

FRANCIELLE DE FÁTIMA VIANA SANTANA

**TOXICOLOGIA DO ARSENATO, ARSENITO, CÁDMIO, CHUMBO, CROMO E
NÍQUEL EM TESTÍCULOS DE CAMUNDONGOS SWISS ADULTOS APÓS
EXPOSIÇÃO CRÔNICA POR VIA INTRAPERITONEAL**

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*.

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2021**

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

T

S232t
2021 Santana, Francielle de Fátima Viana, 1995-
Toxicologia do arsenato, arsenito, cádmio, chumbo, cromo e níquel
em testículos de camundongos Swiss adultos após exposição crônica
por via intraperitoneal / Francielle de Fátima Viana Santana. - Viçosa,
MG, 2021.

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

Inclui apêndice.

Orientador: Sergio Luis Pinto da Matta.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Metais pesados. 2. Testes de toxicidade. 3. Reprodução. 4.
Espermatogênese em animais. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 571.1935

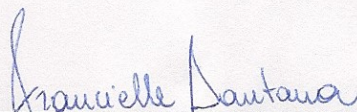
FRANCIELLE DE FÁTIMA VIANA SANTANA

TOXICOLOGIA DO ARSENATO, ARSENITO, CÁDMIO, CHUMBO, CROMO E
NÍQUEL EM TESTÍCULOS DE CAMUNDONGOS SWISS ADULTOS APÓS
EXPOSIÇÃO CRÔNICA POR VIA INTRAPERITONEAL


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: 09 de março de 2021.

Assentimento:



Francielle de Fátima Viana Santana
Autora



Sérgio Luis Pinto da Matta
Orientador

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que esteve comigo em todos os momentos, me dando força e sabedoria nas dificuldades.

Aos meus pais Rita e Paulo, por sempre acreditarem em mim e por serem exemplos de dedicação. Aos meus irmãos, Kátia e Paulo Jr. por serem meu espelho de vida acadêmica.

Ao meu namorado Darley, pelo amor e incentivo.

Aos amigos de Viçosa, por toda leveza e companheirismo que trouxeram a essa jornada.

À todas amigas do Laboratório de Biologia Estrutural, pelos ensinamentos e pela paciência. Agradeço de forma especial a Janaína, Amanda e Diane que se dedicaram, com muito carinho junto comigo para realização deste trabalho.

Ao meu orientador Sérgio Luis Pinto da Matta, por ser um educador incrível, pela oportunidade e pela confiança.

Aos membros da banca, Profa. Fabiana Melo e Sirlene Sartori, pelas contribuições e disponibilidade.

À Universidade Federal de Viçosa – UFV, todos os funcionários, alunos, professores e aos laboratórios de Biofísica Ambiental, Sistemática Molecular, Ultraestrutura Celular, Biologia Molecular de Insetos, Imunoquímica e Glicobiologia e de Patologia Experimental que sempre estiveram à disposição para me ajudar no desenvolvimento das análises.

Ao Programa de Biologia Celular e Estrutural e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro imprescindível durante todo o período deste trabalho.

RESUMO

SANTANA, Francielle de Fátima Viana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2021. **Toxicologia do arsenato, arsenito, cádmio, chumbo, cromo e níquel em testículos de camundongos Swiss adultos após exposição crônica por via intraperitoneal.** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.

Alguns resíduos estão relacionados a emergências de saúde ambiental por causarem impactos no ecossistema e na saúde humana. Entre esses resíduos se destacam os metais pesados. O termo metal pesado se estende a uma variedade de metais, entre eles o cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr VI) e níquel (Ni) e semimetais como o arsênio (As), em suas formas oxidadas +5 (arsenato) e +3 (arsenito). Nos testículos, os metais pesados podem prejudicar células em divisão e diferenciação, causando danos morfológicos e funcionais, podendo ainda afetar as células de Leydig e a produção de testosterona. Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar o impacto da exposição intraperitoneal crônica aos metais pesados. As^{+5} , As^{+3} , Cd, Pb, Cr (VI) e Ni nos testículos de camundongos Swiss adultos e estabelecer uma ordem de toxicidade entre eles. Foram utilizados 42 camundongos Swiss em idade reprodutiva, distribuídos aleatoriamente em sete grupos experimentais (n=6 animais/grupo). A exposição aos metais pesados foi feita em doses semanais, via intraperitoneal, de forma que o grupo 1 recebeu 0,7mL de solução salina 0,9% (controle), o grupo 2 recebeu 1,5 mg/Kg de arsenato, o grupo 3 recebeu 1,5 mg/Kg de arsenito, o grupo 4 recebeu 1,5 mg/kg de cádmio, o grupo 5 recebeu 1,5 mg/Kg de cromo, o grupo 6 recebeu 1,5 mg/Kg de níquel e o grupo 7 recebeu 1,5 mg/Kg de chumbo, durante um período de seis semanas. Os animais foram eutanasiados após 42 dias, sendo os testículos retirados e pesados. Os dados não paramétricos foram comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis e os dados paramétricos por meio de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls e foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$. Nossos resultados mostram que Cd e Ni foram capazes de afetar a morfometria do tecido testicular, enquanto As, Pb, Cr (VI) e Ni alteraram o status oxidativo. Além disso, alterações histopatológicas foram identificadas após exposição a todos os metais pesados. Assim, a comparação de toxicidade entre os metais estudados neste trabalho estabelece que $Ni > Cd > Pb = As^{+3} > Cr (VI) > As^{+5}$. Os dados desse trabalho podem contribuir para melhor compreensão da toxicidade dos metais pesados para a saúde reprodutiva e podem guiar futuras

terapias para o tratamento de danos por meio de apropriado reparo após exposição aos metais pesados.

Palavras-chave: Metais pesados. Toxicidade reprodutiva. Espermatogênese.

ABSTRACT

SANTANA, Francielle de Fátima Viana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2021. **Toxicology of arsenate, arsenite, cadmium, lead, chromium and nickel in testes of adult Swiss mice after chronic exposure by intraperitoneal route.** Advisor: Sérgio Luis Pinto da Matta.

Some residues are related to environmental health emergencies because they cause impacts on the ecosystem and human health. Among these residues, heavy metals stand out. The term heavy metal extends to a variety of metals, including cadmium (Cd), lead (Pb), chromium (Cr VI) and nickel (Ni) and semimetals like arsenic (As), in their oxidized forms +5 (arsenate) and +3 (arsenite). In the male reproductive system, specifically in the testes, heavy metals can harm cells in division and differentiation, causing morphological and functional damage. In addition, they affect Leydig cells and, consequently, the production of steroid hormones. Thus, the objectives of this study were to identify the impact of chronic intraperitoneal exposure to heavy metals arsenate, arsenite, cadmium, lead, chromium and nickel in the testes of adult Swiss mice and establish an order of toxicity among the metals studied. 42 Swiss mice in reproductive age (140 days) were used, which were randomly divided into seven experimental groups (n = 6 animals / group). The group 1 received 0.7mL 0.9% saline (control), group 2 received 1.5 mg/ kg of arsenic in the form of arsenate, group 3 received 1.5 mg/ kg of arsenic in the form of arsenite, group 4 received 1.5 mg/ kg of cadmium, group 5 received 1.5 mg/ kg of chromium and group 6 received 1.5 mg/ kg of nickel and group 7 received 1.5 mg/ kg of lead. Exposure to heavy metals was made in weekly doses, intraperitoneally, over a period of six weeks. The animals were euthanized after 42 days of experiment and then the testes were removed and weighed. Non-parametric data were compared using the Kruskal-Wallis test and parametric data using analysis of variance (ANOVA) followed by the Student Newman-Keuls test and were considered significant when $p \leq 0.05$. Our results indicated that Cd and Ni were able to affect the morphometry of the testicular tissue, while As, Pb, Cr (VI) and Ni altered the oxidative status. In addition, histopathological changes were identified after exposure to all heavy metals. Thus, the toxicity comparison between the metals studied in this work establishes that $Ni > Cd > Pb = As^{+3} > Cr (VI) > As^{+5}$. The data from this work can contribute to a better understanding of the toxicity of heavy metals for reproductive health. Furthermore, they can

guide future therapies for treatment of damage through appropriate repair after exposure to heavy metals.

Keywords: Heavy metals. Reproductive toxicology. Spermatogenesis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Proporção entre os metais pesados no testículo de camundongos Swiss após exposição intraperitoneal ao arsenato (As^{+5}), arsenito (As^{+3}), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr) e níquel (Ni). Sal – Salina (controle). 40
- Figura 2 – Proporção (%) e volume (μL) de túbulo, epitélio seminífero, lúmen e túnica própria de testículo de camundongos Swiss após exposição crônica intraperitoneal ao arsenato (As^{+5}), arsenito (As^{+3}), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo VI (Cr) e níquel (Ni). Sal – Salina. 41
- Figura 3 – Proporção de túbulos seminíferos normais e túbulos seminíferos com patologias leves (vacúolos na base, vacúolos no ápice e vacúolos na base e no ápice), moderadas (desprendimento de epitélio e túbulos apenas com células basais) e severas (túbulos apenas com células de Sertoli e túbulos desprovidos de células de Sertoli ou células germinativas) nos testículos de camundongos Swiss após exposição crônica intraperitoneal ao arsenato (As^{+5}), arsenito (As^{+3}), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo VI (Cr) e níquel (Ni). 46
- Figura 4 - Fotomicrografias testiculares de camundongos Swiss machos após exposição intraperitoneal crônica aos metais pesados. 47
- Figura 5 – Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST nos testículos de camundongos Swiss após exposição crônica intraperitoneal ao arsenato (As^{+5}), arsenito (As^{+3}), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo VI (Cr) e níquel (Ni). 48
- Figura 6 – Marcadores de estresse oxidativo MDA, ON e PCN nos testículos de camundongos Swiss após exposição crônica intraperitoneal ao arsenato (As^{+5}), arsenito (As^{+3}), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo VI (Cr) e níquel (Ni). 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros biométricos corporais e testiculares de camundongos Swiss após exposição intraperitoneal crônica ao arsenato (As+5), arsenito (As+3), cádmio (Cd), cromo (Cr VI), níquel (Ni) e chumbo (Pb).	39
Tabela 2 – Parâmetros morfométricos testiculares de camundongos Swiss após exposição intraperitoneal crônica ao arsenato (As+5), arsenito (As+3), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr VI) e níquel (Ni).	42
Tabela 3 – Proporção do intertúbulo e dos componentes do intertúbulo de camundongos Swiss após exposição intraperitoneal crônica ao arsenato (As+5), arsenito (As+3), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr VI) e níquel (Ni).	44
Tabela 4 – Volume do intertúbulo e dos componentes do intertúbulo de camundongos Swiss após exposição intraperitoneal crônica ao arsenato (As+5), Arsenito (As+3), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Cromo (Cr VI) e Níquel (Ni).	45
Tabela Complementar 1 – Parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig de camundongos Swiss após exposição intraperitoneal crônica ao arsenato (As ⁺⁵), arsenito (As ⁺³), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr) e níquel (Ni).	61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Metais pesados	14
2.2 Arsênio	15
2.3 Cádmio	16
2.4 Chumbo	17
2.5 Cromo	18
2.6 Níquel	18
2.7 Sistema Reprodutor masculino	19
2.8 Metais no sistema reprodutor	21
2.9 Estresse oxidativo	22
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos	24
4 REFERÊNCIAS	25
5 ARTIGO I	31
5.1 INTRODUÇÃO	31
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	32
5.2.1 Animais	32
5.2.2 Delineamento experimental	33
5.2.3 Biometria corporal e testicular	33
5.2.4 Determinação do acúmulo de metais pesados	34
5.2.5 Processamento do material histológico	34
5.2.6 Morfometria e estereologia tubular	34
5.2.7 Morfometria e estereologia intertubular	35
5.2.8 Análise histopatológica testicular	36
5.2.9 Avaliação do status oxidativo	36
5.2.10 Análise das enzimas antioxidantes	36
5.2.11 Determinação do produto de estresse oxidativo – Malondialdeído (MDA)	37
5.2.12 Oxido nítrico (ON)	37
5.2.13 Oxidação de proteínas	37
5.2.14 Análises estatísticas	38

5.3 RESULTADOS	38
5.3.1 Biometria corporal e testicular	38
5.3.2 Determinação do acúmulo de metais pesados	40
5.3.3 Morfometria e estereologia tubular	40
5.3.4 Morfometria e estereologia intertubular	43
5.3.5 Histopatologia testicular	46
5.3.6 Status oxidativo	48
5.4 DISCUSSÃO	49
5.5 CONCLUSÕES	54
6 REFERÊNCIAS	55
APÊNDICE	61

1. INTRODUÇÃO

Metais e semimetais, como elementos essenciais e não essenciais, estão naturalmente presentes no ambiente em concentrações altamente variáveis (WANG *et al.*, 2016). A população em geral está exposta a eles em concentrações residuais voluntariamente, por meio de suplementação, ou involuntariamente por meio da ingestão de alimentos e água contaminados ou contato com solo, poeira ou ar contaminados (MEEKER *et al.*, 2010).

Os metais pesados são elementos que se associam à contaminação e ao potencial toxicidade ou ecotoxicidade (DUFFUS, 2002). O semimetal arsênio é encontrado em diversas formas no ambiente natural e ocorre nos estados de oxidação arsenato (+5) e arsenito (+3) (DIONÍSIO *et al.*, 2011) e, juntamente com os metais cádmio, chumbo, cromo e níquel, estão inclusos no grupo dos metais pesados.

Os metais pesados podem comprometer algumas atividades biológicas. Todos os sistemas enzimáticos são potencialmente suscetíveis aos metais pesados (MOREIRA e MOREIRA, 2004) e esse efeito adverso varia, considerando-se as doses a que um ser vivo foi exposto, o tempo de exposição, a natureza química e física do elemento e seu efeito cumulativo no organismo (LIU *et al.*, 2008; SCHIMTT – JANSEN *et al.*, 2008).

O testículo, gônada responsável pela produção de testosterona e de espermatozoides, sofre impactos pelo contato com metais pesados. Estes são tóxicos para a reprodução e causam alterações nos níveis dos hormônios reprodutivos e na morfologia das gônadas, mesmo em graus considerados subclínicos, mas que podem estar associadas ou levar à diminuição da fertilidade e da saúde reprodutiva (MEEKER *et al.*, 2010).

O parênquima testicular, a região funcional do testículo, é organizado em dois compartimentos: tubular e intertubular. O compartimento tubular é constituído pelos túbulos seminíferos que são compostos, por sua vez, de túnica própria, epitélio seminífero (ou germinativo) e lúmen tubular. O epitélio germinativo é formado pelas células espermatogênicas e células de Sertoli. Assim, o compartimento tubular é onde ocorre a espermatogênese, sendo um processo altamente organizado comandado pelas células de Sertoli (LARA *et al.*, 2018). O compartimento intertubular, também chamado interstício, é composto por vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos, macrófagos, eventualmente mastócitos e células dendríticas, bem como os fibroblastos e as fibras do tecido conjuntivo (LARA *et al.*, 2018). Na maioria dos testículos o elemento predominante no intertúbulo são as células de Leydig, cujo papel é a produção de testosterona, hormônio responsável pela manutenção da espermatogênese e expressão das características sexuais secundárias masculinas (RUSSELL e GRISWOLD).

Embora as atividades espermatogênicas e esteroidogênicas ocorram em dois compartimentos funcionais distintos dos testículos, há necessidade de interações fisiológicas entre os dois compartimentos para o processo reprodutivo (LARA *et al.* 2018). A fertilidade masculina requer a produção, pelo testículo, de grande número de espermatozoides normais e, para isso, o parênquima testicular, incluindo seus dois compartimentos, necessita estar em boas condições morfofisiológicas (DE KRETZER *et al.*, 1998).

Nos últimos anos tem sido reportado um aumento da concentração de metais pesados no ambiente (MUNIZ e OLIVEIRA-FILHO, 2006). Ainda, tem sido observada uma diminuição da qualidade espermática e aumento nos distúrbios reprodutivos, sugerindo possível relação entre os tóxicos ambientais e a queda da fertilidade (MASSÁNY *et al.*, 2020). Assim, este estudo objetivou avaliar a toxicidade dos metais pesados arsenato (As+5), arsenito (As+3), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr VI) e níquel (Ni), após exposição crônica, nos testículos de camundongos adultos. Também, este estudou visou o estabelecimento de uma ordem de toxicidade entre eles, no âmbito da fertilidade masculina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Metais pesados

O termo metal pesado é aplicado a um grupo heterogêneo de elementos, incluindo metais e semimetais. Quando distribuídos na natureza, os metais pesados apresentam uma variedade de atividades, embora todos esses elementos tenham potencial para tornarem-se tóxicos nos sistemas biológicos (TAVARES, 2013).

Os metais pesados aparecem na natureza, mesmo sem a ação do homem, por processos como intemperismo e lixiviação. Porém, o aumento das suas concentrações é causado por atividades antrópicas como a extração e o beneficiamento de metais, rejeitos industriais, efluentes domésticos, insumos agrícolas, descarte de produtos comerciais, queima de combustíveis fósseis e descarte de lodo de esgoto (MUNIZ e OLIVEIRA-FILHO, 2006).

A atividade humana libera os metais no ar, solo e nos corpos hídricos e atingem os seres humanos diretamente pela respiração, contato com a pele, alimentos e água contaminados, ou indiretamente usando, por exemplo, a água para cozinhar e irrigação de plantações (BRADL, 2005; JENARDHANAN *et al.*, 2016). Estudos epidemiológicos relataram que exposições ambientais ao metal pesado no local de trabalho atua sobre a saúde reprodutiva masculina humana impactando diretamente na reprodução (GOLUB, 2006).

