

**JESYLAINÉ OLIVEIRA CUNHA ARAÚJO**

**EFEITOS DA INGESTÃO SUBCRÔNICA DE ARSÊNIO SOBRE OS  
TESTÍCULOS DE CAMUNDONGOS ADULTOS**

Dissertação 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  
*Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2011**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A663e  
2011

Araújo, Jesylaine Oliveira Cunha, 1984-  
Efeitos da ingestão subcrônica de arsênio sobre os testículos  
de camundongos adultos / Jesylaine Oliveira Cunha Araújo.  
– Viçosa, MG, 2011.  
xi, 57f. ; 29cm.

Orientador: Juraci Alves de Oliveira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Camundongo - Reprodução. 2. Camundongo como animal  
de laboratório. 3. Camundongo - Testículos. 4. Arsênio.  
5. Espermatogênese em animais. 6. Toxicologia ambiental.  
7. Testículos. 8. Leydig, Células de. I. Universidade Federal de  
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 599.353

**JESYLAINÉ OLIVEIRA CUNHA ARAÚJO**

**EFEITOS DA INGESTÃO SUBCRÔNICA DE ARSÊNIO SOBRE OS  
TESTÍCULOS DE CAMUNDONGOS ADULTOS**

Dissertação 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  
*Magister Scientiae*.

APROVADA: 17 de outubro de 2011

---

Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta

---

Prof. João Bosco Gonçalves de Barros

---

Prof. Juraci Alves de Oliveira  
(Orientador)

*“O Senhor é o meu rochedo, e o meu lugar forte, e o meu libertador; o meu Deus,  
a minha fortaleza, em quem confio; o meu escudo, a fortaleza da minha salvação,  
e o meu alto refúgio.”*

*(Salmos 18:2)*

## Agradecimentos

A Deus:

“Eu te louvarei, porque de um modo terrível, e tão maravilhoso fui formado; maravilhosas são as tuas obras, e a minha alma o sabe muito bem.” (Salmos 139:14)

À minha princesa Rebeca, única, linda e perfeita! Por alegrar todos os meus dias e fazer-me conhecer o imensurável prazer de ser mãe.

Ao meu esposo, amado, por ser também meu companheiro e amigo. Por todo o amor que dedica a mim. Amo você, pra sempre!

À minha mãe, pela dedicação à minha educação, pelo amor, por sempre torcer por mim e vibrar a cada vitória.

À minha querida irmã Jesyane, por cuidar de mim como uma mãe, pelos conselhos e preocupação sempre.

À querida sobrinha Rayanne, pela ajuda durante o tratamento dos animais e alguns procedimentos para análises (e, que ajuda!). Nanny, você foi fundamental e... vai, nem foi tão dolorosa a “escravidão a qual se submeteu nos laboratórios”! rrsrs... Love u!

À minha família amada, distante, mas não ausente, por todo o incentivo e amor.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, por possibilitar meu aprendizado.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Beth, querida, pela atenção e disposição em ajudar.

À querida amiga Ana Paula de Lima Florentino Matta, pela maneira carinhosa com que sempre se portou a mim. Por toda atenção e paciência, pela ajuda grandiosa no experimento e análises. Será sempre um exemplo de amizade.

Ao querido orientador Juraci Alves de Oliveira, pelo carinho com que me acolheu como sua orientada. Obrigada pela paciência e calma ao transmitir seus conhecimentos e por todo o auxílio na conclusão desta dissertação. Agradeço por ter feito do período de mestrado uma lembrança boa.

Ao meu querido professor Sérgio Luis Pinto da Matta, pela atenção durante os vários anos na UFV. Pelos ensinamentos e sugestões. Será sempre uma pessoa que admirarei com muito carinho.

Ao prezado professor João Bosco Gonçalves de Barros, por sua participação na banca, pelas correções e considerações que certamente contribuirão para este trabalho.

À professora Juliana Silva Rocha, querida, por ter aceitado o convite para co-orientação. Pelo ensino durante o curso. Ju, você é um exemplo de disciplina e dedicação à profissão, um espelho pra mim.

Aos amigos do laboratório: Ana Paula, Danielle, Marli, Alex, Kenner, Suellen, Daiane, Kyvia, Maytê, e tantas outras pessoas que transitam diariamente por lá, pela amizade, boa convivência e colaboração no experimento.

À Bruna Moraes Araújo, pela ajuda imensa nas análises bioquímicas. Muito obrigada pela disposição e companhia, você foi muito importante!

Ao funcionário do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV, Juliano Souza Cardoso, pela ajuda na obtenção dos animais para o experimento, pela boa vontade e simpatia.

Ao professor Antônio José Natali, por disponibilizar o espaço para tratamento dos animais junto ao biotério do Departamento de Educação Física.

À coordenação do Laboratório de Anatomia Vegetal por permitir a utilização do equipamento para captura das imagens.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa durante o período do curso.

Aos meus “bestest” e eternos amigos da graduação: Irving, Saulinho, Lora, Tica, Max, Aldo, Mari e Mandica. Como sinto falta de vocês! Dos nossos encontros para comilanças, sessões fotográficas, para ver filme, jogar Imagem e Ação e War... ai, coração até dói! Vocês são parte da minha vida e serão sempre lembrados! Love you!

Aos amados irmãos da igreja Cristã Maranata: Michele, Claudiano, Augusto, Grasi, Paulo, Rithiely, Rita Pereira e outros tantos. Obrigada pela amizade sincera, por estarem presentes na minha caminhada. Agradeço pelas orações, certamente elas foram meu sustento durante todo o tempo em Viçosa. “... há amigo mais chegado do que um irmão.” (Provérbios 18:24)

*“... e eu bendisse o Altíssimo, e louvei, e glorifiquei ao que vive para sempre, cujo domínio é sempiterno, e cujo reino é de geração em geração.”*  
*(Daniel 4:34)*

## Sumário

<b>Resumo</b> .....	<b>viii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>x</b>
<b>1. Introdução geral</b> .....	<b>1</b>
1.1. Arsênio .....	1
1.2. Processos oxidativos .....	3
1.3. Sistemas antioxidantes .....	3
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>6</b>
<b>3. Referências bibliográficas</b> .....	<b>7</b>

### Capítulo I

Avaliação da biometria corporal reprodutiva e da morfometria do compartimento tubular em testículos de camundongos adultos expostos à ingestão subcrônica de arsênio

Resumo.....	12
1. Introdução .....	13
2. Material e métodos .....	15
2.1. Animais, grupos experimentais e tratamentos.....	15
2.2. Coleta de amostras .....	15
2.3. Biometria corporal e testicular .....	16
2.3.1. Índice gonadossomático.....	16
2.4. Análises morfométricas do compartimento tubular do testículo.....	16
2.4.1. Proporção volumétrica e volume dos componentes do testículo .....	16
2.4.2. Índice tubulossomático .....	17
2.4.3. Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero .....	17
2.4.4. Comprimento total dos túbulos seminíferos e comprimento total dos túbulos seminíferos por grama de testículo.....	18
2.5. Análises estatísticas.....	18
3. Resultados .....	19
4. Discussão.....	22
5. Conclusões .....	27
6. Referências.....	28

## **Capítulo II**

Efeitos da ingestão subcrônica de arsênio sobre o compartimento intertubular e a atividade enzimática da dismutase do superóxido e catalase de testículos de camundongos adultos

Resumo.....	35
1. Introdução .....	36
2. Material e métodos.....	37
2.1. Animais, grupos experimentais e tratamentos.....	37
2.2. Coleta de amostras .....	38
2.3. Análises morfológicas do compartimento intertubular do testículo .....	38
2.3.1. Cálculo da proporção volumétrica e do volume dos elementos do intertúbulo .....	38
2.3.2. Morfometria da célula de Leydig.....	39
2.4. Análises bioquímicas .....	41
2.4.1. Obtenção das amostras de tecidos para leitura das atividades enzimáticas .....	41
2.4.2. Determinação da atividade enzimática da proteína catalase no testículo.....	41
2.4.3. Determinação da atividade da proteína dismutase do superóxido no testículo.....	41
2.4.4. Dosagem de proteínas .....	42
2.5. Análises estatísticas.....	43
3. Resultados .....	43
4. Discussão.....	47
5. Conclusões .....	51
6. Referências.....	52
 <b>Conclusões gerais .....</b>	 <b>57</b>

## Resumo

ARAÚJO, Jesylaine Oliveira Cunha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2011. **Efeitos da ingestão subcrônica de arsênio sobre os testículos de camundongos adultos.** Orientador: Juraci Alves de Oliveira. Co-Orientadora: Juliana Silva Rocha.

A toxicidade de um agente químico depende de sua propensão inerente de produzir danos ao sistema biológico com o qual interage. O arsênio (As), um conhecido poluente ambiental, merece destaque como elemento potencialmente tóxico para a função reprodutiva masculina. A exposição ao As pode afetar o testículo, resultando em efeitos adversos na reprodução, e várias evidências indicam que sua ação tóxica está relacionada ao estresse oxidativo. Com o objetivo de avaliar os efeitos do As sobre os testículos de camundongos adultos, os indicadores: biometria corporal, compartimentos tubular e intertubular e atividade enzimática antioxidante da catalase (CAT) e da dismutase do superóxido (SOD) foram analisados após exposição dos indivíduos a diferentes doses de As. Trinta camundongos suíços adultos foram divididos em três grupos: um grupo controle que recebeu água potável, e dois outros que receberam solução de arsênio nas concentrações de 0,05 (As1) e 1,0 (As2) mg/L, oralmente. O tratamento em ambas as concentrações de arsênio não interferiu de forma significativa na maioria dos parâmetros referentes à biometria corporal e à morfometria tubular. Observou-se aumento na massa dos rins dos animais do grupo As2, sugerindo possível toxicidade neste órgão e maior atividade do mesmo no processo de desintoxicação; houve diminuição da proporção volumétrica da túnica própria e epitélio seminífero e aumento da proporção do lúmen dos animais do grupo As2, indicando possíveis efeitos adversos na espermatogênese, contudo, alterações significativas nas medidas do diâmetro tubular e do epitélio seminífero que confirmassem tais efeitos não foram observadas. No compartimento intertubular, ambas as concentrações de As promoveram redução no volume e diâmetro nucleares das células de Leydig e aumento nas proporções de vasos linfáticos. No entanto, apenas a maior concentração (As2) causou diminuição do volume de células de Leydig no intertúbulo e de sua relação nucleoplasmática. Com relação às defesas antioxidantes enzimáticas, aumento da SOD e diminuição da CAT, sugere-se que há produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentada concomitantemente a uma diminuição de defesa antioxidante de CAT, ocasionando estresse oxidativo. Os dados apresentados indicam que ingestão subcrônica de As provoca alterações nas defesas enzimáticas do testículo e afeta sua porção endócrina sem, no

entanto, promover modificações relevantes na histologia do compartimento tubular que indiquem mudanças na atividade espermatogênica.

## Abstract

ARAÚJO, Jesylaine Oliveira Cunha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2011. **Effects of arsenic subchronic ingestion on the testes of adult mice.** Adviser: Juraci Alves de Oliveira. Co-Adviser: Juliana Silva Rocha.

The toxicity of a chemical agent depends on its inherent propensity to produce damage to the biological system with which it interacts. Arsenic (As), a well known environmental pollutant, outstands as potentially toxic element to the male reproductive function. The exposure to As can affect the testicle, resulting in adverse effects on reproduction; several evidences indicate that its toxic action is related to oxidative stress. In order to evaluate the effects of As on the testes of adult mice, the indicators: body biometrics, tubular and intertubular compartments and antioxidant enzymatic activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) were analyzed after exposure of individuals to different doses of As. Thirty Swiss adult mice at reproductive age were divided in three groups: a control group, which received drinking water, and two others, which received arsenic solution in the concentrations of 0.05 (As1) and 1.0 (As2) mg/L orally. The treatment with both arsenic concentrations did not significantly interfere in most parameters related to the body biometrics and tubular morphometry. There was increase in the mass of kidneys of animals who ingested the highest concentration of As, suggesting possible toxicity in this organ and his increased activity in the process of detoxification; decrease in the proportion of the tunica propria volume and seminiferous epithelium, and increase in the proportion of the lumen in the animals from group As2 were also observed, indicating possible adverse effects on the spermatogenesis, however, significant changes in the tubular diameter and seminiferous epithelium measurements that confirmed these effects were not observed. In the intertubular compartment, both concentrations of As promoted a reduction in the volume and nuclear diameter of Leydig cells and increase in the proportions of lymphatic vessels. However, only the highest concentration (As2) caused decrease of volume of Leydig cell in the intertubular tissue and its relationship nucleoplasmatic. With respect to the enzymatic antioxidant defenses, increased SOD and decrease in the CAT were observed, suggesting a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production increase concomitantly with the reduction of the antioxidant defense of CAT, causing oxidative stress. The data indicate that subchronic ingestion of As can causes alterations in

enzymatic defenses of the testis and affect its endocrine portion without, however, promoting relevant modifications in the tubular compartment histology which would indicate changes in the spermatogenic activity.

## 1. Introdução Geral

### 1.1. Arsênio

O arsênio (As) é um semimetal (metalóide) presente na natureza numa variedade de formas químicas, incluindo espécies orgânicas e inorgânicas que ocorrem em dois diferentes estados de oxidação, +3 (arsenito) e +5 (arsenato), sob a forma de óxidos de As ou sais destes óxidos (De Sesso, 1998; Ghosh, 2008). No ambiente e sistemas biológicos, o As inorgânico é comumente encontrado na forma de arsenato pentavalente (Figueiredo et al., 2007; Lubin et al., 2007).

A toxicidade de diversas espécies de As decresce na seguinte ordem: compostos de  $As^{+3}$  inorgânico > compostos de  $As^{+5}$  inorgânico > compostos de  $As^{+3}$  orgânico > compostos de  $As^{+5}$  orgânico (USEPA, 2001; Ghosh, 2008; Flora, 2011), sendo as formas inorgânicas cerca de 100 vezes mais tóxicas que as formas orgânicas (Thompson, 1993).

A intoxicação por potenciais contaminantes, como o As, pode resultar em efeitos tóxicos, agudos, subcrônicos ou crônicos, relativos a exposições curtas, médias e longas, respectivamente, ocasionando diferentes patologias (Russell et al., 1990; Jana et al., 2006)

Segundo Figueiredo et al. (2007), estudos integrados do ambiente e exposição humana ao As foram realizados em algumas áreas no Brasil (Quadrilátero Ferrífero – Minas Gerais, Vale do Ribeira – Paraná/São Paulo e Santana – Amapá) onde constatou-se grande quantidade deste elemento químico liberada para o ambiente devido a diversas causas, como: mineração de ouro, refino de metais, intemperismo de rochas e associação deste composto ao minério de manganês lavrado.

O Ministério da Saúde no Brasil considera o As uma substância química que representa potenciais risco à saúde humana, sugerindo sua concentração máxima em águas potáveis 0,01 mg/L (Ministério da Saúde, 2006), em conformidade com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011).

A Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (Agency for Toxic Substances and Diseases Registry - ATSDR), sediada nos Estados Unidos, considerou, em 2011, o As como elemento químico mais perigoso de sua Lista Prioritária de Substâncias Perigosas (Priority List of Hazardous Substances) (ATSDR, 2011), tornando-o merecedor de ampla atenção.

Enquanto exposição ao arsênio em níveis elevados é restrita a certas regiões do mundo, exposição a baixos níveis, mas potencialmente prejudiciais, é por vezes constante (crônica) (Celik et al., 2008). Essa exposição, associada à rápida industrialização e crescente urbanização, tem resultado em diversos efeitos tóxicos, com destaque para aqueles relacionados à reprodução masculina (Al-Attar, 2011).

Diversas pesquisas realizadas nos últimos anos têm revelado amplo espectro de ações tóxicas irreversíveis em nível celular e molecular no sistema reprodutor de humanos e animais experimentais (Kaur e Bansal, 2004; Al-Attar, 2011; Tiwari et al., 2011), sendo que a intensidade destes danos é proporcional à dose e à duração da exposição (cronicidade) aos agentes tóxicos (Al-Attar, 2011).

Arsênio inorgânico tem influência supressiva na espermatogênese e androgênese do sistema reprodutor masculino (Jana et al., 2006). A exposição de roedores ao arsenito de sódio levou à ocorrência de eventos patológicos na estrutura dos testículos (Neves et al., 2004) e desequilíbrio de hormônios relacionados à espermatogênese (diminuição da concentração de LH, FSH e testosterona plasmáticos e de testosterona testicular) (Jana et al., 2006). O arsenito tem efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutor de camundongos, acumulando-se nos testículos, vesícula seminal e glândula prostática, causando diminuição do peso testicular e desordens na motilidade do espermatozóide (Pant et al., 2004).

O arsênio inorgânico é rapidamente absorvido através do trato gastrointestinal e biotransformado no fígado e outros tecidos (Vahter, 1994; Holladay et al., 2006). O início da biotransformação depende das reações de oxirredução que interconvertem arsenato em arsenito, de modo não enzimático, com o emprego de glutatona reduzida como agente redutor (Aposhian et al., 1999). A redução de arsenato para arsenito pode ser mediada pela arsenato redutase e ocorre, principalmente, no fígado (Carvalho, 2009). Ainda neste órgão, o arsenito sofre metilação e é transformado em ácido metilarsônico (MMA) e ácido dimetilarsínico (DMA), que são excretados na urina (Naranmandura et al., 2007).

Processos de metilação e oxirredução são responsáveis pela biotransformação e excreção renal de mais de 75% do arsênio absorvido (Holladay et al., 2006; Carvalho, 2009), sendo este o caminho metabólico predominante para esse semimetal em humanos e na maioria dos animais de laboratório (Vahter, 1994).

A metilação do arsênio inorgânico pode ser considerada um mecanismo de desintoxicação, uma vez que metabólitos metilados finais são menos reativos às macromoléculas dos tecidos e mais facilmente eliminados por excreção renal (Deschamps

e Matschullat, 2007). No entanto, estudos evidenciam que metabólitos de arsênio podem contribuir para a carcinogenicidade ou toxicidade do semimetal (Goering, 1999; Naranmandura et al., 2007).

## **1.2. Processos oxidativos**

O estresse oxidativo, envolvido em diversos processos fisiológicos e patológicos nos organismos, é resultante, principalmente, da ação dos intermediários reativos de oxigênio (ROI's). A produção em excesso de ROI's gera o estresse e pode acarretar danos aos constituintes celulares próximos ao local de sua produção (Ames et al., 1993; Repine et al., 1997; Andrade Jr et al., 2005; Velloso et al., 2007).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação dos ROI's, porém, a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações em sua estrutura e permeabilidade. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (Ferreira e Matsubara, 1997). Células espermátogênicas podem ser suscetíveis ao estresse oxidativo por causa da sua alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados e baixa capacidade antioxidante (Vernet et al., 2004).

O malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, possui ação citotóxica e genotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas patologias associadas ao estresse oxidativo (Andrade Jr et al., 2005). Assim, pode ser utilizado como indicador da ação dos radicais livres no organismo (Ferreira e Matsubara, 1997; Antunes et al., 2008). A presença de ROI's no ambiente das células espermáticas representa um desequilíbrio entre a produção destas moléculas pela célula e a capacidade da célula de eliminá-las, podendo ser isso uma das razões para toxicidade reprodutiva masculina induzida por As (Vernet et al., 2004; Sainath, 2011).

Em um órgão como o testículo, com altas taxas de metabolismo e replicação celular, o estresse oxidativo pode ser especialmente danoso, sendo assim, é importante que esse órgão possua elevada capacidade antioxidante.

## **1.3. Sistemas antioxidantes**

Os antioxidantes são substâncias capazes de manter em equilíbrio os processos de formação de ROI's e, assim, retardar ou inibir processos oxidativos como, por exemplo, a lipoperoxidação (Atoui et al., 2005; Chun et al., 2005).

O desequilíbrio na formação de ROI's, resultante da ação de agentes tóxicos, aciona mecanismos de defesa celular que podem atuar de duas formas: i) como desintoxicadores do agente antes que ele cause lesão, sendo constituídos pela glutathiona reduzida (GSH), dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E; ii) como reparadores da lesão ocorrida, sendo constituídos pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px. Com exceção da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (Ross e Moldeus, 1991; Velloso et al., 2007).

O aumento da tolerância aos estresses pode estar fortemente relacionado ao aumento da atividade de sistemas antioxidantes, com elevação no nível de expressão de proteínas como CAT, SOD e glutathiona (Neto et al., 2008).

O sistema enzimático representa a primeira linha de defesa antioxidante endógena contra as espécies reativas de oxigênio. As principais enzimas antioxidantes nos mamíferos são SOD, CAT e GSH-Px, todas elas expressas nos testículos (Vernet et al., 2004; Turner e Lysiak, 2008).

A dismutase do superóxido (SOD) constitui a primeira enzima de defesa contra danos provocados pelos ROI's, uma vez que atua sobre o radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) convertendo-o em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ), utilizando  $2H^+$  (Figura 1) (White, 1993; Turner e Lysiak, 2008). O produto final da reação de dismutação,  $H_2O_2$ , é um metabólito extremamente deletério ao organismo. Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, é altamente tóxico para as células por possuir vida longa e ser capaz de atravessar camadas lipídicas, podendo reagir com membranas biológicas ou com proteínas ligadas ao íon  $Fe^{+2}$  (Ferreira e Matsubara, 1997).

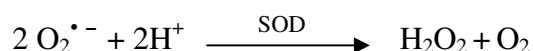


Figura 1 – Dismutação do radical superóxido por ação da dismutase do superóxido (SOD).

Se o peróxido de hidrogênio produzido pela dismutação da SOD não sofrer ação da CAT, que o transforma em O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (Figura 2), ele pode ser acrescido de um ânion superóxido (reação de Haber-Weiss) (Figura 3A) ou de um metal de transição (Reação de Fenton) (Figura 3B), formando o radical hidroxil (•OH).



Figura 2 – Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pela catalase (CAT).

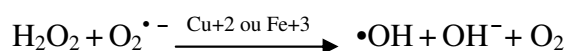


Figura 3A – Reação de Haber-Weiss.

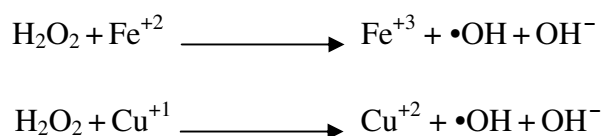


Figura 3B – Reação de Fenton.

O radical hidroxil é mais uma forma de ROI's e, apesar de seu baixo tempo de vida, é considerado o mais reativo radical conhecido. Em sistemas biológicos, o radical hidroxil apresenta capacidade de iniciar a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados das membranas, inativar várias proteínas ao oxidar seus grupos sulfídricos e inativar o DNA, ou causar mutação, pela modificação de suas bases nitrogenadas (Halliwell e Gutteridge, 1999; Velloso et al., 2007).

A catalase (hidroperoxidase) é uma enzima intracelular encontrada na maioria dos organismos, responsável por catalisar a transformação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em oxigênio e água (Turner e Lysiak, 2008; Glorieux et al., 2011) e se encontra, em grande parte, nos peroxissomos de animais e plantas (Halliwell e Gutteridge, 1999; Scandalios,

2002). Ela possui o mais elevado número de *turnover* ( $k_{cat}$ ) conhecido em enzimas: uma molécula de catalase pode catalisar a decomposição de até 40.000.000 moléculas de peróxido de hidrogênio por segundo, o que a torna uma enzima importante para a desintoxicação desta substância, sendo a principal reguladora dos níveis intracelulares de  $H_2O_2$  (Nelson e Cox, 2008).

## 2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivos:

1. Analisar os efeitos da administração oral de arsenato de sódio sobre os testículos de camundongos adultos avaliando, quantitativamente, através de análises morfométricas, possíveis alterações nas estruturas testiculares e suas prováveis implicações no processo espermatogênico;
2. Determinar a atividade das enzimas dismutase do superóxido e catalase nos testículos.

Com a finalidade de se observar a interação entre o testículo e a biometria corporal dos camundongos analisou-se as massas corporal e de órgãos relacionados à reprodução (epidídimos, ductos deferentes, vesícula seminal). Optou-se ainda por avaliar fígado e rins dos animais por se tratar de órgãos-chave no processo de desintoxicação e excreção das formas químicas do As.

Para cumprir estes propósitos foram empregadas técnicas histométricas aliadas a análises de imagem e bioquímicas. Os resultados obtidos foram divididos em duas secções, as quais serão apresentadas nos próximos capítulos.

### 3. Referências Bibliográficas

Al-Attar AM. 2011. Antioxidant effect of vitamin E treatment on some heavy metals-induced renal and testicular injuries in male mice. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18:63-72.

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90:7915-7922.

Andrade Jr DR, Souza RB, Santos AS, Andrade DR. 2005. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 38:60-68.

Antunes MV, Lazzaretti C, Gamaro GD, Linden R. 2008. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 44:279-287.

Aposhian HV, Zakharyan RA, Wildfang EK. 1999. How is Inorganic Arsenic Detoxified? In: Chappell WR, Albernaty CO, Calderon RI (Eds): *Arsenic Exposure and Health Effects*. Amsterdam: Elsevier 289-297.

Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. 2005. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry* 89:27-36.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. 2011. Priority List of Hazardous Substances. Disponível em: < <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/> >. Acesso em janeiro de 2012.

Carvalho FAR. Morfologia e morfometria testicular de camundongos adultos submetidos à exposição crônica ao arsenato. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Celik I, Gallicchio L, Boyd K, Lam TK, Matanoski G, Tao X, Shiels M, Hammond E, Chen L, Robinson KA, Caulfield LA, Herman JG, Guallar E, Alberg AJ. 2008. Arsenic in drinking water and lung cancer: A systematic review. *Environmental Research* 108:48-55.

Chun SS, Vatter DA, Lin YT, Shetty K. 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry* 40:809-816.

De Sesso JM. 1998. An assessment of the developmental toxicity of inorganic arsenic. *Reproductive Toxicology* 12:385-433.

Deschamps E, Matschullat J. 2007. Arsênio antropogênico e natural: um estudo em regiões do quadrilátero ferrífero. 1ª ed. Fundação Estadual do Meio Ambiente: Belo Horizonte. 330p.

Ferreira ALA, Matsubara LS. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira* 43:61-68.

Figueiredo BR, Borba RP, Angélica RS. 2007. Arsenic occurrence in Brazil and human exposure. *Environmental Geochemistry and Health* 29:109-118.

Flora SJS. 2011. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radical Biology and Medicine* 51:257-281.

Ghosh P, Banerjee M, Giri AK, Ray K. 2008. Toxicogenomics of arsenic: Classical ideas and recent advances. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 659:293-301.

Glorieux C, Dejeans N, Sid B, Beck R, Calderon PB, Verrax J. 2011. Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and altered response to chemotherapy. *Biochemical Pharmacology* 82:1384-1390.

Goering PL, Aposhian HV, Mass MJ, Cebrián M, Beck BD, Waalkes MP. 1999. The enigma of arsenic carcinogenesis: role of metabolism. *Toxicological Sciences* 49:5-14.

Halliwell B, Gutteridge JCM. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. 3<sup>th</sup> ed. Oxford: Clarendon Press.

Holladay SD, Wang A, Wolf DC, Ahmed SA, Robertson JL. 2006. Reproductive and developmental toxicity of arsenic in rodents: A Review. *International Journal of Toxicology* 25:319-331.

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. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4:9.

Kaur P, Bansal MP. 2004. Effect of experimental oxidative stress on steroidogenesis and DNA damage in mouse testis. *Journal of Biomedical Science* 11:391-397.

Lubin JH, Freeman LEB, Cantor KP. 2007. Inorganic arsenic in drinking water: An evolving public. *Journal of the National Cancer Institute* 99:906-907.

Ministério da Saúde. 2006. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. Secretaria de Vigilância em Saúde: Brasília. 212 p.

Naranmandura H, Suzuki N, Iwata K, Hirano S, Suzuki KT. 2007. Arsenic metabolism and thioarsenicals in hamsters and rats. *Chemical Research in Toxicology* 20:616-624.

Nelson DL, Cox MM. 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry* .5<sup>th</sup> ed. New York: W. H. Freeman and Company. 1100 p.

Neto JMFA, Silva LP, Macedo DV. 2008. Proteínas de estresse “hsp70” atuam como marcadoras de estresse oxidativo em ratos “wistar” submetidos a treinamento intermitente de corrida para indução de overreaching. *Brazilian Journal of Biomotricity* 2:160-175.

Neves RNP, Carvalho F, Carvalho M, Fernandes E, Soares E, Bastos ML, Pereira ML. 2004. Protective activity of hesperidin and lipoic acid against sodium arsenite acute toxicity in mice. *Toxicologic Pathology* 32:527-535.

Pant N, Murthy RC, Srivastava SP. 2004. Male reproductive toxicity of sodium arsenite in mice. *Human and Experimental Toxicology* 23:399-403.

Repine JE, Bast A, Lankhorst I. 1997. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine* 156:341-357.

Ross D, Moldeus P. 1991. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: Vigopelfrey C (Ed): *Membrane Lipid Oxidation*. 1<sup>th</sup> ed. Boca Raton: CRC Press 151-170.

Russell LD, Ettlín RA, SinhaHikim AP, Clegg ED. 1990. Histopathologic Evaluation of the Testis in Toxicologic Testing and Risk Assessment. In: Russell LD, Ettlín RA, SinhaHikim AP, Clegg ED (Eds): *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Clearwater: Cache River Press 267-268.

Sainath SB, Meena R, Supriya CH, Reddy KP, Reddy PS. 2011. Protective role of *Centella asiatica* on lead-induced oxidative stress and suppressed reproductive health in male rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 32:146-154.

