

FELIPE COUTO SANTOS

**EFEITOS DO ARSÊNIO EM RATOS PÚBERES E ADULTOS EXPOSTOS
DURANTE A PRÉ-PUBERDADE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Mariana Machado Neves

Coorientadora: Ana Cláudia Ferreira Souza

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2020

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

Santos, Felipe Couto, 1985-
S237e Efeitos do arsênio em ratos púberes e adultos expostos
2020 durante a pré-puberdade / Felipe Couto Santos. – Viçosa, MG,
2020.

121 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Mariana Machado Neves.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Arsênio - Toxicologia. 2. Ratos como animais de
laboratório. 3. Toxicologia reprodutiva. 4. Fígado. 5. Rins.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 599.352

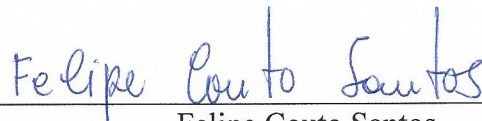
FELIPE COUTO SANTOS

**EFEITOS DO ARSÊNIO EM RATOS PÚBERES E ADULTOS EXPOSTOS
DURANTE A PRÉ-PUBERDADE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 15 de dezembro de 2020.

Assentimento:



Felipe Couto Santos
Autor



Mariana Machado Neves
Orientadora

À Maria Perpétua Couto Santos e José
Ventura dos Santos, pelo amor que
sempre me envolveram.

AGRADECIMENTOS

Encerrar qualquer etapa de vida é impossível sozinho. Devo muita às pessoas, pois, sem elas, seria impossível concluir este ciclo.

Devo sempre me lembrar da minha família. Aos meus queridos pais, José Ventura e Maria Perpétua, pelo amor e apoio que sempre foram incondicionais. Essas são as pessoas a quem nunca precisei provar nada. Agradeço a minha irmã Monalisa Couto Santos por confiar em mim e me ensinar como é amar imensamente alguém. Amo vocês! Obrigado por tudo!

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa (UFV) por me proporcionar a oportunidade de realizar o meu doutorado em uma instituição exemplo. Obrigado pelo crescimento profissional e pessoal. Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela formação e troca de experiências proporcionadas. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de pesquisa imprescindível na realização deste trabalho.

O meu muito obrigado a Mariana Machado Neves, pela orientação, por ter confiado em mim, pelos ensinamentos e por todas as contribuições ao longo deste trabalho. À minha co-orientadora Ana Claudia Ferreira Souza pela convivência e todo empenho investido para que este trabalho se concretizasse. Obrigado por terem feito tanto por mim.

Devo sincera gratidão às pessoas que tanto me auxiliaram e ensinaram durante a realização desse trabalho. Aos professores do Laboratório de Biologia Estrutural pelos ensinamentos adquiridos durante o curso. A secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Beth, pela atenção e disposição em ajudar. Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Estrutural pela amizade, colaboração, carinho e por me proporcionarem momentos tão agradáveis de aprendizado e descontração.

Agradeço ao Daniel Bastos pela valiosa ajuda durante todas as fases desses anos e, principalmente pela amizade. Ao Luiz Otávio e Renner Carvalho pela ajuda disponibilizada nessa reta final do curso. A Fernanda Ribeiro pelos ensinamentos e amizade construída em Viçosa.

Agradeço a LUVE, pela oportunidade de ser contemplado em fazer uma das coisas que mais gosto: jogar voleibol. Agradeço aos amigos de Ipatinga, Viçosa e da

vida que sempre estiveram presentes. Obrigado por serem pacientes e compreensíveis com as minhas ausências.

Agradeço ainda às pessoas que não foram citadas aqui, mas que de uma maneira ou de outra contribuíram para que eu pudesse concluir esse ciclo. Muito obrigado por tudo!

RESUMO

COUTO-SANTOS, Felipe, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2020. **Efeitos do arsênio em ratos púberes e adultos expostos durante a pré-puberdade.** Orientadora: Mariana Machado Neves. Coorientadora: Ana Claudia Ferreira Souza.

Sabe-se que a exposição ao arsênio pode induzir mudanças sistêmicas e provocar a disfunção dos órgãos. A maioria dos estudos focados no efeito do arsênio avalia a influência do metaloide na idade adulta. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros reprodutivos, hepáticos e renais de ratos Wistar púberes e adultos expostos ao arsênio durante a pré-puberdade. Filhotes machos com 21 dias de vida pós-natal (DPN) foram divididos em dois grupos ($n = 20/\text{grupo}$): Ratos controle receberam água filtrada e ratos expostos receberam 10 mg L^{-1} de arsênio do dia DPN 21 até DPN 51. No DPN 52, testículo, epidídimo, fígado, rins de 10 animais/grupo foram examinados quanto aos efeitos do arsênio sob abordagens morfológicas, estereológicas, bioquímicas, funcionais e moleculares. Os outros animais foram mantidos vivos em condições livre de arsênio até DPN 82, quando foram analisados considerando os mesmos parâmetros. Ademais, para avaliar os efeitos da exposição pré-púbere ao arsênio na competência reprodutiva masculina, os ratos adultos foram acasalados com fêmeas não expostas. Os animais púberes expostos ao arsênio apresentaram níveis aumentados de mRNA de SOD1, SOD2, CAT, GSTK1 e MT1 em seus testículos e SOD1, CAT e GSTK1 em seu epidídimo. Nesses órgãos, a atividade da catalase estava alterada, gerando subprodutos do estresse oxidativo. A expressão do gene antioxidante não foi alterada em ratos adultos, em contraste com a atividade alterada das enzimas antioxidantes. Alterações histológicas dos tecidos do testículo e epidídimo foram observadas em ratos púberes e adultos. Curiosamente, apenas ratos adultos exibiram uma diminuição notável nos níveis de testosterona sérica. Além disso, nossos resultados mostraram uma diminuição da produção diária de espermatozoides e do número de espermátides testiculares com resistência homogeneizada em ratos adultos expostos ao arsênio, bem como a contagem de espermatozoides em suas regiões epididimárias. Ratos sexualmente maduros exibiram baixa motilidade espermática e porcentagem de espermatozoides com membranas intactas após exposição pré-púbere ao arsênio, o que potencialmente contribuiu para o baixo potencial de fertilidade e a maior perda pré-implantação. A

análise proteômica de espermatozoides epididimários detectou 624 proteínas, correspondendo a 608 genes pareados em uma distribuição de 41 agrupamentos. A ontologia do gene identificou um processo glicolítico mais enriquecido e a atividade da GTPase em animais expostos ao arsênio. A análise de enriquecimento KEGG identificou maior enriquecimento de fosforilação oxidativa, glicólise / gliconeogênese, biossíntese de aminoácidos e metabolismo de carbono em espermatozoides de ratos expostos a arsênio, enquanto os animais controle exibiram maior enriquecimento no agrupamento de meiose de oócitos. Das 26 proteínas encontradas fosforiladas nesse estudo, MIEAP apresentou padrão de fosforilação apenas em animais expostos a arsênio. Em relação ao fígado e rins, nossos resultados mostraram que a exposição pré-púbere ao arsênio reduziu o conteúdo de glicogênio e zinco e aumentou a proporção de arsênio no fígado e nos rins de animais púberes. Além disso, o arsênio aumentou o volume de macrófagos e cobre no fígado e reduziu a atividade de SOD e CAT no órgão. No rim, a proporção de selênio reduziu nos animais adultos expostos ao arsênio. Em suma, as injúrias causadas pelo arsênio em animais púberes desapareceram, permaneceram, pioraram ou se recuperaram dependendo do parâmetro e órgão analisado, sugerindo possíveis distúrbios em ratos machos durante a vida adulta.

Palavras-chave: Arsenito. Fígado. Pré-púbere. Rins. Toxicologia Reprodutiva

ABSTRACT

COUTO-SANTOS, Felipe, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2020. **Effects of arsenic in pubertal and adult rats exposed during prepuberty.** Adviser: Mariana Machado Neves. Co-adviser: Ana Claudia Ferreira Souza.

It is known that exposure to arsenic can induce systemic changes and cause organ dysfunction. Most studies focused on the effect of arsenic evaluate the influence of the metalloid in adulthood. Thus, the objective of this work was to evaluate reproductive, hepatic and renal parameters of juvenile and adult rats exposed to arsenic during prepuberty. Male puppies of Wistar rats on the postnatal day (DPN) 21 were divided into two groups (n = 20 / group): Control rats received filtered water and exposed rats received 10 mg L⁻¹ of arsenic from day DPN 21 to DPN 51. In DPN 52, testis, epididymis, liver, kidneys of 10 animals / group were examined for effects under morphological, stereological, biochemical, functional and molecular approaches. The other animals were kept alive in arsenic-free conditions until DPN 82, and subsequently analyzed for the same parameters. In addition, to assess the effects of prepubertal exposure to arsenic on male reproductive competence, adult rats were mated with unexposed females. Puberty animals exposed to arsenic showed increased levels of SOD1, SOD2, CAT, GSTK1 and MT1 mRNA in their testicles and SOD1, CAT and GSTK1 in their epididymis. In these organs, the activity of catalase was altered, generating by-products of oxidative stress. The expression of the antioxidant gene was not altered in adult rats, in contrast to the altered activity of antioxidant enzymes. Histological changes in the tissues of the testis and epididymis were observed in pubescent and adult rats. Interestingly, only adult mice exhibited a noticeable decrease in serum testosterone levels. In addition, our results showed a decrease in the daily production of sperm and the number of testicular sperm with homogenized resistance in adult rats exposed to arsenic, as well as the sperm count in their epididymal regions. Sexually mature rats exhibited low sperm motility and percentage of sperm with intact membranes after prepubertal exposure to arsenic, which potentially contributed to low fertility potential and high preimplantation loss. The epididymal sperm proteome detected 624 proteins, corresponding to 608 paired genes in a distribution of 41 clusters. The gene's ontology identified a more enriched glycolytic process and GTPase activity

in animals exposed to arsenic. The KEGG enrichment analysis identified greater enrichment of oxidative phosphorylation, glycolysis / gluconeogenesis, amino acid biosynthesis and carbon metabolism in sperm from rats exposed to arsenic, while control animals exhibited greater enrichment in the cluster of oocyte meiosis. Of the 26 proteins found phosphorylated here, MIEAP showed a phosphorylation pattern only in animals exposed to arsenic. Regarding the liver and kidneys, our results showed that prepubertal exposure to arsenic reduced the content of glycogen and zinc and increased the proportion of arsenic in the liver and kidneys of pubescent animals. In addition, arsenic increased the volume of macrophages and copper in the liver and reduced the activity of SOD and CAT in the organ. In the kidney, the proportion of selenium decreased in adult animals exposed to arsenic. In short, the injuries caused by arsenic in pubertal animals disappeared, remained, worsened or recovered depending on the parameter and organ analyzed, suggesting possible disorders in male rats during adulthood.

Keywords: Arsenite. Liver. Prepubertal. Kidneys. Reproductive Toxicology

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
ARTIGO 1	26
ARTIGO 2	63
ARTIGO 3	93
CONCLUSÕES GERAIS	121

INTRODUÇÃO

Arsênio

O arsênio é um elemento químico largamente difundido na natureza e classificado como metaloide, uma vez que apresenta características dos metais e não metais. Este elemento tem sido reconhecido como metal pesado devido aos aspectos que regem a abordagem toxicológica (Jomova et al., 2011). O arsênio pode ser encontrado no meio ambiente em diversos níveis de valência (+5, +3, 0 e -3), os quais possibilitam a formação de compostos inorgânicos e orgânicos tanto no ambiente como no interior do corpo humano (WHO, 2011).

Este metaloide está presente na crosta terrestre o que permite que durante o processo de lixiviação ele possa alcançar as águas superficiais (Vahter, 2008; Flora, 2015). Ademais, o metaloide tem feito parte em diversos processos nas indústrias de fundição, processamento de produtos de preservação de madeira, semicondutores, bateria bem como na produção de pesticidas (WHO, 2011; Flora, 2015). Os seres vivos estão expostos ao arsênio, sobretudo através das rotas oral e inalatória. A exposição oral sucede do consumo de água e alimentos contaminados. A exposição a grandes concentrações de arsênio, em especial a partir da água contaminada, é vista como uma das fundamentais ameaças à saúde global (WHO, 2011).

Os efeitos nocivos do arsênio são relacionados quase que na sua maioria com sua composição química. Os compostos inorgânicos são considerados potencialmente mais tóxicos comparados com as espécies orgânicas e, considerando os compostos inorgânicos, o arsenito (As^{+3}) e o arsenato (As^{+5}) são as formas normalmente encontradas na natureza (Jomova et al., 2011). Os vários compostos de arsênio apresentam um decréscimo da toxicidade na ordem que se segue: compostos de arsenito inorgânico, compostos de arsenato inorgânico, compostos de arsenito orgânico e compostos de arsenato orgânico (USEPA, 2000). Os compostos de arsenito são considerados significativamente (60 vezes) mais nocivos do que forma oxidada, o arsenato. Tal comportamento se deve a capacidade desses compostos reagir com grupamentos tióis endógenos (Neves et al., 2004).

Os mamíferos metabolizam o arsênio inorgânico via metilação para ácido metilarsônico (MMA) e dimetilarsínico (DMA). O início desse processo é caracterizado

pela redução do arsênio pentavalente para trivalente e adição do grupo metil (Vahter, 2002). A princípio, o fígado foi estabelecido como o principal sítio de metilação do arsênio, em especial após a sua ingestão, quando o metaloide passa pela circulação hepática. Todavia, o processo de metilação pode estar presente em outros órgãos, como testículos, rins e pulmão (Vahter, 2002). A ação da metilação torna as formas de arsênio inorgânicas menos reativas aos tecidos, o que facilita o processo de eliminação através da excreção renal (Barra et al., 2000). Contudo, mesmo com o auxílio da metilação, alguns subprodutos do arsênio ainda podem ser encontrados nos tecidos (Celik et al.; 2008).

Toxicidade do arsênio

A Organização Mundial da Saúde estabelece o arsênio como sendo um elemento químico passível de induzir graves riscos à saúde humana de modo que sua concentração tolerada em águas potáveis é de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ (WHO, 2011). Ainda assim, é considerado que cerca de mais de 100 milhões de pessoas no mundo estão expostas a concentrações elevadas de arsênio ($> 50 \mu\text{g L}^{-1}$) na água de beber (Moon et al., 2012). Em alguns países como Índia, Taiwan, China, Bangladesh, Austrália, Estados Unidos, Chile, Argentina e México têm sido observado questões complexas em relação à contaminação das suas fontes de água pelo arsênio (IARC, 2004; Flora, 2015). No Brasil foram constatados grandes níveis desse metaloide no ambiente ocasionado pela mineração de ouro, refino de metais, intemperismo de rochas e associação deste elemento ao minério de Manganês lavrado nas regiões do Quadrilátero Ferrífero (Minas Gerais), Vale do Ribeira (Paraná/São Paulo) e Santana (Amapá) (Figueiredo et al., 2007).

A exposição ao arsênio induz vários problemas a saúde humana. Em relação aos efeitos da exposição crônica do arsênio, o metaloide pode induzir o surgimento de múltiplos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, desordens neurológicas (Chen et al., 2009; WHO, 2011). Entre os efeitos da exposição aguda é possível mencionar náuseas, vômito, dores abdominais, encefalopatia, neuropatia (Reddy et al., 2011).

O fígado é o órgão no qual os nutrientes absorvidos no trato digestivo são processados e armazenados para utilização por outros órgãos. É, portanto, uma interface entre o sistema digestivo e o sangue. A posição do fígado no sistema circulatório é ideal

para captar, transformar e acumular metabólitos e para a neutralização e eliminação de substâncias tóxicas pela bile (Junqueira e Carneiro, 2008). Além disso, o fígado é o local de síntese de enzimas, colesterol, bile, vitamina A e outras moléculas necessárias para a homeostase (Ross e Pawlina, 2016). Visto que o fígado é o principal sítio de metilação do arsênio, é possível que exposições repetidas a este metal possam causar acumulação de formas de arsênio no órgão, aumentando a toxicidade hepática (Ratnaike, 2003). Em populações expostas ao arsênio na Índia, elevados níveis de fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e bilirrubina foram encontrados associados ao aumento do tamanho do fígado nos indivíduos expostos (Mazumder et al., 1998). Estudos experimentais também mostraram que animais expostos a diferentes compostos de arsênio apresentaram alteração das transaminases, desequilíbrio das enzimas antioxidantes e microminerais no fígado, além de diversas patologias no parênquima hepático (Lu et al., 2014; Kharroubi et al., 2014; Souza et al., 2017). Além disso, elevados níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e produtos de peroxidação lipídica tem sido observado no fígado de animais expostos ao arsênio (Kharroubi et al., 2014).

O rim é o principal órgão excretor e osmorregulador, possui funções metabólicas, hormonais e de reabsorção e secreção, desempenhando um importante papel na regulação da homeostase. É conhecido como um órgão-alvo da ação tóxica do arsênio, uma vez que a urina é a principal rota de eliminação deste elemento (Fowler 1992). Por receber um alto fluxo sanguíneo, o rim torna-se mais exposto e susceptível à ação deste metal, atuando na sua biotransformação e conseqüente eliminação (Madden e Fowler 2000). Após absorção intestinal, o arsênio inorgânico é metabolizado através da metilação, onde a redução do arsênio pentavalente para trivalente e adição do grupo metil gera ácido metilarsênico e dimetilarsínico, que são excretados através da urina (Vahter 2002). Emergentes associações entre a exposição a elevadas concentrações de arsênio ($\geq 300 \mu\text{g/l}$) ingerido através de água potável e câncer de bexiga foram observadas, além de associações ao câncer renal (WHO 2011).

O sistema reprodutor masculino da maioria dos mamíferos é composto por testículos (gônadas), epidídimos, ductos deferentes, glândulas sexuais acessórias (como próstata e vesícula seminal), e pênis. Esse sistema é andrógeno-dependente e qualquer tóxico que atue desordenando a interação coordenada do eixo hipotalâmico hipofisário gonadal pode levar a anormalidades reprodutivas (Sokol, 1997). Estudos

epidemiológicos têm sugerido que o arsênio induz efeitos negativos no sistema reprodutor masculino, incluindo disfunção erétil, redução na qualidade espermática, bem como aumento da incidência de câncer na próstata e mortalidade (Benbrahim-Tallaa and Waalkes, 2008; Hsieh et al. 2008).

Adicionalmente, estudos anteriores com animais experimentais demonstraram que machos adultos expostos ao arsênio apresentaram redução do peso dos órgãos reprodutivos (Morakinyo et al., 2010), alteração na espermatogênese (Li et al., 2012), qualidade espermática (Reddy et al., 2011; Souza et al., 2016b) e nos índices de fertilidade (Lima et al., 2018). Por outro lado, a exposição ao arsênio poderia afetar o eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular em ratos adultos e, conseqüentemente reduz as concentrações dos hormônios luteinizantes (LH), folículo estimulante (FSH) e testosterona (Jana et al., 2006). Em um estudo recente, Alamdar et al. (2019) relatou supressão da expressão de genes relacionados com a esteroidogênese em animais adultos expostos cronicamente ao arsênio, o que sugere que esse metaloide poderia ser reconhecido como um disruptor endócrino.

Os estudos recentes com arsenato de sódio apontam que a exposição a altas doses desse composto reduz a qualidade do sêmen a partir da indução do estresse oxidativo no ambiente testicular (Guvvala et al., 2016). Souza et al. (2016a) também apontam que o estresse oxidativo gerado pela exposição ao arsenato causa mudanças histomorfométricas no testículo de ratos. A redução na produção espermática diária, no número de espermátides no testículo bem como no número de espermatozoides na região da cabeça/corpo do epidídimo também foi observada em ratos expostos a 10 mg/L de arsenato de sódio (Souza et al., 2016b). No entanto, outras formas de arsênio também são consideradas tóxicas para o sistema reprodutor em animais e humanos (Jana et al., 2006; Apostoli e Catalani, 2011). Estudos sobre a influência do arsenito no sistema reprodutor mostraram que ele está associado com toxicidade espermática (Pant et al., 2004, Biswas et al., 2007), provocando alterações nos níveis de testosterona sérica (Das et al., 2009) e redução no peso dos testículos e glândulas acessórias (Sarkar et al., 2003, 2008). Além disso, a exposição ao arsenito induz a redução na contagem espermática e motilidade (Jana et al., 2006; Chang et al., 2007), com aumento no número de espermatozoides anormais (Morakinyo et al., 2010, Kaushal et al., 2012) em animais expostos durante a fase adulta.

Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ERO/ERN) e a eficiência do organismo de neutralizar sua ação pelos sistemas de defesa antioxidante (Persson et al., 2014). A principal fonte de espécies reativas se encontra na cadeia transportadora de elétrons, na membrana interna mitocondrial, onde a energia é gerada na forma de ATP. Nesse evento da fosforilação oxidativa, os elétrons de alta energia são transferidos da NADH e FADH₂, ao longo da cadeia transportadora de elétrons até o oxigênio (O₂), que finalmente gera água (Dröge, 2002; Koopman et al., 2010).

Uma vez que o funcionamento celular normal é dependente de reações de oxidorredução e esse processo é realizado comumente em etapas, surge a oportunidade da formação de compostos intermediários com elétrons desemparelhados denominados de radicais livres. O fato de esses compostos apresentarem elétrons desemparelhados os torna muito reativos a qualquer outro tipo de molécula como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Sies e Cadenas, 1985). Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante. Esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do O₂ e também em situações não fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos, os quais provocam a redução incompleta de O₂ (Godic et al., 2014; Dröge, 2002).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são representadas por radicais livres como superóxido (O₂ •-), hidroxil (OH•), peróxil (ROO•), alcóxil (RO•) e moléculas não radicais, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), oxigênio simpleto (1/2 O₂) e ozônio (O₃) (Ray et al., 2012).

Todas as células em organismos eucarióticos possuem um complexo sistema de enzimas antioxidantes (Sies, 1997). Com o auxílio das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), o organismo conserva os níveis de ROS dentro dos limites fisiológicos. A SOD converte enzimaticamente o radical superóxido (O₂•⁻) em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Dröge, 2002), enquanto a CAT é responsável pela decomposição de H₂O₂ em H₂O e O₂ (Aebi, 1984). A GST é responsável pela desintoxicação celular contra substratos exógenos como medicamentos. Essa desintoxicação ocorre através de conjugados de glutathione

com xenobióticos e produtos aldeídicos produzidos na peroxidação lipídica, tornando os produtos mais solúveis em água (Habig et al., 1974).

O estresse oxidativo surge nas células devido ao desbalanço entre os sistemas pró-oxidante/antioxidante, causando lesões celulares, visto que as espécies reativas podem reagir com proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídios (Sies e Cadenas, 1985). Entre moléculas alvos, a peroxidação de lipídios é extremamente prejudicial visto que a formação de produtos de peroxidação lipídica leva à propagação de reações de radicais livres. O processo geral de peroxidação lipídica consiste em três estágios: iniciação, propagação e terminação (Catalá, 2006). Os lipídios poli-insaturados podem sofrer ataques de radicais livres, que transferem o elétron para um carbono do lipídio, originando um L° (lipídio com um radical livre centrado em carbono). O L° reage com O_2 , originando um radical lipoperoxila ($L^\circ + O_2 \rightarrow \text{LOO}^\circ$). O radical LOO° pode agir sobre outro lipídio, transferindo o elétron desemparelhado para um carbono, originando um novo L° , e assim sucessivamente (peroxidação em cadeia), alterando várias moléculas lipídicas de membranas. Ao atuar em outros lipídios, LOO° transforma-se em um hidroperóxido (LOOH), que pode se decompor em aldeídos (malondialdeído e 4-hidroxinonal), hidrocarbonetos voláteis, como etano e pentano, que são também produtos finais da peroxidação de lipídios insaturados (Catalá, 2006). A principal repercussão da peroxidação lipídica são lesões de membranas celulares (Benzie, 1996; Nigam e Schewe, 2000). O malondialdeído (MDA) é um dos vários produtos finais de baixo peso moleculares formados através da oxidação lipídica, sendo importante marcador de estresse oxidativo, determinado para quantificar a peroxidação lipídica em amostras (Janero, 1990).

O estresse oxidativo é um fator chave envolvido na toxicidade do arsênio. As espécies reativas podem induzir efeitos positivos ou negativos em diversos parâmetros da saúde dependendo da concentração e do tempo de exposição a esses radicais. Fisiologicamente, é produzida pequena quantidade de ROS necessária para a capacitação (processo em que o espermatozoide se torna capaz de penetrar nos óvulos), motilidade e fertilidade dos espermatozoides. Entretanto, o aumento de espécies reativas resulta em prejuízo, como perda da motilidade e disfunção das organelas como no caso da mitocôndria (Fallahi et al., 2015).

Investigações moleculares

Na investigação de marcadores moleculares que ajudem no diagnóstico precoce e no tratamento de diversas doenças humanas, incluindo câncer, muitos estudos têm focado em modificações nos genes, seus transcritos e produtos proteicos envolvidos em processos celulares fundamentais.

Os enfoques metodológicos atuais que permitem uma análise ampla da expressão gênica incluem a técnica de microarranjos de cDNA (DeRisi et al., 1996), a análise seriada da expressão gênica/SAGE (Velculescu et al., 1995) e as técnicas de sequenciamento em larga escala utilizando equipamentos de última geração (Fullwood et al., 2009). O estudo da expressão gênica com tais técnicas permite obter um perfil molecular e fornece oportunidades para identificação de importantes alterações que ocorrem no nível de RNA. Entretanto, a análise dos transcritos é prejudicada pela sua susceptibilidade à degradação e pela falta de concordância entre sua concentração e a de proteína (Gygi et al., 1999). Ademais, as informações a respeito de processos que modulam a função e a atividade proteica, como modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína, transporte e degradação, são perdidas na análise de RNA (Gstaiger e Aebersold, 2009). Por esse motivo, para compreensão dos mecanismos envolvidos em doenças humanas com consequentes benefícios para os pacientes, é importante que em paralelo aos dados derivados do genoma e aos dados clínicos sejam também obtidas informações sobre as diferenças proteicas entre tecidos e/ou fluidos corporais normais e modificados.

A proteômica se dedica a estudar todas as proteínas contidas em uma amostra biológica em um dado momento, seja ela tecido, célula ou fluido. As proteínas desempenham variadas funções no organismo, atuando como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais e sinalizadores (De Souza et al., 2003). Visto à sua multifuncionalidade, o estudo do proteoma se desenvolve constantemente durante os últimos anos possibilitando não só a elucidação na identificação de proteínas, mas também na quantificação e estudo de suas funções (Blackstock e Weir, 1999). A expressão de proteínas é dinâmica e altera de acordo com respostas ao ambiente (Nelson e Cox, 2002), portanto é possível comparar proteomas de distintas amostras biológicas em condições e/ou momentos distintos.

Além do método de separação por eletroforese, a separação de proteínas e peptídeos pode ser obtida através da cromatografia. Esta técnica utiliza características como solubilidade, afinidade e até mesmo tamanho para separação de substâncias (Barbosa et al., 2012). Uma vez separadas, as proteínas devem ser fragmentadas em peptídeos por digestão trípica, para identificação das suas diversas sequências de aminoácidos e, através de ferramentas de bioinformática, a proteína seja identificada. A identificação das proteínas é habitualmente acessada através da espectrometria de massas, método que se baseia nos espectros produzidos conforme a relação massa/carga (m/z) dos peptídeos ionizados (Siuzdak, 2006). Os componentes básicos da espectrometria de massas são uma fonte de ionização, um analisador e um detector (Glish e Vachet, 2003).

Um dos básicos tipos de ionização em espectrômetros de massa é a ionização/dessorção da matriz assistida a laser (MALDI), que envolve o bombardeamento da amostra por um feixe de laser, onde ocorrerá a ionização e a dessorção da amostra, permitindo o trajeto pelo espectrômetro de massas (Glish e Vachet, 2003). O Orbitrap é um analisador de íons baseado em um eletrodo captador de íons que os vincula em um movimento orbital ao redor do fuso. A corrente de imagem dos íons capturados é detectada e transformada em um espectro de massa usando a transformada de Fourier do sinal de frequência (Sciqlova e Makarov, 2006).

A conclusão na identificação do proteoma de uma amostra biológica varia de acordo com diversos fatores, como a preparação da amostra, o equipamento e as análises de bioinformática. Na atualidade, a técnica conhecida como *Shotgun* desperta a atenção vem atraindo grande interesse pois se baseia na separação, por cromatografia líquida de alta resolução, dos peptídeos obtidos após digestão trípica de soluções proteicas complexas, seguida de análise por espectrometria de massas (Barbosa et al., 2012). Quanto melhor a separação e ionização dos peptídeos, mais íons poderão ser analisados e detectados pelo equipamento; portanto, um maior número de proteínas será identificado.

Desenvolvimento sexual em ratos machos e estudos toxicológicos

A puberdade constitui um período de rápidas e interativas alterações morfológicas, endócrinas e comportamentais; fase pela qual ocorre a transição entre o

estado jovem e adulto com a maturação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, levando ao desenvolvimento das características sexuais secundárias e à fertilidade. Esse conjunto de transformações somáticas que ocorrem na adolescência engloba fundamentalmente o crescimento (desenvolvimento esquelético, muscular, visceral e outras) e a maturação sexual (desenvolvimento de gônadas, órgãos de reprodução e caracteres sexuais secundários) (Golub et al., 2008; Perobelli, 2014). A coordenação desses eventos envolve ainda vários efeitos modulatórios morfofisiológicos que, juntos, controlam o início e a progressão da puberdade. O objetivo e o resultado final são a aquisição da capacidade de reprodução. O mecanismo primário que desencadeia a puberdade ainda não está totalmente esclarecido, mas parece resultar de interações entre fatores genéticos, hormonais, idade, nutrição e fatores ambientais (Golub et al., 2008; Perobelli, 2014).

Os mecanismos básicos envolvidos na progressão da maturação sexual são conservados entre a maioria das espécies. Muitos dos eventos endócrinos envolvidos nessa progressão em ratos são similares aos outros mamíferos, incluindo os humanos (Ojeda and Skinner, 2006). Dessa forma muitos dos resultados obtidos em estudos com ratos podem ser extrapolados para outras espécies, inclusive para os humanos.

No rato macho os níveis hipotalâmicos de GnRH continuam a se elevar durante o desenvolvimento pós-natal. Da mesma forma, o conteúdo de LH e FSH na hipófise aumentam gradualmente com a idade, assim como a responsividade da glândula à estimulação do GnRH. A resposta máxima ao FSH ocorre entre os dias 25 e 35 de idade, enquanto a resposta máxima ao LH ocorre entre os dias 35 e 45 de idade (Ojeda e Urbanski, 1994). Os receptores hipofisários de GnRH mostram-se elevados durante as quatro primeiras semanas de vida, alcançando um pico em torno dos 30 dias, declinando então aos níveis adultos observados entre os dias 60 e 80 de idade. Este declínio é inversamente correlacionado com a elevação da testosterona sérica, sugerindo um feedback negativo dos esteroides testiculares sobre a função hipotalâmica e hipofisária (Ojeda; Urbanski, 1994). Os andrógenos são os esteroides, sendo a testosterona o andrógeno mais importante secretado pelos testículos em mamíferos (Perobelli, 2014).

Na literatura existe um grande intervalo fixado para o início desse período. Vários autores reportam grandes períodos nos quais a puberdade se inicia, através dos fenômenos físicos (separação prepucial, aumento testicular, peso corporal) e dosagens hormonais. Vários parâmetros são utilizados como indicadores do início da puberdade

no rato. Dentre eles, podemos destacar o peso corporal e de órgãos reprodutores, dosagens hormonais, parâmetros espermáticos, eficiência reprodutiva e a separação prepucial, sendo a última a mais utilizada (Ojeda e Urbanski, 1994; Perobelli, 2014).

O desenvolvimento sexual do rato macho pode ser dividido em quatro fases: período neonatal: primeira semana após o nascimento (dia pós-natal – DPN 1-7); período infantil: do 8° ao 21° dia de vida (DPN 8-21); período juvenil: até o 35° dia de vida (DPN 22-35); e período peripuberal, que termina entre 55° e 60° dias de idade (DPN 36-55 ou 60) (Ojeda e Urbanski, 1994). Os mecanismos que governam o início da puberdade no rato macho não são bem compreendidos. Desde antes do nascimento, já existem relações entre os elementos do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, que só iniciam sua sincronização durante as primeiras semanas de vida pós-natal (Robb et al., 1978).

Aos 40 dias pós-natal são encontradas as primeiras espermátides maduras no testículo, enquanto espermatozoides são observados na cauda do epidídimo apenas aos 50 dias. Assim, o rato macho atinge a puberdade por volta de 50 dias de idade (Robb et al., 1978). Os pesos relativos do testículo e epidídimo alcançam seus picos por volta dos 70 dias pós-natal. O peso testicular apresenta um rápido crescimento durante o período peri-puberal, provavelmente devido ao aumento no número de receptores de FSH nas células de Sertoli (Ojeda e Urbanski, 1994). O número de receptores de andrógenos aumenta pronunciadamente nas células de Sertoli dos DPN 10-20 até 35-60, sugerindo que andrógenos também apresentam um importante papel na instalação da puberdade no macho (Maeda et al., 2000).

Como a espermatogênese e a esteroidogênese ainda não estão totalmente estabelecidas durante a peri-puberdade, esta pode ser uma fase crítica do desenvolvimento reprodutivo e conseqüentemente mais vulnerável a alterações causadas por agentes químicos (Johnson et al., 1997, Perobelli, 2014). Assim, qualquer alteração nos eventos característicos que ocorrem nesta fase pode originar sérios prejuízos e comprometer a reprodução do indivíduo na vida adulta (Favareto, 2011). Há tempos, tem sido proposto que existem similaridades entre os processos de maturidade sexual e a regulação da fertilidade na vida adulta (Dubey et al., 1986). A fertilidade humana é biologicamente regulada pelo ambiente hormonal de homens e mulheres saudáveis em relação com suas idades e estilo de vida. Alguns autores têm questionado

e relacionado os efeitos determinantes de prejuízos na reprodução que aconteceriam na infância com o nível de fertilidade durante a vida adulta (Kirkwood et al., 1987).

Tendo em vista que há uma continuidade do desenvolvimento e maturação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal durante o processo da puberdade, e que existem similaridades entre o processo de maturação sexual e a regulação da fertilidade no indivíduo adulto, seria realmente possível que alterações no período pre-peripúbere possam impactar na vida reprodutiva futura. Além disso, como o início da puberdade e a continuação desse desenvolvimento até a maturidade sexual são eventos influenciados por uma grande variedade de fatores, existe atualmente a preocupação de que estímulos prejudiciais provenientes do ambiente poderiam afetar a correta progressão desse período tão importante da vida reprodutiva de um indivíduo. Portanto, é provável que fatores ambientais desempenhem um papel crítico nessa tendência (Mouritsen et al., 2010).

As crianças apresentam um padrão único de vulnerabilidade a produtos tóxicos. Em relação à sua massa corpórea, elas consomem mais água, alimentos e ar que adultos, o que as leva a ter maior exposição a substâncias tóxicas presentes nestes elementos. O seu comportamento de levar a mão e objetos à boca, e o hábito de brincar diretamente ou próximas ao solo intensificam a exposição (Ladrikan et al., 2003). Devido à imaturidade enzimática, o metabolismo e excreção de substâncias tóxicas são menos desenvolvidos do que nos adultos (Damstra, 2002) e, por terem, potencialmente, mais anos de vida, apresentam maior probabilidade de virem a apresentar consequências tardias de exposições cumulativas e prolongadas.

Evidências de várias partes do mundo levantaram a preocupação sobre a ação de substâncias químicas presentes no ambiente em alterar o desenvolvimento reprodutivo da população (Colborn et al., 1993).

