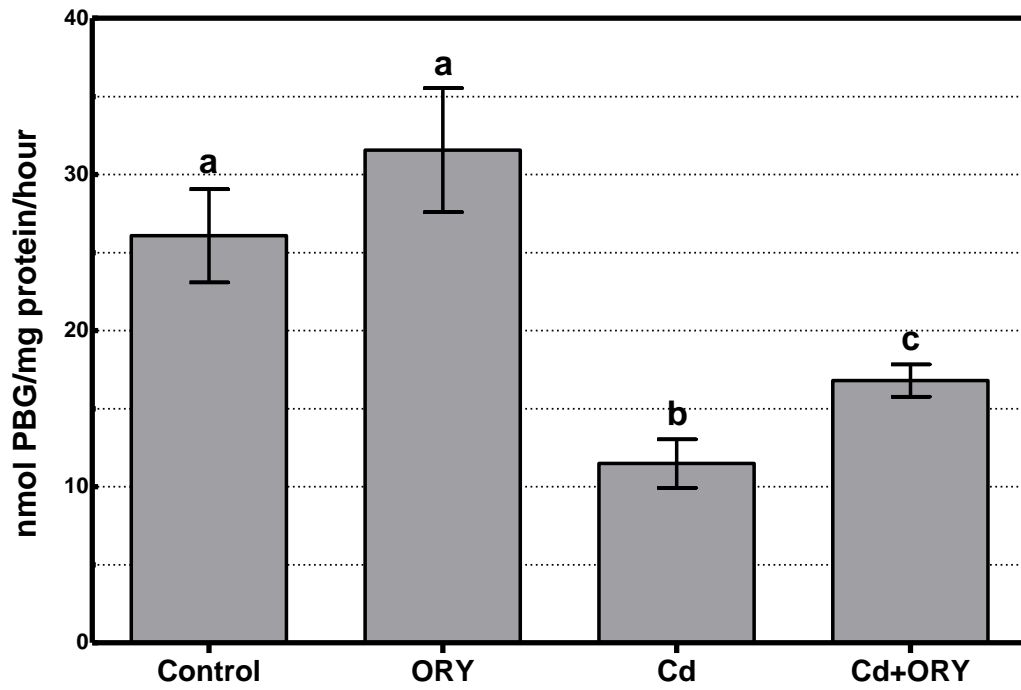


Fig. 4.