Scandalios JG. 2002. The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences* 27:483-486.

Thompson DJ. 1993. A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals. *Chemico-Biological Interactions* 88:89-114.

Tiwari AK, Pragya P, Ram KR, Chowdhuri DK. 2011. Environmental chemical mediated male reproductive toxicity: *Drosophila melanogaster* as an alternate animal model. *Theriogenology* 76:197-216.

Turner TT, Lysiak JJ. 2008. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *Journal of Andrology* 29:488-498.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. 2001. National Primary Drinking Water Regulations; Arsenic and Classifications to Compliance and New Source Contaminants Monitoring; Final Rule. *Federal Register* 66:6976-7066.

Vahter M. 1994. Species differences in the metabolism of arsenic compounds. *Applied Organometallic Chemistry* 8:175-182.

Velloso JCR, Barbosa VF, Oliveira OMM de F. 2007. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. *Revista Eletrônica de Farmácia, UNESP (IV)* 2:119-130.

Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR. 2004. Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 216:31-39.

White CW. 1993. Expression of manganese superoxide dismutase is not altered in transgenic mice with elevated level of copper-zinc superoxide dismutase. *Free Radical Biology and Medicine* 15:629-636.

WHO - World Health Organization. 2011. Guidelines for drinking-water quality [electronic resource]: incorporating first addendum. 4<sup>th</sup> ed. Geneva 315-318.

## Capítulo I

### *Avaliação da biometria corporal reprodutiva e da morfometria do compartimento tubular em testículos de camundongos adultos expostos à ingestão subcrônica de arsênio*

#### **Resumo**

O arsênio (As) é um dos principais poluentes de águas naturais e um carcinógeno humano conhecido, tendo múltiplos efeitos nos seres vivos. As rotas mais importantes de contaminação de animais são através da ingestão de alimentos e de água contaminados. Compostos de As atuam sobre o sistema reprodutor masculino, com ação supressiva na espermatogênese e androgênese, podendo levar a desordens patológicas na estrutura dos testículos. O objetivo do trabalho foi avaliar se a exposição subcrônica a baixas doses de As tem influência sobre a biometria corporal e sobre o compartimento tubular de testículos de camundongos adultos. Trinta animais foram divididos em três grupos: um grupo controle que recebeu água potável, e dois outros que receberam solução de arsênio nas concentrações de 0,05 (As1) e 1,0 (As2) mg/L na água de beber. Após 42 dias, correspondente a 1 ciclo espermatogênico completo na espécie, os animais foram eutanasiados. O tratamento em ambas as concentrações de arsênio não interferiu de forma significativa na maioria dos parâmetros referentes à biometria corporal, observando-se aumento na massa da vesícula seminal e na massa dos rins no grupo As2, em relação ao controle e ao grupo As1. No compartimento tubular dos testículos, ocorreram variações significativas nas proporções volumétricas dos componentes do túbulo seminífero no grupo tratado com maior dose, enquanto as proporções do intertúbulo não se modificaram. Entretanto, isso não ocasionou alterações nos volumes tubulares e intertubulares, no índice tubulossomático, nas medidas do diâmetro tubular e da altura do epitélio seminífero, assim como no comprimento total de túbulos seminíferos e no comprimento dos mesmos por grama de testículo. Os dados obtidos permitem sugerir que o tratamento com As não produziu sinais clínicos de toxicidade e não interferiu expressivamente no compartimento tubular dos testículos de camundongos adultos, não sendo observadas variações relevantes em seus elementos que indicassem alterações na atividade espermatogênica.

Palavras chave: toxicidade, túbulo seminífero, reprodução.

## 1. Introdução

Nos últimos anos tem crescido a preocupação sobre potenciais efeitos adversos de vários contaminantes ambientais (Saradha e Mathur, 2006), dentre eles o arsênio (As), um dos principais poluentes de águas naturais. O As é um semimetal amplamente distribuído na crosta, podendo combinar-se com outros elementos formando diferentes espécies, orgânicas e inorgânicas, que apresentam diferentes graus de toxicidade nos seres vivos (Jain e Ali, 2000), dependendo do seu estado de oxidação (WHO, 2011).

A contribuição antrópica é oriunda de combustíveis fósseis, de atividades de mineração e metalurgia e de uso de compostos de arsênio para diversos fins, principalmente para a agricultura (pesticidas e biocidas), e para a indústria (conservantes de madeira, dessecante de algodão, tintas, etc.) (ATSDR, 2011; Blaser et al., 2000; Ruokolainen, 2000).

Mundialmente, mais de 100 milhões de pessoas estão expostas ao As em água de beber em concentrações maiores que 0,05 mg/L (Rahman, 2001), níveis considerados nocivos para a saúde. Enquanto a exposição ao arsênio em níveis elevados é restrita a certas regiões do mundo, exposição a baixos níveis, mas potencialmente prejudiciais, é por vezes constante (crônica) (Celik et al., 2008). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), a concentração de As na água potável abaixo da qual nenhum efeito possa ser observado ainda não foi estabelecida. Assim, a concentração limite permitida (0,01 mg/L) é mantida como uma meta e designada como provisória (WHO, 2011).

No Brasil, pesquisas sobre as interferências ambientais ocasionados pela contaminação por arsênio são ainda incipientes, mas já se verifica o problema principalmente em regiões industriais e de mineração em alguns estados (Figueiredo et al., 2007).

Compostos de As são toxinas ambientais com múltiplos efeitos em representantes do Reino Animal, devido à sua alta toxicidade mesmo em baixas concentrações. As rotas mais importantes de contaminação são através dos alimentos, medicamentos e de água potável (Mehranjani e Hemadi, 2007; WHO, 2011). Além de ser classificado como um carcinógeno humano Classe I, por sua associação com o aumento no risco de câncer de pele, o As também tem sido associado a maior risco de câncer interno, diabetes, doenças cardiovasculares, complicações na gravidez e diminuição da função intelectual de crianças (Chen et al., 2009).

Exposição ao As, associada à rápida industrialização e crescente urbanização, tem resultado em diversos efeitos tóxicos, com destaque para aqueles relacionados à reprodução masculina (Celik et al., 2008; Al-Attar, 2011). É sabido que o arsenito age sobre o sistema reprodutor de camundongos acumulando-se nos testículos, vesícula seminal e glândula prostática, causando diminuição do peso testicular e desordens na motilidade do espermatozóide (Pant et al., 2004). Diante de sua influência supressiva na espermatogênese e androgênese (Jana et al., 2006), verifica-se a importância de estudos relacionando o As ao processo espermatogênico.

O testículo dos mamíferos é um órgão suscetível a agentes tóxicos ambientais, o que pode comprometer a espermatogênese (Boekelheide, 2005). Dessa forma, e considerando o uso de modelos animais para avaliar as possíveis alterações nos processos envolvidos na espermatogênese, a análise de parâmetros morfológicos e morfométricos do compartimento tubular do testículo revela-se uma estratégia simples e efetiva (Amann, 1982).

Funcionalmente o testículo dos mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos principais: o tubular e o intertubular (Russell et al., 1990). O compartimento tubular é constituído por túnica própria, epitélio seminífero e lúmen tubular. A túnica própria, composta por células mióides, elementos acelulares (fibras colágenas) e lâmina basal, reveste o túbulo externamente, sendo responsável pela movimentação de fluido e propulsão de espermatozoides ao longo do lúmen tubular. No epitélio seminífero são encontradas as células germinativas e as células de Sertoli, estas se localizam junto à lâmina basal e se estendem da base do túbulo ao lúmen, estando em contato com todas as células germinativas (Russell et al., 1990; França e Russell, 1998; Godinho, 1999). Os elementos que compõem o compartimento intertubular são as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável constituída principalmente de fibroblastos, macrófagos e mastócitos (Russell et al., 1990; Setchell, 1991).

A espermatogênese e as funções reprodutivas masculinas podem ser afetadas por uma variedade de fatores, como hipertermia, exposição a microorganismos, drogas antitumorais e imunossupressoras, utilização de medicamentos em altas dosagens e de forma prolongada, além de contaminantes do meio (Wingfield e Sapolsky, 2003; Mata, 2009), como o As, um efetivo contaminante ambiental. Exposição a este elemento químico pode resultar em efeitos tóxicos, incluindo redução da androgênese (Pant et al., 2001; Jana,

2006), das massas dos testículos e dos órgãos sexuais acessórios, além de diminuição da contagem e motilidade espermática (Pant et al., 2001; Neves et al., 2004).

Assim, em face dos potenciais danos do As ao sistema reprodutor de mamíferos, este trabalho teve por objetivos avaliar os efeitos de baixas concentrações de arsênio sobre a biometria corporal relacionada à reprodução e sobre a histomorfometria dos túbulos seminíferos de camundongos adultos, sendo utilizada a forma química arsenato, por ser a mais comumente encontrada em água.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Animais, grupos experimentais e tratamentos**

Foram utilizados trinta camundongos (*Mus musculus*) adultos da linhagem Swiss, em idade reprodutiva (55 dias), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os animais foram pesados e colocados em gaiolas individuais sob fotoperíodo (12-12h claro/escuro) e temperatura (24 °C) controlados. Três grupos experimentais foram constituídos (n=10 em cada grupo): um grupo controle que recebeu água potável, e dois outros que receberam solução de arsênio (na forma de arsenato de sódio) nas concentrações de 0,05 (As1) e 1,0 (As2) mg/L, respectivamente, na água de beber. O regime líquido foi fornecido na quantidade de 100 mL por dia. O regime sólido (ração) foi fornecido *ad libitum*. A fase de tratamento teve duração de 42 dias consecutivos, correspondente a 1 ciclo espermatogênico completo na espécie. Os animais foram manuseados de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente, tendo sido este trabalho submetido ao Comitê de Ética da UFV (processo nº 12 / 2011).

### **2.2. Coleta de amostras**

Ao término do período de tratamento os animais foram contidos fisicamente, anestesiados com mistura de cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina e tiveram seus dados biométricos registrados. Em seguida, após incisão ventral, os testículos, epidídimos,

glândulas vesiculares, ductos deferentes, fígado e rins foram retirados e colocados em solução fixadora de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas, transferidos para álcool 70% e posteriormente pesados em balança de precisão.

### **2.3. Biometria corporal e testicular**

Um dos testículos foi destinado ao estudo em microscopia de luz. Após passagem pelo álcool 70%, a albugínea foi removida desse testículo e pesada, tendo sua massa subtraída do massa total do testículo, a fim de se determinar a massa do parênquima testicular (testículo sem albugínea), que corresponde à parte funcional, gametogênica e androgênica do órgão.

Fragmentos deste mesmo testículo foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70°, 80°, 90°, 95° e 100° GL), com trocas a cada trinta minutos. Após desidratação se procedeu a pré-inclusão e inclusão em resina a base de 2-hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica). Os fragmentos incluídos foram seccionados de modo semiseriado na espessura de 3 µm em micrótomo rotativo, respeitando-se uma distância de 36 µm entre os cortes, e corados com azul de toluidina-borato de sódio 1%.

Imagens do parênquima testicular foram obtidas em microscópio Olympus AX-70 e analisadas, utilizando-se o programa Image Pro Plus 4 (Media Cybernetics).

#### ***2.3.1. Índice gonadossomático (IGS)***

Com base nos pesos corporais e testiculares, foi obtido o IGS (%), proporção da massa corporal representada pelos testículos, calculado a partir da seguinte fórmula:

$$\text{IGS} = (\text{MG}/\text{MC}) \times 100$$

Onde:

MG = massa total das gônadas; MC = massa corporal.

### **2.4. Análises morfométricas do compartimento tubular do testículo**

#### ***2.4.1. Proporção volumétrica e volume dos componentes do testículo***

A proporção volumétrica (%) entre túbulo e intertúbulo, foi estimada a partir da contagem de 2.100 pontos projetados sobre imagens capturadas utilizando objetiva de 10X, em diferentes cortes histológicos do testículo de cada animal. Utilizou-se a fórmula:

Proporção volumétrica (%) = (número de pontos encontrados para o túbulo ou intertúbulo × 100) / 2100 pontos totais

O volume (mL) de cada componente testicular foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do volume do parênquima testicular. Para tal, se utilizou a fórmula:

Volume = (% túbulo ou intertúbulo / 100) × volume do parênquima de 1 testículo.

Como a densidade volumétrica do testículo de mamíferos é em torno de 1 g/mL, a massa do testículo em gramas é considerada igual ao seu volume em mililitros (Costa et al., 2011; Johnson e Neaves, 1981; França, 1991; Paula, 1999; Tae et al., 2005).

#### **2.4.2. Índice tubulossomático (ITS)**

Com base nos volumes de túbulos seminíferos e nas massas corporais, foi calculado o ITS (%), proporção do peso corporal alocado em túbulos seminíferos, a partir da fórmula:

$$ITS = (VT/MC) \times 100$$

Onde:

VT = volume de túbulo seminífero; MC = massa corporal.

#### **2.4.3. Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero**

O diâmetro tubular médio de cada animal foi obtido a partir da medida, ao acaso, de 20 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível, não levando em consideração o estágio do ciclo do epitélio seminífero. Essas

medidas foram realizadas utilizando-se programa de análise de imagem (Image Pro Plus), em imagens aumentadas em 100x, com objetiva de 10X .

As mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foram usadas na mensuração da altura do epitélio seminífero, compreendida da túnica própria ao lume tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio, em cada túbulo, representa a média de duas medidas diametralmente opostas.

#### ***2.4.4. Comprimento total dos túbulos seminíferos (CTT) e comprimento total dos túbulos seminíferos por grama de testículo (CTT/g)***

Devido ao formato cilíndrico do túbulo seminífero, utilizou-se para cálculo de seu comprimento a derivação da fórmula volumétrica do cilindro (Attal e Courot, 1963; Dorst e Sajonski, 1974), em que:

$$CTT = VTS/\pi R^2$$

Onde:

VTS = volume total de túbulos seminíferos nos testículos;

$\pi R^2$  = área da secção transversal dos túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2).

O CTT/g (m/g) foi calculado a partir da fórmula:

$$CTT/g = CTT/MG$$

Onde:

CTT = Comprimento total de túbulos seminíferos;

MG = Massa total das gônadas.

## **2.5. Análises estatísticas**

Análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Student Newman-Keuls (SNK), foi usada para comparar médias entre os grupos experimentais. Todos os resultados foram

expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. A probabilidade ( $p$ ) de erro menor que 0,05 foi considerada significativa.

### 3. Resultados

#### 3.1. Efeitos da exposição subcrônica ao arsênio sobre a biometria corporal e testicular

Os parâmetros biométricos referentes à massa corporal, massa testicular, massa da albugínea, massa do parênquima e ao índice gonadossomático (IGS) (Tabela 1) não exibiram variações significativas entre os grupos controle e aqueles que receberam administração oral de arsenato de sódio. Da mesma forma, com relação à massa dos epidídimos, dos ductos deferentes e do fígado (Tabela 2).

