

**FABÍOLA DE ARAÚJO RESENDE CARVALHO**

**MORFOLOGIA E MORFOMETRIA TESTICULAR DE  
CAMUNDONGOS ADULTOS SUBMETIDOS A EXPOSIÇÃO  
CRÔNICA AO ARSENATO**

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**

**2009**

**FABÍOLA DE ARAÚJO RESENDE CARVALHO**

**MORFOLOGIA E MORFOMETRIA TESTICULAR DE CAMUNDONGOS  
ADULTOS SUBMETIDOS A EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ARSENATO**

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: 25 de setembro de 2009.

---

Prof. Clóvis Andrade Neves

---

Prof. Juraci Alves de Oliveira  
(Coorientador)

---

Prof. Juliana Silva Rocha

---

Prof. Mariana Machado Neves

---

Prof. Sérgio Luis P. da Matta  
(Orientador)

“De tudo ficaram três coisas...  
A certeza de que estamos começando...  
A certeza de que é preciso continuar...  
A certeza de que podemos ser interrompidos  
antes de terminar...  
Façamos da interrupção um caminho novo...  
Da queda, um passo de dança...  
Do medo, uma escada...  
Do sonho, uma ponte...  
Da procura, um encontro!”

Fernando Sabino

*Aos meus pais e à minha irmã.*

*“A Família não nasce pronta; constrói-se aos poucos, e é o melhor laboratório do amor. Em casa, entre pais e filhos, pode-se aprender a amar, pode-se experimentar com profundidade a grande aventura de amar sem medo”*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida sendo presença constante em todos os momentos, iluminando e guiando meus passos e responsável por todas as bênçãos e conquistas da minha vida, inclusive esta.

Aos meus queridos pais, Cristina e Antônio Carlos que são meu porto seguro e meus exemplos de vida, amor, fé, caráter, honestidade e perseverança. Amo vocês! Obrigada por tudo!

A minha irmã Fernanda, pela cumplicidade, amor, apoio e por me encorajar a seguir em frente sempre. Você é especial na minha vida!

Ao professor Sérgio Luis Pinto da Matta, pela orientação, amizade, apoio, confiança, dedicação, ensinamentos e por acreditar na minha capacidade de vencer. Que você continue sendo este exemplo de amigo e profissional que sabemos que é. “Ser convicto de acertos, de erros. Ser construtor de seres, de vidas. Ser edificador. Movido por impulsos, por razão, por emoção. De sentimentos profundos, que carrega no peito o orgulho de educar. Que enfrenta agruras, mas prossegue, vai adiante realizando sonhos, buscando se auto-realizar, atingir sua plenitude humana. Possuidor de potencialidades. Da fraqueza, sempre surge à força fazendo-o guerreiro. Ser de incalculável sabedoria. Este é o valor de ser Educador”.

Ao professor Juraci Alves de Oliveira, pela amizade, empenho, ajuda na análise dos dados e tempo dispensado para que este trabalho se concretizasse.

Ao professor Tarcízio Antônio Rêgo de Paula pelas valiosas contribuições para melhoria deste trabalho.

Aos professores Clóvis Andrade Neves, Juliana Silva Rocha e Mariana Machado Neves por aceitarem participar da banca examinadora de tese e pelas correções que certamente serão de grande valia para este trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa pelo apoio e à brilhante contribuição na capacitação de novos profissionais.

Ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela seriedade dos seus trabalhos e por ter sido acessível a todas as solicitações no decorrer do curso.

Aos professores do laboratório de Biologia Celular e Estrutural por todos os anos de longa convivência, apoio, amizade e colaboração.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pelos ensinamentos adquiridos durante o curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de bolsa fornecida durante o período do mestrado e por subsídios ao projeto.

Ao laboratório de Anatomia Vegetal do departamento de Biologia Vegetal pela disponibilidade do microscópio acoplado a câmera de captura de imagens.

A secretária de Pós-graduação do programa de Biologia Celular e Estrutural, Beth, pela amizade, preocupação permanente com as documentações necessárias durante a realização do curso e por estar sempre disponível para solucionar qualquer problema durante o curso.