Desse modo, tem sido bem estabelecido que a exposição ao arsênio pode causar modificações sistêmicas, e comprometer a função e estrutura de órgãos reprodutivos, do fígado e rins em animais adultos. No entanto, não é bem documentada a extensão dos efeitos da exposição desse metaloide em animais púberes e adultos os quais foram expostos durante a uma fase singular do desenvolvimento. Nesse contexto, o objetivo desta tese foi elucidar as implicações da exposição ao arsênio, um poluente ambiental, em parâmetros reprodutivos, hepáticos e renais de ratos Wistar púberes e adultos expostos durante a pré-puberdade. Portanto, nesta tese, primeiramente foi examinado os

parâmetros testiculares e epididimários para obter uma visão dos eventos celulares e moleculares que podem induzir alterações em longo prazo causadas pelo arsênio (artigo 1 - *Prepubertal exposure to arsenic alters male reproductive parameters in pubertal and adult rats* - artigo publicado). Em seguida, no artigo 2 - *Prepubertal exposure to arsenic alters protein profile and quality of epididymal spermatozoa in adult rats*, foi acessado parâmetros relacionados com a atividade funcional dos espermatozoides, além de avaliar os índices de fertilidade e proteômica. Finalmente, no artigo 3 - Exposição ao arsênio durante a pré-puberdade altera o conteúdo mineral e atividade antioxidante em ratos adultos, nós avaliamos a influência do arsênio no fígado e rins examinando parâmetros bioquímicos, enzimáticos, morfológicos, minerais de animais púberes e adultos.

REFEÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. Mouritsen, L. Aksglaede, K. Sørensen, S.S. Mogensen, H. Leffers, K.M. Main, et al. (2010) Hypothesis: exposure to endocrine-disrupting chemicals may interfere with timing of puberty *Int. J. Androl.*, 33, pp. 346-359.
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymology*. 105: 121-126.
- Alamdar A., Tian M., Huang Q., Du X., Zhang J., Liu L., Shah S.T.A., Shen H. (2019) Enhanced histone H3K9 tri-methylation suppresses steroidogenesis in rat testis chronically exposed to arsenic. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 170, 513–520.
- Apostoli P, Catalani S (2011) Metal ions affecting reproduction and development. *Met Ions Life Sci* 8:263–303.
- Barbosa EB, Vidotto A, Polachini GM, Henrique T, Marqui ABT, Tajara EH (2012) Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 58, n.3, p. 366-375.
- Barra, C.M., Santelli, R.E., Abraão, J.J., Guardia, M. de la. (2000) Especificação de Arsênio-Uma revisão. *Química Nova*. 23, 58-70.
- Benbrahim-Tallaa L., Waalkes M.P., (2008) Inorganic arsenic and human prostate cancer. *Environ. Health Perspect.* 116, 158–164.
- Benzie IF (1996) Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *International Journal of Food Sciences Nutrition*. V. 47, n.3, p. 233 – 261.
- Biswas R, Poddar S, Mukherjee A (2007) Investigation on the genotoxic effect of long-term administration of sodium arsenite in bone marrow and testicular cells in vivo using the comet assay. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 26:29–37.
- Blackstock WP, Weir MP (1999) Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnology*, v. 17, p. 121-127.
- Catalá A (2006) An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. v. 38, p. 1482 – 1495.

- Celik, I. et al. (2008) Arsenic in drinking water and lung cancer: A systematic review. *Environ. Health*.108, 48-5.
- Chang SI, Jin B, Youn P, Park C, Park JD, Ryu DY (2007) Arsenic-induced toxicity and protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicol Appl Pharmacol* 218:196-203.
- Chen, Y., et al., (2009) Arsenic exposure at low-to-moderate levels and skin lesions, arsenic metabolism, neurological functions, and biomarkers for respiratory and cardiovascular diseases: review of recent findings from the Health Effects of Arsenic Longitudinal Study (HEALS) in Bangladesh. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 239, 184–192.
- Colborn, T., vom Saal, F. S., & Soto, A. M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental health perspectives*, 101(5), 378–384.
- Damstra T. Potential effects of certain persistent organic pollutants and endocrine disrupting chemicals on the health of children. *J Toxicol Clin Toxicol.* 2002;40:457-65.
- De Souza MV, Fontes W, Ricart CA (2003) A análise de proteomas: o despertar da era pós-genômica. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 2, p. 12-14.
- DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M et al. (1996) Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet.*14(4):457-60
- Drogö W (2002) Free radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews.* 82: 47-95.
- Dubey, A. K., Cameron, J. L., et al. (1986) Inhibition of gonadotropin secretion in castrated male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) induced by dietary restriction: Analogy with the prepubertal hiatus of gonadotropin release. *Endocrinology*, 118, 518-525.
- Fallahi S, Rajaei M, Malekzadeh K, Kalantar SM (2015) Would *Phoenix dactyflera* Pollen (palm seed) be considered as a treatment agent against males infertility? A systematic review. *Electronic Physician Journal.* v. 7, n. 8, p. 1590 – 1596.
- Figueiredo, B.R., Borba, R.T., Angelica, R.S. (2007) Arsenic occurrence in Brazil and human exposure. *Environ. Geochem. Health.* 29, 109-18.
- Flora SJS (2015) Arsenic: Chemistry, Occurrence, and Exposure. In: Flora SJS (ed) *Handbook of Arsenic Toxicology*. Academic Press, pp 1-49.
- Fullwood MJ, Wei CL, Liu ET, Ruan Y (2009) Next-generation DNA sequencing of paired-end tags (PET) for transcriptome and genome analyses. *Genome Res.* (4):521-32.
- Glish GL, Vachet RW (2003) The basis of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature*, v. 2, p. 140-150.
- Godic A, Poljak B, Adamic M, Dahmane R (2014) The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2014, p. 1-6.
- Golub MS, Collman GW, Foster PM, Kimmel CA, Rajpert-De Meyts E, Reiter EO et al. (2008) Public health implications of altered puberty timing. *Pediatrics*;121:S218–30.
- Gstaiger M, Aebersold R (2009) Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. *Nat Rev Genet.* 10(9):617-27.

- Guvvala PR, Sellappan S, Parameswaraiah RJ (2016) Impact of arsenic (V) on testicular oxidative stress and sperm functional attributes in Swiss albino mice. *Environ Sci Pollut Res*. DOI 10.1007/s11356-016-6870-3.
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*. 19(3):1720-30.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*. 249(22): 7130-7139
- Hsieh, F. I. et al. (2008) Risk of erectile dysfunction induced by arsenic exposure through well water consumption in Taiwan. *Environ. Health Perspect*. 116, 532-536.
- IARC (2004) Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum*. 84, 1-477.
- Jana K, Jana S, Samanta PK (2006) Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. *Reprod Biol Endocrinol* 16:4-9.
- Janero DR (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 9, p. 515 – 540.
- Johnson L, Welsh THJ, Wilker CE (1997) Anatomy and physiology of the male reproductive system and potential targets of toxicants. In: Boekleheide K, Chapin RE, Hoyer PB, Harris C (eds). *Comprehensive Toxicology*, 1 ed., Vol. 10. Pergamon, New York;5-61.
- Jomova, K., et al. (2011) Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J. Appl. Toxicol*. 31:95-07.
- Kaushal P, Dhar P, Shivaprasad SM, Mehra RD (2012) Postnatal exposure to sodium arsenite (NaAsO₂) induces long lasting effects in rat testes. *Toxicol Int* 19:215-222.
- Kirkwood, T. R. (2000) immortality of the germ line versus disposability of the soma. *Basic Life Science*. 42, 209-18.
- Koopman WJ, Nijtmans LG, Dieteren CE, Roestenberg P, Valsecchi F, Smeitink JA, Wikkems PH (2010) Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxidants and Redox Signaling*. v. 12, n. 12, p. 1431 – 1470.
- Landrigan PJ, Goldman L. (2003) Prenatal methylmercury exposure in the Seychelles. *Letter Lancet*. ;362(9384):666-667.
- Li CJ, Lv L, Li H, Yu DM (2012) Cardiac fibrosis and dysfunction in experimental diabetic cardiomyopathy are ameliorated by alpha-lipoic acid. *Cardiovasc Diabetol* 19:11-73.
- Lima G.D.A, Sertorio M.N., Souza A.C.F., Menezes T.P, Mouro V.G.R., Gonçalves N.M., Oliveira J.M., Henry M., Neves M.M., (2018) Fertility in male rats: Disentangling adverse effects of arsenic compounds. *Reprod. Toxicol*. 78, 130-140.
- Moon, K., Guallar, E. & Navas, A. A. (2012) Arsenic exposure and cardiovascular disease: an updated systematic review. *Curr. Atheroscler. Rep*. 14, 542-555.
- Morakinyo AO, Achema PU, Adegoke OA (2010) Effect of Zingiber Officinale (Ginger) on sodium arsenite-induced reproductive toxicity in male rats. *Afr J Biomed Res* 13:39-45.
- Nelson DL, Cox MM (2002) *Principios de bioquímica*. New York.
- Neves, R.N.P., et al. (2004) Protective activity of hesperidin and lipoic acid against sodium arsenite acute toxicity in mice. *Toxicol. Pathol*. 32, 527-35.

- Ojeda SR, Andrews WW, Advis JP, White SS (1980) Recent advances in the endocrinology of puberty. *Endocr Rev*;1:228–57.
- Ojeda SR, Urbanski HF (1994) Puberty in the rat. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press; p. 363-409.
- Ojeda, S. R., & Skinner, M. K. (2006). Puberty in the rat. In Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction* (pp. 2061-2126). Elsevier Inc.
- Pant N, Murthy RC, Srivastava SP (2004) Male reproductive toxicity of sodium arsenite in mice. *Hum Exp Toxicol* 32:399–403.
- Perobelli J. (2014) The male peripubertal phase as a developmental window for reproductive toxicology studies. *Curr. Pharm. Des.* 20, 5398- 5415.
- Persson T, Popescu BO, Cedazo-Minguez A (2014) Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014: 1-11.
- Ray PD, Huang BW, Tsuji Y (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signaling*. V. 24, n. 5.
- Reddy PS, Rani GP, Sainath SB, Meena R, Supriya C (2011) Protective effects of N acetylcysteine against arsenic-induced oxidative stress and reprotoxicity in male mice. *J Trace Elem Med Biol* 25:247-53.
- Robb GW, Amman RP, Killian GJ (1978) Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil* 54:103-7.
- Sarkar M, Chaudhuri GR, Chattopadhyay A, Biswas NM (2003) Effect of sodium arsenite on spermatogenesis, plasma gonadotrophins and testosterone in rats. *Asian J Androl* 5:27–31.
- Sarkar S, Hazra J, Upadhyay SN, Singh RK, Amal RC (2008) Arsenic induced toxicity on testicular tissue of mice. *Indian J Physiol Pharmacol* 52:84–90.
- Scigelova M, Makarov A (2006) Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics. *Proteomics. Suppl* 2:16-21.
- Sies H, Cadenas E (1985) Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society. Series B, Biological Sciences*. v. 311, p. 617 – 631.
- Siuzdak G (2006) *The expanding role of mass spectrometry in biotechnology*. San Diego, MCC press.
- Sokol R. (1997) “Male factor in infertility”. In *infertility, Contraception, and Reproductive Endocrinology*, R. Lobo, D. Mishell, Jr., R. Paulson, eds., Blackwell Science, Inc., Malden, Massachusetts, 547-566.
- Souza ACF, Marchesi SC, Ferraz RP, Lima GDA, Oliveira JA, Machado-Neves M (2016b) Effects of sodium arsenate and arsenite on male reproductive functions in Wistar rats. *J Toxicol Environ Health A* 79: 274-286.
- Souza ACF, Marchesi SC, Lima GDA, Ferraz RP, Santos FC, Matta SLP, Machado-Neves M (2016a) Effects of sodium arsenite and arsenate in testicular histomorphometry and antioxidants enzymes activities in rats. *Biol Trace Elem Res* 171:354-362.
- US EPA (2000) *Arsenic Occurrence in Public Drinking Water Supplies 2000*. <http://www.epa.gov/OGWDW/arsenic/pdfs/occurrence.pdf> EPA-815-R-00-023
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW (1995) Serial analysis of gene expression. *Science*. 270(5235):484-7.
- WHO (2011) *Guidelines for Drinking-water Quality*. Geneva: World Health Organization

ARTIGO 1

Prepubertal exposure to arsenic alters male reproductive parameters in pubertal and adult rats

Felipe Couto-Santos¹, Ana Cláudia Ferreira Souza^{1,2}, Daniel Silva Sena Bastos¹, Luiz Otávio Guimarães Ervilha¹, Fernanda Carolina Ribeiro Dias⁴, Larissa de Sales Araújo³, Simone Eliza Facioni Guimarães³, Leandro Licursi de Oliveira¹, Mariana Machado-Neves¹

¹Department of General Biology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

²Department of Animal Biology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

³Department of Animal Science, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

⁴Department of Structural Biology, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brazil

*Corresponding author: Department of General Biology, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, s/n, Campus Universitário, Viçosa 36570-900, Minas Gerais, Brazil. E-mail: mariana.mneves@ufv.br (M. Machado-Neves)

Artigo publicado na revista Toxicology and Applied Pharmacology

Received: 19 March 2020

Received in revised from: 19 August 2020

Accepted: 22 October 2020

Available online: 27 October 2020

DOI: 10.1016/j.taap.2020.115304

Abstract

Arsenic induces reproductive disorders in pubertal males after prepubertal exposure. However, it is unclear the extent to which those effects remain in testis and epididymis of sexually mature rats after arsenic insult. This study evaluated the effects of prepubertal arsenic exposure in male organs of pubertal rats, and their reversibility in adult rats. Male pups of Wistar rats on postnatal day (PND) 21 were divided into two groups ($n = 20/\text{group}$): Control animals received filtered water and exposed rats received 10 mg L^{-1} arsenic from PND 21 to PND 51. At PND 52, testis and epididymis of ten animals per group were examined for toxic effects under morphological, functional, and molecular approaches. The other animals were kept alive under free arsenic conditions until PND 82, and further analyzed for the same parameters. Pubertal rats overexpressed mRNA levels of SOD1, SOD2, CAT, GSTK1, and MT1 in their testis and SOD1, CAT, and GSTK1 in their epididymis. In those organs, catalase activity was altered, generating byproducts of oxidative stress. The antioxidant gene expression was unchanged in adult rats in contrast to the altered activity of antioxidant enzymes. Histological alterations of testis and epididymis tissues were observed in pubertal and adult rats. Interestingly, only adult rats exhibited a remarkable decrease in serum testosterone levels. Prepubertal exposure to arsenic caused morphological and functional alterations in male reproductive organs of pubertal rats. In adult rats, these damages disappeared, remained, get worsened, or recovered depending on the parameter analyzed, indicating potential male fertility disorders during adulthood.

Keywords: Arsenite; gene expression; oxidative stress; histopathology; recovery

1. Introduction

Exposures to environmental toxic metals have become a global public health concern over the last decades (Rodríguez-Barranco et al., 2013; Veeramachaneni et al., 2001). Among those metals, arsenic is recognized by its toxicity and potential for human exposure. Typically, this metalloid is a naturally occurring element in the Earth's crust. Its inorganic forms can be released into the environment by natural forces and human activities, such as gold mining, glass manufacturing, production of feed additives, and agricultural pesticides, contaminating groundwater and drinking water (Huang et al., 2016). For that reason, 150 million people have been exposed to inorganic arsenic worldwide. Although the current recommended limit of arsenic in drinking water is $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (U.S. EPA, 2011; WHO, 2011), areas in China, Bangladesh, India, Mexico, Argentina, Chile, USA, and Brazil exhibit concentrations of arsenic that range from $50\text{-}3200 \mu\text{g L}^{-1}$ (Alamdar et al., 2016; Frisbie et al., 2002; WHO, 2011).

Adverse health effects are associated with arsenic ingestion such as diabetes, pulmonary and cardiovascular diseases, as well as reproductive disorders (Hughes et al., 2011; Shen et al., 2013). Epidemiological studies indicate that arsenic exposure is related to erectile dysfunction, sperm damages, and prostate cancer in humans (Benbrahim-Tallaa and Waalkes, 2008; Hsieh et al., 2008; Xu et al., 2012). In adult animals, previous studies demonstrated that arsenic reduces sperm number, sperm viability, and motility with implications for male fertility (Lima et al., 2018; Reddy et al., 2011). Oxidative stress is considered the mechanism in which arsenic induces reproductive injuries (Guvvala et al., 2016; Souza et al., 2016a). Indeed, this metalloid may stimulate the production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) that results in lipid peroxidation, protein oxidation, and DNA damage (Birben et al., 2012; Souza et al., 2016a). Arsenic may also affect the hypothalamic-pituitary-testicular axis in adult rats, reducing serum levels of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and testosterone via suppression of steroidogenic genes expression (Alamdar et al., 2019; Jana et al., 2006).

Overall, humans and animals are exposed to toxic elements like arsenic from the time of conception through adulthood. For instance, prepuberty is a sensitive period because spermatogenesis and steroidogenesis are not yet fully established (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Perobelli, 2014). Additionally, the postnatal development of

epididymis occurs during adolescence, and the effects of arsenic exposure on the regional differentiation of the epididymal duct is still unclear. Although this process is not well understood, epididymis differentiation involves morphological and functional changes in the epididymal epithelium that influences its role in sperm maturation and storage (Robaire and Hinton, 2015).

Studies demonstrating the effects of arsenic in pubertal animals are still scarce in contrast to the information available for adult males. Recently, da Cunha de Medeiros et al. (2018) showed that arsenic causes injuries in testis and epididymis of juvenile rats exposed during prepuberty. However, it remains elusive whether these effects are reversible or permanent in adult rats after arsenic insult. Therefore, in this study, we investigated the detrimental effects of prepubertal exposure to arsenic in male organs of pubertal rats. To give a step forward, we evaluated the consequences of this exposure over adulthood. In the latter, we expected four possible scenarios: morphological and functional damages in adult rats would disappear, remain, get worse, or recover. To this extent, we examined testis and epididymis parameters to gain an insight into the cellular and molecular events that may drive long-term changes caused by arsenic. Moreover, we described aspects of oxidative stress associated with arsenic presence, including the expression of genes related to antioxidative ability, the activity of enzymes involved in the regulation of reproductive redox state, and the generation of metabolites resulting from oxidative injuries.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Male pups of Wistar rats were provided by the Central Animal Facility of the Center of the Biological and Health Sciences of the Universidade Federal de Viçosa (UFV). During the experiment, animals were individually housed in polypropylene cages under controlled lighting (light/dark cycle) and temperature (21 °C) with free access to rat chow, whereas drinking water was used for treatment (oral route). This study was carried out in strict accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. All experimental

procedures were reviewed and approved by the Animal Ethics Committee (CEUA protocol number 96/2017).

2.2. Experimental design and treatment

Forty animals on postnatal day (PND) 21 were divided into two groups. While control animals received filtered water, arsenic-exposed animals received 10 mg L⁻¹ arsenic as sodium arsenite (AsNaO₂; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) in drinking water *ad libitum*, daily from PND 21 to 51 (according to da Cunha de Medeiros et al., 2018). This time point represents the critical period for the development and maturation of male reproductive organs in juvenile (PND 21-33) and peripubertal (PND 33-52) rats, with the onset of puberty occurring at PND 46 (Picut et al., 2018). The dose of arsenic used in the present study was based on our published works of arsenic-induced toxicity in adult rats following oral exposure that exhibited important alterations in reproductive organs (Lima et al., 2018; Souza et al., 2016a,b).

A set of 20 animals ($n = 10/\text{group}$) was euthanized on PND 52 to evaluate the arsenic effects 24 h after the end of its exposure. The other set of 20 males ($n = 10/\text{group}$) received filtered water *ad libitum* and were euthanized on PND 82 to describe the consequences of arsenic exposure 30 days later. At this age, male rats are considered sexually mature due to their maximum daily sperm production (Picut et al., 2018). Animals were weighed weekly, and their health conditions (personal hygiene, posture, aggression, vocalization, and the appearance of eyes, tail, ear, and paws) and water consumption were examined daily throughout the experiment.

2.3. Sample collection

The animals were weighed, sedated with xylazine hydrochloride (10 mg Kg⁻¹/intraperitoneal), and euthanized by deep anesthesia using ketamine hydrochloride (150 mg Kg⁻¹/ intraperitoneal). Testis, epididymis, seminal vesicle (without coagulating gland), and ventral prostate were dissected and weighed. Left testis and epididymis were used for histology, whereas the right organs were used for biochemical and molecular analyses. In the latter case, samples were transferred to tubes containing 15

mL RNAlater[®] Solution (Ambion, Texas, USA) at room temperature, stored at 4 °C for 24 h, and then kept at -80 °C until processing (Skowronski et al., 2009).

2.4. Arsenic determination in the testis and epididymis

Arsenic proportion in testis and epididymis tissues was assessed by Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS) using a scanning electron microscope (JEOL, JSM-6010LA) with a Silicon Drift type X-ray detector system (Tracor TN5502, Middleton, WI, USA) according to Souza et al. (2018). Briefly, fragments were dried at 60 °C for 96 h and coated with evaporated carbon (Quorum Q150 T, East Grinstead, West Sussex, England, UK). The analysis was performed at 150x magnification, using an accelerating voltage of 20 kV and a working distance of 10mm. As control animals on PND 52 and PND 82 did not receive arsenic, their testis and epididymis arsenic concentrations were established as 1. The values of the other groups were expressed in number of times (x fold) compared to their controls.

2.5. Serum testosterone assay

During anesthesia, the blood was collected by cardiac puncture and centrifuged at 2000 x g for 15 min. The serum was used for the quantification of testosterone using testosterone ELISA kit (ADI-900- 065, ENZO Life Sciences, Plymouth, PA, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.6. Morphometric and histopathological analysis

Fragments of testis and epididymis (initial segment and cauda regions) were immersed in Karnovsky's fixative solution for 24 h, dehydrated in ethanol series, and embedded in glycol methacrylate (Historesin[®], Leica, Nussloch, Germany). Sections of 3 µm thickness were obtained using rotary microtome (RM 2255, Leica, Biosystems, Nussloch, Germany) and stained with toluidine blue-1% sodium borate. Digital images from the testicular parenchyma were obtained using photomicroscope (Olympus BX53, Tokyo, Japan) and analyzed with Image-Pro Plus[®] (v.4.5 – Media Cybernetic, Silver Spring, MD) software. The mean seminiferous tubule diameter was obtained by

randomly measuring 30 tubular cross sections, as circular as possible. These sections were also used to measure the epithelium height and luminal diameter, according to Souza et al. (2016a). Moreover, the volumetric proportion of intertubular components (macrophages lymphatic space, blood vessels, connective tissue, and Leydig cells) was obtained by counting 1000 intersection points, per animal, projected onto intertubular images of the testes. The average diameter of 30 Leydig cell nuclei was measured in each animal, choosing those with circular outline, perinuclear chromatin, and evident nucleoli. In order to calculate the nuclear volume (NV), cytoplasmic volume (CV) and cell volume (LCV), the following formulas were used: $NV = 4/3 \pi R^3$ (R = nuclear radius); $CV = \% \text{ of cytoplasm} \times NV / \% \text{ of nucleus}$; $LCV = NV + CV$ (Souza et al., 2016a). Finally, the number of Leydig cells per testis was estimated from the Leydig cell individual volumes and the total volume occupied by Leydig cells per gram of testis. The leydigosomatic index (LSI) was obtained by the ratio of the volume occupied by Leydig cells on the testes and the body mass, and the result was multiplied by 100 (Souza et al., 2016a).

For histopathological analysis, 100 cross-sections of seminiferous tubules were assessed per animal and classified into normal or abnormal tubules according to Leite et al. (2017). Basically, normal tubules exhibited a concentric shape and normally organized seminiferous epithelium with germ cell layers and Sertoli cells. Abnormal tubules, in turn, showed few germ cells layers in the seminiferous epithelium, vacuole formation or degeneration in this epithelium, Sertoli cell nucleus displacement, germ cells detachment, and presence of germ cells and cellular debris in the lumen (Leite et al., 2017). The percentage of seminiferous tubules exhibiting spermatozoa within the lumen was also recorded. Similarly, alterations in epididymis tissue (epithelium, lumen, interstitium) were qualitatively evaluated in the initial segment and cauda regions. The quantity and aspect of sperm cells in the lumen were also recorded according to Kempinas and Klinefelter (2015).

2.7. Germ cell counting

The estimated populations of testicular cell types were performed using seminiferous epithelium in Stage 1, based on counts of the nuclei of germ cells and nucleoli of Sertoli cells (Amann and Schanbacher, 1983). The following populations were quantified in 20

random seminiferous tubule cross sections per animal: type A spermatogonia (A), primary spermatocyte at preleptotene/leptotene (PL/L), primary spermatocyte at pachytene (P), round spermatid (RS), and Sertoli cells (S). Thirty nuclear diameters of each germ cell type and nucleolar diameter of the Sertoli cells were measured for each animal. The cell populations were corrected numerically by the section thickness and the variation in the size of the cells (Amann and Almquist, 1962). The ratios between such cell numbers provided the following indexes: mitotic (PL/L / A) and meiotic index (RS / P), Sertoli cell index (RS / S), and the total support capacity of the Sertoli cell ((A + PL/L + P + RS) / S).

The number of Sertoli cells (NSC) was determined using the formula: $NSC = (STL \times S) / 3$, where STL is the length of seminiferous tubules, whereas S is the Sertoli cell number. The number 3 corresponds to the section thickness. The results were then divided by the testicular weight to calculate the Sertoli cell number per gram of testis (NSC/g). Ultimately, daily spermatic production (DSP) was calculated according to Amann and Almquist (1962).

2.8. Gene expression

Total RNA extraction was accomplished in 50 mg of testis and cauda epididymis ($n = 5/\text{group}$) using TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was assessed using spectrophotometer NanoVue[™] Plus (GE Healthcare, Freiburg, Germany) and quality veracity was determined in 1% agarose gel. The first strand of cDNA synthesis was accomplished using GoScript Reverse Transcriptase kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) and its concentration was determined by spectrophotometer NanoVue[™] Plus.

2.9. Primers design and gene expression evaluation by qPCR

Primers (Supplementary Table 1) for target catalase (CAT), superoxide dismutase 1 (SOD1), superoxide dismutase 2 (SOD2), glutathione S-transferase kappa 1 (GSTK1), metallothionein 1 (MT1), and endogenous amplification were designed using PrimerQuest software (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) with sequences obtained from GenBank database (www.ncbi.nlm.nih.gov). As endogenous

controls, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases (GAPDH), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPTR1), and actin beta (ACTB) were verified. These genes were selected based on their amplification profiles and dissociation curve.

Real-time quantitative PCR was performed in thermal cycler ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Amplification situations for all systems were performed as follow: 95 °C for 2 min, 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and annealing/extension at 60 °C for 60 s. Amplification efficiencies (targets and endogenous genes) were approximately 100% in each cycle, and the relative abundance was calculated as described by Pfaffl et al. (2004). Threshold cycles values greater than 35 cycles were considered undetectable expression. The amplification of target and control genes was performed at different wells and in duplicates.

2.10. Evaluation of antioxidant enzymes and oxidative stress markers

To evaluate the markers of oxidative stress, 100 mg of right testes and cauda epididymis ($n = 5/\text{group}$) were homogenized in PBS and centrifuged at 3500 x g for 10 min at 5 °C. The supernatant was used to quantify the activity of superoxide dismutase (SOD), CAT, and glutathione S-transferase (GST) as described by Souza et al. (2019). The status of lipid peroxidation was determined by examining the tissue levels of malondialdehyde (MDA). Briefly, 100 mg of each organ were incubated with thiobarbituric acid to evaluate the levels of thiobarbituric acid-reactive substances. Protein oxidation was also established in these same organs by the quantification of protein carbonyls in tissue pellets using the 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) method (Levine et al., 1990).

2.11. Statistical analysis

The normality of the results was assessed by Shapiro-Wilk test. Data were submitted to two-way ANOVA in order to evaluate the influence of two different categorical independent variables (control x arsenic intake) on one categorical dependent variable (age). Then, it was possible to assess the main effect of each independent variable and the possible interaction between them. Differences were considered significant when p

< 0.05. All graphics were performed using the GraphPad Prism 6.0 statistical software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Data were expressed as mean \pm standard error mean (SEM). ANOVA p-values are shown in the Supplementary Table 2.

3. Results

3.1. Arsenic intake and clinical signs

Based on the average daily solution intake, animals exposed to arsenic ingested 1.34 ± 0.05 mg Kg⁻¹ BW/day. This concentration did not cause any apparent clinical signs in animals during the experimental period. The water consumption did not differ between groups during the 30 days of arsenic administration ($p > 0.05$; Supplementary Figure 1). Overall, the water intake increased weekly during the experimental period ($p < 0.05$; Supplementary Figure 1).

3.2. Biometric parameters and arsenic accumulation

The proportion of arsenic in the testis and epididymis was higher in rats exposed to arsenic at both ages compared to their control animals ($p < 0.05$; Table 1). Final body weight and absolute and relative weights of the testis, prostate, and seminal vesicle did not differ between control and arsenic groups at PND 52 and PND 82 ($p > 0.05$; Table 1). The body weight of rats from both groups increased weekly during the experimental period ($p < 0.05$; Supplementary Figure 1). The absolute weight of epididymis did not change between groups at both ages ($p > 0.05$), but its relative weight was lower in arsenic-exposed rats than their controls at PND 52 ($p < 0.05$; Table 1). Most of the biometric data was influenced only by age instead of the arsenic intake (Supplementary Table 2).

3.3. Serum testosterone levels

There was no change in serum testosterone levels between rats exposed to arsenic from PND 21 to 51 and their controls ($p > 0.05$; Table 1). Differently, serum testosterone levels reduced in arsenic-exposed animals on PND 82 ($p < 0.05$; Table 1).

3.4. Histopathological analysis of testis and epididymis

Histological sections of control testis showed normal architecture of its parenchyma, with concentric seminiferous tubules and germ cells layers in their seminiferous epithelium besides spermatozoa in the lumen. The intertubule, in turn, was composed of Leydig cells, lymphatic and blood vessels, and other components of the connective tissue (Fig. 1A and 1C). On the other hand, testis from animals that received arsenic showed the presence of vacuoles in the base of the epithelium in some seminiferous tubules and an epithelial detachment from the basal region of the seminiferous tubule in animals from both age groups (Fig. 1B and 1D, respectively). In those animals, additionally, seminiferous tubules exhibited increased cytoplasmic debris, apparent sloughing of germ cell, and luminal obstruction (Fig. 1B and 1D). Further, arsenic-exposed rats from PND 52 and PND 82 groups showed a reduction in the percentage of normal seminiferous tubules compared to their controls, resulting in an increased incidence of abnormal seminiferous tubules ($p < 0.05$; Fig. 1E and 1F). The percentage of seminiferous tubules exhibiting spermatozoa within the lumen was lower in arsenic-exposed animals at PND 52 and PND 82 (Fig. 1G and 1H).

Moreover, the epididymis of control rats from both groups showed a typical tissue organization of ductal and interductal compartments in the initial segment and cauda regions (Fig. 2). By contrast, animals exposed to arsenic from PND 52 and 82 groups presented exfoliated cells and spermatozoa in low quantity in the lumen of the initial segment. The proximal cauda showed parts of its epithelium with cribriform aspect, in addition to epithelium vacuoles and detached cells in the lumen (Fig. 2). Sections of proximal cauda showed muscle thickening in rats exposed to arsenic at PND 82 (Fig. 2).

Table 1 Arsenic proportion, biometric parameters, and serum testosterone levels in control and arsenic-exposed rats at postnatal day (PND) 52 and PND 82, respectively 24 hours and 30 days after the end of the experimental treatment.

Parameters	PND 52		PND 82	
	Control	Arsenic	Control	Arsenic
Arsenic proportion in testis (x fold)	1.0 ^a	4.0 ^b	1.0 ^a	2.3 ^b
Arsenic proportion in epididymis (x fold)	1.0 ^a	5.0 ^b	1.0 ^a	3.7 ^b
Final body weight (g)*	218.60 ± 4.99 ^a	199.30 ± 4.88 ^a	335.40 ± 6.06 ^b	351.40 ± 10.70 ^b
Testis (g)*	1.28 ± 0.04 ^a	1.08 ± 0.05 ^a	1.62 ± 0.03 ^b	1.69 ± 0.04 ^b
Testis (g/100 g)	593.80 ± 15.89 ^a	534.00 ± 17.64 ^a	484.90 ± 8.11 ^b	485.30 ± 14.59 ^b
Epididymis (mg)	244.30 ± 11.93 ^a	192.10 ± 12.21 ^a	578.60 ± 14.21 ^b	574.10 ± 16.89 ^b
Epididymis (mg/100 g)	111.70 ± 4.72 ^a	95.95 ± 4.80 ^b	172.80 ± 4.30 ^b	163.60 ± 2.10 ^b
Prostate (mg)*	478.10 ± 24.18 ^a	352.10 ± 19.52 ^a	643.40 ± 28.98 ^b	739.10 ± 38.16 ^b
Prostate (mg/100 g)*	219.10 ± 10.67 ^a	176.10 ± 7.67 ^a	186.20 ± 9.79 ^a	214.6 ± 11.27 ^a
Seminal vesicle (mg)	266.20 ± 22.10 ^a	242.70 ± 18.60 ^a	1429.00 ± 56.32 ^b	1413.00 ± 97.96 ^b
Seminal vesicle (mg/100 g)	122.30 ± 10.30 ^a	121.20 ± 8.37 ^a	427.80 ± 19.67 ^b	401.00 ± 23.52 ^b
Testosterone levels (pg/mL)*	16.14 ± 1.39 ^a	16.56 ± 1.29 ^a	31.08 ± 1.98 ^a	17.34 ± 0.71 ^b

Mean ± SEM. ^{a,b} Significant difference ($p < 0.05$) between arsenic and control groups at PND 52 and PND 82 by two-way ANOVA. In the same roll, if letter sequence differs between PND 52 and PND 82 indicates age effect. *There is interaction between age and arsenic exposure according to two-way ANOVA ($n = 10$ animals/group).

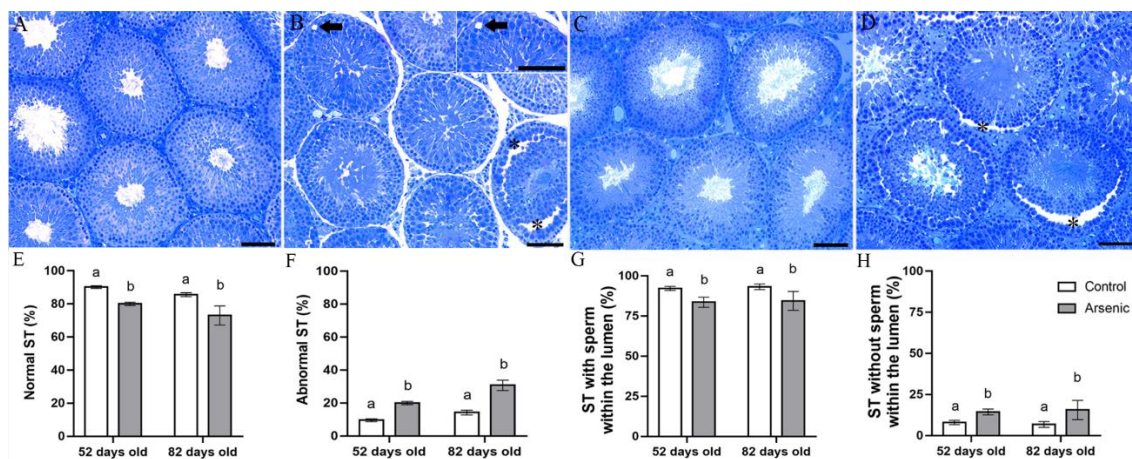


Fig. 1. A-D: Histological sections from testes of pubertal and adult Wistar rats after prepubertal exposure to arsenic. A and C, control animals on post-natal day (PND) 52 and PND 82, respectively, showing seminiferous tubules (ST) with normal tissue architecture. B and D, arsenic-exposed animals on PND 52 and PND 82, respectively, exhibiting ST with epithelial vacuoles, luminal obstruction and areas of epithelium detachment. Arrow: vacuoles; *: epithelium detachment (Toluidine blue, Scale bars: 100 μm). **E-H:** Proportion of normal and abnormal ST and the percentage of ST with and without spermatozoa within the lumen in control and arsenic rats. Mean ± SEM. ^{a,b}Significant difference ($p < 0.05$) between control and arsenic at PND 52 and PND 82 by two-way ANOVA (n = 5 animals/group).