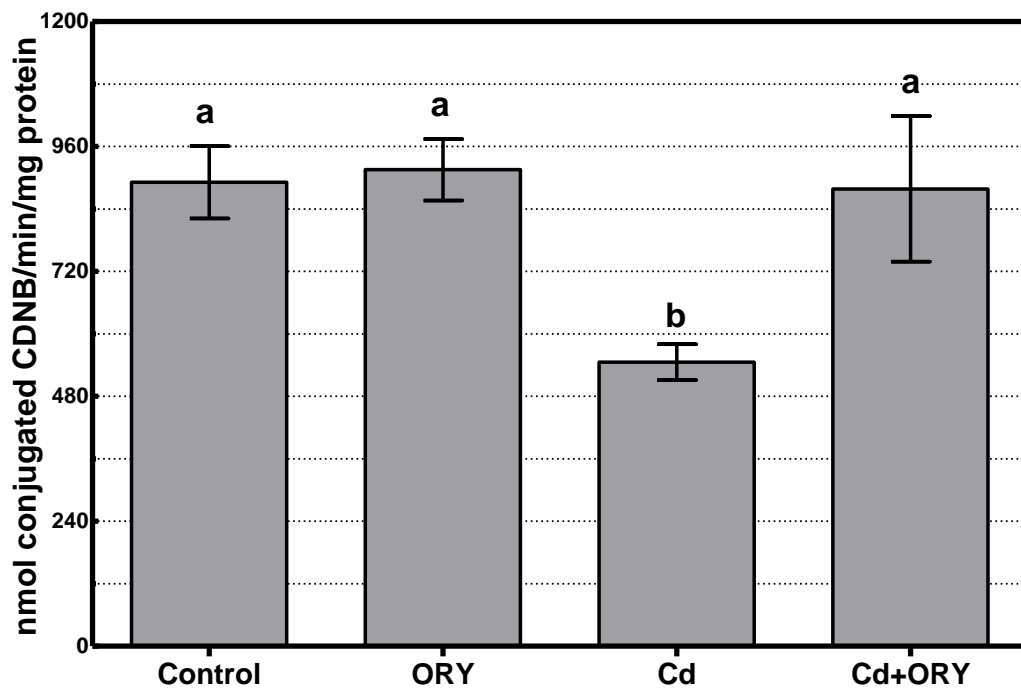


Fig. 5

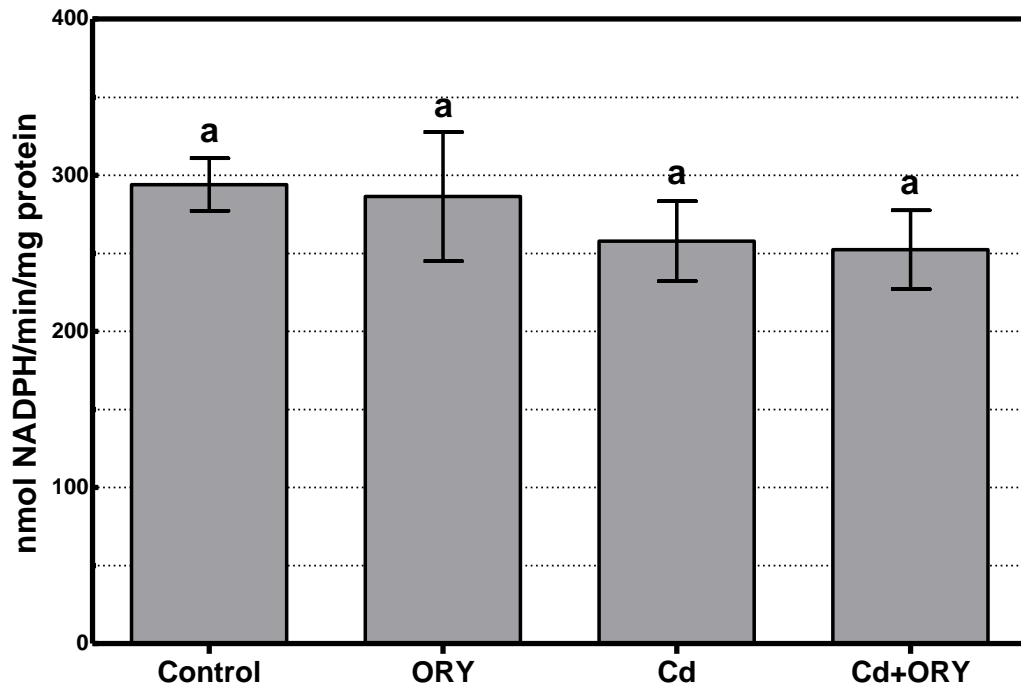
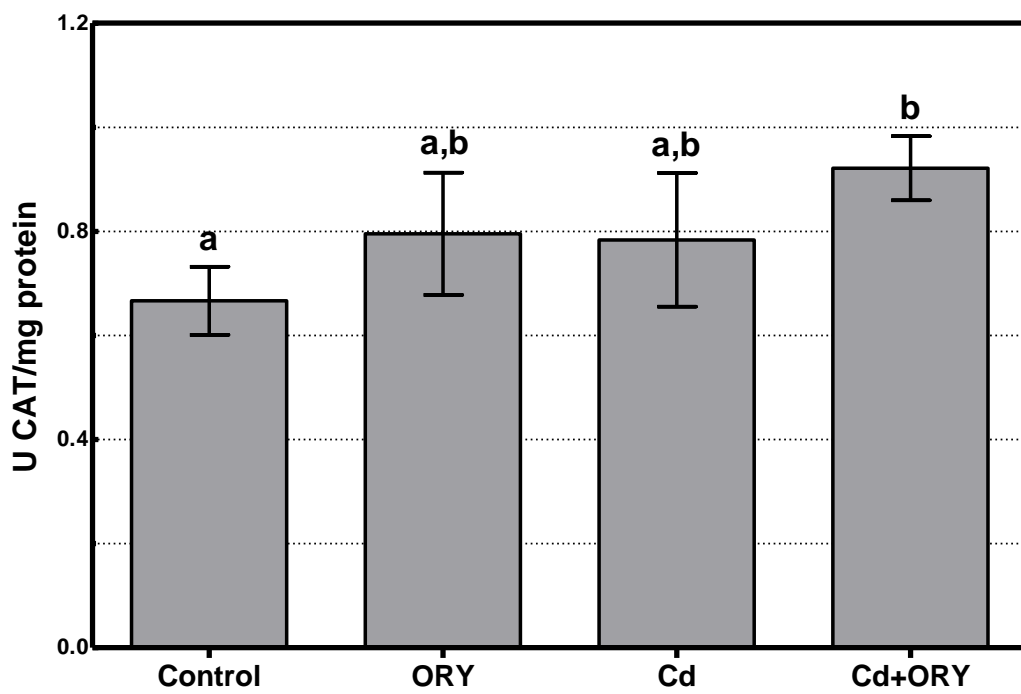