A coordenação do Biotério Central da UFV, por disponibilizar os animais necessários para a realização do experimento.

A Coordenação e responsável pelo laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição por disponibilizar a estrutura do laboratório para a realização do experimento.

Aos queridos amigos do Laboratório de Biologia Estrutural e do programa de Pós-graduação pela amizade, colaboração, carinho, companheirismo e apoio durante estes anos de linda convivência. A participação de vocês foi fundamental para a concretização deste projeto!

A amiga Regiane pela disponibilidade de executar todas as análises bioquímicas deste trabalho.

Aos amigos de graduação, em especial, Guilherme, Carol, Luiza, Alexandra, Bruna, Priscila, Thiago e Marliane que foram presença constante e importante durante todos estes anos.

As amigas-irmãs, Juliana, Kyvia, Ana Paula Matta, Michele, Iulla e Gabriela pela amizade e por estarem sempre presentes e me apoiando em todos os momentos de minha vida. Adoro vocês!

Aos queridos amigos de Divinópolis que sempre torceram por mim.

A todos os meus familiares pelo amor e torcida constante.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente, me ajudaram na conquista de mais esta etapa importante de minha vida.

A todos vocês o meu carinho e MUITO OBRIGADA!!!

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>1. Revisão de literatura</b> .....	1
1.1- Toxicologia e aspectos químicos do arsênio .....	1
1.2- Arsênio como contaminante ambiental .....	1
1.3- Organização morfofuncional do testículo .....	7
1.4- Espermatogênese .....	7
1.5- Células de Sertoli .....	9
1.6- Célula de Leydig .....	11
1.7- Biomarcadores séricos de hepatotoxicidade e testosterona sérica .....	12
1.8- Histopatologia testicular .....	14
<b>2. Objetivos</b> .....	15
<b>3. Material e Métodos</b> .....	15
3.1- Animais, grupos experimentais e tratamento .....	15
3.2- Preparo de solução de arsenato de sódio .....	16
3.3- Coleta de amostras .....	16
3.4- Biometria corporal e testicular .....	16
3.5- Proporções volumétricas (%) e volumes dos componentes do testículo .....	16
3.6- Diâmetro tubular e Altura de epitélio seminífero .....	17
3.7- Comprimento total de túbulo seminífero .....	17
3.8- Proporção volumétrica, relação nucleoplasmática e volumes dos componentes intertubulares do parênquima testicular .....	17
3.9- Morfometria de célula de Leydig .....	18
3.10- Alterações histopatológicas .....	18
3.11- Determinação de níveis plasmáticos de testosterona e transaminases (TGO e TGP) .....	18
3.12- Espectrofotometria de Emissão de plasma .....	19
3.13- Análise estatística .....	19
<b>4. Referências</b> .....	20
<b>CAP. 1. AVALIAÇÃO DO EFEITO CRÔNICO DE ARSENATO SOBRE A BIOMETRIA CORPORAL E DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE CAMUNDONGO SWISS ADULTO</b> .....	
<b>Resumo</b> .....	30
<b>1. Introdução</b> .....	32
<b>2. Resultados e Discussão</b> .....	33
2.1- Biometria corporal e testicular .....	33
2.2- Bioacúmulo de arsênio .....	36

2.3- Determinação plasmática das enzimas transaminases .....	40
2.4- Proporções volumétricas de túbulo seminífero e intertúbulo .....	42
2.5- Volumes tubulares, intertubulares e índice tubulossomático .....	42
2.6- Diâmetros tubulares, altura de epitélio e comprimento total de túbulo seminífero .....	44
2.7- Alterações histopatológicas .....	45
<b>3. Conclusões .....</b>	<b>54</b>
<b>4. Agradecimentos .....</b>	<b>54</b>
<b>5. Referências .....</b>	<b>55</b>
<b>CAP. 2. EFEITO DO ARSENATO SOBRE AS CÉLULAS DE LEYDIG E</b>	
<b>COMPONENTES INTERTUBULARES DE TESTÍCULO DE CAMUNDONGO SWISS</b>	
<b>ADULTO.....</b>	<b>61</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>61</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>63</b>
<b>2. Resultados e Discussão .....</b>	<b>64</b>
2.1- Proporção volumétrica dos componentes do intertúbulo .....	64
2.2- Volume dos componentes de intertúbulo por testículo.....	65
2.3- Morfometria de célula de Leydig .....	67
2.4- Determinação plasmática de testosterona .....	70
<b>3. Conclusões .....</b>	<b>71</b>
<b>4. Agradecimentos .....</b>	<b>71</b>
<b>5. Referências .....</b>	<b>72</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>75</b>