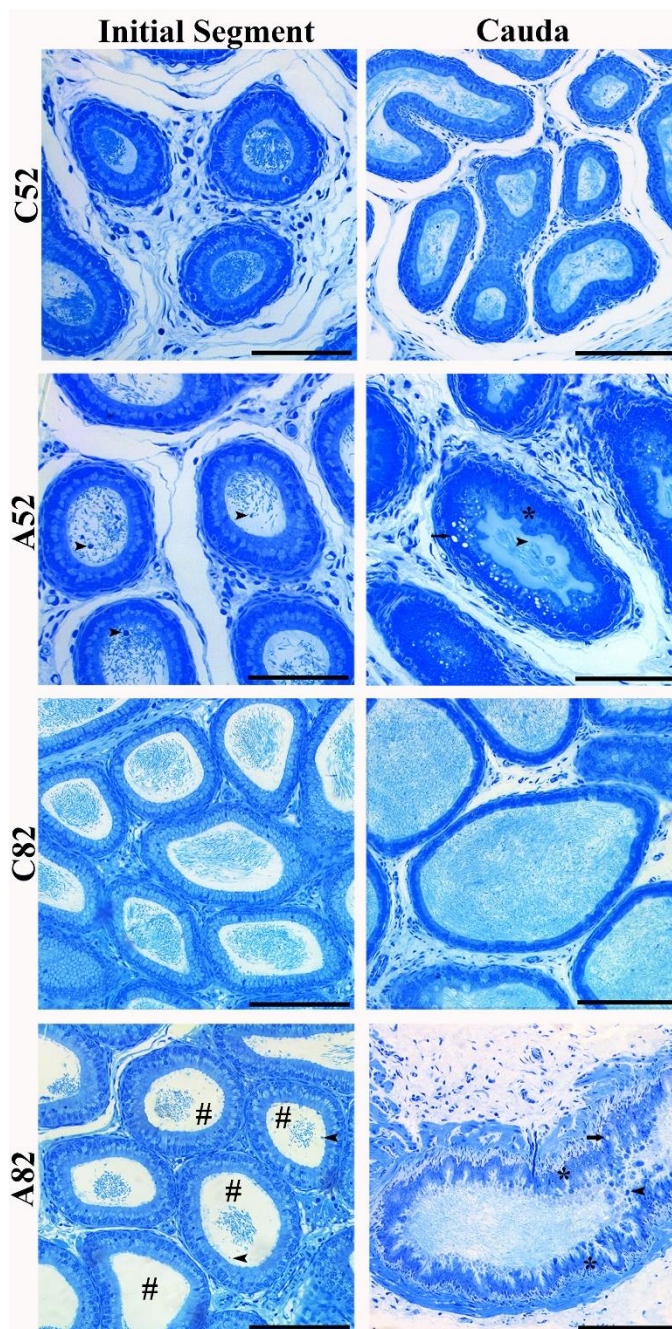


Fig. 2. Histological sections from epididymis of pubertal and adult Wistar rats after prepubertal exposure to arsenic. Initial segment and proximal cauda from control animals on PND 52 (C52) and PND 82 (C82) exhibited normal tissue architecture, as well as spermatozoa in the lumen. In arsenic-exposed animals on PND 52 (A52) and PND 82 (A82), the initial segment presented few luminal sperm and detached cells, whereas the proximal cauda showed epithelial areas with cribriform aspect, basal vacuoles and exfoliated cells in the lumen. Arrow: vacuoles; Arrowhead: exfoliated cells; #: spermatozoa; *: cribriform epithelium. Toluidine blue. Scale bars: 100 μ m.

3.5. Testicular histomorphometry and germ cell counting

Testis of arsenic-exposed animals on PND 52 showed a reduction in the tubular diameter and seminiferous epithelium height compared to control rats ($p < 0.05$; Table

2). On PND 82, in turn, these parameters did not change compared to their controls ($p > 0.05$). The luminal diameter of seminiferous tubules did not alter between groups at both ages ($p > 0.05$). With regards to the intertubular compartment, the proportion of its components, such as macrophages, lymphatic space, connective tissue, and Leydig cells did not alter in their proportion between control and arsenic groups ($p > 0.05$; Table 2). The proportion of blood vessels, in turn, increased in arsenic-exposed animals compared to their controls at PND 52 ($p < 0.05$; Table 2). This parameter did not show differences between groups at PND 82 ($p > 0.05$; Table 2). Further, arsenic exposure did not change the morphometry and stereology of Leydig cells, including the LSI, in rats from both groups at PND 52 and PND 82 ($p > 0.05$; Table 2).

Table 2 Testicular morphometry and stereology in control and arsenic-exposed rats during prepuberty and evaluated postnatal day (PND) 52 and PND82

Parameters	PND 52		PND 82	
	Control	Arsenic	Control	Arsenic
<i>Seminiferous tubules</i>				
Tubular diameter (μm) [*]	272.50 \pm 5.43 ^a	243.80 \pm 5.51 ^b	281.00 \pm 3.12 ^a	280.60 \pm 1.07 ^a
Epithelium height (μm) [*]	84.50 \pm 1.97 ^a	74.02 \pm 0.76 ^b	86.61 \pm 0.77 ^a	88.72 \pm 1.18 ^a
Luminal diameter (μm)	103.20 \pm 3.71 ^a	95.73 \pm 5.97 ^a	107.70 \pm 2.62 ^a	104.00 \pm 1.17 ^a
<i>Intertubular components</i>				
Macrophages (%)	2.57 \pm 0.40 ^a	4.64 \pm 0.69 ^a	2.71 \pm 0.87 ^a	2.26 \pm 0.29 ^a
Lymphatic space (%)	23.51 \pm 4.57 ^a	15.07 \pm 2.49 ^a	19.03 \pm 3.04 ^a	24.65 \pm 4.01 ^a
Blood vessels (%) [*]	4.40 \pm 0.94 ^a	8.64 \pm 0.66 ^b	7.12 \pm 0.70 ^a	6.55 \pm 0.58 ^a
Connective tissue (%)	7.73 \pm 0.77 ^a	10.28 \pm 1.31 ^a	5.14 \pm 0.32 ^b	5.78 \pm 0.56 ^b
Leydig cells (%)	61.78 \pm 3.48 ^a	61.36 \pm 1.22 ^a	65.98 \pm 3.31 ^a	60.74 \pm 4.09 ^a
<i>Leydig cell morphometry and stereology</i>				
Nuclear diameter (μm)	6.34 \pm 0.07 ^a	6.56 \pm 0.07 ^a	6.71 \pm 0.03 ^a	6.43 \pm 0.03 ^a
Nucleus proportion (%)	14.16 \pm 0.85 ^a	18.18 \pm 0.89 ^a	12.08 \pm 0.56 ^b	11.00 \pm 1.13 ^b
Cytoplasm proportion (%)	47.62 \pm 2.71 ^a	43.17 \pm 1.73 ^a	53.90 \pm 3.38 ^a	49.74 \pm 4.38 ^a
Nuclear volume (μm^3)	128.74 \pm 7.05 ^a	138.95 \pm 10.70 ^a	158.48 \pm 2.26 ^a	132.01 \pm 7.83 ^a

Cytoplasmic volume (μm^3)	435.63 \pm 32.55 ^a	338.99 \pm 44.54 ^a	714.06 \pm 55.93 ^b	618.40 \pm 79.94 ^b
Cell volume (μm^3)	564.36 \pm 39.17 ^a	477.93 \pm 53.63 ^a	872.54 \pm 56.32 ^b	750.41 \pm 79.29 ^b
Number of cells/testis ($\times 10^6$)	200.94 \pm 21.44 ^a	121.23 \pm 8.01 ^a	199.96 \pm 7.97 ^a	325.09 \pm 55.83 ^a
Number of cells/ g testis ($\times 10^6$)	82.49 \pm 10.46 ^a	58.33 \pm 4.47 ^a	63.37 \pm 3.61 ^a	93.21 \pm 13.13 ^a
Leydigosomatic index (%)	0.052 \pm 0.008 ^a	0.032 \pm 0.004 ^a	0.052 \pm 0.005 ^a	0.074 \pm 0.011 ^a

Mean \pm SEM. ^{a,b} Significant difference ($p < 0.05$) between arsenic and control groups at PND 52 and PND 82 by two-way ANOVA. In the same roll, if letter sequence differs between PND 52 and PND 82 indicates age effect. *There is interaction between age and arsenic exposure according to two-way ANOVA ($n = 10$ animals/group).

Data of germ cell count and the ratios obtained at Stage I of the seminiferous epithelium cycle are shown in Table 3. The corrected number of germ cells (spermatogonia, round spermatid and total germ cells), meiotic and Sertoli indexes, and daily sperm production were reduced in arsenic-exposed animals on PND 52 compared to their controls ($p < 0.05$; Table 3). At PND 52, additionally, arsenic-exposed rats presented an increase in their mitotic index ($p < 0.05$). These alterations were still present in rats on PND 82 from the arsenic group, excepting the corrected number of spermatogonia that increased in arsenic animals compared to their controls ($p < 0.05$; Table 3).

Table 3 Corrected number of cells in stage 1 of the seminiferous epithelium cycle, sperm indexes, number of Sertoli cells and daily sperm production in control and arsenic-exposed rats during prepuberty and evaluated postnatal day (PND) 52 and PND82.

Parameters	PND 52		PND 82	
	Control	Arsenic	Control	Arsenic
Type A spermatogonia	0.84 \pm 0.09 ^a	0.57 \pm 0.01 ^b	0.69 \pm 0.04 ^a	0.73 \pm 0.04 ^a
PL/L	21.05 \pm 1.17 ^a	20.31 \pm 1.10 ^a	20.05 \pm 1.52 ^a	22.62 \pm 0.92 ^a
Pachytene	21.39 \pm 1.53 ^a	19.59 \pm 1.00 ^a	22.22 \pm 0.67 ^a	24.01 \pm 1.39 ^a
Round spermatid	45.95 \pm 0.97 ^a	33.37 \pm 0.18 ^b	53.06 \pm 0.40 ^a	41.00 \pm 1.75 ^b
Sertoli cell	6.79 \pm 0.28 ^a	6.82 \pm 0.41 ^a	6.05 \pm 0.80 ^a	7.25 \pm 0.41 ^a
Germ cell	89.24 \pm 3.31 ^a	73.84 \pm 2.25 ^b	96.02 \pm 1.59 ^a	88.36 \pm 3.91 ^b
Mitotic index	25.98 \pm 3.51 ^a	35.07 \pm 1.63 ^b	29.22 \pm 0.79 ^a	31.56 \pm 2.98 ^b
Meiotic index	2.18 \pm 0.16 ^a	1.71 \pm 0.08 ^b	2.40 \pm 0.08 ^a	1.72 \pm 0.02 ^b
Sertoli cell index	6.78 \pm 0.13 ^a	4.99 \pm 0.25 ^b	9.42 \pm 1.17 ^a	5.89 \pm 0.46 ^b
NSC (10^6)	8.20 \pm 0.23 ^a	8.97 \pm 1.07 ^a	8.52 \pm 1.38 ^a	8.52 \pm 1.38 ^a

SC	13.15 ± 0.18 ^a	11.02 ± 0.67 ^a	11.02 ± 0.67 ^a	12.60 ± 1.01 ^a
DSP (10 ⁶)	43.35 ± 3.98 ^a	34.42 ± 3.16 ^b	58.44 ± 2.04 ^a	48.73 ± 6.89 ^b

Mean ± SEM. PL/L - primary spermatocyte at preleptotene/leptotene; NSC – number of Sertoli cells; SC – support capacity of Sertoli cells; DSP – daily spermatoc production. ^{a,b}Significant difference ($p < 0.05$) between arsenic and control groups at PND 52 and PND 82 by two-way ANOVA. In the same roll, if letter sequence differs between PND 52 and PND 82 indicates interaction between age and arsenic exposure according to two-way ANOVA ($n = 10$ animals/group).

3.6. Gene expression in testis and epididymis

The mRNA expression levels of the antioxidant enzymes SOD1, SOD2, CAT, GSTK1, and MT1 in testis and cauda epididymis are shown in Figures 3 and 4, respectively. In the testis, expression levels of those genes were higher in arsenic-exposed rats on PND 52 compared to their controls ($p < 0.05$; Fig. 3). On PND 82, their expression levels did not differ between groups ($p > 0.05$; Fig. 3).

Similarly, expression levels of SOD1, CAT, and GSTK1 genes increased in the cauda epididymis of animals exposed to arsenic on PND 52 compared to their control animals ($p < 0.05$; Fig. 4). By contrast, the expression of those genes remained unchanged in arsenic-exposed rats on PND 82 ($p > 0.05$; Fig. 4). SOD2 and MT1 gene expression did not alter in animals from both groups on PND 52 and PND 82 ($p > 0.05$; Fig. 4).

3.7. Antioxidant enzymes and oxidative stress markers

In the testis, the activities of endogenous antioxidant enzymes SOD and CAT altered in arsenic-exposed rats on PND 52 and PND 82 when compared to their respective controls ($p < 0.05$; Fig. 5). Differently, GST activity unchanged in control and arsenic groups at both ages ($p > 0.05$; Fig. 5). The levels of MDA, in turn, did not change in arsenic exposed-animals on PND 52 compared to control rats ($p > 0.05$; Fig. 5), whereas its levels increased in arsenic-exposed animals on PND 82 ($p < 0.05$; Fig. 5). The levels of protein carbonyls increased in rats exposed to arsenic at both ages compared with their controls ($p < 0.05$; Fig. 5).

In the cauda epididymis, the activity of SOD and GST enzymes, as well as the levels of protein carbonyls were unchanged in animals from arsenic groups at PND 52 and PND 82 ($p > 0.05$; Fig. 6). On PND 52, animals exposed to arsenic exhibited a reduction in CAT activity compared to control rats ($p < 0.05$; Fig. 6). By contrast, rats

on PND 82 from the arsenic group showed an increase in the activity of this antioxidant enzyme when compared to their controls ($p < 0.05$; Fig. 6). The levels of MDA were higher in rats exposed to arsenic on PND 52 and PND 82 when compared to control animals ($p < 0.05$; Fig. 6).

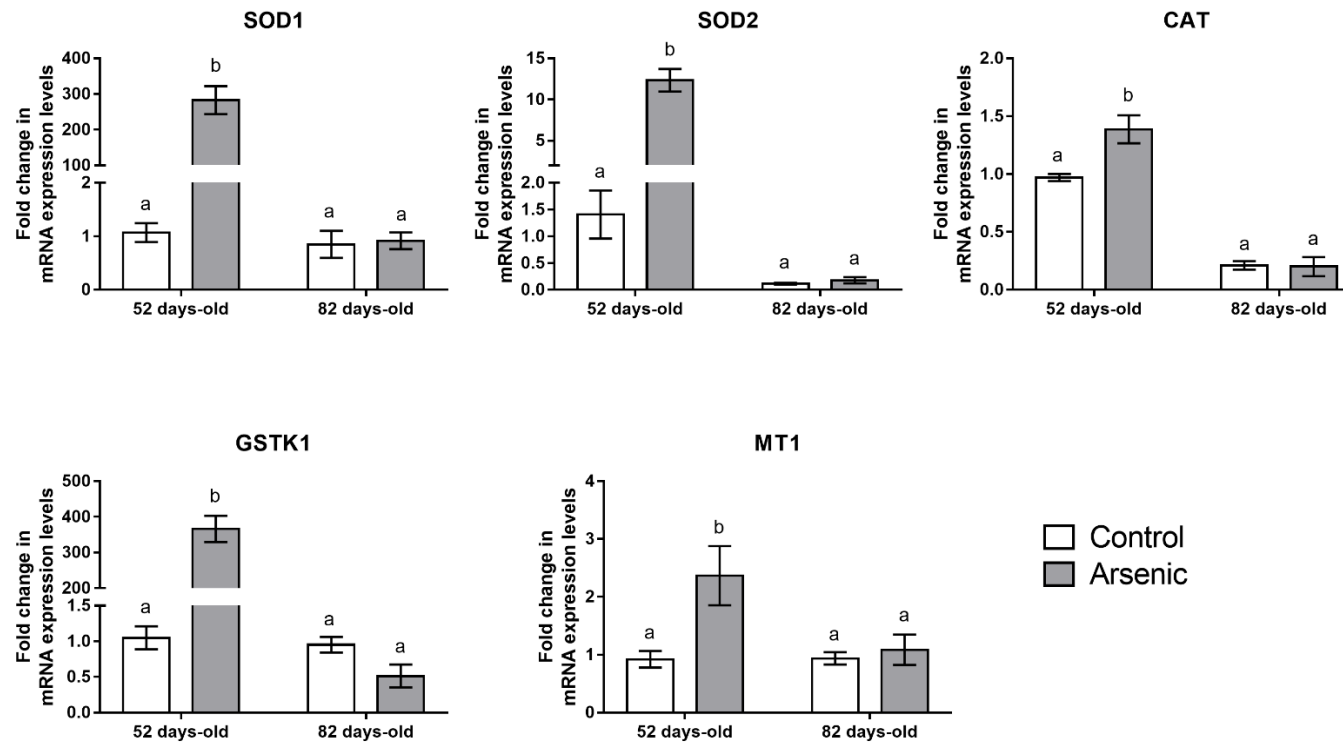


Fig. 3. SOD1, SOD2, CAT, GSTK1 and MT1 mRNA expression levels in testes of pubertal (52 days-old) and adult (82 days-old) Wistar rats from control and arsenic-exposed groups. SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; GSTK1: glutathione S-transferase kappa 1; MT1: metallothionein 1. Mean \pm SEM. ^{a,b} Significant difference ($p < 0.05$) between arsenic and control groups at PND 52 and PND 82 by two-way ANOVA. In the figure, if letter sequence differs between PND 52 and PND 82 indicates interaction between age and arsenic exposure. ($n = 5$ animals/group).

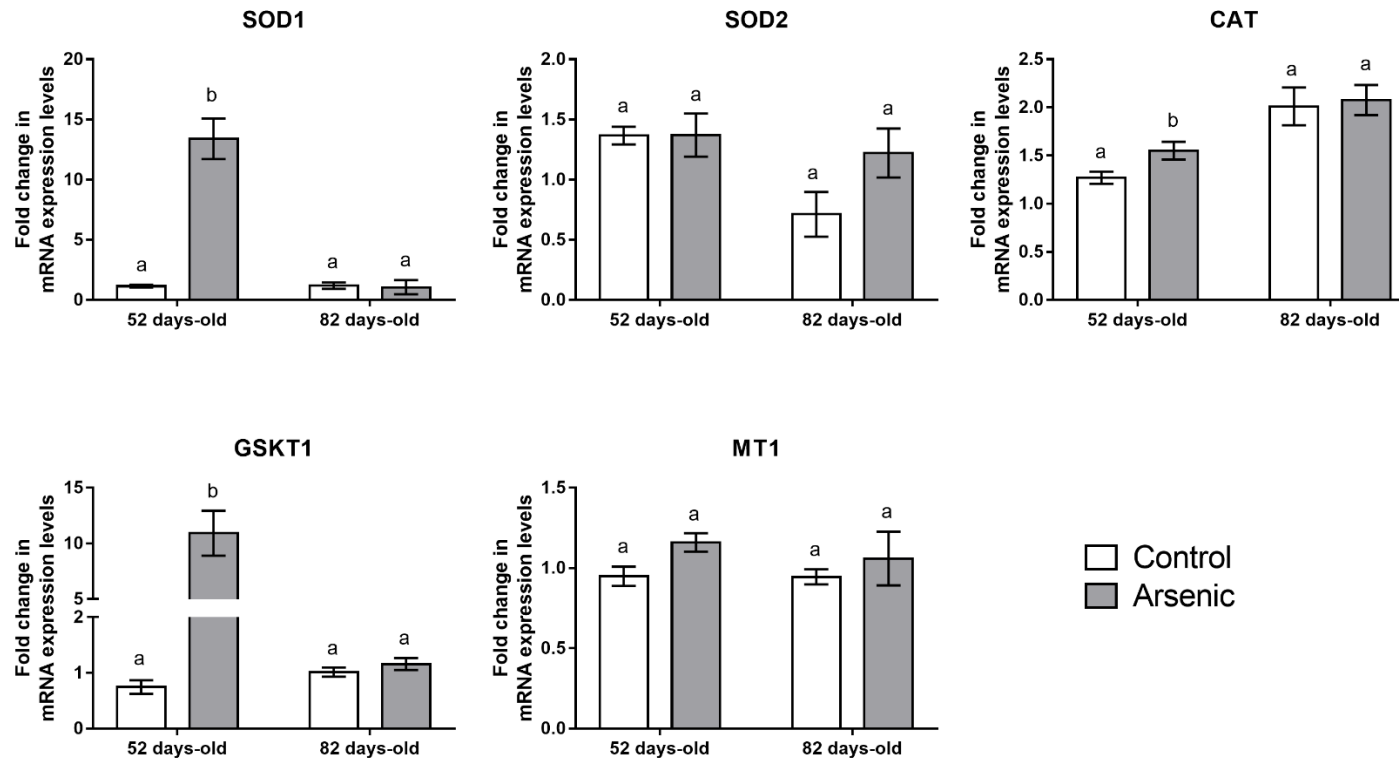


Fig. 4. SOD1, SOD2, CAT, GSTK1 and MT1 mRNA expression levels in cauda epididymis of pubertal (52 days-old) and adult (82 days-old) Wistar rats from control and arsenic-exposed groups. SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; GSTK1: glutathione S-transferase kappa 1; MT1: metallothionein 1. Mean \pm SEM. ^{a,b} Significant difference ($p < 0.05$) between arsenic and control groups at PND 52 and PND 82 by two-way ANOVA. In the figure, if letter sequence differs between PND 52 and PND 82 indicates interaction between age and arsenic exposure. ($n = 5$ animals/group).

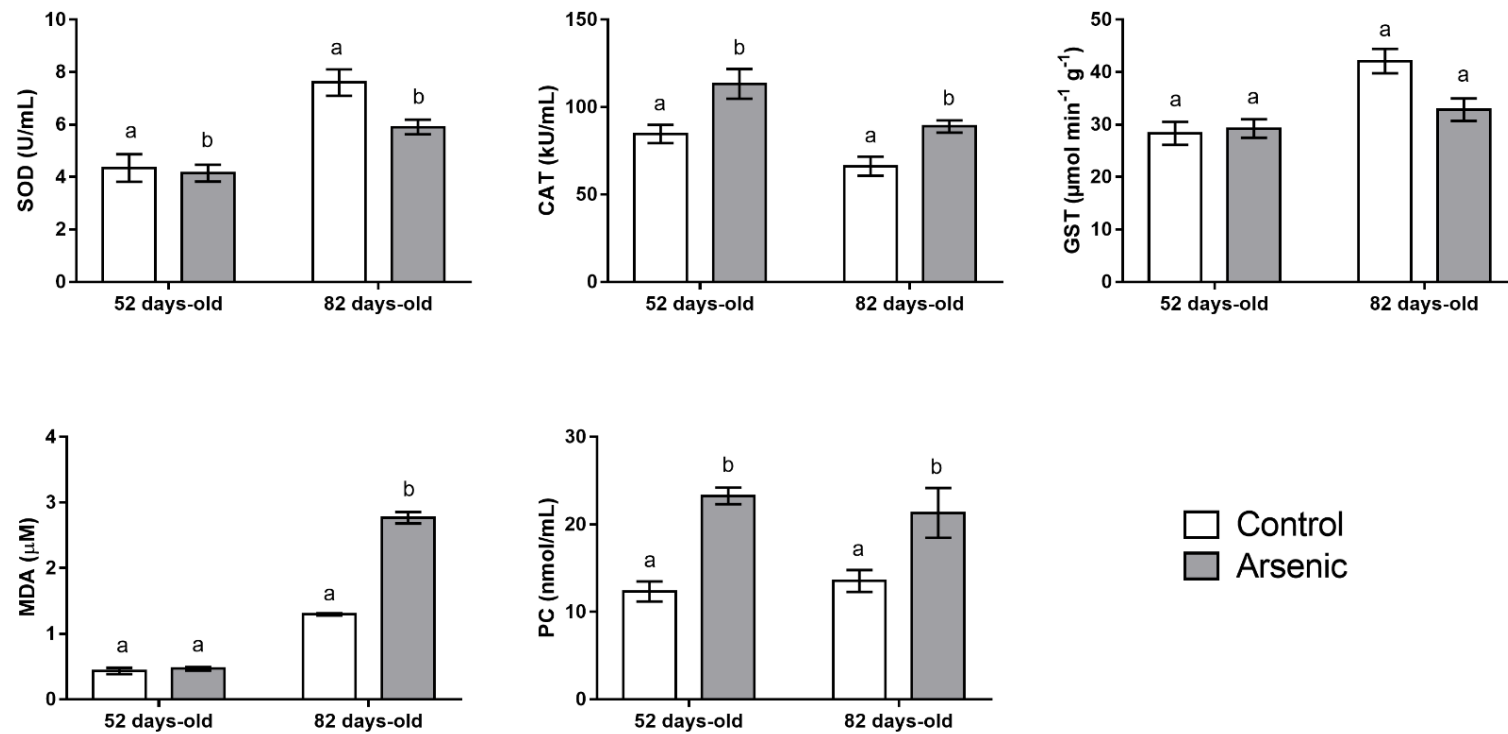


Fig. 5. Oxidative stress markers in testes of male Wistar rats from control and arsenic-exposed groups at 52 and 82 days old. SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; GST: glutathione S-transferase; MDA: malondialdehyde; PC: carbonyl protein. Mean \pm SEM. ^{a,b} Significant difference ($p < 0.05$) between arsenic and control groups at 52 and 82 days old by two-way ANOVA. In the figure, if letter sequence differs between PND 52 and PND 82 indicates interaction between age and arsenic exposure. ($n = 5$ animals/group).

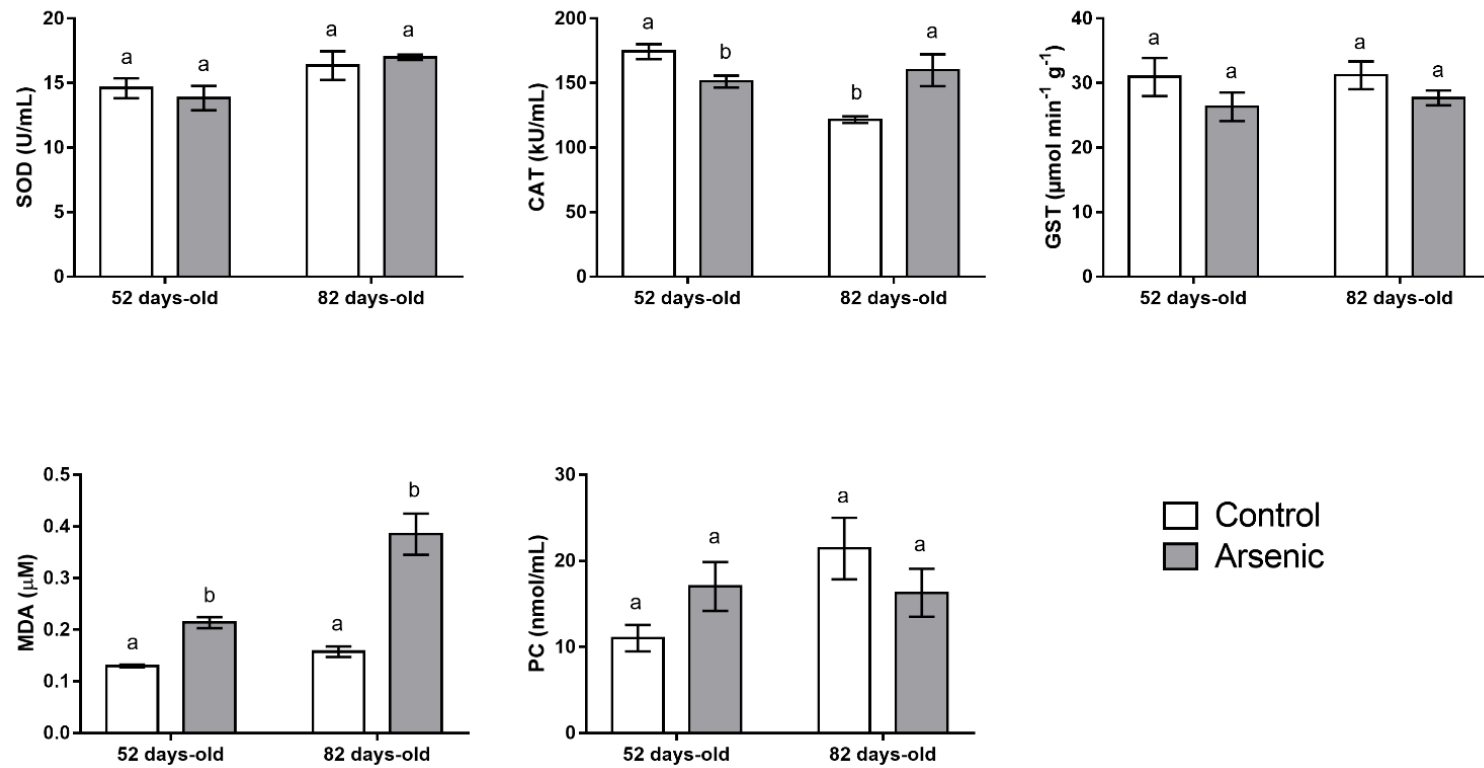


Fig. 6. Oxidative stress markers in epididymis of male Wistar rats from control and arsenic-exposed groups at 52 and 82 days old. SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; GST: glutathione S-transferase; MDA: malondialdehyde; PC: carbonyl protein. Mean \pm SEM. ^{a,b} Significant difference ($p < 0.05$) between arsenic and control groups at 52 and 82 days old by two-way ANOVA. In the figure, if letter sequence differs between PND 52 and PND 82 indicates interaction between age and arsenic exposure. (n = 5 animals/group).

4. Discussion

This is the first study to address the deleterious impact of arsenic in adult rats after prepubertal exposure. Our results demonstrated that reversible effects of arsenic intoxication are parameter dependent. So far, we observed three scenarios: i) the dysregulation of antioxidant genes expression observed in pubertal rats disappeared in adult animals; ii) the altered enzymatic activity and histopathological changes observed in pubertal rats remained in adult rats; and iii) serum testosterone levels reduced in adult rats.

The arsenic provided in drinking water was able to accumulate in the epididymis at high levels, as well as in the testis of pubertal rats. Oldereid et al. (1993) have reported that epididymis is more efficient than testis to accumulate heavy metal ions. It is probably related to the functional characteristics of high absorption and secretion of its epithelial cells. Thirty days after arsenic exposure, the proportion of this metalloid reduced in both tissues, but it was still high compared to control animals. The rat is the animal that retains more arsenic species than other mammals. Their red blood cells can bind to large amounts of organic arsenicals, especially dimethylarsinic acid, causing a decreased urinary excretion and increased accumulation in the body (Aposhian et al., 2004). Even though, the rat is the animal model widely used in experimental studies evaluating arsenic intoxication (da Cunha de Medeiros et al., 2018; Huang et al., 2016; Souza et al., 2016b). Moreover, the arsenic intake via drinking water observed here corresponds to 0.2 mg L^{-1} when expanded to humans (Reagan-Shaw et al., 2008). Although this concentration is considered high for human exposure, there are locations worldwide exhibiting this concentration in contaminated groundwater and food (Gbogbo et al., 2017; Hughes et al., 2011; Liao et al., 2018; WHO, 2011). Therefore, our findings may shed light on the effects of arsenic exposure in young men with possible consequences on their fertility in adulthood.

Oxidative stress is well known as one of the mechanisms of action of arsenic (Wang et al., 2017). In the testis, this cellular process elicits the production of mRNA species for SOD, CAT, and GST (Aitken and Roman, 2008). We detected a significant up-regulation of the detoxifying genes targets SOD1 and GSTK1 mainly, as well as SOD2, CAT, and MT1 in the testes of arsenic-exposed rats on PND 52. While SOD1 is a copper/zinc SOD occurring in the cell cytoplasm, nucleus, and intermembrane space

of the mitochondria, SOD2 is a manganese SOD located in the mitochondrial matrix (Miao and Clair, 2009; Zelko et al., 2002). Both SOD isoforms are relevant to the testis defense strategy (Aitken and Roman, 2008), including after arsenic intake. It may be explained by the molecular processes involved in cellular arsenic metabolism. As arsenic enters the cell via hexose permeases and aquaporins 9 and 7, it reaches the cytoplasm where SOD1 is expressed. Once inside, this metalloid can be readily methylated to form organic arsenicals, or arsenic ions can stay in the cell reacting with thiol-containing molecules or producing oxidative species, stimulating SOD2 expression as well (Roggenbeck et al., 2016).

Additionally, arsenic stimulated the expression of other antioxidant genes such as CAT and GSTK1. CAT gene encodes catalase that is a key antioxidant enzyme in the cell defense against oxidative stress. Catalase is a heme enzyme present in the peroxisome of nearly all aerobic cells. This enzyme converts the reactive species hydrogen peroxide to water and oxygen and so alleviates the toxic effects of hydrogen peroxide (Zini et al., 1996). GSTK1, in turn, encodes the glutathione S-transferase, which is present in the mitochondria and peroxisomes. It catalyzes the conjugation of glutathione to a wide range of substances thus helping in the removal of these compounds from the cell (Luthra et al., 2018). Taking these results into account, we may suggest that arsenic exposure induced an oxidative stress response. The high expression of MT1 gene confirms this fact. This gene encodes the isoform metallothionein 1, a cysteine-rich intracellular protein with low molecular weight and high affinity for heavy metals. This enzyme acts as an antioxidant, protects against free radicals, and plays a role in detoxification of heavy metal. Notably, this gene is more expressed in the testis compared to the epididymis (Cyr et al., 2001; Haq et al., 2003).

In the cauda epididymis, the quantitative real-time PCR analysis revealed a significant up-regulation of SOD1, CAT, and GSTK1 genes in 52 days-old rats exposed to arsenic as observed in testis tissue. Indeed, the primary antioxidant enzymes involved in the protection against reactive species along the entire epididymis duct, as well as their spermatozoa, are SOD, CAT and GST (Aitken and Roman, 2008; O'Flaherty, 2019). On the other hand, in those animals, we observed no changes in the expression of SOD2 and MT1 genes. These findings may be explained by the characteristics of gene expression in this epididymal region. Perry et al. (1993) reported that SOD1 isoform is regularly expressed in the cauda epididymis at high levels compared to SOD2. Further,

mRNA levels of MTs are more expressed in basal cells from the proximal regions than the cauda epididymis, even after cadmium or mercury exposure. In both cases, MT levels in the corpus and cauda regions were either unaffected or decreased (Cyr et al., 2001).

Nevertheless, inconsistencies between increased mRNA expression and enzymatic activity were observed in testis and epididymis for SOD1, SOD2, and GSTK1 genes and their respective enzymes (SOD and GST). Indeed, there is often no correlation between mRNA and protein levels, as well as enzyme activity (Liu et al., 2016). Possibly, mRNA levels represent a snapshot of the cell activity at any given time, and the protein synthesis might be regulated at the post-transcriptional level (Valko et al., 2016). Enzymatic activity, in turn, is modulated by ROS and RNS formed during the inorganic arsenic metabolism (Valko et al., 2016). In this article, we observed an alteration in CAT activity in testis and epididymis of pubertal and adult rats. In latter animals, the reduction in SOD activity contrasted with the high CAT activity in their testes. The increase in CAT activity might be due to the adaptation of part of the endogenous antioxidant system to neutralize oxidative stress in the organs, whereas the decrease of SOD activity can be due to disruption of adaptive mechanism to act against free radicals (Guvvala et al., 2016). Marked changes in the antioxidant enzyme activity were also mentioned in works evaluating the effects of arsenic on the male reproductive system of adult rats (Lima et al., 2018; Souza et al., 2016b).

Intriguingly, the alteration in antioxidant genes expression was no longer detected in testis and epididymis of adult rats after removal of arsenic exposure, though this chemical element was still present in their tissues. This finding is probably due to the absence of inorganic arsenic intake during the recovery period. Once inside the cell, inorganic arsenic is readily methylated to facilitate its excretion (Hughes, 2002). It has demonstrated that inorganic arsenite is more toxic than organic arsenicals due to its faster uptake rate in cells, as well as its higher potential for inducing oxidative stress (Hirano et al., 2004). Due to this fact, we might speculate that inorganic arsenicals are the key molecules to stimulate the overexpression of antioxidant genes in exposed animals.

