

MÔNICA DE FÁTIMA OLIVEIRA

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO NÍQUEL NOS TESTÍCULOS
DE RATOS WISTAR ADULTOS**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010**

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

T

O48e
2010

Oliveira, Mônica de Fátima, 1982-

Efeito da exposição crônica ao níquel nos testículos de
ratos Wister adultos / Mônica de Fátima Oliveira. – Viçosa,
MG, 2010.

ix, 67f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Testículos - Efeitos na reprodução de ratos.
 2. Toxicologia - Efeitos na reprodução de ratos. 3. Metais
pesados. 4. Níquel. 5. Histopatologia. 6. Espermatogênese.
- I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 573.655

MÔNICA DE FÁTIMA OLIVEIRA

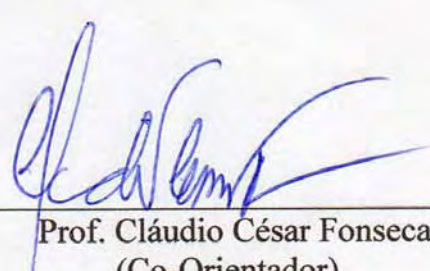
**EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO NÍQUEL NOS TESTÍCULOS
DE RATOS WISTAR ADULTOS**

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

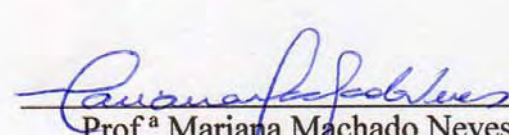
APROVADA: 10 de dezembro de 2010.



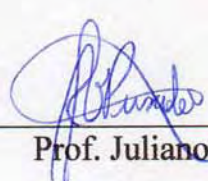
Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta
(Co-Orientador)



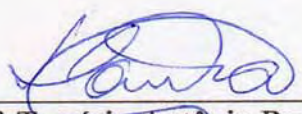
Prof. Cláudio César Fonseca
(Co-Orientador)



Prof.ª Mariana Machado Neves



Prof. Juliano Vogas Peixoto



Prof. Tarcízio Antônio Rego de Paula
(Orientador)

Dedico este trabalho
Aos meus queridos pais, Antônio e Teresinha.
As minhas irmãs (os)
Ao Márcio Jacob

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder sabedoria e por me ajudar enfrentar todos os obstáculos.

Aos meus amados pais, Antônio e Terezinha, pelo amor incondicional, pelos ensinamentos, orações e pelo carinho em todos os momentos da minha vida. Vocês são meus exemplos de vida. Amo vocês!

As minhas queridas irmãs pela amizade, incentivo e por estarem sempre ao meu lado. Aos meus irmãos pelo apoio e colaboração. Aos sobrinhos, cunhados e cunhada, pela torcida.

Ao meu namorado, Márcio Jacob pelo amor e incentivo, me proporcionado há tantos anos e por compartilhar esta conquista comigo. A Eunice e Romany, por me receberem com carinho quando ia para Timóteo.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade e realização do mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) pelo financiamento que proporcionou a realização do projeto.

Ao Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI) pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de estudos.

Ao pessoal do “REUNI”, Danilo, Jefferson, Ivan e Rúdo companheiros de trabalho. Monise e Waléria pela parceria. A Rôh (Rosângela), Rita por quebrar sempre o nosso galho! Ao professor João Marcos de Araújo pelo apoio, ensinamentos e pela confiança. E a todos os professores da Biologia Celular pela convivência neste período.

Ao meu orientador, Tarcízio Antônio Rego de Paula, pela oportunidade, ensinamentos e acreditar no meu trabalho.

Ao co-orientador Sérgio Luis P. da Matta, professor querido e amigo, pela valiosa contribuição em todos esses anos de trabalho.

Ao co-orientador Cláudio César Fonseca, pela colaboração e orientações sobre técnicas histológicas e pelas correções da dissertação.

A Mariana Machado Neves, professora admirada e amiga, e ao Juliano Vogas Peixoto por aceitarem participar da banca examinadora e pela preciosa contribuição que serão de grande valia para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Professor Juraci Alves de Oliveira pela paciência, atenção e ajuda nas análises. As professoras Juliana Silva Rocha, Sirlene Souza Rodrigues Sartori e Ita de Oliveira Silva, pelas parcerias e sugestões no experimento.

Aos professores do Laboratório de Biologia Estrutural por todos esses anos de convivência, amizade e profissionalismo.

Aos Departamentos de Biologia Geral, Nutrição, Medicina Veterinária e Solos por cederem espaço e equipamentos necessários para a realização deste experimento.

A secretária da Pós-graduação do programa de Biologia Celular e Estrutural, Beth pela atenção, preocupação e disposição em ajudar.

A minha 1ª e 2ª dupla dinâmica Dani Soares e Ju Antonucci, grandes amigas de faculdade.

Em fim, a minha 3ª dupla dinâmica Ana Teresa que tive o prazer de conhecer e conviver, sendo longos períodos compartilhados com alegrias, turbulências e conquistas. Obrigada pela ajuda, força e carinho.

A turma da bacalhoadá: Juliana Antonucci, Rômulo, Arlete, LÍlian, Luiz Fernando (Fernandinho) e Jesy pelo apoio e troca de experiências.

A Ana Paula Matta, pela amizade e pela imensa contribuição durante todo o meu trabalho. A Suellen pela grande ajuda nas análises. A Daiane e Kátia pela jornada na Biologia Celular, pelas conversas, incentivo e apoio. A Diane, Sendy e ao Diego (Muriaé) pela disponibilidade em cuidar dos meus ratos. Aos colegas do laboratório, Alex Bhering pelo auxílio no laboratório, Ana Carolina (amiga de todas as horas), Marli (pelo carinho e força), Danielle Moraes, Reggiani, Fabíola, Juliana Silveira, Kyvia, Michele, Maytê, Kenner, Bruna Fontana, Priscila, Bruna Moraes, Daniel que me ajudaram, durante todo este período. A Ana Vidigal, (Ao Moacir e ao Alex do CETAS - UVF), pela ajuda e análises realizadas no dia do sacrifício dos meus animais, muito obrigada!

As minhas amigas de república, Letícia, Flávia, Helena, pelo companheirismo, e as antigas moradoras Juliana, Pri, Carol, Valquíria e Dani, que sempre estiveram na torcida. E as minhas amigas, que mesmo distantes estão torcendo por mim, muito obrigada.

A todos que acreditaram e que de uma forma
me ajudaram e que fizeram parte desta conquista
Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. Toxicologia	1
1.1. Metal Pesado	1
1.2. Níquel	3
1.3. Indicadores Biológicos	6
1.4. Espécies Reativas de Oxigênio	8
2. Testículo	9
2.1. Espermatogênese	10
2.2. Célula de Leydig	11
2.3. Histopatologia Testicular.....	13
3. Objetivos	14
4. Referências	15
 1. EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO NÍQUEL SOBRE A BIOMETRIA CORPORAL E TESTICULAR E PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DO COMPARTIMENTO TUBULAR DO TESTÍCULO DE RATOS WISTAR ADULTOS	23
Resumo	23
Abstract	24
1. Introdução	25
2. Material e Métodos	26
2.1. Animais e tratamento	26
2.2. Coleta de amostras	27
2.3. Processamento do material para análise histológica	27
2.4. Proporção volumétrica e volume do compartimento tubular	27
2.5. Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos	28
2.6. Índice gonadossomático e tubulossomático	28
2.7. Análises histopatológicas	29
2.8. Análise estatística	29
3. Resultados	29
3.1. Alterações histopatológicas	32

3.2. Avaliações médias do peso corporal e consumo de alimento	36
4. Discussão	37
5. Conclusões	43
6. Referências	44
 2. EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO NÍQUEL NO COMPARTIMENTO INTERTUBULAR DO TESTÍCULO DE RATOS WISTAR ADULTOS	 51
Resumo	51
Abstract	52
1. Introdução	53
2. Material e Métodos	54
2.1. Animais e tratamento	54
2.2. Coleta de amostras	54
2.3. Processamento do material para análise histológica	55
2.4. Proporções volumétricas e volume dos elementos do intertúbulo, proporção volumétrica do túbulo seminífero e volume tubular	55
2.5. Diâmetro nuclear, relação núcleo citoplasmática, índice Leydigossomático, volumetria e número de células de Leydig	56
2.6. Análise estatística	56
3. Resultados	56
4. Discussão	60
5. Conclusões	62
6. Referências	62
CONCLUSÕES GERAIS	67

RESUMO

OLIVEIRA, Mônica de Fátima, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2010. **Efeito da exposição crônica ao níquel nos testículos de ratos Wistar adultos.** Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula. Co-Orientadores: Sérgio Luis Pinto da Matta e Cláudio César Fonseca.

A toxicidade de um metal depende da sua capacidade inerente de afetar adversamente qualquer atividade biológica. Entre poluentes ambientais, o níquel, um metal pesado, merece destaque especial como um elemento potencialmente tóxico. A exposição aguda ou crônica ao níquel resulta em vários efeitos na reprodução, tendo como alvo o testículo, que é um órgão bastante suscetível a este agente nocivo. Neste trabalho, avaliou-se o efeito crônico do níquel sobre a biometria corporal e testicular e sobre os compartimentos tubular e intertubular dos testículos de ratos Wistar em idade reprodutiva. Foram utilizados 24 ratos, divididos em três grupos de oito animais. O grupo 1, controle, recebeu água deionizada, os grupos tratados receberam sal de níquel na forma de cloreto de níquel NiCl_2 nas doses de 20mgNi/dia (grupo 2) e 40mgNi/dia (grupo 3), durante 60 dias. A administração crônica de níquel causou redução no peso da próstata, e reduziu a ingestão de alimentos pelos animais, independentemente da concentração utilizada. Os animais que receberam a maior dose apresentaram redução no peso corporal, nos componentes testiculares, epidídimo, altura do epitélio seminífero, diâmetro dos túbulos seminíferos e no volume tubular. Em relação ao compartimento intertubular, o níquel acarretou redução no volume total das células de Leydig, e consequentemente do índice Leydigossomático. Observou-se ainda, neste grupo, a redução da proporção volumétrica dos macrófagos e do aumento da proporção volumétrica do espaço linfático. Nas avaliações histopatológicas do parênquima testicular foram evidenciadas patologias pontuais no epitélio seminífero referente à vacuolização, desprendimento celular e depleção das células germinativas, sendo que em dois animais todos os túbulos seminíferos apresentavam comprometimento. Dentre as alterações verificadas nestes animais, os dados acima, sugerem que doses elevadas de níquel possam afetar a esteroidogênese e comprometer o processo espermatogênico.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Mônica de Fátima, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2010. **Effect of chronic nickel exposure in the testes of Wistar adult rats.** Advisor: Tarcízio Antônio Rego de Paula. Co-advisors: Sérgio Luis Pinto da Matta and Cláudio César Fonseca.

The toxicity of a metal depends on its inherent capacity to adversely affect any biologic activity. Among the environmental pollutants, nickel, a heavy metal, merits special highlights as a potential toxic element. The acute or chronic exposure to nickel, results in effects various on reproduction, being targeting, the testis, which is an organ highly susceptible to this noxious agent. In this study, was evaluated the chronic effect of nickel over corporal and testis biometry and tubular and intertubular compartments in Wistar rats on reproductive age. Were utilized 24 rats divided into three groups with eight animals. Group 1, control, received deionized water, treated groups received the nickel salt in the form of nickel chloride NiCl_2 in the doses of 20mgNi/day (group 2) and 40mgNi/day (group 3) for 60 days. Chronic administration of nickel caused reduction in prostate weight and reduced food intake by the animals, independently concentration used. The animals that received the highest dose showed reduction in the corporal weight in the testicular components, epididym, seminiferous epithelial height, diameter seminiferous tubules and at the tubular volume. Regarding the intertubular compartment, nickel caused reduction in the total volume of Leydig cells, and consequently of the Leydigosomatic index. It was also observed in this group, reduction the volumetric proportion of macrophages and increase volumetric proportion in lymphatic space. In the histopathological evaluation of testicular parenchyma were observed punctual pathologies of the seminiferous epithelial related to vacuolation, cell detachment and depletion of germ cells in two animals all seminiferous tubules showed committed. Among the changes in these animals, the above data suggest that high doses of nickel may affect steroidogenesis and impair the spermatogenic process.

INTRODUÇÃO GERAL

1. Toxicologia

Após a Segunda Guerra Mundial, a toxicologia experimentou notável desenvolvimento, principalmente a partir de 1960, deixando de ser uma ciência envolvida apenas com o aspecto forense. Hoje a ênfase está voltada à avaliação da segurança e risco na utilização de substâncias químicas, como também à aplicação de dados gerados em estudos toxicológicos, como base para o controle regulatório destas substâncias no alimento, no ambiente, nos locais de trabalho, entre outros (Oga et al., 2008).

A toxicologia é uma ciência que estuda os efeitos tóxicos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo, sob condições específicas de exposição. Um efeito adverso ou tóxico é definido como uma alteração anormal, indesejável ou nociva após exposição a substâncias potencialmente tóxicas. A morte é o efeito adverso mais drástico. Os efeitos adversos de menor gravidade incluem alterações patológicas ou enzimáticas, alteração no consumo de alimentos e variação no peso corpóreo (Oga et al., 2008). Portanto, a toxicologia é a área do conhecimento humano devotada a compreender os tóxicos, sua existência, sua ocorrência, seus comportamentos e mecanismos de ação (Fukushima e Azevedo, 2008).

A presença de substâncias tóxicas, contaminando vários locais do meio ambiente, tem sido fonte de preocupação mundial. Do ponto de vista da Saúde Pública, a água contaminada é a principal fonte de exposição à população. Os locais contaminados podem conter um grande número de agentes químicos capazes de promover distúrbios graves, como o câncer, desordens no sistema nervoso central e alterações dos órgãos genitais. Logo, a toxicologia objetiva melhorar a qualidade de vida e a saúde do ambiente, sendo uma ciência de inegável importância social no mundo contemporâneo (Oga et al., 2008).

1.1. Metal Pesado

Atualmente, uma das grandes preocupações ambientais se relaciona aos resíduos sólidos gerados pela sociedade moderna e consumista. Com a intensificação do processo industrial, aliada ao crescimento da população e a consequente demanda por bens de consumo, o homem tem produzido quantidades significativas destes resíduos

(Leite et al., 2004). De todos os resíduos que atingem o sistema aquático, os metais, principalmente os pesados, devem ser vistos com maior preocupação, especialmente por serem elementos não degradáveis (Silva, 2002). A poluição dos sistemas aquáticos por metais pesados é um fator que afeta a qualidade ambiental e constitui risco iminente de toxicidade ao homem (Muniz e Filho, 2006).

Os metais são quimicamente definidos como elementos que conduzem eletricidade, possuem brilho metálico, são maleáveis e dúcteis, formam cátion e apresentam óxidos básicos. A partir dessa definição a maior parte dos elementos químicos pode ser considerada um metal, havendo a necessidade de se subdividir os metais em diferentes classes químicas, de acordo com suas propriedades individuais (McLean e Bledsoe, 1992).

Quimicamente, o termo “pesado” implica elevada densidade e o termo “metal” se refere a um elemento puro ou uma liga de elementos metálicos. De acordo com a literatura, a definição mais antiga classifica como sendo “pesado” todo metal com densidade superior a 7 g/cm^3 . Ao longo dos anos, a classificação de um elemento como sendo metal pesado, com base na massa específica, tem variado entre diversos autores, sendo que elementos com valores de densidade entre $3,5$ e 6 g/cm^3 são classificados como metal pesado (Guilherme et al., 2005).

O fato de não apresentarem caráter de biodegradabilidade faz com que metais permaneçam em ciclos biogeoquímicos globais, sendo os das águas naturais o seu principal meio de condução, podendo haver acumulação na biota aquática em concentrações significativamente elevadas (Silva, 2002). Podem estar presentes nos sistemas aquáticos como o resultado de processos naturais, tais como intemperismo, erosão e erupções vulcânicas e também podem ser introduzidos por meio de diversas atividades praticadas pelo homem, tais como extração e o beneficiamento de metais, rejeitos industriais, efluentes domésticos, insumos agrícolas, descarte de produtos comerciais, queima de combustíveis, dentre outros (Guilherme et al., 2005; Machado et al., 2005).

Embora o termo metal pesado tenha conotação de toxicidade, alguns desses elementos atendem aos critérios de essencialidade às plantas, aos animais e ao homem e são ditos bioenergéticos, ou seja, sua presença é essencial para permitir o funcionamento de algumas rotas metabólicas (Guilherme et al., 2005). Assim, em baixas concentrações, metais como ferro, cobre, magnésio e zinco são considerados essenciais para os organismos vivos, podendo até causar doenças na sua ausência. Porém, o excesso deles resulta em efeito tóxico, podendo levar à morte. Alguns são

também de efeito acumulativo e altamente tóxico, tanto para o meio ambiente quanto para o homem. São considerados tóxicos mesmo em baixas concentrações o mercúrio, chumbo, cádmio, cromo, níquel, estanho, pois não têm função nutricional ou biológica conhecida (Machado et al., 2005).

Todos os metais e seus compostos possuem toxicidade, o fator-chave é o grau de exposição que afeta o organismo. A exposição está relacionada tanto com a quantidade envolvida quanto com o tempo de exposição (Goyer, 1996). Dessa forma, a atividade de uma substância tóxica depende sempre de sua concentração, já que a maioria dos metais pesados, se ingeridos em concentrações elevadas, são venenos acumulativos para o organismo (Guilherme et al., 2005).

Uma vez absorvidos, os metais são geralmente retidos por proteínas e transportados pelo sangue até tecidos onde podem ser estocados ou biotransformados (Heath, 1995). A toxicidade causada por estes metais se deve à ocorrência de dois principais mecanismos de ação: formação de complexos com os grupos funcionais das enzimas, o que prejudica o perfeito funcionamento do organismo, e a combinação com as membranas celulares, que perturba ou impede completamente o transporte de substâncias essenciais (Goldhaber, 2003). Além disso, os efeitos tóxicos podem incluir a letalidade e efeitos subletais, como alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, respostas farmacocinéticas, patológicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais (Rand e Petrocelli, 1985).

1.2. Níquel

O nome níquel (Ni) deriva de “*kupfernickel*”, referência dada a nicolita pelos mineiros alemães, quando a identificaram no século XVII. Antes da era cristã, o metal já era utilizado. Moedas japonesas de 800 anos a.C. e gregas de 300 anos a.C. continham níquel. Acredita-se que seja uma liga natural com o cobre. Nos anos 300 ou 400 a.C. fabricavam-se armas que possuíam ferro meteorítico, com conteúdo de níquel variando de 5 a 15% (Silva, 2001). O níquel foi descoberto em 1751 por Axel Frederick Cronstedt. Em 1804 Richter descreveu as propriedades desse metal (Ali et al., 1987; Rana, 2006). O minério teve pouca importância real na economia industrial até 1820, quando Michael Faraday, com a colaboração de seu associado Stodard, foram bem sucedidos fazendo uma liga sintética de ferro-níquel, sendo o início da liga níquel-aço que tem uma grande contribuição para o desenvolvimento industrial do mundo (Silva, 2001).