Fig. 6



Tables

Table 1 – Experimental model for cadmium-induced testes injury in mice ($n = 5$), using γ -oryzanol (ORY) as treatment.

Group	Treatment	
	<i>Intraperitoneal</i>	<i>Oral</i>
Control	Saline solution	Canola oil (5 mL/kg b.w.)
ORY	Saline solution	ORY 50 mM (5 mL/kg b.w.)
Cd	CdCl ₂ (2.5 mg/kg b.w.)	Canola oil (5 mL/kg b.w.)
Cd+ORY	CdCl ₂ (2.5 mg/kg b.w.)	ORY 50 mM (5 mL/kg b.w.)

Table 2 – Effect of γ -oryzanol (ORY) on non-enzymatic parameters evaluated on testes of mice exposed to cadmium.

Groups	Cadmium concentration ($\mu\text{g/g}$)	Ascorbic acid ($\mu\text{g/g}$ of wet tissue)	NPSH (nmol NPSH/g of tissue)	MDA (mg/g of protein)	Protein carbonyl (nmol/mg of protein)
Control	$< 0.0006^{a,*}$	516.1 ± 15.4^a	613.1 ± 73.9^a	295.3 ± 33.6^a	3.984 ± 0.54^a
ORY	$< 0.0006^{a,*}$	$479.5 \pm 37.6^{a,b}$	$548.6 \pm 73.9^{a,c}$	322.9 ± 19.7^a	3.556 ± 1.18^a
Cd	0.26 ± 0.0087^b	262.1 ± 5.4^c	399.3 ± 24.2^b	429.2 ± 55.0^b	5.862 ± 0.45^b
Cd+ORY	0.19 ± 0.0184^c	217.8 ± 22.8^d	$455.8 \pm 42.5^{b,c}$	278.5 ± 19.7^a	6.906 ± 0.70^b

All data are expressed as mean \pm S.D. with $n = 5$. Different letters represent different statistical groups when $p < 0.05$ using one-way ANOVA, followed by Duncan's post-hoc test. * Quantification limit of the instrument used to measure cadmium concentration on mice testes.

Table 3 – Degrees of damage according to migration of DNA strands on comet assay.