Os reflexos dessa contaminação por metais pesados extravasam os limites das áreas de trabalho, atingindo a topografia, a flora e a fauna (MUNIZ e OLIVEIRA-FILHO, 2006). Se os solos contiverem altos teores de metais naturais e forem atingidos com lamas metálicas, ou forem irrigados com água contaminada com metais, algumas plantas irão acumular em grande quantidade esses metais, resultando em culturas alimentares e forragem animal poluídas. Em seguida, podem aumentar sua concentração ao longo da cadeia alimentar sendo transferidos, através de níveis tróficos, para os seres humanos (BRADL, 2005). Além disso, a contaminação afeta também os sistemas hídrico e a morfologia do solo (MUNIZ e OLIVEIRA-FILHO, 2006).

Os efeitos dos metais pesados sobre a biota aquática e sobre os seres humanos são bastante variados, a depender do tipo de metal, da sua concentração no meio e sua capacidade acumulativa (BRASIL, 2006). Considerando estes fatos, estudos analíticos de metais pesados são essenciais para o desenvolvimento de estratégias para a conservação das espécies e descontaminação de ambientes poluídos pelos mesmos (MOZETO e ZAGATTO, 2008).

A toxicidade de metais pesados pode estar relacionada com a diminuição dos níveis de energia, mudanças na composição sanguínea e danificação do funcionamento do cérebro, dos pulmões, rins, do fígado e de outros órgãos importantes. Pode levar à progressão gradual dos

processos degenerativos musculares e neurológicos que mimetizam doenças como a esclerose múltipla, doença de Parkinson, doença de Alzheimer e distrofia muscular (JAISHANKAR, *et al.*, 2014). Metais pesados que entram na cadeia alimentar podem esgotar seriamente os estoques de ferro, vitamina C e outros nutrientes essenciais, levando à diminuição das defesas imunológicas, retardo do crescimento intrauterino, deficiências psicossociais e outras carências associadas à desnutrição (IYENGAR e NAIR, 2000).

Em relação à reprodução, os metais pesados, de forma geral, causam graves efeitos à fertilidade, provocando alterações morfofisiológicas nas gônadas masculinas (KONG *et al.*, 2014), na produção de hormônios esteroides (CUPERTINO *et al.*, 2017A) e no status oxidativo (DJURIC *et al.*, 2015). Devido a essas alterações por substâncias tóxicas no ambiente, tem sido relatado um declínio global no número de espermatozoides produzidos, maior incidência de doenças urogenitais, baixa qualidade do sêmen e maior incidência de câncer de testículo (PAYNE e HARDY, 2007). Assim, a identificação de substâncias químicas no ambiente que alteram o sistema endócrino e a determinação dos mecanismos pelo qual elas atuam tornou-se prioridade de pesquisa (PAYNE e HARDY, 2007).

A Agência de Substâncias Tóxicas e Registros de Doenças - ATSDR (2017) investiga e elenca emergências de saúde ambiental por meio de pesquisas sobre os impactos na saúde em locais com resíduos perigosos. Entre esses resíduos perigosos investigados aparecem os metais pesados, Arsênio, Cádmio, Chumbo, Cromo e Níquel, sendo, portanto, necessário desenvolver análises sobre sua toxicidade no organismo, incluindo o aparelho reprodutor.

2.2 Arsênio

O Arsênio é um semimetal considerado tóxico devido ao seu caráter bioacumulativo (ANDRADE e ROCHA, 2015), podendo ser encontrado em diversas formas químicas na natureza, incluindo espécies orgânicas e inorgânicas, como resultado de sua participação em processos biológicos, químicos e aplicações industriais. O arsênio apresenta um comportamento químico diversificado no ambiente natural e ocorre em quatro estados de oxidação: arsenato (+5), arsenito (+3), arsina (-3) e na forma elementar (0). Contudo, as espécies solúveis e mais toxicologicamente potentes às quais os seres humanos são expostos geralmente ocorrem nos estados de oxidação +3 e +5 (DIONÍSIO *et al.*, 2011). Isso se deve à reatividade do arsênio com compostos contendo enxofre e a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (HUGHES *et al.*, 2011).

O arsênio é amplamente distribuído na crosta terrestre e está presente em mais de 200 minerais (ANDRADE e ROCHA, 2015). Além disso, é encontrado em fontes antropogênicas

como na produção de herbicidas, inseticidas e rodenticidas e foi identificado como um poluente frequente no ar, no solo e na água devido ao seu amplo uso na agricultura e em procedimentos industriais como rejeitos de minas e resíduos de fundição (PAYNE e HARDY, 2007).

Os altos níveis de toxicidade de arsênio são muito bem conhecidos, pois compostos de arsênio são facilmente absorvidos, tanto oralmente quanto por inalação, sendo a extensão da absorção dependente da solubilidade do composto (BARRA *et al.*, 2000). Outras vias de exposição em potencial para o arsênio são o solo, onde pode ser absorvido por via dérmica, e a inalação de partículas dispersas pelo vento, ou seja, poeira fugitiva (HUGHES *et al.*, 2011), além da sua presença na fumaça do cigarro (HAYS *et al.*, 2006).

Os problemas de saúde produzidos pelo metal dependem da quantidade de arsênio ingerido, dose, frequência e do tempo de absorção do mesmo, já que é excretado principalmente pelo fígado e rins. O arsênio no organismo reage muito rapidamente com os grupos sulfidrila das proteínas, inibindo a ação enzimática e bloqueando a respiração celular (ANDRADE e ROCHA, 2015).

2.3 Cádmi

O cádmio é um metal pesado encontrado no ambiente relacionado às atividades industriais incluindo fundição, queima de petróleo e carvão, desgaste de pneus (PAYNE e HARDY, 2007), fabricação e aplicação de fertilizantes fosfatados e incineração e eliminação de resíduos. Também é utilizado em baterias, pigmentos e revestimentos (ATSDR, 2012A). A maior parte do cádmio existente é extraída como subproduto durante o refinamento de outros metais como chumbo ou cobre (ATSDR, 2012A).

A maior parte do cádmio (como óxido, cloreto e sulfato) existe no ar como partículas ou vapores (de processos de alta temperatura) que podem ser transportados por longas distâncias na atmosfera, sendo depositados nos solos e superfícies de água. Geralmente, o cádmio se liga fortemente à matéria orgânica, sendo absorvido pelos vegetais e, eventualmente, fazem parte do suprimento de alimentos. As folhas de tabaco acumulam altos níveis de cádmio no solo, aumentando os níveis de cádmio nos tecidos corporais de fumantes e confirmando que o tabagismo praticamente dobra a carga corporal do metal pesado quando comparado a uma pessoa não fumante (ATSDR, 2012A).

Além das neoplasias, foram relatados outros efeitos na saúde induzidos por cádmio, como exemplo doenças renais. Há também evidências epidemiológicas que apontam para a exposição ao cádmio como fator de risco para diabetes tipo II e complicações diabéticas (EDWARDS e PROZIALEC, 2009). O risco aumentado de osteoporose se correlaciona com a carga de cádmio

em diferentes populações e a exposição ao cádmio diminui a densidade mineral óssea e aumenta o risco de fraturas (ALFVÉN *et al.*, 2000; SIGEL *et al.*, 2013). Outras consequências para a saúde da exposição ao cádmio, são anemia, doença hepática, danos nos nervos ou ao cérebro (SIGEL *et al.*, 2013). Por fim, estudos sugerem que o testículo de mamíferos é um alvo sensível à toxicidade do cádmio. A exposição ao cádmio induz a perda de células germinativas e diminui a produção de espermatozoides (WU *et al.*, 2017).

2.4 Chumbo

Embora o chumbo ocorra naturalmente na crosta terrestre, e seja encontrado na água e no ar por meio de processos como intemperismo, ele está presente na atmosfera principalmente como subproduto da indústria (PAYNE e HARDY, 2007). A tinta com chumbo em casas antigas, uso em construções civis, uso em ligas metálicas para produção de fusíveis e cabos elétricos, a cerâmica à base de chumbo e o chumbo em medicamentos populares continuam a ser importantes fontes de exposição e contaminação (GOLUB, 2006). A exposição humana ao chumbo é uma preocupação de saúde pública, principalmente por que o metal pesado atinge o ambiente aquático através de descargas industriais e domésticas (PAYNE e HARDY, 2007).

O chumbo afeta adversamente vários órgãos e sistemas, sendo que as alterações subcelulares e os efeitos neurológicos sobre o desenvolvimento parecem ser os mais críticos. Esse metal produz efeitos sobre muitos processos bioquímicos afetando, em particular, síntese do grupo prostético heme (MOREIRA E MOREIRA, 2004) e, portanto, interferindo adversamente na bioquímica do sangue, assim como no crescimento, além de causar efeitos neurológicos devido a lesões degenerativas e afetar o sistema reprodutivo (PAYNE e HARDY, 2007). O chumbo também prejudica a homeostase do cálcio, aumenta as espécies reativas de oxigênio e interage com os grupos sulfidril das enzimas e proteínas com alta afinidade, interferindo em outros processos celulares (IARC, 2006; PAYNE e HARDY, 2007).

As rotas de exposição ao chumbo incluem inalação, oral e dérmica. Para a população em geral, a maior via de contaminação por chumbo deriva da ingestão de alimentos e água contaminadas. A quantidade de chumbo nas plantas depende das concentrações no solo e é mais alta próximo das minas e fundições (GOLUB, 2006). O chumbo presente na água da torneira pode ser o resultado de sua dissolução a partir de fontes naturais, mas deve-se principalmente a sistemas de encanamento doméstico contendo tubos de chumbo, soldas e acessórios (GOLUB, 2006).

A inalação de poeira também expõe os seres humanos ao chumbo. O desgaste, descascamento ou lascamento de tintas à base de chumbo, encontradas principalmente em casas

mais antigas, e o pó contendo chumbo presente nas roupas daqueles que trabalham nas indústrias onde esse pó é gerado, são as principais fontes de contaminação. A exposição dérmica se dá pelo contato com alguns objetos que são feitos de chumbo ou contêm chumbo como, plásticos ou tintas e alguns medicamentos e maquiagem tradicionais (WHO, 1992). Concentrações significativas de chumbo foram encontradas em sangue de doadores fumantes (HASHIM *et al.*, 2019).

2.5 Cromo

O cromo existe na natureza em duas formas químicas principais: Cr (III) e Cr (VI). O Cr (III) é essencial para os mamíferos e está incluso no metabolismo da glicose, lipídios e proteínas, em contraste com o Cr (VI), que é conhecido por ser tóxico para os organismos (LANDNER e REUTHER, 2005). Produtos químicos à base Cr (VI) são utilizados na produção de papel, produção de fertilizantes, no curtimento de couro, em catalisadores, pigmentos e lamas de perfuração. O cromo é também usado em soldas e indústrias de cromagem (PAYNE e HARDY, 2007).

Deste modo, a exposição ambiental ao Cr (VI) ocorre por meio de deposições atmosféricas, contaminação de esgotos e resíduos sólidos e poluição da água potável perto de locais industriais (BRADL, 2005). Assim, além da exposição ocupacional onde os trabalhadores podem ser expostos a altas concentrações de ar contaminado com cromo, é provável que a população em geral esteja exposta a níveis vestigiais de cromo nos alimentos que são consumidos (ATSDR, 2012B).

O principal órgão alvo do Cr (VI) é o trato respiratório. Os sintomas clássicos são perfurações e ulcerações do septo, bronquite, função pulmonar diminuída e pneumonia. É o segundo maior alérgeno cutâneo após o níquel, causando dermatite alérgica de contato (BRADL, 2005). O cromo é também um agente mutagênico e cancerígeno e além disso, causa diminuição da fertilidade (PAYNE e HARDY, 2007)

2.6 Níquel

O níquel está na crosta terrestre combinado com outros elementos, geralmente oxigênio ou enxofre, como óxidos ou sulfetos. Pode ser encontrado em todo o solo, emitido por vulcões, em meteoritos e no fundo do oceano em pedaços de minerais chamados nódulos no fundo do mar. O núcleo da Terra é composto por 6% de níquel (ATSDR, 2005).

O níquel é usado em uma ampla variedade de processos metalúrgicos como galvanoplastia, e em baterias de níquel-cádmio (DAS *et al.*, 2008) A maior aplicação de níquel é na produção de aço inoxidável e de ligas metálicas e, portanto, é encontrado em uma grande variedade de produtos como automóveis, baterias, moedas, joias, implantes cirúrgicos e utensílios de cozinha. As ligas de níquel-ferro, níquel-cobre, níquel-cromo e níquel-prata são usadas em chapas, bem como em pás de turbinas, componentes de motores a jato e em reatores nucleares. As principais fontes de contaminação por níquel no meio ambiente são a mineração e a fundição, o lodo de esgotos e a combustão de petróleo e carvão (BRADL, 2005).

Como a maioria dos metais, a toxicidade do níquel depende da via de exposição e solubilidade do composto de níquel. A exposição a íons níquel pode ocorrer por meio de contato prolongado e íntimo da pele (HUGHSON *et al.*, 2010) com itens com alta liberação de níquel como algumas joias, botões e materiais para perfurar o corpo, de forma que o níquel pode causar dermatite alérgica de contato se houver exposição cutânea suficiente (BRADL, 2005). Do mesmo modo a inalação de componentes de níquel leva à intoxicação causando pneumonite, insuficiência adrenal, edema pulmonar, degeneração hepática, câncer do trato respiratório e asma (BRADL, 2005). Há indicação do aumento do potencial de carcinogenicidade, o que têm sido motivo de preocupação (DAS *et al.*, 2008). Elementos componentes do fumo contêm grande quantidade de níquel (HASHIM *et al.*, 2019), que também é eliminado na fumaça dos cigarros.

2.7 Sistema Reprodutor masculino

O sistema reprodutor masculino é composto por testículos, ductos eferentes, epidídimos, ductos deferentes, ductos ejaculatórios, uretra, glândulas acessórias e pênis. Os testículos de mamíferos podem ser divididos funcionalmente em dois compartimentos principais: o compartimento tubular e o intertubular (RUSSELL *et al.*, 1990; LARA *et al.*, 2018).

No intertúbulo estão as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, macrófagos e células dendríticas, bem como fibroblastos e fibras do tecido conjuntivo. Em algumas espécies são encontrados também mastócitos. A principal função da célula de Leydig é a síntese e secreção do hormônio esteroide testosterona que estimula as células germinativas no seu desenvolvimento, atuando também na proliferação da célula de Sertoli estando, deste modo, diretamente ligado à fertilidade. Além disso, a testosterona estimula também a diferenciação sexual masculina antes do nascimento e as características sexuais secundárias masculinas na puberdade (PAYNE e HARDY, 2007).

As células de Leydig estão sempre em um local em estreita associação com capilares sanguíneos, onde secretam testosterona, que por sua vez se liga a receptores no sistema reprodutivo e também em outros tecidos, incluindo músculo esquelético, timo e cérebro. Assim, a diferenciação das células de Leydig nos testículos é de importância geral no desenvolvimento do plano corporal masculino (PAYNE e HARDY, 2007). Além do hormônio luteinizante (LH) produzido na hipófise, que estimula a função esteroidogênica das células Leydig, fatores de crescimento secretados pelos macrófagos e fibroblastos no compartimento intertubular também são essenciais para a diferenciação e desenvolvimento dessas células (PAYNE e HARDY, 2007; LARA *et al.*, 2018).

O compartimento tubular é formado pelos túbulos seminíferos, que estão envolvidos na espermatogênese, ou seja, na produção de espermatozoides. Neste local, as células germinativas imaturas, as espermatogônias, geralmente estão localizadas junto à membrana basal e as outras células germinativas, como espermatócitos e espermátides, ocupam as camadas superiores próximas ao lúmen tubular. O local onde essas células se acomodam de forma altamente organizada, juntamente com as células de Sertoli, é chamado epitélio seminífero (NAKATA, 2018). Além do epitélio seminífero, os túbulos seminíferos são compostos pela túnica própria, onde estão as células mioides, e pelo lúmen, onde os espermatozoides são liberados (LARA *et al.*, 2018).

As células de Sertoli se estendem da lâmina basal até o lúmen tubular, onde fornecem fatores críticos para o sucesso da progressão de células germinativas até espermatozoides. Elas fornecem suporte físico, barreiras juncionais, fatores de crescimento e são responsáveis pela formação de um ambiente único e essencial denominado adluminal (GRISWOLD, 1998). Este ambiente é isolado do sistema imune e é onde ocorre a produção dos espermatozoides, assim como a fagocitose de corpos residuais e células germinativas degeneradas (OLIVEIRA e ALVES, 2015).

Além dessas funções, as células de Sertoli participam do início do desenvolvimento dos testículos, são alvos e mediadores dos hormônios sexuais e destacam as espermátides das células do epitélio seminífero a fim de que ocorra sua maturação, para dar origem aos espermatozoides. Deste modo, células de Sertoli são responsáveis por determinar a produção de espermatozoides pelo testículo (HESS e FRANÇA, 2005; MÄKELÄ e TOPPARI, 2017).

As células de Sertoli são proliferativamente ativas até a puberdade na maioria das espécies de mamíferos, incluindo o homem. Depois disso, o ciclo celular é interrompido e as células de Sertoli ficam quiescentes e terminalmente diferenciadas (MÄKELÄ e TOPPARI, 2017).