Tabela 1 – Parâmetros biométricos de camundongos adultos após administração oral de arsenato de sódio por 42 dias.

Grupos	Massa corporal (g)	Massa testicular (g)	IGS (%)	Massa da albugínea (g)	Massa do parênquima (g)
Controle	42,40 $\pm$ 6,80 <sup>a</sup>	0,24 $\pm$ 0,021 <sup>a</sup>	0,579 $\pm$ 0,073 <sup>a</sup>	0,024 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,218 $\pm$ 0,019 <sup>a</sup>
As1	39,65 $\pm$ 4,77 <sup>a</sup>	0,24 $\pm$ 0,030 <sup>a</sup>	0,611 $\pm$ 0,072 <sup>a</sup>	0,024 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	0,217 $\pm$ 0,028 <sup>a</sup>
As2	41,82 $\pm$ 3,54 <sup>a</sup>	0,26 $\pm$ 0,029 <sup>a</sup>	0,626 $\pm$ 0,065 <sup>a</sup>	0,026 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	0,235 $\pm$ 0,026 <sup>a</sup>

Valores agrupados por média  $\pm$  desvio padrão.

Letras iguais nas colunas, não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ) ( $n=10$ ). Controle: água potável; As1: solução de arsênio 0,05 mg/L; As2: solução de arsênio 1,0 mg/L.

Dentre os parâmetros avaliados, a massa da vesícula seminal e a massa dos rins (Tabela 2) apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) no grupo As2 quando comparado com o controle e com As1.

Tabela 2 – Parâmetros biométricos (g) de camundongos adultos, massa dos epidídimos, dos deferentes, da vesícula seminal, do fígado e dos rins, após administração oral de arsenato de sódio por 42 dias.

Grupos	Epidídimos	Deferentes	Vesícula seminal	Fígado	Rins
Controle	0,077 ± 0,018 <sup>a</sup>	0,023 ± 0,007 <sup>a</sup>	0,232 ± 0,061 <sup>a</sup>	1,414 ± 0,251 <sup>a</sup>	0,379 ± 0,063 <sup>a</sup>
As1	0,077 ± 0,008 <sup>a</sup>	0,024 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,269 ± 0,030 <sup>a</sup>	1,449 ± 0,157 <sup>a</sup>	0,413 ± 0,052 <sup>a</sup>
As2	0,078 ± 0,027 <sup>a</sup>	0,026 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,314 ± 0,048 <sup>b</sup>	1,471 ± 0,140 <sup>a</sup>	0,473 ± 0,035 <sup>b</sup>

Valores agrupados por média ± desvio padrão.

Letras iguais nas colunas, não diferem significativamente entre si (p>0,05) (n=10). Controle: água potável; As1: solução de arsênio 0,05 mg/L; As2: solução de arsênio 1,0 mg/L.

### 3.2. Efeitos da exposição subcrônica ao arsênio sobre a proporção volumétrica entre túbulo e intertúbulo, volume tubular, intertubular e índice tubulossomático

A proporção volumétrica do túbulo seminífero não variou significativamente entre os grupos (Tabela 3), embora tenha havido diminuição (p<0,05) da proporção do epitélio seminífero no grupo As2 e da túnica própria nos animais que receberam As, em relação ao controle. Houve aumento significativo da proporção do lúmen nos grupos tratados em relação ao grupo controle, ao passo que não foi observada alteração na proporção volumétrica do intertúbulo entre os grupos.

Tabela 3 - Proporções volumétricas (%) de túbulo seminífero (túnica própria, epitélio seminífero e lúmen) e intertúbulo de camundongos adultos após administração oral de arsenato de sódio por 42 dias.

Grupos	Túnica própria	Epitélio seminífero	Lúmen	Túbulo	Intertúbulo
Controle	3,69 ± 0,68 <sup>a</sup>	75,73 ± 3,00 <sup>a</sup>	7,01 ± 1,57 <sup>a</sup>	86,42 ± 2,84 <sup>a</sup>	13,58 ± 2,84 <sup>a</sup>
As1	2,44 ± 0,50 <sup>b</sup>	73,17 ± 3,74 <sup>ab</sup>	8,99 ± 2,34 <sup>b</sup>	84,60 ± 2,74 <sup>a</sup>	15,40 ± 2,74 <sup>a</sup>
As2	2,33 ± 0,18 <sup>b</sup>	71,38 ± 2,04 <sup>b</sup>	10,88 ± 1,60 <sup>b</sup>	84,59 ± 1,91 <sup>a</sup>	15,41 ± 1,91 <sup>a</sup>

Valores agrupados por média ± desvio padrão.

Letras iguais nas colunas, não diferem significativamente entre si (p>0,05) (n=10). Controle: água potável; As1: solução de arsênio 0,05 mg/L; As2: solução de arsênio 1,0 mg/L.

Os volumes tubulares, intertubulares e ITS (Tabela 4) foram estatisticamente iguais nos grupos analisados, não sendo afetados pelo arsênio.

Tabela 4 - Volume (mL) dos compartimentos do parênquima testicular e índice tubulossomático - ITS (%) de camundongos adultos, após administração oral de arsenato de sódio por 42 dias.

Grupos	Volume tubular	Volume intertubular	ITS
Controle	0,086 ± 0,012 <sup>a</sup>	0,014 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,195 ± 0,017 <sup>a</sup>
As1	0,087 ± 0,015 <sup>a</sup>	0,016 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,218 ± 0,032 <sup>a</sup>
As2	0,092 ± 0,009 <sup>a</sup>	0,017 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,222 ± 0,016 <sup>a</sup>

Valores agrupados por média ± desvio padrão.

Letras iguais nas colunas, não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ) (n=10). Controle: água potável; As1: solução de arsênio 0,05 mg/L; As2: solução de arsênio 1,0 mg/L.

### 3.3. Efeitos da exposição subcrônica ao arsênio sobre diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos

Não houve variações ( $p > 0,05$ ) nas medidas do diâmetro tubular, da altura do epitélio seminífero, do comprimento total de túbulos seminíferos e do comprimento dos mesmos por grama de testículo (Tabela 5).

Tabela 5 - Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero, comprimento total dos túbulos seminíferos (CTT) e comprimento total dos túbulos seminíferos por grama de testículo (CTT/g) de camundongos adultos, após administração oral de arsenato de sódio por 42 dias.

Grupos	Diâmetro tubular (µm)	Altura do epitélio (µm)	CTT (m)	CTT/g (m/g)
Controle	192 ± 10,31 <sup>a</sup>	62,50 ± 15,09 <sup>a</sup>	3,08 ± 0,516 <sup>a</sup>	12,73 ± 1,88 <sup>a</sup>
As1	211 ± 15,52 <sup>a</sup>	57,98 ± 7,01 <sup>a</sup>	2,35 ± 0,488 <sup>a</sup>	9,65 ± 1,37 <sup>a</sup>
As2	210 ± 28,47 <sup>a</sup>	57,17 ± 8,21 <sup>a</sup>	3,07 ± 1,904 <sup>a</sup>	11,53 ± 5,63 <sup>a</sup>

Valores agrupados por média ± desvio padrão.

Letras iguais nas colunas, não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ) (n=10). Controle: água potável; As1: solução de arsênio 0,05 mg/L; As2: solução de arsênio 1,0 mg/L.

## 4. Discussão

### 4.1. Efeitos da exposição subcrônica ao arsênio sobre a biometria corporal e testicular

Mudanças nas massas dos órgãos reprodutores masculinos pela influência de algum agente permitem inferir que esse agente causa algum efeito sobre a reprodução de machos (Zenick e Clegg, 1994). Entretanto, os efeitos tóxicos produzidos por substâncias químicas em sistemas biológicos só se manifestam se o agente tóxico ou um produto de sua biotransformação alcançar locais específicos do organismo, em concentração e tempo suficientes para produzi-los (Oga et al., 2008). A massa testicular pode ser usada como indicadora quantitativa da produção espermática, já que o principal componente dos testículos é o túbulo seminífero; há uma forte correlação entre massa testicular e número de células espermatogênicas presentes no testículo (França e Russell, 1998; Russell et al., 1990; Melo et al., 2010).

Na maioria dos parâmetros biométricos avaliados o As não causou alteração, semelhante ao observado por Chang et al. (2007) em relação às massas corporal e testicular e ao IGS, após 5 semanas de administração oral de As nas doses de 11,5 e 23 ppm.

Modificação na massa corporal de um animal é um importante indicador de efeito biológico de uma substância (Jahn e Günzel, 1997). O índice gonadosomático (IGS) representa a porcentagem da massa corporal correspondente ao testículo e, em alguns casos, pode sofrer severa redução, como observado por Chandra et al. (2007) em ratos tratados com dicromato de potássio na concentração de 0,6 mgK<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>/kg/dia. Outros parâmetros, no entanto, podem ser distintamente afetados, conforme resultados de Anjum et al. (2011) em que ratos expostos ao acetato de chumbo não tiveram alteração da massa corporal, mas ocorreram significativos decréscimos nas massas dos testículos, epidídimos, vesícula seminal e ductos deferentes, quando expressados em relação à massa corporal.

Os primeiros indicadores de possíveis alterações no estado androgênico do animal são mudanças nas massas da vesícula seminal e da próstata (Creasy, 2001), glândulas andrógeno-dependentes (Sainath et al., 2011). Redução na massa da vesícula seminal pode representar potencial dano que resulta em infertilidade (Gupta et al., 2001), uma vez que o líquido seminal secretado por ela constitui fonte energética para a motilidade dos espermatozoides e representa a maior parte do volume de ejaculado (Junqueira e Carneiro, 2008). Redução na massa das glândulas sexuais acessórias foi constatada em trabalho de

Sarkar et al. (2003) em ratos expostos ao arsenito de sódio. No presente trabalho, no entanto, houve aumento ( $p < 0,05$ ) na massa da vesícula seminal do grupo As2 em relação ao controle e ao grupo As1. Isso pode ser devido ao grande acúmulo de concreção calcária anormal no seu lúmen, conforme constatado por Espinoza-Navarro et al. (2007).

O rim é a principal via de excreção do arsênio e seus metabólitos e o principal local para biotransformação do mesmo, se tornando, assim, o órgão mais sensível à exposição a esse semimetal (Patel e Kalia, 2010). A maior massa encontrada nos rins do grupo As2 em comparação com As1 e com o controle pode indicar maior atividade deste órgão na filtração plasmática, sugerindo maior acúmulo de As renal. Há evidências que o As induz nefrotoxicidade por causar distúrbio no sistema de defesa antioxidante (Patel e Kalia, 2010). Segundo Barbier et al. (2005), a intoxicação por metais pesados, tanto aguda quanto crônica, demonstra causar nefropatias.

O fígado, maior glândula do organismo, representa o local de numerosos processos metabólicos, além de ser o principal órgão de desintoxicação do corpo (Pough et al., 1999). Ele é vulnerável aos efeitos tóxicos de substâncias, pois abriga, mesmo que por um curto período, não apenas os compostos a serem transformados, mas também os metabólitos resultantes (Vasconcelos et al., 2007). Sendo assim, várias drogas ou substâncias tóxicas podem afetar a função hepática por estresse oxidativo (Pawa e Ali, 2004) e alterações nos parâmetros biométricos do fígado possuem estreita correlação com hepatotoxicidade. A massa do fígado nos animais tratados com arsênio não apresentou variações significativas, o que pode indicar que as doses administradas e a duração da exposição não foram suficientes para induzir essa alteração; entretanto, outras análises, como medida do teor de arsênio no órgão e determinação plasmática de enzimas transaminases do fígado (marcadores sensíveis de lesão hepática) são necessárias para afirmar ausência ou presença de hepatotoxicidade.

#### **4.2. Efeitos da exposição subcrônica ao arsênio sobre a proporção volumétrica entre túbulo e intertúbulo**

Em termos funcionais, o testículo de mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos, o compartimento dos túbulos seminíferos ou espermatogênico e o compartimento intertubular ou androgênico. A proporção volumétrica de túbulos seminíferos em mamíferos é bastante variável, sendo um dos principais fatores responsáveis pela diferença observada na eficiência da produção espermática nas diversas

espécies (Russell et al., 1990; França e Russell, 1998). No presente trabalho não foram encontradas alterações significativas relacionadas à proporção volumétrica de túbulo e intertúbulo entre os grupos experimentais. De maneira semelhante, Oliveira (2010) e Carvalho (2009), ao estudarem os efeitos da exposição crônica ao cloreto de níquel e ao arsenato de sódio, respectivamente, em testículos de camundongos, não encontraram tais diferenças ( $p < 0,05$ ).

O epitélio seminífero é envolvido pela túnica própria, que é formada por lâmina basal e por uma bainha de tecido conjuntivo composto por fibroblastos, elementos acelulares e células mióides (Junqueira e Carneiro, 2008; Russell et al., 1990). As células mióides, unidas entre si por junções de oclusão, possuem propriedades contráteis, secretam componentes da lâmina basal e são dotadas de receptores de andrógenos em sua superfície, o que as torna andrógeno-dependentes (Rodríguez et al., 2008). No epitélio seminífero, as junções entre as células de Sertoli adjacentes formam a barreira hematotesticular, que divide funcionalmente o epitélio seminífero em dois compartimentos, o basal (abaixo das junções entre as células de Sertoli) e o adluminal (acima das junções). As células de Sertoli, importantes no suporte estrutural e nutricional das células germinativas, precisam se apoiar na lâmina basal (constituente da túnica) para o correto desempenho de suas funções, sendo assim, a túnica própria contribui indiretamente para manutenção das células da linhagem espermatogênica (Garcia e Fernández, 2003). Além deste papel, a túnica possui papel regulador e protetor (através das junções entre as células mióides) contra substâncias tóxicas de origem externa ao túbulo (Garcia e Fernández, 2003; Carvalho, 2009; Mata, 2009) e controla, parcialmente, por contração das células mióides, o movimento do fluido dos túbulos para a rede testicular (Creasy, 2001).

A redução na proporção volumétrica da túnica própria nos animais expostos ao arsenato (As1 e As2) em relação ao grupo controle pode indicar menor contratilidade dos túbulos e, assim, menor fluxo de fluidos, nos levando a sugerir que o As altera os mecanismos de interação entre as células e fibras que constituem o tecido peritubular. Resultados semelhantes foram observados por França et al. (2000) em ratos expostos à cimetidina, um tóxico de células peritubulares, que apresentaram redução na densidade volumétrica da túnica própria quando comparados com animais controle.

O aumento significativo na proporção volumétrica do lúmen pode indicar elevação da atividade de síntese pelas células espermatogênicas e do deslocamento do fluido tubular (Creasy, 2001), isso se houver também aumento na medida do epitélio seminífero e do

diâmetro do túbulo. Aumento do diâmetro tubular indica maior atividade espermatogênica apenas se houver ampliação na medida do epitélio seminífero (França e Russell, 1998). Se não acontecer desta forma, dilatação do diâmetro tubular pode ser usado como um importante indicador de acúmulo de fluido. Se o acúmulo for tal, a ponto de causar obstrução do fluido circulante, pode-se originar um aumento marcante no diâmetro tubular. Alguns compostos tóxicos podem causar danos às células do epitélio dos ductos, acumulando restos celulares e causando inflamação que pode resultar na obstrução de todo o sistema ductular (Creasy, 2001).