## RESUMO

CARVALHO, Fabíola de Araújo Resende, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2009. **Morfologia e morfometria testicular de camundongos adultos submetidos à exposição crônica de arsenato.** Orientador: Sérgio Luis P. da Matta. Co-Orientadores: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula e Juraci Alves de Oliveira.

Verifica-se atualmente aumento na preocupação com os potenciais efeitos de vários contaminantes ambientais, dentre eles o arsênio inorgânico, um dos principais poluentes da água considerado um problema de abrangência mundial. A intoxicação por arsênio pode resultar em efeitos tóxicos, agudos ou crônicos, ocasionando diferentes patologias, dentre elas aquelas que afetam o sistema reprodutor masculino. Desta forma, este trabalho teve como objetivo a investigação dos efeitos crônicos do arsênio sobre a biometria corporal e testicular, dos túbulos seminíferos e do compartimento intertubular de camundongos adultos. Vinte e quatro camundongos foram divididos em três grupos: o Controle (CTR), que recebeu apenas água destilada e os grupos de tratamento que receberam solução de arsênio, na forma de arsenato de sódio na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , durante 42 dias (grupo AS1) e 84 dias (grupo AS2). Os órgãos sexuais, fígado, rins e pele foram coletados e fixados em Karnovsky. Os testículos foram processados e corados em azul de toluidina/borato de sódio para as análises histopatológicas. O tratamento com arsenato na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  via água de consumo em camundongos *Swiss* adultos, aumentou significativamente o peso corporal no grupo AS2 em relação ao grupo AS1 e o CTR. Já o peso testicular não variou significativamente entre os grupos. Epidídimo, vesícula seminal e ducto deferente não apresentaram alteração de peso, enquanto a próstata teve seu peso reduzido nos grupos AS1 e AS2. O mesmo foi observado para fígado e rim. Houve acúmulo de arsênio em todos os órgãos analisados, sendo este maior nos animais que ficaram mais tempo expostos ao agente tóxico. A alanina aminotransferase não apresentou alterações, ao passo que a aspartato aminotransferase (AST) aumentou no grupo AS2. O aumento de AST sinaliza para a toxicidade do arsênio na função hepática e renal, motivando assim estudos histológicos e morfométricos destes órgãos posteriormente. A proporção de túnica própria se mostrou aumentada nos grupos AS1 e AS2 em relação ao CTR, sugerindo um possível mecanismo de proteção à ação do arsenato nos túbulos seminíferos, uma vez que a túnica própria faz parte da barreira hemato-testicular. Por outro lado, a proporção de epitélio seminífero foi diminuída significativamente no grupo AS1. O diâmetro tubular e o epitélio seminífero se apresentaram recuperados no grupo AS2 em relação ao grupo AS1. O arsênio causou diferentes patologias testiculares, particularmente nos túbulos seminíferos. Houve redução na proporção de células de Leydig, bem como no seu diâmetro nuclear e volume. Além disto verificou-se aumento expressivo de macrófagos nos animais expostos por mais tempo à ação do arsênio. O volume