Groups	n	DI (mean \pm SD)	Damage Class ($\sum_{\text{cells counted}}$)				
			0	1	2	3	4
Control	5	9.6 ± 1.82	452	48	0	0	0
ORY	5	11.2 ± 1.30	444	56	0	0	0
Cd	5	42.2 ± 2.28	340	110	49	1	0
Cd+ORY	5	42.0 ± 2.74	343	106	49	2	0

Damage classes varies from 0 (no migration) to 4 (maximal migration), which can be visualized by the length of the comet "tail". Damage index (DI) values are expressed as mean \pm SD, $n = 5$.

5 CONCLUSÕES

Verificou-se que o tratamento com um produto naturalmente encontrado no óleo do farelo de arroz, o ORY, foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica causada pelo cádmio em testículos de camundongos, o que por si só já indica uma proteção contra o dano oxidativo. Porém o tratamento não foi efetivo em proteger contra o dano em proteínas e lipídios.

Além disso, o ORY foi capaz de proteger totalmente contra a inibição causada pelo cádmio nas atividades das enzimas SOD, GPx e GST. Ainda, o tratamento preveniu parcialmente a inibição causada pelo cádmio à enzima δ -ALA-D. As enzimas GPx e CAT não apresentaram nenhuma alteração com o tratamento (ORY) e com a exposição ao metal.

O ORY também não conseguiu proteger contra a redução vista em antioxidantes não-enzimáticos (ácido ascórbico e tióis não-proteicos) causados pela exposição de cádmio em testículos de camundongos.

Porém, notou-se uma pequena redução no acúmulo de cádmio nos testículos, o que poderia explicar de certa forma as melhoras percebidas nos outros parâmetros avaliados.

Apesar do tratamento não ter sido efetivo em reverter a carbonilação proteica e fragmentação do DNA induzidas pelo cádmio, os resultados indicam que há atividade do ORY sobre os parâmetros antioxidantes envolvidos no sistema reprodutivo, sendo este o primeiro estudo a demonstrar tal tipo de atividade. Um esquema representativo dos resultados está disponível no APÊNDICE A.

Entretanto, mais estudos precisam ser realizados para elucidar quais os possíveis mecanismos de ação do ORY, e quais outros parâmetros são afetados por ele a nível de sistema reprodutivo.

6 PERSPECTIVAS

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

- Avaliar o efeito do ORY em um modelo de exposição crônica ao cádmio, para posterior avaliação histológica dos testículos, assim como avaliação espermática levando em consideração a concentração, motilidade, morfologia, etc.
- Verificar os níveis de testosterona, bem como a atividade de enzimas que fazem parte da rota de síntese de hormônios esteroidais, com o objetivo de investigar o efeito do ORY sobre a esteroidogênese em camundongos expostos cronicamente ao cádmio.
- Baseado em relatos da literatura, há evidências de que a utilização de emulsões aumenta a absorção de compostos lipossolúveis, dessa forma a utilização da terapia com ORY em diferentes tipos de emulsões seria uma alternativa a fim de aumentar a biodisponibilidade deste composto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acharya, U., Mishra, M., Patro, J., & Panda, M. (2008). Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. *Reproductive Toxicology*, 25, pp. 84-88.
- Agarwal, A., Nallella, K., Allamaneni, S., & Said, T. (2004). Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive Biomedicine Online*, 8, pp. 616-627.
- Aitken, R. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7, pp. 559-668.
- Aitken, R., & Fisher, H. (1994). Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioassays*, 16, pp. 259-267.
- Arlas, T., Pederzoli, C., Terraciano, P., Trein, C., Bustamante-Filho, I., Castro, F., et al. (2008). Sperm quality is improved feeding stallions with a rice oil supplement. *Animal Reproduction Science*, 107, p. 306.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2011). *Detailed data table for the 2011 priority list of hazardous substances that will be the subject of toxicological profiles*. Acesso em 13 de Agosto de 2012, disponível em <http://www.atsdr.cdc.gov/SPL/index.html>
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2008). Toxicological Profile for Cadmium (Draft for Public Comment). Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Ausman, L. A., Rong, N., & Nicolosi, R. J. (2005). Hypocholesterolemic effect of physically refined rice bran oil: studies of cholesterol metabolism and early atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, pp. 521-529.
- Bansal, A., & Bilaspuri, G. (2011). Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Veterinary Medicine International*.
- Bao, J., & Corke, H. (2004). RICE | Genetics. In: C. Wrigley (Ed.), *Encyclopedia of Grain Science* (pp. 48-61). Oxford: Elsevier.
- Cai, L., Liu, Q., & Cherian, M. (2010). Metallothionein and Intracellular Sequestration of Metals. In: C. McQueen, *Comprehensive Toxicology* (Vol. 4, pp. 501-5017). Oxford: Elsevier.
- Chotimarkorn, C., & Ushio, H. (2008). The effect of trans-ferulic acid and gamma-oryzanol on ethanol-induced liver injury in C57BL mouse. *Phytomedicine*, 15, pp. 951-958.