On the other hand, the presence of methylated arsenicals may be involved in the enzymatic activity observed in adult rats after arsenic insult. Methylation of arsenic is a bioactivation process rather than a detoxification process, and the formation of

methylated trivalent arsenicals may account for the toxicity of inorganic arsenic (Hirano et al., 2004). In particular, methylated arsenic species may release iron from ferritin, which may catalyze the formation of free radicals, including hydroxyl radicals, nitric oxide, and peroxynitrite (Ahmad et al., 2000; Wang et al., 2017). This fact may be supported here by the detection of malondialdehyde and protein carbonyls levels in testis and epididymis from adult rats.

In addition to the above, we observed histopathological changes in male organs of adult rats after the removal of arsenic exposure. Typically, uncontrolled ROS production or impaired ROS scavenging can lead to oxidative damage to membrane phospholipids, nucleic acids, and proteins that, in turn, can disrupt normal cellular processes and trigger severe cell dysfunctions (Santini et al., 2018). Thus, these cellular alterations might directly affect the morphological organization of the organs. In this study, we observed several pathologies in the testis and epididymis of both ages analyzed. The most prevalent alteration in testis was vacuolization in the basal seminiferous epithelium, as previously described by Souza et al. (2016a). Recently, da Cunha de Medeiros et al. (2018) reported vacuoles in the seminiferous epithelium of juvenile rats exposed to sodium arsenite during prepuberty. Vacuolization is a morphological response of Sertoli cells against injuries such as the exposure to toxic components (Creasy, 2011). Here, the vacuolization may have been caused by the higher amount of ROS generated in the tissue due to oxidative overload. Besides, prepubertal arsenic exposure affected the seminiferous epithelium with the sloughing of immature germ cells into the tubular lumen. The incidence of immature germ cells in the tubular lumen can be associated with disruption of germinal epithelium carried out by intercellular bridges cleavages and decrease of fluid secretion by Sertoli cells induced by oxidative stress (Creasy, 2011). It is worth noting that da Cunha de Medeiros et al. (2018) has previously described, in juvenile rats, a high prevalence of inactive androgen receptors after arsenite exposure. This fact might intensify the negative effect of arsenic on the functionality of Sertoli cells and the integrity of seminiferous tubules (Sharpe et al., 2003). For both pathologies observed, the arsenic withdrawal period was unable to reestablish tissue morphology possible due to antioxidant imbalance prevalent in the organ.

Likewise, epididymis exhibited morphological alterations indicating a response to oxidative overload, such as the cribriform appearance in the epithelium of arsenic-

exposed rats on PND 52 and PND 82. This alteration may be a response to the lack of spermatozoa in the lumen and atrophy of the epididymis leading to an injury of the epididymal microenvironment that is essential for the normal processes of sperm maturation (Toledo et al., 2011). Besides, the presence of vacuoles in the epididymal epithelium and the presence of cell debris observed herein is another indication of luminal microenvironment disruption. These changes could mean future damage to the sperm maturation process, as well as interfere with the sperm quality of adult animals after the removal of arsenic exposure.

Another effect of prepubertal arsenic exposure on the testis of pubertal rats was the reduction in the epithelium height and tubular diameter. When we looked at the epithelial cells, we verified that arsenic altered the total number of germ cells in rats on PND 52, mainly spermatogonia and round spermatids. Meanwhile, the exposure to this metalloid modified the mitotic and meiotic indexes, which indicate the division efficiency (Castro et al., 1997; Costa et al., 2007). For instance, the elevated mitotic index reflected the effort of spermatogonial cells for maintaining the number of epithelial cells required for the spermatogenesis process, such as primary spermatocyte at preleptotene/leptotene and pachytene. The reduced meiotic index, in turn, is more related to the number of round spermatids produced per pachytene spermatocyte and represents the cell loss during meiosis. It means that the meiosis was less efficient in intoxicated animals with a negative impact on the round spermatocyte population. In the end, pubertal rats exposed to arsenic showed a reduction in the daily sperm production. The lower Sertoli cell's index and the percentage of seminiferous tubules containing spermatozoa in their lumen supported this finding since both parameters reflect the conditions for sperm production (de Barros et al., 2007), as well as the lower percentage of seminiferous tubules containing spermatozoa in their lumen. Interestingly, most of these alterations were still present in adult rats and resulted in damages to the daily sperm production. Collectively, we may suggest that arsenic exposure during prepuberty affect the daily sperm production in rats from puberty until adulthood, with potential implications for male fertility.

Differently to the tubular compartment, only one morphometrical alteration was observed in the intertubule of testis from arsenic-exposed rats at both ages. The higher proportion of blood vessels found in intoxicated rats on PND 52 is probably associated with the increased diameter of capillaries within the connective tissue. Lima et al.

(2018) also reported this alteration in the epididymis tissue of rats exposed to arsenic. In the current study, adult rats exhibited a remarkable decrease in the serum testosterone levels after prepubertal exposure to arsenic, with no alteration in Leydig cells morphometry and stereology. Several studies have demonstrated that arsenic affects testosterone production by the reduction of hypothalamic-pituitary-testicular activities, and 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) and 17β -HSD enzyme activities in testis (Jana et al., 2006; Zubair et al., 2017). Of note, the period of arsenic contamination here coincides with the differentiation period of adult Leydig cells in rat testis, from progenitor cells to immature Leydig cells (Teerds and Huhtaniemi, 2015). Hence, we might speculate that arsenic disturbed the functionality of mature adult Leydig cells of rats on PND 82 but preserved their number and morphology. This cell type is highly dependent on LH stimulus for the testosterone production (Shima, 2019). Therefore, our findings might be related to a dysfunction of the hypothalamic-pituitary-testicular axis. Nevertheless, in this study, we cannot conclude the real cause of the low testosterone levels, and this should be investigated in future studies. Additionally, it remains to be seen whether the low testosterone level influenced the male reproductive behavior and fertility potential in adult rats exposed to arsenic during puberty.

5. Conclusion

In summary, our findings shed light on the impact of prepubertal arsenic exposure on the reproductive functions of male rats during adulthood. Indeed, the adulthood is the life span that reproductive ability is fully developed, and then it is possible to measure their reproductive competence. In this sense, our results showed that, in pubertal rats, arsenic intoxication caused disorders in testis and epididymis, such as the overexpression of antioxidant genes, alterations in antioxidant enzymes' activity and tissue architecture, with detriment to daily sperm production. While these three latter damages remained in the organs of adult rats under free arsenic conditions, those animals also presented low levels of serum testosterone. Collectively, those injuries might impair vital functions such as spermatogenesis, steroidogenesis, and sperm maturation over the male reproductive lifetime. Moreover, our findings might be considered a baseline for future studies testing the possible effects of prepubertal arsenic exposure on male fertility.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais [grant number APQ-02514-16 and PPM-00621-18 to M.M-N.], and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [postdoctoral fellowship 150333/2018-8 to A.C.F.S.; grant number 420077/2018-9 to M.M-N.; Fellowship granted to the research in productivity 302088/2018-0 to M.M-N.].

Disclosures

The authors declare that they have no conflict of interest.

Authorship contribution statement

Felipe Couto-Santos: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Resources, Writing – original draft, Visualization. **Ana Cláudia F. Souza:** Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation, Writing – original draft, Visualization. **Daniel S. S. Bastos:** Formal analysis, Investigation. **Luiz Otávio G. Ervilha:** Investigation. **Fernanda Carolina Ribeiro Dias:** Investigation. **Larissa de Sales Araújo:** Investigation. **Simone Eliza Facioni Guimarães:** Writing - review & Editing. **Leandro L. Oliveira:** Writing - review & editing. **Mariana Machado-Neves:** Conceptualization, Supervision, Investigation, Data curation, Resources, Funding Acquisition, Writing - review & editing.

References

- Aitken R., Roman S., 2008. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1, 15–24. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_9
- Ahmad S., Kitchin K.T., Cullen W.R., 2000. Arsenic species that cause release of iron from ferritin and generation of activated oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.* 382, 195–202. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2023>
- Alamdar A., Eqani S.A.M.A.S, Ali S.W., Sohail M., Bhowmik A.K., Cincinelli A., Subhani M., Ghaffar B., Ullah R., Huang Q., Shen H., 2016. Human arsenic exposure via dust across the different ecological zones of Pakistan. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 126, 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.044>
- Alamdar A., Tian M., Huang Q., Du X., Zhang J., Liu L., Shah S.T.A., Shen H., 2019. Enhanced histone H3K9 tri-methylation suppresses steroidogenesis in rat testis

- chronically exposed to arsenic. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 170, 513–520. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.035>
- Amann R., Almquist J., 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *Dairy Sci* 774-781. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(62\)89487-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(62)89487-9)
- Amann R., Schanbacher B., 1983. Physiology of male reproduction. *J. Anim. Sci.* 57, 380-403.
- Aposhian H.V., Zakharyan R.A., Avram M.D., Sampayo-Reyes A., Wollenberg M.L., 2004. A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 327-335. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.10.027>
- Benbrahim-Tallaa L., Waalkes M.P., 2008. Inorganic arsenic and human prostate cancer. *Environ. Health Perspect.* 116, 158–164. <https://doi.org/10.1289/ehp.10423>
- Birben E., Sahiner U., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O., 2012. Oxidative stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ. J.* 5, 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Castro A.C.S., Berndtson W.E., Cardoso F. M., 1997. Cinética e quantificação da espermatogênese: bases morfológicas e suas aplicações em estudos da reprodução de mamíferos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 21, 25-34.
- Costa D.S., Henry M., Paula T.A.R., 2004. Spermatogenesis in the collared peccary (*Tayassu tajacu*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56, 46-51. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352004000100008>
- Creasy D. (2011) Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicol. Pathol.* 29, 64-76. <https://doi.org/10.1080/019262301301418865>
- Cyr D., Dufresne J., Pillet S., Alfieri T., Hermo L., 2001. Expression and regulation of metallothioneins in the rat epididymis. *J. Androl.* 22, 124-135. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02162.x>
- Da Cunha de Medeiros P., Samelo R., Silva A.P., Santiago G., Duarte F., Castro I., Perobelli J., 2018. Prepubertal exposure to low of sodium arsenite impairs spermatogenesis and epididymal histophysiology in rats. *Environ. Toxicol.* 34, 83-91. <https://doi.org/10.1002/tox.22660>
- De Barros J.B.G., Paula T.A.R., Matta S.L.P., Fonseca C.C., Leite F.L.G., Rossi Jr J.L., Oliveira P.C., Costa E.P. *Anim. Reprod. Sci.* 102, 350-356. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.04.002>
- Diamanti-Kandarakis E., Bourguignon J.P., Giudice L.C., Hauser R., Prins G.S., Soto A.M., Gore A.C., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr. Rev.* 30, 293–342. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>
- Frisbie S.H., Ortega R., Maynard D.M., Sarkar B., 2002. The concentrations of arsenic and other elements in Bangladesh's drinking water. *Environ. Health. Perspect.* 110, 1147–53. <https://doi.org/10.1289/ehp.021101147>
- Gbogbo F., Otoo S.D., Asomaning O., Huago R.Q., 2017. Contamination status of arsenic in fish and shellfish from three river basins in Ghana. *Environ. Monit. Assess.* 189, 400. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6118-9>
- Guvvala P.R., Sellapan S., Parameswaraiyah R.J., 2016. Impact of arsenic (V) on testicular oxidative stress and sperm functional attributes in Swiss albino mice. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 18200-18210. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6870-3>
- Haq F., Mahoney M., Koropatnick J., 2003. Signaling events for metallothionein induction. *Mutat. Res.* 533, 211-226. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.07.014>

- Hirano S., Kobayashi Y., Cui X., Kanno S., Hayakawa T., Sharaim A., 2004. The accumulation and toxicity of methylated arsenicals in endothelial cells: important roles of thiol compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 458-467. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.10.023>
- Hsieh F.I., Hwang, T.I., Hsieh Y.C., Lo H.C., Su C.T., Hsu H.S., Chiou H.Y., Chen C.J., 2008. Risk of erectile dysfunction induced by arsenic exposure through well water consumption in Taiwan. *Environ. Health Perspect.* 116, 532-536. <https://doi.org/10.1289/ehp.10930>
- Huang Q., Luo L., Alamdar A., Zhang J., Liu L., Tian M., Eqani S.A., Shen H., 2016. Integrated proteomics and metabolomics analysis of rat testis: Mechanism of arsenic-induced male reproductive toxicity. *Sci. Rep.* 6, 32518. <https://doi.org/10.1038/srep32518>
- Hughes MF, 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.*, 133, 1-16. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(02\)00084-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(02)00084-x)
- Hughes M.F., Beck B.D., Chen Y., Lewis A.S., Thomas D.J., 2011. Arsenic Exposure and Toxicology: A Historical Perspective. *Toxicol. Sci.*, 123, 305-332. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr184>
- Jana K., Jana S., Samanta P.K., 2006. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 16, 4-9. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-9>
- Kempinas W.G., Klinefelter G.R., 2015. Interpreting histopathology in the epididymis. *Spermatogenesis*, 4, 2 e979114. <https://doi.org/10.4161/21565562.2014.979114>
- Leite G.A.A., Figueredo T.M., Sanabria M., Dias A.F.M.G., Silva P.V.E., Martins Junior A.D.C., Barbosa Junior F., Kempinas W.G., 2017. Ascorbic acid supplementation partially prevented the delayed reproductive development in juvenile male rats exposed to rosuvastatin since prepuberty. *Reprod. Toxicol.* 73, 328-338. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.07.006>
- Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S., Stadtman E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464-478. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-h](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-h)
- Liao N., Seto E., Eskenasi B., Wang M., Li Y., Hua J., 2018. A comprehensive review of arsenic exposure and risk from rice and a risk assessment among a cohort of adolescents in Kunming, China. *Int. J. Environm. Res. Public Health* 15, pii: E2191. <https://doi.org/10.3390/ijerph15102191>
- Lima G.D.A., Sertorio M.N., Souza A.C.F., Menezes T.P, Mouro V.G.R., Gonçalves N.M., Oliveira J.M., Henry M., Neves M.M., 2018. Fertility in male rats: Disentangling adverse effects of arsenic compounds. *Reprod. Toxicol.* 78, 130-140. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.04.015>
- Liu Y., Beyer A., Aebersold R., 2016. On the dependency of cellular protein levels on mRNA abundance. *Cell* 165, 535-550. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.014>
- Luthra S., Chandran U., Diergaarde B., Becich M., Lee A.V., Neumann C.A., 2018. Expression of reactive species related genes is associated with patient survival in luminal B breast cancer. *Free Radic. Biol. Med.* 120, 170-180. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.011>
- Miao L., Clair D.K., 2009. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 344-356. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018>

- O'Flaherty C. (2019) Orchestrating the antioxidant defenses in the epididymis. *Andrology*, 1-7. <https://doi.org/10.1111/andr.12630>
- Oldereid N.B., Thomassen Y., Attraadal A., Olaisen B., Purvis K., 1993. Concentrations of lead, cadmium and zinc in the tissues of reproductive organs of men. *J. Reprod. Fertil.* 99, 421-425. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0990421>
- Perobelli J. (2014) The male peripubertal phase as a developmental window for reproductive toxicology studies. *Curr. Pharm. Des.* 20, 5398- 5415. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140205150059>
- Perry A., Jones R., Hall L., 1993. Isolation and characterization of the rat cDNA clone encoding a secreted superoxide dismutase reveals the epididymis to be a major site of its expression. *Biochem. J.* 293, 21-25. <https://doi.org/10.1042/bj2930021>
- Pfaffl M.W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26, 509-515.
- Picut C.A., Ziejewski M.K., Stanislaus D., 2018. Comparative aspects of pre-and postnatal development of the male reproduction system. *Births Defects Res.* 110,190-227. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1133>
- Reagan-Shaw S., Nihal M., Ahmad N., 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 22, 659-661. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF>
- Reddy P., Rani G., Sainath S., Meena R., Supriya C., 2011. Protective effects of N-acetylcysteine against arsenic-induced oxidative stress and reprotoxicity in male mice. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 25, 247-253. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2011.08.145>
- Robaire B., Hinton B.T., 2015. The epididymis In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (eds Plant T & Zeleznik AJ), pp. 691-772. Elsevier, New York
- Rodríguez-Barranco M., Lacasaña M., Aguilar-Garduño C., Alguacil J., Gil F., González-Alzaga B., Rojas-García A., 2013. Association of arsenic, cadmium and manganese exposure with neurodevelopment and behavioural disorders in children: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Total Environ.* 454-455, 562-577. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.047>
- Roggenbeck B., Banerjee M., Leslie E., 2016. Cellular arsenic transport pathways in mammals. *J. Environ. Sci.* 49, 36-58. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.10.001>
- Santini S., Cordone V., Falone S., 2018. Role of mitochondria in the oxidative stress induced by electromagnetic fields: Focus on reproductive systems. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1-18. <https://doi.org/10.1155/2018/5076271>. eCollection 2018
- Sharpe R.M., McKinnell C., Kivlin C., Fisher J.S., 2003. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125, 769-784. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250769>
- Shen H., Xu W., Zhang J., Chen M., Martin F., Xia Y., Liu L., Dong S., Zhu YG., 2013. Urinary metabolic biomarkers link oxidative stress indicators associated with general arsenic exposure to male infertility in a han chinese population. *Environ. Sci. Technol.* 47, 8843-8851. <https://doi.org/10.1021/es402025n>
- Shima Y., 2019. Development of fetal and adult Leydig cells. *Reprod. Med. Biol.* 18,323-330. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12287>
- Skowronski M., Kwon T.H., Nielsen S., 2009. Immunolocalization of aquaporin 1, 5, and 9 in the female pig reproductive system. *J. Histochem. Cytochem.* 57, 61e7. <https://doi.org/10.1369/jhc.2008.952499>
- Souza A.C.F., Marchesi S.C., Lima G.D.A.L., Ferraz R.P., Santos F.C., da Matta S.L.P., Machado-Neves M., 2016a. Effects of sodium arsenite and arsenate in testicular

- histomorphometry and antioxidants enzymes activities in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 171, 354-62. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0523-0>
- Souza A.C.F., Marchesi S., Ferraz R., Lima G.D.AL., Oliveira J.A., Machado-Neves M., 2016b. Effects of sodium arsenate and arsenite on male reproductive functions in Wistar rats. *J. Toxicol. Environ. Health* 6, 274-286. <https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1150926>
- Souza A.C.F., Bastos D.S.S., Santos F.C., Sertorio M.N., Ervilha L.O.G., Gonçalves R.V., de Oliveira L.L., Machado-Neves M., 2018. Arsenic aggravates oxidative stress causing hepatic alterations and inflammation in diabetic rats. *Life Sci.* 209, 472-480. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.054>
- Souza A.C.F., Bastos D.S.S., Sertorio M.N., Santos F.C., Ervilha L.O.G, de Oliveira L.L., Machado-Neves M., 2019. Combined effects of arsenic exposure and diabetes on male reproductive functions. *Andrology* 2019, 1-11. <https://doi.org/10.1111/andr.12613>
- Teerds K.J., Huhtaniemi I.T., 2015. Morphological and functional maturation of Leydig cells: from rodent models to primates. *Hum. Reprod. Update* 21, 310-328. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv008>
- Toledo F.C., Perobelli J.E., Pedrosa F.P., Anselmo- Franci J.Á., Kempinas W.D., 2011. In utero protein restriction causes growth delay and alters sperm parameters in adult male rats. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9, (1):94. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-94>
- United State Environmental Protection Agency (U.S. EPA)., 2011. Pubertal development and thyroid function in intact juvenile/peripubertal male rats assay. OCSPP Guideline 890, 1500. Standard Evaluation Procedure (SEP), Washington, DC, pp 1-19.
- Valko M., Jomova K., Rhodes C.J., Kuca J., Musílek K., 2016. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch. Toxicol.* 90, 1-37. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1579-5>
- Veeramachaneni D.N., Palmer J.S., Amann R.P., 2001. Long-term effects on male reproduction of early exposure to common chemical contaminants in drinking water. *Hum. Reprod.* 16, 979-87. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.5.979>
- Wang H., Zhu J., Li L., Li Y., Lv H., Xu Y., Sun G., Pi J., 2017. Effects of Nrf2 deficiency on arsenic metabolism in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 337, 111-119. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.11.001>
- World Health Organization (WHO)., 2011. Guidelines for drinking water quality. 4th ed. Geneva, pp 315-318.
- Xu W., Bao H., Liu F., Liu L., Zhu Y-G., She J., 2012. Environmental exposure to arsenic may reduce human semen quality: associations derived from a Chinese cross-sectional study. *Environ. Health* 11, 46. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-11-46>
- Zelko I., Mariani T., Folz R., 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 337-349. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00905-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00905-X)
- Zini A., Schlegel P., 1996. Catalase mRNA expression in the male rat reproductive tract. *J. Androl.* 17, 473- 80. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1996.tb01823.x>
- Zubair M., Ahmad M., Qureshi Z.I., 2017. Review on arsenic-induced toxicity in male reproductive system and its amelioration. *Andrologia* 49, e12791. <https://doi.org/10.1111/and.12791>

Supplementary material

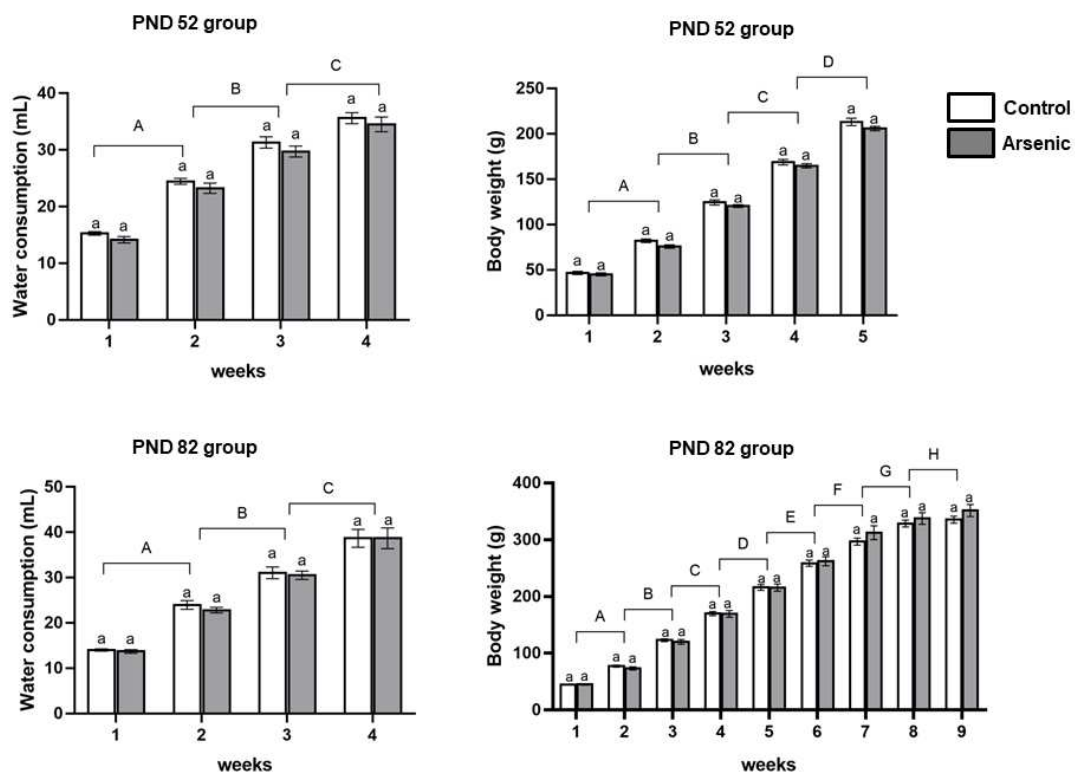
Supplementary Table 1 Primers sequences for gene expression analysis by RT-qPCR.

Gene	GeneBank Accession no.	Primer sequence
Catalase	NM_012520.2	Forward: 5'- GTACAACTCCCAGAAGCCTAAG-3' Reverse: 5'-ACCCGTGCTTTACAGGTTAG-3'
Superoxide dismutase 1	NM_017050.1	Forward: 5'-CAATGTGGCTGCTGGAAAG-3' Reverse: 5'-CACCATAGTACGGCCAATGA-3'
Superoxide dismutase 2	NM_017050.2	Forward: 5'-GGGAGCACGCTTACTATCTTC-3' Reverse: 5'-GGGCTTCACTTCTTGCAAAC-3'
glutathione S-Transferase 1	NM_181371.2	Forward: 5'-CTGGGCTTTGAGGTCCTATG-3' Reverse: 5'-TAGCTGGTGGTTGGTTTCC-3'
Metallothionein 1	NM_138826.4	Forward: 5'-TGTGCCTGAAGTGACGAA-3' Reverse: 5'-GTAAACTGGGTGGAGGTGTA-3'
Glycealdehyde-3-phosphate dehydrogenases (endogenous)	NM_017008.4	Forward: 5'-AGCATCTCCCTCACAATTCC-3' Reverse: 5'-GGGTGCAGCGAACTTTATTG-3'
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (endogenous)	NM_012583.2	Forward: 5'-AGACAGCGGCAAGTTGAA-3' Reverse: 5'-AGTAGATGGCCACAGGACTA-3'
Actin beta (endogenous)	NM_031144.3	Forward: 5'-GTGTGGATTGGTGGCTCTAT-3' Reverse: 5'-TCAGTAACAGTCCGCCTAGA-3'

Supplementary Table 2 ANOVA p values

Parameters	Two-way ANOVA		
	Age effect	As effect	Interaction
Arsenic Intake	0.724	0.004	0.600
Arsenic proportion in testis	0.714	0.000	0.617
Arsenic proportion in epididymis	0.657	0.000	0.882
Final body weight	0.000	0.814	0.017
Testis (g)	0.000	0.149	0.004
Testis (g/100 g)	0.000	0.125	0.119
Epididymis (mg)	0.000	0.050	0.102
Epididymis (mg/100g)	0.000	0.005	0.4333
Prostate (mg)	0.000	0.616	0.000
Prostate (mg/100g)	0.776	0.468	0.001
Seminal vesicle (mg)	0.000	0.739	0.947
Seminal vesicle (mg/100g)	0.000	0.409	0.445
Testosterone	0.000	0.000	0.000
Normal seminiferous tubules	0.164	0.04	0.851
Abnormal seminiferous tubules	0.000	0.000	0.099
ST with sperm within the lumen	0.800	0.024	0.978
ST without sperm within the lumen	1.000	0.033	0.717
Tubular diameter	0.000	0.003	0.004
Epithelium height	0.000	0.005	0.000
Luminal diameter	0.130	0.137	0.693
Macrophages (%)	0.085	0.205	0.057
Lymphatic space (%)	0.491	0.702	0.070
Blood vessel (%)	0.671	0.024	0.005
Connective tissue (%)	0.001	0.073	0.266
Leydig cell (LC; %)	0.852	0.071	0.095
LC: Nuclear diameter	0.056	0.619	0.001
LC: Nuclear proportion	0.000	0.116	0.011
LC: Cytoplasm proportion	0.061	0.197	0.965
LC: Nuclear volume	0.153	0.300	0.028
LC: Cytoplasm volume	0.000	0.105	0.993
LC volume	0.000	0.096	0.766
Number of LC/ testis (x10 ⁶)	0.000	0.996	0.000
Number of LC/ g testis (x10 ⁶)	0.657	0.746	0.004
Leydigosomatic index (%)	0.003	0.613	0.004
Spermatogonia	0.961	0.032	0.024
Spermatocyte preleptotene/leptotene	0.624	0.498	0.228

Pachytene	0.077	0.997	0.211
Round spermatid	0.000	0.000	0.852
Sertoli cell	0.833	0.391	0.413
Germ cell	0.005	0.009	0.279
Mitotic index	0.957	0.038	0.195
Meiotic index	0.275	0.000	0.285
Sertoli cell index	0.051	0.006	0.299
Number of Sertoli cells	0.288	0.156	0.425
Support capacity of Sertoli cells	0.093	0.051	0.451
Daily sperm production	0.000	0.001	0.849
Testis SOD1 expression	0.000	0.000	0.000
Testis SOD2 expression	0.000	0.000	0.000
Testis CAT expression	0.000	0.012	0.009
Testis GSTK1 expression	0.000	0.000	0.000
Testis MT1 expression	0.866	0.035	0.041
Epididymis SOD1 expression	0.000	0.000	0.000
Epididymis SOD2 expression	0.335	0.471	0.192
Epididymis CAT expression	0.001	0.050	0.945
Epididymis GSTK1 expression	0.000	0.000	0.000
Epididymis MT1 expression	0.071	0.662	0.725
Testis SOD activity	0.000	0.0001	0.996
Testis CAT activity	0.001	0.037	0.096
Testis GST activity	0.001	0.395	0.606
Testis MDA	0.000	0.000	0.000
Testis PC	0.639	0.000	0.317
Epididymis SOD activity	0.009	0.940	0.409
Epididymis CAT activity	0.000	0.451	0.000
Epididymis GST activity	0.715	0.086	0.806
Epididymis MDA	0.013	0.010	0.963
Epididymis PC	0.072	0.977	0.068



Supplementary Figure 1 Water consumption and body weight of pubertal (PND 52 group) and adult (PND 82 group) Wistar rats during the experimental period (weeks). ^aComparison between control and arsenic groups ($p > 0.05$). ^{A,B}Different letters (A,B,C,D) indicate differences ($p < 0.05$) between weeks by two-way ANOVA ($n = 10$ animals/group).

ARTIGO 2

Prepubertal exposure to arsenic alters phosphoproteins profile and quality of epididymal spermatozoa in sexually mature rats*

* Artigo a ser submetido na revista Science of the Total Environmental

Abstract

Prepubertal arsenic intoxication is a hazard to the reproductive parameters of pubertal and adult males. However, it is still unclear the extent to which arsenic could affect the fertile ability of sexually mature rats after prepubertal exposure. Therefore, we aimed to evaluate the effects of prepubertal exposure to arsenic on the fecundity of epididymal sperm from sexually mature rats, assessing fertility indexes, sperm parameters, and sperm phosphoproteins content. Male pups on postnatal day (PND) 21 or were treated with filtered water (control group, $n = 10$) or were exposed to 10 mg L^{-1} arsenite (arsenic group, $n = 10$) daily. The exposure period lasted up to PND51. Afterward, animals from both groups were maintained alive up to PND82 drinking filtered water. During this experimental period, the animals mated with non-exposed females between PND72 and PND75. Our results showed a diminishing of daily sperm production and the number of testicular homogenized-resistance spermatids in arsenic-exposed rats, as well as sperm count in their epididymal regions. Sexually mature rats exhibited low sperm motility and percentage of sperm with intact membranes after prepubertal arsenic exposure, which potentially contributed to the low fertility potential and high preimplantation loss. Epididymal sperm proteome detected 624 proteins, corresponding to 608 genes matched in a distribution of 41 clusters. The gene ontology identified a more enriched glycolytic process and GTPase activity in arsenic-exposed animals. The KEGG enrichment analysis identified higher enrichment of oxidative phosphorylation, glycolysis/ gluconeogenesis, biosynthesis of amino acids, and carbon metabolism in sperm from arsenic-exposed rats, whereas control animals exhibited higher enrichment in oocyte meiosis cluster. From the 26 proteins found phosphorylated here, MIEAP presented phosphorylation pattern arsenic-exposed animals only. We concluded that prepubertal exposure to arsenic is harmful to sperm quality and male fertility, with influences in the phosphoproteins profile.

Keywords: Sperm proteins, arsenite, male fertility, reproductive toxicology

1. Introduction

Arsenic has attracted the attention of both the scientific and public community owing to its environmental, public health, and toxicity issues (Lui et al., 2014; Renu et al., 2018; Coelho et al., 2020a,b). Over the last decades, humans are contaminated chronically with inorganic arsenic in drinking water, which is considered a relevant source of arsenic intake. The exposure to this metalloid may lead to the development of cancer and other complications in body systems, including the reproductive tract (Hughes., 2002; Hughes et al., 2003; Abdul et al., 2015; Huang et al., 2016). Epidemiological studies have associated the adverse effect of arsenic with male reproductive disorders in humans, such as erectile dysfunction, sperm damages, and prostate cancer (Veeramachaneni et al., 2001; Benbrahim-Talla and Waalkes, 2008; Hsieh et al., 2008; Xu et al., 2012). Likewise, studies demonstrated that arsenic impairs the fertility of rodents by reducing the motility, number, and viability of epididymal spermatozoa (Reddy et al., 2011; Lima et al., 2018; Machado-Neves, 2020).

So far, few studies have reported reproductive alterations caused by arsenic in young individuals (Perobelli, 2014; Medeiros et al., 2018). Prepuberty is a critical lifetime period for the development of male reproductive organs because spermatogenesis and steroidogenesis are not fully completed in the testis, as well as epithelial differentiation in the epididymis (Sharpe, 1994; Robaire and Hinton, 2015). Such developmental events are remarkably responsive to xenobiotic induced endocrine disorders (Perobelli, 2014). A recent study described damages to spermatogenesis and inactivation of androgen receptors in the testis of juvenile rats exposed to arsenic during prepuberty (Medeiros et al., 2018). Later on, our group showed that most of the arsenic damages observed in pubertal rats remained in sexually mature males, such as damages in testis and epididymis tissues and alterations in antioxidant enzymes' activity, with a diminishing serum testosterone levels 30 d after the arsenic insult (Couto-Santos et al., 2020). Importantly, Veeramachanenin et al. (2001) cited that long-term sequelae of infantile exposure to toxic agents could remain undetected for many years until manifestation as idiopathic subfertility or testicular pathology in adult men.

Based on that, it is reasonable to hypothesize that prepubertal exposure to arsenic may impair the sperm fecundity. The acquisition of such ability occurs during sperm transit throughout the epididymis. This organ is a highly convoluted duct lined by

a pseudostratified epithelium that creates a unique luminal environment for sperm maturation (Breton et al., 2019). This process involves several biochemical and structural membrane changes, caused by the removal, translocation, and modification of proteins (Naz and Rajesh, 2004; Jankovičová et al., 2018). In the end, matured sperm gain the motility and fertile ability required for fertilizing the egg (Robaire and Hinton, 2015). One of the most common post-translational modifications (PTM) of proteins is the addition of phosphate groups into serine, threonine, or tyrosine proteins' residues (Manning et al., 2002). Protein phosphorylation in sperm has been studied in many species (Kalab et al., 1994; Aitken et al., 1995; Flesc et al., 1999; Jankovičová et al., 2018) and, for most of them, the flagellum is the main component of the spermatozoon that undergoes phosphorylation (Barth and Oko, 1989).

Notwithstanding, the protein activity or content are strongly affected by exogenous stresses (O'Flaherty and Matsushita-Fournier, 2017). The inorganic arsenite, for instance, enters the cell and binds to proteins through thiol groups and consequently alters their conformation and function (Hughes et al., 2011; Gervasi and Visconti, 2017; Hirano, 2020). In this framework, this study aimed to evaluate the effects of prepubertal exposure to arsenic on the reproductive competence of sexually mature rats. To this extent, we assessed fertility indexes and functional parameters of epididymal sperm, including motility, morphology, and protein content, with a focus on phosphoproteins. The identification of molecular elements present in toxicological response may help to elucidate fertility alterations of spermatozoa often related to arsenic exposure (Guvvala et al., 2016; Lima et al., 2018).

2. Material and methods

2.1. Animals

This study is part of a comprehensive work concerning the effect of prepubertal exposure to arsenic in adult rats (Couto-Santos et al., 2020). Males ($n = 20$) and females ($n = 20$) of Wistar rats were obtained from the Central Animal Facility of the Center of the Biological and Health Sciences of the Universidade Federal de Viçosa (UFV). The animals were individually housed in polypropylene cages under controlled photoperiod (12 h light/12 h dark) and temperature (21 °C), with free access to rat chow and drinking

water. The use of animals in this study was reviewed and approved by the Animal Ethics Committee (CEUA; protocol no. 96/2017).