de vasos sanguíneos apresentou queda significativa em AS2 em relação aos demais grupos. O contrário ocorreu com o grupo AS1, onde observou-se aumento neste parâmetro. Um aumento expressivo no volume de vasos linfáticos foi observado nos grupos tratados em relação ao CTR. Os volumes de células de Leydig e de tecido conjuntivo foram diminuídos nos grupos tratados, comparados ao grupo CTR. Para volume de macrófagos, observou-se um aumento em AS2, comparado a AS1 e CTR. Quanto à morfometria de células de Leydig, o diâmetro nuclear, a proporção de núcleo e citoplasma, o índice Leydigossomático e o volume nuclear foram reduzidos significativamente nos grupos tratados, em comparação com o grupo CTR. Já a relação nucleoplasmática foi reduzida apenas no grupo AS1. Desta forma, detectamos que o arsênio afetou a porção endócrina do testículo. Os níveis plasmáticos de testosterona apresentaram-se reduzidos nos dois grupos de tratamento. Este trabalho confirmou a toxicidade do arsênio na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  em dois períodos de exposição diferentes. Os dados apresentados permitem inferir que esta concentração de arsênio não interferiu na morfometria tubular, porém causou alterações na biometria testicular e corporal, além de se acumular em vários órgãos e fornecer fortes indicativos de sua toxicidade hepática e renal de camundongos em idade reprodutiva. Adicionalmente, o arsênio levou a uma desorganização do epitélio germinativo, o que certamente pode comprometer o processo espermatogênico. O arsênio também alterou os parâmetros morfométricos das células de Leydig e provocou redução nos níveis de testosterona plasmática, confirmando a toxicidade deste elemento no sistema reprodutor masculino.

**PALAVRAS-CHAVES:** Arsenato; AST; célula de Leydig; testículo; testosterona; túbulo seminífero.

## ABSTRACT

CARVALHO, Fabíola de Araújo Resende, M.Sc., Federal University of Viçosa, September, 2009. **Testicular morphology and morphometry in mice chronically exposed to arsenic.** Advisor: Sérgio Luis Pinto da Matta. Co-Advisors: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula and Juraci Alves de Oliveira.

There is an increasing concern about the potentially harmful effects of several environmental pollutants, as for instance, the inorganic arsenic, one of the main pollutants of the water worldwide. The intoxication by arsenic can be acute or chronic, and lead to a variety of pathologies and impairment of male reproductive system. This work aimed to investigate the chronic effects of the arsenic exposure on biometric and testicular parameters of adult mice. Tissue accumulation of arsenic was verified in reproductive organs, skin, liver and kidneys. Twenty-four mice were divided in three groups, which received treatment in the drinking water: 1) control, which received distilled water, 2) arsenic 1 (AS1), which received a solution of sodium arsenate at the concentration of  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$ , during 42 days; and 3) arsenic 2 (AS2), which received a solution of sodium arsenate at the concentration of  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$ , during 84 days. After sacrifice, sexual organs, liver, kidneys and skin were collected and immersed in Karnovsky fixative solution. The testes were processed and dyed in toluidina/borate of sodium blue for the histopathological analyses. The treatment with sodium arsenate at the concentration of  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  increased body weight in the AS2 group, compared to AS1 and control. However, the testicular weight did not vary significantly among the treated groups. Accessory sexual organs as epididim, seminal vesicle and deferential duct did not present changes in weight. The prostate had its weight reduced in the two treatment groups. The same happened for the kidneys and liver. There was arsenic accumulation in all of the analyzed organs and it was larger in the animals that were exposed to the poison longer. Alanina aminotransfrase did not present alterations. Aspartato aminotranferase (AST) increased in the group of animals that received arsenic longer. The increase of ALT signals the toxicity of arsenic in the hepatic and renal functions, motivating, thus future histological and morphometric studies on these organs. The proportion of the tunica propria was increased in the groups treated compared to the control, suggesting a possible protective action of the arsenate in the seminiferous tubules, once the tunica propria is part of the hemato-testicular barrier that promotes protection of the cells of espermatogenic lineage inside the seminiferous tubules. However the proportion of the seminiferous epithelium was reduced significantly in the 42-day treatment group. The tubular diameter and the seminiferous epithelium were shown to be recovered in the 84- day treatment group compared to the 42- day group. Arsenic caused different testicular pathologies, particularly in the seminiferous tubules. There was a reduction in the proportion of cells of Leydig, as well as in their nuclear diameter and volume.