- Chotimarkorn, C., Benjakul, S., & Silalai, N. (2008). Antioxidant components and properties of five long-grained rice bran extracts from commercial available cultivars in Thailand. *Food Chemistry*, *111*, pp. 636–641.
- Dal Moro, J., Rosa, C. S., & Hoelzel, S. C. (2004). Composição centesimal e ação antioxidante do farelo de arroz e seus benefícios à saúde. *Disciplinarum Scientia*, *4*(1), pp. 33-44.
- Dalton, T., He, L., Wang, B., Miller, M., Jin, L., Stringer, K., et al. (2005). Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*, pp. 3401-3406.
- De, S., Enders, G., & Andrews, G. (1991). High levels of metallothionein messenger RNAs in male germ cells of the adult mouse. *Molecular Endocrinology*, *5*, pp. 628-636.
- Diack, M., & Saska, M. (1994). Separation of vitamin E and γ -oryzanols from rice bran by normal-phase chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *71*, pp. 1211-1217.
- Faostat, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistic Division (2010). Acesso em 21 de Março de 2011, disponível em FAO Statistic Division: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Ferreira, A., & Matsubara, L. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, *43*, pp. 61-68.
- Goering, P., Waalkes, M., & Klaasen, C. (1994). Toxicology of cadmium. In: R. Goyer, & M. Cherian, *Handbook of Experimental Pharmacology: Toxicology of Metals, Biochemical Effects* (Vol. 115, pp. 189-214). New York: Springer-Verlag.
- Goering, P., Waalkes, M., & Klaassen, C. (1995). Toxicology of cadmium. In: R. Boyer, R. Goyer, & M. Cherian (Eds.), *Toxicology of Metals: Biochemical Aspects. Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 115, pp. 189–213). New York: Springer-Verlag.
- Ha, T.-Y., Han, S., Kim, S.-R., Kim, I.-H., Lee, H.-Y., & Kim, H.-K. (2005). Bioactive components in rice bran oil improve lipid profiles in rats fed a high-cholesterol diet. *Nutrition Research*, *25*, pp. 597–606.
- Halliwell, B. (1991). Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role in Human Disease. *The American Journal of Medicine*, *91*, pp. 14-22.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, *186*, pp. 1-85.
- Halliwell, B., & Gutteridge, M. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine* (3rd Ed. ed.). New York: Oxford University Press.