A procura global por níquel tem sido aumentada ao longo do tempo, principalmente devido ao aumento da produção de aço inoxidável. Níquel é usado em cerca de 250.000 aplicações industriais nas formas de carbonato de níquel, níquel carbonil, cloreto de níquel, nitrato de níquel, óxido de níquel, sulfato de níquel e sulfeto de níquel. Algumas aplicações incluem o uso em processamento de ferro, niquelagem, baterias de níquel-cádmio, certas soldagens e máquinas copiadoras. Ferro-níquel é utilizado em equipamentos elétricos, o cobre-níquel é utilizado como um anticorrosivo para navios e equipamentos marítimos, enquanto titanato de níquel é usado como pigmento em tintas (Pascalichio, 2002; Yu, 2005).

O níquel é um metal branco prateado, duro e ferromagnético, com densidade de $8,9 \text{ g/cm}^3$ (Ali et al., 1987; WHO, 2005). É um elemento de transição e pertence ao grupo 10 da tabela periódica. Ocorre naturalmente em cinco formas isotópicas: 58 (67,8%), 60 (26,2%), 61 (1,2%), 62 (3,7%) e 64 (1,2%) (WHO, 2005). O níquel forma uma grande quantidade de compostos e complexos, nos quais apresenta os estados de oxidação -1, 0, +1, +2, +3, +4. Embora possa existir em vários estados de oxidação, o mais importante sob condições ambientais é aquele que apresenta o estado de valência 2 (Haber et al., 2000).

Níquel é o 24º elemento mais abundante da crosta terrestre, compreendendo cerca de 3% da composição da terra. É o quinto elemento mais abundante em peso depois do ferro, oxigênio, magnésio e silício (Cempel e Nickel, 2006). Ele é encontrado principalmente combinado com oxigênio, enxofre e com vários minerais que ocorrem naturalmente na crosta terrestre (ATSDR, 2005; Das et al., 2008).

A contaminação ambiental por níquel ocorre naturalmente e antropologicamente. A fonte natural inclui meteoritos, vulcões, a poeira do solo e os incêndios florestais, com tamanho de partículas variando de 2-10 μm . Exemplos de fontes antropogênicas incluem a mineração, fundição e refinamento. Níquel é liberado do derretimento do aço inoxidável, durante a reciclagem de sucata. Outras formas de mineração, incluindo a extração de ouro, podem liberar níquel para o meio ambiente como um subproduto, usualmente lixiviados com outros. Sulfato de níquel é liberado na queima de combustíveis fósseis e incineração de esgoto. Fontes de ar poluído com níquel incluem, além dos referidos anteriormente, o processamento de níquel, queima de derivados de petróleo e produção de plástico. A concentração de níquel no ar está aumentada em áreas industrializadas. Uma elevada concentração de níquel é frequentemente encontrada na água de lagos próximo as áreas industriais. Baterias de níquel-cádmio

também são uma fonte potencial de poluição de níquel na água, que pode resultar a lixiviação de depósitos desses resíduos (Yu, 2005).

Como para a maioria dos metais, a toxicidade do níquel é dependente da via de exposição e da solubilidade dos compostos, sendo seus efeitos adversos para a saúde. Contudo, as principais vias de exposição ao níquel são a água para consumo humano, alimentos, ar, exposição industrial, cigarros (Das et al., 2008). Outro tipo de exposição ao níquel é considerado também como uma das causas mais comuns de sensibilização da pele humana, a dermatite de contato alérgica. A exposição dérmica ao níquel pode ocorrer através de joias, relógios de pulso com encosto de metal, moedas e botões metálicos. O risco de sensibilização levou à adoção de limites de liberação de níquel para as joias e outros objetos metálicos em contacto com a pele (Ali et al., 1987; Rana, 2006).

Quanto à solubilidade, vários sais de níquel são solúveis em água, como acetato, cloreto, nitrato e sulfato, estando distantes dos carbonatos e hidróxidos menos solúveis e dos dissulfetos, subsulfetos e óxidos que são praticamente insolúveis em água (WHO, 2005). A absorção de compostos de níquel depende da solubilidade dos mesmos. Em geral, a absorção de níquel pelo homem é relativamente elevada em comparação com outros metais. Após a ingestão, a absorção de níquel metálico e composto de níquel moderadamente solúveis no aparelho digestório (International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature, 2005) é pequena, porém, a absorção de compostos de níquel solúveis, como cloreto, nitrato, sulfato é de 1 a 2 horas, com uma biodisponibilidade variando entre 1-5% (Barceloux, 1999). Tratando-se de compostos solúveis, a absorção de até 27% pode ocorrer (Azevedo e Chasin, 2003). Sendo que a legislação brasileira estabelece 0,025 mg/L como o limite máximo permitido de níquel presente na água (CONAMA, 2005).

Após a absorção, o rim é a principal via de eliminação. Excreção de níquel também ocorre na saliva e suor, o que pode contribuir significativamente para a eliminação deste metal em ambientes quentes (Ali et al., 1987; Barceloux, 1999). A eliminação também pode se dar pelas fezes e leite (Das et al., 2008). Medições da quantidade de níquel no sangue, fezes, urina podem ser usadas para estimar a sua exposição ao metal (ATSDR, 2005).

O níquel é conhecido por se ligar a determinadas proteínas e ou aminoácidos no soro sanguíneo. Estes ligantes são instrumentos importantes para o transporte e distribuição de níquel no organismo. O metal não é destruído no corpo, mas sua forma química pode ser alterada. A principal rota para toxicidade de níquel é depleção ou

diminuição da enzima antioxidante a glutathione e a ligação de níquel com grupos de proteínas sulfidril, ou seja, grupo químico que contem enxofre e hidrogênio encontrado no aminoácido cisteína e outras moléculas (Das et al., 2008; Oga et al., 2008). O níquel também é inibidor de uma série de enzimas no organismo humano, incluindo urease e monóxido de carbono desidrogenase (Yu, 2005). Sabe-se que a exposição aos compostos de níquel pode ter efeitos adversos na saúde humana (Denkhaus e Salnikow, 2002), como os efeitos degenerativos no tecido hepático (Das et al., 2006), diminuição significativa no volume urinário e aumento do peso relativo do rim (Obone et al., 1999), retratibilidade dos túbulos seminíferos e diminuição do número de espermatogônias (Käkelä et al., 1999). Além disso, a exposição ao níquel eleva a peroxidação lipídica testicular e suprime atividades das enzimas antioxidantes (Gupta et al., 2007), indicando que o níquel, sendo um metal pesado exerce potenciais efeitos tóxicos nos tecidos e sobre os órgãos genitais masculinos (Das e Dasgupta, 2002; International Committee on Veterinary Gross Anatomical 2005).

1.3. Indicadores Biológicos

O monitoramento biológico consiste na detecção dos agentes presentes no ambiente ou de seus metabólitos nos tecidos, secreções, ar expirado dos indivíduos expostos, para avaliar a exposição e o risco à saúde (Oga et al., 2008). A avaliação da exposição aos agentes químicos constitui um importante aspecto para a saúde pública, tendo em vista a possibilidade de se prevenir ou minimizar a incidência de mortes ou doenças decorrentes da interação das substâncias químicas com o organismo humano (Amorim, 2003).

Os parâmetros estudados com este objetivo são definidos como indicadores biológicos, bioindicadores ou biomarcadores. Estes constituem um parâmetro que evidencia a ocorrência de alguma alteração num sistema ou numa amostra biológica e são definidos como uma espécie capaz de indicar os primeiros sinais de estresse ambiental, causado por contaminantes em diferentes níveis de organização biológica, que se expressam pela exposição e/ou por efeito tóxico de poluentes presentes no ambiente (Walker et al., 1996; Adams, 2002; Oga et al., 2008).

Um biomarcador eficiente deve apresentar grande susceptibilidade, boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise. Ainda é desejável a possibilidade de sua criação e manutenção em condições de experimentação, de modo a se obter dados de toxicidade para o estabelecimento de limiares de concentração, quanto

à alteração do parâmetro estudado (Stegeman et al., 1992; Bainy, 1993; Jonsson e Castro, 1995).

O estudo dos biomarcadores é uma ferramenta de avaliação do efeito tóxico de substâncias poluentes, que através do desenvolvimento e aplicação de técnicas de exposição ou efeito em três níveis de complexidade individual, celular e molecular, torna-se possível a elucidação da relação causa-efeito e dose-efeito na avaliação de risco a saúde (Jesus e Carvalho, 2008).

Quando o monitoramento biológico está baseado na determinação da substância química ou do seu metabólito no meio biológico, torna-se essencial o conhecimento de como a substância é absorvida pelas diferentes vias e, posteriormente, como é distribuída para os diferentes compartimentos do organismo, se é acumulado ou não no organismo, como é biotransformada e, finalmente, como é eliminada (Bernard e Lauwerys, 1986; Rüdiger, 1999).

Os biomarcadores podem ter como finalidade, avaliar a exposição (quantidade absorvida ou dose interna), avaliar os efeitos das substâncias químicas e avaliar a suscetibilidade individual (WHO, 1993). Há três tipos de indicadores biológicos os de exposição, de efeito e de suscetibilidade que constituem instrumentos para explorar a evolução de eventos e comportamento do organismo em relação à exposição (Oga et al., 2008).

Os biomarcadores de exposição refletem a distribuição da substância química ou seu metabólito através do organismo, e por isso são identificados como dose interna. Consequentemente, a dose externa se refere à concentração do agente químico presente no ambiente em contato com o organismo. Teoricamente, a distribuição da substância no organismo pode ser traçada por meio de vários níveis biológicos, como tecidos e células, até seu alvo definitivo (WHO, 1993).

O biomarcador de efeito é um parâmetro biológico, medido no organismo, que reflete a interação da substância química com os receptores biológicos (Amorim, 2003). Geralmente, as alterações bioquímicas são consideradas como uma fonte potencial de indicadores biológicos de efeito. Se considerarmos que estas alterações precedem um dano estrutural, a detecção destas alterações biológicas permite a identificação precoce de uma exposição excessiva e intervenção para prevenir um efeito irreversível, ou seja, a doença. Esta estratégia é baseada na identificação das alterações bioquímicas precoces e reversíveis que são indicadores sensíveis e específicos de uma resposta do organismo à exposição (Rüdiger, 1999).

Os biomarcadores de suscetibilidade podem refletir fatores genéticos ou adquiridos que influenciam na resposta do organismo a uma determinada exposição química, aumentando ou diminuindo a suscetibilidade. Estes são fatores pré-existent e independem da exposição. São predominantemente genéticos, embora a patologia, alterações fisiológicas, medicamentos e exposição a outros agentes ambientais também possam alterar a suscetibilidade individual. Os biomarcadores de suscetibilidade identificam na população aqueles indivíduos que têm uma diferença genética ou adquirida na suscetibilidade, para os efeitos da exposição a substâncias químicas (WHO, 1993; Rüdiger, 1999; Amorim, 2003).

A utilização de biomarcadores tem sido bem sucedida como um instrumento de monitorização da poluição ambiental, mas também como uma eficiente sentinela na detecção precoce de riscos ecológicos. Antes do seu uso como rotina, torna-se necessário definir uma estratégia que permita o delineamento e validação de sua aplicação. O uso de biomarcadores tem sido apontado como uma solução para alguns dos problemas no domínio da gestão ambiental (McCarthy e Shuggart, 1990). Além disso, por estarem mais diretamente relacionados aos efeitos na saúde, esses biomarcadores podem oferecer melhor estimativa do risco (Amorim, 2003). No entanto, urina, fezes, soro, mucosa nasal, cabelo tem sido utilizados como biomarcadores para identificar ou quantificar a exposição ao níquel (ATSDR, 2005).

1.4. Espécies Reativas de Oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas continuamente durante os processos metabólicos normais, podendo ser geradas no citoplasma, mitocôndrias, retículo endoplasmático, membrana celular e núcleo de todas as células aeróbicas. Participam de inúmeros processos fisiológicos, incluindo crescimento celular, morte celular programada e senescência celular (Hodgson e Smart, 2001; Oga et al., 2008). Espécies reativas de oxigênio são conhecidas também como mediadores de cascatas de sinalização intracelular (Nordberg e Arnér, 2001).

Apesar de ser essencial para as respostas biológicas, em algumas ocasiões, o aumento na produção dessas espécies pode resultar em respostas deletérias ao organismo (Oga et al., 2008), e devido à sua elevada reatividade, são propensas a causar danos sendo, portanto, potencialmente tóxicas, mutagênicas ou cancerígenas. A produção excessiva de EROs pode levar ao estresse oxidativo, perda da função celular e, finalmente, apoptose ou necrose (Nordberg e Arnér, 2001).

Espécies reativas de oxigênio são incluídas em um número de moléculas quimicamente reativas derivadas do oxigênio (Nordberg e Arnér, 2001). As principais moléculas conhecidas como radicais livres são: radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^-), radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais alquil (R^-) e radicais peroxil (ROO^-) (Pascalichio, 2002).

Níquel e outros metais pesados podem gerar radicais livres diretamente do oxigênio molecular em um processo que produz ânion superóxido. E na presença do metal pesado, o superóxido formado pode então combinar com os prótons na reação de dismutação, gerando peróxido de hidrogênio. Esses radicais livres formados podem causar várias alterações nas bases do DNA e aumento da peroxidação de lipídeos (Das et al., 2008).

Há também alguns estudos que relacionam radicais livres à menor mobilidade dos espermatozóides e a danos em seu DNA, que podem ocasionar malformações genéticas. A geração de EROs pode estar entre as causas da infertilidade masculina e estudos nessa linha ajudarão a desenvolver terapias para identificar e contornar a etiologia da infertilidade (Sharma e Agarwal, 1996).

A maioria das reações químicas que governam os processos celulares é regulada por reações enzimáticas (Sharma e Agarwal, 1996). Contudo, EROs produzidas pelo metabolismo celular são mantidas em baixas concentrações intracelulares pela ação de algumas enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (Oga et al., 2008). A análise da presença de radicais livres pode ser feito através da dosagem destas enzimas (Sharma e Agarwal, 1996).

Estas enzimas são substâncias antioxidantes protetoras dos sistemas biológicos contra os efeitos danosos de processos ou reações que promovem a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (Oga et al., 2008). Os antioxidantes podem desempenhar um papel importante na redução de alguns efeitos ocasionados pelo níquel (Das et al., 2008).

2. Testículo

É um órgão complexo com funções exócrina e endócrina, geralmente localizado no escroto apresentando uma cápsula conjuntiva que o envolve e envia septos para seu interior formando lóbulos. Funcionalmente o testículo pode ser dividido em dois compartimentos principais: o compartimento intertubular e o compartimento tubular (Russell et al., 1990; Banks, 1992). O testículo apresenta estrutura similar para várias

espécies de mamíferos, variando em geral, a proporção volumétrica de seus componentes.

No compartimento intertubular estão localizadas as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células e fibras do tecido conjuntivo, além de uma população variável de células como macrófagos e mastócitos (Russell et al., 1990; Setchell, 1991). De maneira geral, a célula de Leydig é o tipo celular mais abundante neste compartimento, sendo responsável pela função endócrina dos testículos. Essa célula sintetiza e libera o hormônio sexual masculino, a testosterona, que é requerida em altas concentrações nos testículos a fim de sustentar a espermatogênese nos túbulos seminíferos. Além da ação local, a testosterona circulante é essencial para a manutenção das funções das glândulas acessórias dos órgãos genitais masculinos e também pela manutenção das características sexuais secundárias (Colleta e Carvalho, 2005).

O compartimento tubular representa a maior parte do testículo, ocupando de 70 a 90% do parênquima testicular na maioria dos mamíferos estudados (França e Russell, 1998; Godinho, 1999). Os túbulos seminíferos são constituídos por túnica própria, epitélio seminífero e lume tubular. A túnica própria reveste o túbulo externamente, sendo composta por células mióides, fibras colágenas e membrana basal. É responsável pela movimentação de fluido e propulsão de espermatozóides ao longo do lume tubular. No epitélio seminífero são encontradas as células germinativas e as células de Sertoli (Russell et al., 1990).

As células de Sertoli, por meio de junções de oclusão, dividem o epitélio seminífero em dois compartimentos: o basal, onde se localizam as espermatogônias e os espermatócitos primários na fase inicial da prófase meiótica (pré-leptótenos e leptótenos), e o adluminal, onde se encontram os espermatócitos primários a partir da fase de zigóteno, espermatócitos secundários e espermátides. O ambiente adluminal está totalmente sob controle das células de Sertoli, propiciando um microambiente isolado e essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (Russell et al., 1990; Setchell, 1991; Creasy, 2001).

2.1. Espermatogênese

Espermatogênese compreende precisamente um sincronizado desenvolvimento de várias gerações de células germinativas, podendo durar cerca de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos (França et al., 1998; França e Russell, 1998; Godinho, 1999; Creasy, 2001).

O processo espermatogênico pode ser dividido em três fases baseado em considerações morfológicas e funcionais: fase proliferativa ou espermatogonial, na qual as células germinativas sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas; fase meiótica ou espermatocitogênica, na qual o material genético é recombinado e segregado, onde cada espermatócito primário dá origem a quatro espermátides e fase de diferenciação ou espermiogênica, na qual as espermátides se transformam em células especializadas, os espermatozóides, que são estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar o ovócito (Russell et al., 1990).

Nos túbulos seminíferos, as células germinativas não estão organizadas ao acaso e sim em associações celulares distintas, denominadas de estádios, que se sucedem com o tempo, de maneira bastante ordenada, formando o ciclo do epitélio seminífero. A duração do ciclo do epitélio seminífero é uma constante biológica espécie-específica sendo necessários 4,5 ciclos para que o processo espermatogênico se complete em mamíferos, ou seja, desde uma espermatogônia até a liberação dos espermatozóides no lume do túbulo seminífero (Amann e Schanbacher, 1983; França et al., 1998; França e Russell, 1998).

Durante seu desenvolvimento, as células germinativas estão embutidas dentro dos processos citoplasmáticos das células de Sertoli, que estruturalmente suportam e movem as células germinativas da base para o lúmen do túbulo. As células de Sertoli também produzem e transferem moléculas essenciais para as células germinativas, secretam o fluido para o lume, participam do processo de espermiação, realizam fagocitose e regulam o progresso da espermatogênese até a sua conclusão (Russell, et al., 1990; Creasy, 2001; Skinner e Griswold, 2005).

Então, fica evidente, a necessidade da interação das células germinativas com os componentes somáticos do testículo, principalmente entre as células de Sertoli e de Leydig, para que o processo espermatogênico transcorra de maneira normal e eficiente (Skinner, 1991; Pescovitz et al., 1994; Schlatt et al., 1997; França e Russell, 1998; Skinner e Griswold, 2005).

2.2. Célula de Leydig

A disposição das células de Leydig varia de espécie para espécie. No homem, ela dispõe-se em pequenos grupos, enquanto que nos animais, elas são abundantes e ocupam grande parte do interstício (Colleta e Carvalho, 2005). São células relativamente grandes, poliédricas com núcleo localizado excentricamente no

citoplasma e tem grânulos de heterocromatina que formam uma camada intimamente associada ao envoltório nuclear, sendo uma característica destas células (Setchell, 1991).

As células de Leydig possuem caráter eosinofílico, devido principalmente à grande quantidade de retículo endoplasmático liso e gotículas de gordura em seu citoplasma (Ross et al., 2003). Em ratos, essas células estão intimamente associadas com os vasos sanguíneos presentes no espaço intertubular e envolvidas por espaço linfático (Fawcett et al., 1973).