Besides, there was a significantly increased number of macrophages in the animals exposed to the action of arsenic for a longer time. The blood vessel was significantly reduced in As2 in relation to As1 and control, unlike what happened in relation to As1, where there was an increase in this proportion. For the lymphatic vessel, the increase in the treated groups was significant. The volume of cells of Leydig and conjunctive tissue were reduced in the treated groups. For the macrophages volume, a significant increase was observed in As2 in relation to As1 and control. In relation to the blood vessel, the volume of As1 increased significantly in relation to the control, decreasing significantly in As2. In relation to the two treated groups, the blood vessel volume reduced in As2. However, for the volume of lymphatic vessel, a significant increase was observed in the groups treated in relation to the control group. In the morfometry of the cells of Leydig, nuclear diameter, the nucleus proportion and cytoplasm, ILS and nuclear volume were reduced significantly in the two treatment groups. However, the nucleoplasmatic relationship (NPR) was reduced significantly just in the 42-day group. This way we detected that arsenic affects the endocrine portion of the testicle. The plasmatic levels of testosterone were shown to be reduced in the two treatment groups. This work confirmed the toxicity of arsenic in the concentration of 1mg/l in two different exposure times. The data presented allow us to suggest that the treatments, in this arsenic concentration, did not interfere with the tubular morphometry. However, it caused alterations in the testicular and body biometry, besides the confirmation of its cumulative nature in several organs and strong indicators of its toxicity in the hepatic and renal functions of mice in reproductive age. The germinative epithelium in the two treatment groups was disorganized, which certainly damaged the spermatogenic process. Sodium arsenate alters the morphometric parameters of the cells of Leydig besides leading to a reduction in the levels of plasmatic testosterone confirming the toxicity of this element in the masculine reproductive system.

**KEY WORDS: Arsenate, testes, testosterone, seminiferous tubules, Leydig, AST.**

# 1. Revisão de literatura

## 1.1. Toxicologia e aspectos químicos do arsênio

Com a expansão industrial, houve a necessidade de exploração de certos metais como matéria prima em processos de refinaria e metalurgia. Com o aumento das concentrações desses metais no ambiente, em decorrência da sua exploração, aumenta a probabilidade de exposição de diferentes formas de vida a estes poluentes (Waalkes et al., 1992 a; Rana, 2007).

Algumas características são importantes no que diz respeito à toxicidade dos metais. A concentração dos metais no organismo é um fator primordial de sua ação, daí a preocupação com o acúmulo ao longo dos anos de exposição (Gunn & Gould, 1970; Waalkes et al, 1992 a,b; Rana, 2007). Existe relação entre toxicidade e a espécie ou mesmo a linhagem animal atingida, assim como com a resposta específica de cada órgão ou tecido ao metal. Existe também a relação entre a concentração local do metal ou com a forma de exposição a ele, como por exemplo, através do contato com a pele, ingestão ou inalação. Esta característica está ligada à capacidade de captação do metal pelas células em questão (Oldereid et al., 1993) e a susceptibilidade dos órgãos e tecidos afetados (Waalkes et al, 1992 a).

O arsênio (As) é um metal (metalóide) pertencente ao grupo 15 (5A) da classificação periódica dos elementos químicos. O arsênio existe na natureza numa variedade de formas químicas, não possuindo odor nem sabor, incluindo espécies orgânicas e inorgânicas (Ferguson & Anderson, 1974). Estas podem ocorrer em diversos estados de oxidação, sob a forma de óxidos de arsênio ou sais destes óxidos ( $\text{AsO}_3^{-3}$  - arsenito e  $\text{AsO}_4^{-3}$  – arsenato) (DeSesso et al., 1998).

De acordo com a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR), sediada nos Estados Unidos, o As é considerado o elemento químico mais perigoso da *Priority List of Hazardous Substances* de 2007, o que o torna merecedor de grande atenção (Rodrigues & Malafaia, 2008).