O aumento na proporção volumétrica do lúmen do túbulo nos animais tratados com a maior dose de As não refletiu em aumento significativo do diâmetro tubular neste grupo, isto porque juntamente com o aumento do lúmen houve diminuição ( $p < 0,05$ ) da proporção volumétrica do epitélio seminífero.

Desta forma, a diminuição na proporção volumétrica da túnica própria, epitélio seminífero e aumento na proporção volumétrica do lúmen tubular nos animais tratados com a maior dose (As<sub>2</sub>) em relação ao controle, neste trabalho, pode refletir uma atividade espermatogênica diminuída em relação aos demais grupos. Entretanto, outras análises como diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero são necessárias para confirmar esta hipótese.

#### **4.3. Efeitos da exposição subcrônica ao arsênio sobre os volumes tubular, intertubular e índice tubulossomático (ITS)**

Há uma forte correlação entre a massa do testículo e o volume ocupado pelos túbulos seminíferos, o que reflete na produção espermática (Amann, 1970; França e Russell, 1998). O compartimento tubular é o principal componente do testículo, por isso exerce grande influência sobre a massa testicular e sobre a produção de espermatozóides.

A redução significativa no volume dos túbulos seminíferos de animais tratados com níquel (40mg/dia), observada por Oliveira (2010), estava relacionada à diminuição da massa testicular, já que o volume intertubular não sofreu alterações ( $p > 0,05$ ). Da mesma forma, Mata (2009), estudando camundongos expostos a 100 mg/L de As, concluiu que a diminuição na massa testicular daqueles animais foi devida à redução do volume de túbulos seminíferos, uma vez que o volume do intertúbulo permaneceu inalterado. Entretanto, a exposição de animais a doses menores de As não provocou tais alterações,

conforme observado no trabalho de Carvalho (2009) e no presente trabalho, onde a massa testicular e os volumes tubular e intertubular permaneceram inalterados.

O ITS, que é um parâmetro utilizado para se quantificar a proporção de túbulos seminíferos em relação à massa corporal, não diferiu entre os grupos experimentais estudados. O mesmo foi observado em ratos tratados com cloreto de níquel (Oliveira, 2010) e em camundongos com arsenato de sódio (Carvalho, 2009). Redução do ITS representa menor investimento corporal na produção espermática, sugerindo um prejuízo nesta produção; isso porque o ITS é diretamente proporcional ao volume que os túbulos seminíferos ocupam no testículo.

#### **4.4. Efeitos da exposição subcrônica ao arsênio sobre diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos (CTT)**

A medida do diâmetro tubular é uma abordagem classicamente utilizada como indicador da atividade espermatogênica (França e Russell, 1998; Paula et al., 2002), entretanto, a medida da altura do epitélio seminífero é mais precisa que a do diâmetro para avaliação da produção espermática (Wing e Christensen, 1982), uma vez que é no epitélio seminífero que ocorre os eventos da síntese de espermatozóides. Como não ocorreram alterações no diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos, podemos afirmar que a administração de baixas doses de As não modificou a atividade espermatogênica nos animais expostos, em relação ao controle. Esses resultados estão em concordância com os resultados que Mehranjani e Hemadi (2007) encontraram quando submeteram ratos à exposição ao arsenito de sódio (8mg/kg/dia) por 8 semanas.

O CTT é relacionado a três parâmetros estruturais: massa testicular, diâmetro tubular e volume do túbulo seminífero. A exposição ao As não provocou alteração no CTT, o que reflete na manutenção da massa testicular, do diâmetro tubular e do volume de túbulos nos grupos tratados (As1 e As2) em relação ao controle, indicando que não houve alteração na produção espermática.

No tempo e doses de exposição do presente trabalho não foram observadas modificações acentuadas na histologia tubular. Segundo Russell et al. (1990), estudos conduzidos com agentes administrados acima de um período de várias semanas e meses indicaram ampliação de um dano, antes focal, para células da secção transversal do túbulo seminífero.

## 5. Conclusões

Com relação ao parênquima testicular de camundongos adultos, não foram observadas variações significativas relevantes na histologia do compartimento tubular dos testículos que indicassem alterações na atividade espermatogênica. Apesar de ter havido redução da proporção de túnica própria no grupo As2, resultando em diminuição da proporção do epitélio seminífero e aumento da proporção do lúmen tubular, estas alterações não foram suficientes para causar outras modificações significativas em parâmetros relacionados, como diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero.

Mesmo diante dos resultados, não se pode afirmar que um tempo de exposição maior não afetaria o compartimento dos túbulos seminíferos e a espermatogênese, pois a intensidade do dano causado pelo composto é diretamente proporcional à sua dose e ao tempo de exposição a ele.

Em adição, pode-se concluir que a administração subcrônica de arsênio em ambas as concentrações não produziu sinais clínicos de toxicidade na maioria dos parâmetros biométricos observados. Entretanto, o aumento na massa dos rins do grupo tratado com maior dose indica sobrecarga renal, sugerindo possível toxicidade neste órgão, o que deve ser investigado em maior detalhe.

## 6. Referências bibliográficas

Amann RP. 1970. Sperm Production Rates. In: Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL (Eds): The Testis. Vol. 1. New York: Academic Press 433-482.

Amann RP. 1982. Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. *Fundamental and Applied Toxicology* 2:13-26.

Anjum MR, Sainath SB, Suneetha Y, Reddy OS. 2011. Lead acetate induced reproductive and paternal mediated developmental toxicity in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74:793-799.

Al-Attar AM. 2011. Antioxidant effect of vitamin E treatment on some heavy metals-induced renal and testicular injuries in male mice. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18:63-72.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. 2011. Toxic Substances Portal. Disponível em: < <http://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=3> >. Acesso em janeiro de 2012.

Attal J, Courot M. 1963. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique* 3:219-241.

Barbier O, Jacquillet G, Tauc M, Cougnom M, Poujeol P. 2005. Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron Physiology* 99:105-110.

Blaser P, Zimmermann S, Luster J, Shotyk W. 2000. Critical examination of trace element enrichments and depletions in soils: As, Cr, Cu, Ni, Pb, and Zn em Swiss forest soils. *The Science of the Total Environment* 249:257-280.

Boekelheide K. 2005. Mechanisms of toxic damage to spermatogenesis. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 6-8.

Carvalho FAR. Morfologia e morfometria testicular de camundongos adultos submetidos à exposição crônica ao arsenato. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Celik I, Gallicchio L, Boyd K, Lam TK, Matanoski G, Tao X, Shiels M, Hammond E, Chen L, Robinson KA, Caulfield LA, Herman JG, Guallar E, Alberg AJ. 2008. Arsenic in drinking water and lung cancer: A systematic review. *Environmental Research* 108:48-55.

Chandra AK, Chatterjee A, Ghosh R, Sarkar M, Chaube SK. 2007. Chromium induced testicular impairment in relation to adrenocortical activities in adult albino rats. *Reproductive Toxicology* 24:388-396.

Chang SI, Jin B, Youn P, Park C, Park J-D, Ryu D-Y. 2007. Arsenic-induced toxicity and protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 218:196-203.

Chen Y, Parvez F, Gamble M, Islam T, Ahmed A, Argos M, Graziano JH, Ahsan H. 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. *Toxicology and Applied Pharmacology* 239:184-192.

Costa KLC, Matta SLP, Gomes MLM, Paula TAR, Freitas KMF, Carvalho FAR, Silveira JA, Dolder H, Mendis-Handagama SMLC. 2011. Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Animal Reproduction Science* 127:202-212.

Creasy DM. 2001. Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicologic Pathology* 29:64-76.

Dorst VJ, Sajonski H. 1974. Morphometrische untersuchunhen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. *Monatshefte fur Veterinär Medizin* 29:650-652.

Espinoza-Navarro O, Vilaxa A, Granifo L, Rojas S, Rodríguez H. 2007. Histological study on the male reproductive organs of mouse CF1 treated with boron. *International Journal Morphology* 25:341-346.

Figueiredo BR, Borba RP, Angélica RS. 2007. Arsenic occurrence in Brazil and human exposure. *Environmental Geochemistry and Health* 29:109-118.

França LR. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. 1991. 185 f. Tese (Doutorado em Morfologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

França LR, Leal MC, Sasso-Cerri E, Vasconcelos A, Debeljuk L, Russell LD. 2000. Cimetidine (Tagamet) is a reproductive toxicant in male rats affecting peritubular cells. *Biology of Reproduction* 63:1403-1412.

França LR, Russell LD. 1998. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia F and Regadera J (Org.): *Male reproduction - a multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Communications 198-219.

Garcia SML, Fernández CG. 2003. Espermatogênese. In: Garcia SML, Jeckel E, Fernández CG (Eds): *Embriologia*. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed 42-58.

Godinho CL. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros. 1999. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Gupta RS, Yadav RK, Dixit VP, Dobhal MP. 2001. Antifertility studies of *Colebrookia oppositifolia* leaf extract in male rats with special reference to testicular cell population dynamics. *Fitoterapia* 72:236-245.

Jahn AI, Günzel PKH. 1997. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? *Reproductive Toxicology* 11:171-178.

Jain CK, Ali I. 2000. Arsenic: Occurrence, toxicity and speciation techniques. *Water Research* 34:4304-4312.

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. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4:9.

Johnson L, Neaves WB. 1981. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. *Biology of Reproduction* 24:703-712.

Junqueira LC, Carneiro J. 2008. Aparelho Reprodutor Masculino. In: *Histologia Básica (texto / atlas)*. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 414-430.

Karnovsky MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* 27:137-138.

Mata WS. Toxicidade do arsenato e efeito protetor do guaraná e da vitamina E no aparelho reprodutor de camundongos machos adultos. 2009. 138 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Mehranjani MS, Hemadi M. 2007. The effects of sodium arsenite on the testis structure and sex hormones in vasectomized rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 5:127-133.

Melo FCSA, Matta SLP, Paula TAR, Gomes MLM, Oliveira LC. 2010. The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult Wistar rats. *Biological Research* 43:445-450.

Neves RNP, Carvalho F, Carvalho M, Fernandes E, Soares E, Bastos ML, Pereira ML. 2004. Protective activity of hesperidin and lipoic acid against sodium arsenite acute toxicity in mice. *Toxicologic Pathology* 32:527-535.

Oga S, Camargo MMA, Batistuzzo JAO. 2008. Fundamentos de toxicologia. 3ª ed. São Paulo: Atheneu. 677p.

Oliveira MF. Efeito da exposição crônica ao níquel em testículos de ratos wistar adultos. 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Pant N, Kumar R, Murthy RC, Srivastava SP. 2001. Male reproductive effect of arsenic in mice. *BioMetals* 14:113-117.

Pant N, Murthy RC, Srivastava SP. 2004. Male reproductive toxicity of sodium arsenite in mice. *Human and Experimental Toxicology* 23:399-403.

Patel HV, Kalia K. 2010. Sub-chronic arsenic exposure aggravates nephrotoxicity in experimental diabetic rats. *Indian Journal of Experimental Biology* 48:762-768.

Paula TAR. Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). 1999. 84 f. Tese (Doutorado em Morfologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Paula TAR, Costa DS, Matta SLP. 2002. Avaliação histológica quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas. *Bioscience Journal* 18:121-136.

Pawa S, Ali S. 2004. Liver necrosis and fulminant hepatic failure en rats: protection by oxyanionic form of tungsten. *Biochimica et Biophysica Acta* 1688:210-222.

Pough FH, Heiser JB, McFarland WN. 1999. A vida dos vertebrados. 2ª ed. São Paulo: Atheneu Editora 86-88.

Rahman MM, Chowdhury UK, Mukherjee, SC, Mondal BK, Paul K, Lodh D, Biswas BK, Chanda CR, Basu GK, Saha KC, Roy S, Das R, Palit SK, Quamruzzaman Q, Chakraborti D. 2001. Chronic arsenic toxicity in Bangladesh and West Bengal, India-a review and commentary. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* 39:683-700.

Rodríguez H, Espinoza-Navarro O, Sarabia L, Tamayo C, Sepúlveda M, Inostroza J, Araya JC, Moriguehi K. 2008. Histological and functional organization in human testicle: expression of receptors c-kit and androgensInternational. *Journal of Morphology* 26:603-608.

Ruokolainen M, Pantsar-Kallio A, Haapa A, Kairesalo T. 2000. Leaching, runoff and speciation of arsenic in a laboratory mesocosm. *The Science of the Total Environment* 258:139-147.

Russell LD, Ettlín RA, SinhaHikim AP, Clegg ED. 1990. Histopathology of the Testis. In: Russell LD, Ettlín RA, SinhaHikim AP, Clegg ED (Eds): *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Clearwater: Cache River Press 242-264.

Russell LD, Ettlín RA, SinhaHikim AP, Clegg ED. 1990. Mammalian Spermatogenesis. In: Russell LD, Ettlín RA, SinhaHikim AP, Clegg ED (Eds): *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Bolesta: Cache River Press 1-40.

Sainath SB, Meena R, Supriya Ch, Reddy KP, Reddy PS. 2011. Protective role of *Centella asiatica* on lead-induced oxidative stress and suppressed reproductive health in male rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 32:146-154.

Saradha B, Mathur PP. 2006. Effect of environmental contaminants on male reproduction. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 21:34-41.

Sarkar M, Chaudhuri GR, Chattopadhyay A, Biswas NM. 2003. Effect of sodium arsenite on spermatogenesis, plasma gonadotrophins and testosterone in rats. *Asian Journal of Andrology* 5:27-31.

Setchell BP. 1991. Male reproductive organs and semen. In: Cupps PT (Ed): *Reproduction in Domestic Animals*. San Diego: Academic Press 6:221-250.

Tae HJ, Jang BG, Ahn DC, Choi EY, Kang HS, Kim NS, Lee JH, Park SY, Yang HH, Kim IS. 2005. Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus*

*colchicus karpowi*) during the breeding and non-breeding seasons. Veterinary Research Communications 29:629-643.

Vasconcelos THC, Modesto-Filho J, Diniz MFFM, Santos HB, Aguiar FB, Moreira PVL. 2007. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia 17:583-591.

Wing TY, Christensen AK. 1982. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. American Journal of Anatomy 165:13-25.

Wingfield JC, Sapolsky RM. 2003. Reproduction and resistance to stress: when and how. Journal of Neuroendocrinology 15:711-724.

WHO - World Health Organization. 2011. Guidelines for drinking-water quality [electronic resource]: incorporating first addendum. 4<sup>th</sup> ed. Geneva 315-318.

Zenich H, Clegg ED, Perreault SD, Klinefelter GR, Gray LE. 1994. Assessment of Male Reproductive Toxicity: a risk assessment approach. In: Principles and Methods of Toxicology. 3<sup>th</sup> ed. New York: Raven Press 937-988.