As células de Leydig surgem nos testículos durante o período embrionário. Duas populações distintas de células de Leydig são responsáveis pelo período de esteroidogênese testicular. Células de Leydig do tipo fetal, durante o período fetal-neonatal e células de Leydig do tipo adulto, no adulto. Estas células distinguem-se em sua morfologia, produção hormonal, regulação parácrina e funções fisiológicas (Colleta e Carvalho, 2005).

As células de Leydig são bastante conhecidas por sua marcante produção de andrógenos, os quais são sintetizados a partir da molécula-base, o colesterol (Bardin, 1996). Dentre os andrógenos que as células de Leydig sintetizam, incluem a testosterona e a diidrotestosterona. A testosterona é requerida em altas concentrações nos testículos para assegurar a espermatogênese nos túbulos seminíferos, promover a diferenciação do trato genital masculino, além de promover e manter os caracteres sexuais secundários. Particularmente a diidrotestosterona é responsável pela manutenção funcional das glândulas sexuais acessórias e epidídimo (Luke e Coffey, 1994; Fan e Robaire, 1998; Goyal et al., 1999; Colleta e Carvalho, 2005). Além dos andrógenos, outras substâncias são produzidas pelas células de Leydig que participam do controle autócrino e parácrino das funções das células de Leydig e de Sertoli. As células de Leydig podem influenciar a função das células de Sertoli tanto em animais imaturos quanto em animais adultos especificamente por meio de peptídeos derivados da pro-opiomelanocorticotrofina (POMC), tais como β -endorfina, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e hormônio melanotrófico (MSH) (Bardin et al., 1987). Da mesma forma, as células de Sertoli parecem regular de forma parácrina a determinação da população das células de Leydig e a capacidade esteroidogênica das mesmas, por meio de secreção de fatores de crescimento estimulados pelo FSH (Tabone et al., 1984; Waites et al., 1985).

Além da célula de Sertoli, outro tipo celular comumente encontrado em associação com as células de Leydig é o macrófago. Fatores secretados por estas células

controlam de modo parácrino a atividade esteroidogênica e o desenvolvimento das células de Leydig. Citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 (IL-1) e fator α de necrose tumoral (TNF- α) inibem a atividade esteroidogênica das células de Leydig adultas. E citocinas e fatores de crescimento estimulam a proliferação e diferenciação de células de Leydig imaturas, sugerindo que os macrófagos são essenciais para o desenvolvimento normal das células de Leydig (Hales, 1996).

2.3. Histopatologia Testicular

Avaliação histopatológica dos testículos é uma tarefa difícil e demorada, dada a complexa organização do testículo e da espermatogênese (Russell et al., 1990). A diversidade funcional dos órgãos genitais masculinos (International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature, 2005) e a complexidade de sua regulação hormonal, fornecem um vasto número de sítios potenciais para a perturbação química (Creasy, 2001).

A perturbação toxicológica da função reprodutora masculina pode ocorrer em muitos locais e produzir uma gama de efeitos, alguns primários e alguns secundários, à agressão inicial. Sítios-alvo incluem o testículo, epidídimo, espermatozóides maduros e o sistema regulatório hormonal. Detecção de efeitos nesses locais variados exige a avaliação de múltiplos pontos-chaves por meio do exame microscópico cuidadoso das alterações precoces dos tecidos podendo fornecer informações essenciais sobre a provável célula-alvo e possíveis mecanismos de toxicidade (Creasy, 2001)

Produtos químicos que afetam diferentes tipos de células específicas ou funções celulares geralmente provocam padrões previsíveis das alterações patológicas que podem ser facilmente reconhecidas (Creasy, 2001). Como exemplo, presença de células germinativas degeneradas, desprendidas e/ou infiltradas, ausência de lúmen tubular, ausência de espermátides alongadas, alterações na altura do epitélio germinativo e diâmetro tubular e formação de agregados celulares (Russell et al., 1990).

Como consequência de seu papel crítico no suporte da espermatogênese, uma das células-alvo para a toxicidade mais comum é a célula de Sertoli. Qualquer comprometimento funcional desta célula ocasionará um rápido efeito secundário sobre a sobrevivência das células germinativas dependentes. Se a lesão é suficientemente grave ou prolongada, é provável que a função das células de Sertoli seja permanentemente comprometida e a recuperação da espermatogênese pode não ser possível ou, na melhor das hipóteses, será incompleta (Creasy, 2001; Boekelheide et al., 2005).

A compreensão da patogênese, a probabilidade de reversibilidade e a importância das lesões dos órgãos genitais masculinos (International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature, 2005) são auxiliadas por um sólido conhecimento da fisiologia do testículo e epidídimo e, em particular, a compreensão do momento da produção de espermatozóides e do seu transporte (Creasy, 2001).

Em síntese, a avaliação histopatológica do tubulo seminífero é um componente muito importante em testes de toxicologia e na avaliação de riscos para efeitos reprodutivos. Entretanto, os métodos de utilização dos resultados dos testes de avaliação de risco devem ser melhorados para refletir mais adequadamente as diferenças entre as medidas, para detectar os efeitos e para prever o risco resultante à capacidade reprodutiva. Na avaliação dos possíveis efeitos tóxicos de diferentes substâncias à espermatogênese, a análise histopatológica do testículo é considerada uma das estratégias mais tradicionais para analisar os parâmetros morfológicos (aspectos qualitativos do epitélio seminífero) e morfométricos (aspectos quantitativos do epitélio seminífero) dos túbulos em condições patológicas ou de diferentes tratamentos em comparação com os indivíduos normais (Russell et al., 1990).

3. Objetivos

Em virtude do efeito da exposição crônica ao cloreto de níquel, este trabalho teve como objetivo avaliar qualitativa e quantitativamente, por meio de análises biométricas, histomorfométricas e histopatológicas possíveis alterações somáticas e testiculares relativas ao processo espermatogênico em ratos Wistar adultos. Para tal avaliou-se:

- Biometria corporal e consumo de alimento;
- Peso dos órgãos: testículo, epidídimo, glândulas anexas ao aparelho urogenital (glândula vesicular e próstata) ducto deferente, fígado e rins;
- Proporção volumétrica e volume dos componentes testiculares;
- Índice gonadossomático (IGS) e tubulossomático (ITS);
- Diâmetro tubular, altura do epitélio e comprimento total do túbulo seminífero;
- Volume nuclear, citoplasmático e celular de Leydig;
- Relação núcleo citoplasmática da célula de Leydig (RNP);
- Índice Leydigossomático (ILS);
- Número total de células de Leydig por testículo e por grama de testículo.

4. Referências

ADAMS, M. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. Maryland: America Fisheries Society Bethesda, USA, 2002. 600 p.

ALI, S. A.; GROTTI, A.; RISCALA, C. M. O níquel e suas ações sobre o organismo humano. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 62, p. 85-96, 1987.

AMANN, R. P.; SCHANBACHER, B. D. Physiology of male reproduction. Journal Animal Science, v. 57, p. 380-403, 1983.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. Revista Brasileira de Edimiologia, v. 6, p. 1-13, 2003.

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for nickel. US Public Health Service. Atlanta. USA, 2005. 351 p.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. Metais: Gerenciamento da Toxicidade. São Paulo: Atheneu, 2003. 554 p.

BAINY, A. C. D. How to evaluate the safety chemical substances in aquatic environments. Ciência e Cultura, v. 45, p. 10-11, 1993.

BANKS, W. J. Histologia veterinária aplicada. 2 ed. São Paulo: Malone, 1992. 629 p.

BARCELOUX, D. G. Nickel. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, v. 37, p. 239-258, 1999.

BARDIN, C. W. Androgens: early attempts evaluate to Leydig cell function in man: In: PAYNE, A. H.; HARDY, M. P.; RUSSELL, L. D. The Leydig Cell. Vienna: Cache River Press, 1996. cap. 2, p. 31-42.

BARDIN, C. W.; CHEN, C. C.; MORRIS, P. L.; GERENDAI, I.; BOITANI, C.; LIOTTA, A. S; MARGORIS, A.; KRIEGER, D. T. Proopiomelanocortin-derived peptides in testis, ovary, and tissues of reproduction. Recent Progress in Hormone Research, v. 43, p. 1-28, 1987.

BERNARD, A.; LAUWERYS, R. Assessment of human exposure to chemicals through biological monitoring. In: KOPFLER FC, CRAUN, GF (eds). Environmental Epidemiology. Chelsea: Lewis Publ. Inc., 1986. p. 17-28.

BOEKELHEIDE, K.; JOHNSON, K. J.; RICHBURG, J. H. Sertoli cell toxicants. Sertoli Cell Biology, Elsevier Science (USA), 2005. cap. 20, p. 345-382.

CEMPEL, M.; NIKEL, G. Nickel: A Review of its sources and environmental toxicology. Polish Journal of Environmental Studies, v. 15, p. 375-382, 2006.

COLLETA, H. H. M. D.; CARVALHO, H. F. Células de Leydig. In: CARVALHO, H. F.; COLARES-BUZATO, C. B. (eds). Células: Uma abordagem multidisciplinar. São Paulo: Malone, 2005. cap. 25, p. 325-334.

CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº357 de 17/03/05, 2005. 23 p.

CREASY, D. M. Pathogenesis of Male Reproductive Toxicity. Toxicologic Pathology, v. 29, p. 64-76, 2001.

DAS, K. K.; DAS, S. N.; DHUNDASI, S. A. Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. Indian Journal of Medical Research, v. 128, p. 412-425, 2008.

DAS, K. K.; DASGUPTA, S. Effect of nickel sulfate on testicular steroidogenesis in rats during protein restriction. Environmental Health Perspectives, v. 110, p. 923-926, 2002.

DAS, K. K.; GUPTA, A. D.; DHUNDASI, S. A.; PATIL, A. M.; DAS, S. N.; AMBEKAR, J. G. Effect of L-ascorbic acid on nickel-induced alterations in serum lipid profiles and liver histopathology of rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, v. 17, p. 20-44, 2006.

DENKHAUS, E.; SALNIKOW, K. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 42, p. 35-56, 2002.

FAN, X.; ROBAIRE, B. Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinology*, v. 139, p. 2128-2136, 1998.

FAWCET, D. W.; NEAVES, W. B.; FLORES, M.N. Comparative observations on intertubular Lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology Reproduction*, v. 9, p. 500-532, 1973.

FRANÇA, L. R.; PARREIRA, G. G., GATES, R. J.; RUSSELL, L. D. Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: quantitation of germ-cell population and effect of elimination of residual testosterone after long-term hypophysectomized. *Journal of Andrology*, v. 19, p. 335-342, 1998.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic mammals. In: MARTINEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J., (eds). *Male reproduction – multidisciplinary overview*. Madrid, Churchill Communications, 1998. p. 198-219.

FUKUSHIMA, A. R.; AZEVEDO, F. A. História da Toxicologia. Parte I – breve panorama brasileiro. *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, v. 1, p. 1-32, 2008.

GODINHO, C. L. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros. 1999. 74 f. Dissertação (Mestrado em Morfologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1999.

GOLDHABER, S. B. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity
Regulatory Toxicology and Pharmacology, v. 38, p. 232-242, 2003.

GOYAL, H. O.; WILLIAMS, C. S.; KHALIL, M. K.; VIG, M. M.; MALONEY, M. A.
Postnatal differentiation of ductus deferente, tail of the epididymis, and distal body of
epididymis in goats occurs independently of rete testis fluid. The Anatomical Record, v.
254, p. 508-520, 1999.

GOYER, R. A. Toxic effects of metals. In: KLAASSEN, C. D. (Ed.). Casarett &
Doull's toxicology: The basic science of poisons, New York: McGraw Hill, 1996. p.
691-736.

GUILHERME, L. R. G.; MARQUES, J. J.; PIERANGELI, M. A. P.; ZULIANI, D. Q.;
CAMPOS, M. L.; MARCHI, G. Elementos-traço em solos e sistemas aquáticos.
Tópicos em Ciências do Solo, v. 4, p. 345-390, 2005.

GUPTA, A. D.; DHUNDASI, S. A.; AMBEKAR, J. G.; DAS, K. K. Effect of Lascorbic
acid on antioxidant defense system in testes of albino rats exposed to nickel sulphate.
Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology, v. 18, p. 87-95, 2007.

HABER, L. T.; DIAMOND, G. L.; ZHAO, Q.; ERDREICH, L.; DOURSON, M. L.
Hazard identification and dose-response of ingested nickel soluble salts. Regulatory
Toxicology and Pharmacology, v. 31, p. 231-241, 2000.

HALES, D. B. Leydig cell-macrophage interactions: an overview. In: Payne, A.H.;
Hardy, M.P.; Russell, L.D. (eds.), The Leydig cell. Vienna: Cache River Press, 1996.
cap. 21, p. 452-463.

HEATH, A. G. Water pollution and fish physiology. Florida, Lewis Publishers, 1995.
359 p.

HODGSON, E.; SMART, R. C. Introduction to biochemical toxicology. 3 ed, Wiley-
Interscience, New York, 2001. 721 p.

International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. Nomina Anatomica Veterinária. Editorial Committee Hannover, Columbia, Gent, Sapporo, 2005. 166 p.

JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecologia Brasiliensis*, v. 12, p. 680-693, 2008.

JONSSON, C. M.; CASTRO V. G. Bioindicadores e biomarcadores de agroquímicos no contexto da relação saúde-ambiente. Embrapa Meio Ambiente Jaguariúna, 2005. p. 1-5.

KÄKELÄ, R. A.; KÄKELÄ, A.; HYVARINEN, H. Effects of nickel chloride on reproduction of the rat and possible antagonistic role of selenium. *Comparative Biochemistry and Physiology and Pharmacology and Toxicology and Endocrinology*, v. 123, p. 27-37, 1999.

LEITE, C. M. B.; BERNARDES, R. S.; OLIVEIRA, S.A. Método Walkley-Black na determinação da matéria orgânica em solos contaminados por chorume. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 8, p. 111-115, 2004.

LUKE, M. C.; COFFEY, D. S. The male sex accessory tissue: structure, androgen action and physiology. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D., (eds). *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, 1994. p. 1435-1488.

MACHADO, T. T. V.; GADELHA, C. L. M.; SILVA JR, W. R.; DINIZ, F. E. G; COLARES, D. A; NEVES, A. F. J. F. Avaliação preliminar da presença de chumbo e cromo em mananciais do estado da Paraíba, utilizados em sistemas urbanos de abastecimento de água. 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005. p. 1-8.

McCARATHY, J. F.; SHUGART, L. R. Biological markers of environmental contamination. In McCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. (eds.). *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, 1990. p. 3-16.

McLEAN, J. E.; BLEDSOE, B. E.; Behavior of metals in soils. Ground Water Issue. Washington: USEPA. United States Environmental Protection Agency, 1992. 25 p.

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

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radical Biology and Medicine, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

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

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu, 2008. 677 p.

PASCALICCHIO, A. E. Contaminação por metais pesados. Saúde Pública e Medicina Ortomolecular. Editora: Annablume, 2002. 132 p.

PESCOVITZ, O. H.; SRIVASTAVA, C. H.; BREYER P. R.; MONTS, B. A. Paracrine control of spermatogenesis. Trends in Endocrinology and Metabolism, v. 5, p. 126-131, 1994.

RANA, S. V. S. Environmental pollutions: health and toxicology. Alpha Science. International, 2006. 269 p.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. New York: Hemisphere, 1985. p. 1-28.

ROSS, M. H.; KAYE, G. I.; PAWLINA, W. Histology: A text and atlas. 4ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. cap. 21, p. 682-724.

RÜDIGER, H. W. Biomonitoring in occupational medicine. In: MARQUART, H.; SCHÄFER, S. G.; MCCLELLAN, R.; WELSCH, F. (eds.). Toxicology. San Diego: Academic Press, 1999. p. 1027-1039.

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. Florida: Cache River Press, 1990. p. 1-40, 210-266.

SCHLATT, S.; MEINHARDT, A.; NIESCHLAG, E. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. European Journal of Endocrinology, v. 137, p. 101-117, 1997.

SETCHELL, B. P. Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P.T. (ed.). Reproduction in domestic animals. 4 ed. San Diego: Academic Press, 1991. p. 221-250.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. Urology, v. 48, p. 835-850, 1996.

SILVA, C. S. Níquel. Balanço Mineral Brasileiro, 2001. p. 1-18.

SILVA, M. R. C. Estudos de sedimentos da bacia hidrográfica do Mogi-Guaçu com ênfase na determinação de metais. 2002. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciência Química Analítica) - Universidade São Paulo, São Carlos, SP, 2002.

SKINNER, M. Cell-cell interactions in the testis. Endocrine Reviews, v. 12, p. 45-77, 1991.

SKINNER, M. K.; GRISWOLD, M. D. Sertoli cell biology. Elsevier Academic Press, 2005. 494 p.

STEGEMAN, J. J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R. T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B. A.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: HUGGETT, R. J., KIMERLY, R. A., MEHRLE JR., P. M., BERGMAN, H. L. (eds.). Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress, Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, 1992. p. 235-335.

TABONE, E.; BENAHMED, M.; REVENTOS, J.; SAEZ, J. M. Interactions between immature porcine Leydig and Sertoli in vitro. Cell and Tissue Research, v. 237, p. 357-362, 1984.

WAITES, G. M. H.; SPEIGHT, A. C.; JENKINS, N. The function maturation of the Sertoli cell and Leydig cell in mammalian testis. Journal of Reproduction and Fertility, v. 75, p. 316-326, 1985.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. Principles of ecotoxicology. Taylor & Francis. Londres, 1996. 321 p.

WHO, World Health Organization. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Geneva, 1993. 57 p.

WHO, World Health Organization. Nickel in Drinking Water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, 2005. 22 p.

YU, MING-HO. Environmental Toxicology: biological and health effects of pollutants. Second Edition CRC PRESS, 2005. 339 p.

ARTIGO 1

EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO NÍQUEL SOBRE A BIOMETRIA CORPORAL E TESTICULAR E PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DO COMPARTIMENTO TUBULAR DO TESTÍCULO DE RATOS WISTAR ADULTOS

Resumo

O níquel é um metal pesado amplamente utilizado e altas doses deste metal podem acumular no organismo através da exposição oral e causar efeitos tóxicos nos tecidos, principalmente, no testículo. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito crônico do níquel no compartimento tubular e alterações histopatológicas nos testículos de ratos Wistar adultos. Foram utilizados 24 ratos em idade reprodutiva, divididos em três grupos de oito animais. O grupo 1, controle, recebeu água deionizada, os grupos 2 e 3 receberam cloreto de níquel (NiCl_2) nas doses de 20mgNi/dia e 40mgNi/dia, respectivamente, durante 60 dias. Nos animais sacrificados 60 dias após o término do tratamento observou-se que a administração crônica de níquel no grupo de maior dose causou variação e redução nos pesos corporais ao longo do tratamento, além de diminuir o peso total dos testículos, do parênquima testicular, da albugínea e dos epidídimos. O níquel induziu redução no peso da próstata e a redução da ingestão de alimentos pelos animais, independentemente da concentração utilizada. Também reduziu o volume tubular, diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero e ainda o comprimento tubular por grama de testículo aumentou no grupo de maior dose. De acordo com as avaliações qualitativas e histopatológicas observadas no parênquima testicular foram evidenciadas patologias como vacuolização, desprendimento celular e a depleção das células germinativas. Estes resultados sugerem que doses elevadas de níquel podem afetar o processo espermatogênico.