2.8 Metais no sistema reprodutor

Efeitos ainda mais específicos do arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr VI) e níquel (Ni) no sistema reprodutor podem ser destacados. O arsênio, por exemplo, em seus estados de oxidação, tem capacidade de reduzir a síntese de testosterona pelo testículo o que, conseqüentemente, causa deficiências nas células germinativas, ao mudar a configuração do epitélio e comprometer a espermatogênese (HUANG *et al.*, 2016). As atividades de várias enzimas testiculares diminuem com a administração de arsênio, sugerindo um efeito nas funções das células de Leydig, o que explica a redução da testosterona (PAYNE e HARDY, 2007). Um experimento que administrou arsênio intraperitoneal por um longo período demonstrou que há reduções dependentes da dose, no peso dos testículos, das vesículas seminais e da próstata, além da diminuição da contagem de espermatozoides epididimários (PAYNE e HARDY, 2007).

O cádmio, do mesmo modo, inibe a participação de proteínas reguladoras do processo que mantém a integridade da barreira de célula de Sertoli e que promovem a adesão das células germinativas às células de Sertoli (CUPERTINO *et al.*, 2017B). A contaminação por cádmio pode induzir a diminuição da massa do testículo pela redução da sua população celular (BLOTTNER *et al.*, 1999). Em outro estudo, houve redução da viabilidade celular de Leydig e a produção de testosterona basal foi diminuída pela exposição ao cádmio, além de haver aumento no oxigênio reativo testicular quando medido dois dias após o tratamento, o que pode ter afetado as células de Leydig (PAYNE e HARDY, 2007).

Em relação ao chumbo, os principais achados referem-se à diminuição do volume de epitélio germinativo (MASSANYI *et al.*, 2007), além da degeneração testicular (BATRA *et al.*, 2001). Há evidências de que o chumbo suprime o eixo hipotálamo-hipófise-testicular e inibe várias funções testiculares, levando à redução da testosterona (PAYNE e HARDY, 2007). Adicionalmente, existe uma relação entre o chumbo e o estresse oxidativo que prejudica a espermatogênese pela geração de espécies reativas de oxigênio (ANJUM *et al.*, 2017).

Um exame histopatológico dos testículos de ratos expostos ao cromo mostrou que houve ruptura visível no arranjo de células germinativas próximo à túnica própria dos túbulos seminíferos e também diminuição do diâmetro tubular (LI *et al.*, 2001). A diminuição induzida pelo cromo na contagem de espermatozoides pode ser devido a danos nos túbulos seminíferos mediados por apoptose (DAS *et al.*, 2015). A exposição *in vivo* de ratos ao cromo, a longo prazo, induziu o declínio na população de células de Leydig e a inibição significativa da 3β -HSD (3β -hidroxiesteroide desidrogenase), importante enzima esteroideogênica, responsável por

etapas essenciais para a formação de todas as classes de hormônios esteroides (SANTOS, 2013), além de causar a diminuição da testosterona sérica (PAYNE e HARDY, 2007).

O níquel, por sua vez, também tem sido foco de estudos na área da reprodução, porque após a administração desse metal pesado observou-se que os níveis de FSH e testosterona diminuíram. Os resultados patológicos mostraram o desprendimento de células epiteliais do túbulo seminífero, arranjo desordenado das células e o aparecimento de células apoptóticas (KONG *et al.*, 2014). Outros estudos apontam para a geração de espécies reativas de oxigênio induzida por níquel (AIJIE *et al.*, 2018).

2.9 Estresse oxidativo

A evolução de processos metabólicos aeróbicos, como a respiração celular, levou à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em mitocôndrias e peroxissomos. Uma característica comum entre as diferentes EROs é sua capacidade de causar danos oxidativos a proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (APEL e HIRT, 2004).

As espécies reativas de oxigênio surgem quando o oxigênio, no seu estado fundamental, passa por reações de transferência de elétrons resultando na sua redução às formas de superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (STORZ e IMLAY, 1999). Sob condições fisiológicas normais, essas moléculas são eliminadas por diferentes antioxidantes componentes da defesa do organismo, que agem por meio de mecanismos de prevenção impedindo ou controlando a formação de radicais livres que culminarão na ocorrência de danos oxidativos. A função desses agentes antioxidantes pode ser perturbada por inúmeros fatores ambientais adversos, incluindo metais pesados, e como resultado, os níveis intracelulares de EROs podem aumentar rapidamente (BARBOSA *et al.*, 2010).

O superóxido se forma a partir da redução de um elétron do oxigênio molecular e, dentro da célula, é rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio pela enzima superóxido dismutase (SOD). As SODs impedem o acúmulo de superóxido que pode danificar e inativar proteínas contendo aglomerados de ferro-enxofre (SCHIEBER e CHANDEL, 2014). O peróxido de hidrogênio, apesar de não ser um radical livre, por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, é capaz de atravessar as membranas celulares apresentando-se potencialmente tóxico para as células. Esta toxicidade pode ser aumentada pela presença de íons metálicos. As enzimas catalase e glutatona são responsáveis, respectivamente, pela decomposição de H_2O_2 em H_2O e O_2 (SHEEHAN *et al.*, 2001), impedindo assim o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Tal ação integrada é de grande importância, uma vez que

essa espécie reativa pode culminar na geração do radical hidroxila, contra o qual não há sistema enzimático de defesa (BARBOSA *et al.*, 2010).

O radical hidroxila oxida indiscriminadamente lipídios, proteínas e DNA, resultando em danos ou instabilidade genômica. Tipicamente, os radicais hidroxila são gerados a partir de peróxido de hidrogênio na presença de íons ferrosos. Portanto, as células possuem múltiplos mecanismos para manter a homeostase do ferro e impedir a formação de radicais hidroxila tóxicos (SCHIEBER e CHANDEL, 2014). A membrana plasmática é a mais atingida caso os radicais hidroxila sejam formados, num processo chamado peroxidação lipídica, que acarreta alterações em sua estrutura e permeabilidade. Consequentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, assim como a formação de produtos citotóxicos (como o malondialdeído) que culmina com a morte da célula (FERREIRA e MATSUBAR, 1997).

Além da capacidade do superóxido em participar de reações de geração de radicais hidroxila, ele pode ainda, por meio da combinação com o óxido nítrico, gerar a espécie reativa de nitrogênio peroxinitrito (ONOO) (BARBOSA *et al.*, 2010). O óxido nítrico desempenha diversas funções testiculares (McCANN *et al.*, 1999), mas ao se combinar com o superóxido produzindo peroxinitrito conduz a um processo de citotoxicidade pela peroxidação lipídica (TOMÉ, 2002).

Enzimas e proteínas estruturais também podem ser alteradas com a presença de radicais livres e, como consequência, pode incorrer em uma variedade de alterações fisiológicas e processos patológicos. Um exemplo importante é a modificação covalente de proteínas, onde grupos carbonil (aldeídos e cetonas) podem ser introduzidos nas mesmas. A análise de grupos carbonila nas proteínas fornece uma técnica conveniente para detectar e quantificar a modificação oxidativa das proteínas (LEVINE *et al.*, 1994).

Todos esses processos de estresse oxidativo podem provocar a infertilidade, por isso, analisar suas possíveis causas, deve ser uma abordagem visando neutralizar seu impacto nos tecidos reprodutivos (SIKKA, 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade crônica dos metais pesados arsenato, arsenito, cádmio, chumbo, cromo e níquel, quando administrados por via intraperitoneal, sobre os parâmetros testiculares e estabelecer uma ordem de toxicidade entre esses metais.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar valores biométricos corporais e testiculares;
- Determinar o acúmulo de metais pesados nos testículos.
- Verificar o impacto dos metais pesados na morfometria e na estereologia das estruturas e dos tipos celulares do parênquima testicular;
- Obter os índices gonadossomático (IGS), parenquimossomático (IPS) tubulossomático (ITS), epiteliossomático (IES), intertubulossomático (IIS), Leydigossomático (ILS);
- Realizar avaliação histopatológica dos testículos;
- Avaliar o status oxidativo do testículo por meio da determinação da atividade de enzimas antioxidantes e da mensuração de óxido nítrico e de malondialdeído;
- Estabelecer uma ordem de toxicidade entre os metais, baseada nos impactos observados nas diferentes análises realizadas.

4 REFERÊNCIAS

AIJIE, H.; LINGYUE, Z.; XIAOQIN, G.; YU, L.; FANGFANG, L.; XUHONG, C.; XIAOTIAN, Z.; MINMIN, T.; SHENG, L.; LI, S.; YINGBIAO, S. ROS generation and MAPKs activation contribute to the Ni-induced testosterone synthesis disturbance in rat Leydig cells. **Toxicology Letters**, vol. 209, p. 36-45, 2018.

ALFVÉN, T.; ELINDER, C. G.; CARLSSON, M. D.; GRUBB, A.; HELLSTRÖM, L.; PERSSON, B.; PETTERSSON, C.; SPANG, G.; SCHÜTZ, A.; JÄRUP, L. Low-level cadmium exposure and osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, vol.15, n.8, p. 1579-1589, 2000.

ANDRADE, D. F.; ROCHA, M. S. A toxicidade do Arsênio e Sua Natureza. **Revista Osvaldo Cruz**, vol.10, 2015.

ANJUM, M. R.; MADHU, P.; REDDY, K. P.; REDDY, S. P. The protective effects of zinc in lead-induced testicular and epididymal toxicity in Wistar rats. **Toxicology and Industrial Health**, vol. 33, p. 265-276, 2017.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, vol. 55, p. 373-399, 2004.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for cadmium, p. 87, 2012A.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for chromium, p. 592, 2012B.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Nickel, p. 397, 2005.

ATSDR's substance priority list, 2017. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>. Acesso em: 03.04.2020.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, vol. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARRA, C. M.; SANTELLI, R.E.; ABRAÃO, J.J.; GUARDIA, M. Especificação de arsênio uma revisão. **Química Nova**, vol. 23, p. 58-70, 2000.

BATRA, N.; NEHRU B.; BANSA, M. P. Influence of lead and zinc on rat male reproduction at biochemical and histopathological levels. **Journal of Applied Toxicology**, vol. 21, p. 507-512, 2001.

BLOTTNER, S.; FRÖLICH, K.; ROELANTSA, H.; STREICHA, J.; TATARUCH, F. Influence of environmental cadmium on testicular proliferation in roe deer. **Reproductive Toxicology**, vol. 13, p. 261-267, 1999.

BRADL, H. B. Heavy Metals in the Environment. Ed. **Elsevier Academic Press**, vol. 6, 283p, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano**, 212 p. Brasília, 2006.

CUPERTINO, M. C.; NOVAES, R. D.; SANTOS, E. C.; NEVES, A. C.; SILVA, E.; OLIVEIRA, J. A.; MATTA, S. L. P. Differential susceptibility of germ and Leydig cells to cadmium-mediated toxicity: Impact on testis structure, adiponectin levels, and steroidogenesis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2017, 11p, 2017A.

CUPERTINO, M. C.; NOVAES, R. D.; SANTOS, E. C.; BASTOS, D. S. S.; SANTOS, D. C. M.; FILHO, M. C. Q.; MATTA, S. L. P. Cadmium-induced testicular damage is associated with mineral imbalance, increased antioxidant enzymes activity and protein oxidation in rats. **Life Sciences**, vol. 175, p. 23-30, 2017B.

DAS, K.K.; DAS, S.N.; DHUNDAS, S. A. Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. **Indian Journal of Medical Research**, vol. 128, p. 412-442, 2008.

DAS, J; KANG, M; KIM, E; KWON, D; CHOI, Y; KIM, J. Hexavalent chromium induces apoptosis in male somatic and spermatogonial stem cells via redox imbalance. **Scientific Reports**, vol. 5, p. 1-14, 2015.

DE KRETZER, M. de; LOVELAND, K. L.; MEINHARDT, A.; SIMORANGKIR, D.; WREFORD, N. Spermatogenesis. **Human Reproduction**, vol. 13, p. 1-8, 1998.

DIONÍSIO, A. G. G; GONZALES, M. H; NÓBREGA, J. A. Determinação de arsênio em amostras da cadeia produtiva de frangos de corte por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. **Revista Química Nova**, vol. 34, n. 1, p. 49-52, 2011.

DJURIC, A.; BEGIC, A.; GOBELJIC, B.; STANOJEVIC, I.; NINKOVIC, M.; VOJVODIC, D.; PENTELIC, A.; ZEBIC, G.; PROKIC, V.; DEJANOVIC, B.; STOJANOVIC, I.; PAVLICA, M.; DJUKIC, D.; SASO, L.; DJURDJEVIC, D.; PAVLOVIC, M.; TOPIC, A.; VUJANOVIC, D.; STEVNOVIC, I.; DJUKIC, M. Oxidative stress, bioelements and androgen status in testes of rats subacutely exposed to cadmium. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 86, p-25-33, 2015.

DUFFUS, J. H. "Heavy metals"—A Meaningless term. **Pure and Applied Chemistry**, vol. 74, n. 5, p. 793–807, 2002.

EDWARDS, J. R.; PROZIALECK, W. C. Cadmium, diabetes and chronic kidney disease. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol. 238, n. 3, p. 289–293, 2009.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBAR, L. B. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, vol. 43, n. 1, p. 61-868, 1997.

GOLUB, M. S. Metals, Fertility, and Reproductive Toxicity. **Taylor & Francis Group**, USA. 2006.

GRISWOLD, M. D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, vol 9, p. 411 – 416, 1998.

HAYS, A.M.; SRINIVASAN, D.; WITTEN, M.L.; CARTER, D.E.; LANTZ, R.C. Arsenic and cigarette smoke synergistically increase DNA oxidation in the lung. **Toxicologic Pathology**, vol. 34(4), p. 396-404, 2006.

HASHIM, A.; FATHIMA, H.; MUHAMMED, R.C.S.; DSOUZAC NEEVAN, D.R. Analysis of Lead, Cadmium, and Nickel in Blood Donors in Relation to Smoking-A Comparative Study. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology**, vol. 38(2), p. 165-172, 2019.

HESS, R. A.; FRANÇA, L. R. Sertoli cell biology. Chapter 3: Structure of the Sertoli cell. Ed. **Elsevier**, p. 19-40, 2005.

HUANG, Q.; LUO, L.; ALAMDAR, A.; ZHANG, J.; LIU, L.; TIAN, M.; EQANI, S. A. M. A. S.; SHEN, H. Integrated proteomics and metabolomics analysis of rat testis: mechanism of arsenic-induced male reproductive toxicity. **Scientific Reports**, vol. 6, n. 32518, p. 1-12, 2016.

HUGHES, M. F; BECK, B. D; CHEN, Y; LEWIS, A. S; THOMAS, D. J. Arsenic Exposure and Toxicology: A Historical Perspective. **Toxicological Sciences**, vol. 123, n. 2, p. 305-332, 2011.

HUGHSON, G. W.; GALEA, K. S.; HEIM, K. E. Characterization and Assessment of Dermal and Inhalable Nickel Exposures in Nickel Production and Primary User Industries. **Annals of Occupational Hygiene**, vol. 54, n. 1, p. 8–22, 2010.

IARC – International Agency for Research on Cancer. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Inorganic and organic lead compounds, vol. 87, 2006.

IYENGAR, G. V.; NAIR, P. P. Global outlook on nutrition and the environment: meeting the challenges of the next millennium. **Science of the Total Environment**, vol.249, p. 331-346, 2000.

JAISHANKAR, M; TSETEN, T; ANBALAGAN N; MATHEW, B. B.; BEEREGOWDA, K. N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. **Interdisciplinary Toxicology**, vol. 7(2), p. 60–72, 2014.

JENARDHANAN, P; PANNEERSELVAM, M; PREMENDU, M. Effect of environmental contaminants on spermatogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, vol. 59, p. 126-140, 2016.

KONG, L.; TANG, M.; ZHANG, T.; WANG, D.; HU, K.; LU, W.; WEI, C.; LIANG, G.; PU, Y. Nickel nanoparticles exposure and reproductive toxicity in healthy adult rats. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 15, p. 21253-21269, 2014.

LANDNER, L.; REUTHER, R. Metals in society and in the environment. Chapter 5: Speciation, mobility and bioavailability of metals in the environment. **Kluwer Academic Publishers**, vol. 8, p. 144-145, 2005.

LARA, N. L. M.; COSTA, G. M. J.; AVELAR, G. F.; LACERDA, S. M. S. N.; HESS, Rex A.; FRANÇA, L. R. de. Testis Physiology — Overview and Histology. In: JÉGOU, Bernard; SKINNER, Michael. **Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)**, vol. 1, p. 105-116, 2018.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, vol. 233, p. 346-557, 1994.

LI, H; CHEN, Q; LI, S; YAO, W; LI, L; SHI, X; WANG, L; CASTRANOVA, V; VALLYATHAN, V; ERNST, C. Effect of Cr (VI) Exposure on Sperm Quality: Human and Animal Studies. **Annals of Occupational Hygiene**, vol. 45, n. 7, p. 505–511, 2001.

LIU, J.; GOYER, R. A.; WAALKES, M. P. Toxic effects of metals. In: Klaassen, C.D. (Ed.). **Casarett & Doull's Toxicology: the basic science of poisons**. 7 ed. New York: McGraw Hill, p. 931-979, 2008.

MÄKELÄ, J.; TOPPARI, J. Spermatogenesis. In: SIMONI, M.; HUHTANIEMI, I. T. Endocrinology of the Testis and Male Reproduction. **Editora Springer**, 2017.

MASSANYI, P; LUKAC, N; MAKAREVICH, A. V.; CHRENEK, P; FORGACS, Z; ZAKRZEWSKI, M; STAWARZ, R; TOMAN, R; LAZOR, P; FLESAROVA, S. Lead-induced alterations in rat kidneys and testes in vivo. **Journal of Environmental Science and Health**, vol. 42, p. 671 - 676, 2007.