## Capítulo II

### *Efeitos da ingestão subcrônica de arsênio sobre o compartimento intertubular e a atividade enzimática da dismutase do superóxido e catalase de testículos de camundongos adultos*

#### **Resumo**

Contaminação ambiental por arsênio (As) e suas consequências para a população é considerada um problema de saúde pública mundial. Evidências indicam que exposição a este semimetal pode causar efeitos prejudiciais na reprodução de humanos e outros animais, interferindo no sistema enzimático de defesas antioxidantes, na morfologia do testículo e no equilíbrio da androgênese. O objetivo deste trabalho foi investigar o impacto dos efeitos do arsênio sobre a porção androgênica testicular e os demais componentes do compartimento intertubular e sobre a atividade enzimática antioxidante da catalase (CAT) e da dismutase do superóxido (SOD) dos testículos de camundongos adultos. Utilizou-se 30 camundongos em idade reprodutiva, separados em três grupos, sendo um grupo controle, que recebeu água potável, e dois outros que receberam solução de arsênio nas concentrações de 0,05 (As1) e 1,0 (As2) mg/L na água de beber. O tratamento durou 42 dias, correspondente a 1 ciclo espermatogênico completo na espécie. A exposição subcrônica ao As reduziu o volume de células de Leydig no intertúbulo e o diâmetro e volume nucleares desta célula nos animais do grupo tratado com maior dose, assim como sua relação nucleoplasmática. Observou-se aumento nas atividades enzimáticas de SOD e diminuição nas de CAT, sugerindo estresse oxidativo. Os dados apresentados indicam que ingestão subcrônica de As provoca variações nas defesas enzimáticas do testículo, afetando sua porção endócrina.

Palavras chave: toxicidade, reprodução, testículo, intertúbulo, célula de Leydig.

## 1. Introdução

A diversidade funcional do sistema reprodutor masculino e a complexidade de sua regulação hormonal favorecem a ocorrência de distúrbios químicos causados por agentes ambientais, como o arsênio (As) (Creasy, 2001; Parada et al., 2004). Sendo o testículo um alvo provável, danos podem resultar em síntese diminuída de espermatozóides, interferência no seu transporte através do sistema de ductos e reduzida secreção de testosterona (Jana et al., 2006; Maneesh e Jayalekshmi, 2006; Turner e Lysiak, 2008).

O testículo está dividido em dois compartimentos funcionais: o tubular e o intertubular (Russell et al., 1990). O primeiro é formado por túbulos seminíferos e o segundo por células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável constituída principalmente de fibroblastos, macrófagos e mastócitos (Setchell, 1991). As células de Leydig encontram-se em contato íntimo com o sistema de capilares existentes no compartimento intertubular do testículo, sendo, desta forma, as primeiras a entrar em contato com substâncias tóxicas que chegam ao testículo pelo sistema sanguíneo (Chen et al., 2011). Elas são responsáveis pela síntese e armazenamento de andrógenos, principalmente a testosterona, importante, dentre outras coisas, por promover comportamento sexual normal, manter a espermatogênese e a função das glândulas acessórias (Dellmann e Wrobel, 1982; Russell, 1996; Chen et al., 2011).

A habilidade reprodutiva de machos sexualmente maduros é dependente da capacidade dos testículos de produzir elevado número de espermatozóides viáveis (espermatogênese) e níveis adequados de andrógenos (androgênese). Sabe-se que o As inorgânico tem influência supressiva nestes dois eventos (Jana et al., 2006).

Ações tóxicas irreversíveis do As podem ocorrer em nível celular e molecular, conforme observado no sistema reprodutor de humanos e de animais experimentais (Kaur e Bansal, 2004; Al-Attar, 2011; Tiwari et al., 2011). Alterações na metabolização de As ingerido e seu acúmulo podem conduzir à toxicidade testicular (Vázquez, 1998), gerando estresse oxidativo, que desempenha importante papel na infertilidade masculina. Células espermatogênicas podem ser sujeitas ao estresse oxidativo por causa da sua alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados e baixa capacidade antioxidante (Vernet et al., 2004).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação dos intermediários reativos de oxigênio (ROI's), porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência do

processo da peroxidação lipídica. Este processo acarreta alterações na estrutura da membrana e em sua permeabilidade, ocasionando perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas (como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos) e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (Ferreira e Matsubara, 1997).

O aumento da tolerância aos estresses pode estar fortemente relacionado ao aumento da atividade de sistemas antioxidantes na célula, com elevação no nível de expressão de proteínas como catalase (CAT), dismutase do superóxido (SOD) e glutathione (Neto et al., 2008). Em um órgão como o testículo, com altas taxas de metabolismo e replicação celular, o estresse oxidativo pode ser especialmente danoso, sendo assim, é importante que esse órgão possua elevada capacidade antioxidante. Muitos fatores, incluindo aqueles que resultam em estresse oxidativo, parecem afetar o sistema endócrino (Kaur e Bansal, 2004), comprometendo a espermatogênese.

Neste sentido, sabendo que o As representa risco para saúde humana (Chen et al., 2009; WHO, 2011) e para capacidade reprodutiva masculina (Borba et al., 2000; Pokhrel e Viraraghavan, 2009; Tiwari et al., 2011), objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos da administração de arsênio, de forma subcrônica, sobre os elementos do compartimento intertubular e sobre o sistema antioxidante dos testículos de camundongos .

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Animais, grupos experimentais e tratamentos**

Trinta camundongos (*Mus musculus*) adultos da linhagem Swiss, em idade reprodutiva (55 dias), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa foram utilizados. Os animais foram pesados e colocados em gaiolas individuais sob um ambiente controlado de fotoperíodo (12-12h claro/escuro) e temperatura (24 °C). Três grupos experimentais foram constituídos (n=10 em cada grupo): um grupo controle que recebeu água potável, e dois outros que receberam solução de arsênio (na forma de arsenato de sódio) nas concentrações de 0,05 (As1) e 1,0 (As2) mg/L, respectivamente, na água de beber. O regime líquido foi fornecido na quantidade de 100 mL por dia. O regime sólido (ração) foi fornecido *ad libitum*. A fase de

tratamento teve duração de 42 dias consecutivos, correspondente a 1 ciclo espermatogênico completo na espécie. Os animais foram manuseados de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente, sendo este trabalho submetido ao Comitê de Ética da UFV (processo nº 12 / 2011).

## **2.2. Coleta de amostras**

Ao término do período de tratamento, os animais foram contidos fisicamente, anestesiados com mistura de cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina e tiveram seus dados biométricos registrados. Em seguida, após incisão ventral, os testículos, epidídimos, glândulas vesiculares, ductos deferentes, fígado e rins foram retirados e mantidos em solução fixadora de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas, transferidos para álcool 70% e posteriormente pesados em balança de precisão. Um dos testículos, destinado às análises bioquímicas, foi pesado e resfriado em nitrogênio líquido, sendo mantido armazenado sob temperatura de -80 °C até sua utilização.

## **2.3. Análises morfométricas do compartimento intertubular do testículo**

### ***2.3.1. Cálculo da proporção volumétrica e do volume dos elementos do intertúbulo***

A proporção volumétrica (%) entre os componentes intertubulares foi obtida a partir da contagem de 1000 pontos projetados sobre imagens da região do intertúbulo, ao acaso, nos diferentes cortes histológicos do testículo de cada animal. As imagens foram adquiridas com aumento de 400× e foram considerados os seguintes elementos do intertúbulo: tecido conjuntivo, macrófagos, vasos sanguíneos, espaço linfático e células de Leydig. Para cálculo desta proporção utilizou-se a fórmula:

Proporção volumétrica do elemento no intertúbulo = (número de pontos do componente do intertúbulo × 100) / 1000 pontos totais.

O volume (mL) de cada componente do intertúbulo por testículo foi calculado a partir da proporção do elemento no testículo / 100 × massa do parênquima de um testículo.

Onde:

Proporção volumétrica (%) do elemento intertubular no testículo = (proporção volumétrica de intertúbulo × proporção volumétrica do elemento) / 100.

### **2.3.2. Morfometria da célula de Leydig**

#### *a) Cálculo do diâmetro nuclear médio*

O diâmetro nuclear médio ( $\mu\text{m}$ ) das células de Leydig foi mensurado utilizando imagens capturadas com objetiva de 40X e zoom de 1.5. Trinta núcleos de células de Leydig foram medidos em cada animal, utilizando-se programa de análise de imagens (Image Pro Plus), escolhendo-se os núcleos que apresentavam contorno esférico, cromatina perinuclear e nucléolos evidentes.

#### *b) Cálculo da relação nucleoplasmática*

Quinhentos pontos distribuídos ao acaso sobre núcleo e citoplasma das células de Leydig foram contados por animal, em imagens capturadas, utilizando-se objetiva de 40X e zoom de 1.5. Para se calcular a relação nucleoplasmática das células de Leydig, dividiu-se o percentual ocupado pelo núcleo pelo percentual ocupado pelo citoplasma e multiplicou-se por 100.

#### *c) Cálculo dos volumes nuclear, citoplasmático e de cada célula de Leydig*

Foram calculados os volumes ( $\mu\text{m}^3$ ) nuclear, citoplasmático e de cada célula de Leydig por animal aplicando-se as fórmulas abaixo:

Volume nuclear =  $4/3\pi R^3$ , onde R = raio nuclear;

Volume citoplasmático = (% citoplasma × volume nuclear) / % núcleo;

Volume celular = volume nuclear + volume citoplasmático.

*d) Cálculo do número de células de Leydig por testículo*

Obtido o volume individual da célula de Leydig, foi calculado o número de células de Leydig por testículo conforme fórmula seguinte:

Número de células de Leydig por testículo = volume que as células de Leydig ocupam por testículo ( $\mu\text{m}^3$ ) / volume de uma célula de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ )

Onde:

Volume que a célula de Leydig ocupa por testículo = (proporção da célula de Leydig no testículo  $\times$  massa do parênquima de um testículo) / 100

*e) Cálculo do número de células de Leydig por grama de testículo*

Este cálculo foi realizado de baseado na seguinte fórmula:

Número de células de Leydig por grama de testículo = volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo ( $\mu\text{m}^3$ ) / volume de uma célula de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ )

Onde:

Volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo = volume que a célula de Leydig ocupa por testículo / massa bruta de um testículo

*f) Cálculo do Índice Leydigossomático (ILS)*

Para se quantificar a proporção de células de Leydig, em relação à massa corporal, foi calculado o ILS (%), conforme a fórmula:

$$\text{ILS} = (\text{volume que a célula de Leydig ocupa nos testículos} / \text{MC}) \times 100$$

Onde:

Volume que a célula de Leydig ocupa nos testículos = (porcentual de Leydig nos testículos / 100) × massa do parênquima das gônadas;

MC = Massa corporal.

## **2.4. Análises Bioquímicas**

### ***2.4.1. Obtenção das amostras de tecidos para leitura das atividades enzimáticas***

Fragmentos de testículo (100 mg) foram homogeneizados em 1 mL de solução tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,4) e centrifugados a  $10.000 \times g$ , por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi armazenado em ultrafreezer a -80 °C.

### ***2.4.2. Determinação da atividade enzimática da Catalase (CAT, EC 1.11.1.6) no testículo***

A atividade da CAT foi determinada pela adição de 50 µL do extrato enzimático obtido em 2.4.1. a 950 µL de meio de reação, constituído de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,4 (modificado de Aebi, 1974). A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, no intervalo de 0 a 60 segundos. A atividade da enzima foi expressa em µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido por min por mg de proteína, sendo representada como unidade de CAT / miligrama de proteína (uma unidade de CAT = 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido por minuto).

### ***2.4.3. Determinação da atividade da Dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) no testículo***

A técnica utilizada foi modificada de Madesh e Balasubramanian (1998). O método envolve geração do ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) pela autooxidação de pirogalol e inibição da redução (dependente de superóxido) do corante MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio] a cristais de formazan. A SOD presente no extrato enzimático em estudo compete pelo radical superóxido, inibindo a redução do MTT a formazan (Figura 1).

A reação é terminada pela adição de dimetil sulfoxido (DMSO) que interrompe a reação e também ajuda a solubilizar os cristais formados.

Uma vez que não se consegue determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, se utiliza a quantificação em unidades relativas.

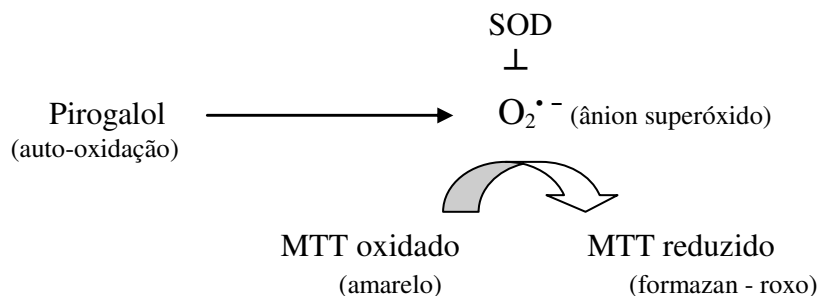


Figura 1 – Esquema da geração do ânion superóxido, sua participação na redução de MTT e inibição da reação pela SOD.

O meio de reação do ensaio consistiu de 15  $\mu$ L de pirogalol (1000  $\mu$ M), 6  $\mu$ L de MTT (1,25 mM) e 30  $\mu$ L do homogeneizado de testículo. O volume foi completado para 150  $\mu$ L com tampão fosfato de sódio (25 mM) pH 7,4.

A análise da variação de absorbância foi acompanhada a 570 nm pelo método de Elisa, sendo a placa incubada por 5 minutos a 37 °C na estufa antes da leitura. Através da curva padrão foi obtida a equação da reta para realização dos cálculos.

Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína, sendo uma unidade de SOD definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a redução de MTT.

#### **2.4.4. Dosagem de proteínas**

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Bradford, utilizando como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 0,2 mg/mL (Bradford, 1976).

Inicialmente preparou-se o reagente de Bradford 5 $\times$  que foi deixado em repouso por 12 horas e depois filtrado e armazenado em frasco âmbar envolvido em papel alumínio. Em seguida fez-se uma diluição de 15 $\times$  da amostra do homogenato de testículo, sendo

utilizados 30 µL desta com 900 µL de reagente de Bradford completando o volume com água para 1000 µL. As leituras foram feitas em 595 nm após 15 minutos da adição do reagente de Bradford.

## 2.5. Análises estatísticas

Análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Student Newman-Keuls (SNK), foi usada para comparar médias entre os grupos experimentais. Todos os resultados foram expressos em média ± desvio padrão da média. A probabilidade (*p*) de erro menor que 0,05 foi considerada significativa.