Palavras-chave: níquel; toxicidade; biometria corporal; testículo; túbulo seminífero.

EFFECT OF CHRONIC NICKEL EXPOSURE OVER TESTICULAR AND CORPORAL BIOMETRICS AND MORPHOMETRIC PARAMETERS OF THE COMPARTIMENT TUBULAR OF THE TESTIS OF WISTAR ADULTS RATS

Abstract

Nickel is a heavy metal widely used, and high doses of this metal can accumulate in organism through oral exposure and cause toxic effects in tissues, mainly in the testis. The aim of this work was to evaluate the chronic effect of nickel in the tubular compartment and histopathological changes, at the testis of Wistar adults rats. Were utilized 24 rats of reproductive age, divided into three groups with eight animals. Group 1, control, received deionized water and groups 2 and 3 received nickel chloride (NiCl_2) at the doses of 20mgNi/day and 40mgNi/day, respectively, for 60 days. In the animals euthanized 60 days after the end of the treatment observed that chronic administration of nickel, in the group of higher dose caused variation and reduction in body weight during treatment, besides reducing the weights testis total, of the testicular parenchyma of the albuginea and of the epididymis. The nickel induced reduction in the prostate weight and the reduction of the food intake by animals, independently concentration used. It also reduced the tubular volume, tubular diameter and seminiferous epithelial height still and tubular length per gram of testis increased in the highest dose. According to the qualitative and histopathological evaluations observed in the testicular parenchyma evidenced pathologies as vacuolation, cell detachment, and depletion of germ cells. These results suggest that high doses of nickel may affect spermatogenic process.

Keywords: nickel; toxicity; body biometrics; testis; seminiferous tubule.

1. Introdução

O níquel é um elemento metálico que está naturalmente presente na crosta terrestre. Devido as suas propriedades físicas e químicas, o níquel e seus compostos são amplamente utilizados na indústria moderna. O alto consumo de produtos contendo níquel conduz, inevitavelmente, à poluição do ambiente (Denkhaus e Salnikow, 2002). Os seres humanos estão expostos a esse metal através dos alimentos, água e ar e sua produção pode ocorrer a partir da extração, mineração e refino, galvanoplastia, lixamento e polimento, metalurgia do pó de níquel, ligas de níquel, de níquel-cádmio, indústria química, processamento de alimentos e eliminação de resíduos tóxicos de baterias e pilhas (Das e Dasgupta, 2002; WHO, 2005). O níquel não tem sido reconhecido como um elemento essencial em humanos, e não está claro como os compostos de níquel são metabolizados. Entretanto, sabe-se que a exposição aos compostos de níquel podem ter efeitos adversos à saúde humana (Denkhaus e Salnikow, 2002). Ele exerce um potente efeito tóxico sobre os tecidos e órgãos genitais masculinos (Das e Dasgupta, 2002; International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature, 2005).

O testículo dos mamíferos é um órgão suscetível a agentes tóxicos ambientais ou terapêuticos que comprometem a espermatogênese (Boekelheide, 2005). Considerando o uso de modelos animais para avaliar as possíveis alterações nos processos envolvidos na espermatogênese, a análise dos parâmetros morfológicos e morfométricos do compartimento tubular do testículo revela-se uma estratégia simples e efetiva (Amann, 1982). A organização estrutural do testículo é altamente conservada entre os vertebrados, sendo dividido em dois compartimentos, o tubular e o intertubular. O compartimento tubular é constituído de túnica própria, epitélio seminífero e lume. No epitélio seminífero são encontrados dois tipos celulares, as células germinativas e as células de Sertoli. O compartimento intertubular é composto por células de Leydig, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, macrófagos e espaço linfático (Russell et al., 1990; Holstein et al., 2003; França e Chiarini-Garcia, 2005). O túbulo seminífero é o componente de maior proporção do testículo, na maioria dos mamíferos, variando de 70 a 90%, sendo o elemento mais abundante do parênquima testicular (França e Russell, 1998). Adicionalmente, todos os parâmetros quantitativos relacionados com o túbulo seminífero, como diâmetro tubular, espessura do epitélio seminífero e comprimento total e por grama de testículo apresentam relação positiva com a atividade espermatogênica (Paula, 1999).

Várias consequências do níquel sobre diferentes aspectos da reprodução em roedores têm sido descritos, como efeitos na estrutura e função do testículo, vesícula seminal (glândula seminal) (International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature, 2005) e próstata, bem como degeneração do epitélio seminífero, sarcoma testicular, alteração da esteroidogênese e distúrbios funcionais inibindo a espermatogênese ou levando a esterilidade (Mathur et al., 1977a.; Mathur et al., 1977b.; Pandey et al., 1999; Das e Dasgupta, 2002; Denkhaus e Salnikow, 2002; Massanyi et al., 2007). Apesar da bioacumulação do níquel no testículo terem sido demonstradas (Käkelä et al., 1999; Obone et al., 1999), muitos estudos precisam ser feitos para melhorar o entendimento dos mecanismos de toxicidade deste metal.

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar alterações somáticas e alterações no compartimento tubular por meio dos parâmetros biométricos, histomorfométricos e histopatológicos em ratos Wistar adultos submetidos a exposição crônica ao cloreto de níquel.

2. Material e Métodos

2.1. Animais e tratamento

Foram utilizados 24 ratos Wistar adultos em idade reprodutiva (70 dias), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram divididos em três grupos de oito indivíduos cada, pesados e alojados em gaiolas individuais. O grupo 1 (controle) recebeu apenas água deionizada. Cada animal dos grupos de tratamento consumiu níquel na água de beber nas dosagens de 20mgNi/dia (grupo 2) e 40mgNi/dia (grupo 3), durante um período de 60 dias. Para tal foram utilizadas soluções de cloreto de níquel (NiCl_2) nas concentrações de 2,0249 e 4,0498 g/L diluídos na água de beber correspondendo, respectivamente a 0,67 e 1,34 mg/ml de níquel puro (íon). Foi anotado o consumo diário médio de 30 ml por animal correspondendo a um consumo de 20 e 40 mg de níquel/dia, respectivamente nos grupos 2 e 3. Para os animais dos três grupos acima foram fornecidos 30g de alimentação sólida (ração), sendo os animais mantidos em temperatura ambiente de 24°C e luminosidade de 12 horas. Os mesmos foram pesados a cada duas semanas e mensurada diariamente a ingestão de alimento durante toda a fase experimental.

2.2. Coleta de amostras

Os animais foram manuseados e submetidos à eutanásia de acordo com Princípios Éticos de Pesquisa Animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo os critérios metodológicos aprovados pela Comissão de Ética Para o Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV).

Os animais foram contidos fisicamente e eutanasiados com sobredosagem de tiopental sódico intraperitonealmente. Estes animais foram pesados e, posteriormente, foram retirados e pesados os seguintes órgãos: testículos, epidídimos, glândulas vesiculares, próstata, ductos deferentes, fígado e rins. Fragmentos desses órgãos foram seccionados e fixados em solução de Karnovsky por 24 horas sob-refrigeração.

2.3. Processamento do material para análise histológica

Os fragmentos de testículo, destinados ao estudo da microscopia de luz, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 95% e 100%) com trocas a cada 30 minutos. Após a desidratação, os fragmentos foram incluídos em resina a base de 2-hidroxietil metacrilato (Historesin[®], Leica), sendo posteriormente seccionados na espessura de 3µm em micrótomo rotativo automático (Reichert-Jung, Alemanha) com navalha de vidro. Os cortes semi-seriados foram obtidos por meio de intervalo de 13 cortes, correspondendo à distância de 40µm entre eles. Os cortes obtidos foram corados com azul de toluidina-borato de sódio 1% e as lâminas e lamínulas montadas com Entellan[®] (Merck). Imagens do parênquima testicular foram obtidas em fotomicroscópio (Olympus CX-31) e analisadas utilizando-se o programa *Image Pro Plus* (Media Cybernetics).

2.4. Proporção volumétrica e volume do compartimento tubular

As proporções volumétricas do compartimento tubular foram estimadas por meio da contagem de um total de 3150 pontos projetados sobre 10 fotomicrografias do parênquima testicular de cada animal. Para tal, utilizou-se uma grade de 315 intersecções (pontos), e as imagens foram capturadas em aumento de 200 vezes. As mensurações foram realizadas utilizando-se o programa de análises de imagens *Image Pro Plus* (Media Cybernetics).

O volume do compartimento tubular, expresso em mL, foi obtido a partir do percentual ocupado pelo mesmo no testículo e do peso líquido testicular (peso do parênquima) que foi obtido subtraindo-se do peso bruto do testículo, o peso da albugínea testicular, o qual foi obtido por dissecação. Como a densidade volumétrica do testículo é em torno de 1 (Johnson e Neaves, 1981; França, 1991; Paula, 1999; Tae et al., 2005), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

2.5. Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 15 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentaram contorno o mais circular possível, medidas estas que não levaram em consideração o estágio do ciclo do epitélio seminífero. As mensurações foram realizadas utilizando-se programa de análise de imagem *Image Pro Plus* (Media Cybernetics). Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi mensurada a altura do epitélio seminífero, obtida da membrana basal até o lume tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio em cada túbulo representou a média de duas medidas tomadas de forma diametralmente opostas.

O comprimento total (CT) dos túbulos seminíferos por testículo, expresso em metros, foi estimado a partir do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal, empregando-se a seguinte fórmula (Attal e Courot, 1963; Dorst e Sajonski 1974): $CT = VTS/\pi R^2$, onde VTS = volume total de túbulos seminíferos; πR^2 = área da secção transversal dos túbulos seminíferos; R = diâmetro tubular/2.

Para o cálculo do comprimento tubular por grama de testículo, dividiu-se o valor encontrado para o CT pelo peso do parênquima testicular.

2.6. Índice gonadosomático e tubulosomático

Com bases nos pesos corporais e testiculares, e conhecendo o volume dos túbulos seminíferos, foram calculados os índices gonadosomático (IGS) e tubulosomático (ITS), os quais se referem ao percentual de massa corporal alocados, respectivamente, em gônadas e túbulos seminíferos utilizando-se as seguintes fórmulas:

IGS = $PG/PC \times 100$, onde PG = peso total das gônadas e PC = peso corporal; ITS = $VT/PC \times 100$, onde VT = volume do túbulo seminífero e PC = peso corporal.

2.7. Análises histopatológicas

As análises histopatológicas foram realizadas observando-se as alterações ocorridas em todo o tecido testicular, baseadas nos dados histológicos e morfométricos. Foram analisadas duas lâminas por animal com doze cortes semi-seriados por lâmina, correspondendo à distância de 40µm entre os cortes.

2.8. Análise estatística

A média e o desvio-padrão dos parâmetros analisados foram comparados entre os grupos por meio da análise de variância (ANOVA) utilizando o teste de Newman-Keuls, sendo o nível de significância de ($p < 0,05$). Todos os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio-padrão.

3. Resultados

Os resultados dos parâmetros biométricos analisados encontram-se nas Tabelas 1 e 2. Não foram observadas variações significativas no índice gonadosomático (IGS), nos pesos da glândula vesicular, do fígado e dos rins. Entretanto, houve redução ($p < 0,05$) nos pesos corporal, testicular total, do parênquima testicular, epidídimo e ducto deferente do grupo 3 (40mgNi/dia) em relação ao grupo 1 (controle) e ao grupo 2 (20mgNi/dia). Também houve diminuição do peso da albugínea testicular nos animais do grupo 3 em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). O peso da próstata foi menor nos grupos tratados em relação ao controle ($p < 0,05$).

Tabela 1 – Pesos corporal, testicular, da albugínea, do parênquima e índice gonadossomático (IGS) de ratos Wistar em idade reprodutiva após tratamento com cloreto de níquel (média $\pm$ desvio-padrão).

Biometrias	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Peso corporal (g)	370,00 $\pm$ 15,28 ^a	342,25 $\pm$ 54,40 ^a	293,50 $\pm$ 31,69 ^b
Peso testicular (g)	3,35 $\pm$ 0,40 ^a	3,19 $\pm$ 0,28 ^a	2,40 $\pm$ 0,54 ^b
Peso da albugínea (g)	0,19 $\pm$ 0,04 ^a	0,15 $\pm$ 0,04 ^{ab}	0,15 $\pm$ 0,03 ^b
Peso do parênquima (g)	3,16 $\pm$ 0,38 ^a	3,03 $\pm$ 0,28 ^a	2,25 $\pm$ 0,53 ^b
IGS (%)	0,91 $\pm$ 0,09 ^a	0,95 $\pm$ 0,17 ^a	0,82 $\pm$ 0,18 ^a

Letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Newman-Keuls
Grupo 1: controle; Grupo 2: 20mgNi/dia; Grupo 3: 40mgNi/dia

Tabela 2 – Pesos do epidídimo, do ducto deferente, da glândula vesicular, da próstata, do fígado e dos rins de ratos Wistar em idade reprodutiva após tratamento com cloreto de níquel (média $\pm$ desvio-padrão).

Peso (g)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Epidídimo	0,62 $\pm$ 0,13 ^a	0,56 $\pm$ 0,07 ^a	0,46 $\pm$ 0,08 ^b
Ducto deferente	0,19 $\pm$ 0,03 ^a	0,21 $\pm$ 0,03 ^a	0,15 $\pm$ 0,04 ^b
Glândula vesicular	0,92 $\pm$ 0,15 ^a	0,88 $\pm$ 0,33 ^a	0,70 $\pm$ 0,23 ^a
Próstata	0,80 $\pm$ 0,15 ^a	0,59 $\pm$ 0,20 ^b	0,46 $\pm$ 0,13 ^b
Fígado	9,43 $\pm$ 0,41 ^a	8,58 $\pm$ 1,33 ^a	8,29 $\pm$ 0,96 ^a
Rins	2,85 $\pm$ 0,36 ^a	2,46 $\pm$ 0,21 ^a	2,63 $\pm$ 0,43 ^a

Letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Newman-Keuls
Grupo 1: controle; Grupo 2: 20mgNi/dia; Grupo 3: 40mgNi/dia

A proporção volumétrica de túbulo seminífero e intertúbulo, volume do compartimento intertubular e índice tubulossomático (ITS) não apresentaram diferença significativa entre os grupos tratados e controle ($p>0,05$). Por outro lado, verificou-se redução no volume do compartimento tubular no grupo 3 em relação ao grupo controle e ao grupo 2 ($p<0,05$). Os resultados podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3 – Proporção volumétrica de túbulo seminífero e intertúbulo, volume dos compartimentos do parênquima testicular, tubular e intertubular, e índice tubulossomático (ITS) de ratos Wistar em idade reprodutiva após tratamento com cloreto de níquel (média $\pm$ desvio-padrão).

Parâmetros	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Túbulo seminífero (%)	83,28 $\pm$ 3,11 ^a	76,38 $\pm$ 11,67 ^a	76,77 $\pm$ 6,50 ^a
Intertúbulo (%)	16,72 $\pm$ 3,11 ^a	23,62 $\pm$ 11,67 ^a	23,23 $\pm$ 6,50 ^a
Volume tubular (mL)	2,33 $\pm$ 0,14 ^a	2,32 $\pm$ 0,41 ^a	1,75 $\pm$ 0,50 ^b
Volume intertubular (mL)	0,60 $\pm$ 0,12 ^a	0,72 $\pm$ 0,35 ^a	0,49 $\pm$ 0,08 ^a
ITS (%)	0,59 $\pm$ 0,07 ^a	0,70 $\pm$ 0,21 ^a	0,60 $\pm$ 0,17 ^a

Letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si ($p>0,05$) pelo teste de Newman-Keuls
Grupo 1: controle; Grupo 2: 20mgNi/dia; Grupo 3: 40mgNi/dia

Na Tabela 4 encontram-se os valores referentes ao diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero, comprimento total do túbulo seminífero e comprimento do túbulo seminífero por grama de testículo. Com relação ao comprimento total do túbulo seminífero, não foram observadas diferenças entre os valores médios dos grupos tratados e controle ($p>0,05$). Considerando o comprimento do túbulo seminífero por grama de testículo, o valor médio encontrado no grupo tratado com 40mgNi/dia foi maior ($p<0,05$) que aqueles registrados para os animais controle e tratados com 40mgNi/dia, o diâmetro tubular, o valor médio encontrado no grupo 3 foi menor ($p<0,05$) em relação ao grupo 1 e 2. Analisando a altura do epitélio seminífero observou-se variação significativa no grupo 3, estando este parâmetro reduzido em comparação ao grupo controle.

Tabela 4 – Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero, comprimento total do túbulo seminífero e comprimento do túbulo seminífero por grama de testículo de ratos Wistar em idade reprodutiva após tratamento com cloreto de níquel (média $\pm$ desvio-padrão).

Parâmetros	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Diâmetro tubular (μm)	327,24 $\pm$ 8,74 ^a	312,87 $\pm$ 11,45 ^a	290,03 $\pm$ 30,10 ^b
Altura do epitélio (μm)	86,02 $\pm$ 4,71 ^a	86,27 $\pm$ 3,24 ^{ab}	76,21 $\pm$ 13,91 ^b
Comprimento total do túbulo (m)	27,82 $\pm$ 2,69 ^a	30,24 $\pm$ 5,91 ^a	26,12 $\pm$ 6,10 ^a
Comprimento túbulo/ grama de testículo (m)	8,98 $\pm$ 0,63 ^a	9,49 $\pm$ 1,59 ^a	11,04 $\pm$ 1,73 ^b

Letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Newman-Keuls
Grupo 1: controle; Grupo 2: 20mgNi/dia; Grupo 3: 40mgNi/dia

3.1. Alterações histopatológicas

Não foram observadas alterações histopatológicas nas amostras analisadas dos animais submetidos à dose de 20mgNi/dia (Figura 1c e 1d) em relação ao controle (Figura 1a e 1b). Assim, observaram-se túbulos seminíferos íntegros sem alterações perceptíveis no processo espermatogênico e nas interações entre células germinativas e células de Sertoli. No entanto, animais do grupo 3 (40mgNi/dia) apresentaram danos no parênquima testicular após 60 dias de tratamento (Figura 2), principalmente patologias tubulares. Assim, na Figura 2a, observa-se o aparecimento de pequenos vacúolos no túbulo seminífero. Na Figura 2b observa-se a presença de múltiplos e grandes vacúolos ao longo do epitélio germinativo com desprendimento de células germinativas. Na Figura 2c observa-se descamação celular causada pelo desprendimento apical das células germinativas em todo o túbulo. Outras alterações como a presença de vacúolo acompanhado de degeneração celular, aumento do espaço entre as células germinativas e o surgimento de massas celulares desorganizadas com ausência de lúmen tubular, podem ser verificados na Figura 2d.

Ainda no grupo 3 (40mgNi/dia), observou-se o aparecimento de epitélio seminífero composto por células de Sertoli com depleção das células germinativas (Figura 3a). Na Figura 3b e 3c verificam-se múltiplos vasos sanguíneos e degeneração tubular. Já em 3d, presença de grandes vasos sanguíneos e túbulos sem o formato arredondado, constituídos praticamente por células de Sertoli. Em dois animais do grupo 3 observou-se comprometimento geral dos túbulos seminíferos, com degeneração epitelial. Na Figura 4 observa-se uma representação do parênquima testicular após 60 dias de tratamento nestes animais.