2.2 Experimental design

Male pups on postnatal day (PND) 21 were randomly divided into two experimental groups ($n = 10/\text{group}$). The control animals received filtered water *ad libitum* for 60 days, from PND 21 to PND 81. The rats from the arsenic group, in turn, were exposed to 10 mg L^{-1} sodium arsenite (AsNaO_2 ; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) in filtered water *ad libitum* from PND 21 to PND 51 (Medeiros et al., 2018). Thereafter, they were maintained alive for 30 days receiving filtered water *ad libitum* until PND 81 (Couto-Santos et al., 2020). Additionally, control and arsenic-exposed animals on PND 72 were mated for evaluating the effects of prepubertal exposure to arsenic on male reproductive performance.

The concentration of 10 mg L^{-1} was chosen according to published works of arsenic-induced toxicity in rodents following oral exposure (Pant et al., 2001; Chang et al., 2007; Souza et al., 2016a,b). Animals exposed to arsenic ingested $1.34 \pm 0.05 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ BW/day}$ (Couto-Santos et al., 2020). Moreover, the exposure period used here corresponded to the prepubertal phase of rats' development (Perobelli, 2014; Picut et al., 2018) and followed the experimental design of our previous study (Couto-Santos et al., 2020). The natural mating occurred at PND 72 because this time point corresponds to the period after the sexual maturity in rats (Picut et al., 2018).

2.3. Natural mating and fertility

Male rats from both groups and non-exposed females were naturally mated in 1 male:1 female ratio up to 72 h. Vaginal smears were used to detect sperm cells in the vagina of each female after collection at 24, 48, and 72 h mating. Its outcome confirmed mating and established the day 0 of gestation (GD0). Males and females were separated at the end of this period (Lima et al., 2018).

On the GD19, females were sedated with xylazine hydrochloride (10 mg/kg/ip), anesthetized with ketamine hydrochloride (150 mg/kg/ip), and euthanized. Ovaries were removed, weighed, and analyzed under gross morphology for the presence and number

of corpora lutea. Moreover, uterine horns were used for quantifying areas of implantation sites, and the number of fetuses and resorptions. Hence, we determined several fertility indexes, such as male mating index (number of males mated/ number of males x 100), male fertility index (number of males impregnating females/ number of males mated x 100), fertility potential (number of implants/ number of corpora lutea x 100), preimplantation loss (number of corpora lutea - number of implants/ number of corpora lutea x 100), and postimplantation loss (number of implants - number of viable fetuses/ number of implants x 100). Viable fetuses were considered animals with no structural malformations, and skeletal anomalies related to arsenic exposure, such as spina bifida, anencephaly, rib, and vertebral malformation, and tail defects (Hood, 2012; Lima et al., 2018).

2.4. Euthanasia and collection of organs

Male rats were euthanized on PND 82, seven days after the end of the mating period. This period is enough to re-establish the sperm reserves in the epididymis cauda (Jones, 1999). First, the animals were weighed, sedated with xylazine hydrochloride (10 mg Kg⁻¹/intraperitoneal), and euthanized by deep anesthesia using ketamine hydrochloride (150 mg Kg⁻¹/ intraperitoneal). The left testis and epididymis were dissected and stored at -20 °C for evaluating the daily sperm production, epididymal sperm counting, and sperm transit time. Spermatozoa from the right epididymis, in turn, was used immediately for assessing their functional analyses and collecting samples for proteome.

2.5. Daily sperm production (DSP), sperm number, and transit time in the epididymis

The left testis ($n = 5$ /group) was decapsulated, weighed, and homogenized in 5 mL 0.9% NaCl containing 0.05% Triton X-100. After a 10-fold dilution, the sample was transferred to Neubauer chambers (four fields per animal) for counting the number of homogenization-resistant testicular spermatids. Daily sperm production was assessed by dividing the number of spermatids per testis at stage 19 was divided by 6.1, which is the number of days that spermatids at this stage are present in the seminiferous tubules (Robb et al., 1978). Likewise, caput/corpus and cauda epididymis ($n = 5$ /group) were

cut into small fragments with scissors, homogenized, and diluted (1:20). Sperm count was performed as described for testis. The transit time of sperm through the epididymis was determined by dividing the number of sperm in each portion of epididymis by the DSP (Robb et al., 1978).

2.6. Sperm analyses

Immediately after euthanasia, portions of the cauda region from right epididymides ($n = 5/\text{group}$) were cut into small pieces and added 500 μL BWW medium (Aitken et al., 2016) for 5 min at 37 °C to enable the release of spermatozoa. Aliquots of this fluid were collected for sperm analysis. First, sperm motility was evaluated post-collection using 10 μL of epididymal fluid placed between the slide and coverslip, previously heated to 37 °C, and analyzed under a phase-contrast microscope (Bioval L-1000B, Brazil) at 400x magnification (Morakinyo et al., 2010). Two hundred sperm cells were counted per animal and classified as motile or immotile. Second, sperm morphology was assessed using 50 μL of epididymal fluid fixed in 100 μL 4% buffered formaldehyde. Morphological abnormalities, such as defects in the head, midpiece, and tail, were analyzed in two hundred cells under phase-contrast microscope (Bioval L-1000B, Brazil) at 400x magnification (Filler, 1993). Finally, 10 μL of epididymal fluid were used to evaluate the structural integrity of plasma and acrosomal sperm membranes. For that, sperm cells were incubated in a solution of 4% buffered formaldehyde plus buffer citrate, carboxyfluorescein diacetate (CFDA), and propidium iodide (PI) for 8 min at 37 °C (Harrison & Vickers, 1990). Two hundred sperm cells were analyzed under the EVOS FL fluorescence microscope (Advanced Microscopy Group, Bothell, WA, USA) at 400x magnification. These cells were classified into two categories: sperm with intact plasma and acrosome membranes (CFDA⁺/PI) and damaged plasma and acrosomal membranes (CFDA⁻/PI⁺). All the results were expressed as a percentage.

2.7. Proteomic analysis of epididymal spermatozoa

There were harvested sperm from cauda epididymis ($n = 5/\text{group}$) by chopping the tissue with a scalpel in 1 mL BWW medium (Aitken et al., 2016) with bovine serum

albumin (BSA; 3 mg/mL) in a petri dish, kept in heat trail (Menezes et al., 2018). They were filtered in 100 μ m cell strainers. After that, the samples were laid in 1 mL over 3 mL of 30% Percoll (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), followed by centrifugation at 600 x g for 20 min. The samples were resuspended in 2 mL of RBC Lysis buffer 10 mg EDTA (NH₄Cl 2.075 g/NaHCO₃ 0.5 g in 250 mL pH 7.4) and followed by centrifugation at 1,200 x g for 20 min. The latter process was repeated more two times. The pellet was resuspended in 1 mL BWW and centrifuged at 600 x g for 20 min. Ultimately, the solution was examined in a light microscope to verify the presence of sperm cells and the absence of red blood cells. Samples were then centrifuged, and the pellet was resuspended in acetic acid and acetonitrile solution and then stored at -20 °C.

2.8. Immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC).

Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) has been used for the enrichment of phosphorylated proteins and peptides. PHOS-Select™ Iron Affinity Gel (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) was used according to the manufacturer's instructions. Briefly, a 500 μ L slurry of PHOS-Select iron affinity gel beads was washed three times with 250 mMol acetic acids in 30% acetonitrile (pH 2.5). Then, 500 μ L of sample diluted in the same buffer solution was loaded onto each spin column (about 2 mg total protein per 500 μ L of bead slurry) and incubated for 15 min at room temperature with gentle shaking. Phosphoproteins bound to the IMAC columns were eluted three times with 500 μ L of elution buffer (150 mMol Ammonium hydroxide in 25% acetonitrile) each time incubating at room temperature for 10 min with gentle shaking and then centrifuged at 8,200 \times g for 1 min. The two eluates were pooled and dried in a speed vac and frozen at -20 °C for further analysis.

2.9. Protein digestion

Protein digestion was performed according to Viana et al. (2018). Briefly, sperm proteins were suspended in 0.02M ammonium bicarbonate and 0.5M DTT (dithiothreitol), followed by incubation at 55°C for 25 min. Further, 0.014M IAA (iodoacetamide) was added and maintained at 21°C in the dark for 40 min. All samples were incubated with trypsin (Promega, Fitchburg, WI, USA) at 37°C for 18h, with a

1/50 (w/w) enzyme/substrate ratio. Then, a solution of 1% TFA (trifluoroacetic acid) was added to stop the tryptic activity.

2.10. Orbitrap MS

Tryptic peptides were fractionated on Easy nLC II (Thermo Scientific) nanoflow HPLC system connected to an LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (MS) (Thermo, Bremen, Germany) equipped with a nano-electrospray ion source. Peptides were initially loaded onto a trap column 2.0 cm long (100 μm internal diameter) packed in-house with C18 resin (5 μm , 100 Å pore, Magic C18 AQ, Bruker-Michrom, Auburn, CA) and fractionated on an RP-HPLC column 30 cm long (75 μm internal diameter). The gradient conditions were as follows: 2 to 40% of 0.1% trifluoroacetic acid (v/v) in acetonitrile solution for 162 min and up to 80% of this solution for 4 min. This concentration was maintained for 2 min before the column was re-equilibrated. The eluted peptides were directly introduced to an LTQ Orbitrap XL MS for analysis.

Precursor scans were performed in Orbitrap mass detector at a resolution of 60,000 in a mass range from 300 m/z to 1700 m/z, while MS/MS scans were acquired in a linear trap analyzer. With the exclusion of singly charged ions, up to ten of the most intense precursor ions were subjected to produce ion scans using collision-induced dissociation (CID) with a normalized collision energy of 35.0. Moreover, MS/MS scans were only triggered for precursor ions having a minimum signal threshold of 10,000 counts. Precursors selected for MS/MS scans were dynamically excluded for 30 s from a repeated production scan within a ± 10 ppm mass error.

2.11. Database search

Database searches of the tandem mass spectra acquired on LTQ Orbitrap XL mass spectrometer were performed using Peaks Studio 8.5. There was applied database searching from Uniprot and NCBI repositories in September 2019, filtered for the species *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, and *Bos taurus*. The search parameters for monoisotopic peptide masses allowed two missed enzymatic cleavage. Carbamidomethylation of the cysteine residues was defined as fixed modification and oxidation (M), whereas phosphorylation (P) as variable modifications. A fragment ion

mass tolerance of 0.60 Da and a parent ion tolerance of 20 ppm was used. To choose from variables modifications, the PEAKS PTM algorithm WARE tool was used, with the same parameters described above, and modifications with AScore 1000 were selected for the searches. False discovery rates (FDR) were estimated through the PEAKS decoy fusion approach. A peptide-spectrum match FDR of 1% and protein identifications with at least two unique peptides were the criteria used to establish FDR values at peptide and protein levels $\leq 1\%$.

2.12. Analysis of functional clusters and in silico protein-protein interactions

Functional clusters associated with sperm proteins were analyzed through the DAVID platform (DAVID Functional Annotation Bioinformatics Analysis - <https://david.ncifcrf.gov>; Huang et al., 2009). Gene Ontology annotated terms for biological process, molecular function, and cellular component, as well as metabolic pathways annotated in KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) database, were clustered and defined according to enrichment scores and p-values. There were considered genes of the species *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, and *Bos taurus*. Besides, functional clusters were evaluated for comparison of control and arsenic groups. Then, Ingenuity Pathway Analysis (IPA; Ingenuity System Inc, USA) was used to interpret the findings of the present work, filtering the species *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, and *Homo sapiens*.

2.13. Statistical analysis

The normality of the results was assessed by Shapiro-Wilk test. All the variables analyzed herein were compared between control and arsenic groups using the Student's T-test. Differences were considered significant when $p < 0.05$. All tests and graphics were performed using the GraphPad Prism 6.0 statistical software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Data were expressed as mean \pm standard error mean (SEM).

3. Results

3.1. Prepubertal exposure to arsenic affects fertility indexes of sexually mature rats

Ten animals from the arsenic group were able to mate with non-exposed females in contrast to the eight from the control group. The male mating index reflected this difference (Table 1). However, eight rats of each control and arsenic group impregnated their respective females. This fact influenced the low male fertility index of arsenic-exposed rats compared to control animals (Table 1). Consequently, the fertility potential of intoxicated rats was lower than the control animals ($p < 0.05$; Table 1). The number of corpora lutea, implants, resorptions, viable fetuses, and ovary weight did not differ between groups ($p > 0.05$; Table 1). While the percentage of preimplantation loss was higher in arsenic-exposed animals compared to their controls ($p < 0.05$), the postimplantation loss did not differ between groups ($p > 0.05$; Table 1).

Table 1. Fertility indexes of sexually matured rats ($n = 10$ animals/group) exposed to arsenic between postnatal day (PND) 21 and 51, after natural mating with non-exposed females.

Parameters	Control	Arsenic
Number of females	10	10
Number of females mated ¹	8	10
Number of males mated ¹	8	10
Number of males impregnating females	8	8
Number of females pregnant	8	8
Number of corpora lutea ²	14.17 ± 1.01	16.43 ± 0.99
Number of implants ²	12.17 ± 0.60	11.57 ± 0.68
Number of resorptions ²	0.50 ± 0.18	0.75 ± 0.41
Number of viable fetuses ²	11.83 ± 0.79	10.71 ± 0.80
Ovary weight (g) ²	0.18 ± 0.012	0.17 ± 0.008
Male mating index (%)	80	100
Male fertility index (%)	100	80
Fertility potential (%) ²	87.13 ± 4.90	71.47 ± 4.91*
Preimplantation loss (%) ²	17.62 ± 2.62	30.70 ± 4.22*
Postimplantation loss (%) ²	9.05 ± 0.67	17.66 ± 3.53

¹Sperm presence on vaginal smears; ²Values expressed as mean ± SEM. *Significant differences ($p < 0.05$) between control and arsenic groups by Student's t-test.

3.2. Prepubertal exposure to arsenic reduces sperm count and daily sperm production in sexually mature rats

The number of mature spermatids per testis and per gram of testis, as well as the daily sperm production, was diminished in arsenic-exposed animals compared to control animals ($p < 0.05$; Table 2). Similarly, the number of sperm count in caput/corpus and cauda epididymis reduced in animals previously exposed to arsenic compared to their controls ($p < 0.05$; Table 2). The sperm transit time in epididymal regions, in turn, did not alter after prepubertal arsenic exposure ($p > 0.05$; Table 2).

3.3. Sperm parameters were altered in sexually mature males after prepubertal exposure to arsenic

The percentage of motile spermatozoa and cells with intact plasma and acrosomal membranes was lower in arsenic-exposed animals than the control rats ($p < 0.05$; Table 2). Exposure to arsenic did not alter the percentage of sperm with normal morphology in those animals ($p > 0.05$; Table 2).

Table 2. Sperm count in testis and epididymis, and sperm parameters of sexually matured rats exposed to 10 mg/L arsenite between postnatal day (PND) 21 and PND 51.

Parameters	Control	Arsenic
<i>Sperm count</i>		
Spermatid number ($\times 10^6$ /testis)	175.30 \pm 4.63	115.30 \pm 3.34*
Spermatid number ($\times 10^6$ /g testis)	122.60 \pm 1.09	90.65 \pm 4.80*
Daily sperm production ($\times 10^6$ /testis/d)	28.73 \pm 1.69	18.90 \pm 0.54*
Caput/corpus epididymis sperm number ($\times 10^6$ /organ)	94.83 \pm 3.08	60.37 \pm 2.38*
Caput/corpus epididymis sperm number ($\times 10^6$ /g organ)	290 \pm 6.60	194 \pm 3.50*
Sperm transit time in the caput/corpus epididymis (d)	3.09 \pm 0.21	3.21 \pm 0.18
Cauda epididymis sperm number ($\times 10^6$ /organ)	126.40 \pm 9.03	69.43 \pm 4.73*
Cauda epididymis sperm number ($\times 10^6$ /g organ)	619 \pm 23.72	389 \pm 9.76*
Sperm transit time in the cauda epididymis (d)	4.38 \pm 0.22	3.70 \pm 0.32
<i>Sperm parameters</i>		
Sperm motility (%)	76.46 \pm 2.28	62.00 \pm 4.83*
Normal sperm morphology (%)	93.80 \pm 2.39	92.60 \pm 2.50

Sperm with intact membranes (%)	32.30 ± 1.25	8.10 ± 1.23*
---------------------------------	--------------	--------------

Mean ± SEM. *Significant differences ($p < 0.05$) between control and arsenic groups by Student's t-test. $n = 5$ animals/group.

3.4. Proteome of epididymal sperm from control and arsenic-exposed rats after prepubertal contamination

There were identified 624 proteins from epididymal spermatozoa (Supplementary Table 1). From those, 342 proteins were found in rats of both control and arsenic groups, 121 were detected only in control animals, and other 161 proteins were present in the epididymal sperm of rats exposed to arsenic (Fig. 1). Gene ontology and KEGG enrichment analysis were performed for the 624 identified proteins, corresponding to 608 genes matched in a distribution of 41 clusters (Supplementary Table 2).

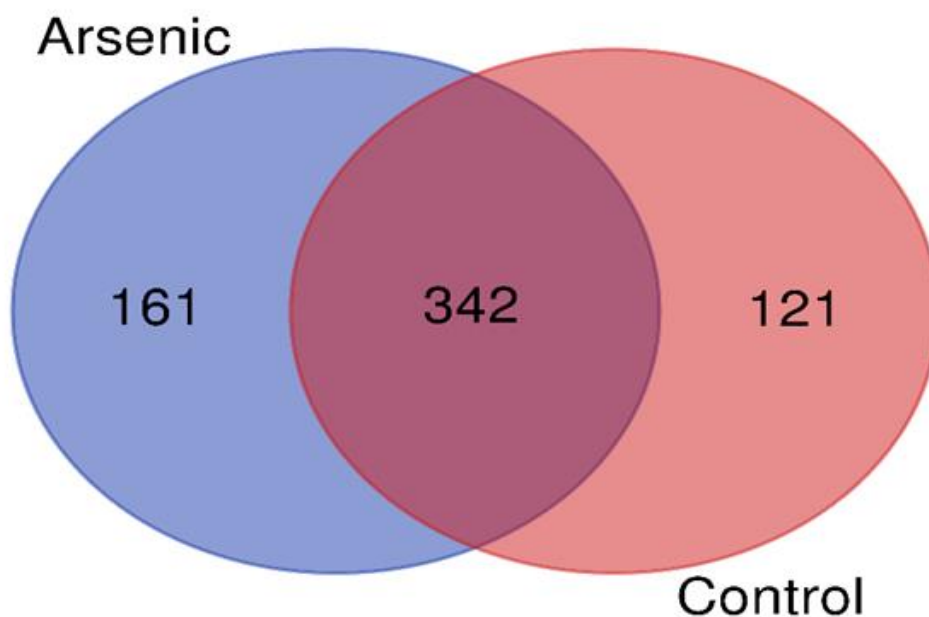


Figure 1. Venn diagram generated by the Bioinformatics & Evolutionary Genomics platform (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn>) showing the proteome of rat sperm. From a total of 624 proteins, 463 were identified in the control group and 503 were identified in the arsenic-exposed group.

The top 10 enrichment scores [-log (p-value)] of gene ontology were ranked for each category, as shown in Figure 2. Microtubule-based process, mitochondrial electron transport, cytochrome c to oxygen, and cytoskeleton organization were the biological processes mostly enriched in control animals compared to arsenic-exposed rats. By contrast, the glycolytic process was the only process in which arsenic-animals presented higher enrichment than their controls. Molecular function category, in turn, showed higher enrichment in the structural constituent of the cytoskeleton and threonine-type endopeptidase activity functions in control rats, and GTPase activity function more enriched in arsenic-exposed animals (Fig. 2). With regards to cellular components, epididymal sperm from control animals exhibited enrichment in the mitochondrion, cell body, intermediate filament, zona pellucida receptor complex, cell periphery, and keratin filament compartments, differently to the epididymal spermatozoa from arsenic-exposed animals. By contrast, the latter animals showed enrichment in the cilium component that was not present in control animals. Finally, the proteasome core complex was more enriched in control rats, whereas the microtubule compartment was more enriched in arsenic-exposed rats (Fig. 2).

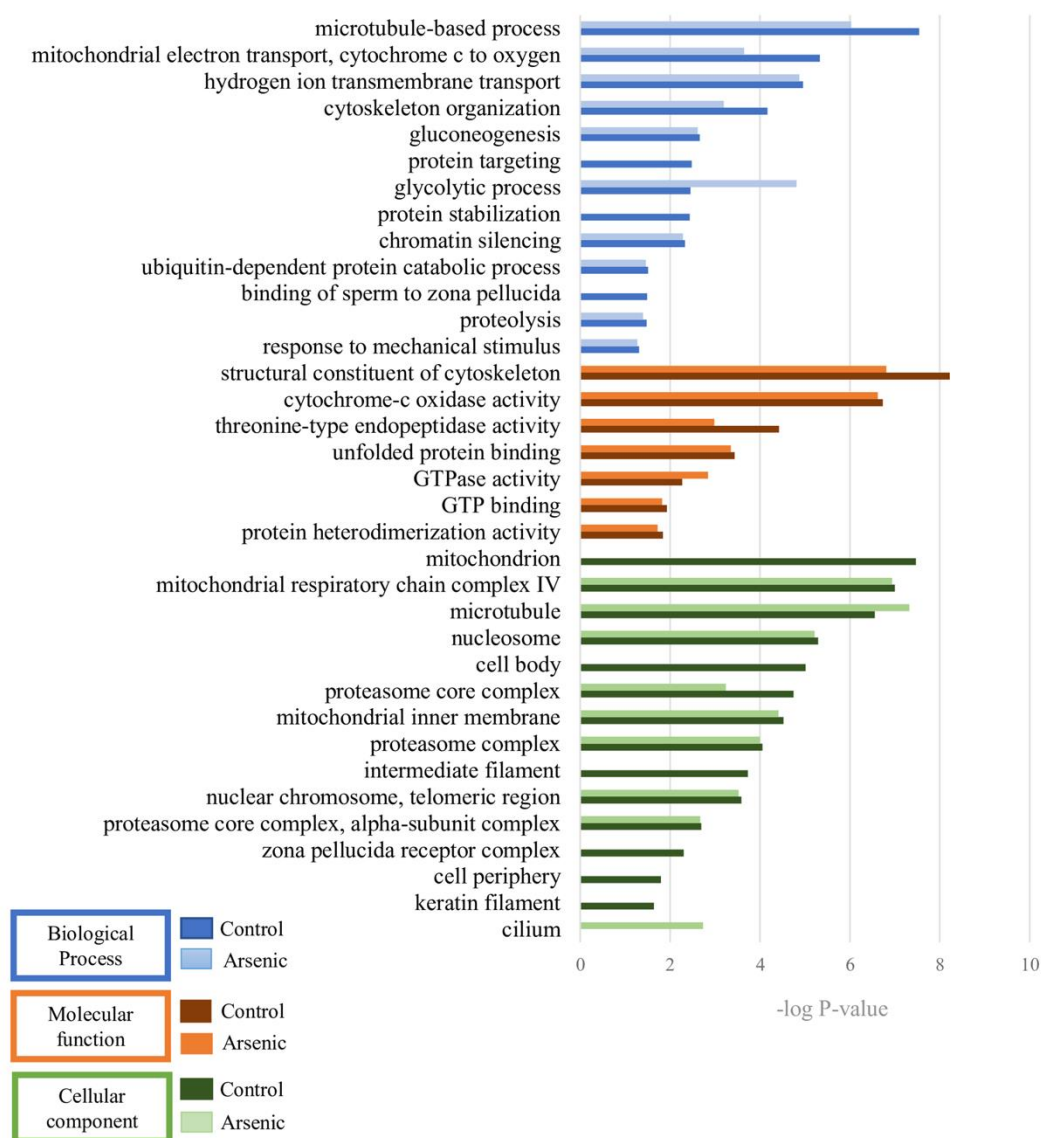


Figure 2. Functional annotations of the top 10 enrichment scores [-log (p-value)] of proteins' clusters identified in the epididymal sperm of control and arsenic-exposed rats according to biological process, molecular functions, and cellular components. Protein data were clustered and defined according to enrichment scores and p-values using the DAVID platform (DAVID Functional Annotation Bioinformatics Analysis - <https://david.ncifcrf.gov>).

The results of KEGG pathway were also ranked by enrichment score [-log (p-value)] (Fig. 3). Thus, oocyte meiosis and gap junction were the two top enriched pathways in control rats. In addition, the proteasome pathway was more enriched in those animals (Fig. 3). On the other hand, spermatozoa from arsenic-exposed rats presented higher enrichment of oxidative phosphorylation, biosynthesis of antibiotics, phagosome, glycolysis/ gluconeogenesis, biosynthesis of amino acids, and carbon metabolism than their controls (Fig. 3).

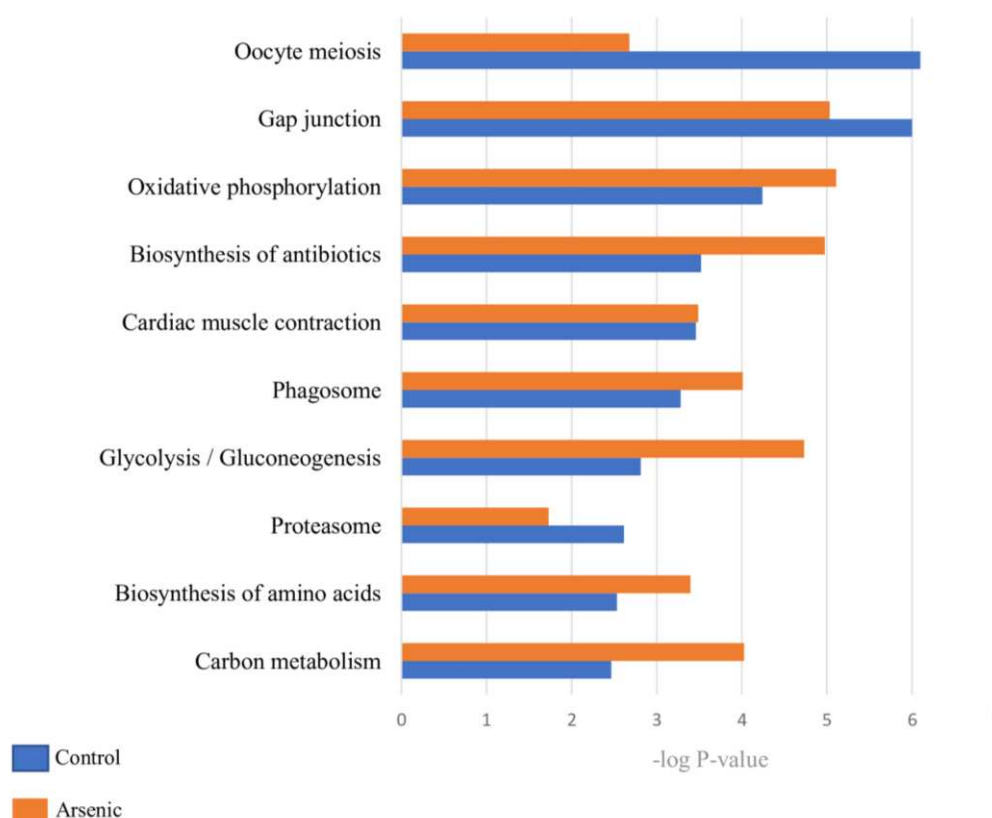


Figure 3. The ten most enriched pathways [-log (p-value)] of epididymal sperm of control and arsenic-exposed rats in the KEGG pathway database. Protein data were clustered and defined according to enrichment scores and p-values using the DAVID platform (DAVID Functional Annotation Bioinformatics Analysis - <https://david.ncifcrf.gov>).

3.5. Arsenic affected the phosphorylation pattern of protein MIEA associated with the flagellar structure and cell cycle

A total of 26 proteins were found phosphorylated. The proteins cyclin 2, osteopontin, glutathione peroxidase 3, spermatogenesis-associated protein 19 mitochondrial, and A-kinase anchor protein 4 (AKAP4) were phosphorylated in most of the animals (Table 3). The protein AKAPA4 was identified in both mouse and rat species. By contrast, 20 proteins were detected in one animal from one group, regardless of the treatment (Table 3). Interestingly, the mitochondria eating protein (MIEAP), also known as spermatogenesis-associated protein 18 (SPATA18), showed no phosphorylation pattern in epididymal sperm from control rats and was phosphorylated in three from five animals of the arsenic group (Table 3).

Ingenuity Pathway Analysis identified significant interactions (Fig. 4) of MIEAP with proteins that regulate cell cycle and transcriptional regulation, such as TP53, TP63,

anilin and PAX-interacting protein 1. We also found an important interaction with outer dense fiber protein 2 (ODF2), which is a major component of sperm tail outer dense fibers. In turn, ODF2 interacts with other spermatogenesis-associated proteins (SPATA24 and SPATA2), proteins related to the cytoskeleton (IFT74, IFT81, MAP7D3, LIMCH1, and ALMS1), and cell cycle (RSPH1, CDC123, and HAUS3).

Table 3. List of phosphoproteins of rat (R) sperm harvested from cauda epididymis identified by mass spectrometry after IMAC enrichment.

Phosphorylated proteins (<i>n</i> = 26)				Control					Arsenic				
<i>n</i>	Accession number		Description	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
1	Q28092	CYLC2_BOVIN	Cylicin-2	x	x	x			x	x			
2	P31096	OSTP_BOVIN	Osteopontin	x	x	x			x	x			
3	P37141	GPX3_BOVIN	Glutathione peroxidase 3	x	x	x		x	x				
4	Q3SZQ3	SPT19_BOVIN	Spermatogenesis-associated protein 19 mitochondrial		x	x			x		x		
5	O35774	AKAP_RAT	A-kinase anchor protein 4				x	x	x	x	x	x	x
6	Q60662	AKAP_MOUSE											
6	Q6AYL6	MIEAP_RAT	Mitochondria-eating protein								x	x	x
7	Q80XH4	WSCD1_MOUSE	WSC domain-containing protein 1	x									
8	Q49AM1	MTEF2_HUMAN	Transcription termination factor 2 mitochondrial						x				
9	Q9H6K5	PRR36_HUMAN	Proline-rich protein 36						x				
10	Q4U2R1	HERC2_MOUSE	E3 ubiquitin-protein ligase HERC2		x								
11	Q8VHX6	FLNC_MOUSE	Filamin-C							x			
12	Q80V94	AP4E1_MOUSE	AP-4 complex subunit epsilon-1							x			
13	Q8BGZ7	K2C75_MOUSE	Keratin type II cytoskeletal 75							x			
14	Q6S8J3	POTEE_HUMAN	POTE ankyrin domain family member E							x			
15	A5A3E0	POTEF_HUMAN	POTE ankyrin domain family member F							x			
16	P0CG38	POTEI_HUMAN	POTE ankyrin domain family member I							x			
17	Q96F45	ZN503_HUMAN	Zinc finger protein 503				x						

18	P50851	LRBA_HUMAN	Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein	x	
19	P54652	HSP72_HUMAN	Heat shock-related 70 kDa protein 2	x	
20	Q6AY30	SCPDL_RAT	Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase		x
21	P00342	LDHC_MOUSE	L-lactate dehydrogenase C chain		x
22	Q9UI47	CTNA3_HUMAN	Catenin alpha-3		x
23	A2A870	FBF1_MOUSE	Fas-binding factor 1	x	
24	O09046	OXLA_MOUSE	L-amino-acid oxidase	x	
25	Q3ZBH0	TCPB_BOVIN	T-complex protein 1 subunit beta	x	
26	Q5JR59	MTUS2_HUMAN	Microtubule-associated tumor suppressor candidate 2		x

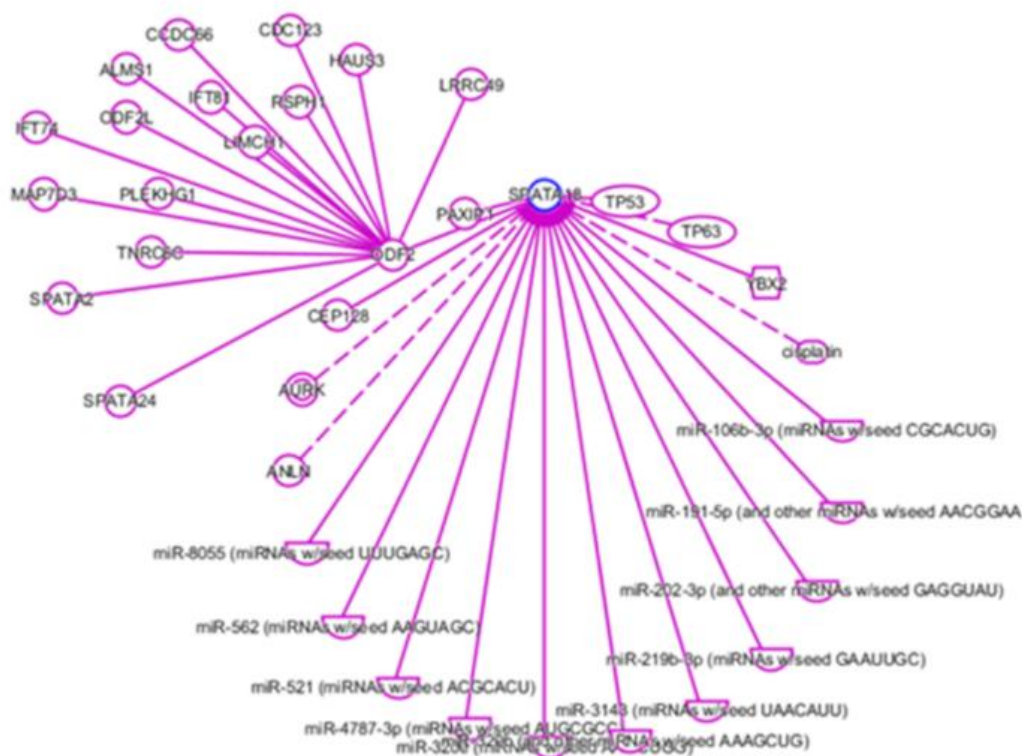


Figure 4. *In silico* protein interactions performed using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) of SPATA18 (spermatogenesis-associated protein 18) and ODF2 (outer dense fiber protein 2). TP53 = Tumor protein p53; TP63 = Tumor protein p63; YBX2 = Y-box-binding protein 2; miRNA = microRNA; ANLN = Anilin; AURK = Aurora kinase; CEP128 = Centrosomal protein of 128 kDa; PAXIP1 = PAX-interacting

protein 1; SPATA24 = spermatogenesis-associated protein 24; SPATA2 = spermatogenesis-associated protein 2; TNRC6C = Trinucleotide repeat-containing gene 6C protein; MAP7D3 = MAP7 domain-containing protein 3; PLEKHG1 = Pleckstrin homology domain-containing family G member 1; IFT74 = Intraflagellar transport protein 74 homolog; IFT81 = Intraflagellar transport protein 81 homolog; ODF2L = Protein BCAP; LIMCH1 = LIM and calponin homology domains-containing protein 1; ALMS1 = Alstrom syndrome protein 1; ccdc66 = Coiled-coil domain-containing protein 66; RSPH1 = Radial spoke

4. Discussion

The current study is the first dedicated to analyzing the sperm parameters, phosphoprotein content, and fertility of animals exposed to arsenic during prepuberty. In this scenario, adult rats exposed to this metalloid exhibited low sperm quality 30 d after arsenic withdrawal. Accordingly, there was a reduction in the male fertility potential, as well as an alteration in the epididymal sperm proteome. The detrimental effect of arsenic on the reproductive competence of adult rats is well documented (Sarkar et al., 2003; Reddy et al., 2011; Souza et al., 2016a,b; Lima et al., 2018). By contrast, its impact during a critical period of development as puberty is still poorly understood (Ferreira et al., 2012; Adedara et al., 2017; Medeiros et al., 2018). Puberty occurs around PND 46 in Wistar rats and is recognized as the period when the spermatogenic process first concludes its whole cycle and sperm enter the epididymis (Senger, 2003). One week later, fertile sperm is present in the epididymis cauda. At PND 60, in turn, adult rats are considered sexually matured. Their sperm production/g of testis increases until PND 75, supporting the sperm reserves in epididymal cauda. Then, males can express their fertility potential and achieve sexual maturity (Robb et al., 1978; Picut et al., 2018).