## 3. Resultados

### 3.1. Efeitos da exposição subcrônica ao As sobre a proporção volumétrica, o volume dos elementos do intertúbulo e a morfometria da célula de Leydig

A proporção volumétrica do espaço linfático aumentou ( $p < 0,05$ ) nos grupos expostos ao arsênio (As1 e As2) em relação ao controle, entretanto, não se verificou alterações significativas nas proporções dos outros elementos do intertúbulo (tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, macrófagos e células de Leydig).

Tabela 1 – Proporção volumétrica (%) dos elementos no intertúbulo de camundongos adultos, após administração oral de arsenato de sódio por 42 dias.

Grupos	Tecido conjuntivo	Espaço linfático	Vasos sanguíneos	Macrófagos	Células de Leydig
Controle	7,28±3,01 <sup>a</sup>	27,16±5,77 <sup>a</sup>	12,38±4,89 <sup>a</sup>	1,48±0,76 <sup>a</sup>	51,7±3,82 <sup>a</sup>
As1	3,76±1,59 <sup>a</sup>	50,22±16,23 <sup>b</sup>	8,52±5,61 <sup>a</sup>	0,82±0,41 <sup>a</sup>	36,68±15,67 <sup>a</sup>
As2	4,86±1,82 <sup>a</sup>	50,52±23,26 <sup>b</sup>	9,26±3,55 <sup>a</sup>	0,92±0,46 <sup>a</sup>	34,44±21,19 <sup>a</sup>

Valores agrupados por média ± desvio padrão.

Letras iguais nas colunas, não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ) ( $n = 10$ ). Controle: água potável; As1: solução de arsênio 0,05 mg/L; As2: solução de arsênio 1,0 mg/L.

Concernente ao volume dos elementos do intertúbulo verificou-se aumento significativo do volume de células de Leydig no grupo As2 em relação ao controle e do volume de espaço linfático em As1 e As2 em comparação com o controle, não se observando alterações nos volumes dos demais componentes do intertúbulo (Tabela 2).

Tabela 2 – Volume (mL) dos elementos no intertúbulo por testículo de camundongos adultos, após administração oral de arsenato de sódio por 42 dias.

Grupos	Tecido conjuntivo	Espaço linfático	Vasos sanguíneos	Macrófagos	Células de Leydig
Controle	0,00002±0,000009 <sup>a</sup>	0,0035±0,0005 <sup>a</sup>	0,0017±0,0008 <sup>a</sup>	0,0002±0,0004 <sup>a</sup>	0,007±0,0019 <sup>a</sup>
As1	0,00005±0,00004 <sup>a</sup>	0,0077±0,0021 <sup>b</sup>	0,0014±0,0011 <sup>a</sup>	0,0002±0,0001 <sup>a</sup>	0,004±0,0009 <sup>ab</sup>
As2	0,00004±0,000004 <sup>a</sup>	0,0081±0,0036 <sup>b</sup>	0,0019±0,0011 <sup>a</sup>	0,0002±0,0001 <sup>a</sup>	0,003±0,0004 <sup>b</sup>

Valores agrupados por média ± desvio padrão.

Letras iguais nas colunas, não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ) ( $n=10$ ). Controle: água potável; As1: solução de arsênio 0,05 mg/L; As2: solução de arsênio 1,0 mg/L.

### 3.2. Efeitos da exposição subcrônica ao As sobre a morfometria da célula de Leydig

Na análise morfométrica das células de Leydig, observou-se diminuição ( $p < 0,05$ ) do diâmetro nuclear médio nos grupos expostos às duas concentrações de As e da relação nucleoplasmática (RNP), cuja redução foi significativa apenas no grupo As2 em relação ao controle. A proporção de núcleo e citoplasma de células de Leydig e o ILS não variaram ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3 – Morfometria da célula de Leydig (diâmetro nuclear, proporção entre núcleo e citoplasma de células de Leydig, relação nucleoplasmática e índice leydigossomático) em testículos de camundongos adultos, após administração oral de arsenato de sódio por 42 dias.

Grupos	Diâmetro nuclear de Leydig ( $\mu\text{m}$ )	Núcleo de Leydig no intertúbulo (%)	Citoplasma de Leydig no intertúbulo (%)	RNP - Relação nucleoplasmática (%)	ILS - Índice leydigossomático (%)
Controle	6,91 $\pm$ 0,56 <sup>a</sup>	14,5 $\pm$ 1,48 <sup>a</sup>	37,2 $\pm$ 2,64 <sup>a</sup>	38,98 $\pm$ 2,79 <sup>a</sup>	0,038 $\pm$ 0,007 <sup>a</sup>
As1	6,55 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	9,28 $\pm$ 3,51 <sup>a</sup>	27,4 $\pm$ 12,27 <sup>a</sup>	34,46 $\pm$ 3,97 <sup>ab</sup>	0,032 $\pm$ 0,017 <sup>a</sup>
As2	6,48 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	8,66 $\pm$ 6,11 <sup>a</sup>	25,8 $\pm$ 15,09 <sup>a</sup>	31,77 $\pm$ 5,13 <sup>b</sup>	0,036 $\pm$ 0,022 <sup>a</sup>

Valores agrupados por média  $\pm$  desvio padrão.

Letras iguais nas colunas, não diferem significativamente entre si ( $p>0,05$ ) ( $n=10$ ). Controle: água potável; As1: solução de arsênio 0,05 mg/L; As2: solução de arsênio 1,0 mg/L.

O volume nuclear de Leydig apresentou-se diminuído ( $p<0,05$ ) nos grupos As1 e As2. Entretanto, os volumes citoplasmático e de uma célula de Leydig não acompanharam esta redução, permanecendo invariados, assim como o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo (Tabela 4).

Tabela 4 – Morfometria da célula de Leydig de camundongos adultos, após administração oral de arsenato de sódio por 42 dias.

Grupos	Volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ )	Volume citoplasmático ( $\mu\text{m}^3$ )	Volume de uma célula de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ )	Nº de células / testículo ( $\times 10^6$ )	Nº de células / grama de testículo ( $\times 10^6$ )
Controle	175,91 $\pm$ 45,55 <sup>a</sup>	428,20 $\pm$ 69,76 <sup>a</sup>	604,11 $\pm$ 107,32 <sup>a</sup>	11,96 $\pm$ 4,14 <sup>a</sup>	116,24 $\pm$ 32,45 <sup>a</sup>
As1	147,94 $\pm$ 14,77 <sup>b</sup>	431,78 $\pm$ 66,11 <sup>a</sup>	579,73 $\pm$ 79,11 <sup>a</sup>	10,14 $\pm$ 4,51 <sup>a</sup>	95,07 $\pm$ 49,37 <sup>a</sup>
As2	142,95 $\pm$ 15,17 <sup>b</sup>	458,39 $\pm$ 66,75 <sup>a</sup>	601,34 $\pm$ 70,10 <sup>a</sup>	12,60 $\pm$ 8,39 <sup>a</sup>	98,68 $\pm$ 63,34 <sup>a</sup>

Valores agrupados por média  $\pm$  desvio padrão.

Letras iguais nas colunas, não diferem significativamente entre si ( $p>0,05$ ) ( $n=10$ ). Controle: água potável; As1: solução de arsênio 0,05 mg/L; As2: solução de arsênio 1,0 mg/L.

### 3.2. Efeito da exposição subcrônica ao As sobre a atividade enzimática de SOD e CAT testiculares

A atividade enzimática da dismutase do superóxido (SOD) apresentou-se aumentada ( $p < 0,05$ ) nos testículos dos animais que receberam arsênio em sua maior concentração (As2), em relação ao tratamento As1 e ao controle (Figura 2).

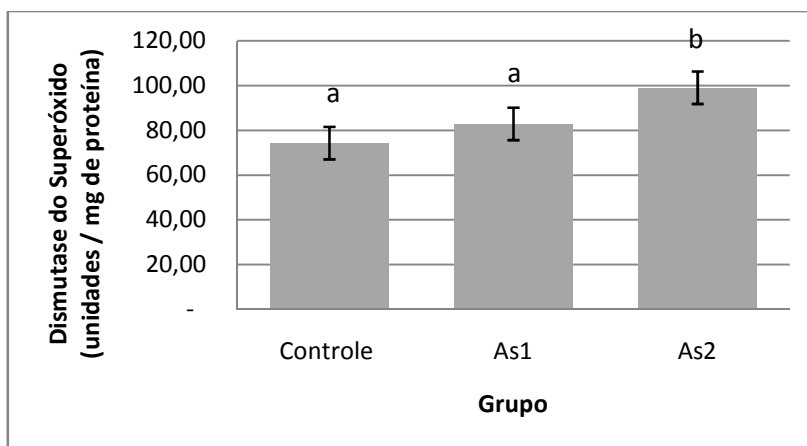


Figura 2 – Atividade da dismutase do superóxido (SOD) em testículos de camundongos, após administração oral de arsenato de sódio por 42 dias.

Médias ( $\pm$  erro padrão) seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ). Controle: água potável; As1: solução de arsênio 0,05 mg/L; As2: solução de arsênio 1,0 mg/L.

Análises estatísticas revelaram que a administração de baixas doses de arsênio (As1 e As2) diminuíram significativamente a atividade da catalase (CAT) em homogenatos de testículo de animais tratados (As1 e As2) quando comparado com animais que administraram apenas água (Controle) (Figura 3).

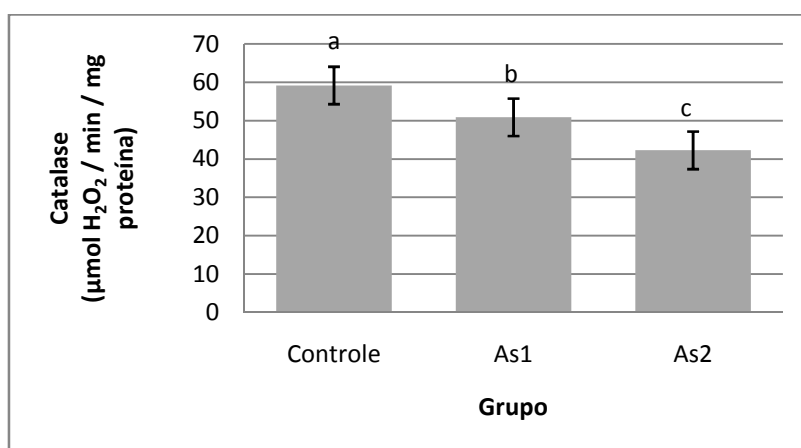


Figura 3 – Atividade da catalase (CAT) em testículos de camundongos, após administração oral de arsenato de sódio por 42 dias.

Médias ( $\pm$  erro padrão) seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ). Controle: água potável; As1: solução de arsênio 0,05 mg/L; As2: solução de arsênio 1,0 mg/L.

## **4. Discussão**

### **4.1. Efeito da exposição subcrônica ao As sobre a proporção volumétrica e volume dos elementos do intertúbulo e sobre a morfometria da célula de Leydig**

O compartimento intertubular representa a porção endócrina do testículo e, embora o arranjo e a proporção dos seus diferentes componentes variem sobremaneira entre as diferentes espécies, é o responsável pela manutenção dos níveis fisiológicos de andrógenos no fluido intersticial e na circulação sanguínea (Fawcett et al., 1973).

Segundo Jana et al. (2006) e Mehranjani e Hemadi (2007), a exposição ao arsenito de sódio determina inibição da androgênese testicular em ratos, a qual é exercida pelas células de Leydig. Aproximadamente 90% da testosterona no sangue são produzidas pelas células de Leydig e, por isso, modificação em sua morfologia pode levar a efeitos sobre a espermatogênese (Chen et al., 2011). Este hormônio é necessário para iniciação da espermatogênese na puberdade e para manutenção desse processo no adulto, sendo requerido para finalização da meiose e para diferenciação das espermátides (Castro et al., 2002; Liu e Handelsman, 2003).

O tratamento com arsenato de sódio não causou alteração na proporção de células de Leydig no intertúbulo, nem no volume das mesmas no testículo. Estudos correlacionando estrutura e função das células de Leydig mostraram que variações na secreção de testosterona resultam mais da capacidade individual da célula de Leydig de secretar testosterona do que de diferenças no volume total das mesmas no testículo (Ewing et al., 1979). Esta capacidade está altamente associada à quantidade de retículo endoplasmático liso presente na célula de Leydig e ao seu volume nuclear (Zirkin et al., 1980; Castro et al., 2002).

Os vasos linfáticos possuem capacidade de se remodelar (plasticidade) (Karpanen et al., 2006), portanto, o aumento significativo observado na proporção de espaço linfático nos animais que receberam solução de arsênio (As1 e As2) deve ser devido ao espaço deixado pela diminuição dos outros componentes do intertúbulo, principalmente das células de Leydig, elemento mais abundante no compartimento intertubular. No testículo há uma vasta rede de vasos linfáticos sinusóides que desempenha papel importante na nutrição e fornecimento de andrógenos aos túbulos seminíferos, mantendo adequadas as concentrações de andrógenos (Creasy, 2001; Foley, 2001), tendo também a habilidade de

drenar fluidos extracelulares e mover para fora dos testículos materiais vascularmente secretados (Fawcett et al., 1973).

Ação do As no testículo pode gerar estresse oxidativo celular, aumentando a produção de intermediários reativos de oxigênio (ROI's). Estas substâncias influenciam a liberação de fatores pró-inflamatórios pelos macrófagos e, dependendo da intensidade do estresse, podem levar à redução na proporção das células de Leydig (Papadopoulos, 2007), redução essa observada de forma não significativa no presente trabalho. Durante o desenvolvimento testicular, mudanças na morfologia das células de Leydig ocorrem de maneira coordenada com os macrófagos, demonstrando íntima relação entre estas células. Assim, entende-se que fatores secretados pelos macrófagos controlam de um modo parácrino a atividade esteroidogênica e o desenvolvimento das células de Leydig (Hales, 1996). Enquanto o número de macrófagos da maioria dos órgãos aumenta pela migração de monócitos sanguíneos para os tecidos periféricos, o número de macrófagos testicular aumenta principalmente por proliferação, não sendo este aumento mediado pela testosterona (Raburn et al., 1993).

A redução observada no volume nuclear das células de Leydig, reflexo da diminuição significativa no diâmetro nuclear, não foi acompanhada pela redução do volume citoplasmático e celular. Segundo Castro et al. (2002), o volume nuclear da célula de Leydig está fortemente relacionado à concentração de testosterona testicular e plasmática e assim, esta redução no volume nuclear está ligada à redução da atividade nuclear das células de Leydig e, provavelmente, acarreta redução significativa nas concentrações testiculares ou plasmáticas de testosterona nos grupos expostos ao As. Em ratos tratados com arsenito de sódio (30 e 40 mg/L), o diâmetro nuclear das células de Leydig reduziu gradativamente em 45 e 60 dias, sendo observada também redução na população destas células (Sarkar et al., 2008). Em tratamento de camundongos com solução de arsênio (100 mg/L), constatou-se que a redução do volume nuclear da célula de Leydig causou diminuição significativa nas concentrações plasmáticas de testosterona (Mata, 2009).