A toxicidade de diversas espécies de arsênio decresce na seguinte ordem: compostos de  $\text{As}^{3+}$  inorgânico > compostos de  $\text{As}^{5+}$  inorgânico > compostos de  $\text{As}^{3+}$  orgânico > compostos de  $\text{As}^{5+}$  orgânico (USEPA, 2000 a, b). Quanto à intensidade, o  $\text{As}^{3+}$  inorgânico é 60 vezes mais tóxico que o  $\text{As}^{5+}$  inorgânico (Mabuchi et al., 1979). As espécies inorgânicas de As são 100 vezes mais tóxicas que as espécies orgânicas (Thompson, 1993).

## 1.2. O Arsênio como contaminante ambiental

Atualmente, um dos tópicos mais relevantes na química ambiental é a qualidade da água. O Arsênio (As) inorgânico é um dos principais poluentes da água, sendo esta contaminação considerada problema de abrangência mundial (Rana, 2007).

Recentemente houve grande aumento na preocupação dos potenciais efeitos de vários contaminantes ambientais, muitos deles considerados disruptores endócrinos ou agentes de ativação hormonal. Esta preocupação se originou, em parte, de observações acerca do desenvolvimento e de alterações no sistema reprodutivo em populações que foram expostas a uma variada gama de químicos sintéticos e seus subprodutos, lançados em grande quantidade no ambiente desde a Segunda Guerra Mundial. Muitos destes contaminantes estão presentes na água de consumo sendo tóxicos para a população (Saradha & Mathur, 2006).

A contaminação acidental pelo As, existente na água potável, tem sido motivo de numerosos e elaborados estudos. Arguello et al. (1938) descreveram que, já no final do século XIX, Geyer relatava os casos ocorridos na República Checa (Reischestein, Silésia) e também o arsenicismo crônico regional endêmico na província de Córdoba, Argentina. Dos 323 casos de epitelomas estudados nos pacientes argentinos em oito anos, 39 (12,07%) ocorreram em indivíduos com evidências de intoxicação arsenical (Gontijo & Bittencourt, 2005).

Os maiores focos endêmicos estão localizados na Bengala Ocidental (Índia), região composta por seis distritos, com população de 30 milhões de habitantes (Rana, 2007). A partir de dados oriundos de uma pesquisa que avaliou apenas parte das áreas desse território, estima-se que pelo menos 800.000 pessoas beberam água contaminada por As e 175.000 delas apresentam lesões cutâneas decorrentes do arsenicismo (Das et al., 1995).

O arsênio é um resíduo da manufatura de vidros, esmaltes, tintas, tecidos e couros, tendo sido muito usado em produtos agrícolas como inseticidas, formicidas, herbicidas e preservativos de madeira. Traços deste elemento são lançados na atmosfera, tanto de fontes naturais como de atividades antrópicas. O meio industrial representa fonte de As, especialmente as fundições de chumbo, ouro, prata, cobre, zinco e cobalto (Gontijo & Bittencourt, 2005). Os principais modos de intoxicação por arsênio ocorrem via água de consumo, de vinho contaminado por pesticidas e por inalação de gás arsina em fundições de metais não ferrosos. (USEPA, 2000).

Um estudo feito nas bacias auríferas mais importantes do Quadrilátero Ferrífero, situado no estado de Minas Gerais, registrou concentrações variando de 0,4 a 350,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  em águas superficiais (Matschullat et al., 2000). Concentrações encontradas no distrito de Nova Lima foram consideravelmente altas, com valores de 47,8  $\mu\text{g L}^{-1}$  em águas superficiais. O desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação das espécies inorgânicas de arsênio ( $\text{As}^{+3}$  e  $\text{As}^{+5}$ ) permitiu a obtenção da distribuição das espécies inorgânicas do arsênio em águas superficiais e subterrâneas, com razões  $[\text{As}^{+3}] / [\text{As}^{+5}]$  entre  $1 \times 10^{-1}$  e  $4 \times 10^{-2}$  (Borba, 2002).