MASSÁNYI, P; MASSÁNYL, M; MADEDDU, R; STAWARZ, R; LUKÁC, N. Effects of Cadmium, Lead, and Mercury on the Structure and Function of Reproductive Organs. **Toxics**, vol. 8, n. 4, p. 94, 2020.

McCANN, S. M.; MASTRONARDI, C.; WALCZEWSKA, A.; KARANTH, S.; RETTORI, V.; YU, W. H. The role of nitric oxide in reproduction. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, vol. 32, n.11, p. 1367-1379, 1999.

MEEKER, J. D.; ROSSANO, M. G.; PROTAS, B; PADMANABHAN, V; DIAMOND, M. P.; PUSCHECK, E; DALY, D; PANETH, N; WIRTH, J. J. Environmental exposure to metals and male reproductive hormones: Circulating testosterone is inversely associated with blood molybdenum. **Fertility and Sterility**, vol. 93, p. 130-140, 2010.

MOREIRA, F. R; MOREIRA, J. C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. **Pan American Journal of Public Health**, vol.15, n. 2, p. 119–29, 2004.

MOZETO, A. A.; ZAGATTO, P. A. "Introdução de Agentes químicos no Ambiente". Zagatto P. A. e Bertoletti E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações** 2ed. São Carlos, 2008.

- MUNIZ, D. H. F; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. **Universitas: Ciências da Saúde**, vol. 4, n. 1/2, p. 83-100, 2006.
- NAKATA, H. Morphology of mouse seminiferous tubules. **Anatomical Science International**, vol. 94, p. 1-10, 2018
- OLIVEIRA, P. F.; ALVES, M. G. Sertoli Cell Metabolism and Spermatogenesis. Ed. **Springer**, p. 75, 2015.
- PAYNE, A. H; HARDY, M. P. The Leydig cell in health and disease. **Humana Press**. New Jersey, 2007.
- RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. (Eds). Histological and histopathological evaluation of the testis. Bolesta: **Cache River Press**, p. 1-40, 1990.
- RUSSELL, L. D.; GRISWOLD, M. D. The Sertoli Cell. Clearwater. **Cache River Press**, Florida, p. 1-37, 1993.
- SANTOS, E. M dos. Alteração da expressão de enzima 3β -HSD e aromatase nos testículos de ratos submetidos a exposição crônica ao herbicida atrazina, seguido de um período de recuperação. Dissertação de mestrado, **Universidade Federal de Minas Gerais**, 2013.
- SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. **Current Biology**, vol. 24. n. 10, p. 453-462, 2014.
- SCHMITT-JANSEN, M.; VEIT, U.; DUDEL, G.; ALTENBURGER, R. An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: Approaches and challenges. **Basic and Applied Ecology**, vol. 9, n. 4, p. 337-345, 2008.
- SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. M.; DOWD, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**, vol. 360, p. 1-16, 2001.
- SIGEL, A.; SIGEL, H.; SIGEL, R. K. O. Metal ions in life sciences: Cadmium: From toxicity to essentiality. Ed. **Springer**, vol. 11, p. 589, 2013.
- SIKKA, S. C. Relative Impact of Oxidative Stress on Male Reproductive Function. **Current Medicinal Chemistry**, vol. 8, p. 851-862, 2001.
- STORZ, G.; IMLAY, J. A. Oxidative stress. **Current Opinion in Microbiology**, vol.2, n. 2, p. 188-194, 1999.
- TAVARES, S.R. Remediação de solos e águas contaminadas por metais pesados. **Conceitos Básicos & Fundamentos**, 1ª Edição, Rio de Janeiro, p. 147, 2013.
- TOMÉ, A. R. Estudo dos efeitos da inibição crônica do óxido nítrico na reprodução de ratos machos. Tese de doutorado, **Universidade Federal do Ceará**, 2002.

WANG, Y; FENG, W; ZENG, Q; SUN, Y; WANG, P; YOU, L; YANG, P; HUANG, Z; YU, S; LU, W. Variability of Metal Levels in Spot, First Morning, and 24-Hour Urine Samples over a 3-Month Period in healthy adult chinese men. **Environmental Health Perspectives**, vol.124, n. 4, p. 468-476, 2016.

WHO-World Health Organization. Expose to Lead: A major public health concern. Geneva. 1992.

WU, X.; GUO, X.; WANG, H.; ZHOU, S.; LI, L.; CHEN, X.; WANG, G.; LIU, J.; GE, H.; GE, R. A brief exposure to cadmium impairs Leydig cell regeneration in the adult rat testis. **Scientific Reports**, vol. 7, n.6337, 2017.

5 ARTIGO I

TOXICOLOGIA DO ARSENATO, ARSENITO, CÁDMIO, CHUMBO, CROMO E NÍQUEL EM TESTÍCULOS DE CAMUNDONGOS SWISS ADULTOS APÓS EXPOSIÇÃO CRÔNICA VIA INTRAPERITONEAL

5.1 INTRODUÇÃO

Os metais pesados apresentam o potencial para tornarem-se tóxicos nos sistemas biológicos (TAVARES, 2013). A Agência de Substâncias Tóxicas e Registros de Doenças - ATSDR (2017) elenca o cádmio, chumbo, cromo e níquel como emergências de saúde ambiental pois causam impactos no ecossistema e na saúde humana. Embora o arsênio seja um semimetal, é igualmente considerado um metal pesado perigoso devido aos seus efeitos tóxicos (BARAKAT, 2011). A exposição aos metais é inevitável devido à sua onipresença na natureza e ao seu amplo uso na indústria, além de seu longo prazo de persistência no ambiente (PIZENT *et al.*, 2012). Geralmente, a contaminação ocorre acidentalmente por meio do consumo de alimentos e água contaminados ou inalação de ar contaminado (WIRTH e MIJAL, 2010).

Os efeitos causados pela contaminação com metal dependem do tempo de exposição, da natureza do metal e de sua capacidade bioacumulativa (TAVARES, 2013; NORDBERG *et al.*, 2015). Tem sido relatado casos agudos e crônicos de intoxicação relacionados à exposição ao cromo e níquel, elementos muito utilizados em processos metalúrgicos, soldas ou indústrias de cromagem (BRADL, 2005; PAYNE e HARDY, 2007; DAS *et al.*, 2008; HUGHSON *et al.*, 2010). Além disso, metais pesados como o cádmio, amplamente utilizado na indústria, interferem no metabolismo dos metais essenciais e nutrientes, reduzindo suas concentrações no organismo ou diminuindo sua biodisponibilidade (PAYNE e HARDY, 2007; SIGEL *et al.*, 2013). Os metais podem também interferir nos processos enzimáticos, afetar a estrutura e função das membranas celulares e induzir estresse oxidativo. Neste contexto, podemos citar, dois exemplos: o arsênio, metal muito encontrado na formulação de herbicidas (PAYNE e HARDY, 2007; ANDRADE e ROCHA, 2015) e o chumbo, encontrado em tintas, baterias e ligas metálicas (MOREIRA E MOREIRA, 2004; IARC, 2006; PAYNE e HARDY, 2007). Tudo isso afeta diretamente a célula em crescimento, desenvolvimento e diferenciação, sendo, portando, a espermatogênese foco de estudos envolvendo a contaminação por metais pesados (IYENGAR e NAIR, 2000; PIZENT *et al.*, 2012).

No testículo, o arsênio e o cromo induzem apoptose das células germinativas, causando diminuição significativa no número total de espermatozoides (MOMENI *et al.* 2012; MAROUANI *et al.* 2017). Além disso, Chiou *et al.* (2008) e Santos (2013) demonstraram que

o arsênio e cromo inibem a secreção de testosterona pelas células de Leydig. Do mesmo modo, a exposição ao cádmio provoca danos irreversíveis, como apoptose das células de Leydig, o que acarreta diminuição da função esteroidogênica do testículo (MOURO *et al.* 2019). Adicionalmente, provoca a depleção de células germinativas e induz necrose testicular (OLIVEIRA *et al.* 2012). Adhikari *et al.* (2001) também observaram que a exposição ao chumbo causa aumento significativo no número de células apoptóticas no parênquima testicular, o que pode ser explicado, de acordo com Haouas *et al.* (2014), pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) no testículo após a exposição ao metal. Por fim, a qualidade espermática após exposição ao níquel também é diminuída, uma vez que houve diminuição do nível de testosterona resultante do dano testicular (KONG *et al.*, 2014). Os principais danos identificados por Massányi *et al.* (2007) foram o aumento da morte celular no intertúbulo e diminuição do epitélio seminífero. Assim, a determinação exata dos mecanismos pelo qual cada metal pesado atua e o estabelecimento da ordem de toxicidade desses metais tornaram-se prioridades de pesquisa (PAYNE e HARDY, 2007).

Estudos epidemiológicos indicam diminuição no número de espermatozoides e aumento nos distúrbios reprodutivos em algumas áreas durante os últimos 50 anos (MASSÁNY *et al.*, 2020). Neste período houve aumento das concentrações de metais pesados no ambiente, devido a sua extração e beneficiamento, rejeitos industriais, efluentes domésticos, insumos agrícolas, descarte de produtos comerciais, queima de combustíveis fósseis e descarte de lodo de esgoto (MUNIZ e OLIVEIRA-FILHO, 2006). Assim, sugere-se que alterações nos parâmetros reprodutivos possam ter ocorrido com um papel crucial do meio ambiente atuando de forma crônica nos indivíduos (MASSÁNY *et al.*, 2020). Portanto, este estudo objetivou avaliar, por meio de análises histomorfométricas, estereológicas e de status oxidativo, os mecanismos de toxicidade dos metais pesados arsenato (As^{+5}), arsenito (As^{+3}), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr VI) e níquel (Ni), após exposição crônica, nos testículos de camundongos adultos, assim como determinar a acumulação gonadal destes metais e estabelecer uma ordem de toxicidade entre eles, no âmbito da fertilidade masculina.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Animais

Foram utilizados 42 camundongos Swiss machos em idade reprodutiva (140 dias), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia

Geral da UFV à temperatura de 20°C a 22°C, em ambiente iluminado por 12 horas e no escuro pelo mesmo período. Todos os procedimentos experimentais seguiram os padrões determinados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFV, protocolo 07/2018).

5.2.2 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 7 grupos experimentais (n=6 animais/grupo), pesados e destinados em gaiolas individuais. A exposição aos metais pesados foi feita em doses semanais, via intraperitoneal. O grupo 1 recebeu 0,7mL de solução salina 0,9% (controle), o grupo 2 recebeu 1,5 mg/Kg de arsênio na forma de arsenato (6,24 mg/Kg de $\text{HAsNa}_2\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), o grupo 3 recebeu 1,5 mg/Kg de arsênio na forma de arsenito (2,60 mg/Kg de AsNaO_2), o grupo 4 recebeu 1,5 mg/kg de cádmio (2,45 mg/kg de CdCl_2), o grupo 5 recebeu 1,5 mg/Kg de chumbo (2,45 mg/kg de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), o grupo 6 recebeu 1,5 mg/Kg de cromo VI (2,88 mg/kg de CrO_3) e o grupo 7 recebeu 1,5 mg/Kg de níquel (6,07 mg/kg de $\text{Cl}_2\text{Ni} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), durante seis semanas. Os animais foram eutanasiados após 42 dias de experimento.

A dosagem de 1,5 mg/kg foi baseada em estudos que administraram cádmio, onde observou-se que os danos testiculares só ocorrem a partir de 0,67 mg/kg (CUPERTINO, 2016). A fim de realizar uma avaliação toxicológica comparativa entre esses metais, foi utilizada o dobro dessa dosagem, aproximadamente 1,5mg/kg.

O período de 42 dias é equivalente à duração completa da espermatogênese no camundongo e por isso possibilita a observação de alterações crônicas e a capacidade de acumulação dos metais pesados (RUSSELL *et al.*, 1990).

5.2.3 Biometria corporal e testicular

Os animais foram pesados em balança de precisão 0,01g (AS500, Marte) e anestesiados com tiopental 30 mg/Kg intraperitoneal. O sangue foi coletado por punção cardíaca e esse procedimento acarretou na morte do animal. Em seguida, foi realizada a incisão escrotal para dissecação, obtenção e pesagem dos testículos. O testículo direito foi congelado para realização das análises de status oxidativo, enquanto a gônada esquerda foi destinada ao processamento histológico e acúmulo de metais, sendo fixada em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965).

Para determinar o peso do parênquima testicular, a albugínea foi retirada do testículo fixado e pesada, descontando-se seu peso daquele obtido para o testículo inteiro. Baseado nos pesos corporal, testicular e do parênquima, foram calculados os índices gonadossomático (IGS) e parenquimossomático (IPS), de acordo com Mouro *et al.* (2019).

5.2.4 Determinação do acúmulo de metais pesados

O acúmulo dos metais arsênio, cádmio, cromo e níquel foi determinado em fragmentos testiculares fixados e secos a 60°C durante 96 horas. As amostras foram revestidas com carbono (quorum Q150 T, East Grinstead, West Sussex, Inglaterra, Reino Unido), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, e analisadas por espectroscopia dispersiva de raios-X (EDS) em microscópio eletrônico de varredura (Leo 1430VP, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com detector de raios-X acoplado (Tracor TN5502, Middleton, WI, USA) (LADEIRA *et al.*, 2019) no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Departamento de Física da UFV.

5.2.5 Processamento do material histológico

Fragmentos dos testículos destinados ao estudo em microscopia de luz foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica), seccionados na espessura de 3µm, mantendo-se um intervalo de 13 cortes entre secções, e corados com azul de toluidina - borato de sódio 1%. As preparações foram montadas com Entellan® (Merck, Frankfurt, Alemanha). Imagens dos tecidos foram obtidas em microscópio Olympus AX-70 e analisadas utilizando-se o programa ImageJ.

5.2.6 Morfometria e estereologia tubular

A proporção volumétrica dos elementos que compõem o parênquima testicular foi estimada a partir da contagem de 5.320 pontos por animal, utilizando-se retículo com 266 intersecções (pontos), em aumento de 200X, realizando-se a contagem de 20 campos aleatoriamente distribuídos, nas preparações histológicas.

Foram anotados pontos sobre as estruturas do parênquima testicular, como túbulo seminífero, especificando-se aqueles sobre a túnica própria, o epitélio seminífero e lúmen, e sobre o compartimento intertubular. A proporção volumétrica desses componentes e o volume de túbulo seminífero e intertúbulo, bem como dos elementos que os compõem foram calculados de acordo com Mouro *et al.* (2019). O volume do testículo foi considerado igual ao peso, pois sabe-se que a densidade testicular está próxima de 1 em mamíferos (JOHNSON *et al.*, 1981).

Baseado no volume de túbulo seminífero, volume de epitélio seminífero e no peso corporal foram calculados os índices tubulossomático (ITS) (LIMA *et al.* 2018) e epiteliossomático (IES) (DIAS *et al.*, 2020).

O diâmetro tubular médio (μm) por animal foi obtido de acordo com Mouro *et al.* (2019), a partir da mensuração, ao acaso, de 20 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível, sem se considerar o estágio do ciclo do epitélio seminífero. Foi mensurada a altura do epitélio seminífero (μm) a partir da túnica própria até o lúmen tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio, em cada túbulo, representou a média de duas medidas de forma diametralmente opostas. De posse do diâmetro dos túbulos seminíferos e da altura do epitélio, foram calculados o diâmetro do lúmen tubular e em seguida, as áreas tubulares, luminal e epitelial e a relação túbulo – epitélio.

O comprimento total dos túbulos seminíferos, em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos mesmos nos dois testículos e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal (SOUZA *et al.* 2015).

5.2.7 Morfometria e estereologia intertubular

A proporção volumétrica entre os elementos que compõem o intertúbulo foi estimada a partir da contagem de 1.000 pontos por animal, utilizando-se retículo com 540 intersecções (pontos), em aumento de 400X, em campos aleatoriamente distribuídos nas preparações histológicas do testículo de cada animal.

Foram anotados pontos sobre os componentes do compartimento intertubular, como células de Leydig (núcleo e citoplasma), vasos sanguíneos, espaço linfático, tecido conjuntivo e macrófagos. A proporção volumétrica desses componentes foi calculada por meio da proporção de intertúbulo e da proporção volumétrica do componente no intertúbulo (MOURO *et al.* 2019).

Baseado no volume de intertúbulo e no peso corporal foi calculado o índice intertubulossomático (IIS) a partir da equação: $IIS = VI / PC \times 100$, onde VI = Volume de intertúbulo do testículo e PC= Peso corporal. Baseado no volume de células de Leydig e no peso corporal foi calculado o índice Leydigossomático (ILS) (SOUZA *et al.* 2015).

Foi medido o diâmetro nuclear médio, em μm , das células de Leydig em aumento de 400x, totalizando 30 núcleos para cada animal. Os núcleos medidos foram os mais esféricos e com cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. A partir do raio nuclear e da proporção volumétrica do componente de intertúbulo foram calculados os volumes nuclear e

citoplasmático e, conseqüentemente, o volume de cada célula de Leydig, em μm^3 (DIAS *et al.* 2020).

O volume que a célula de Leydig ocupa por testículo, em μL , foi calculado a partir da proporção volumétrica da célula de Leydig no parênquima testicular e do peso do parênquima de dois testículos. O volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo, em μL , foi calculado do volume que a célula de Leydig ocupa por testículo, e do peso dos testículos (DIAS *et al.* 2020).

De posse do volume individual da célula de Leydig e do volume total ocupado por estas células no testículo, foi calculado o número de células de Leydig por testículo. Esse valor foi dividido pelo peso gonadal para estimar o número de células de Leydig por grama de testículo, o que permite comparações entre espécies diferentes (SOUZA *et al.* 2015).