Our findings showed that prepubertal contamination with arsenic impairs sperm production in the testis of sexually mature rats. The reduction in the number of spermatids in testis and per gram of testis, as well as the daily sperm production, have been previously described in adult rats 24 h after the end of arsenic intake (Souza et al., 2016a; Lima et al., 2018). Here, we verified that this effect remains in poisoned animals 30 d after the arsenic removal. Interestingly, the daily sperm production found in this study was lower than the findings reported by Couto-Santos et al. (2020). This difference is due to the methodology adopted here that considers only the number of testicular homogenized-resistance spermatids heads (HRSH) to calculate this variable. The HRSH are considered viable cells that probably will become sperm at the end of the spermatogenic cycle (Pacheco et al., 2012). The methodology used by Couto-Santos et

al. (2020), in turn, considered the round spermatids count in histological testis sections in stage 1 of the seminiferous cycle, regardless of cell loss. The loss of germ cells is often reported in intoxicated animals by arsenicals, which accumulates in testis tissue undergoing oxidative stress process even after exposure withdrawal (Souza et al., 2019; Couto-Santos et al., 2020). Consequently, reduced daily sperm production directly influenced the number of sperm cells observed in the caput/corpus and cauda segments of the epididymis. Altogether, these parameters are important indicators of male fertility potential (Klinefelter and Hess, 1998; Mangelsdorf et al., 2003; Fernandes et al., 2007; Sanabria et al., 2016).

Aside from the reduced sperm count, epididymal sperm quality was disrupted by prepubertal arsenic exposure in sexually mature rats, according to our findings regarding sperm motility and structural integrity of acrosomal and sperm membranes. Once epididymis is the organ responsible for sperm maturation (Robaire and Hinton, 2015), spermatozoa should display forward motility and fertility ability after the transit throughout the entire duct (Klinefelter and Hess, 1998; Sullivan et al., 2007). Two factors may influence the quality of mature spermatozoa, the sperm transit time and the quality of luminal microenvironment within the epididymal duct. There are controversial findings in the literature regarding the capacity of this metalloid to retard the sperm transit along the epididymis when this variable is assessed 24 h after the arsenic exposure (Souza et al., 2016b; Altoé et al., 2017; Souza et al., 2019). Nevertheless, the concentration of 10 mg L^{-1} of sodium arsenite used here did not alter the sperm transit time 30 d after the arsenic insult. Therefore, we might speculate that the withdrawal exposure was enough to reestablish any possible alteration in the sperm transit time caused by arsenic intake.

With regards to the epididymal lumen, epithelial cells lining the duct play a vital role in establishing the optimal environment for the maturation and storage of spermatozoa. To that end, they produce a fluid with a low pH and low bicarbonate concentration and enriched with a diversity of proteins, inorganic ions, and small non-coding RNA transcripts (Zhou et al., 2018; Breton et al., 2019). To date, the effect of arsenic on the epididymal fluid content is still unclear. This toxic element can react in the tissues by losing electrons to form cations, which drives a breakdown of metal-ion homeostasis, and mimic essential metals dysregulating metabolic and signaling pathways (Wu et al., 2016). Both modes of action may impair biochemical and

structural modifications of sperm membranes required to the gamete maturation, as well as cause lipid peroxidation (Belleannée et al., 2012). Specifically, arsenite can access epididymal cells via hexose permease transporters and aquaporin 9, which is rich in principal cells (Hughes, 2002; Da Silva et al., 2006; Thomas, 2007). Once inside, this trivalent arsenical can inhibit enzymes or alter proteins secreted by principal cells via reacting with proteinaceous thiol groups (Thomas, 2007). Accordingly, arsenite may inactivate enzymes and proteins relevant for sperm maturation and then impair their functionality (Souza et al., 2019). For instance, thiol groups gradually stabilize tail structures by the formation of disulfide bonds (Hughes, 2002; Ijiri et al., 2014; Gervasi and Visconti, 2017). Altogether, these effects are detrimental to the progressive motility, sperm capacitation, and sperm-egg interaction.

On the other hand, intoxicated animals did not show alteration in the percentage of sperm with normal morphology after 30 d of arsenic insult. Studies have reported no alterations in this parameter when assessed 24 h after arsenic exposure (Souza et al., 2016a,b; Lima et al., 2018) in contrast to others that described a higher occurrence of tail defects, followed by head and midpiece defects (Ferreira et al., 2012; Bashandy et al., 2016; Prathima et al., 2018). These controversial results can be influenced by the acceleration of the sperm transit time, the high osmolarity of dilution media, heat stress, cold shock, and human manipulation during the sperm analysis, particularly those related to the distal cytoplasmic droplet, coiled tail, broken tail, hook different angles, and detached head (Barth and Oko, 1989). Typically, sperm abnormalities are mainly related to alteration in the spermatogenic process. In this regard, a recent study reported that arsenic influences spermiogenesis by disorganizing the elongation of spermatids in arsenic-intoxicated animals (Han et al., 2020). This abnormality, however, needs to be assessed by electronic microscopy.

Notwithstanding, the decrease of sperm quality and motility are strongly linked to other important outcomes observed in this study, such as reduced fertility indexes and alteration in the epididymal sperm proteome. The low fertility potential added to the high percentage of preimplantation loss indicates possible failure of fertilization ability of epididymal spermatozoa from arsenic-exposed rats. Previously, Lima et al. (2018) also observed a reduction in the fertility potential and an increased preimplantation loss in adult rats exposed to 10 mg L⁻¹ arsenic. Those results reinforce the detrimental effect of prepubertal arsenic exposure to male reproductive competence in adulthood.

Recently, it was demonstrated that arsenic caused adverse effects on sperm fertilizing ability by down regulating proteins linked to sperm motility, such as sperm mitochondrial associated cysteine-rich protein (da Silva et al., 2017). The interaction of these molecules may cause a decrease in motility and impair the capacitation events of the sperm that, in turn, may disturb male fertility (Makker et al., 2009).

Mitochondria and oxidative phosphorylation were the most enriched clusters of epididymal sperm proteins in both controls and arsenic-exposed rats. It is already known that arsenic induces oxidative stress through the generation of reactive oxygen species (ROS) that cause direct oxidative injuries in the cells (Aitken, 2011; Souza et al., 2019). Spermatozoa undergoes a cascade of biochemical and physiological events, as known as capacitation, prior fertilization. Such events increase the ROS production (Aitken, 2011), which may be detrimental to those cells that are suffering oxidative stress due to the arsenic intoxication. Protein phosphorylation is crucial for sperm capacitation, through signal transduction pathway inside the cell. Herrero et al. (2000) showed that nitric oxide (NO) produced in sperm induces sperm capacitation through protein tyrosine phosphorylation in men.

Oocyte meiosis cluster was found more enriched in control group than in arsenic-exposed one, while cell cycle cluster was enriched only in control group. Both clusters involve proteins related to regulation of pathways, such as 14-3-3 family. But, regarding oocyte meiosis cluster, there was identified in control animals four proteins did not present in the treated group. Among the four proteins, two from 14-3-3 family and a protein kinase dependent of cyclic AMP and a receptor for inositol 1,4,5-triphosphate, which is a second messenger regulated by cAMP. Cyclic AMP is crucial for events occurring during sperm capacitation and its effects on sperm are mediated by activation of protein kinases (Ickowicz et al., 2012). Clusters related to metabolism of glucose, carbon and amino acids were found more enriched in treated groups. Alpha enolase and hexokinase were the two proteins that contributed to the enrichment of the three clusters. Hexokinases catalyze the phosphorylation of various hexoses during glycolysis, gluconeogenesis, metabolism of carbon, and biosynthesis of amino acids (Robey and Hay, 2006). Alpha enolase, in turn, catalyzes the conversion of 2-phosphoglycerate to phosphoenolpyruvate (Pancholi, 2001). Thus, we suggest that arsenic toxicity decrease sperm pathways' regulation by the lack of important proteins for the gamete physiology.

Among the 26 phosphorylated proteins, cyclin 2, osteopontin (OPN), Glutathione peroxidase 3 (GPX3), spermatogenesis-associated protein 19 (SPATA 19) and A-Kinase Anchoring Protein 4 (AKAP 4) were phosphorylated in almost all rats. Cyclins form a complex with cyclin-dependent kinases (Cdks) that are constantly activated and inactivated to regulate cell cycle and may be involved in sperm differentiation during spermatogenesis (Wolgemuth et al., 2013). OPN is a phosphoprotein already identified in several tissues, as well as rat testis, epididymis and sperm (Siiteri et al., 1995). OPN was described in sperm membrane, keeping the binding during spermatogenesis and transport through the epididymis (Luedtke et al., 2002). In bovine, OPN secreted in seminal plasma is associated with sperm fertility (Cancel et al. 1999). GPX3, in turn, is one of the enzymes involved in cell protection against oxidative damage (Halliwell and Gutteridge, 2007). SPATA 19 belongs to a family of spermatogenesis-associated protein and Nourashrafeddin et al. (2014) suggest its role in sperm mitochondrial maintenance and its correlation with androgen secretion and male fertility. Finally, AKAP4 is a major component of sperm fibrous sheath that target protein kinase A (PKA) and other subcellular enzymes (Ben-Navi et al., 2016). AKAP4 are phosphorylated at serine and tyrosine residues during sperm capacitation. Rats knock out for AKAP4 showed no progressive motility and were infertile (Miki et al., 2002).

Interestingly, mitochondrial eating protein (MIEAP, also known as SPATA 18, spermatogenesis-associated 18 homolog protein) was the only phosphorylated protein found in three (60%) of arsenic-exposed animals and absent in all rats from control group. Iida et al. (2004) identified spermatid-expressing gene 1 protein (SPETEX-1, another alternative name for MIEAP) in rats' testis and haploid spermatids (steps 7-18). SPETEX-1 was specifically described in residual body of elongated spermatids (steps 15-18) and absent in spermatogonia, spermatocytes and round spermatids (Iida et al., 2004). Thus, it is suggested that MIEAP plays role in maturation of spermatids to spermatozoa. During this process, the gamete undergoes a decrease of cytoplasm volume, which is mediated by apoptotic signaling to Sertoli cells recognize and phagocyte it (Bornstein et al., 2011). Besides that, Iida et al. (2004) showed MIEAP is retained in flagellar portion after spermiation, suggesting its role in flagellum structure. We suggest the phosphorylated pattern of MIEAP in animals exposed to arsenic is detrimental for sperm physiology, leading to damaging the cell and, further, death.

5. Conclusion

In summary, our findings showed the impact of prepubertal arsenic exposure on the reproductive functions of male rats during adulthood. It is exactly in this life span that reproductive ability is completely developed and then, it is possible to measure their reproductive competence. Our results showed that, prepubertal arsenic intoxication caused important damages to sperm parameters in adult rats, expressed from their impaired production in the testis, quality in the epididymis, with hazard to fertility ability. Collectively, those injuries might impair male reproductive capacity and fertility over lifetime. Proteomic findings contributed to the elucidation of arsenic mechanism of action in reproductive toxicity. We suggest the phosphorylated pattern of MIEAP in animals exposed to arsenic is detrimental for sperm function. Moreover, our findings might be considered a baseline for future studies testing the possible effects of arsenic exposure on the sperm physiology under toxic conditions. While the exposure time comprised a critical period of organs development, the effects were measured when the male reproductive ability is fully developed.

References

- Abdul, K.S., Jayasinghe, S.S., Chandana, E.P., Jayasumana, C., De Silva, P.M., 2015. Arsenic and human health effects: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40, 828–846. doi: 10.1016/j.etap.2015.09.016.
- Adedara, I.A., Abolaji, A.O., Awogbindin, I.O., Farombi, E.O., 2017. Suppression of the brain-pituitary-testicular axis function following acute arsenic and manganese co-exposure and withdrawal in rats. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 39, 21–29. doi:10.1016/j.jtemb.2016.07.001.
- Aitken, R.J., Paterson, M., Fisher, H., Buckingham, D.W., van Duin, M., 1995. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J. Cell Sci.* 108, 217–225.
- Aitken, R.J., 2011. The capacitation-apoptosis highway: oxysterols and mammalian sperm function. *Biol. Reprod.* 85, 9–12. doi:10.1095/biolreprod.111.092528.
- Aitken, R.J., Gibb, Z., Baker, M.A., Drevet, J., Gharagozloo, P., 2016. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 28, 1–10. doi: 10.1071/RD15325.
- Altoé, L.S., Reis, I.B., Gomes, M.L.M., Dolder, H., Monteiro Pirovani, J.C., 2017. Could vitamin C and zinc chloride protect the germ cells against sodium arsenite? *Hum. Exp. Toxicol.* 36, 1049–1058. doi: 10.1177/0960327116679714.

Barth, A.D., Oko, R.J., 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: Iowa State University Press, IA. p.19–88.

Bashandy, S.A., El Awdan, S.A., Ebaid, H., Alhazza, I.M., 2016. Antioxidant Potential of *Spirulina platensis* Mitigates Oxidative Stress and Reprotoxicity Induced by Sodium Arsenite in Male Rats. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2016:7174351. doi:10.1155/2016/7174351.

Belleannée, C., Thimon, V., Sullivan, R., 2012. Region-specific gene expression in the epididymis. *Cell Tissue Res.* 349, 717–731. doi: 10.1007/s00441-012-1381-0.

Benbrahim-Tallaa, L., Waalkes, M.P., 2008. Inorganic arsenic and human prostate cancer. *Environ. Health Perspectives.* 116, 158–164. doi: 10.1590/S1413-81232009000100037.

Ben-Navi, L.R., Among, T., Yao, Z., Seger, R., Naor, Z., 2016. A-Kinase Anchoring Protein 4 (AKAP4) is an ERK1/2 substrate and a switch molecule between cAMP/PKA and PKC/ERK1/2 in human spermatozoa. *Sci. Rep.* 6, 37922. doi: 10.1038/srep37922.

Bornstein, C., Brosh, R., Molchadsky, A., Madar, S., Kogan-Sakin, I., Goldstein, I., Chakravarti, D., Flores, E.R., Goldfinger, N., Sarig, R., Rotter, V., 2011. SPATA18, a spermatogenesis-associated gene, is a novel transcriptional target of p53 and p63. *Mol. Cell Biol.* 31, 1679 – 1789. doi: 10.1128/MCB.01072-10.

Breton, S., Nair, A.V., Battistone, M.A., 2019. Epithelial dynamics in the epididymis: role in the maturation, protection, and storage of spermatozoa. *Andrology.* 7, 631–643. doi: 10.1111/andr.12632.

Cancel, A.M., Chapman, D.A., Killian, G.J., 1999. Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. *Biol. Reprod.* 60, 454–460. doi: 10.1095/biolreprod60.2.454.

Chang, S.I., Jin, B., Youn, P., Park, C., Park, J.D. Ryu, D.Y., 2007. Arsenic induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 218, 196–203. doi:10.1016/j.taap.2006.11.009.

Coelho, D.G., Marinato, C.S., de Matos, L.P., de Andrade, H.M., da Silva, V.M., Santos-Neves, P.H., Araújo, S.C., Oliveira, J.A., 2020a. Is arsenite more toxic than arsenate in plants? *Ecotoxicology.* 29 196–202. doi: 10.1007/s10646-019-02152-9.

Coelho, D.G., Marinato, C.S., de Matos, L.P., de Andrade, H.M., da Silva, V.M., Neves, P.H.S., de Oliveira, J.A., 2020b. Evaluation of heavy metals in soil and tissues of economic-interest plants grown in sites affected by the Fundão dam failure in Mariana, Brazil. *Integrated Environ. Assessment Management.* doi:10.1002/ieam.4253.

Couto-Santos, F., Souza, A.C.F., Bastos, D.S.S., Ervilha, L.O.G., Dias, F.C.R., Araújo, L.S., Guimarães, S.E.F., Oliveira, L.L., Machado-Neves, M., 2020. Prepubertal exposure to arsenic alters male reproductive parameters in pubertal and adult rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 27;115304. doi:10.1016/j.taap.2020.115304. Online ahead of print.

Da Silva, N., Silberstein, C., Beaulieu, V., Piétrement, C., Van Hoek, A.N., Brown, D., Breton, S., 2006. Postnatal expression of aquaporins in epithelial cells of the rat epididymis. *Biol Reprod.* 74, 427–438. doi:10.1095/biolreprod.105.044735.

Da Silva, R.F., Borges, C.S., Lamas, C.A., Cagnon, V.H.A., Kempinas, W.G., 2017. Arsenic trioxide exposure impairs testicular morphology in adult male mice and consequent fetus viability. *J. Toxicol. Environ. Health.* 80, 1166–1179. doi:10.1080/15287394.2017.1376405.

Fernandes, G.S., Arena, A.C., Fernandez, C.D., Mercadante, A., Barbisan, L.F., Kempinas, W.G., 2007. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod. Toxicol.* 23, 106–112. doi:10.1016/j.reprotox.2006.09.002.

Ferreira, M., Matos, R.C., Oliveira, H., Nunes, B., Pereira, M. L. 2012. Impairment of mice spermatogenesis by sodium arsenite. *Hum. Exp. Toxicol.* 31, 290–302. doi:10.1177/0960327111405862.

Filler, R., 1993. Methods for evaluation of rat epididymal sperm morphology. In: *Male Reprod. Toxicol.* (eds RE Chapin & JJ Heinde) Academic Press, Cambridge, MA 334–343.

Flesch, F.M., Colenbrander, B., van Golde, L.M., Gadella, B.M., 1999. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 262 787-792. doi:10.1006/bbrc.1999.1300.

Gervasi, M.G., Visconti, P.E., 2017. Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology.* 5, 204–218. doi:10.1111/andr.12320.

Guvvala, P.R., Sellapan, S., Parameswaraiyah, R.J., 2016. Impact of arsenic (V) on testicular oxidative stress and sperm functional attributes in Swiss albino mice. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 18200-18210. doi:10.1007/s11356-016-6870-3.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University, Oxford, 110 p.

Han, Y., Liang, C., Manthari, R.K., Yu, Y., Gao, Y., Liu, Y., Jiang, S., Tikka, C., Wang, J., Zhang, J., 2020. Arsenic influences spermatogenesis by disorganizing the elongation of spermatids in adult male mice. *Chemosphere.* 238:124650. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.124650.

Harrison, R.A.P.; Vickers, S.E., 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 88, 343–352.

Herrero, B.M., Chatterjee, S., Lefièvre, L., de Lamirande, E., Gagnon, C., 2000. Nitric oxide interacts with the cAMP pathway to modulate capacitation of human spermatozoa. *Free Radical Biol. Med.* 29, 522–536. doi:10.1016/S0891-5849(00)00339-7.

Hirano, S., 2020. Biotransformation of arsenic and toxicological implication of arsenic metabolites. *Arch. Toxicol.* 94, 2587-601. doi: 10.1007/s00204-020-02772-9.

Hood, R.D., 2012. *Developmental and Reproductive Toxicology: A Practical Approach*, 3rd ed. CRC Press 1168.

Hsieh, F.I., Hwang, T.I., Hsieh, Y.C., Lo, H.C., Su, C.T., Hsu, H.S., Chiou, H.Y., Chen, C.J., 2008. Risk of erectile dysfunction induced by arsenic exposure through well water consumption in Taiwan. *Environmental Health Perspective.* 116, 532–536. doi:10.1289/ehp.10930.

Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A., 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols.* 4, 44–57. doi:10.1038/nprot.2008.211.

Huang, Q., Luo, L., Alamdar, A., Zhang, J., Liu, L., Tian, M., Eqani, S.A., Shen, H., 2016. Integrated proteomics and metabolomics analysis of rat testis: Mechanism of arsenic-induced male reproductive toxicity. *Scientific Reports.* 6, 32518. doi:10.1038/srep32518.

Hughes, M.F., 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* 133, 1–16. doi:10.1016/S0378-4274(02)00084-X.

Hughes, M.F., Kenyon, E.M., Edwards, B.C., Mitchell, C.T., Del Razo, L.M., Thomas, D.J., 2003. Accumulation and metabolism of arsenic in mice after repeated oral administration of arsenate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 191, 202–210. doi:10.1016/S0041-008X(03)00249-7.

Hughes, M.F., Beck, B.D., Chen, Y., Lewis, A.S., Thomas, D.J., 2011. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicol. Sci.* 123, 305–332. doi:10.1093/toxsci/kfr184.

Ickowicz, D., Finkelstein, M., Breitbart, H., 2012. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J. Androl.* 14, 816–821. doi:10.1038/aja.2012.81.

Iida, H., Ichinose, J., Kaneko, T., Mōri, T., Shibata, Y., 2004. Complementary DNA cloning of rat spetex-1, a spermatid-expressing gene-1, encoding a 63 kDa cytoplasmic protein of elongate spermatids. *Mol.Reprod. Dev.* 68, 385–393. doi:10.1002/mrd.20101.

Ijiri, T.W., Vadnais, M.L., Huang, A.P., Lin, A.M., Levin, L.R., Buck, J., Gerton, G.L., 2014. Thiol changes during epididymal maturation: a link to flagellar angulation in mouse spermatozoa? *Andrology.* 2, 65–75. doi:10.1111/j.2047-2927.2013.00147.x.

Jankovičová, J., Michalková, K., Sečová, P., Horovská, Ľ., Maňásková-Postlerová, P., Antálíková, J., 2018. Evaluation of protein phosphorylation in bull sperm during their maturation in the epididymis. *Cell Tissue Res.* 371, 365–373. doi:10.1007/s00441-017-2705-x.

Jones, R.C., 1999. To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. *Int. J. Andro.* 22, 57–67. doi:10.1046/j.1365-2605.1999.00151.x.

Kalab, P., Peknicova, J., Geussova, G., Moos, J., 1998. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP dependent pathway. *Mol. Reprod. Dev.* 51, 30 – 314. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199811)51:3<304::AID-MRD10>3.0.CO;2-2

Klinefelter, G.R., Hess, R.A., 1998. Toxicology of the male excurrent ducts and accessory sex glands. In: *Reproductive and Developmental Toxicology*, Korach KS (ed). Marcel Dekker, New York, 553–591.

Lima, G.D.A., Sertorio, M.N., Souza, A.C.F., Menezes, T.P., Mouro, V.G.R., Gonçalves, N.M., Oliveira, J.M., Henry, M., Neves, M.M., 2018. Fertility in male rats: Disentangling adverse effects of arsenic compounds. *Reprod. Toxicol.* 78, 130–140. doi:10.1016/j.reprotox.2018.04.015.

Liu, S., Guo, X., Wu, B., Yu, H., Zhang, X., Li, M., 2014. Arsenic induces diabetic effects through beta-cell dysfunction and increased gluconeogenesis in mice. *Sci. Rep.* 4, 6894. doi:10.1038/srep06894.

Luedtke, C.C., McKee, M.D., Cyr, D.G., Gregory, M., Kaartinen, M.T., Mui, J., Hermo, L., 2002. Osteopontin expression and regulation in the testis, efferent ducts, and epididymis of rats during postnatal development through to adulthood. *Biology of Reproduction.* 66, 1437–1448. doi:10.1095/biolreprod66.5.1437.

Mangelsdorf, I., Buschmann, J., Orthen, B., 2003. Some aspects relating to the evaluation of the effects of chemicals on male fertility. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 37, 356–369. doi:10.1016/S0273-2300(03)00026-6.

Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S., 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 298, 1912 – 1934. doi:10.1126/science.1075762.

Makker, K., Agarwal, A., Sharma, R., 2009. Oxidative stress & male infertility. *Indian J. Med. Res.* 129, 357–367.

Medeiros, P.C., Samelo, R., Silva, A.P., Santiago, G., Duarte, F., Castro, I., Perobelli, J., 2018. Prepubertal exposure to low of sodium arsenite impairs spermatogenesis and epididymal histophysiology in rats. *Environ. Toxicol.* 34, 83–91. doi:10.1002/tox.22660.

Menezes, T.P., Hill, E., de Alencar Moura, A., Lobo, M.D.P., Monteiro-Moreira, A.C.O., Breton, S., Machado-Neves, M., 2018. Pattern of protein expression. In the epididymis of *Oligoryzomys nigripes* (Cricetidae, Sigmodontinae). *Cell Tissue Res.* 372, 135 – 147. doi:10.1007/s00441-017-2714-9.

Miki, K., Willis, W.D., Brown, PR., Goulding, E.H., Fulcher, K.D., Eddy, E.M., 2002. Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility. *Dev. Biol.* 248, 331–342. doi:10.1006/dbio.2002.0728.

Morakinyo, A.O., Achema, P.U., Adegoke, A.O., 2010. Effect of *Zingiber officinale* (Ginger) on sodium arsenite-induced reproductive toxicity in male rats. *Afr. J. Biomed. Res.* 13, 39–45.

Mukherjee, A., Sengupta, M.K., Hossain, M.A., Ahamed, S., Das, B., Nayak, B., Lodh, D., Rahman, M.M., Chakraborti, D., 2006. Arsenic contamination in groundwater: a global perspective with emphasis on the Asian scenario. *J. Health Popul. Nut.* 24 142–163.

Naz, R.K., Rajesh, P.B., 2004. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2, 75. doi:10.1186/1477-7827-2-75.

Nourashrafeddin, S., Ebrahimzadeh-Vesal, R., Modarressi, M.H., Zekri, A., Nouri, M., 2014. Identification of Spata-19 new variant with expression beyond meiotic phase of mouse testis development. *Rep. Biochem. Mol. Biol.* 2, 89–93.

O’Flaherty, C., Matsushita-Fournier, D., 2017. Reactive oxygen species and protein modifications in spermatozoa. *Biol. Reprod.* 97, 577 – 585. doi:10.1093/biolre/iox104.

Pacheco, S.E., Anderson, L.M., and Boekelheide, K., 2012. Optimization of a filter-lysis protocol to purify rat testicular homogenates for automated spermatid counting. *J. Androl.* 33, 811–816. . doi:10.2164/jandrol.111.015131.

Pancholi, V., 2001. Multifunctional α -enolase: its role in diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 902–920. doi:10.1007/PL00000910.

Pant, N., Kumar, R., Murthy, R.C., Srivastava, S.P., 2001. Male reproductive effect of arsenic in mice. *Biometals.* 14, 113–117. doi:10.1023/A:1016686113763.

Perobelli, J., 2014. The male peripubertal phase as a developmental window for reproductive toxicology studies. *Curr. Pharm. Des.* 20 5398–5415. doi:10.2174/1381612820666140205150059.

Picut, C.A., Ziejewski, M.K., Stanislaus, D., 2018. Comparative Aspects of Pre- and Postnatal Development of the Male Reproductive System. *Birth Defects Res.* 110, 190 – 227. doi:10.1002/bdr2.1133.

Prathima, P., Pavani, R., Sukeerthi, S., Sainath, S.B., 2008. α -Lipoic acid inhibits testicular and epididymal oxidative damage and improves fertility efficacy in arsenic-intoxicated rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 32. doi:10.1002/jbt.22016.

Reagan-Shaw, S., Nihal, M., Ahmad, N., 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 22, 659–661. doi:10.1096/fj.07-9574LSF.

Reddy, P., Rani, G., Sainath, S., Meena, R., Supriya, C., 2011. Protective effects of N-acetylcysteine against arsenic-induced oxidative stress and reprotoxicity in male mice. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 25, 247–253. doi:10.1016/j.jtemb.2011.08.145.

Renu, K., Madhyastha, H., Madhyastha, R., Maruyama, M., Vinayagam, S., Valsala, Gopalakrishnan, A., 2018. Review on molecular and biochemical insights of arsenic-mediated male reproductive toxicity. *Life Sci.* 212, 37–58. doi:10.1016/j.lfs.2018.09.045.

Robaire, B., Hinton, B.T., 2015. The epididymis. In: Knobil and Neill’s *Physiology of Reproduction* (eds Plant T & Zeleznik AJ) Elsevier, New York, 691–772.

Robb, G., Ammann, R.P., Killian, G.J., 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J. Reprod. Fertil.* 54, 103–107. doi:10.1530/jrf.0.0540103.

Robey, R.B., Hay, N., 2006. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene.* 25, 4683–4696. doi:10.1038/sj.onc.1209595.

Sanabria, M., Cuciello, M.S., Guerra, M.T., Dos Santos Borges, C., Banzato, T.P., Perobelli, J.E., Leite, G.A., Anselmo-Franci, J.A., Kempinas, W.D.G., 2016. Sperm quality and fertility in rats after prenatal exposure to low doses of TCDD: a three-generation study. *Reprod. Toxicol.* 65, 29–38. doi:10.1016/j.reprotox.2016.06.019.

Sarkar M, Chaudhuri GR, Chattopadhyay A & Biswas NM 2003 Effect of sodium arsenite on spermatogenesis, plasma gonadotrophins and testosterone in rats. *Asian J. Androl.* 5, 27–31.

Senger, P.L., 2003. Pathways to pregnancy and parturition. 2nd revision edited. Washington: Current conceptions 381.

Sharpe, R.M., 1994. Regulation of Spermatogenesis In: *The Physiology of Reproduction*, Second Edition. Edited by E.Knobel and JD Neil. Haven Press Ltd, New York.

Siiteri, J.E., Ensrud, K.M., Moore, A., Hamilton, D.W., 1995. Identification of osteopontin (OPN) mRNA and protein in the rat testis and epididymis, and on sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 40, 16–28. doi:10.1002/mrd.1080400104.

Souza, A.C.F., Marchesi, S.C., Lima, G.D.A.L., Ferraz, R.P., Santos, F.C., da Matta, S.L.P., Machado-Neves, M., 2016a. Effects of sodium arsenite and arsenate in testicular histomorphometry and antioxidants enzymes activities in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 171, 354–362. doi:10.1007/s12011-015-0523-0.

Souza, A.C.F., Marchesi, S., Ferraz, R., Lima, G.D.A.L., Oliveira, J.A., Machado-Neves, M., 2016b. Effects of sodium arsenate and arsenite on male reproductive functions in Wistar rats. *J. Toxicol. Environ. Health.* 6, 274–286. doi:10.1080/15287394.2016.1150926.

Souza, A.C.F., Bastos, D.S., Sertorio, M.N., Santos, F.C., Ervilha, L.O.G., Oliveira, L.L., Machado-Neves, M., 2019. Combined effects of arsenic exposure and diabetes on male reproductive functions. *Andrology.* 7, 730–740. doi:10.1111/andr.12613.

Sullivan, R., Frenette, G., Girouard, J., 2007. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J. Androl.* 9, 483–491. doi:10.1111/j.1745-7262.2007.00281.x.

Thomas, D.J., 2007. Molecular processes in cellular arsenic metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol.* 222, 365–73. doi:10.1016/j.taap.2007.02.007.

Veeramachaneni, D.N.R., Palmer, J.S., Amann, R.P., 2001. Long-term effects on male reproduction of early exposure to common chemical contaminants in drinking water. *Hum. Reprod.* 16, 979–987. doi:10.1093/humrep/16.5.979.

Viana, A.G.A., Martins, A.M.A., Pontes, A.H., FONTES, W., Castro, M.S., Ricart, C.A.O., Sousa, M.V., Kaya, A., Topper, E., Memmili, E., Moura, A.A., 2018. Proteomic landscape of seminal plasma associated with dairy bull fertility. *Scientific Reports.* 8, 16323. doi:10.1038/s41598-018-34152-w.

Wolgemuth, D.J., Manterola, M., Vasileva, A., 2013. Role of cyclins in controlling progression of mammalian spermatogenesis. *Int. J. Devel. Biol.* 57, 159–168. doi:10.1387/ijdb.130047av.

Wu, X., Cobbina, S.J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., Yang, L., 2016. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 8244–8259. doi:10.1007/s11356-016-6333-x.

Xu, W., Bao, H., Liu, F., Liu, L., Zhu, Y.-G., She, J., 2012. Environmental exposure to arsenic may reduce human semen quality: associations derived from a Chinese cross-sectional study. *Environ. Health.* 11, 46. doi:10.1186/1476-069X-11-46.

Zhou, W., De Iuliis, G.N., Dun, M.D., Nixon, B., 2018. Characteristics of the Epididymal Luminal Environment Responsible for Sperm Maturation and Storage. *Front Endocrinol (Lausanne).* 28, 9–59. . doi:10.3389/fendo.2018.00059.

ARTIGO 3

Exposição ao arsênio durante a pré-puberdade altera o conteúdo mineral e a atividade antioxidante no fígado e rins de ratos púberes e adultos*

* Artigo em fase de produção

Resumo

O arsênio é um poluente amplamente encontrado no meio ambiente. A exposição ao arsênio na água potável tem sido relacionada a diversos problemas para a saúde humana e animais experimentais na idade adulta. No entanto, o impacto deste metaloide em animais expostos durante a pré-puberdade são escassos e imprecisos. Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da exposição pré-púbere ao arsênio nos parâmetros hepático e renal de animais púberes e adultos através de parâmetros estereológicos, bioquímicos, morfométricos, enzimáticos e minerais. Para isso, ratos Wistar machos no dia pós-natal (DPN) 21 receberam água filtrada (grupo controle, n = 20) ou foram expostos a 10 mg L⁻¹ de arsenito de sódio (grupo arsênio, n = 20) diariamente até o DPN 51. Metade dos animais foram eutanasiados (n=10/grupo) no DPN 52 e a outra metade recebeu água filtrada até o DPN 82, quando foram eutanasiados. Nossos resultados mostraram que a exposição pré-púbere ao arsênio aumentou a proporção deste metaloide em ambos os órgãos no DPN52 e reduziu o conteúdo de glicogênio e zinco no fígado destes animais. Além disso, a exposição ao arsênio aumentou a proporção de macrófagos e cobre no fígado, e reduziu a atividade de SOD e CAT no órgão de animais adultos. No rim, a proporção de selênio foi reduzida nos animais adultos expostos ao arsênio. Nós concluímos que o arsênio foi capaz de alterar o status oxidativo e balanço de microminerais, demonstrando que o metaloide pode causar efeitos a longo prazo em ratos Wistar.

Palavras-chave: arsenito, estresse oxidativo, rim, fígado, pré-púbere

Introdução

Os metais pesados são constituintes naturais da crosta terrestre e considerados os agentes tóxicos mais conhecidos pelo homem durante os anos (Baker et al., 2018). Entre os contaminantes ambientais, o arsênio (As) tem recebido considerável atenção vista sua onipresença no ambiente devido às diversas fontes naturais e antropogênicas, sendo a água potável a principal fonte de exposição dos seres humanos e animais (Flora 2015). O arsênio é classificado como um metaloide embora seja reconhecido como metal pesado no âmbito da toxicologia (Jomova et al., 2011). A toxicidade do arsênio está intimamente relacionada com suas propriedades químicas, as quais possibilitam a formação de compostos inorgânicos e orgânicos no ambiente ou no interior do corpo humano (Orloff et al., 2009). Nesse sentido, as formas mais comuns de arsênio encontradas na água são os compostos de arsenato (As^{+5}) e arsenito (As^{+3}), dos quais o último mencionado, é mais tóxico e solúvel em água (Abdul et al., 2015; WHO 2011).

Após a ingestão de água contaminada, o arsênio inorgânico é absorvido no intestino e subsequentemente metabolizado, via metilação, para ácido metilarsônico (MMA) e dimelarsínico (DMA). Esse evento envolve a redução do arsênio pentavalente para trivalente e a adição do grupo metil (Vahter 2002). O fígado tem sido elucidado como o principal órgão-alvo da metilação do arsênio, porém, tal processo foi evidenciado também nos testículos, rins e pulmão (Vahter 2002). No caso do rim, o órgão tem sido visto como alvo dos efeitos da ação do arsênio uma vez que a urina é a principal rota de eliminação deste elemento químico (Fowler 1994). O mecanismo de metilação reduz a reatividade do arsênio inorgânico nos tecidos e, conseqüentemente, facilita a eliminação do elemento através da excreção renal (Barra et al., 2000). Contudo, mesmo com a efetividade da metilação, subprodutos do arsênio podem se mostrar presentes nos tecidos.