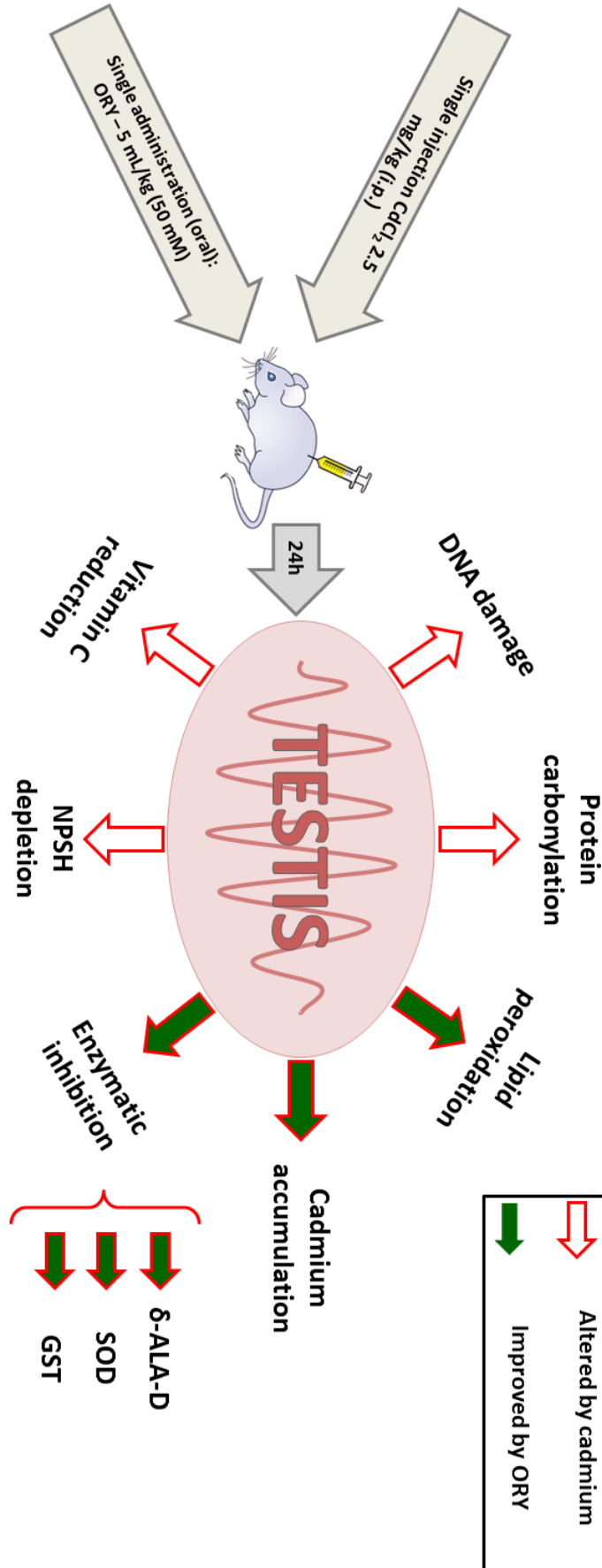
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, *142*, pp. 231-255.
- Haouem, S., Najjar, M., Hani, A., & Sakly, R. (2008). Accumulation of cadmium and its effects on testis function in rats given diet containing cadmium-polluted radish bulb. *Experimental and Toxicology Pathology*, *59*, pp. 307-311.
- Hu, W., Wells, J., Shin, T., & Godber, J. (1996). Comparison of isopropanol and hexane for extraction of vitamin E and oryzanols from stabilized rice bran. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *73*, pp. 1653–1656.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. (22 de Agosto de 1993). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Industry*, *58*, 119-238. Lyon: IARC.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2007). *Produção Agrícola Municipal: Cereais, Leguminosas e Oleaginosas*. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE.
- Iqbal, S., Bhangar, M., & Anwar, F. (2005). Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chemistry*, *93*, pp. 265–272.
- Jihen, E., Imed, M., Fatima, H., & Abdelhamid, K. (2008). 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 and Chemical Toxicology*, *46*, pp. 3522-3527.
- Johansen, P., Mulvad, G., Pedersen, H. S., Hansen, J. C., & Riget, F. (2006). Accumulation of cadmium in livers and kidneys in Greenlanders. *Science of the Total Environment*, *372*, pp. 58-63.
- Juliano, C., Cossu, M., Alamanni, M. C., & Piu, L. (2005). Antioxidant activity of gamma-oryzanol: Mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. *International Journal of Pharmaceutics*, *299*, pp. 146–154.
- Klaassen, C., Liu, J., & Choudhuri, S. (1999). Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, *39*, pp. 267-294.
- Klaassen, C., Liu, J., & Diwan, B. (2009). Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *238(3)*, pp. 215-220.
- Klimisch, H.-J. (1993). Lung deposition, lung clearance and renal accumulation of inhaled cadmium chloride and cadmium sulphide in rats. *Toxicology*, *84*, pp. 103-124.
- Lakkakula, N., Lima, M., & Walker, T. (2004). Rice bran stabilization and rice bran oil extraction using ohmic heating. *Bioresource Technology*, *92*, pp. 157-161.