5.2.8 Análise histopatológica testicular

Para a avaliação histopatológica do testículo foram contados 200 túbulos por animal e classificados em três categorias, adaptado do índice de Johnsen (1970): patologias leves (vacúolos na base, vacúolos no ápice e vacúolos na base e no ápice), moderada (descamação do epitélio seminífero e túbulos apenas com células basais) e graves (túbulos apenas com células de Sertoli e túbulos desprovidos de células de Sertoli ou células germinativas).

5.2.9 Avaliação do status oxidativo

O testículo foi homogeneizado em tampão fosfato (pH 7,4) na proporção de 100 mg de órgão para 1000 μL de tampão. A suspensão foi centrifugada (12000 rpm a 4°C por 10 minutos) e o sobrenadante foi utilizado na determinação da atividade de enzimas antioxidantes, concentração de óxido nítrico, malondialdeído, proteínas oxidantes e proteína total.

5.2.10 Análise das enzimas antioxidantes

A atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) foi determinada em leitor de Elisa em 570 nm baseado na capacidade dessa enzima em catalisar a reação do superóxido O_2^- em H_2O_2 e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol (DIETERICH *et al.*, 2000). A atividade enzimática da catalase (CAT) foi mensurada segundo Goth (1991) e Korolyuk *et al.* (1988) modificado por Hadwan e Abed (2016). A atividade da CAT foi avaliada por meio da incubação da amostra enzimática em peróxido de hidrogênio e tampão de fosfato de sódio-

potássio por três minutos. A reação foi bloqueada com molibdato de amônio. Este método baseia-se na reação do peróxido de hidrogênio com molibdato de amônio para produzir uma cor amarelada, que possui uma absorvância máxima a 374 nm. A atividade enzimática da glutationa S-transferase (GST) foi mensurada de acordo com Habig *et al.* (1974), por meio da formação do conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno (CDNB).

5.2.11 Determinação do produto de estresse oxidativo – Malondialdeído (MDA)

Ao homogenato foi adicionado solução TBARS (ácido tricloroacético 15%, 0,375% de ácido tiobarbitúrico e ácido clorídrico 0,25 M) mantendo-se, por 40 minutos, em banho-maria a temperatura de 90°C. As substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico são, em sua maioria, produtos da peroxidação lipídica, sendo o MDA importante marcador para monitorar a taxa de lipoperoxidação. Foi quantificada a concentração de MDA em leitor de microplacas ($\lambda = 532\text{nm}$). A concentração de MDA foi determinada por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1, 1, 3,3-tetramethoxypropane (TMPO). Os resultados foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína (BUEGE e AUST, 1978).

5.2.12 Oxido nítrico (ON)

O nitrito usado como indicador da síntese de óxido nítrico é detectado pelo Reativo de Griess, composto por 1% de sulfanilamida e 0,1% naftil-etileno-diamina em 2,5% H_3PO_4 . Desta forma, 50 μL do sobrenadante das amostras foi adicionado em microplacas com igual volume do Reativo de Griess, incubado em temperatura ambiente por 15 minutos, avaliando-se, na sequência, em leitor de microplacas ($\lambda = 540\text{ nm}$). A concentração do óxido nítrico das amostras foi determinada utilizando curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio e expressas em μM (DROGE, 2002; RICART-JANÉ *et al.*, 2002).

5.2.13 Oxidação de proteínas

O teor de proteína carbonilada foi medido usando o método de Levine *et al.* (1994), que utiliza a reação dos grupos carbonila com 2, 4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) promovendo melhor especificidade e sensibilidade à análise. Foi adicionada à amostra a solução DNPH 10 mmol / L diluída em ácido clorídrico (7%), mantendo-se em temperatura ambiente no escuro e agitando periodicamente por 30 min. Em seguida, ácido tricloroacético 10% (TCA) gelado foi adicionado a cada tubo, centrifugado (5000 g por 10 min a 4 °C) e o sobrenadante foi

descartado. O precipitado foi lavado com acetato de etila e etanol. Finalmente, o dodecil sulfato de sódio (SDS) 6% foi adicionado e a absorbância foi medida a 370 nm.

5.2.14 Análises estatísticas

Antes de serem analisados, os valores percentuais médios obtidos foram transformados em arco-seno. Os dados estudados foram submetidos à avaliação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e em sequência, aqueles que tiveram distribuição normal foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls (SNK). Os dados não paramétricos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. Foi utilizado o software STATISTICA, sendo o nível de significância considerado de $p \leq 0,05$.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Biometria corporal e testicular

Os parâmetros biométricos corporais e testiculares e os índices gonadossomático e parenquimossomático estão apresentados na Tabela 1. Não houveram alterações significativas nesses parâmetros avaliados com a administração dos metais pesados.

Tabela 1 – Parâmetros biométricos corporais e testiculares de camundongos Swiss após exposição intraperitoneal crônica ao arsenato (As⁺⁵), arsenito (As⁺³), cádmio (Cd), cromo (Cr VI), níquel (Ni) e chumbo (Pb).

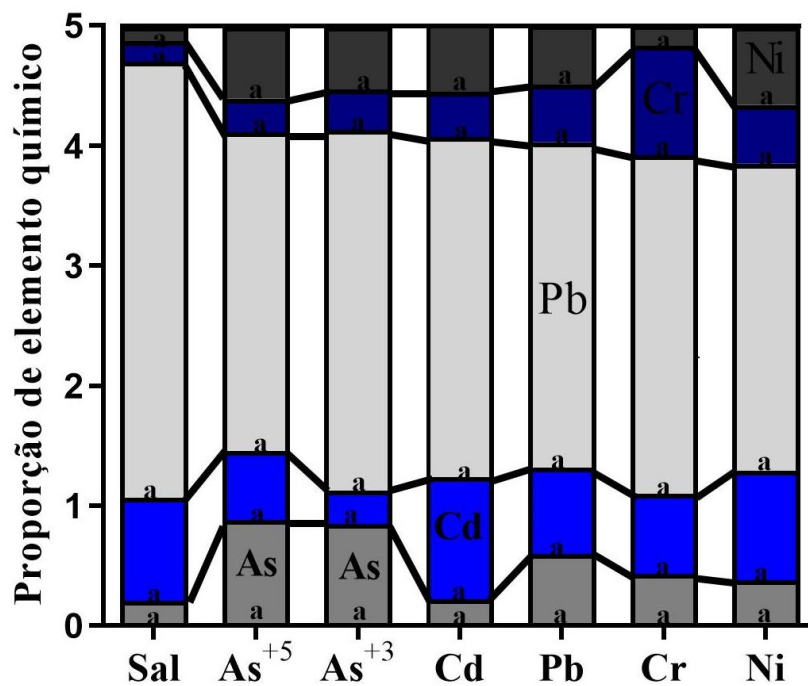
Parâmetros	Sal	As ⁺⁵	As ⁺³	Cd	Pb	Cr (VI)	Ni
PC (g)	45,23±7,78 ^a	42,18±4,35 ^a	43,69±6,46 ^a	43,46±4,52 ^a	46,51±2,36 ^a	43,51±6,17 ^a	46,81±4,75 ^a
PT (g)	0,20±0,03 ^a	0,18±0,04 ^a	0,17±0,06 ^a	0,19±0,01 ^a	0,22±0,03 ^a	0,18±0,03 ^a	0,23±0,03 ^a
PA (g)	0,04±0,02 ^a	0,03±0,01 ^a	0,02±0,01 ^a	0,05±0,00 ^a	0,06±0,02 ^a	0,05±0,03 ^a	0,04±0,01 ^a
PP (g)	0,15±0,02 ^a	0,15±0,03 ^a	0,14±0,05 ^a	0,16±0,01 ^a	0,16±0,05 ^a	0,13±0,05 ^a	0,20±0,03 ^a
IGS (%)	0,44±0,06 ^a	0,43±0,05 ^a	0,39±0,10 ^a	0,45±0,08 ^a	0,47±0,07 ^a	0,41±0,09 ^a	0,50±0,07 ^a
IPS (%)	0,34±0,06 ^a	0,35±0,04 ^a	0,31±0,06 ^a	0,36±0,08 ^a	0,33±0,10 ^a	0,33±0,10 ^a	0,48±0,08 ^a

Sal - Salina (controle) / PC - Peso corporal / PT - Peso testicular / PA - Peso da albugínea / PP - Peso do parênquima / IGS – Índice Gonadossomático / IPS – Índice parenquimossomático. Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes na mesma linha mostram valores significativamente diferentes em relação ao controle ($p \leq 0,05$) pelo Student Newman Keuls (dados paramétricos) ou Kruskal-Wallis (dados não paramétricos). Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.2 Determinação do acúmulo de metais pesados

A proporção entre os metais arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr) e níquel (Ni) no testículo está exposta na Figura 1. A administração de As, Cd, Pb, Cr e Ni não causou acúmulo significativo nos testículos dos animais expostos aos metais quando comparados com o controle.

Figura 1 – Proporção entre os metais pesados no testículo de camundongos Swiss após exposição intraperitoneal ao arsenato (As+5), arsenito (As+3), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr) e níquel (Ni). Sal – Salina (controle).



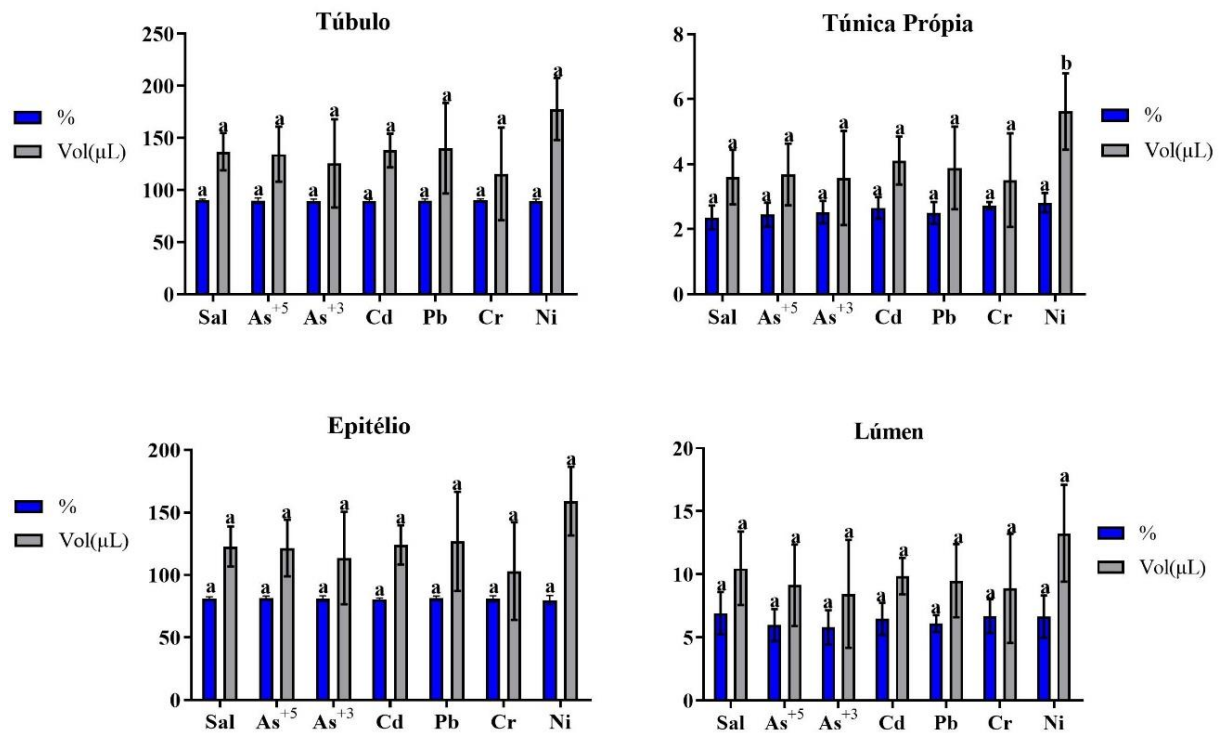
Letras diferentes mostram valores significativamente diferentes em relação ao controle ($p \leq 0,05$) pelo Student Newman Keuls (dados paramétricos) ou Kruskal-Wallis (dados não paramétricos). Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.3 Morfometria e estereologia tubular

A proporção e volume de túbulo, epitélio seminífero e lúmen não mostraram variações significativas com os metais administrados, enquanto o volume de túnica própria aumentou cerca de 56% no grupo exposto ao níquel (Ni) (Figura 2). Os índices tubulossomático e epiteliossomático assim como a altura de epitélio seminífero, o diâmetro de túbulo, o diâmetro de lúmen, o comprimento total de túbulos seminíferos nos testículos, o comprimento total de túbulos seminíferos por grama de testículo, as áreas de túbulo, lúmen e epitélio seminífero e a

relação túbulo/epitélio não mostraram alterações significativas com a exposição aos metais analisados (Tabela 2).

Figura 2 – Proporção (%) e volume (μL) de túbulo, epitélio seminífero, lúmen e túnica própria de testículo de camundongos Swiss após exposição crônica intraperitoneal ao arsenato (As^{+5}), arsenito (As^{+3}), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo VI (Cr) e níquel (Ni). Sal – Salina.



Dados expressos como média \pm DP. Letras diferentes mostram valores significativamente diferentes em relação ao controle ($p \leq 0,05$) pelo Student Newman Keuls (dados paramétricos) ou Kruskal-Wallis (dados não paramétricos). Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 2 – Parâmetros morfométricos testiculares de camundongos Swiss após exposição intraperitoneal crônica ao arsenato (As+5), arsenito (As+3), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr VI) e níquel (Ni).

Parâmetros	Sal	As ⁺⁵	As ⁺³	Cd	Pb	Cr (VI)	Ni
ITS (%)	0,31±0,05 ^a	0,32±0,04 ^a	0,28±0,06 ^a	0,32±0,07 ^a	0,30±0,09 ^a	0,26±0,09 ^a	0,38±0,08 ^a
IES (%)	0,28±0,04 ^a	0,29±0,04 ^a	0,26±0,05 ^a	0,29±0,06 ^a	0,27±0,08 ^a	0,24±0,08 ^a	0,34±0,07 ^a
AE (µm)	77,01±6,01 ^a	76,95±4,23 ^a	78,44±6,70 ^a	74,49±3,31 ^a	77,90±5,93 ^a	72,63±4,35 ^a	77,01±7,34 ^a
DT ((µm)	193,63±51 ^a	188,16±6,88 ^a	194,97±7,51 ^a	188,09±12,51 ^a	195,04±14,02 ^a	195,99±17,18 ^a	207,76±27,21 ^a
DL (µm)	39,60±9,43 ^a	34,26±3,33 ^a	38,09±9,44 ^a	39,11±12,60 ^a	39,24±8,51 ^a	50,72±14,03 ^a	43,22±5,87 ^a
CTT (m)	4,75±1,15 ^a	4,86±1,06 ^a	4,20±1,43 ^a	5,03±0,90 ^a	4,74±1,56 ^a	3,89±1,69 ^a	5,32±0,87 ^a
CTT/gT (m)	24,31±5,37 ^a	26,41±3,02 ^a	24,72±3,50 ^a	26,17±5,51 ^a	21,33±4,45 ^a	21,77±8,18 ^a	23,02±4,51 ^a
ArT (10 ⁻² mm ²)	2,95±0,31 ^a	2,78±0,20 ^a	2,99±0,23 ^a	2,79±0,36 ^a	3,00±0,44 ^a	3,03±0,54 ^a	3,44±0,93 ^a
ArL (10 ⁻² mm ²)	0,13±0,07 ^a	0,09±0,02 ^a	0,12±0,06 ^a	0,13±0,08 ^a	0,13±0,06 ^a	0,21±0,13 ^a	0,15±0,04 ^a
ArE (10 ⁻² mm ²)	2,82±0,30 ^a	2,69±0,21 ^a	2,87±0,26 ^a	2,66±0,30 ^a	2,87±0,41 ^a	2,82±0,43 ^a	3,31±0,98 ^a
RTE	1,04±0,01 ^a	1,03±0,01 ^a	1,04±0,02 ^a	1,05±0,03 ^a	1,04±0,02 ^a	1,07±0,03 ^a	1,05±0,02 ^a

Sal - Salina (controle), ITS - Índice tubulossomático / IES – Índice epiteliossomático / AE - Altura de epitélio / DT – Diâmetro de túbulo / DL - Diâmetro de lúmen / CTT - Comprimento total de túbulo seminífero no testículo / CTT/gT - Comprimento total de túbulo seminífero por grama de testículo / ArT – Área de túbulo / ArL – Área de Lúmen / ArE – Área de epitélio e RTE – Relação túbulo/Epitélio. Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes na mesma linha mostram valores significativamente diferentes em relação ao controle (p ≤ 0,05) pelo Student Newman Keuls (dados paramétricos) ou Kruskal-Wallis (dados não paramétricos). Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.4 Morfometria e estereologia intertubular

A proporção do intertúbulo e dos componentes do intertúbulo estão dispostos na Tabela 3. A proporção de vasos sanguíneos diminuiu cerca de 51% e 52% nos grupos expostos ao cádmio (Cd) e níquel (Ni), respectivamente. A proporção de espaço linfático aumentou significativamente nos grupos expostos ao Cd e Ni (81% e 82%, respectivamente). As demais proporções não apresentaram variações significativas após a administração dos metais.

O volume de intertúbulo e dos componentes do intertúbulo estão dispostos na Tabela 4. O volume de espaço linfático aumentou aproximadamente 135% no grupo exposto ao Ni. Os demais volumes não apresentaram alterações significativas após a administração dos metais em relação ao controle.