Segundo Castro et al. (2002), não há correlação entre altas concentrações de testosterona e aumento da atividade espermatogênica, sendo possível que as concentrações deste hormônio só precisem alcançar, ou exceder, um certo nível limiar para que a espermatogênese proceda normalmente. Assim sendo, baixas concentrações de testosterona são ser especialmente danosas para a reprodução.

Juntamente com a massa corporal, o volume individual e total de células de Leydig no parênquima testicular e o número total desta célula no testículo não variaram nos animais expostos ao As, refletindo na conservação do ILS, um parâmetro que visa quantificar o investimento da massa corporal na produção de células de Leydig. O valor estimado de ILS para camundongos é de 0,03% (Russell, 1996).

Assim, diante das alterações observadas na célula de Leydig, no referido tempo de exposição, sugerimos que pode ter havido redução significativa na androgênese. Entretanto, dados provenientes de análise plasmática de andrógenos e da morfometria de organelas, como o retículo endoplasmático liso, poderiam constatar com maior precisão alterações relacionadas à produção androgênica.

#### **4.2. Efeito da exposição subcrônica ao As sobre a atividade da dismutase do superóxido (EC 1.15.1.1) e catalase (EC 1.11.1.6) no testículo**

O As tem potencial de favorecer o aumento da síntese de SOD e CAT, ativando o complexo protéico NF- $\kappa$   $\beta$ , que participa da transcrição de DNA e está envolvido em respostas celulares a estímulos como o estresse, radicais livres, etc. (Bartosz, 1990). Se a exposição persistir por períodos longos, dependendo da dose e da via administrada, podem ocorrer alterações em fatores de transcrição, como inibição de NF- $\kappa$   $\beta$ , levando à formação excessiva de radicais livres (De Vizcaya-Ruiz et al., 2009) a ponto de gerar estresse oxidativo, diminuindo assim as defesas antioxidantes enzimáticas da célula. No presente trabalho, a verificação de aumento na atividade da SOD nos testículos indica a participação ativa desse sistema enzimático no combate à ação oxidativa dos intermediários reativos de oxigênio, gerados em decorrência da exposição dos animais ao As.

A resposta antioxidante ao As parece ser tempo-dependente visto que as atividades de SOD e CAT crescem inicialmente, mas declinam depois de exposição prolongada (De Vizcaya-Ruiz et al., 2009), lembrando que a concentração administrada também é um fator que influencia a resposta. Há indicação que o grau tóxico de manifestação de diferentes substâncias depende da dose, duração, via de administração, dentre outros fatores fisiológicos (Al-Attar, 2011).

Nandi et al. (2006) verificaram aumento inicial (na quarta semana) nas atividades enzimáticas de SOD e CAT nos rins e no fígado de animais tratados com solução de arsenito de sódio (10 ppm) em relação ao controle, seguido de diminuição na décima

segunda semana de exposição. Os autores propuseram que a diminuição pode ter sido devido à redução da síntese ou sobreutilização de enzimas antioxidantes em decorrência do persistente estresse tóxico. Assim, concluíram que exposição a baixas doses de As por um curto período de tempo causa ativação da defesa antioxidante intrínseca, mas que o prolongamento da exposição pode afetar negativamente esse mecanismo de defesa.

Apesar do nosso ensaio ter sido com testículo, e não com rim ou fígado, podemos inferir que o significativo ( $p < 0,05$ ) aumento da atividade de SOD nos testículos do grupo As2 em relação ao As1 e ao controle, ao final de 6 semanas de exposição, é atribuído ao aumento da regulação da síntese de SOD, como uma resposta de proteção contra o estresse oxidativo causado pela elevação da concentração do ânion superóxido, conforme relatado por Nandi et al. (2006).

Segundo Scandalios (2002), como o ânion superóxido e seus derivados são altamente tóxicos ao metabolismo, a ocorrência de uma atividade basal de SOD torna-se necessária à manutenção adequada dos mecanismos de proteção celular contra peroxidação dos lipídios. Como consequência da maior atividade da SOD nos testículos dos grupos tratados com As, esperava-se concomitante aumento da atividade enzimática da CAT, o que não foi confirmado pelas nossas análises.

A diminuição na atividade de CAT observada nos testículos de animais tratados com As indica que essa enzima não teve participação efetiva na eliminação de  $H_2O_2$  resultante da atividade da SOD na gônada. Swathy et al. (2006) também observaram, ao final de 60 dias, diminuição da atividade da CAT nos testículos de ratos tratados com etanol (4g etanol/kg de massa corporal).

Vernet et al. (2004) consideram que a atuação da CAT torna-se importante apenas quando as concentrações de  $H_2O_2$  são elevadas, podendo ser atingidas durante um grande desequilíbrio oxidativo ou durante uma superexpressão de SOD. No presente trabalho é possível que o aumento da atividade da SOD no testículo investigado tenha elevado a concentração de  $H_2O_2$  no testículo, mas não a ponto de alcançar o limiar para que a resposta da CAT fosse satisfatória.

Sendo assim, presume-se que a exposição ao As no período de confinamento contribuiu para maior produção de  $H_2O_2$ , o qual não foi eliminado na mesma proporção com que foi produzido, já que a atividade de CAT nos grupos tratados diminuiu significativamente em relação ao controle. Desta forma, podemos sugerir uma participação

limitada dessa enzima nos mecanismos de eliminação de  $H_2O_2$  sintetizado como resposta à toxicidade do arsênio nos testículos.

A diminuição da atividade de CAT nos testículos dos animais expostos ao As está em concordância com o observado por Sainath et al. (2011) nos testículos de ratos tratados com chumbo, quando comparados ao grupo controle. Da mesma forma, o tratamento de ratos com acetato de chumbo, diminuiu a atividade enzimática da CAT nos tecidos de rins e fígado analisados (Trivedi et al., 1998). Atividades diminuídas dessa enzima, que tem papel antioxidante, sugerem uma tendência ao aumento da peroxidação lipídica, que não foi quantificada neste trabalho.

Desta forma, os dados indicam que administração de As nas concentrações utilizadas promove alterações nas defesas enzimáticas da SOD e da CAT celulares, causando estresse oxidativo testicular, processo que desempenha um importante papel na infertilidade masculina.

## **5. Conclusões**

As doses de arsênio afetaram os parâmetros morfométricos do compartimento intertubular, especialmente no grupo exposto à maior concentração. Alterações verificadas na morfometria da célula de Leydig estão associadas, principalmente, com o comprometimento da esteroidogênese.

Administração de As provocou alteração nas defesas antioxidantes de SOD e CAT no testículo, permitindo sugerir que houve aumento na produção de  $H_2O_2$  pela SOD concomitantemente a uma diminuição de defesa antioxidante de CAT, ocasionando o processo conhecido como estresse oxidativo, um dos primeiros sinais da toxicidade desse elemento químico no órgão.

Os dados apresentados indicam que ingestão subcrônica de As provoca alterações nas defesas enzimáticas do testículo e afeta sua porção endócrina, promovendo modificações na histologia do compartimento intertubular que conduzem a mudanças na atividade esteroidogênica.

## 6. Referências bibliográficas

Aebi H. 1974. Catalase. In: Bergmeyer HU (Ed): *Methods of Enzymatic Analysis*. 2<sup>nd</sup> ed. Weinheim: Verlag Chemie 673-684.

Al-Attar AM . 2011. Antioxidant effect of vitamin E treatment on some heavy metals-induced renal and testicular injuries in male mice. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18:63-72.

Bartosz G. 1990. Erythrocytes membrane changes during ageing in vitro. In: Hariss JR (Ed.): *Blood Cell Biochemistry: Erythroid Cells*. Vol. 1. New York: Plenum Press 81-120.

Borba RP, Figueiredo BR, Rawlins B, Matschullat J. 2000. Arsenic in water and sediment in the Iron Quadrangle, state of Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Geociências* 30:558-561.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

Castro ACS, Berndtson WE, Cardoso FM. 2002. Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35:493-498.

Chen Y, Parvez F, Gamble M, Islam T, Ahmed A, Argos M, Graziano JH, Ahsan H. 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. *Toxicology and Applied Pharmacology* 239:184-192.

Chen Y, Xu J, Li Y, Han X. 2011. Decline of sperm quality and testicular function in male mice during chronic low-dose exposure to microcystin-LR. *Reproductive Toxicology* 31:551-557.

Creasy DM. 2001. Pathogenesis of male Reproductive Toxicity. *Toxicologic Pathology* 29:64-76.

De Vizcaya-Ruiz A, Barbier O, Ruiz-Ramos R, Cebrian ME. 2009. Biomarkers of oxidative stress and damage in human populations exposed to arsenic. *Mutation Research* 674:85-92.

Dellmann H, Wrobel K. 1982. Sistema reprodutor masculino. In: Dellmann H, Brown EM (Eds): *Histologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 12:232-253.

Ewing LL, Zirkin BR, Cochran RC, Kromann N, Peters C, Ruiz-Bravo N. 1979. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. *Endocrinology* 105:1135-1142.

Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN. 1973. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of Reproduction* 9:500-532.

Ferreira ALA, Matsubara LS. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira* 43:61-68.

Foley GL. 2001. Mechanisms of male reproductive organ toxicity - Overview of male reproductive pathology. *Toxicologic Pathology* 29:49-63.

Hales BD. 1996. Leydig cell-macrophage interactions: an overview. In: Payne AH, Hardy MP, Russell LD (Eds): *The Leydig Cell*. Vienna, Illinois: Cache River Press 451-465.

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. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4:9.

Karnovsky MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* 27:137-138.

Karpanen T, Wirzenius M, Makinen T, Veikkola T, Haisma HJ, Achen MG, Stacker SA, Pytowski B, Yla-Herttuala, Alitalo K. 2006. Lymphangiogenic growth factor responsiveness is modulated by postnatal lymphatic vessel maturation. *The American Journal of Pathology* 169:708-718.

Kaur P, Bansal MP. 2004. Effect of experimental oxidative stress on steroidogenesis and DNA damage in mouse testis. *Journal of Biomedical Science* 11:391-397.

Liu PY, Handelsman DJ. 2003. The present and future state of hormonal treatment for male infertility. *Human Reproduction Update* 9:9-23.

Madesh M, Balasubramanian KA. 1998. Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. *Indian Journal of Biochemistry e Biophysics* 35:184-188.

Maneesh M, Jayaleskshmi H. 2006. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 21:80-89.

Mehranjani MS, Hemadi M. 2007. The effects of sodium arsenite on the testis structure and sex hormones in vasectomized rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 5:127-133.

Mata WS. Toxicidade do arsenato e efeito protetor do guaraná e da vitamina E no aparelho reprodutor de camundongos machos adultos. 2009. 138 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Nandi D, Patra RC, Swarup D. 2006. Oxidative stress indices and plasma biochemical parameters during oral exposure to arsenic in rats. *Food and Chemical Toxicology* 44:1579-1584.

Neto JMFA, Silva LP, Macedo DV. 2008. Proteínas de estresse “hsp70” atuam como marcadoras de estresse oxidativo em ratos “wistar” submetidos a treinamento intermitente de corrida para indução de overreaching. *Brazilian Journal of Biomotricity* 2:160-175.

Papadopoulos V. 2007. Environmental factors that disrupt Leydig cell steroidogenesis. In: Payne AH, Hardy MP (Eds): Contemporary Endocrinology: The Leydig cell in the health and disease. New Jersey: Humana Press 393-413.

Parada B, Requixa A, Figueiredo A, Mota A. 2004. Infertilidade masculina e fatores ambientais. Acta Urológica 21:9-15.

Pokhrel D, Thiruvengkatachari V. 2009. Biological filtration for removal of arsenic from drinking water. Journal of Environmental Management 90:1956-1961.

Raburn DJ, Reinhart AJ, Hutson JC. 1993. Regulation of the macrophage population in postnatal rat testis. Journal of Reproductive Immunology 24:139-151.

Russell LD. 1996. Mammalian Leydig cell structure. In: Payne AH, Hardy MP, Russell LD (Eds): The Leydig Cell. Vienna: Cache River Press 43-96.

Russell LD, Ettlin RA, SinhaHikim AP, Clegg ED. 1990. Mammalian Spermatogenesis. In: Russell LD, Ettlin RA, SinhaHikim AP, Clegg ED (Eds): Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Bolesta: Cache River Press 1-4.

Sainath SB, Meena R, Supriya Ch, Reddy KP, Reddy PS. 2011. Protective role of *Centella asiatica* on lead-induced oxidative stress and suppressed reproductive health in male rats. Environmental Toxicology and Pharmacology 32:146-154.

Sarkar S, Hazra J, Upadhyay SN, Singh RK, Chowdhury AR. 2008. Arsenic induced toxicity on testicular tissue of mice. Indian Journal of Physiology and Pharmacology 52:84-90.

Scandalios JG. 2002. The rise of ROS. Trends in Biochemical Sciences 27:483-486.

Setchell BP. 1991. Male reproductive organs and semen. In: Cupps PT (Ed): Reproduction in Domestic Animals. San Diego: Academic Press 6:221-250.

Swathy SS, Panicker S, Indira M. 2006. Effect of exogenous selenium on the testicular toxicity induced by ethanol in rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 50:215-224.

Tiwari AK, Pragya P, Ram KR, Chowdhuri DK. 2011. Environmental chemical mediated male reproductive toxicity: *Drosophila melanogaster* as an alternate animal model. *Theriogenology* 76:197-216.

Trivedi R, John S, Rathore N, Kale M, Bhatnagar D. 1998. Effect of vitamin E on the changes in lead-induced lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues. *Trace Elements and Electrolytes* 15:200-204.

Turner TT, Lysiak JJ. 2008. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *Journal of Andrology* 29:488-498.

Vázquez DM. 1998. Stress and the development limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology* 23:663-700.

Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR. 2004. Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 216:31-39.

WHO - World Health Organization. 2011. Guidelines for drinking-water quality [electronic resource]: incorporating first addendum. 4<sup>th</sup> ed. Geneva 315-318.

Zirkin BR, Ewing LL, Kromann N, Cochran RC. 1980. Testosterone secretion by rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cells ultrastructure. *Endocrinology* 107:1867-1874.

## **Conclusões gerais**

A administração de arsênio (As), na forma de arsenato de sódio, causou aumento significativo na massa dos rins, sugerindo possível toxicidade neste órgão e maior atividade no processo de desintoxicação; provocou alterações nas defesas enzimáticas dos testículos e afetou sua porção endócrina sem, no entanto, serem observadas modificações relevantes na histologia do compartimento tubular que indicassem alterações na atividade espermatogênica.

A ingestão subcrônica de arsênio na concentração de 0,05 mg/L, admitida por algumas legislações internacionais, não causou, no tempo observado, efeitos adversos nos testículos de camundongos que pudessem indicar comprometimento da função espermatogênica. Entretanto, é importante ressaltar que alterações enzimáticas gerando estresse oxidativo e modificações nas células produtoras de testosterona são os primeiros sinais de um possível agravo na morfofisiologia reprodutiva. Assim, efeitos danosos em longo prazo não podem ser excluídos.