- Lewis, G. P., Jusko, W. J., Coughlin, L. L., & Hartz, S. (1972). Cadmium Accumulation in Man: Influence of Smoking, Occupation, Alcoholic Habit and Disease. *Journal of Chronic Diseases*, 25, pp. 717-726.
- Liu, D., Colina-Ibarra, J., Kakuda, A., & Hue, S. (2008). The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C and β -carotene mixtures on the DPPH free radical. *LWT Food Science and Technology*, 41, pp. 1344-1349.
- Lloyd, B., Siebenmorgen, T., & Beers, K. (2000). Effects of commercial processing on antioxidants in rice bran. *Cereal Chemistry*, 77, pp. 551-555.
- Luchese, C., Brandão, R., Oliveira, R., Nogueira, C. W., & Santos, F. W. (2007). Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice. *Toxicology Letters*, 173, pp. 181-190.
- Maclean, J., Dawe, D., Hardy, B., & Hettel, G. (Eds.). (2002). *Rice Almanac - Source Book for the Most Important Economic Activity on Earth*. Wallingford: CABI Publishing.
- Makker, K., Agarwal, A., & Sharma, R. (2009). Oxidative stress & male infertility. *Indian Journal of Medical Research*, 129, pp. 357-367.
- Messaoudi, I., Hammouda, F., El Heni, J., Baati, T., Saïdi, K., & Kerkeni, A. (2010). Reversal of cadmium-induced oxidative stress in rat erythrocytes by selenium, zinc or their combination. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62, pp. 281-288.
- Moraes, F. P., & Colla, L. M. (2006). Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 3(2), pp. 109-122.
- Moriwaki, H., Osborne, M. R., & Phillips, D. H. (2008). Effects of mixing metal ions on oxidative DNA damage mediated by a Fenton-type reduction. *Toxicology in vitro*, 22, pp. 36-44.
- Nordberg, G. (2009). Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238, pp. 192-200.
- Ognjanović, B., Marković, S., Đorđević, N., Trbojević, I., Štajn, A., & Saičić, Z. (2010). Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. *Reproductive Toxicology*, 29, pp. 191-197.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, pp. 351-358.
- Ola-Mudathir, K. F., Suru, S. M., Fafunso, M. A., Obioha, U. E., & Faremi, T. Y. (2008). Protective roles of onion and garlic extracts on cadmium-induced changes in sperm characteristics and testicular oxidative damage in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46, pp. 3604-3611.