Atualmente, há uma eminente preocupação global em relação a crescente deposição do arsênio no meio ambiente a partir de atividades antropogênicas as quais são, anualmente, responsáveis por aproximadamente 112 000 toneladas do metaloide no ambiente (Liao et al., 2005). Além disso, cerca de 100 milhões de pessoas em todo mundo estão expostas a concentrações de arsênio acima daquelas estabelecidas (0.01 mg L^{-1}) pela Organização Mundial da Saúde (OMS 2011). É estimado que grande parte da população, incluindo um elevado número de crianças em todo mundo, está exposta a

altas concentrações de arsênio via ingestão de água potável (Figueiredo et al., 2007). Nessa perspectiva, estudos emergentes têm focado em compreender como fatores de risco não convencionais poderiam contribuir para o surgimento de patologias. Estudos epidemiológicos nas diferentes áreas contaminadas mostraram forte associação entre a ingestão do arsênio inorgânico e câncer, lesão cutânea, doença cardiovascular, neurotoxicidade e diabetes (WHO 2011; Chen et al., 2009).

Estudos com animais experimentais elucidaram que a exposição aos diferentes compostos do arsênio modificou o perfil das transaminases e minerais no fígado, alterou o status oxidativo, além de evidenciarem patologias no parênquima hepático (Samelo et al., 2019; Turk et al., 2019; Souza et al., 2018a,b; Lu et al., 2014; Kharroubi et al., 2014). Além do fígado, foram observadas intensas associações entre a exposição a elevadas concentrações de arsênio e câncer de bexiga e renal (WHO 2011). No rim, estudos experimentais com animais adultos mostraram que a exposição ao arsênio pode causar danos histopatológicos nos glomérulos e túbulos renais, alterações morfométricas nos túbulos, perda do citoplasma além de congestão glomerular (Kharroubi et al., 2014). Além disso, a intoxicação por arsênio pode induzir mudanças nas concentrações de biomarcadores da função renal e da atividade das enzimas antioxidantes.

Na maioria dos casos, as condições mencionadas acima são diagnosticadas preferencialmente em adultos como resultado da exposição a níveis tóxicos do elemento não essencial. Contudo, estudos emergentes tem se preocupado com a relação entre os efeitos da exposição a xenobióticos durante o período de desenvolvimento, visto que essa fase corresponde a uma janela crítica e susceptível a ação de contaminantes ambientais (Samelo et al., 2020; Johnson et al., 2015; Perobelli 2014). Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da exposição pré-púbere ao arsênio no desenvolvimento hepático e renal de animais púberes e adultos através de parâmetros estereológicos, bioquímicos, morfométricos, enzimáticos e minerais.

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados neste trabalho, quarenta ratos Wistar machos (*Ratus norvegicus*) recém-desmamados (DPN 21) e provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com condições controladas de temperatura (21 ± 2 °C) e umidade (60-70%), e ciclo de luminosidade de 12 horas. Os animais foram alimentados com dieta comercial e receberam água *ad libitum*. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFV (CEUA/UFV, protocolo 96/2017) e realizados de acordo com as orientações emitidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Delineamento experimental

Os ratos foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais ($n = 20$ /grupo). Enquanto os animais do grupo controle receberam água filtrada, os animais expostos ao arsênio receberam 10 mg L^{-1} de arsênio na forma de arsenito de sódio (AsNaO_2 ; SigmaAldrich Co., St. Louis, MO) na água de beber, diariamente, do dia DPN 21 até o DPN51. A dose utilizada no presente estudo foi baseada em trabalhos previamente publicados a respeito da toxicidade induzida pelo arsênio em ratos adultos (Souza et al., 2016; Lima et al., 2018;).

Um conjunto de 20 animais ($n = 10$ /grupo) foram eutanasiados no DPN 52 com o objetivo de avaliar os efeitos do arsênio 24 horas após o término do período de exposição. Os 20 animais restantes receberam água filtrada *ad libitum* e foram posteriormente eutanasiados no DPN 82, para elucidar possíveis efeitos da exposição ao metaloide 30 dias após o fim de período do tratamento. Durante o período experimental, o consumo de arsênio foi mensurado diariamente, enquanto a mensuração do peso corporal foi realiza semanalmente. Os animais ingeriram em média $1,34 \pm 0,05 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ PC}$ de arsênio diariamente como foi relatado por Couto-Santos et al (2020).

Eutanásia e coleta de material

Nos dias de eutanásia (DPN 52 e DPN 82), os animais foram pesados e sacrificados por aprofundamento anestésico (ketamina 150 mg/kg e xilazina 10 mg/kg ,

intraperitoneal). A coleta de sangue foi realizada imediatamente via punção cardíaca. Posteriormente, o fígado e os rins foram removidos, dissecados e pesados. O rim esquerdo e fragmentos do fígado foram separados e imersos em solução fixadora de Karnovsky por 24 h para avaliação histológica. Fragmentos do rim direito e do fígado foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a - 80 °C para ensaios enzimáticos e minerais. Por fim, os fragmentos de cada órgão, rim e fígado, foram utilizados para avaliar o conteúdo de água por unidade de peso/órgão (mL/g). Para isso, os fragmentos dos órgãos foram secos a 60°C por 96 horas para obtenção do peso seco. O teor de água (ml/g) foi calculado através da diferença entre o peso dos órgãos úmidos e secos (Novaes et al. 2012). O índice somático do fígado (ISF %) foi avaliado pela relação entre o peso do órgão e o peso corporal final (Gonçalves et al. 2012). Da mesma maneira, o índice somático do rim (ISR%) foi também calculado.

Análise bioquímica do soro

As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas, em temperatura ambiente, a 2000 × g por 10 min. O soro obtido foi utilizado para a quantificação da transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), fosfatase alcalina (ALP), ureia, creatinina e bilirrubina. Foram utilizados kits bioquímicos (Bioclin Laboratories, Belo Horizonte, MG, Brasil) adequados para o equipamento BS-200 (Bioclin Laboratories, Belo Horizonte, MG, Brasil) de acordo com instruções do fabricante.

Análise estereológica e morfométricas

Os fragmentos do fígado e rim foram fixados em solução de Karnovsky por 24 h à temperatura ambiente, e, em seguida, desidratadas em gradiente de álcool e embebidas em metacrilato de 2-hidroxietilo (Historesin®, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Secções de 3µm de espessura foram obtidas com auxílio de um micrótomo rotativo (RM 2255, Leica Biosystems, Nussloch, German) e coradas com Hematoxilina-Eosina (H&E) para análise estereológica, e ácido periódico-Schiff (PAS) para quantificação de glicogênio através da microscopia de luz. Para evitar análises repetitivas da mesma área histológica, os cortes foram obtidos de modo semi-seriado,

utilizando 1 a cada 5 secções. Dez cortes histológicos foram preparados aleatoriamente para cada animal e capturados usando a objetiva de 20x. As imagens do fígado e rim foram digitalizadas por meio de fotomicroscópio (Olympus BX-53, Tóquio, Japão) conectado a câmera digital (Olympus DP73, Tóquio, Japão).

Para quantificação da proporção volumétrica do fígado foi utilizado um sistema de grades que consistia na contagem de 266 intersecções distribuídas sobre toda área histológica de cada imagem. Nos cortes histológicos corados com H&E foram contabilizados pontos coincidentes com os componentes do parênquima do fígado (núcleo e citoplasma de hepatócitos, capilares sinusoides, vasos sanguíneos e macrófagos), além de intersecções sobre focos de infiltrado inflamatório. A partir das secções histológicas coradas pelo método PAS, os pontos foram registrados em regiões citoplasmáticas contendo glicogênio. A proporção de cada componente (X_c) foi calculada usando a seguinte fórmula: $X_c = PP / PT$, onde PP é o número de pontos localizados na estrutura de interesse e PT é o número total de pontos na área histológica (Souza et al., 2018).

Para a análise estereológica do rim, foram obtidas imagens do córtex renal corado com H&E para quantificação do número de glomérulos por área, e o diâmetro dos glomérulos foi determinado para obtenção do volume glomerular conforme a fórmula $V = 4/3\pi r^3$, onde r corresponde ao valor médio do diâmetro do glomérulo dividido por 2 (Mandarim-de-Lacerda 2003). Nas imagens dos cortes corados pelo método de PAS, uma grade com 266 pontos foi utilizada para determinar a proporção volumétrica de regiões com glicogênio. Todas as análises estereológicas foram realizadas no software ImageJ (National Institutes of Health).

Atividade das enzimas antioxidantes e marcadores de dano oxidativo/nitrosativo

Para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes, os fragmentos do fígado e rim (100 mg/fragmento) congelados foram homogeneizados em PBS e centrifugados a $3,500 \times g$ por 10 min a $4^\circ C$. O sobrenadante foi utilizado para a análise das atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST). A atividade da SOD foi estimada pelo método do pirogalol, com base na capacidade desta enzima em catalisar as reações de superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Sarban et al., 2005). A atividade da CAT foi avaliada a partir da

mensuração da taxa de decomposição do H_2O_2 , de acordo com Aebi (1984). A atividade da GST foi estimada conforme descrito por Habig (1974), e testado de acordo com a formação de 2,4-Dinitroclorobenzeno conjugado com glutatona (CDNB).

Os níveis de malondialdeído (MDA) no homogenato do fígado e rim foram utilizados para avaliar a peroxidação lipídica nesses órgãos (Buege and Aust, 1978). Os níveis de proteína total (PC) nos tecidos foram determinados usando o método descrito por Bradford (1976). Por último, a produção de óxido nítrico (NO) foi quantificada, indiretamente, pelos níveis de nitrito no sobrenadante do homogenato dos órgãos baseado na reação de Griess (Tsikas 2007).

Determinação de microminerais

A proporção dos elementos químicos arsênio (As), manganês (Mn), ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e selênio (Se) no fígado e rim foram determinados por área. Os fragmentos previamente congelados desses órgãos foram secos ($60^\circ C$) em estufa até alcançarem peso seco constante e, em seguida cobertos com filme de carbono (Quorum Q150 T, East Grinstead, West Sussex, Inglaterra, Reino Unido). O conteúdo mineral do fígado e rim foi determinado por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS), utilizando um microscópio eletrônico de varredura (SEM) (Leo 1430 VP, Carl Zeiss, Jena, Thuringia, Alemanha) com um sistema detector de raios-X acoplado (Tracor TN5502, Middleton, WI, EUA) (Ladeira et al.,2019). Os resultados foram expressos como média das proporções.

Análises estatísticas

A normalidade dos resultados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram submetidos a two-way ANOVA para avaliar a influência de duas variáveis categóricas independentes diferentes (controle x ingestão de arsênio) em uma variável dependente categórica (idade). Em seguida, foi possível avaliar o efeito principal de cada variável independente e a possível interação. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todos os gráficos foram criados através do software estatístico GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM).

Resultados

Parâmetros biométricos

Sinais clínicos como perda de peso, lesões cutâneas, sangramento aparentes não foram observados nos animais durante o período experimental. Os resultados do peso, índice somático e conteúdo de água do fígado e rins foram apresentados na Tabela 1. O peso corporal final não apresentou diferenças significativas entre animais expostos ao arsênio comparados com animais do seu grupo controle em ambas as idades (dados apresentados em Couto-Santos et al., 2020).

No fígado, o ISF aumentou nos animais expostos ao arsênio no DPN 52 quando comparados com ratos do seu grupo controle ($p < 0,05$), ao passo que esse índice permaneceu inalterado nos animais expostos ao arsênio no DPN 82 comparados com animais do seu grupo controle ($p > 0,05$). O peso e conteúdo de água no fígado não apresentaram diferenças significativas entre animais expostos ao arsênio e controle, em ambas as idades ($p > 0,05$).

Em relação aos rins, o conteúdo de água no órgão aumentou em animais púberes expostos ao arsênio comparado com ratos do seu grupo controle ($p < 0,05$), enquanto que nos animais adultos expostos ao arsênio esse parâmetro foi inalterado ($p > 0,05$). O peso e o ISR não diferiram entre animais expostos ao arsênio e controle no DPN 52 e DPN 82 ($p > 0,05$). A maioria dos resultados dos parâmetros biométricos sofreu influência apenas do fator idade ao invés da ingestão de arsênio (Tabela Suplementar).

Tabela 1 Peso, índice somático e conteúdo de água obtido a partir do fígado e rins de ratos púberes e adultos.

Parâmetros	DPN 52		DPN 82	
	Controle	Arsênio	Controle	Arsênio
<i>Fígado</i>				
Peso (g)	11,07 ± 0,51 ^a	11,64 ± 0,36 ^a	14,30 ± 0,31 ^b	15,92 ± 0,70 ^b
Índice somático (%) [*]	5,02 ± 0,18 ^a	5,88 ± 0,15 ^b	4,27 ± 0,12 ^a	4,41 ± 0,08 ^a
Conteúdo de água (mL/g)	0,68 ± 0,006 ^a	0,70 ± 0,004 ^a	0,70 ± 0,01 ^a	0,70 ± 0,01 ^a
<i>Rins</i>				
Peso (g)	1,38 ± 0,05 ^a	1,28 ± 0,05 ^a	1,62 ± 0,06 ^b	1,57 ± 0,05 ^b

Índice somático (%)	0,62 ± 0,01 ^a	0,64 ± 0,01 ^a	0,48 ± 0,02 ^b	0,43 ± 0,008 ^b
Conteúdo de água (mL/g)*	0,76 ± 0,008 ^a	0,81 ± 0,01 ^b	0,85 ± 0,008 ^a	0,85 ± 0,01 ^a

Média ± SEM. Entre colunas, ^{a,b} expressa diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e arsênio DPN 52 e DPN 82 pelo ANOVA two-way com post hoc teste Tukey. Na mesma linha, se a sequência de letras difere entre DPN 52 e DPN 82 indica o efeito da idade. * indica interação entre a idade e a exposição ao arsênio de acordo com ANOVA two-way com post hoc teste Tukey ($n = 8$ animais/grupo).

Parâmetros bioquímicos do soro

Os resultados do perfil bioquímico sérico podem ser vistos na Tabela 2. As concentrações séricas de TGO, TGP, ALP, ureia, creatinina e bilirrubina não apresentaram diferenças significativas entre os animais do grupo controle e arsênio em ambas as idades ($p > 0,05$).

Tabela 2 Concentrações de TGO, TGP, ALP, ureia, creatinina e bilirrubina no soro de ratos no DPN 52 e DPN 82 expostos ao arsênio.

Parâmetros	DPN 52		DPN 82	
	Controle	Arsênio	Controle	Arsênio
TGO (U/L)	191,80 ± 10,15 ^a	193,60 ± 10,41 ^a	133,60 ± 9,17 ^b	142,80 ± 2,33 ^b
TGP (U/L)	72,40 ± 3,60 ^a	64,60 ± 8,40 ^a	51,40 ± 2,11 ^a	52,33 ± 1,85 ^a
ALP (U/L)	366,60 ± 41,28 ^a	414,00 ± 22,78 ^a	190,80 ± 22,72 ^b	221,60 ± 36,51 ^b
Ureia (mg/dL)	31,20 ± 2,35 ^a	36,60 ± 1,69 ^a	35,20 ± 0,80 ^a	39,60 ± 1,72 ^a
Creatinina (mg/dL)	0,45 ± 0,02 ^a	0,37 ± 0,04 ^a	0,39 ± 0,01 ^a	0,42 ± 0,01 ^a
Bilirrubina (mg/dL)	0,26 ± 0,02 ^a	0,28 ± 0,04 ^a	0,32 ± 0,03 ^a	0,32 ± 0,02 ^a

Média ± SEM. Entre colunas, ^{a,b} expressa diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e arsênio DPN 52 e DPN 82 pelo ANOVA two-way com post hoc teste Tukey. Na mesma linha, se a sequência de letras difere entre DPN 52 e DPN 82 indica o efeito da idade. * indica interação entre a idade e a exposição ao arsênio de acordo com ANOVA two-way com post hoc teste Tukey ($n = 8$ animais/grupo).

Parâmetros estereológicos e morfométricos

As observações histológicas mostraram que os animais de todos os grupos experimentais apresentaram aspecto normal do parênquima hepático caracterizado pela disposição dos hepatócitos em placas cribiformes, anastomazantes, que se estendem dos tratos portais até as veias hepáticas. Estas células apresentaram um núcleo central, arredondado com um ou dois nucléolos evidentes. Entre as placas de hepatócitos é

possível observar os capilares sinusoides onde se encontram os macrófagos, que no fígado são conhecidos como células de Kupffer (Figura 1).

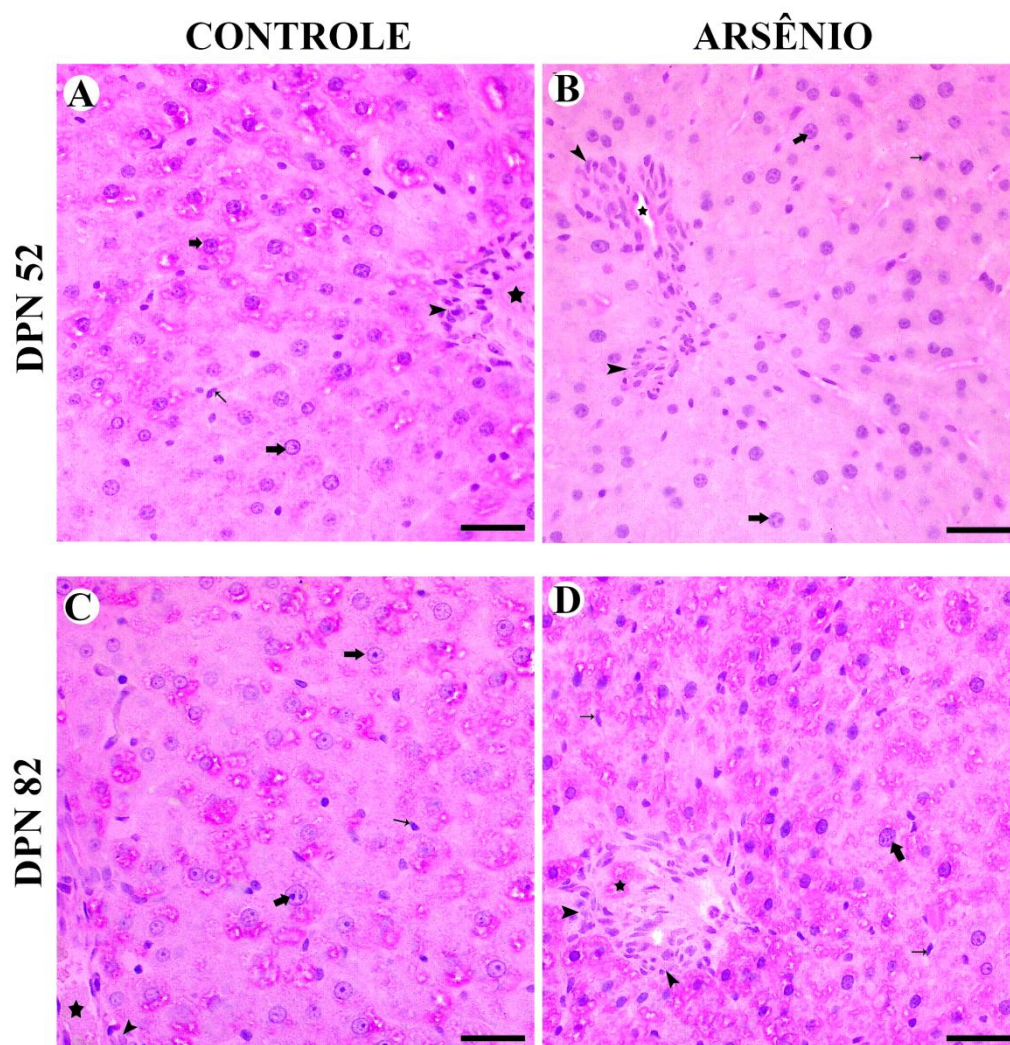


Figura 1. Fotomicrografias representativas do fígado de ratos Wistar púberes e adultos expostos ou não ao arsenito de sódio na água de beber *ad libitum*. A e C, animais controle no DPN 52 e DPN 82 respectivamente. B e D, animais expostos ao arsênio no DPN 52 e DPN 82 respectivamente. Estrela: vaso sanguíneo; cabeça de seta: infiltrado inflamatório; seta larga: hepatócito; seta fina: macrófagos (H&E, Barra: 50 μ m).

As análises estereológicas do fígado mostraram que a proporção volumétrica do citoplasma e núcleo de hepatócitos, hepatócitos, capilares sinusoides, vasos sanguíneos e focos de infiltrado inflamatório não se alteraram em animais expostos ao arsênio em ambas as idades comparados com os animais de seus respectivos grupos controle ($p > 0,05$) (Tabela 3; Figura 1). A proporção volumétrica dos macrófagos não alterou nos animais púberes expostos ao arsênio comparados com animais do seu grupo controle (p

> 0,05) (Tabela 3; Figura 1), porém esse parâmetro aumentou nos animais adultos expostos ao arsênio ($p < 0,05$) (Tabela 3; Figura 1). O arsênio reduziu a proporção volumétrica das inclusões citoplasmáticas contendo glicogênio nos animais no DPN 52 comparados com os animais do seu grupo controle ($p < 0,05$), ao passo que nos animais no DPN 82, a proporção de glicogênio no fígado não se alterou nos animais expostos ao arsênio comparados com animais do seu grupo controle ($p > 0,05$) (Tabela 3; Figura 2).

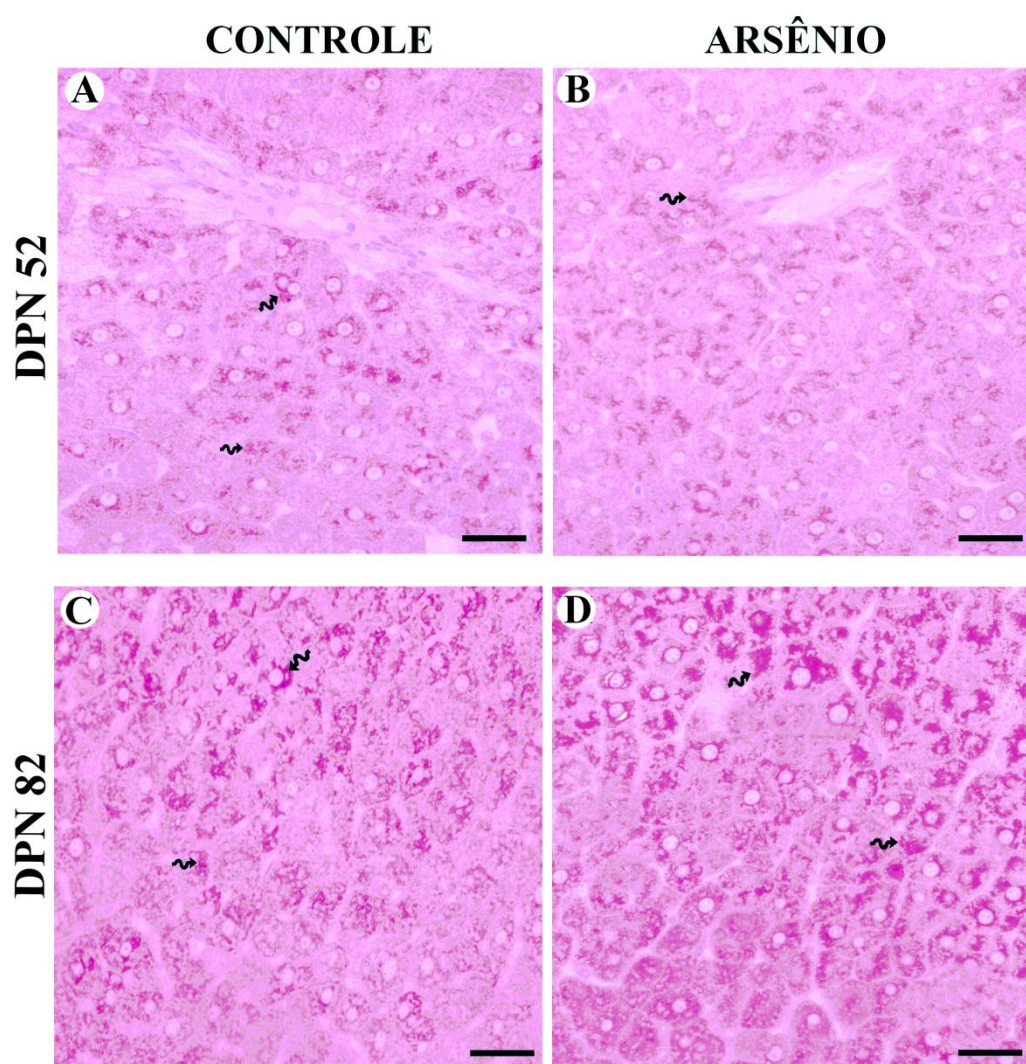


Figura 2. Fotomicrografias representativas dos rins de ratos Wistar juvenis e adultos expostos ou não ao arsenito de sódio na água de beber *ad libitum*. A e C, animais controle no DPN 52 e DPN 82 respectivamente. B e D, animais expostos ao arsênio no DPN 52 e DPN 82 respectivamente. Inclusões citoplasmáticas de glicogênio são representadas por setas tortas. (método PAS, Barra: 50 μ m). ($n = 5$ animais/grupo).

Em relação aos rins, o órgão quando visualizado microscopicamente apresentou a aparência tecidual natural em todos os grupos experimentais. Na região cortical foi possível observar os corpúsculos renais. A região menor e menos corada é a medular, onde foi possível observar uma grande concentração de túbulos renais de vários tipos. Os túbulos coletores, que são os maiores dessa região, mostraram um revestimento epitelial formado por uma só camada de células que têm o formato cúbico (Figura 3). O arsênio não alterou o volume glomerular, a proporção de glomérulos por área e o conteúdo de glicogênio no órgão em ambas às idades quando comparados com seus respectivos animais controle ($p > 0,05$) (Tabela 3; Figura 4).

Table 3 Parâmetros morfométricos e estereológicos do fígado e rins de ratos no DPN 52 e DPN 82 expostos ou não ao arsênio durante a pré-adolescência.

Parâmetros	DPN 52		DPN 82	
	Controle	Arsênio	Controle	Arsênio
<i>Fígado</i>				
Citoplasma (%) [*]	62,23 ± 1,76 ^a	66,97 ± 0,94 ^a	63,59 ± 2,49 ^a	59,66 ± 2,16 ^a
Núcleo (%)	5,33 ± 0,51 ^a	6,12 ± 0,11 ^a	5,93 ± 0,11 ^a	7,10 ± 0,38 ^a
Hepatócito (%)	67,56 ± 1,96 ^a	72,27 ± 0,75 ^a	69,52 ± 1,81 ^a	66,77 ± 2,02 ^a
Capilar sinusoide (%) [*]	30,28 ± 1,87 ^a	24,15 ± 0,80 ^a	29,01 ± 1,91 ^a	29,96 ± 1,72 ^a
Vaso sanguíneo (%)	0,38 ± 0,10 ^a	0,72 ± 0,35 ^a	0,23 ± 0,06 ^a	0,84 ± 0,32 ^a
Macrófago (%) [*]	0,77 ± 0,10 ^a	0,92 ± 0,04 ^a	0,58 ± 0,03 ^b	1,21 ± 0,16 ^a
Glicogênio (%) [*]	66,68 ± 2,06 ^a	59,17 ± 1,91 ^b	70,78 ± 0,72 ^a	71,17 ± 0,83 ^a
Infiltrado inflamatório (%) [*]	0,85 ± 0,12 ^a	0,50 ± 0,12 ^a	0,70 ± 0,10 ^a	1,06 ± 0,10 ^a
<i>Rins</i>				
Volume glomerular 10 ⁴ (mm ³)	4,48 ± 0,29 ^a	3,65 ± 0,47 ^a	6,05 ± 0,45 ^b	7,03 ± 0,66 ^b
Glomérulo / área (mm ²)	6,08 ± 0,60 ^a	5,24 ± 0,39 ^a	6,78 ± 0,34 ^a	5,51 ± 0,35 ^a
Glicogênio (%)	5,35 ± 0,15 ^a	5,85 ± 0,46 ^a	5,74 ± 0,16 ^a	5,05 ± 0,89 ^a

Média ± SEM. Entre colunas, ^{a,b} expressa diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e arsênio DPN 52 e DPN 82 pelo ANOVA two-way com post hoc teste Tukey. Na mesma linha, se a sequência de letras difere entre DPN 52 e DPN 82 indica o efeito da idade. ^{*} indica interação entre a idade e a exposição ao arsênio de acordo com ANOVA two-way com post hoc teste Tukey ($n = 5$ animais/grupo).

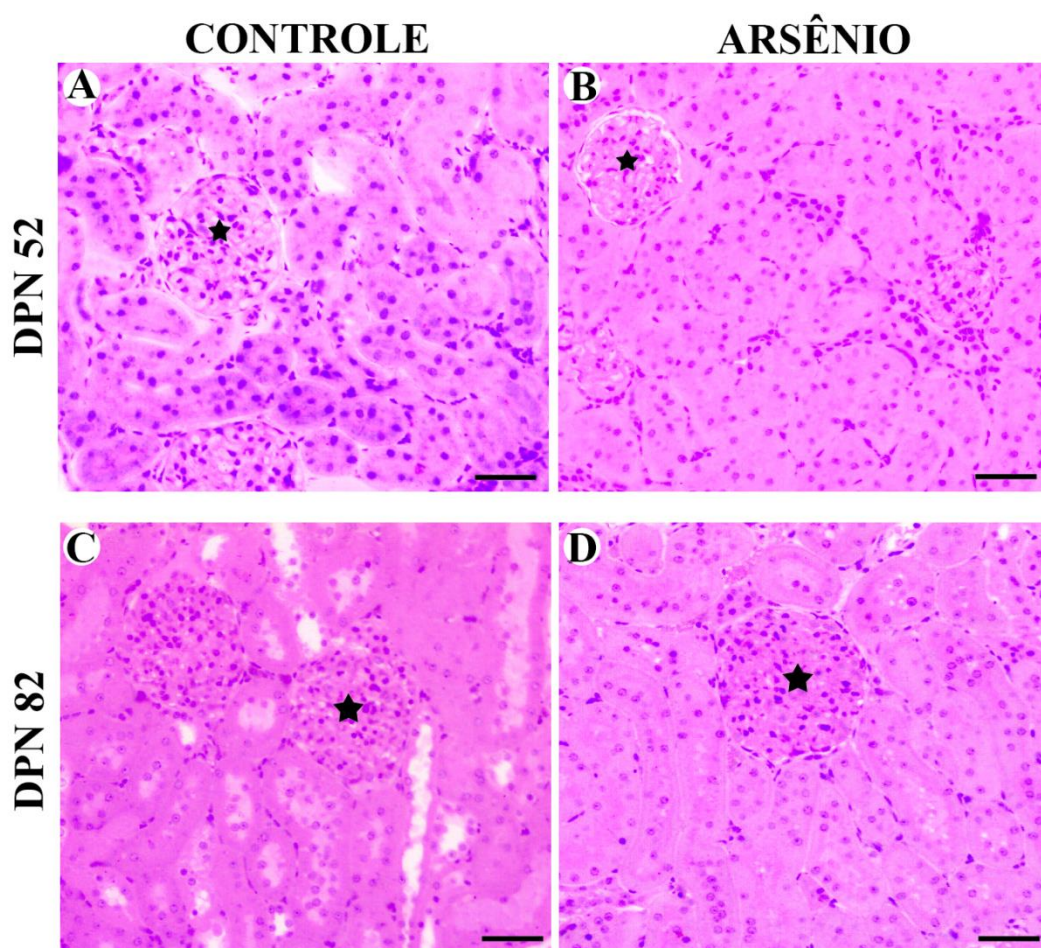


Figura 3. Fotomicrografias representativas dos rins de ratos Wistar juvenis e adultos expostos ou não ao arsenito de sódio na água de beber *ad libitum*. A e C, animais controle no DPN 52 e DPN 82 respectivamente. B e D, animais expostos ao arsênio no DPN 52 e DPN 82 respectivamente. Os glomérulos são indicados por estrela (H&E, Barra: 5 μ m).

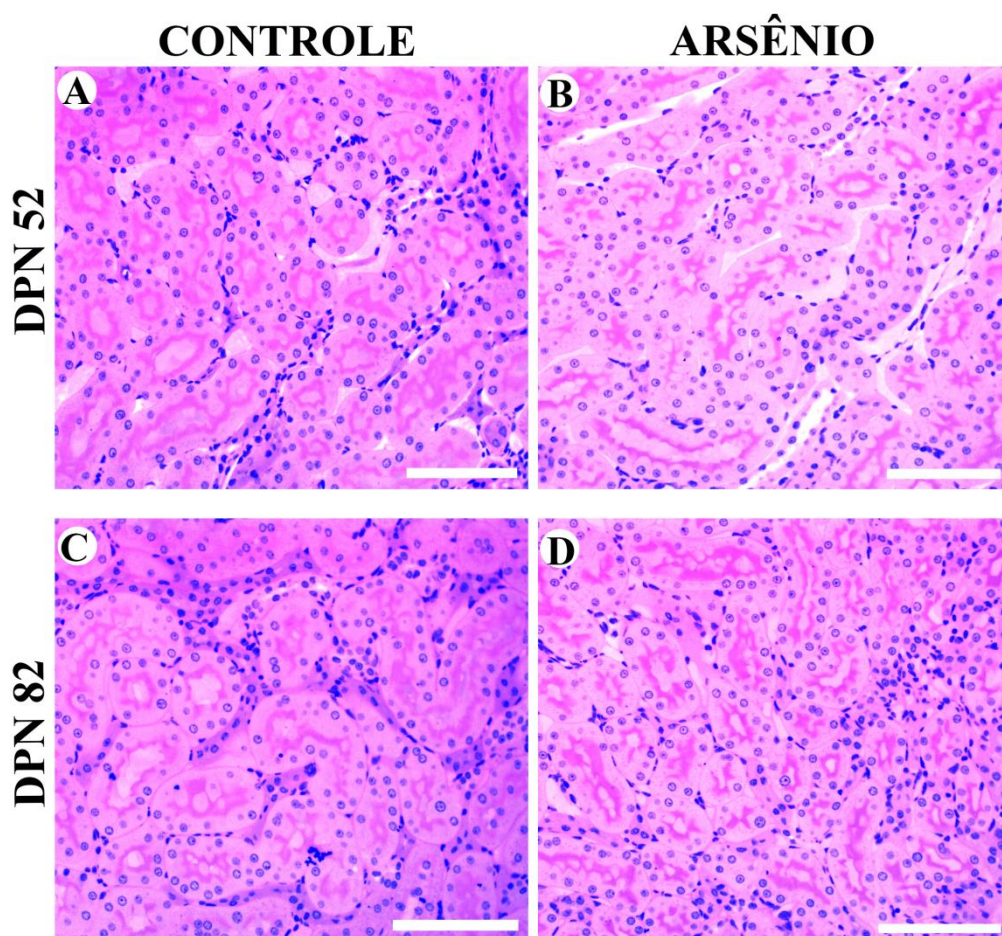


Figura 4. Fotomicrografias representativas dos rins de ratos Wistar juvenis e adultos expostos ou não ao arsenito de sódio na água de beber *ad libitum*. A e C, animais controle no DPN 52 e DPN 82 respectivamente. B e D, animais expostos ao arsênio no DPN 52 e DPN 82 respectivamente. (método PAS, Barra: 5 μ m). ($n = 5$ animais/grupo).

Atividade das enzimas antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo

Os resultados da atividade de enzimas antioxidantes e dos marcadores do estresse oxidativo no fígado e rins foram mostrados na figura 5 e 6, respectivamente. No fígado, não foram observadas mudanças na atividade de SOD e CAT nos animais expostos ao arsênio comparados com os animais do seu grupo controle no DPN 52 ($p > 0,05$) (Figura 5), mas, a exposição ao arsênio reduziu a atividade dessas enzimas nos animais no DPN 82 comparados com os animais do seu grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 5). Atividade de GST e as concentrações de PC, MDA e NO não foram alteradas no fígado de animais expostos ao arsênio quando comparados com os animais dos seus grupos controle em ambas as idades ($p > 0,05$) (Figura 5).

No rim, a atividade de todas as enzimas antioxidantes bem como os marcadores do dano oxidativo não sofreram influências da exposição ao arsênio em ambas as idades quando comparadas com seus respectivos grupos controles ($p > 0,05$; Figura 6).