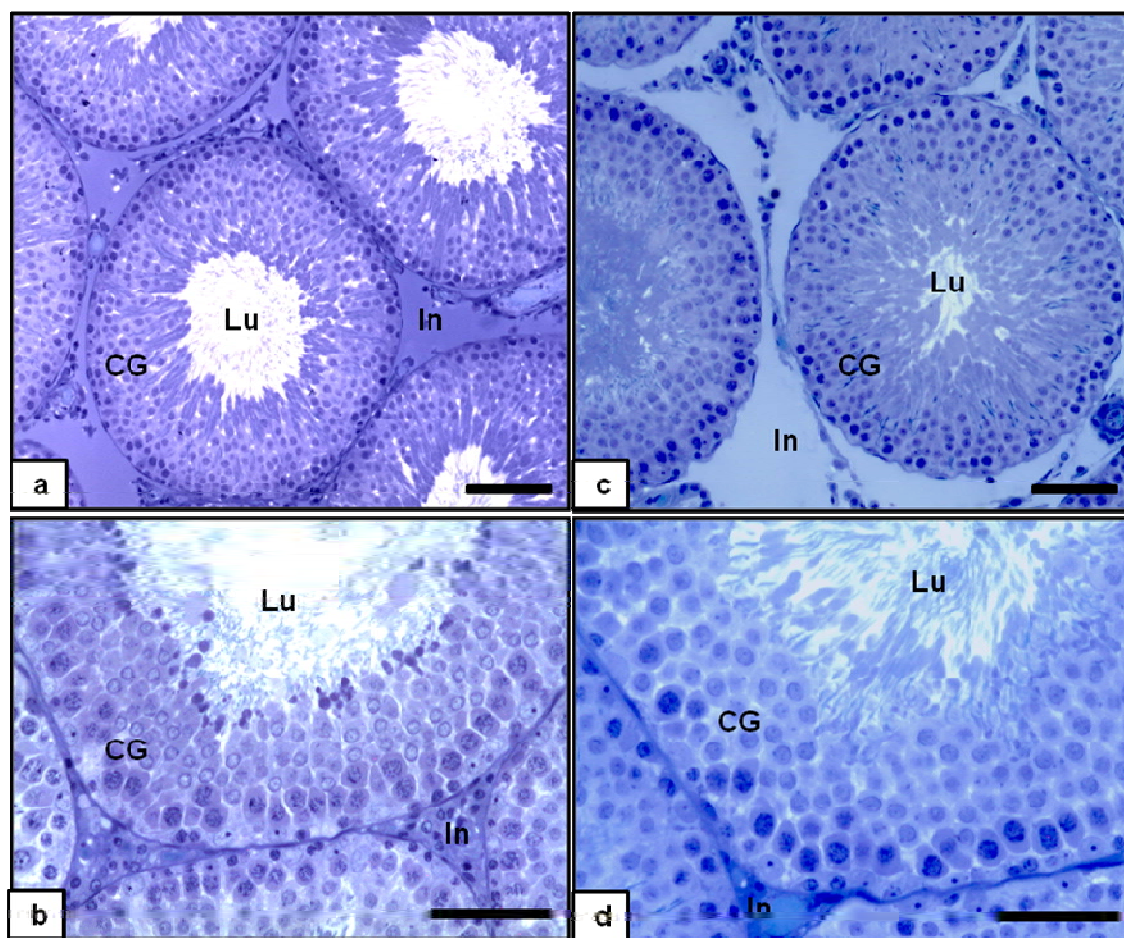


Figura 1: Fotomicrografias do parênquima testicular de ratos Wistar adultos. Os túbulos seminíferos estão preservados com o processo espermatogênico normal nos animais do grupo controle (a e b) e nos animais do grupo2 que receberam 20mgNi/dia (c e d). Intertúbulo (In); células germinativas (CG); lume (Lu). Barras: a e c = 80µm; b e d = 300µm. Coloração: Azul de Toluidina.

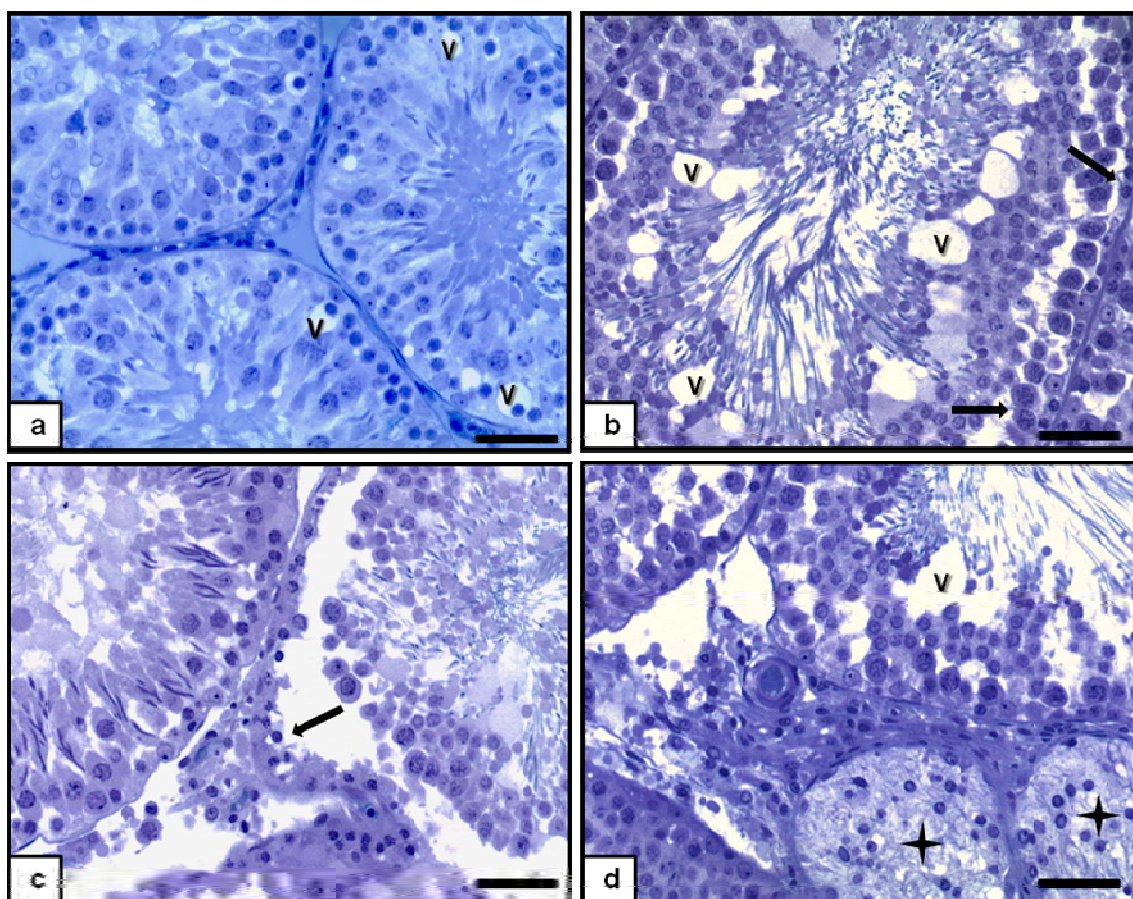


Figura 2: Fotomicrografias testiculares de ratos Wistar adultos tratados com 40mgNi/dia. Aparecimento de pequenos vacúolos (V) no túbulo seminífero **(a)**. Presença de múltiplos e grandes vacúolos (V) ao longo do epitélio germinativo e evidências de desprendimento celular (setas) **(b)**. Descamação celular precedida por desprendimento apical das células germinativas (seta) **(c)**. Presença de vacúolo (V) acompanhado de degeneração celular, aumentando o espaço entre as células germinativas, surgimento de massas celulares (*) desorganizadas com ausência de lúmen tubular **(d)**. Barras: 80µm. Coloração: Azul de Toluidina.

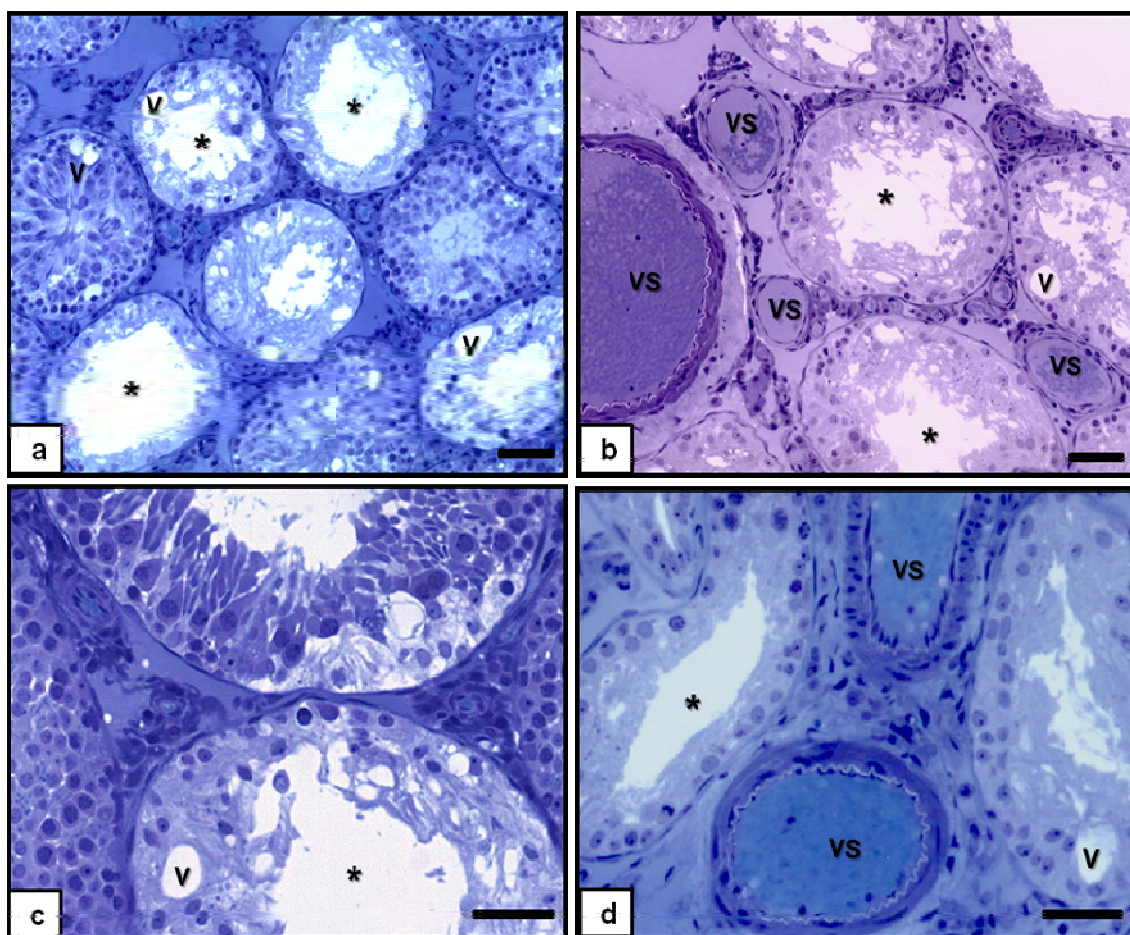


Figura 3: Fotomicrografias do parênquima testicular de ratos Wistar adultos tratados com 40mgNi/dia. Presença de vacúolos (V) ao longo do epitélio seminífero, epitélio revestido pelas células de Sertoli devido à depleção das células germinativas (*) **(a)**. Presença de múltiplos vasos sanguíneos (VS) e depleção das células germinativas (*) **(b)**. Degeneração tubular **(c)**. Presença de grandes vasos sanguíneos (VS) deformação do túbulo seminífero (aspectos irregulares) constituído por células de Sertoli (*) **(d)**. Barras: **a e b** = 50µm; **c e d** = 80µm. Coloração: Azul de Toluidina.

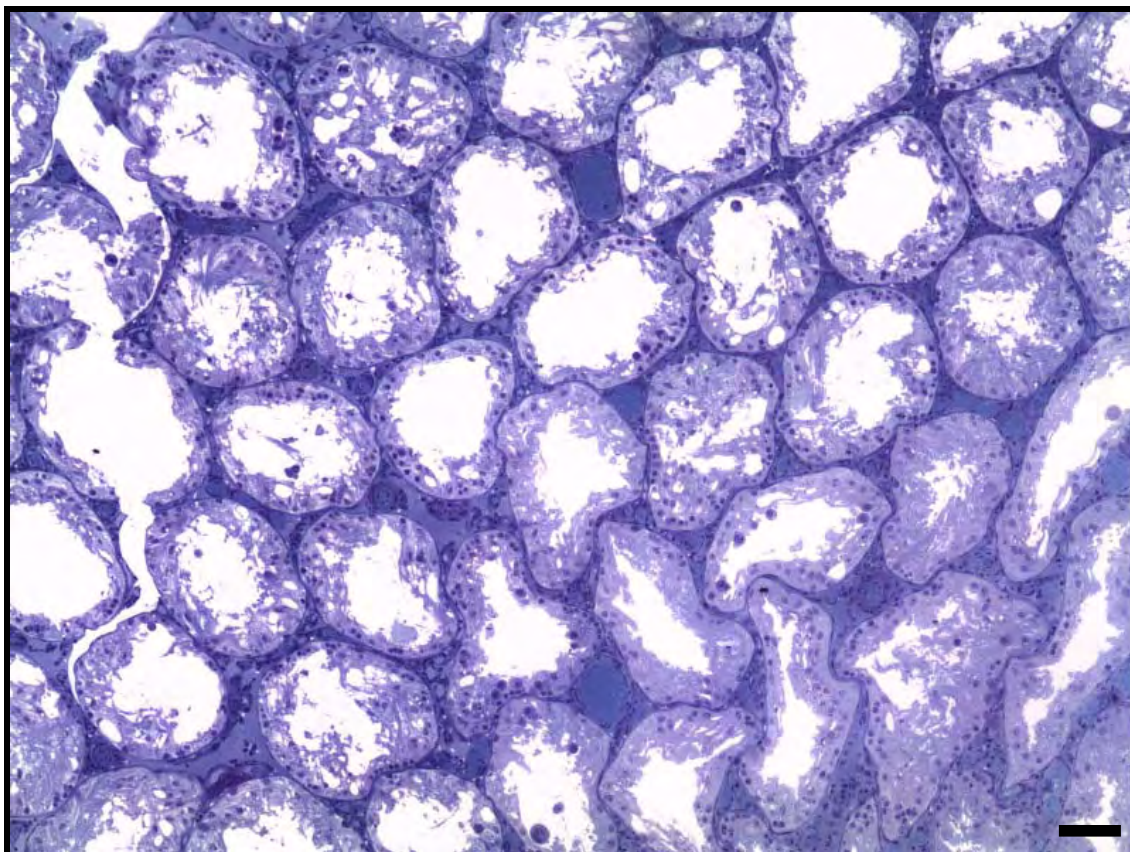


Figura 4: Fotomicrografia do aspecto geral do parênquima testicular observado em dois indivíduos tratados com 40mgNi após 60 dias. Barras: 50µm. Coloração: Azul de Toluidina.

3.2. Avaliações médias do peso corporal e consumo de alimento

Na Figura 5 observam-se reduções significativas nos pesos corporais médios após a 2^a, 3^a e 4^a avaliações dos animais tratados com 40mgNi/dia em relação aos grupos controle e tratado com 20mgNi/dia ($p < 0,05$). Foi observada redução ($p < 0,05$) na ingestão média diária de alimento nos dois grupos tratados em relação ao grupo controle (Figura 6).

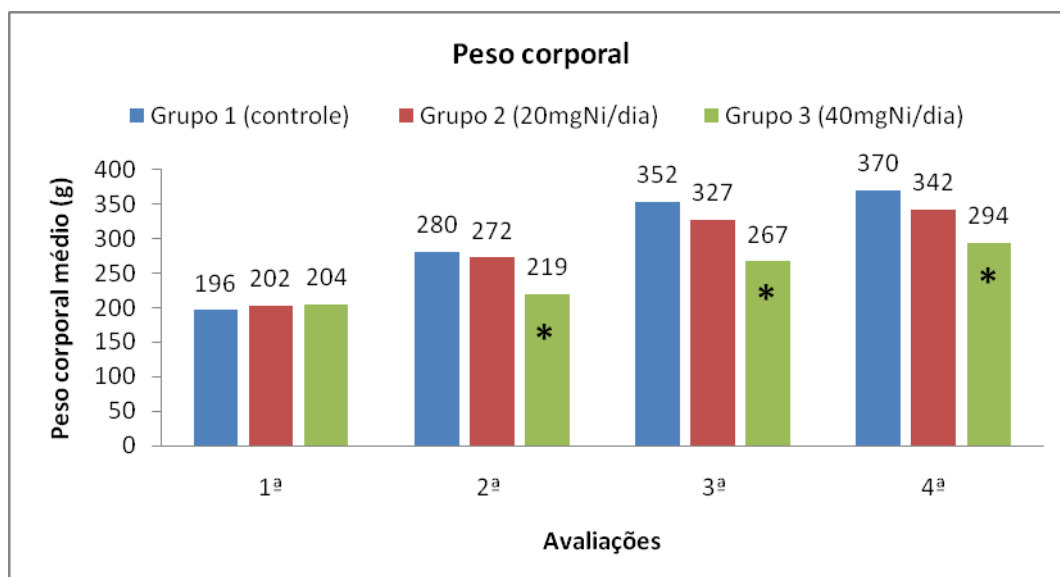


Figura 5: Peso corporal médio (g) dos animais controle e tratados com cloreto de níquel em diferentes avaliações bissemanais ao longo do período experimental; (*) $p < 0,05$.

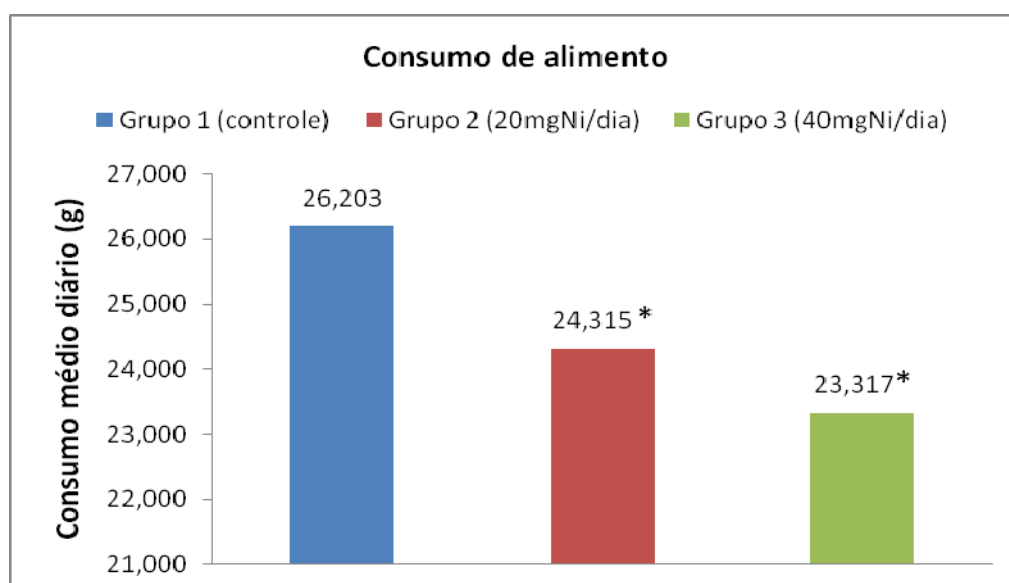


Figura 6: Consumo médio diário de alimento (g) dos animais controle e tratados com cloreto de níquel ao longo do período experimental; (*) $p < 0,05$

4. Discussão

Alguns pesquisadores e associações de toxicologia estão centrados no risco da poluição ambiental por metais pesados contendo níquel e seus compostos e têm relatado em estudos com animais, efeitos tóxicos devido à exposição oral, com evidências de possível diminuição do desenvolvimento e das funções reprodutivas (Domshlak et al., 2005; ATSDR, 2005). Seus efeitos sobre os diversos aspectos da reprodução têm sido

descritos, podendo o metal alcançar os testículos e as glândulas anexas (Pandey et al., 1999).