Os parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig e o índice Leydigossomático não mostraram alterações significativas dos grupos expostos aos metais em relação ao controle (tabela suplementar 1).

Tabela 3 – Proporção do intertúbulo e dos componentes do intertúbulo de camundongos Swiss após exposição intraperitoneal crônica ao arsenato (As⁺⁵), arsenito (As⁺³), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr VI) e níquel (Ni).

Parâmetros	Sal	As ⁺⁵	As ⁺³	Cd	Pb	Cr (VI)	Ni
% IT	9,60±0,87 ^a	10,18±2,54 ^a	10,51±1,86 ^a	10,43±1,51 ^a	10,05±1,66 ^a	9,53±1,14 ^a	10,58±1,97 ^a
%VS	0,96±0,29 ^a	0,80±0,21 ^a	0,64±0,29 ^a	0,47±0,09 ^b	0,73±0,15 ^a	0,54±0,13 ^a	0,46±0,09 ^b
%EL	1,38±0,14 ^a	1,78±0,02 ^a	1,67±0,39 ^a	2,50±0,65 ^b	1,94±0,54 ^a	1,70±0,15 ^a	2,51±0,91 ^b
%NL	1,46±0,24 ^a	1,59±0,49 ^a	1,87±0,66 ^a	1,51±0,29 ^a	1,42±0,32 ^a	1,55±0,24 ^a	1,57±0,48 ^a
%CL	5,49±0,74 ^a	5,68±1,62 ^a	6,02±1,39 ^a	5,55±0,93 ^a	5,62±0,97 ^a	5,45±0,81 ^a	05,65±0,86 ^a
%VL	6,95±0,81 ^a	7,27±1,94 ^a	7,88±1,90 ^a	7,07±1,12 ^a	7,04±1,21 ^a	7,01±0,95 ^a	7,22±1,16 ^a
%TC	0,31±0,08 ^a	0,31±0,14 ^a	0,31±0,06 ^a	0,38±0,11 ^a	0,33±0,09 ^a	0,39±0,19 ^a	0,38±0,13 ^a
%MAC	0,00±0,00 ^a	0,00±0,01 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,01 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,01 ^a

Sal - Salina (controle), % IT – Porcentagem de intertúbulo, %VS – Porcentagem de vaso sanguíneo, %EL – Porcentagem de espaço linfático, %NL – Porcentagem de núcleo de Leydig, %CL – Porcentagem de citoplasma de Leydig, %VL – Volume de Leydig, %TC – Porcentagem de tecido conjuntivo, %MAC – Porcentagem de macrófago. Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes na mesma linha mostram valores significativamente diferentes em relação ao controle ($p \leq 0,05$) pelo Student Newman Keuls (dados paramétricos) ou Kruskal-Wallis (dados não paramétricos). Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 4 – Volume do intertúbulo e dos componentes do intertúbulo de camundongos Swiss após exposição intraperitoneal crônica ao arsenato (As+5), Arsenito (As+3), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Cromo (Cr VI) e Níquel (Ni).

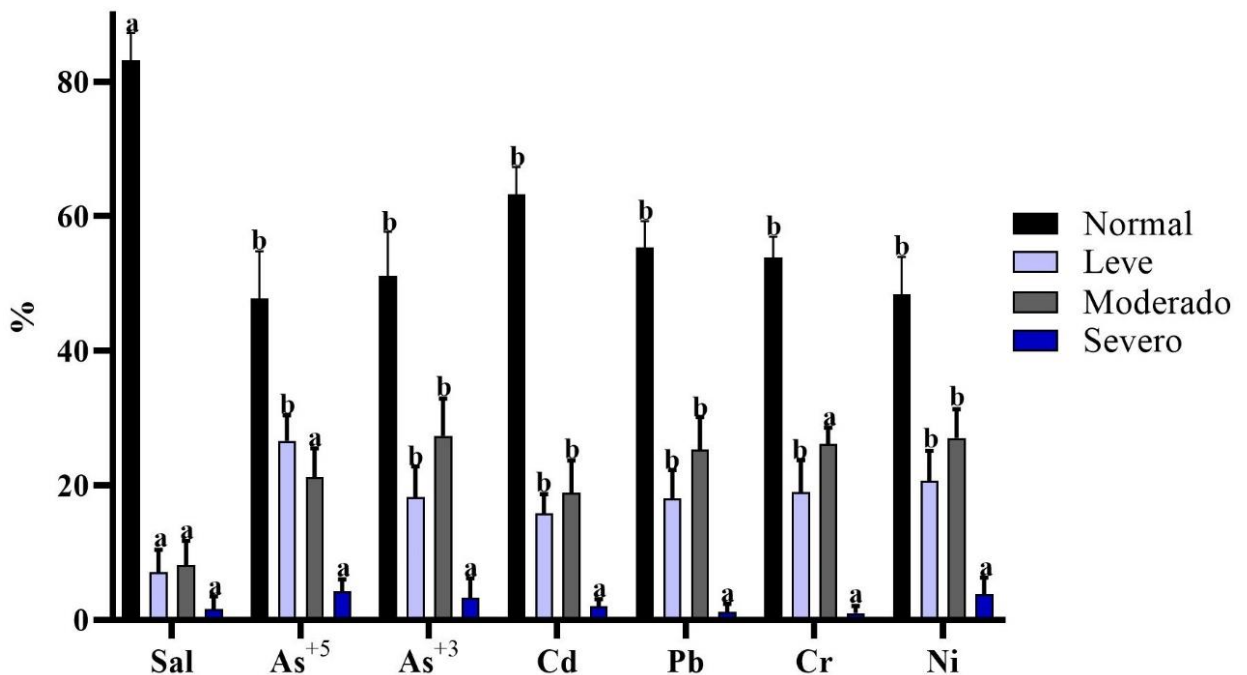
Parâmetros	Sal	As ⁺⁵	As ⁺³	Cd	Pb	Cr (VI)	Ni
VIT	14,56±2,42 ^a	14,72±2,05 ^a	14,63±4,57 ^a	16,13±3,29 ^a	15,22±3,81 ^a	12,59±5,42 ^a	20,84±4,20 ^a
VVS	1,46±0,50 ^a	1,20±0,41 ^a	0,87±0,43 ^a	0,73±0,19 ^a	1,17±0,51 ^a	0,72±0,38 ^a	0,90±0,08 ^a
VEL	2,10±0,47 ^a	2,56±0,71 ^a	2,43±1,12 ^a	3,92±1,28 ^a	2,96±0,91 ^a	2,20±0,90 ^a	4,94±1,78 ^b
VNL	2,23±0,59 ^a	2,31±0,59 ^a	2,57±0,95 ^a	2,33±0,50 ^a	2,10±0,43 ^a	2,05±0,99 ^a	2,70±0,33 ^a
VCL	8,27±1,25 ^a	8,20±1,38 ^a	8,31±7,71 ^a	8,55±1,67 ^a	8,48±2,03 ^a	7,08±2,91 ^a	11,17±2,12 ^a
VL	10,51±1,71 ^a	10,50±1,57 ^a	10,89±3,46 ^a	10,88±2,05 ^a	10,59±2,39 ^a	9,13±3,86 ^a	14,25±2,74 ^a
VTC	0,49±0,17 ^a	0,45±0,19 ^a	0,44±0,17 ^a	0,59±0,16 ^a	0,50±0,18 ^a	0,54±0,42 ^a	0,74±0,23 ^a
VMAC	0,0±0,01 ^a	0,01±0,01 ^a	0,00±0,00 ^a	0,01±0,01 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a

Sal - Salina (controle), VIT – volume de intertúbulo, VVS – volume de vaso sanguíneo, VEL – volume de espaço linfático, VNL – volume de núcleo de Leydig, VCL – volume de citoplasma de Leydig, VL – volume de Leydig, VTC – volume de tecido conjuntivo, VMAC – volume de macrófago. Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes na mesma linha mostram valores significativamente diferentes em relação ao controle ($p \leq 0,05$) pelo Student Newman Keuls (dados paramétricos) ou Kruskal-Wallis (dados não paramétricos). Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.5 Histopatologia testicular

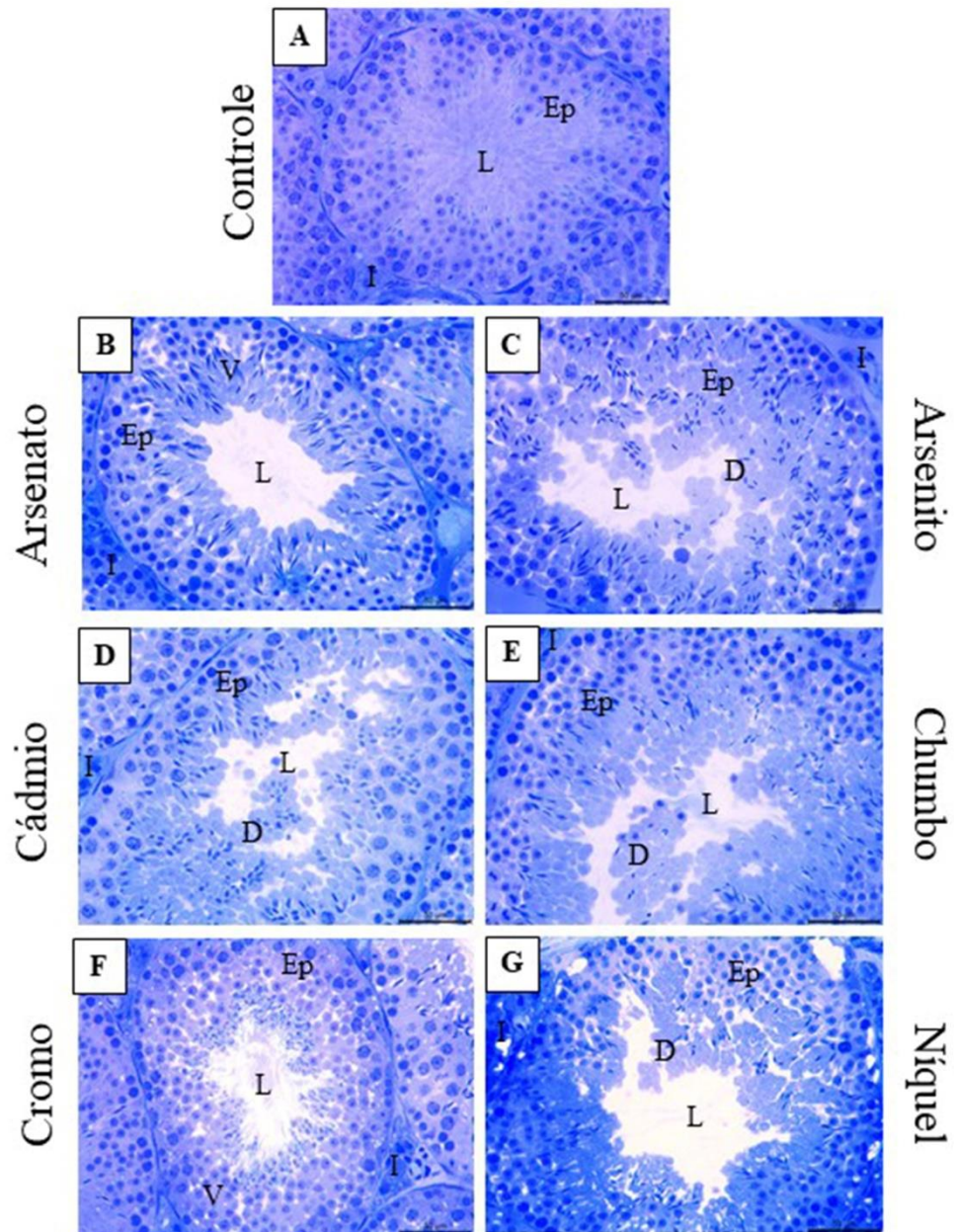
A proporção de túbulos seminíferos normais e túbulos seminíferos com patologias leves, moderadas e severas após a administração dos metais arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo VI (Cr) e níquel (Ni) no testículo estão apresentadas na Figura 3. Houve aumento significativo de túbulos anormais e patologias leves após a administração dos metais pesados. As patologias moderadas aumentaram após exposição ao As^{+3} , Cd, Pb e Ni. As patologias severas não mostraram variações significativas dos grupos tratados em relação ao controle. A Figura 4 apresenta fotomicrografias das patologias visualizadas nas lâminas dos animais expostos aos diferentes tratamentos.

Figura 2 – Proporção de túbulos seminíferos normais e túbulos seminíferos com patologias leves (vacúolos na base, vacúolos no ápice e vacúolos na base e no ápice), moderadas (desprendimento de epitélio e túbulos apenas com células basais) e severas (túbulos apenas com células de Sertoli e túbulos desprovidos de células de Sertoli ou células germinativas) nos testículos de camundongos Swiss após exposição crônica intraperitoneal ao arsenato (As^{+5}), arsenito (As^{+3}), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo VI (Cr) e níquel (Ni).



Sal – Salina (controle). Dados expressos como média \pm DP. Letras diferentes mostram valores significativamente diferentes em relação ao controle ($p \leq 0,05$) pelo Student Newman Keuls (dados paramétricos) ou Kruskal-Wallis (dados não paramétricos). Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 3 - Fotomicrografias testiculares de camundongos Swiss machos após exposição intraperitoneal crônica aos metais pesados.

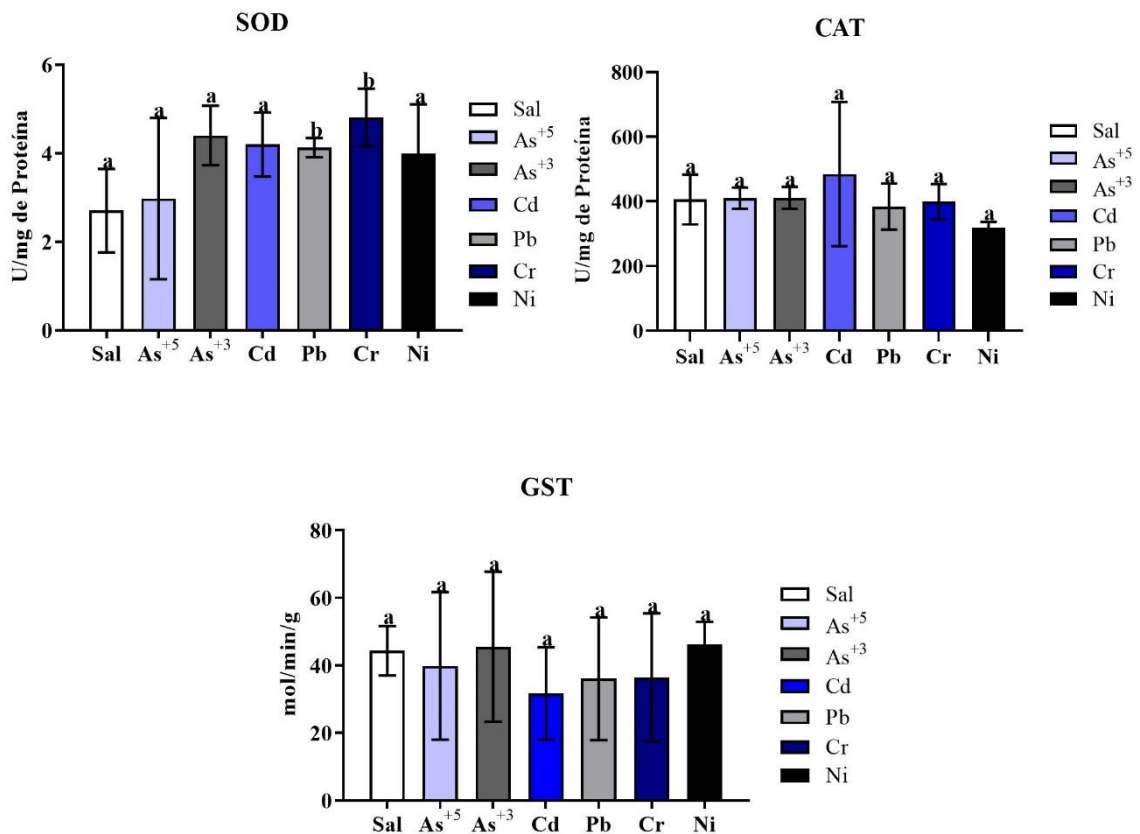


L – Lúmen, Ep - Epitélio seminífero, I – Intertúbulo, V- Vacúolos, D- Descamação do epitélio seminífero. Corte de 3 µm corado com azul de toluidina Barra = 50µm. Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.6 Status oxidativo

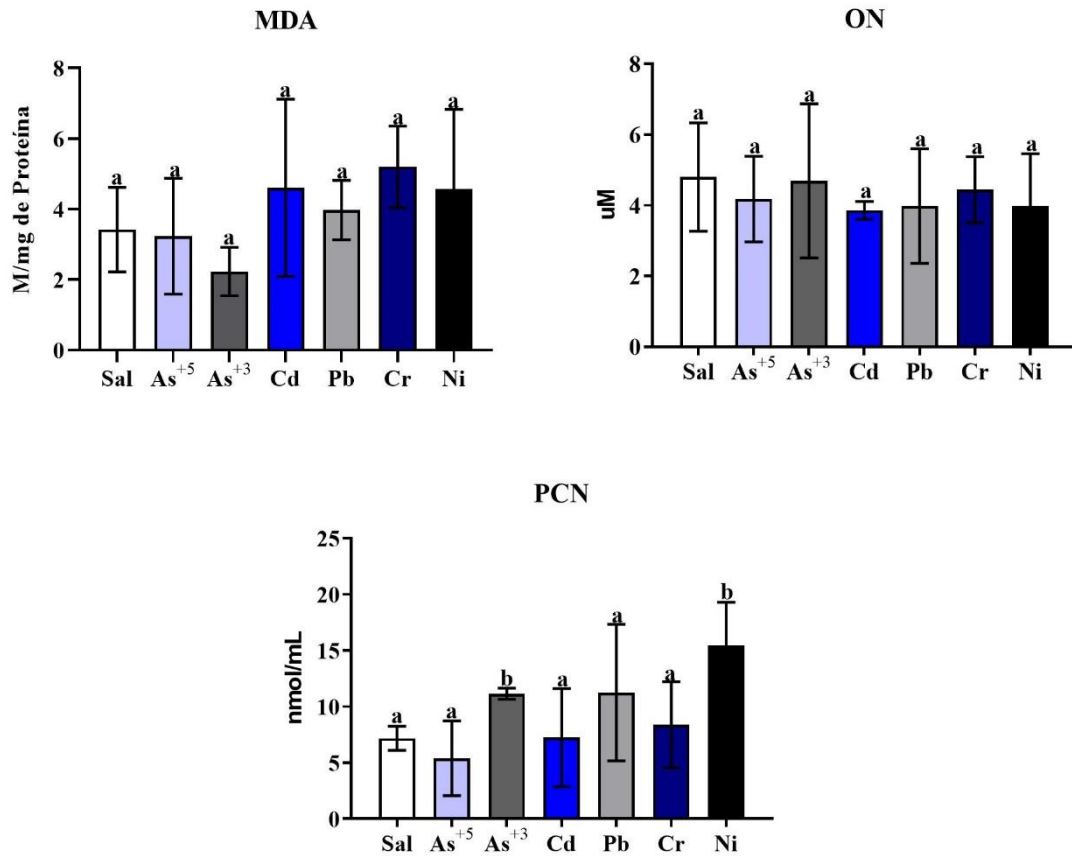
A atividade da enzima antioxidante Superóxido dismutase (SOD) aumentou 51% com a administração de chumbo (Pb) e 62% com o cromo VI (Cr) (Figura 5). No entanto, as enzimas Catalase (CAT) e Glutaciona-S-Transferase (GST) não alteraram significativamente após a exposição aos metais. Os marcadores de estresse oxidativo e nitrosativo Malondialdeído (MDA) e Óxido nítrico (ON) não alteraram significativamente após a exposição aos metais (Figura 6). Diferentemente, o marcador de Proteína carbonilada (PCN) aumentou 42% com a administração de arsenito (As^{+3}) e 114% com a administração de níquel (Ni).