- Orthoefer, F. T. (2005). Rice Bran Oil. In F. Shahidi, *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (6th ed., pp. 465-489). John Wiley & Sons, Inc.
- Parrado, J., Miramontes, E., Jover, M., Gutierrez, J. F., Téran, L. C., & Bautista, J. (2006). Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. *Food Chemistry*, 98, pp. 742–748.
- Ray, P., Huang, B.-W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24, pp. 981-990.
- Rikans, L., & Yamano, T. (2000). Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 14(2), pp. 110-117.
- RITO Partnership. (2012). *Rice Bran Oil > Info*. Acesso em 11 de Setembro de 2012, disponível em <http://www.ricebranoil.info/>
- Rogers, E., Rice, S., Nicolosi, R., Carpenter, D., McClelland, C., & Romanczyk, L. (1993). Identification and quantitation of γ -oryzanol components and simultaneous assessment of tocopherols in rice bran oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70(3), pp. 301-307.
- Salehi-Ashtiani, K., Widrow, R., Markert, C., & Goldberg, E. (1993). Testis-specific expression of a metallothionein I-driven transgene correlates with undermethylation of the locus in testicular DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, pp. 8886-8890.
- Salgado, P. (1996). Toxicologia dos metais. In: S. Oga, *Fundamentos de toxicologia*. São Paulo: Atheneu.
- Santos, F. W., L. Graça, D., Zeni, G., Rocha, J. B., Weis, S. N., Favero, A. M., et al. (2006). Sub-chronic administration of diphenyl diselenide potentiates cadmium-induced testicular damage in mice. *Reproductive Toxicology*, 22, pp. 546–550.
- Santos, F. W., Oro, T., Zeni, G., Rocha, J. B., Nascimento, P. C., & W. Nogueira, C. (2004a). Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. *Toxicology Letters*, 152, pp. 255–263.
- Santos, F. W., Zeni, G., Rocha, J. B., Nascimento, P. C., Marques, M. S., & Nogueira, C. W. (2004b). Efficacy of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 152, pp. 255-263.
- Shuto, R. (2005). Itai-itai. In: P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology* (2^a ed.). Bethesda, USA: Elsevier.
- Sies, H. (1991). Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. *The American Journal of Medicine*, 91, pp. 31-38.

- Siu, E., Mruk, D., Porto, C., & Cheng, C. (2009). Cadmium-induced testicular injury. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238, pp. 240-249.
- Suzuki, J., Kodama, N., Molotkov, A., Aoki, E., & Tohyama, C. (1998). Isolation and identification of metallothionein isoforms (MT-1 and MT-2) in the rat testis. *Biochemical Journal*, 334, pp. 695-701.
- Thompson, J., & Bannigan, J. (2008). Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reproductive Toxicology*, 25, pp. 304-315.
- Vernet, P., Aitken, R., & Drevet, J. (2004). Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 216, pp. 31-39.
- Waalkes, M. P. (2003). Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research*, 533, pp. 107-120.
- WHO, World Health Organization. (2010). Preventing Disease Through Healthy Environments. *Exposure to Cadmium: A Major Public Health Concern*. Geneva: World Health Organization.
- Wilson, T. A., Nicolosi, R. J., Woolfrey, B., & Kritchevsky, D. (2007). Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, pp. 105–112.
- Xu, Z., & Godber, J. S. (1999). Purification and Identification of Components of γ -Oryzanol in Rice Bran Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(7), pp. 2724–2728.
- Xu, Z., & Godber, J. S. (2001). Antioxidant activities of major components of γ -oryzanol from rice bran using a linoleic acid model. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, pp. 645-649.
- Yang, H., Han, D., Kim, J., & Sim, J. (2006). Effects of α -Tocopherol on Cadmium-Induced Toxicity in Rat Testis and Spermatogenesis. *Journal of Korean Medical Science*, 21, pp. 445-451.

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 11.640, 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

PROTOCOLO Nº 004/2011

Título: Efeito do óleo do farelo de arroz e do gama-orizanol sobre o dano testicular induzido por cádmio

Pesquisador: Francielli Weber Santos Cibin

Campus: Uruguaiana

Telefone: (55) 91593160

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
Submission Confirmation - Yahoo! Mail

Página 1 de 1



Submission Confirmation

Quinta-feira, 13 de Setembro de 2012 16:05

De: "Food and Chemical Toxicology" <fct@elsevier.com>
Para: francieliweber@yahoo.com.br

Dear Dr Santos,

Your submission entitled "γ-Oryzanol protects against acute cadmium-induced oxidative damage in mice testes" has been received by Food and Chemical Toxicology

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/fct/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Food and Chemical Toxicology