No presente estudo, animais tratados com 40mgNi/dia (grupo 3) apresentaram redução no peso corporal, testicular total, no parênquima testicular, epidídimo e nos ductos deferentes. Vários estudos têm avaliado a toxicidade do níquel por exposição oral em diferentes doses crônicas, sendo observada redução significativa no peso corporal acompanhada ou não de redução na ingestão de alimento (American Biogenics Corporation, 1988; Dieter et al., 1988; Obone et al., 1999; Cempel e Janicka, 2002; Springborn Laboratories, 2002). Os efeitos tóxicos produzidos por substâncias químicas em sistemas biológicos só se manifestam se o agente tóxico ou um produto de sua biotransformação alcançar locais específicos do organismo em concentração e tempo suficientes para produzi-los. Um efeito adverso ou tóxico é definido como uma alteração anormal, indesejável ou nociva após exposição a substâncias potencialmente tóxicas. A morte é o efeito adverso mais drástico. Os efeitos adversos de menor gravidade incluem alterações patológicas ou enzimáticas, alteração no consumo de alimentos e variação no peso corpóreo (Oga et al., 2008). No presente trabalho observou-se que, além da perda significativa de peso corporal do grupo tratado com 40mgNi/dia, a ingestão média de alimento teve redução significativa nos dois grupos tratados. Certamente essa redução do peso corporal foi devido ao baixo consumo alimentar. E o baixo consumo alimentar foi decorrente da dosagem de níquel. Então, a redução do peso corporal é decorrente da ação do níquel.

Como a produção espermática é altamente relacionada com o peso testicular (Amann, 1970; Russell et al., 1990; França e Russell, 1998) este parâmetro pode ser usado como indicador quantitativo da produção espermática, uma vez que o principal componente testicular é o túbulo seminífero. A redução significativa observada no peso testicular do grupo de maior dose de níquel foi acompanhada pela redução do peso do epidídimo e do ducto deferente. Da mesma forma, em camundongos adultos tratados cronicamente com 10mg/kg de sulfato de níquel 5 dias por semana (durante 35 dias), observaram diminuição significativa no peso do testículo e epidídimo (Pandey et al., 1999). Porém, em tratamento agudo em ratos, com dose única de 20mg e 40mg/kg de cloreto de níquel, não foram detectadas diferenças significativas no peso testicular (Massányi et al., 2007).

O índice gonadossomático (IGS) é um parâmetro que relaciona a massa testicular à massa corporal. No presente experimento não foi observada alteração do IGS entre os grupos avaliados. Embora tenha sido registrado diminuição significativa

do peso corporal no grupo 3, esta diminuição foi proporcionalmente seguida pela redução no peso testicular. Em outras avaliações de toxicidade, como em camundongos tratados com arsenato de sódio a 1,0mg/L, em 42 e 84 dias (Carvalho, 2009), e em ratos tratados com cloreto de cádmio em dose única de 3µmol/kg (Predes, 2007), também não foram observadas variações no IGS.

A albugínea testicular de roedores é cápsula fibrosa constituída por tecido conjuntivo denso rico em vasos sanguíneos (Cabral, 1996). Ela compõe a morfologia do testículo embora não participe diretamente da função espermatogênica ou androgênica (Johnson e Neaves, 1981). Os valores encontrados mostraram redução do peso da albugínea em animais tratados com 40mgNi/dia. Resultados variados foram registrados, em relação à albugínea testicular em outros experimentos de toxicidade crônica. Assim, em estudo com camundongos tratados com arsenato de sódio, o peso da albugínea não teve diferenças significativas entre os tratamentos e ao controle (Carvalho, 2009). Já Cabral (1996), analisando ratos submetidos ao cádmio nas doses de 10 µmols/kg (com duração de 83 dias) ou 15 µmols/kg (duração de 06 dias), constatou alterações morfológicas caracterizadas por espessamento da albugínea testicular.

Os primeiros indicadores de possíveis alterações no estado androgênico são mudanças nos pesos dos órgãos sexuais acessórios. Segundo Creasy (2001), o peso da próstata pode indicar mudanças nas concentrações de testosterona circulante e a redução no peso das glândulas vesiculares podendo indicar um quadro de infertilidade (Malini et al., 1999; Gupta et al., 2001). No presente trabalho não foi encontrada diferença significativa no peso da glândula vesicular entre os grupos estudados. Porém, houve redução significativa do peso da próstata, nos dois grupos tratados. Em camundongos tratados cronicamente com sulfato de níquel foi demonstrada redução, tanto na próstata quanto na vesícula seminal (glândula vesicular) (Pandey et al., 1999). O mesmo foi observado em ratos que receberam arsenito de sódio intraperitonealmente, por 26 dias, nas doses de 5 e 6mg/kg/dias (Sarkar et al., 2003).

O fígado desempenha papel homeostático fundamental no equilíbrio de numerosos processos biológicos, além de ser o principal órgão de destoxificação do corpo (Pouton e Hayanes, 2005). Várias drogas afetam o fígado por estresse oxidativo e a exposição do tecido hepático a tais agentes químicos constitui um importante risco à saúde (Pawa e Ali, 2004). Portanto, alterações nos parâmetros biométricos estão positivamente correlacionados com hepatotoxicidade. O peso do fígado nos animais tratados com cloreto de níquel não apresentou diferença significativa. Se o fígado não alterou é porque as doses não foram suficientes para tal alteração. Ou o fígado

metabolizou a droga, nessa dosagem. Já estudos realizados por Obone et al. (1999) observaram que ratos tratados com sulfato de níquel, ambos os pesos absoluto e relativo do fígado foram significativamente menores em 0,05 e 0,1% (ou 111,75 e 223,5 mgNi/L) nos grupos tratados.

Os metais pesados não essenciais, são tóxicos em doses muito baixas e têm a capacidade de serem absorvidos e acumulados pelos rins. No entanto, o dano renal se dá pela natureza, a dose, a via e a duração da exposição ao tóxico. Tanto a intoxicação aguda quanto a crônica têm demonstrado causar nefropatias (Barbier et al., 2005). Segundo Foulkes e Blanck (1984) o níquel é nefrotóxico. No presente trabalho não foram observadas diferenças significativas no peso dos rins dos animais tratados. Porém, em experimento com ratos utilizando dose mais elevada de sulfato de níquel 0,1% (ou 223,5 mgNi/L) na água de beber, durante 13 semanas observou-se aumento significativo no peso relativo dos rins, concomitantemente com a diminuição no volume de urina (Obone et al., 1999).

A proporção volumétrica de túbulos seminíferos em mamíferos é bastante variável, sendo, portanto um dos principais fatores responsáveis pela diferença observada, para a eficiência na produção espermática nas diversas espécies (Russell et al., 1990; França e Russell, 1998). No presente trabalho não foram encontradas alterações significativas entre o grupo controle e os grupos tratados com cloreto de níquel, para proporção volumétrica de túbulo e intertúbulo. Também não foram encontradas alterações significativas na proporção volumétrica de túbulo e intertúbulo em camundongos tratados cronicamente com arsenato de sódio (Carvalho, 2009) e cloreto de cádmio (Predes, 2007), com os respectivos grupos controle.

Há uma relação direta entre o tamanho testicular e o volume ocupado pelos túbulos seminíferos, o que reflete na produção espermática individual (França e Russell, 1998). No presente experimento verificou-se redução significativa do volume dos túbulos seminíferos nos animais tratados com 40mgNi/dia, sendo este parâmetro responsável pela diminuição do peso testicular, uma vez que o volume do tecido intertubular não sofreu diferenças significativas. O índice tubulossomático (ITS) que é um parâmetro proposto para se quantificar o investimento em túbulos seminíferos em relação à massa corporal, não diferiu entre os grupos estudados, mesmo avaliando-se o grupo 3, onde observou-se diminuição do volume tubular, porém acompanhado de diminuição proporcional no peso corporal. O mesmo foi observado em camundongos tratados com arsenato de sódio (Carvalho, 2009).

O diâmetro médio do túbulo seminífero é uma abordagem classicamente utilizada como indicador da atividade espermatogênica (França e Russell, 1998). Segundo Paula et al. (2002), existem diversos fatores que contribuem para a constituição do diâmetro tubular e altura do epitélio, dentre eles o número de camadas de células mióides que constituem a túnica própria, o tamanho e a população das células de Sertoli e das células espermatogênicas e secreção de fluidos pelas células de Sertoli, o qual determina o lume tubular. Nos animais estudados, aqueles tratados com 40mgNi/dia apresentaram valor médio do diâmetro tubular, menor, assim como a altura do epitélio seminífero. O mesmo foi observado por Massányi et al., (2007), que injetaram intraperitonealmente uma dose única de 20 e 40 mg NiCl₂ por kg de massa corporal. De acordo com Wing e Christensen (1982), a mensuração da altura do epitélio seminífero é mais efetiva que o diâmetro tubular para a avaliação da produção espermática, uma vez que diferenças significativas no diâmetro tubular ao longo do túbulo seminífero, acompanhando as variações do ciclo do epitélio seminífero, estão relacionadas com o aumento do lume tubular que precede a espermição.

O comprimento dos túbulos seminíferos é diretamente dependente do volume total de túbulos seminíferos e do diâmetro tubular, sendo diretamente relacionado ao tamanho do testículo (França e Russell, 1998). No presente estudo, o comprimento total dos túbulos seminíferos não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Porém, considerando o comprimento do túbulo seminífero por grama de testículo, o valor médio encontrado no grupo 3 foi maior que aqueles registrados para os animais do grupo 1 e 2, refletindo a redução também significativa do diâmetro tubular. Já Predes et al., (2009) utilizando cádmio em ratos observaram diminuição significativa no comprimento total de túbulos seminíferos após 7 e 56 dias, embora o valor por grama de testículo não tenha sido alterado.

Vários estudos em animais mostraram efeitos adversos nos órgãos genitais masculinos após a exposição oral ao nitrato, cloreto ou sulfato de níquel. Os efeitos observados incluíram alterações histológicas no epidídimo e vesículas seminais (glândulas vesiculares) e diminuição da motilidade espermática com anormalidades e diminuição da fertilidade (Obone et al., 1999; Pandey et al., 1999; ATSDR, 2005; International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature, 2005; Mathur et al., 2010). Estudos também demonstraram que a maior sensibilidade do epitélio seminífero ao sulfato de níquel na dose de 1,0mg/kg é observada nos espermatozóides, espermátides iniciais, espermátócitos finais e espermatogônias-tronco (Domshlak et al., 2005), prejudicando assim todo o processo espermatogênico. Ratos, após o tratamento

com níquel, apresentaram retração dos túbulos seminíferos e diminuição do número de espermatogônias nos túbulos (Käkelä et al., 1999). Além de elevada peroxidação lipídica testicular e supressão da atividade de enzimas antioxidantes (Gupta et al., 2007), indicando que o níquel, sendo um metal pesado exerce potenciais efeitos tóxicos sobre os órgãos genitais masculinos (Das e Dasgupta, 2002; International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature, 2005).

A animais do grupo tratado com 20mgNi/dia, não apresentaram alterações testiculares significativas, assim como o controle, sendo que espermatogênese foi considerada em estado fisiológico normal para a espécie, compatível com a faixa etária. Já nas avaliações qualitativas e histopatológicas observadas no parênquima testicular dos ratos tratados com 40mgNi/dia evidenciaram patologias no processo espermatogênico: vacuolização, desprendimento celular, e depleção das células germinativas.

Segundo Boekelheide et al. (2005), a vacuolização é o sinal morfológico mais precoce de lesão testicular em resposta a agentes tóxicos, sendo geralmente observada de duas formas, a presença de múltiplos pequenos vacúolos ou de um grande e único vacúolo. Em experimentos realizados por Hoey (1966), para determinar o efeito de cinco metais, prata, cobre, estanho, níquel e cobalto, sobre a histologia e o funcionamento dos testículos e epidídimos de ratos, observou-se que a vacuolização única ou múltipla no epitélio seminífero parece ser devido à morte isolada de espermatócitos primários ou de células de Sertoli. Predes (2007) e Predes et al. (2009), em estudos com ratos Wistar tratados com diferentes doses de cloreto de cádmio, observaram vacuolização nos túbulos seminíferos.

Creasy (2001) descreve que após a vacuolização, a degeneração de células germinativas, desorganização ou esfoliação epitelial é geralmente vista, sendo que os efeitos podem variar com substâncias tóxicas diferentes e, provavelmente, estão relacionadas à natureza do distúrbio funcional sobre a célula de Sertoli. Conforme Lee et al. (2005), as alterações na dinâmica das junções celulares, presentes na barreira hematotesticular de mamíferos, podem alterar todo o processo de espermatogênese levando até a degeneração de células germinativas. Segundo Russell et al. (1990) o comprometimento da barreira de células de Sertoli estão relacionados as alterações que ocorrem no ambiente adluminal e no ambiente basal caracterizando assim a ruptura de barreira. Bustos-Obregón et al. (2006) verificaram a diminuição na altura do epitélio seminífero no intervalo de 72 horas após o uso de flutamida (10mg/kg) em camundongos, observando em alguns casos o descolamento do epitélio germinativo. Em

camundongos tratados cronicamente com arsênio, observa-se vacuolização do epitélio seminífero e perda da população de células germinativas aos 45 dias de tratamento (Sanghamitra et al., 2008). Alguns autores verificaram que o desprendimento de células germinativas do epitélio seminífero pode ser precedido por apoptose (Rodríguez e Garcia, 1998; Hammami et al., 2009).

Assim como observado no presente experimento, Massányi et al. (2007) relatam que a gravidade das alterações testiculares observadas com o uso de níquel são dose dependentes. Segundo Käkälä et al. (1999) a atrofia de túbulos seminíferos com a diminuição do número de espermatogônias basais são induzidas pelo uso do cloreto de níquel. O mesmo foi encontrado em camundongos expostos ao boro, mostrando que este metal também induz a atrofia do epitélio seminífero (Bustos-Obregón et al., 2007). Em estudo semelhante com ratos Wistar tratados com dose única de cloreto de cádmio (1,2mg/kg), verificou-se dano progressivo com degeneração de células resultando em túbulos seminíferos revestidos apenas por células de Sertoli (Predes et al., 2009). Tratamento com 40mg de arsênio em camundongos por 45 dias mostrou mudanças degenerativas graves no tecido tubular, ocorrendo a perda de células germinativas, enquanto que o tratamento por 60 dias mostrou completa degeneração das células espermatogênicas, com aparecimento de agregado de células nos túbulos seminíferos (Sanghamitra et al., 2008).

5. Conclusões

A administração crônica de cloreto de níquel na dose de 40mgNi/dia em ratos Wistar adultos causou redução do peso testicular total e dos componentes testiculares, epidídimo, ducto deferente, albugínea, parênquima, altura do epitélio seminífero, diâmetro dos túbulos seminíferos e do volume tubular.

Os animais expostos cronicamente ao cloreto de níquel sofreram alterações dose dependentes no peso corporal e no consumo de alimento, não refletidas no peso hepático e renal. Independente da dose utilizada, o uso crônico do cloreto ao níquel causou redução no peso da próstata.

Nas avaliações histopatológicas do parênquima testicular, em animais submetidos a maior dose foi evidenciada patologias pontuais no epitélio seminífero referente à vacuolização, desprendimento celular e depleção das células germinativas, sendo que em dois animais todos os túbulos seminíferos apresentavam-se comprometidos.

6. Referências

AMANN, R. P. Sperm production rates. In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; WANDERMARK, N. L., (eds). The Testis. New York: Academia Press, 1970. cap 7, p. 433-482.

AMANN, R. P. Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. *Fundamental and Applied Toxicology*, v. 2, p. 13-26, 1982.

AMERICAN BIOGENICS CORPORATION. Ninety day gavage study in albino rats using nickel. Final report submitted to U.S. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste. Study 410-2520. Submitted by Research Triangle Institute and American Biogenics Corporation, 1988.

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for nickel. US Public Health Service. Atlanta. USA, 2005. 351 p.

ATTAL, J.; COUROT, M. Développement testiculaire et établissement de la spermatogenesis chez le taureau. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, v.3, p. 219-241, 1963.

BARBIER, O.; JACQUILLET, G.; TAUC, M.; COUGNON, M.; POUJEOL, P. Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron Physiology*, v. 99, p. 105-110, 2005.

BOEKELHEIDE, K.; Mechanisms of toxic damage to spermatogenesis. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, v. 2005, p. 6-8, 2005.

BOEKELHEIDE, K.; JOHNSON, K. J.; RICHBURG, J. H. Sertoli cell toxicants. *Sertoli Cell Biology*, Elsevier Science (USA), 2005. cap. 20, p. 345-382.

BUSTOS-OBREGÓN, E.; CARVALHO, M.; BELMAR-HARTLEY, R.; SARABIA, L.; PONCE, C. Histopathological and histometrical assessment of boron exposure effects on mouse spermatogenesis. *International Journal of Morphology*, v. 25, p. 919-925, 2007.

BUSTOS-OBREGÓN, E.; ESPONDA, P.; SARABIA, L. Effect of flutamide in mouse spermatogenesis and on the function of seminal vesicle and prostate. *International Journal of Morphology*, v. 24, p. 171-174, 2006.

CABRAL, F. H. C. Alterações morfológicas testiculares provocadas pelo cádmio, paracetamol e cádmio associado ao paracetamol, em ratos. 1996. 176 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 1996.

CARVALHO, F. A. R. Morfologia e morfometria testicular de camundongos adultos submetidos a exposição crônica ao arsenato. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

CEMPEL, M.; JANICKA, K. Distribution of nickel, zinc, and copper in rat organs after oral administration of nickel (II) chloride. *Biological Trace Element Research*, v. 90, p. 215-226, 2002.

CREASY, D. M. Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicologic Pathology*, v. 29, p. 64-76, 2001.

DAS, K. K.; DASGUPTA, S. Effect of nickel sulfate on testicular steroidogenesis in rats during protein restriction. *Environmental Health Perspectives*, v. 110, p. 923-926, 2002.

DENKHAUS, E.; SALNIKOW, K. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 42, p. 35-56, 2002.

DIETER, M. P.; JAMESON, C. W.; TUCKER, A. N. Evaluation of tissue disposition, myelopoietic, and immunologic responses in mice after long-term exposure to nickel sulfate in the drinking water. *Journal of Toxicology Environmental Health*, v. 24, p. 356-372, 1988.

DOMSHLAK, M. G.; ELAKOV, A. L.; OSIPOV, A. N. Genetic effects induced by nickel sulfate in germline and somatic cells of WR mice. *Russian Journal of Genetics*, v. 41, p. 728–734, 2005.