Figura 4 – Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST nos testículos de camundongos Swiss após exposição crônica intraperitoneal ao arsenato (As^{+5}), arsenito (As^{+3}), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo VI (Cr) e níquel (Ni).



Sal – Salina (controle). Dados expressos como média \pm DP. Letras diferentes mostram valores significativamente diferentes em relação ao controle ($p \leq 0,05$) pelo Student Newman Keuls (dados paramétricos) ou Kruskal-Wallis (dados não paramétricos). Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 5 – Marcadores de estresse oxidativo MDA, ON e PCN nos testículos de camundongos Swiss após exposição crônica intraperitoneal ao arsenato (As^{+5}), arsenito (As^{+3}), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo VI (Cr) e níquel (Ni).



Sal – Salina (controle). Dados expressos como média \pm DP. Letras diferentes mostram valores significativamente diferentes em relação ao controle ($p \leq 0,05$) pelo Student Newman Keuls (dados paramétricos) ou Kruskal-Wallis (dados não paramétricos). Fonte: Elaborado pela autora.

5.4 DISCUSSÃO

Sabe-se que os prejuízos causados após a absorção de metais pesados à saúde humana são adversos, podendo gerar danos irreversíveis (TAVARES, 2013). Esses metais pesados não são biodegradáveis e podem acumular no ambiente e nos tecidos vivos, aumentando sua concentração ao longo da cadeia alimentar, podendo chegar ao ser humano (BRADL, 2005). A rota de exposição aos metais pesados utilizada neste trabalho, foi a intraperitoneal que, embora não seja a principal rota de exposição na natureza (MOURO *et al.*, 2019), é bastante utilizada em experimentação animal para evitar a degradação e modificação da substância administrada pelo trato gastrointestinal. Além disso, o vasto suprimento de sangue do peritônio facilita a

absorção de substâncias ocasionando a transferência total do composto da cavidade peritoneal para a circulação sistêmica (AL SHOYAIB *et al.*, 2020). Sabendo disso, neste estudo foram apresentadas pela primeira vez alterações testiculares causadas pela exposição crônica por via intraperitoneal (Ip), aos metais pesados arsenato (As^{+5}), arsenito (As^{+3}), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr VI) e níquel (Ni), sendo estabelecida uma ordem comparativa de toxicidade entre eles. Os resultados indicam que Cd e Ni alteram a morfometria do tecido testicular, enquanto As, Pb, Cr (VI) e Ni alteram o status oxidativo. Além disso, alterações histopatológicas foram identificadas após exposição a todos os metais pesados analisados.

De acordo com Russell *et al.* (1990), o peso do testículo está intimamente ligado à sua capacidade de produzir espermatozoides, uma vez que o testículo é composto em sua maioria de túbulos seminíferos, onde acontece o processo espermatogênico. Os parâmetros biométricos corporais e testiculares de camundongos Swiss, após exposição crônica intraperitoneal a todos os metais pesados testados não se alteraram significativamente. Lima *et al.* (2018) administrando 0,01 e 10 mg/L de arsênio por 56 dias e El-Sayed e El-Neweshy (2010), administrando acetato de chumbo 0,1% por 60 dias, também não verificaram alterações nesses parâmetros. Adicionalmente, Toman *et al.* (2012), administrando 10mg/kg de níquel por 3 a 9 semanas, não obtiveram resultados significativos em relação ao peso corporal e peso testicular. Porém, Hassan *et al.* (2019) observaram diminuição significativa no peso dos testículos em estudos com ratos albinos machos recebendo acetato de chumbo 20 mg/kg, por 56 dias. Portanto, neste estudo, a baixa dose ou tempo de exposição podem ter sido insuficientes para gerar alterações nos órgãos reprodutivos.

Embora não tenha sido visualizada bioacumulação pela análise de espectroscopia dispersiva de raios-X (EDS), ressalta-se os danos causados pelos metais. É importante observar que a natureza acumulativa dos metais pesados difere nos organismos por uma série de fatores. Uma variedade de parâmetros abióticos e bióticos podem influenciar na eficiência com que os organismos acumulam os metais pesados em seus tecidos e órgãos (SEIXAS *et al.*, 2007). Uma justificativa para os resultados encontrados nesse estudo pode ser a dose baixa, uma vez que outros trabalhos indicam o bioacúmulo desses metais. Assim, Obone *et al.* (1999) verificaram acúmulo de níquel no testículo em um experimento com 223,5 mg Ni/L, Oliveira *et al.* (2009A) verificaram maior acumulação de cádmio no testículo na concentração 3 mg/kg e Adhikari *et al.* (2001) relataram que ratos expostos ao Pb (5, 10 e 20 mg/kg por duas semanas) apresentaram bioacumulação no testículo nas doses mais elevadas. Massány *et al.* (2020) ressaltam que baixas

doses de cádmio alteram os parâmetros testiculares sem mudanças drásticas, enquanto doses moderadas resultam fortemente em diminuição da espermatogênese. Já doses altas de cádmio causam morfologia aberrante nos túbulos seminíferos e um nível marcadamente baixo de espermatogênese, além de outras anormalidades no estroma testicular (CUPERTINO *et al.*, 2017).

A proporção e volumes de túbulo, epitélio seminífero e lúmen se mantiveram sem alterações significativas com os metais administrados, porém o volume de túnica própria aumentou no grupo exposto ao Ni. Lozi (2019) encontrou resultados semelhantes utilizando os mesmos metais pesados, enquanto, Mouro *et al.* (2019), em estudo apenas com cádmio e utilizando a concentração de 1,2 mg/kg, registraram também aumento de túnica própria. Carvalho (2009) sugere que, como a túnica própria faz parte da barreira hematotesticular, o crescimento da mesma pode representar um mecanismo de proteção contra as ações dos metais pesados. Em seu experimento utilizando 1,0 mg/L de arsenato de sódio por 42 e 84 dias, Carvalho (2009) afirma que os túbulos seminíferos sofreram uma adaptação na túnica própria, espessando-a, afim de manter a estrutura tubular íntegra. O mesmo pode ter ocorrido neste trabalho, uma vez que, se tratou também de uma exposição crônica. Por outro lado, Nascimento (2017) infere que o aumento da túnica própria após exposição ao cádmio, seja resultado da produção exacerbada de fibras colágenas neste local, como resultado do estresse oxidativo, o que pode ser uma alternativa que corrobora com os resultados do presente estudo.

Os parâmetros morfométricos como altura de epitélio, diâmetro de túbulo e lúmen, comprimento total de túbulo seminífero no testículo e por grama de testículo, assim como as áreas de túbulo, lúmen e epitélio e a relação túbulo/epitélio se mantiveram inalterados, não apresentando qualquer comprometimento de sua organização. Lozi (2019), estudando os mesmos metais pesados na concentração de 1,5 mg/kg em uma exposição aguda também obteve resultados semelhantes. Contudo, Costa (2013) e Couto-Santos *et al.* (2020) observaram redução significativa na altura do epitélio e no diâmetro tubular de camundongos tratados com acetato de chumbo nas concentrações de 16, 32 e 64 mg/kg em 30 dias e com arsenito de sódio a 10mg/kg por 30 dias, respectivamente. Olaniyi *et al.* (2020), administrando 5 mg/kg de cádmio por 30 dias em ratos Wistar, também verificaram diminuição do diâmetro tubular enquanto Massanyi *et al.* (2007), em estudo com níquel, observaram aumento no diâmetro luminal, assim como Oliveira *et al.* (2009B), em estudo com cromo. Com base nesses relatos

encontrados na literatura, este trabalho infere que a baixa dose influenciou no surgimento de alterações nesses parâmetros.

Com relação ao compartimento intertubular, a morfometria e estereologia mostraram que os parâmetros como núcleo de Leydig, citoplasma de Leydig, célula de Leydig (CL), tecido conjuntivo e macrófago se mantiveram sem alterações significativas. Porém, a proporção de vasos sanguíneos diminuiu nos animais expostos ao Cd e Ni enquanto a proporção de espaço linfático aumentou nos mesmos grupos. O volume de espaço linfático também aumentou nos animais tratados com Ni. Souza *et al.* (2015), pesquisando a ação do arsênio no testículo, encontraram aumento da proporção e volume do espaço linfático, sugerindo que a diminuição de outros elementos intertubulares, como CL e tecido conjuntivo, pode ter sido responsável pela manutenção do volume padrão do intertúbulo. Similarmente, sugere-se que a redução do percentual de vasos sanguíneos tenha sido compensada pelo aumento no percentual de espaço linfático, o que manteve a estrutura do intertúbulo. De acordo com Da Silva *et al.* (2017), uma vez que o sistema linfático é organizado em sinusoides linfáticos ao redor dos túbulos seminíferos, sendo uma porta de saída para substâncias tóxicas presentes no tecido, pode ter ocorrido uma proliferação do espaço linfático após a exposição ao metal para manter a homeostase testicular após a intoxicação. Outra explicação para esta alteração pode estar associada ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) devido à exposição aos metais, resultando em efeitos que incluem inflamação, e conseqüentemente, aumento linfático a fim de entregar células imunológicas ao tecido danificado para sua regeneração (DA SILVA *et al.*, 2017).

As células de Leydig realizam a produção de testosterona, um hormônio que além de ser responsável pelas características sexuais secundárias masculinas é essencial para a manutenção da espermatogênese (RUSSELL *et al.*, 1990). No presente estudo nenhum dos grupos tratados apresentou qualquer alteração estrutural nas células de Leydig, incluindo sua proporção e volume. Resultados semelhantes foram encontrados por Neves (2016), utilizando 32 e 128 mg/kg de chumbo em ratos por 58 dias e por Couto-Santos *et al.*, (2020) em experimento com arsenito de sódio a 10mg/kg por 30 dias. O tempo de exposição e a dose baixa neste estudo, podem ter sido determinantes para a manutenção da atividade esteroidogênica.

Há evidências que metais pesados alteram morfologicamente o tecido testicular, causando degeneração do epitélio germinativo e descamação celular para o lúmen (El-Sayed e El-Newshy, 2010). Neste trabalho foi visualizada vacuolização inicial do epitélio germinativo

nos grupos expostos ao As^{+5} , As^{+3} , Cd, Pb, Cr (VI) e Ni e processos de descamação do epitélio com a exposição a As^{+3} , Cd, Pb e Ni. Estes resultados indicam um processo de intoxicação pelos metais administrados. Lima *et al.* (2018), Marouani *et al.* (2017) e Costa (2013) relataram resultados semelhantes após a exposição de animais ao As^{+3} , Cr (VI) e Pb, respectivamente. Kong *et al.* (2014), após administrarem 45 mg/kg de Ni, identificaram depleção de células germinativas do túbulo seminífero, arranjo desordenado de células e aparecimento de células germinativas no lúmen. Cupertino *et al.* (2017), após avaliarem a toxicidade testicular do cádmio, observaram danos como inflamação intensa, desorganização do epitélio seminífero, vacuolização do citoplasma e morte de células germinativas em doses baixas do metal (0,67; 0,74; 0,86 e 1,1 mg Cd/kg). Por fim, estudos corroboram que após exposição aguda a metais pesados são observadas células espermatogênicas moderadamente desordenadas no epitélio seminífero (LOZI, 2019). Em contrapartida, em condições de exposição crônica, como neste trabalho, foram relatados perda de células espermatogênicas e aumento dramático de células no lúmen dos túbulos (MASSÁNY *et al.*, 2020).

Neste trabalho houve aumento da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) nos animais expostos ao Pb e ao Cr (VI). A SOD é o primeiro mecanismo de defesa da célula contra os efeitos deletérios causados pelos radicais livres (FRIDOVICH, 1997). Ela catalisa a dismutação dos radicais ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é quebrado pela enzima catalase (CAT) em água e oxigênio (PAITHANKAR *et al.* 2021). Lozi (2019) explica que o aumento na atividade da SOD nos animais intoxicados por metais pesados pode ter ocorrido devido ao aumento da produção do O_2^- , sem alterar a atividade da CAT ou da glutathione-S-transferase (GST). Nascimento (2017) também encontrou aumento da SOD após exposição de ratos a 1,2 mg/kg de cádmio, do mesmo modo que Lozi (2019) encontrou aumento dessa enzima ao administrar 1,5 mg/kg de As^{+5} em camundongos. Outro indicativo de estresse oxidativo é quando enzimas e proteínas estruturais são alteradas pela presença de radicais livres causando, por exemplo, a introdução de grupos carbonil (aldeídos e cetonas) nessas proteínas (LEVINE *et al.*, 1994). Neste trabalho quantificamos a alteração de proteínas por meio do grupo carbonil, e arsenito e níquel foram os principais metais que induziram esse tipo de dano. Couto-Santos et al. (2020) e Doreswamy et al. (2004) corroboram com estes resultados, uma vez que trabalhando com arsênio e níquel, respectivamente, também evidenciaram aumento de proteínas carboniladas no testículo de ratos. Sugerimos dessa forma que houve dano oxidativo

nos testículos dos animais após exposição aos metais As^{+3} e Ni, assim como alteração no status oxidativo daqueles expostos ao Pb e Cr (VI).

5.5 CONCLUSÕES

Embora não tenha havido bioacumulação dos metais analisados, a toxicidade dos metais pesados após exposição crônica (1,5 mg/kg intraperitoneal) por 42 dias produziu alterações histomorfométricas e no status oxidativo testicular. O níquel (Ni) causou aumento do volume de túnica própria nos túbulos seminíferos, além de danos patológicos leves e moderados, havendo ainda aumento da proporção e do volume de espaço linfático e diminuição da proporção de vasos sanguíneos no intertúbulo de animais expostos a esse metal, por fim, aumentou também marcadores de estresse oxidativo no testículo. O cádmio (Cd) alterou componentes intertubulares diminuindo a proporção de vasos sanguíneos e aumentando a de espaços linfáticos, além de induzir danos patológicos leves e moderados. O chumbo (Pb) por sua vez, também induziu essas alterações patológicas, além de aumentar a enzima superóxido dismutase (SOD). O arsênio, em sua forma mais tóxica arsenito (As^{+3}), causou patologias leves e moderadas, além de aumento das proteínas carboniladas pelo estresse oxidativo. O cromo (Cr VI) aumentou o percentual de patologias leves e da SOD, indicando que este metal também interferiu no status oxidativo testicular. O arsenato (As^{+5}) por fim, aumentou o percentual de patologias leves nesta concentração. Uma vez que objetivamos observar a toxicidade ao longo de um ciclo espermatogênico completo, todos os efeitos a longo prazo foram excluídos.

Sendo assim, com base na quantidade de alterações causadas por cada metal, a comparação de toxicidade entre os metais estudados neste trabalho estabelece que $Ni > Cd > Pb = As^{+3} > Cr(VI) > As^{+5}$. Os dados desse trabalho podem contribuir para melhor compreensão da toxicidade dos metais pesados para a saúde reprodutiva e podem guiar futuras terapias para o tratamento de danos por meio de apropriado reparo após exposição aos metais pesados.

6 REFERÊNCIAS

ADHIKARI, N; SINHA, N; NARAYAN, R; SAXENA, D. K. Lead-induced cell death in testes of young rats. **Journal of Applied Toxicology**, vol. 21(4), p. 275–277, 2001.