A solubilidade desse elemento em água é um fator chave na sua absorção e as formas solúveis de arsênio e os compostos trivalentes e pentavalentes são bem absorvidos em poucas

horas no trato gastrointestinal de animais de experimentação e em humanos (60 a 90%) (Deschamps & Matschullat, 2007).

Em 1984, a Organização Mundial da Saúde (OMS) sugeriu que as águas potáveis poderiam ter no máximo  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  de As na água. Com base em novas evidências toxicológicas, a OMS reduziu, em 1993, a concentração máxima de arsênio para  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  (OMS 2001b).

O arsênio inorgânico é rapidamente absorvido através do trato gastrointestinal e biotransformado no fígado e outros tecidos. A maioria dos mamíferos, incluindo camundongos, ratos e humanos, biotransformam o arsênio inorgânico por redução e metilação oxidativa. A redução é facilitada por redutases e pela forma reduzida da glutathione (GSH) com possíveis outros fatores como doadores de elétrons. A metilação oxidativa é feita por metiltransferases e S-adenosylmetionina serve como principal doador de elétrons (Holladay et al., 2006).

A biotransformação do arsênio inorgânico ocorre por metilação da forma arsenito para ácido metilarsônico (MMA) e ácido dimetilarsônico (DMA), principalmente no fígado. A eficiência deste mecanismo diminui com aumento da dose de arsênio. Estudos indicam que o fígado é um importante sítio de metilação do arsênio, especialmente após a ingestão, quando o arsênio passa pela circulação hepática. Porém, a atividade de metilação tem sido identificada também em outros tecidos de camundongos machos, como nos testículos, rins, fígado e pulmão (Valther, 2002). A metilação torna as formas de arsênio inorgânico menos reativas aos tecidos (consequentemente menos tóxicas), facilitando o processo de eliminação por excreção renal (Deschamps & Matschullat, 2007). A metilação é o caminho metabólico predominante para o arsênio inorgânico em humanos e a maioria dos animais de laboratório (Vahter, 1983; McKinney, 1992; Vahter, 1994). Algumas espécies como por exemplo, os chimpanzés são notáveis exceções, pois não metilam o arsênio inorgânico (Vahter, 1982; Aposhian, 1998). Há uma considerável variação no metabolismo de arsênio inorgânico nas diferentes espécies de mamíferos. Camundongos e cachorros têm uma alta eficiência de metilação para DMA, que é rapidamente excretado pela urina, havendo pouca retenção de arsênio nos tecidos. Ratos também são eficientes no processo de metilação, porém a maior parte do DMA fica retido nos eritrócitos. Independente do tipo e extensão da exposição, a média de distribuição relativa de metabólitos de arsênio na urina de vários grupos populacionais parece ser constante: 10 a 30% de arsênio inorgânico, 10 a 20% de MMA e 60 a 70% de DMA. Porém, existem diferenças entre populações, indicando polimorfismo genético na regulação de enzimas responsáveis pela metilação do arsênio.

Estudos em animais experimentais têm demonstrado que vários fatores podem influenciar a metilação do arsênio inorgânico: dose, taxa de administração, forma de ingestão do arsênio e estado nutricional. Os produtos finais de metilação são menos reativos aos tecidos e são mais rapidamente excretados do que as formas inorgânicas. Neste sentido, a metilação age como

mecanismo de desintoxicação. Estudos em camundongos e coelhos mostram que a inibição da metilação promove maior acúmulo de arsênio nos tecidos (Valther, 2002).

Outro mecanismo de biotransformação do arsênio depende das reações de oxi-redução que interconvertem arsenato em arsenito, de modo não enzimático, com o emprego de glutatona como agente redutor (Aposhian et al., 1999).

A redução de arsenato para arsenito pode ser mediada pela arsenato redutase, e ocorre principalmente no fígado. Ambos os processos de metilação e oxi-redução são responsáveis pela biotransformação e excreção renal de mais de 75% do arsênio absorvido.

Foi demonstrado que a maior parte do arsenato (AsV) entra na célula por transportadores de fosfato (Kumagai & Sumi, 2007; Villa-Bellosta et al., 2008) e é reduzido principalmente no sangue. Esta etapa pode ser considerada uma bioativação e é distribuído aos tecidos, onde é metilado a MMA e DMA (Valther, 2002).