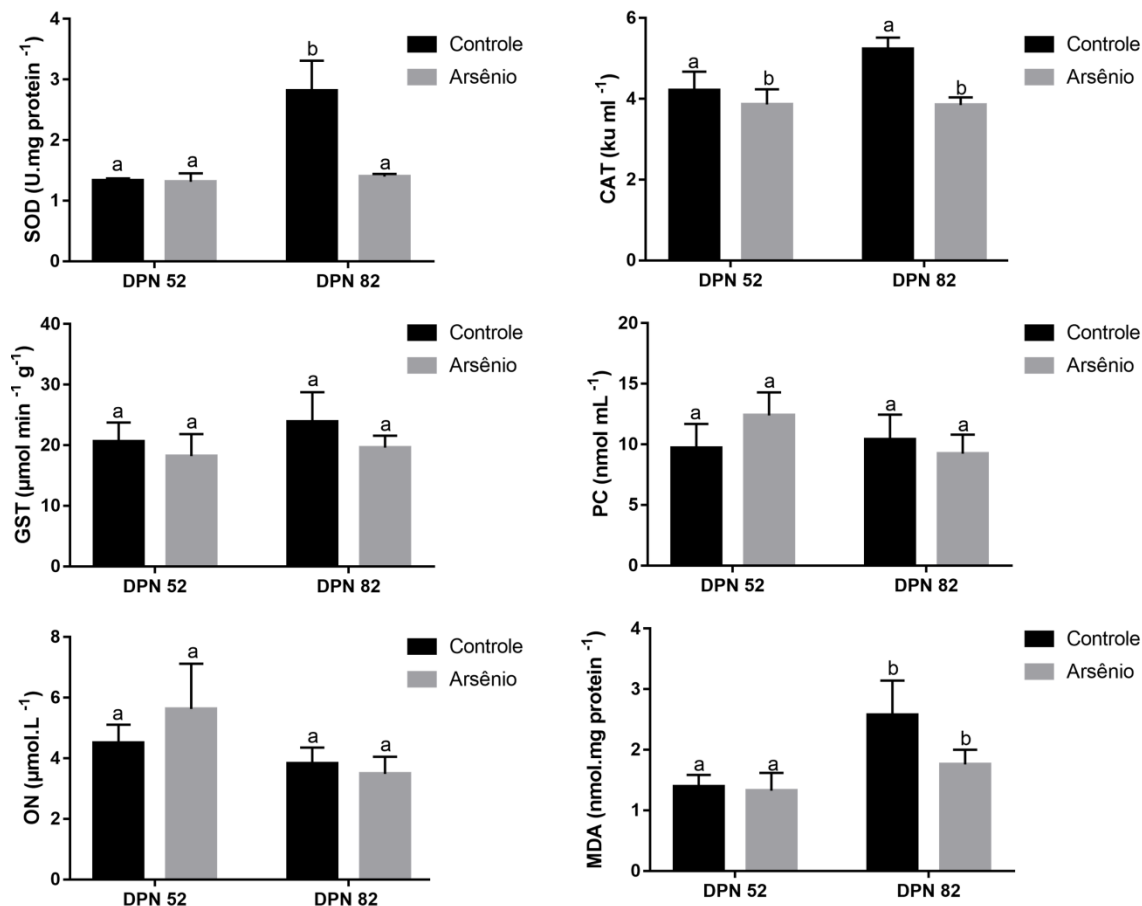


Figura 5. Enzimas antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo no fígado de ratos Wistar expostos ou não ao arsênio no DPN 52 e DPN 82. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GST: glutiona S-transferase; MDA: malondialdeído; PC: proteína carbonilada; NO: óxido nítrico. Média \pm Erro Padrão. ^{a,b} expressa diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e arsênio DPN 52 e DPN 82 pelo ANOVA two-way. Na mesma linha, se a sequência de letras difere entre DPN 52 e DPN 82 indica o efeito da idade. * indica interação entre a idade e a exposição ao arsênio de acordo com ANOVA two-way. ($n = 5$ animais/grupo).

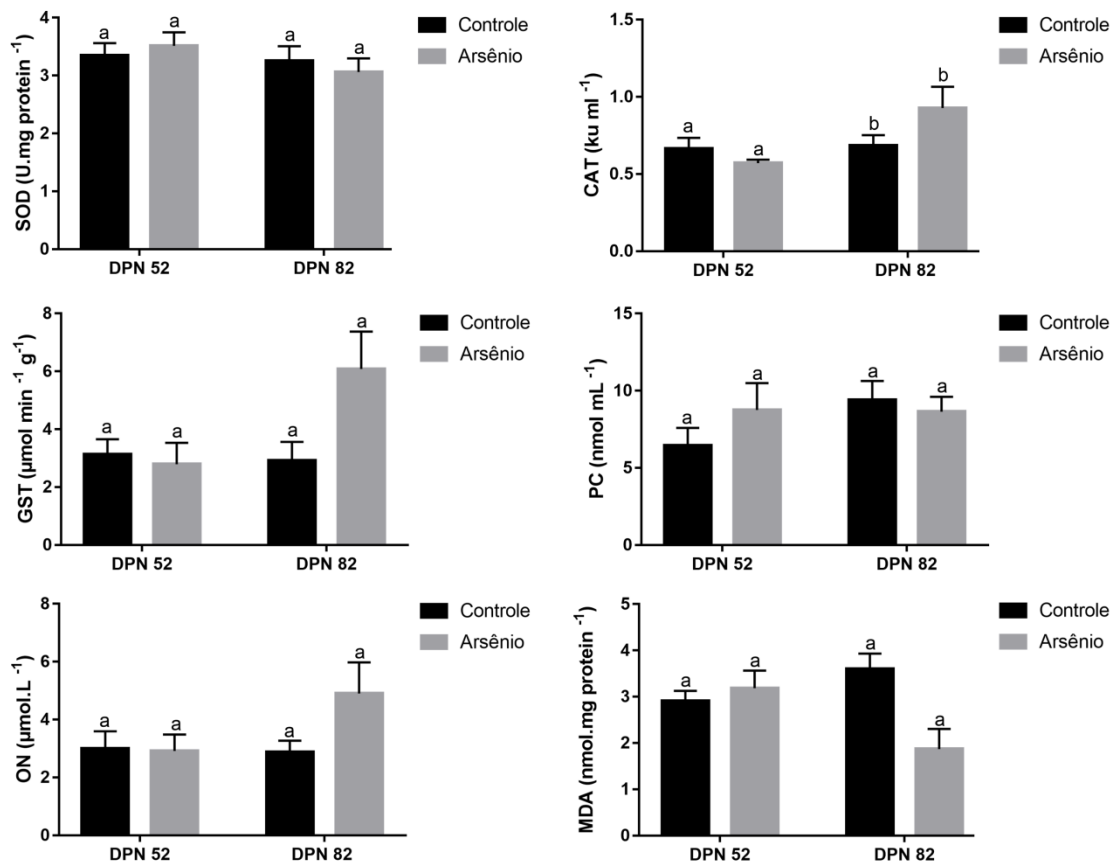


Figura 6. Enzimas antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo nos rins de ratos Wistar expostos ou não ao arsênio no DPN 52 e DPN 82. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GST: glutiona S-transferase; MDA: malondialdeído; PC: proteína carbonilada; ON: óxido nítrico. Média ± Erro Padrão. ^{a,b} expressa diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e arsênio DPN 52 e DPN 82 pelo ANOVA two-way. Na mesma linha, se a sequência de letras difere entre DPN 52 e DPN 82 indica o efeito da idade. * indica interação entre a idade e a exposição ao arsênio de acordo com ANOVA two-way. ($n = 5$ animais/grupo).

Análise de microminerais

Em relação ao fígado, as análises da determinação de microminerais mostraram que não houve diferenças significativas na proporção de manganês, ferro e selênio entre animais expostos ao arsênio e animais dos seus grupos controle em ambas as idades ($p > 0,05$) (Tabela 4). A proporção do cobre não foi alterada nos animais no DPN 52 expostos ao arsênio quando comparados com os animais do seu grupo controle ($p > 0,05$) (Tabela 4), Porém a proporção desse mineral foi maior nos animais expostos ao arsênio do que nos animais do seu grupo controle no DPN 82 ($p < 0,05$) (Tabela 4). A proporção de arsênio aumentou nos animais expostos ao arsênio no DPN 52, enquanto a proporção de zinco reduziu nesses animais quando comparados com animais do seu

grupo controle ($p < 0,05$) (Tabela 4). No DPN 82, a proporção de zinco e arsênio foi similar entre animais expostos ao arsênio e animais controle ($p > 0,05$) (Tabela 4).

Nos rins, a proporção de arsênio aumentou no órgão dos animais expostos ao arsênio no DPN 52 ($p < 0,05$) (Tabela 4), enquanto esse parâmetro foi inalterado nos animais no DPN 82 quando comparados com animais do seu grupo controle ($p > 0,05$) (Tabela 4). Em relação ao selênio, a proporção deste micromineral não foi alterada nos animais expostos ao arsênio no DPN 52 quando comparado com animais do seu grupo controle ($p > 0,05$) (Tabela 4), ao passo que a proporção do selênio reduziu nos animais expostos ao arsênio no DPN 82 quando comparados com os animais dos seus grupos controle ($p < 0,05$) (Tabela 4). A proporção do manganês, ferro, cobre e zinco não diferiu entre os grupos experimentais em ambas as idades ($p > 0,05$).

Table 4. Proporção de elementos traços no fígado de ratos Wistar expostos ou não ao arsênio no DPN 52 e DPN 82.

Minerais	DPN 52		DPN 82	
	Controle	Arsênio	Controle	Arsênio
<i>Fígado</i>				
Mn	7,35 ± 0,67 ^a	7,15 ± 0,55 ^a	6,51 ± 0,13 ^a	5,52 ± 1,32 ^a
Fe	16,63 ± 0,78 ^a	18,67 ± 0,76 ^a	23,89 ± 3,14 ^a	15,69 ± 1,14 ^a
Cu [*]	11,32 ± 0,57 ^a	13,71 ± 0,87 ^a	8,74 ± 0,48 ^a	24,01 ± 2,91 ^b
Zn	24,03 ± 2,86 ^a	17,53 ± 1,90 ^b	18,65 ± 1,49 ^b	13,67 ± 3,09 ^b
As	20,44 ± 0,77 ^a	27,69 ± 2,18 ^b	19,43 ± 2,80 ^a	23,29 ± 1,02 ^a
Se	20,23 ± 1,48 ^a	15,23 ± 0,43 ^a	22,78 ± 1,58 ^a	17,82 ± 3,86 ^a
<i>Rins</i>				
Mn [*]	4,87 ± 0,98 ^a	8,21 ± 1,24 ^a	7,65 ± 1,88 ^a	5,16 ± 0,65 ^a
Fe	15,35 ± 2,10 ^a	17,36 ± 2,57 ^a	13,96 ± 2,67 ^a	22,92 ± 4,07 ^a
Cu	14,28 ± 0,56 ^a	15,83 ± 1,52 ^a	13,27 ± 1,74 ^a	16,02 ± 1,71 ^a
Zn	14,26 ± 1,41 ^a	15,09 ± 1,79 ^a	14,08 ± 1,01 ^a	13,78 ± 3,02 ^a
As	17,25 ± 1,47 ^a	23,58 ± 2,84 ^b	17,85 ± 1,50 ^a	21,18 ± 2,44 ^a
Se	33,99 ± 3,91 ^a	19,93 ± 4,30 ^a	33,19 ± 1,23 ^b	20,94 ± 1,14 ^a

Média ± SEM. Entre colunas, ^{a,b} expressa diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e arsênio DPN 52 e DPN 82 pelo ANOVA two-way com post hoc teste Tukey. Na mesma linha, se a sequência de letras difere entre DPN 52 e DPN 82 indica o efeito da idade. ^{*} indica interação entre a idade e a exposição ao arsênio de acordo com ANOVA two-way com post hoc teste Tukey ($n = 5$ animais/grupo).

Discussão

O presente estudo investigou a hepato-nefrototoxicidade do arsênio inorgânico em ratos púberes e adultos expostos ao metaloide durante a pré-puberdade através da água de beber. Nós acreditamos que este é o primeiro estudo que propôs acessar os efeitos do arsenito de sódio no status oxidativo e no conteúdo de microminerais no fígado e rins de animais púberes e adultos. Os resultados exibidos neste trabalho demonstraram que a exposição ao arsênio alterou a proporção de minerais e glicogênio no fígado de ratos púberes. Interessantemente, mesmo após o período de recuperação, os animais adultos apresentaram redução na atividade das enzimas antioxidantes, além de alterações na morfologia do fígado e no conteúdo mineral sem alterar a microarquitetura do órgão. Em relação aos rins, a exposição ao arsênio não modulou alterações expressivas nos parâmetros avaliados, exceto nas concentrações séricas de ureia e na proporção de selênio nos animais adultos.

Os resultados encontrados no nosso estudo demonstraram houve um aumento na proporção de arsênio no fígado e rins de animais púberes, sugerindo que o metabolismo e excreção do arsênio inorgânico foram inábeis para eliminar completamente o composto. O fígado exerce papel crucial no processo de desintoxicação do corpo e por isto é considerado um órgão chave no processo de detoxificação do organismo. Após a ingestão de água contaminada, o arsênio inorgânico é absorvido no intestino, metabolizado no fígado e, os subprodutos do arsênio são prontamente excretados através da urina (Vahter 1981). Contudo, a exposição ao arsênio pode neutralizar o processo de desintoxicação o que pode causar acúmulo do metal nesses órgãos (Ratnaike 2003). Recentemente, Samelo et. al (2020) mostraram que a exposição ao arsênio aumentou os níveis do metaloide no fígado e rins de animais púberes expostos durante a pré-puberdade o que corrobora com os resultados encontrados no presente estudo. Interessantemente, o acúmulo de arsênio observado em nosso estudo nos animais no DPN 52 não persistiu nos animais adultos em nenhum dos órgãos estudados. Nós acreditamos que o período de recuperação foi suficiente para o sistema hepato-renal metabolizar e excretar, pelo menos em parte o arsênio, já que o acúmulo do metaloide nesses órgãos depende da sua presença. Além disso, levando em consideração a alta capacidade regenerativa do fígado, nós sugerimos que o fígado pode ter eliminado

o arsênio, diferentemente de outros metais pesados que não são metabolizados e assim se acumulam nos órgãos.

Os elementos traços são requeridos em pequenas concentrações como componentes essenciais nos processos biológicos. Os xenobióticos podem interferir na dinâmica desses elementos e dessa forma causar desequilíbrio na homeostase corporal (Molin et al. 2009). O zinco desenvolve várias funções singulares no organismo explicado pela sua função catalítica e estrutural, além de ser componente de uma gama de fatores de transcrição (Vallee and Falchuk 1993).

Nossos resultados demonstraram que a exposição ao arsênio reduziu a proporção de zinco no fígado dos animais púberes e tal efeito poderia ser relacionado com mudanças do perfil oxidativo do hepatócito. Contrariamente, Souza et al. (2018) mostraram que a exposição ao arsenito de sódio durante 56 dias aumentou a proporção de zinco no fígado de ratos adultos. Nós sugerimos que o arsênio interfere diferentemente no balanço do zinco e essa variabilidade poderia ser dependente da idade. O cobre pode desempenhar um papel antioxidante dependendo do seu estado de oxidação no interior da célula (Fraga 2005). O aumento na proporção de cobre após a exposição ao arsênio evidenciada em nosso trabalho poderia ter modulado variações no estado redox das células hepáticas mesmo após o período de exposição nos ratos adultos. No presente estudo, a ausência de alterações nos demais elementos traços poderia ser explicada pela funcionalidade da metalotioneína na desintoxicação do organismo. Essas proteínas possuem a capacidade de interagirem com os metais pesados de modo que os mesmos podem induzir a expressão da metalotioneína (Ganger et al., 2016). Tem sido demonstrado que altas concentrações de arsênio aumentam as concentrações de metalotioneína no fígado (Albores et al., 1992). Além disso, Couto-Santos et al. (2020) demonstraram que a exposição pré-púbere ao arsenito de sódio aumentou a expressão da metalotioneína nos testículos de animais púberes. Como as metalotioneínas apresentam elevada quantidade de grupos tióis, a interação do arsênio com essas proteínas poderia ter um papel na desintoxicação do arsênio (Ganger et al., 2016). Dessa forma, o arsênio poderia estar indisponível para competir com os elementos traços presente no órgão e, conseqüentemente, não modular alterações no equilíbrio desses microminerais.

O selênio é um elemento traço que desenvolve papel importante na atividade enzimática de GST (Zwolak and Zaporowska 2012). Estudos *in vitro* demonstraram

que compostos arsênicos apresentam efeito inibitório sobre as selenoenzimas, proteínas estas que desempenham papel crítico na regulação do status redox da célula (Kotyzová et al., 2008). No presente estudo, nós observamos uma redução no conteúdo de selênio nos rins de animais adultos sem alterar a atividade da enzima GST no órgão. Nós sugerimos que as mudanças nos padrões do selênio induzida pelo arsênio não foram capazes de interferir na atividade de enzimas antioxidante.

A toxicidade do arsênio aumenta os níveis de citocinas, espécies reativas de oxigênio (EROs) (, peróxido de hidrogênio, radicais ânion superóxido e radicais livres hidroxila) e níveis de espécies reativas de nitrogênio (ERN). Também bloqueia o sistema de defesa antioxidante, atacando a cadeia respiratória mitocondrial e, em última análise, danifica o DNA celular e as proteínas (Adil et al., 2015; Brunati et al., 2010). O desequilíbrio antioxidante derivado do arsênio no fígado foi relatado em vários estudos com animais adultos (Turk et al., 2019; Souza et al., 2018; Kotyzová et al., 2013). O sistema de defesa antioxidante conta com o papel das enzimas antioxidantes SOD e CAT, as quais são a primeira linha de defesa enzimática a fim de anular os efeitos nocivos dos radicais livres (Inal et al., 2001). A diminuição da atividade de SOD e CAT no fígado dos animais expostos ao arsênio no DPN 82 poderia estar relacionada ao consumo dessas enzimas na conversão dos radicais superóxido e peróxido de hidrogênio. Durante a exposição repetitiva a agentes tóxicos, os níveis de enzimas antioxidantes são geralmente reduzidos em consequência do aumento na produção e acúmulo de O_2 , os quais exaltam o consumo enzimático no órgão (Novaes et al., 2012). Além disso, a perturbação nos níveis de elementos traços poderia modificar a expressão e síntese das enzimas antioxidantes requeridas para a manutenção do equilíbrio redox e impedir a iniciação do estresse oxidativo (Molin et al., 2008).

A avaliação dos níveis das transaminases tem sido utilizada como um bom indicativo do dano nos hepatócitos. Durante a injúria, a perda da permeabilidade da membrana dos hepatócitos possibilita a liberação dessas enzimas para a circulação (Novaes et al., 2012). Nós não observamos alterações nas concentrações séricas de transaminases nos ratos em ambas às idades o que poderia sugerir que a exposição do arsênio não foi capaz de intensificar alterações nos níveis séricos de enzimas relacionadas à função hepática. Souza et al. (2018) também não observaram alterações nas concentrações de transaminases em ratos Wistar adultos expostos ao arsenito de sódio durante 56 dias.

Embora o arsênio não tenha induzido alterações na proporção de macrófagos imediatamente após o período de exposição, o metaloide foi apto a provocar o aumento na proporção de macrófagos no parênquima hepático mesmo após 30 dias após o término do período de tratamento. No presente estudo, o aumento na proporção de macrófagos observados pode ter sido modulado pelo aumento das espécies reativas geradas uma vez que houve uma redução da atividade das enzimas SOD e CAT no fígado de ratos adultos. Resultados similares são observados em animais adultos expostos ao arsênio (Souza et al., 2018).

No presente estudo, à exposição ao arsênio também afetou o metabolismo do glicogênio nos animais púberes, potencializando a redução do armazenamento de glicogênio nos hepatócitos. Um estudo examinou os efeitos da exposição crônica ao arsênio inorgânico em níveis ambientalmente relevantes (Huang et al. 2015). Este estudo descobriu que a exposição ao arsenito na água de beber por 6 semanas diminuiu o conteúdo de glicogênio hepático em camundongos. A inibição da sinalização da insulina (isto é, resistência à insulina) é provavelmente responsável pela desregulação do metabolismo do glicogênio em hepatócitos expostos ao arsenito de sódio (Zhang et al., 2017). Souza et al (2018b) também observaram redução no conteúdo de glicogênio no hepatócitos de ratos adultos expostos ao arsênio durante 40 dias. Tomados em conjuntos, esses resultados sugerem que os efeitos do arsênio no metabolismo de carboidratos em animais púberes expostos durante a pré-puberdade são prejudicados de maneira similar aos observados em animais adultos.

Nossos resultados mostraram que embora tenha sido observado acúmulo do metaloide no fígado e rins 24 h após o período de intoxicação, estes órgãos não apresentaram danos evidentes na sua microarquitetura em nenhuma das idades analisadas. Samelo et al. (2020) não observaram alterações na histoarquitetura renal em animais expostos ao arsenito de sódio durante DPN 21 até DPN 51. Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que embora o arsênio cause alterações em parâmetros renais e hepáticos, o período de exposição não foi capaz de induzir mudanças teciduais nos órgãos estudados nem em ratos púberes nem em adultos.

Conclusão

Os resultados apresentados em nosso estudo mostraram que a exposição ao arsênio durante a pré-puberdade pode perturbar diferentemente o equilíbrio de microminerais e o sistema de defesa antioxidante no fígado e nos rins de animais púberes e, mesmo após o período de recuperação, em adultos. Essas mudanças, por sua vez, podem ter contribuído para alterações na proporção dos macrófagos e inclusões glicogênicas no hepatócito sem alterar a histologia do tecido. É preciso enfatizar que o presente estudo foi o primeiro a empenhar-se a compreender o modo pelo qual o arsênio interage com os microminerais e induz alterações no sistema de defesa antioxidante em jovens e adultos expostos durante o período pré-púbere do desenvolvimento. Ademais, é necessário que mais estudos visando compreender o mecanismo pelo qual a exposição pré-púbere afeta a dinâmica hepática e renal sejam realizados.

Referências

- Adil M, Kandhare AD, Visnagri A, Bodhankar SL (2015) Naringin ameliorates sodium arsenite-induced renal and hepatic toxicity in rats: decisive role of KIM-1, Caspase-3, TGF- β , and TNF- α . *Ren Fail.* 37(8):1396-407.
- AdilM, Kandhare AD, Visnagri A, Bodhankar SL (2015) Naringin ameliorates sodium arsenite-induced renal and hepatic toxicity in rats: decisive role of KIM-1, caspase-3, TGF- β , and TNF- α . *Ren Fail* 37:1396–1407.
- Aebi H (1984) Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Albores A, Koropatnick J, Cherian MG, Zelazowski AJ (1992) Arsenic induces and enhances rat hepatic metallothionein production in vivo. *Chem Biol Interact* 85:127–140.
- Baker BA, Cassano VA, Murray C (2018) Arsenic exposure, assessment, toxicity, diagnosis, and management: guidance for occupational and environmental physicians. *J Occup Environ Med.* ;60:e634-e639.
- Barra CM, Santelli RE, Abraão JJ, Guardia M de la (2000) Especificação de Arsênio-Uma revisão. *Química Nova.* 23, 58-70.
- Benzer F, Kandemir FM, Kucukler S et al (2018) Chemoprotective effects of curcumin on doxorubicin-induced nephrotoxicity in Wistar rats: by modulating inflammatory cytokines, apoptosis, oxidative stress and oxidative DNA damage. *Arch Physiol Biochem* 0:1–10.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Brunati AM, Pagano MA, Bindoli A, Rigobello MP (2010) Thiol redox systems and protein kinases in hepatic stellate cell regulatory processes. *Free Radic Res.*
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52:302-10.

Chandana EP, Jayasumana C, De Silva PM (2015) Arsenic and human health effects: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40, 828–846.

Chen BW, Hua N, Lu ML, Le XC (2009) Metabolism, toxicity, and biomonitoring of arsenic species. *Prog Chem.* 21:474-82.

Couto-Santos F, Souza ACF, Bastos DSS, Ervilha LOG, Dias FCR, Araújo LS, Guimarães SEF, Oliveira LL, Machado-Neves M (2020) Prepubertal exposure to arsenic alters male reproductive parameters in pubertal and adult rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 27;115304.doi:10.1016/j.taap.2020.115304. Online ahead of print.

Figueiredo BR, Borba RT, Angelica RS (2007) Arsenic occurrence in Brazil and human exposure. *Environ. Geochem. Health.* 29, 109-1.

Flora SJS (2015) Arsenic: chemistry, occurrence, and exposure. In: Flora SJS (ed) *Handbook of arsenic toxicology*. Academic, Cambridge, pp 1–49.

Fowler BA (1994) Nutritional and toxicological aspects of arsenic intake: an overview. In: Merts W, Abernathy CO, Olin SS., eds. *Risk assessment of essential elements*. Washington: ILSI Press. p.269-272.

Fraga CG (2005) Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Mol Asp Med* 26:235–244.

Ganger R, Garla R, Mohanty BP, Bansal MP, Garg ML (2016) Protective effects of zinc against acute arsenic toxicity by regulating antioxidant defense system and cumulative metallothionein expression. *Biol Trace Elem Res* 169:218–229.

Gonçalves RV, Novaes RD, Leite JP, Vilela EF, Cupertino MC, Nunes LG, Matta SL (2012) Hepatoprotective effect of *Bathysa cuspidata* in a murine model of severe toxic liver injury. *Int J Exp Pathol.* 93(5):370-6.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases (1974) The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 249(22):7130-9.

Huang CF, Yang CY, Chan DC, Wang CC, Huang KH, Wu CC, Tsai KS, Yang RS, Liu SH (2015) Arsenic exposure and glucose intolerance/ insulin resistance in estrogen-deficient female mice. *Environ Health Perspect* 123:1138–1144.

Inal ME, Kanbak G, Sunal E (2001) Antioxidant enzymes activities and malonaldehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta* 305:75–80.

Johnson L, Ing NH, Curley KO, Graham J, Welsh TH, Staub C (2015) Anatomy and physiology of the male reproductive system and potential targets of toxicants. *Compr Toxicol.* 4:2-63.

Jomova K., et al. (2011) Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J. Appl. Toxicol.* 31:95-07.

Kandemir FM, Yildirim S, Kucukler S et al (2018) Therapeutic efficacy of zingerone against vancomycin-induced oxidative stress, inflammation, apoptosis and aquaporin 1 permeability in rat kidney. *Biomed Pharmacother* 105:981–991.

Kharroub W, Dhibi M, Haouas Z, et al. (2014) Effects of sodium arsenate exposure on liver fatty acid profiles and oxidative stress in rats. *Environ Sci Pollut Res.* 21, 1648–1657.

Kotyzová D, Bludovská M, Eybl V (2013) Differential influences of various arsenic compounds on antioxidant defense system in liver and kidney of rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 36(3):1015-21.

Liao XY, Chen TB, Xie H, Liu YR (2005) Soil As contamination and its risk assessment in areas near the industrial districts of Chenzhou City, southern China. *Environ Int.* 31(6):791-798.

Lima G.D.A, Sertorio M.N., Souza A.C.F., Menezes T.P, Mouro V.G.R., Gonçalves N.M., Oliveira J.M., Henry M., Neves M.M., (2018) Fertility in male rats: Disentangling adverse effects of arsenic compounds. *Reprod. Toxicol.* 78, 130-140.

Lu C, Zhao F, Sun D, Zhong Y, Yu X, Li G, Lv, X, Sun G, Jin Y (2014) Comparison of speciated arsenic levels in the liver and brain of mice between arsenate and arsenite exposure at the early life. *Environ. Toxicol*, 29: 797-803.

Madden EF, Fowler BA (2000) Mechanisms of nephrotoxicity from metal combinations: a review. *Drug Chem Toxicol* 23:1–12.

Mandarim-de-Lacerda CA (2003) Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 75:469–486.

Molin Y, Frisk P, Ilback NG (2008) Sequential effects of daily arsenic trioxide treatment on essential and nonessential trace elements in tissues in mice. *Anti-Cancer Drugs* 19:812–818.

Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Yamamoto T (2004) Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc* 37:16–28.

Novaes RD, Gonçalves RV, Marques DC, Cupertino Mdo C, Peluzio Mdo C, Leite JP, Maldonado IR (2012) Effect of bark extract of *Bathysa cuspidata* on hepatic oxidative damage and blood glucose kinetics in rats exposed to paraquat. *Toxicol Pathol.* 40(1):62-70.

Orloff K, Mistry K, Metcalf S (2009) Biomonitoring for environmental exposures to arsenic. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.* 12, 509–524.

Perobelli J (2014) The male peripubertal phase as a developmental window for reproductive toxicology studies. *Curr. Pharm. Des.* 20, 5398- 5415.

Ratnaike RN (2003) Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgrad Med J* 79:391–396.

Roussel RR, Barchowsky A (2000) Arsenic inhibits NF- κ B mediated gene transcription by blocking I κ B kinase activity and I κ B α phosphorylation and degradation. *Arch Biochem Biophys* 377:204–212.

Ruiz-Ramos R, Lopez-Carrillo L, Rios-Perez AD et al (2009) Sodium arsenite induces ROS generation, DNA oxidative damage, HO-1 and c-Myc proteins, NF- κ B activation and cell proliferation in human breast cancer MCF-7 cells. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* 674:109–115.

Samelo RR, da Cunha de Medeiros P, de Carvalho Cavalcante DN, Aranha MLG, Duarte FA, de Castro ÍB, Ribeiro DA, Perobelli JE (2020) Low concentrations of sodium arsenite induce hepatotoxicity in prepubertal male rats. *Environ Toxicol.* 35(5):553-560.

Sarban S, Kocyigit A, Yazar M, Isikan UE (2005) Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Biochem.* 38(11):981-6.

Souza ACF, Bastos DSS, Santos FC, Sertorio MN, Ervilha LOG, Gonçalves RV, de Oliveira LL, Machado-Neves M (2018b) Arsenic aggravates oxidative stress causing hepatic alterations and inflammation in diabetic rats. *Life Sci.* 15;209:472-480.

Souza ACF, Marchesi SC, de Almeida Lima GD, Machado-Neves M (2018) Effects of Arsenic Compounds on Microminerals Content and Antioxidant Enzyme Activities in Rat Liver. *Biol Trace Elem Res.* 183(2):305-313.

Turk E, Kandemir FM, Yildirim S. et al. (2019) Protective Effect of Hesperidin on Sodium Arsenite-Induced Nephrotoxicity and Hepatotoxicity in Rats. *Biol Trace Elem Res* 189: 95–108.

Vahter M (1981) Biotransformation of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice and rats. *Environ Res.* 25:286–293.

Vahter M (2002) Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology.* 27;181-182:211-7.

WHO (2011) *Guidelines for Drinking-water Quality*. Geneva: World Health Organization.

Zhang C, Fennel EMJ, Douillet C, Stýblo M. Exposures to arsenite and methylarsonite produce insulin resistance and impair insulin-dependent glycogen metabolism in hepatocytes. *Arch Toxicol.* 91(12):3811-3821.

Zwolak I, Zaporowska H (2012) Selenium interactions and toxicity: areview. *Cell Biol Toxicol* 28:31–46.

Material Suplementar
Tabela Suplementar 1. Valores de p ANOVA

Parâmetros	Two-way ANOVA		
	Efeito da idade	Efeito tratamento	Interação
Peso fígado (g)	0.0001	0.0363	0.3033
Índice somático fígado (%)	0.0001	0.0015	0.0168
Edema fígado (mL/g)	0.5098	0.1239	0.1197
Peso fígado (g)	0.0001	0.2300	0.6717
Índice somático rim (%)	0.0001	0.4610	0.0572
Edema rim (mL/g)	0.0001	0.0312	0.0403
TGO (U/L)	0.0001	0.5351	0.6755
TGP (U/L)	0.0086	0.5386	0.4362
ALP (U/L)	0.0001	0.2381	0.7981
Ureia (mg/dL)	0.0604	0.0121	0.7765
Creatinina (mg/dL)	0.8694	0.3468	0.0846
Billirubina (mg/dL)	0.1682	0.7765	0.7765
Citoplasma (%)	0.1108	0.8197	0.0255
Núcleo (%)	0.0322	0.0097	0.5727
Hepatócito (%)	0.3438	0.5988	0.0574
Capilar sinusoide (%)	0.1853	0.1344	0.0468
Vaso sanguíneo (%)	0.9557	0.0724	0.5978
Macrófago (%)	0.6278	0.0015	0.0312
Glicogênio (%)	0.0001	0.0271	0.0158
Infiltrado inflamatório (%)	0.1098	0.9766	0.0114
Volume glomerular 10 ⁴ (mm ³)	0.0001	0.8836	0.0850
Glomérulo / mm ²	0.1751	0.0167	0.9163
Glycogen (%)	0.7016	0.8600	0.2646
SOD fígado	0.0079	0.0134	0.0158
CAT fígado	0.1606	0.0229	0.1516
GST fígado	0.5201	0.3649	0.7936
PC fígado	0.5238	0.6957	0.3206
MDA fígado	0.0368	0.2315	0.3020
NO fígado	0.1330	0.6650	0.4274
SOD rim	0.2589	0.9565	0.4552
CAT rim	0.0432	0.3874	0.0676

Tabela Suplementar 1 - Continuação. Valores de p ANOVA

Parametros	Two-way ANOVA		
	Efeito da idade	Efeito tratamento	Interação
GST rim	0.0897	0.1157	0.0566
PC rim	0.2885	0.5580	0.2536
MDA rim	0.3822	0.0549	0.0113
NO rim	0.2021	0.1483	0.1563
Mn fígado	0.1458	0.4739	0.6311
Zn fígado	0.2434	0.1064	0.0128
Cu fígado	0.0170	0.0001	0.0008
Zn fígado	0.0819	0.0361	0.7590
As fígado	0.2056	0.0186	0.4184
Se fígado	0.1931	0.0673	0.8182
Mn fígado	0.9163	0.7470	0.0410
Fe fígado	0.4928	0.0878	0.2619
Cu fígado	0.7837	0.1690	0.6914
Zn fígado	0.7112	0.8826	0.7782
As fígado	0.6613	0.0096	0.8685
Se fígado	0.9688	0.0010	0.7659

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados deste trabalho indicam que o arsênio afeta diferentemente os parâmetros reprodutivos, hepáticos e renais de ratos Wistar púberes e adultos, os quais foram expostos durante a pré-puberdade.

O arsênio aumentou a expressão de genes relacionados com a atividade antioxidante no testículo e epidídimo, alterou CAT e conseqüentemente, induziu a produção dos subprodutos do estresse oxidativo nos ratos púberes. A exposição ao arsênio não alterou a expressão de genes antioxidantes, porém, a atividade de enzimática dessas proteínas foi modificada nos animais adultos. Conseqüentemente, alterações histológicas foram observadas no testículo e epididimo de ratos em ambas as idades. Curiosamente, apenas ratos adultos exibiram redução nos níveis de testosterona sérica. Além disso, o arsênio foi capaz de reduzir à produção espermática diária, o número de espermátides testiculares, a contagem de espermatozoides no epididimo, a motilidade espermática, a porcentagem de espermatozoides com membranas intactas o que potencialmente contribuiu para o baixo potencial de fertilidade e o aumento de perdas pré-implantação. Em nosso estudo, das 26 proteínas fosforiladas encontradas, MIEAP apresentou padrão de fosforilação apenas em animais expostos a arsênio.

Em relação ao fígado e rins, nossos resultados mostraram que a exposição pré-púbere ao arsênio reduziu o conteúdo de glicogênio e zinco e aumentou a proporção de arsênio no fígado e nos rins de animais púberes. Além disso, o arsênio aumentou o volume de macrófagos e cobre no fígado e reduziu a atividade de SOD e CAT no órgão. No rim, a proporção de selênio reduziu nos animais adultos expostos ao arsênio.

Tomados em conjunto, os resultados apresentados nesta tese sugerem que os efeitos da contaminação da água potável pelo arsênio merecem atenção visto que a exposição ao metaloide pode causar complicações na funcionalidade dos órgãos e desequilíbrio dos sistemas corporais em diferentes fases da vida mesmo após a interrupção do contato com esse elemento químico. Dessa maneira, mais estudos são necessários para melhor elucidar o mecanismo de ação do arsênio em animais púberes e adultos expostos durante a prepuberdade, além das influências deste metaloide na fertilidade, e nas funções hepáticas e renais destes animais.