DORST, V. J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchunhen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. *Monatshefte für Veterinär Medizin*, v. 29, p. 650-652, 1974.

FOULKES, E. D.; BLANCK, S. The selective action of nickel on tubule function in rabbit kidneys. *Toxicology*, v. 33, p. 245-249, 1984.

FRANÇA, L. R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. 1991. 180 f. Tese (Doutorado em Morfologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1991.

FRANÇA, L. R.; CHIARINI-GARCIA, H. Célula de Sertoli. In: CARVALHO, H.I.; COLLARES-BUZATO, C.B., (eds). *Células – Uma abordagem multidisciplinary*. São Paulo: Malone, Brasil, 2005. p. 302-324.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic mammals. In: MARTINEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J. (eds). *Male reproduction – multidisciplinary overview*. Madrid, Churchill Communications, 1998. p. 198-219.

GUPTA, A. D.; DHUNDASI, S. A.; AMBEKAR, J. G.; DAS, K. K. Effect of Lascorbic acid on antioxidant defense system in testes of albino rats exposed to nickel sulphate. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, v. 18, p. 87-95, 2007.

GUPTA, R. S.; YADAV, R. K.; DIXIT, V. P. DOBHAL, M. P. Antifertility studies of *Colebrookia oppositifolia* leaf extract in male rats with special reference to testicular cell population dynamics. *Fitoterapia*, v. 72, p. 236-245, 2001.

HAMMAMI, I.; AMARA, S.; BENAHMED, M.; MAY, M. V. E L.; MAUDUIT, C. Chronic crude garlic-feeding modified adult male rat testicular markers: mechanisms of action. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 7, p. 1-13, 2009.

HOEY, M. J. The effects of metallic salts on the histology and functioning of the rat testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 12, p. 461-471, 1966.

HOLSTEIN A-F.; SCHULZE, W.; DAVIDOFF, M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 1, p. 1-16, 2003.

International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. *Nomina Anatomica Veterinaria*. Editorial Committee Hannover, Columbia, Gent, Sapporo, 2005. 166 p.

JOHNSON, L.; NEAVES, W. B. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. *Biology of Reproduction*, v. 24, p. 703-712, 1981.

KÄKELÄ, R. A.; KÄKELÄ, A.; HYVARINEN, H. Effects of nickel chloride on reproduction of the rat and possible antagonistic role of selenium. *Comparative Biochemistry and Physiology and Pharmacology and Toxicology and Endocrinology*, v. 123, p. 27-37, 1999.

LEE, N. P. Y.; MRUK, D. D.; WONG C-H.; CHENG, C. Y. Regulation of sertoli-germ cell adherens junction dynamics in the testis via the nitric oxide synthase (NOS)/cGMP/protein kinase G (PRKG)/b-catenin (CATNB) signaling pathway: An In Vitro and In Vivo Study. *Biology of Reproduction*, v. 73, p. 458-471, 2005.

MALINI, T.; MANIMARAN, R. R.; ARUNAKARAN, J.; ARULDHAS, M. M.; GOVINDARAJULU. Effects of piperine on testis of albino rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 64, p. 219-225, 1999.

MASSÁNYI, P.; LUKÁČ, N.; ZEMANOVÁ, J.; MAKAREVICH, A. V.; CHRENEK, P.; CIGÁNKOVA, V.; FLESÁROVA, S.; TOMAN, R.; FORGÁC, ZS.; SOMOSY, Z.; LAZOR, P. Effect of Nickel Administration *in vivo* on the Testicular Structure in Male Mice. *Acta Veterinaria Brno*, v. 76, p. 223-229, 2007.

MATHUR, A. K.; CHANDRA, S. V.; BEHARI, J.; TANDON, S. K. Biochemical and morphological changes in some organs in rats in nickel intoxication. *Archives of Toxicology*, v. 37, p. 159-164, 1977b.

MATHUR, A. K.; DATTA, K. K.; TANDON, S. K.; DISKHITH, S. S. Effect of nickel sulphate on male rats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 17, p. 241-248, 1977a.

MATHUR, N.; PANDEY, G.; JAIN, G. C. Male reproductive toxicity of some selected metals: a review. *Journal of Biological Sciences*, v. 10, p. 396-404, 2010.

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

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo: Atheneu, 2008. 677 p.

PANDEY, R.; KUMAR, R.; SINGH, S. P.; SAXENA, D. K.; SRIVASTAVA, S. P. Male reproductive effect of nickel sulphate in mice. *BioMetals*, v. 12, p. 339-346, 1999.

PAULA, T. A. R. Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). 1999. 84 f. Tese (Doutorado em Morfologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1999.

PAULA, T. A. R.; COSTA, D. S.; MATTA, S. L. P. Avaliação histológica quantitativa do testículo capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas. Bioscience Journal, v. 18, p. 121-136, 2002.

PAWA, S.; ALI, S. Liver necrosis and fulminant hepatic failure in rats: protection by oxyanionic form of tungsten. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1688, p. 210-222, 2004.

POUTON, C. W.; HAYNES, J. M. Pharmaceutical applications of embryonic stem cells. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 57, p. 1918-1934, 2005.

PREDES, F. S. Associação de cádmio e *Ginkgo biloba* em ratos: avaliação do testículo quanto a modificações de estrutura, ultraestrutura e morfometria. 2007. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2007.

PREDES, F. S.; DIAMANTE, M.A.S.; DOLDER, H. Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. International Journal of Experimental Pathology, v. 91, p. 125-131, 2009.

RODRÍGUEZ, B. J.; GARCÍA, M. C. Apoptosis precedes detachment of germ cells from the seminiferous epithelium after hormone suppression by short-term oestradiol treatment of rats. International Journal of Andrology, v. 21, p. 109-115, 1998.

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. Florida: Cache River Press, 1990. p. 1-40.

SANGHAMITRA, S.; HAZRA, J.; UPADHYAY, S. N.; SINGH, R. K.; AMAL, R. C. Arsenic induced toxicity on testicular tissue of mice. Indian Journal of Physiology and Pharmacology, v. 52, p. 84-90, 2008.

SARKAR, M.; CHAUDHURI, G. R.; CHATTOPADHYAY, A.; BISWAS, N. M. Effect of sodium arsenite on spermatogenesis, plasma gonadotrophins e testosterone in rats. Asian Journal of Andrology, v. 5, p. 27-31, 2003.

SPRINGBORN LABORATORIES. A range-finding 90-day oral (gavage) toxicity study in Fischer 344 rats with nickel sulfate hexahydrate. Spencerville, OH: Springborn Laboratories, Inc. SLI Study No. 3472.6, 2002.

TAE, H. J.; JANG, B. G.; AHN, D. C.; CHOI, E. Y.; KANG, H. S.; KIM, N. S.; LEE, J. H.; PARK, S. Y.; YANG, H. H.; KIM, I. S. Morphometric studies on the testis of Korean ring necked pheasant (*Phasianus colchicus karpowi*) during the breeding and non-breeding seasons. Veterinary Research Communications, v. 29, p. 629-643, 2005.

WHO, World Health Organization. Nickel in Drinking Water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, 2005. 22 p.

WING, T-Y.; CHRISTENSEN, K. A. Morphometric studies on rats seminiferous tubules. The American Journal of Anatomy, v. 165, p. 13-25, 1982.

ARTIGO 2

EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO NÍQUEL NO COMPARTIMENTO INTERTUBULAR DO TESTÍCULO DE RATOS WISTAR ADULTOS

Resumo

Entre os metais que causam poluição ambiental, o níquel é de especial importância como um elemento potencialmente tóxico e sua acumulação no ambiente pode representar perigo para a saúde animal. A exposição ao níquel acarreta vários efeitos na reprodução, tendo como alvo os testículos, que são órgãos bastante suscetível a agentes ambientais. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito crônico do níquel no compartimento intertubular dos testículos de ratos Wistar adultos. Foram utilizados 24 ratos em idade reprodutiva, divididos em três grupos de oito animais. O grupo 1 (controle) recebeu água deionizada, os grupos 2 e 3 receberam cloreto de níquel (NiCl_2) nas doses de 20mgNi/dia e 40mgNi/dia, respectivamente. Nos animais sacrificados 60 dias após o término do tratamento, observou-se que a administração crônica de níquel no grupo de maior dose causou redução do índice Leydigossomático, da proporção volumétrica dos macrófagos e das células de Leydig e do volume das células de Leydig, sem alterar o número total destas células. Observou-se ainda, o aumento da proporção volumétrica do espaço linfático, além de induzir a redução no peso da próstata, independentemente da concentração utilizada. Dentre as alterações verificadas nestes animais, pode-se inferir que o níquel na dose de 40mgNi/dia altera os parâmetros morfométricos do compartimento intertubular, podendo comprometer a esteroidogênese.

Palavras-chave: níquel; toxicidade; testículo; intertúbulo; células de Leydig.

EFFECT OF CHRONIC NICKEL EXPOSURE IN THE INTERTUBULAR COMPARTIMENT OF THE TESTIS OF WISTAR ADULTS RATS

Abstract

Among the metals that cause environmental pollution, the nickel has especial importance as a potentially toxic element and its accumulation in the environment may represent a hazard to human health. Exposure to nickel causes several effects on reproduction, being targeting, the testes, which are organ highly susceptible to environmental agents. The aim of this work was to evaluate the chronic effect of nickel in the intertubular testis compartment in Wistar adults rats. Were utilized 24 rats of reproductive age, divided into three groups with eight animals. Group 1 (control) received deionized water and groups 2 and 3 received nickel chloride (NiCl_2) at the doses of 20mgNi/day and 40mgNi/day, respectively. In the animals euthanized sixty days after the end of the treatment observed that chronic administration of nickel in the group of higher dose caused reduction in the Leydigosomatic index, at the volumetric proportion of macrophages and of Leydig cell and volume of Leydig cells, without changing the total number these cells. It was also observed increased lymphatic space, besides inducing reduction in prostate weight, independently concentration used. Among the changes in these animals may infer the nickel in the dose of 40mgNi/day alters morphometric parameters of intertubular compartment, probably compromise the steroidogenesis.

Keywords: nickel; toxicity; testis; interbule; Leydig cell.

1. Introdução

Níquel e compostos de níquel são muito utilizados na indústria e comércio, como na galvanoplastia e produção de equipamentos eletrônicos, algumas vezes combinado com outros metais para formação de ligas metálicas (aço inoxidável), sendo também utilizados na fabricação de moedas, joias e baterias (Denkhaus e Salnikow, 2002; ATSDR, 2005). O uso destes metais pesados tem se tornado um perigo potencial à saúde, e os íons desses metais no ambiente causam uma grande variedade de efeitos biológicos (Das e Dasgupta 1997; Das e Dasgupta 2002).

A capacidade dos íons Ni^{2+} em gerar espécies reativas de oxigênio reforçam a peroxidação lipídica e seus efeitos são significativos sobre a esteroidogênese (Forgács et al, 1998). Além de aumentar a peroxidação lipídica e as concentrações de cálcio e ferro nos testículos, fígado e rim, o níquel em altas concentrações diminui o peso testicular e a taxa de fecundidade (Xie et al., 1995). O níquel também reduz significativamente a atividade das enzimas testiculares esteroidogênicas e a concentração plasmática de testosterona, acompanhado por uma elevação na concentração de colesterol e no teor de ácido ascórbico (Das e Dasgupta, 1997; Das e Dasgupta, 2002). Quanto à ação do níquel nos órgãos genitais masculinos (International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature, 2005), pouco se sabe à respeito da morfometria do compartimento intertubular.

O compartimento intertubular é composto por células de Leydig, espaços linfáticos, vasos sanguíneos, nervos e uma população celular variável que inclui fibroblastos, macrófagos e mastócitos (Russell, 1996). As células de Leydig sintetizam testosterona, que assegura a espermatogênese, promove a diferenciação dos órgãos genitais masculinos, mantendo os caracteres sexuais secundários e a função das glândulas acessórias (O'Donnel et al., 2001; Colleta e Carvalho, 2005; International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature, 2005). Em geral, roedores apresentam um padrão de intertúbulo no qual as células de Leydig estão intimamente associadas aos vasos sanguíneos e cercadas pelo espaço linfático (Fawcett et al., 1973).

Como o níquel é um metal pesado e sua acumulação no ambiente pode representar um perigo grave para a saúde humana, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da administração crônica do cloreto de níquel sobre os componentes do compartimento intertubular dos testículos de ratos Wistar adultos.

2. Material e Métodos

2.1. Animais e tratamento

Foram utilizados 24 ratos Wistar adultos em idade reprodutiva (70 dias), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram divididos em três grupos de oito indivíduos cada, pesados e alojados em gaiolas individuais. O grupo 1 (controle) recebeu apenas água deionizada. Cada animal dos grupos de tratamento consumiu níquel na água de beber nas dosagens de 20mgNi/dia (grupo 2) e 40mgNi/dia (grupo 3), durante um período de 60 dias. Para tal foram utilizados soluções de cloreto de níquel (NiCl_2) nas concentrações de 2,0249 e 4,0498 g/L diluídos na água de beber correspondendo, respectivamente a 0,67 e 1,34 mg/ml de níquel puro (íon). Foi anotado o consumo diário médio de 30 ml por animal correspondendo a um consumo de 20 e 40 mg de níquel/dia, respectivamente nos grupos 2 e 3. Para os animais dos três grupos acima foram fornecidos 30g de alimentação sólida (ração), sendo os animais mantidos em temperatura ambiente de 24°C e luminosidade de 12 horas. Os mesmos foram pesados a cada duas semanas e mensurada diariamente a ingestão de alimento durante toda a fase experimental.

2.2. Coleta de amostras

Os animais foram manuseados e submetidos à eutanásia de acordo com Princípios Éticos de Pesquisa Animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo os critérios metodológicos aprovados pela Comissão de Ética Para o Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV).

Os animais foram contidos fisicamente e eutanasiados com sobredosagem de tiopental sódico intraperitonealmente. Os animais foram pesados e, posteriormente, foram retirados e pesados os seguintes órgãos: testículos, glândulas vesiculares e próstata. Fragmentos desses órgãos foram seccionados e fixados em solução de Karnovsky por 24 horas sob-refrigeração.

2.3. Processamento do material para análise histológica

Os fragmentos de testículo, destinados ao estudo da microscopia de luz, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 95% e 100%) com trocas a cada 30 minutos. Após a desidratação, os fragmentos foram incluídos em resina a base de 2-hidroxietil metacrilato (Historesin[®], Leica), sendo posteriormente seccionados na espessura de 3µm em micrótomo rotativo automático (Reichert-Jung, Alemanha) com navalha de vidro. Os cortes semi-seriados foram obtidos por meio de intervalo de 13 cortes, correspondendo à distância de 40µm entre eles. Os cortes obtidos foram corados com azul de toluidina-borato de sódio 1% e as lâminas e lamínulas montadas com Entellan[®] (Merck). Imagens do parênquima testicular foram obtidas em fotomicroscópio (Olympus CX-31) e analisadas utilizando-se o programa *Image Pro Plus* (Media Cybernetics).

2.4. Proporções volumétricas e volume dos elementos do intertúbulo, proporção volumétrica do túbulo seminífero e volume tubular

As proporções volumétricas do espaço linfático, vasos sanguíneos, tecido conjuntivo, macrófagos, núcleos da célula de Leydig, citoplasma de células de Leydig no parênquima testicular e a proporção volumétrica do túbulo seminífero foram obtidas por meio da contagem de um total de 3150 pontos projetados sobre 10 fotomicrografias do parênquima testicular de cada animal. Para tal, utilizou-se uma grade de 315 intersecções (pontos), e as imagens foram capturadas em aumento de 200 vezes. As mensurações foram realizadas utilizando-se o programa de análises de imagens *Image Pro Plus* (Media Cybernetics).

O volume de cada elemento do intertúbulo e o volume tubular expresso em mL foram calculados a partir do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e o peso líquido testicular (peso do parênquima) foram obtidos subtraindo-se do peso bruto do testículo, o peso da albugínea testicular. Como a densidade do testículo é em torno de 1 (Johnson e Neaves, 1981; França, 1991; Paula, 1999; Tae et al., 2005), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

2.5. Diâmetro nuclear, relação núcleo citoplasmática, índice Leydigossomático, volumetria e número de células de Leydig

O diâmetro nuclear de células de Leydig foi mensurado em 30 células por animal, utilizando-se o programa de análises de imagens *Image Pro Plus* (Media Cybernetics). Os núcleos utilizados foram os que apresentaram contorno circular, com a cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. Devido à morfologia circular do núcleo, foi possível o cálculo do seu volume a partir da fórmula do volume da esfera (Volume nuclear = $4/3\pi R^3$ onde, R = raio nuclear). A partir da proporção volumétrica obtida do núcleo e do citoplasma da célula de Leydig foi possível a caracterização do volume do citoplasma e consequentemente do volume total de uma célula de Leydig. Assim, Volume citoplasmático = % citoplasma x volume nuclear / % núcleo; logo, Volume celular = volume nuclear + volume citoplasmático. Estes valores foram expressos em micrômetros cúbicos (μm^3). A relação núcleo citoplasmática refere-se à correlação entre o núcleo e o citoplasma da célula de Leydig, e foi calculada dividindo-se a proporção volumétrica de citoplasma pela proporção volumétrica de núcleos de célula de Leydig.

O volume total de células de Leydig foi calculado a partir da proporção que esta célula ocupa no parênquima testicular e o peso do parênquima de um testículo. Dividindo-se o volume total (mL) das células de Leydig pelo volume ocupado por uma célula, foi calculado o número de células de Leydig por testículo e a partir do peso testicular, o número de células de Leydig por grama de testículo. O índice Leydigossomático (ILS) foi calculado a partir da seguinte fórmula: ILS = volume que a célula de Leydig ocupa nos testículos / PC x 100, onde PC = peso corporal.

2.6. Análise estatística

A média e o desvio-padrão dos parâmetros analisados foram comparados entre os grupos por meio da análise de variância (ANOVA) utilizando o teste de Newman-Keuls, sendo o nível de significância de ($p < 0,05$). Todos os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio-padrão.

3. Resultados

Os valores médios da proporção volumétrica para tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, núcleo de células de Leydig e valores médios da proporção volumétrica dos

túbulos seminíferos não variaram entre os animais dos grupos estudados ($p>0,05$). Houve aumento significativo do espaço linfático nos animais do grupo 3 em relação ao grupo controle ($p<0,05$). Analisando os valores médios da proporção volumétrica para os macrófagos, também foi observado redução significativa no grupo 3 ($p<0,05$) quando comparado ao grupo controle, não sendo significativo em relação ao grupo 2. O mesmo pode ser constatado em relação à proporção de célula de Leydig e do citoplasma da célula de Leydig Tabela 1.

Tabela 1 – Proporção volumétrica (%) dos elementos do intertúbulo e do túbulo seminífero de testículo de ratos Wistar em idade reprodutiva após tratamento com cloreto de níquel (média $\pm$ desvio-padrão).