AL SHOYAIB, A; ARCHIE, S. R; KARAMYAN, V. T. Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies? **Pharmaceutical Research**, vol. 12, n. 1, p. 23-37, 2020.

ANDRADE, D. F.; ROCHA, M. S. A toxicidade do Arsênio e Sua Natureza. **Revista Osvaldo Cruz**, vol.10, 2015.

ATSDR's substance priority list, 2017. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>. Acesso em: 03.04.2020.

BARAKAT, M. A. New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. **Arabian Journal of Chemistry**, vol. 4, n, 4, p. 361-377, 2011.

BRADL. H. B. Heavy Metals in the Environment. Ed. **Elsevier Academic Press**, vol. 6, 283p, 2005.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation methods. **Methods in Enzymology**, vol. 2, p. 302-310, 1978.

CARVALHO, F. A. R. Morfologia e Morfometria testicular de camundongos adultos submetidos à exposição crônica de arsenato. Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal de Viçosa**, 2009.

CHIOU, T. J.; CHU, S.T.; TZENG, W. F.; HUANG, Y. C.; LIAO, C. J. Arsenic Trioxide Impairs Spermatogenesis via Reducing Gene Expression Levels in Testosterone Synthesis Pathway. **Chemical Research in Toxicology**, vol. 21, p. 1562–1569, 2008.

COSTA, K. L. C. Danos Testiculares em ratos submetidos a diferentes doses de chumbo: avaliação histomorfométrica, ultraestrutural e bioquímica. Tese – doutorado, **Universidade Federal de Viçosa**, 2013.

COUTO-SANTOS, F; SOUZA, A. C. F; BASTOS D. S. S; ERVILHA, L. O. G; DIAS, F. C. R; ARAÚJO, L. S; GUIMARÃES, S. E. F; OLIVEIRA, L. L; MACHADO-NEVES, M. Prepubertal exposure to arsenic alters male reproductive parameters in pubertal and adult rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol. 409, p. 11530, 2020.

CUPERTINO, M. C. Mineral and inflammatory disturbances on reproductive system triggered by cadmium exposure. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Departamento de Biologia Geral, **Universidade Federal de Viçosa**. Viçosa, 2016.

CUPERTINO, M. C.; NOVAES, R. D.; SANTOS, E. C.; NEVES, A. C.; SILVA, E.; OLIVEIRA, J. A.; MATTA, S. L. P. Differential susceptibility of germ and Leydig cells to

cadmium-mediated toxicity: Impact on testis structure, adiponectin levels, and steroidogenesis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2017, 11p, 2017.

DA SILVA, R. F.; BORGES, C. D. S.; DE ALMEIDA LAMAS, C.; CAGNON, V. H. A.; KEMPINAS, W, G. Arsenic trioxide exposure impairs testicular morphology in adult male mice and consequent fetus viability. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, vol. 80, p. 1166-1179, 2017.

DAS, K.K.; DAS, S.N.; DHUNDAS, S. A. Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. **Indian Journal of Medical Research**, vol. 128, p. 412-442, 2008.

DIAS, F. C. R.; GOMES, M. L. M.; MELO, F. C. S. A.; MENEZES, T. P.; MARTINS, A. L. P.; CUPERTINO, M. C.; OTONI, W. C.; MATTA, S. L. P. *Pfaffia glomerata* hydroalcoholic extract stimulates penile tissue in adult Swiss mice. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 261, p. 113182, 2020.

DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K.; HASENFUSS, G.; PRESTLE, J. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. **Journal of the American Heart Association**, vol. 101, p. 33-39, 2000.

DORESWAMY, K; SHRILATHA, B; RAJESHKUMAR, T; MURALIDHARA. Nickel-Induced Oxidative Stress in Testis of Mice: Evidence of DNA Damage and Genotoxic Effects. **Journal of Andrology**, vol. 25, n. 6, p. 996-1003, 2004.

DROGE, W. Free radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, vol. 87, p. 47-95, 2002.

EL-SAYED, Y. S.; EL-NEWESHY, M. S. Impact of lead toxicity on male rat reproduction at "hormonal and histopathological levels". **Toxicological and Environmental Chemistry**, vol. 92, p. 765-774, 2010.

FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases, and related matters. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 72, n. 30, p.18515-18527, 1997.

GOTH, L.A. Simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. **Clinica Chimica Acta**, vol. 196, p. 143-152, 1991.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

HADWAN, M. H.; ABED, H. N. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. **Data in Brief**, vol. 6, p. 194–199, 2016.

HAOUAS, Z.; ZIDI, I.; SALLEM, A.; BHOURI, R.; AJINA, T.; ZAOUALI, M.; MEHDI, M. Reproductive Toxicity of Lead Acetate in Adult male Rats: Histopathological and Cytotoxic Studies. **Journal of Cytology & Histology**, vol. 6, n.1, 2014.

HASSAN, E; EL-NEWESHY, M. S; HASSAN, M; NORELDIN, A. E. Thymoquinone attenuates testicular and spermotoxicity following subchronic lead exposure in male rats: Possible mechanisms are involved. **Life Sciences**, vol. 230, p. 132–140, 2019.

HUGHSON, G. W.; GALEA, K. S.; HEIM, K. E. Characterization and Assessment of Dermal and Inhalable Nickel Exposures in Nickel Production and Primary User Industries. **Annals of Occupational Hygiene**, vol. 54, n. 1, p. 8–22, 2010.

IARC – International Agency for Research on Cancer. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Inorganic and organic lead compounds, vol. 87, 2006.

IYENGAR, G. V.; NAIR, P. P. Global outlook on nutrition and the environment: meeting the challenges of the next millennium. **Science of the Total Environment**, vol.249, p. 331-346, 2000.

JOHNSEN, S. G. Testicular Biopsy Score Count--A Method for Registration of Spermatogenesis in Human Testes: Normal Values and Results in 335 Hypogonadal Males. **Hormone Research**, 1970.

JOHNSON, L.; PETTY, C. S.; NEAVES W. B. A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermiogenesis. **Biology of Reproduction**, vol. 25, p. 217-226, 1981.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**. vol. 27, p. 137-138, 1965.

KONG, L.; TANG, M.; ZHANG, T.; WANG, D.; HU, K.; LU, W.; WEI, C.; LIANG, G.; PU, Y. Nickel nanoparticles exposure and reproductive toxicity in healthy adult rats. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 15, p. 21253-21269, 2014.

KOROLYUK, M.A.; IVANOVA, L. I.; MAIOROVA, I. G.; TOKAREV, V.E. A method for measuring catalase activity. **Laboratornoe Delo**, vol. 1, p. 16-19, 1988.

LADEIRA, L. C. M.; SANTOS, E. C dos.; VALENTE, G. E.; SILVA, J. da.; SANTOS, T. A.; MALDONADO, I. R. S. C. Could biological tissue preservation methods change chemical elements proportion measured by energy dispersive X-ray spectroscopy? **Biological Trace Element Research**, vol. 196, p. 168-172, 2019.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, vol. 233, p. 346-557, 1994.

LIMA G. D. A.; SERTORIO, M. N.; SOUZA, A. C. F.; MENEZES, T. P.; MOURO, V. G. S.; ALVES, N. M. G.; OLIVEIRA, J. M.; HENRY, M.; NEVES, M. M. Fertility in male rats: Disentangling adverse effects of arsenic compounds. **Reproductive Toxicology**, vol. 78, p.130-140, 2018.

LOZI, A.A. Toxicidade comparada dos metais pesados, arsênio, cádmio, chumbo, cromo e níquel, sobre parâmetros reprodutivos de camundongos machos adultos após exposição aguda. Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal de Viçosa**, 2019.

MAROUANI, N.; OLFA TEBOURBI, O.; HALLÈGUE, D.; MONCEF MOKNI, M.; YACOUBI, M. T.; SAKLY, O.; BENKHALIFA, M.; RHOUMA, K. B. Mechanisms of chromium hexavalent-induced apoptosis in rat testes. **Toxicology and Industrial Health**, vol. 33(2), p. 97–106, 2017.

MASSÁNYI, P; LUKAC, N; MAKAREVICH, A. V.; CHRENEK, P; FORGACS, Z; ZAKRZEWSKI, M; STAWARZ, R; TOMAN, R; LAZOR, P; FLESAROVA, S. Lead-induced alterations in rat kidneys and testes in vivo. **Journal of Environmental Science and Health**, vol. 42, p. 671 - 676, 2007.

MASSÁNYI, P; MASSÁNYL, M; MADEDDU, R; STAWARZ, R; LUKÁC, N. Effects of Cadmium, Lead, and Mercury on the Structure and Function of Reproductive Organs. **Toxics**, vol. 8, n. 4, p. 94, 2020.

MOMENI, H. R.; ORYAN, S.; ESKANDARI, N. Effect of vitamin E on sperm number and testis histopathology of sodium arsenite-treated rats. **Reproductive Biology**, vol. 12, p.171:181, 2012.

MOREIRA, F. R; MOREIRA, J. C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. **Pan American Journal of Public Health**, vol.15, n. 2, p. 119–29, 2004.

MOURO, V. G. S.; SIMAN, V. A.; DA SILVA, J.; DIAS, F. C. R.; DAMASCENO, E. M.; CUPERTINO, M. C.; DE MELO, F. C. S. A.; DA MATTA, S. L. P. Cadmium-Induced Testicular Toxicity in Mice: Subacute and Subchronic Route-Dependent Effects. **Biological Trace Element Research**, vol. 193, p. 466-482, 2019.

MUNIZ, D. H. F; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. **Universitas: Ciências da Saúde**, vol. 4, n. 1/2, p. 83-100, 2006.

NASCIMENTO, L. S. Efeito do extrato hidroalcoólico da polpa de juçara (*Euterpe edulis* Martius) sobre a morfologia testicular de ratos adultos sadios e expostos ao cádmio. Tese – Doutorado. **Universidade Federal de Viçosa**, 2017.

NEVES, A. C. Efeitos do açaí (*Euterpe edulis*) em testículo de ratos expostos ao acetato de chumbo: análise morfométrica e estrutural. Dissertação - Mestrado. **Universidade Federal de Viçosa**, p. 1-49, 2016.

NORDBERG, G. F., FOWLER, B. A., NORDBERG, M.: Chapter 1—toxicology of metals: overview, definitions, concepts, and trends. **Handbook on the Toxicology of Metals**, 4^a Edição, San Diego, p. 1–12, 2015.

OBONE, E.; CHAKRABARTI, S. K.; BAI, C.; MALICK, M. A.; LAMONTAGNE, L.; SUBRAMANIAN, K. S. Toxicity and bioaccumulation of nickel sulfate in Sprague-Dawley rats following 13 weeks of subchronic exposure. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, vol. 57, p. 379-401, 1999.

OLANIYI, K. S.; AMUSA, O. A.; ONIYIDE, A. A.; AJADI, I. O.; AKINNAGBE, N. T.; BABATUNDE, S.S. Protective role of glutamine against cadmium-induced testicular dysfunction in Wistar rats: Involvement of G6PD activity. **Life Sciences**, vol. 242, p. 117250, 2020.

OLIVEIRA, H.; SPANÒ, M.; SANTOS, C.; PEREIRA, M. L. Adverse effects of cadmium exposure on mouse sperm. **Reproductive Toxicology**, vol. 28, n. 4, p. 550-555, 2009A.

OLIVEIRA, H.; SPANÒ, M.; GUEVARA, M. A.; SANTOS, T. M.; SANTOS, C.; PEREIRA, M de L. Evaluation of in vivo reproductive toxicity of potassium chromate in male mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, vol 62, n. 4, p. 391-404, 2009B.

OLIVEIRA, H.; LOPES, T.; ALMEIDA, T.; PEREIRA, M. L.; SANTOS, C. Cadmium-induced genetic instability in mice testis. **Human & Experimental Toxicology**, vol. 31, p. 1228–1236, 2012.

PAITHANKAR, J. G.; SAINI, S.; DWIVEDI, S.; SHARMA, A.; CHOWDHURI, D. K. Heavy metal associated health hazards: An interplay of oxidative stress and signal transduction. **Chemosphere**, vol. 262, p. 128350, 2021.

PAYNE, A. H.; HARDY, M. P. The Leydig cell in health and disease. **Humana Press**. New Jersey, p. 471, 2007.

PIZENT, A.; TARIBA, B.; ŽIVKOVIĆ, T. Reproductive toxicity of metals in men. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, vol. 63, p. 35-43, 2012.

RICART-JANÉ, D.; LLOBERA, M.; LÓPEZ-TEJERO, D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, vol. 6, n. 2, p. 178-185, 2002.

RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. (Eds). Histological and histopathological evaluation of the testis. Bolesta: **Cache River Press**, p. 1-40, 1990.

SEIXAS, T. G.; KEHRIG, H. A.; MOREIRA, I.; MALM, O. Distribuição de Selênio em Organismos Marinhos da Baía de Guanabara, RJ. **Química Nova**, vol. 30, n. 3, p. 554–559, 2007.

SANTOS, E. M dos. Alteração da expressão de enzima 3 β -HSD e aromatase nos testículos de ratos submetidos a exposição crônica ao herbicida atrazina, seguido de um período de recuperação. Dissertação de mestrado, **Universidade Federal de Minas Gerais**, 2013.

SIGEL, A.; SIGEL, H.; SIGEL, R. K. O. Metal ions in life sciences: Cadmium: From toxicity to essentiality. Ed. **Springer**, vol. 11, p. 589, 2013.

SOUZA, A. C. F.; MARCHESI, S. C.; LIMA, G. D. A.; FERRAZ, R. P.; SANTOS, F. C.; MATTA, S. L. P.; NEVES, M. M. Effects of Sodium Arsenite and Arsenate in Testicular Histomorphometry and Antioxidants Enzymes Activities in Rats. **Biological Trace Element Research**, vol. 171, p. 354-362, 2015.

TAVARES, S.R. Remediação de solos e águas contaminadas por metais pesados. **Conceitos Básicos & Fundamentos**, 1ª Edição, Rio de Janeiro, p. 147, 2013.

TOMAN, R.; MASSÁNYI, P.; ADAMKOVICOVA, M.; LUCKA, N.; CABAJ, M.; MARTINIÁKOVA, M. Quantitative histological analysis of the mouse testis after the long-term administration of nickel in feed. **Journal of Environmental Science and Health**, vol. 47, n. 9, p. 1272-1279, 2012.

WIRTH, J. J.; MIJAL, R. S. Adverse Effects of Low Level Heavy Metal Exposure on Male Reproductive Function. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, vol. 56, n.2, p. 147–167, 2010.

APÊNDICE

Tabela Complementar 1 – Parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig de camundongos Swiss após exposição intraperitoneal crônica ao arsenato (As^{+5}), arsenito (As^{+3}), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr) e níquel (Ni).

Parâmetros	Sal	As^{+5}	As^{+3}	Cd	Pb	Cr	Ni
DNL (μm)	5,99±0,27 ^a	6,08±0,41 ^a	5,83±0,33 ^a	6,03±0,46 ^a	6,30±0,23 ^a	5,84±0,29 ^a	6,15±0,38 ^a
VNL (μm^3)	112,96±15,63 ^a	118,99±22,89 ^a	104,76±17,56 ^a	116,54±26,47 ^a	131,37±14,35 ^a	104,72±15,76 ^a	123,06±22,71 ^a
VCL (μm^3)	443,05±103,70 ^a	451,87±168,23 ^a	356,39±124,20 ^a	438,52±140,78 ^a	529,33±106,04 ^a	369,33±68,61 ^a	481,73±210,58 ^a
VL (μm^3)	546,00±112,08 ^a	570,85±184,97 ^a	461,16±139,39 ^a	554,76±165,35 ^a	660,71±115,29 ^a	474,05±80,24 ^a	604,76±229,43 ^a
VL/t (μL)	10,51±1,71 ^a	10,50±1,57 ^a	10,89±3,46 ^a	10,88±2,05 ^a	10,59±2,39 ^a	9,13±3,86 ^a	14,25±2,74 ^a
VL/gt (μL)	53,82±6,50 ^a	58,65±13,67 ^a	64,72±18,36 ^a	56,26±10,72 ^a	48,85±9,27 ^a	50,98±18,63 ^a	60,82±7,39 ^a
NL/t (10^6)	19,76±4,20 ^a	20,57±9,11 ^a	25,14±10,73 ^a	20,68±5,24 ^a	16,31±4,37 ^a	19,21±8,12 ^a	26,51±12,08 ^a
NL/gt (10^6)	102,28±23,55 ^a	115,16±54,43 ^a	150,08±62,32 ^a	108,64±34,40 ^a	74,48±12,22 ^a	108,27±42,31 ^a	111,84±42,10 ^a
ILS (%)	0,02±0,00 ^a	0,03±0,00 ^a	0,02±0,01 ^a	0,03±0,01 ^a	0,02±0,00 ^a	0,02±0,01 ^a	0,03±0,01 ^a

Sal – Salina (controle), DNL - Diâmetro nuclear de Leydig, VNL - Volume do núcleo de Leydig, VCL - Volume do citoplasma de Leydig, VL - Volume da célula de Leydig, VL/t - Volume de Leydig no testículo, VL/gt - Volume de Leydig por grama de testículo, NL/t - Número de célula de Leydig no testículo, NL/gt - Número de célula de Leydig por grama de testículo, ILS – Índice Leydigossomático. Dados expressos como média \pm DP. Letras diferentes na mesma linha mostram valores significativamente diferentes em relação ao controle ($p \leq 0,05$) pelo Student Newman Keuls (dados paramétricos) ou Kruskal-Wallis (dados não paramétricos). Fonte: Elaborado pela autora.