Proporções	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Tecido conjuntivo	0,57 $\pm$ 0,24 ^a	0,39 $\pm$ 0,22 ^a	0,34 $\pm$ 0,12 ^a
Espaço linfático	8,04 $\pm$ 2,95 ^a	14,42 $\pm$ 9,21 ^{ab}	14,31 $\pm$ 3,34 ^b
Vasos sanguíneos	2,62 $\pm$ 0,99 ^a	4,30 $\pm$ 3,11 ^a	3,37 $\pm$ 0,89 ^a
Macrófagos	0,74 $\pm$ 0,28 ^a	0,57 $\pm$ 0,35 ^{ab}	0,36 $\pm$ 0,10 ^b
Célula de Leydig	4,75 $\pm$ 1,08 ^a	3,95 $\pm$ 1,91 ^{ab}	2,75 $\pm$ 1,03 ^b
Núcleo de Leydig	0,52 $\pm$ 0,16 ^a	0,53 $\pm$ 0,31 ^a	0,34 $\pm$ 0,13 ^a
Citoplasma de Leydig	4,24 $\pm$ 0,96 ^a	3,42 $\pm$ 1,61 ^{ab}	2,41 $\pm$ 0,96 ^b
Túbulo seminífero	83,28 $\pm$ 3,11 ^a	76,38 $\pm$ 11,67 ^a	76,77 $\pm$ 6,50 ^a

Letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si ($p>0,05$) pelo teste de Newman-Keuls
Grupo 1: controle; Grupo 2: 20mgNi/dia; Grupo 3: 40mgNi/dia

Os volumes médios dos elementos do intertúbulo e volume tubular estão expressos na Tabela 2. As médias referentes ao tecido conjuntivo, espaço linfático, vasos sanguíneos, macrófagos e núcleo da célula de Leydig não sofreram variações significativas entre os animais do grupo controle e tratados ($p>0,05$). No entanto, o volume da célula de Leydig e do citoplasma da célula de Leydig apresentaram redução no grupo 3 em relação ao grupo controle, porém não apresentando valor significativo

em relação ao grupo 2. Observou-se ainda redução significativa no volume tubular ($p<0,05$), no grupo 3 em relação ao grupo controle e ao grupo 2.

Tabela 2 – Volume (mL) dos elementos do intertúbulo por testículo e volume tubular de ratos Wistar em idade reprodutiva após tratamento com cloreto de níquel (média $\pm$ desvio-padrão).

Volume	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Tecido conjuntivo	0,0015 $\pm$ 0,0007 ^a	0,0016 $\pm$ 0,0015 ^a	0,0008 $\pm$ 0,0003 ^a
Espaço linfático	0,0225 $\pm$ 0,0142 ^a	0,0437 $\pm$ 0,0344 ^a	0,0360 $\pm$ 0,0129 ^a
Vasos sanguíneos	0,0073 $\pm$ 0,0045 ^a	0,0243 $\pm$ 0,0221 ^a	0,0126 $\pm$ 0,0111 ^a
Macrófagos	0,0020 $\pm$ 0,0010 ^a	0,0022 $\pm$ 0,0022 ^a	0,0009 $\pm$ 0,0003 ^a
Célula de Leydig	0,0126 $\pm$ 0,0041 ^a	0,0103 $\pm$ 0,0046 ^{ab}	0,0068 $\pm$ 0,0030 ^b
Núcleo de Leydig	0,0014 $\pm$ 0,0007 ^a	0,0012 $\pm$ 0,0005 ^a	0,0008 $\pm$ 0,0003 ^a
Citoplasma de Leydig	0,0112 $\pm$ 0,0035 ^a	0,0091 $\pm$ 0,0041 ^{ab}	0,0060 $\pm$ 0,0028 ^b
Volume tubular	2,3310 $\pm$ 0,1402 ^a	2,3177 $\pm$ 0,4143 ^a	1,7508 $\pm$ 0,4951 ^b

Letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si ($p>0,05$) pelo teste de Newman-Keuls
Grupo 1: controle; Grupo 2: 20mgNi/dia; Grupo 3: 40mgNi/dia

Os parâmetros observados na Tabela 3 diâmetro do núcleo da célula de Leydig, relação núcleo citoplasmática (RNP), volumes nuclear, citoplasmático e de uma célula de Leydig não apresentaram diferenças entre os grupos controle e tratados ($p>0,05$), sendo o mesmo para o peso da glândula vesicular e para o número de células Leydig por testículo e por grama de testículo. O índice Leydigossomático (ILS), apresentou valores significativamente menores no grupo 3, tanto em relação ao grupo controle quanto em relação ao grupo 2 ($p<0,05$). Quanto ao peso da próstata ($p<0,05$) houve redução significativa nos grupos 2 e 3 em relação ao controle.

Tabela 3 – Diâmetro do núcleo da célula de Leydig, relação núcleo citoplasmática (RNP), índice Leydigossomático (ILS), volumes nuclear, citoplasmático e total de uma célula de Leydig, número de células Leydig por testículo e por grama de testículo, peso da glândula vesicular e peso da próstata de ratos Wistar em idade reprodutiva após tratamento com cloreto de níquel (média $\pm$ desvio-padrão)

Parâmetros	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Diâmetro nuclear (μm)	7,40 $\pm$ 0,31 ^a	7,18 $\pm$ 0,53 ^a	7,07 $\pm$ 0,19 ^a
RNP	1: 8,21 ^a	1: 6,48 ^a	1: 7,16 ^a
ILS (%)	0,020 $\pm$ 0,01 ^a	0,018 $\pm$ 0,01 ^a	0,011 $\pm$ 0,01 ^b
Volume nuclear (μm^3)	213,21 $\pm$ 25,89 ^a	196,37 $\pm$ 41,55 ^a	185,24 $\pm$ 14,37 ^a
Volume citoplasmático(μm^3)	1820,87 $\pm$ 426,75 ^a	1340,24 $\pm$ 330,84 ^a	1438,27 $\pm$ 591,74 ^a
Volume celular (μm^3)	2034,08 $\pm$ 434,68 ^a	1536,61 $\pm$ 357,50 ^a	1623,51 $\pm$ 598,82 ^a
Nº de Leydig / testículo (10^6)	39,26 $\pm$ 15,32 ^a	41,29 $\pm$ 24,48 ^a	30,43 $\pm$ 25,24 ^a
Nº de Leydig/g de testículo (10^6)	23,22 $\pm$ 7,90 ^a	35,84 $\pm$ 24,96 ^a	34,90 $\pm$ 27,30 ^a
Peso da glândula vesicular (g)	0,92 $\pm$ 0,15 ^a	0,88 $\pm$ 0,33 ^a	0,70 $\pm$ 0,23 ^a
Peso da próstata (g)	0,80 $\pm$ 0,15 ^a	0,59 $\pm$ 0,20 ^b	0,46 $\pm$ 0,13 ^b

Letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Newman-Keuls. Valores de RNP representado em razão matemática. Grupo 1: controle; Grupo 2: 20mgNi/dia; Grupo 3: 40mgNi/dia

4. Discussão

Vários autores têm descrito relações funcionais entre células de Leydig e os demais componentes intertubulares (Skinner, 1991; Hales, 2002; Colleta e Carvalho, 2005). Durante o desenvolvimento testicular, mudanças na morfologia das células de Leydig ocorrem de maneira coordenada com os macrófagos demonstrando íntima associação entre essas células. Neste sentido, entende-se que fatores secretados pelos macrófagos controlam de modo parácrino a atividade esteroidogênica e o desenvolvimento das células de Leydig (Hales, 1996). No presente estudo, observou-se que o uso crônico do níquel induziu redução significativa nas proporções volumétricas de macrófagos acompanhada pela redução, também significativa, na proporção volumétrica de células de Leydig. Estas alterações podem indicar um prejuízo fisiológico sobre a androgênese. Em relação aos demais componentes testiculares não foram observadas variações significativas na volumetria de tecido conjuntivo, porém, o aumento significativo na proporção volumétrica de espaços linfáticos foi detectada nos animais que receberam maior dose de níquel, possivelmente como reflexo de maior vascularização sanguínea, que embora esteja notadamente aumentada nos grupos tratados, não pôde ser detectada estatisticamente.

Carvalho (2009), em estudos com camundongos, observou redução no volume total de células de Leydig nos grupos tratados cronicamente com arsenato de sódio, diferente do que foi observado no estudo com doses aguda de cloreto de cádmio ($3\mu\text{mol/kg}$), onde não foram verificadas variações nas proporções volumétricas e volumes dos elementos do intertúbulo (Predes, 2007). No presente experimento, foi observada redução significativa no volume total de células de Leydig com o uso crônico de 40mg/dia, reforçando a suspeita de prejuízo androgênico nestes animais. Porém, Ewing et al. (1979), correlacionando estrutura e funções das células de Leydig em várias espécies de mamíferos, mostraram que variações na síntese e secreção de testosterona dependem mais da capacidade individual desta célula do que do volume total delas no testículo. Esta capacidade está altamente associada com a quantidade de retículo endoplasmático liso presente na célula de Leydig (Zirkin et al., 1980). De acordo com Castro et al. (2002), o volume nuclear da célula de Leydig e o número de células de Leydig por grama de testículo estão altamente correlacionados com a concentração de testosterona testicular plasmática. Já, Costa e Paula (2006) sugerem que, em capivaras, as taxas de produção de testosterona correlacionam-se com o volume individual da célula de Leydig. Como a redução no volume individual da célula de

Leydig observada nos animais tratados não foi comprovada estatisticamente são necessários dados provenientes da morfometria de organelas, como o retículo endoplasmático liso, para constatar alterações relacionadas a produção androgênica nos animais submetidos a exposição crônica ao níquel.

Outro parâmetro diretamente relacionado à produção androgênica é o peso das glândulas anexas ao aparelho urogenital masculino, uma vez que este é um parâmetro andrógeno dependente (Souza et al., 2005; Chieregatto, 2009). No presente experimento redução significativa foi observada no peso da próstata nos grupos tratados cronicamente com níquel, indicando mais uma vez um prejuízo na produção androgênica nos animais tratados.

Foi observado que as reduções nos valores médios de diâmetro e núcleo de célula de Leydig não foram significativas assim como para relação núcleo citoplasmática entre os grupos experimentais. Carvalho (2009), correlacionou, em animais que receberam arsenato de sódio a 1,0mg/L, redução significativa no diâmetro e no volume nuclear de células de Leydig com a redução na produção de testosterona. Também em ratos tratados cronicamente com arsenito de sódio (30 e 40mg/L), o diâmetro nuclear das células de Leydig reduziu gradativamente em 45 e 60 dias, sendo observada também, redução na população de células de Leydig (Sanghamitra, 2008). Neste experimento as médias referentes ao número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo não variaram nos grupos estudados. Porém, foi observada redução significativa no índice Leydigossomático no grupo de maior dose entre os grupos analisados. Como o índice Leydigossomático é um parâmetro que visa quantificar o investimento em células de Leydig com relação ao peso corporal, claramente houve uma influência dose dependente na administração crônica de níquel no requerimento androgênico dos animais tratados, uma vez que redução significativa no volume de túbulos seminíferos foi também observada nos animais tratados com a maior dose de níquel. Neste sentido, segundo Mali et al. (2002), a redução dos túbulos seminíferos está relacionada à redução na produção de testosterona e, segundo Gupta et al. (2001), com consequente infertilidade. Autores relatam ainda que a redução do peso dos testículos e glândulas acessórias são provavelmente causadas pela baixa produção de andrógenos nos testículos, possivelmente como um resultado da perda da massa das células de Leydig (Ng e Liu 1990; Pandey et al., 1999). Dessa forma, é provável que tenham ocorrido alterações na produção de testosterona correlacionadas com alterações no processo espermatogênico nos animais tratados cronicamente com alta concentração níquel neste experimento.

5. Conclusões

A administração crônica de cloreto de níquel na maior dose em ratos Wistar adultos reduziu o índice Leydigossomático, a proporção volumétrica, dos macrófagos, das células de Leydig e o volume total das células de Leydig.

Nos animais expostos a maior dose observou-se o aumento da proporção volumétrica do espaço linfático, além da redução do peso da próstata, independentemente da concentração utilizada.

Pode-se inferir que o níquel na dose de 40mgNi/dia altera os parâmetros morfométricos do compartimento intertubular, podendo comprometer a esteroidogênese.

6. Referências

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for nickel. US Public Health Service. Atlanta. USA, 2005. 351 p.

CARVALHO, F. A. R. Morfologia e morfometria testicular de camundongos adultos submetidos a exposição crônica ao arsenato. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

CASTRO, A. C. S.; BERNDTSON, W. E.; CARDOSO, F. M. Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, p. 493-498, 2002.

CHIEREGATTO, L. C. Efeitos dos extratos de *Heteropterys aphrodisiaca* O. Mach. (nó-de-cachorro) e *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellfeld & J.F. Souza (vergateza) sobre o testículo e o processo espermatogênico de ratos Wistar adultos. 2009. 109 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

COLLETA, H. H. M. D.; CARVALHO, H. F. Células de Leydig. In: CARVALHO, H. F.; COLARES-BUZATO, C. B., (eds). Células: Uma abordagem multidisciplinar. São Paulo: Malone, 2005. cap 25. p. 325-334.

COSTA, D. S.; PAULA, T. A. R. Testosterone level, nasal gland volume and Leydig cell morphometry in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 58, p. 1086-1091, 2006.

DAS, K. K.; DASGUPTA, S. Alteration of testicular biochemistry during protein restriction in nickel treated rats. Biological Trace Element Research, v. 60, p. 243-249, 1997.

DAS, K. K.; DASGUPTA, S. Effect of nickel sulfate on testicular steroidogenesis in rats during protein restriction. Environmental Health Perspectives, v. 110, p. 923-926, 2002.

DENKHAUS, E.; SALNIKOW, K. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. Critical Reviews in Oncology/Hematology, v. 42, p. 35-56, 2002.

EWING, L. L.; ZIRKIN, B. R.; COCHRAN, R. C.; KROMANN, N.; PETERS, C.; RUIZ BRAVO, N. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. Endocrinology, v. 105, p. 1135-1142, 1979.

FAWCET, D. W.; NEAVES, W. B.; FLORES, M. N. Comparative observations on intertubular Lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. Biology Reproduction, v. 9, p. 500-532, 1973.

FORGÁCS, Z.; PAKSY, K.; LÁZÁR, P.; TÁTRAI, E. Effect of Ni²⁺ on the testosterone production of mouse primary Leydig cell culture. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part a, v. 55, p. 213-224, 1998.

FRANÇA, L. R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. 1991. 180 f. Tese (Doutorado em Morfologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1991.

GUPTA, R. S.; YADAV, R. K.; DIXIT, V. P. DOBHALL, M. P. Antifertility studies of *Colebrookia oppositifolia* leaf extract in male rats with special reference to testicular cell population dynamics. *Fitoterapia*, v. 72, p. 236-245, 2001.

HALES, D. B. Leydig cell-macrophage interactions: an overview. In: PAYNE, A. H., HARDY, M. P., RUSSELL, L. D. (Eds.), *The Leydig cell*. Vienna: Cache River Press, 1996. cap 21, p. 452-463.

HALES, D. B. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *Journal Reproductive Immunology*, v. 57, p. 3-18, 2002.

International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. *Nomina Anatomica Veterinária*. Editorial Committee Hannover, Columbia, Gent, Sapporo, 2005. 166 p.

JOHNSON, L.; NEAVES, W. B. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. *Biology of Reproduction*, v. 24, p. 703-712, 1981.

MALI, P. C.; ANSARI, A. S.; CHATURVEDI, M. Antifertility effect of chronically administered *Martynia annua* root extract on male rats. *Journal Ethnopharmacology*, v. 82, p. 61-67, 2002.

NG, T. B.; LIU, W. K. Toxic effect of heavy metals on cells isolated from the rat adrenal and testis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, v. 26, p. 24-28, 1990.

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R. Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Review*, v. 22, p. 289-318, 2001.

PANDEY, R.; KUMAR, R.; SINGH, S. P.; SAXENA, D. K.; SRIVASTAVA, S. P. Male reproductive effect of nickel sulphate in mice. *BioMetals*, v. 12, p. 339-346, 1999.

PAULA, T. A. R. Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). 1999. 84 f. Tese (Doutorado em Morfologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1999.

PREDES, F. S. Associação de cádmio e *Ginkgo biloba* em ratos: avaliação do testículo quanto a modificações de estrutura, ultraestrutura e morfometria. 2007. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2007.

RUSSELL, L. D. Mammalian Leydig cell structure. In: PAYNE, A.H.; HARDY, M.P.; RUSSELL, L.D. (eds) *The Leydig Cell*. Vienna: Cache River Press, 1996. p. 43-96.

SANGHAMITRA, S.; HAZRA, J.; UPADHYAY, S. N.; SINGH, R. K.; AMAL, R. C. Arsenic induced toxicity on testicular tissue of mice. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 52, p. 84-90, 2008.

SKINNER, M. K. Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Reviews*, v. 12, p. 45-77, 1991.

SOUZA, P. C.; PAULA, T. A. R.; NATALI, A. J.; MATTA, S. L. P.; COSTA, D. S.; FONSECA, C. C.; SARTI, P. Efeito do exercício crônico voluntário e do sedentarismo, com e sem o uso do esteroide anabólico nandrolona, sobre os componentes do parênquima testicular de ratos adultos. *Revista Ceres*, v. 53, p. 305-316, 2005.

TAE, H. J.; JANG, B. G.; AHN, D. C.; CHOI, E. Y.; KANG, H. S.; KIM, N. S.; LEE, J. H.; PARK, S. Y.; YANG, H. H.; KIM, I. S. Morphometric studies on the testis of Korean ring necked pheasant (*Phasianus colchicus karpowi*) during the breeding and non-breeding seasons. *Veterinary Research Communications*, v. 29, p. 629-643, 2005.

XIE, J.; FUNAKOSHI, T.; SHIMADA, H.; KOJIMA, S. Effects of chelating agents on testicular toxicity exposure to nickel in mice caused by acute. *Toxicology*, v. 103, p. 147-155, 1995.

ZIRKIN, B. R.; EWING, L. L.; KROMANN, N.; COCHRAN, R. C. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes in vitro: correlation with Leydig cells ultrastructure. *Endocrinology*, v. 107, p. 1867-1874, 1980.

CONCLUSÕES GERAIS

Animais expostos cronicamente a maior dose de cloreto de níquel apresentaram redução nos pesos testiculares totais e nos componentes testiculares, altura do epitélio seminífero, diâmetro dos túbulos seminíferos e no volume tubular, além da redução do peso do epidídimo.

A exposição crônica de cloreto de níquel em ratos Wistar adultos causou alterações dose dependente no peso corporal e no consumo de alimento, não refletidos no peso hepático e renal.

Nas avaliações do parênquima testicular de animais submetidos a maior dose com cloreto de níquel foram evidenciadas manifestações histopatológicas consideráveis, vacuolização, desprendimento celular e severa depleção das células germinativas.

Nos animais expostos cronicamente ao níquel observou-se redução no peso da próstata, independentemente da dose utilizada.

Em relação ao compartimento intertubular a administração crônica de cloreto de níquel na maior dose interferiu na redução da proporção volumétrica, dos macrófagos, das células de Leydig e no volume total das células de Leydig, assim como a redução do índice Leydigossomático. Houve alterações no peso dos órgãos andrógenos dependentes, o que está correlacionado às possíveis alterações observadas no compartimento intertubular, considerando-se as células de Leydig.

Testículo é susceptível a altas doses de níquel, assim a dose de 40mgNi mostrou-se mais tóxica que a dose de 20mgNi durante o tratamento de 60 dias.

Dentre as alterações observadas acima, sugere-se que o uso crônico de altas doses de níquel possa afetar a esteroidogênese e comprometer o processo espermatogênico.