A intoxicação por arsênio pode resultar em efeitos agudos ou crônicos, relativos à exposição curta ou longa, respectivamente, ocasionando diferentes patologias. Os mecanismos tóxicos básicos pelos quais o arsênio produz efeitos nocivos estão relacionados com alguns mecanismos conhecidos, como por exemplo: inibição da respiração celular em mitocôndrias, inibindo a atividade de mais de 20 enzimas, em sua maioria envolvidas neste processo, além do reparo e síntese de DNA; interferência no metabolismo de porfirinas e na homeostase do heme; aumento da expressão das principais proteínas de estresse, principalmente por estímulo celular à produção de espécies reativas de oxigênio (Deschamps & Matschullat, 2007); além de provocar disfunções imunológicas (Rodrigues & Malafaia, 2008).

A maioria dos estudos que visam elucidar as especificidades da avaliação dos riscos e os efeitos da exposição ao As no sistema imunológico derivam de pesquisas onde modelos animais são utilizados. No estudo de Patterson et al. (2004) envolvendo a exposição de camundongos da linhagem BALB/c ao As, os autores verificaram que o elemento não só suprimiu a produção de anticorpos das classes IgM e IgG, como inibiu a apresentação antigênica, diminuiu a proliferação e atividade dos macrófagos, reduziu o número dos linfócitos TCD4+, e ainda suprimiu a resposta de hipersensibilidade tardia nos animais estudados. Estes dados podem explicar a maior susceptibilidade dos animais expostos ao As às infecções virais e bacterianas, constatada no estudo recente de Akshata et al. (2007).

O arsênio pode induzir a produção de metalotioneína, uma proteína que se liga a este metal, e também ao cádmio, mercúrio e a muitos metais essenciais. Supõe-se que este é um mecanismo de adaptação que leva a tolerância à toxicidade do arsênio (Aposhian et al., 1999). O arsênio afeta cascatas de sinalização intracelular através da ativação ou inativação de fatores transcricionais que controlam a expressão de genes. Alguns dos produtos destes genes

superregulados pela exposição ao arsênio, atuam como proteínas antioxidantes e enzimas metabolizantes de xenobióticos. Na verdade, este fenômeno contribui para uma resposta adaptativa das células ao arsênio (Kumagai & Sumi, 2007).

As manifestações clínicas de exposição ao arsênio dependem basicamente da espécie química de arsênio envolvida, além da dose e duração de exposição. Uma longa exposição a compostos inorgânicos de arsênio, através da água de consumo, pode conduzir a manifestações sistêmicas em vários órgãos tais como: pele (hiperqueratose, hiperpigmentação), coração (doenças cardiovasculares), sistema nervoso central ou periférico e vascular periférico (confusão mental e dores de cabeça, podendo levar até a encefalopatia grave e coma) e câncer (Winsky & Carter, 1998).

Com relação à natureza carcinogênica do As, estudos recentes de Lee et al. (2005) desenvolvido na Coreia, demonstraram que em população exposta a solos e águas contaminadas por As, o risco de câncer aumentou em mais de 10 vezes, quando comparado a população não exposta ao elemento. Andrés (2005) propõe que os mecanismos que explicariam o surgimento de neoplasias em populações expostas ao As estariam relacionados justamente às disfunções imunes observadas nos modelos animais expostos ao elemento. De acordo com Abbas et al. (2008) defeitos nas respostas imunes podem ser responsáveis por falhas na prevenção do crescimento tumoral. Os autores alertam para o fato de que há inúmeras razões para a imunidade antitumoral não conseguir erradicar as células transformadas e destacam que a exposição crônica ao As pode ser uma delas.

Segundo Morton & Dunnette (1994) pode ocorrer perda auditiva em exposições crônicas, principalmente em crianças. Isto ocorreu no Japão em 1955, após consumo por longo prazo de leite em pó contaminado, e na então Checoslováquia, em 1977, quando pessoas residentes de uma área próxima a uma fundição foram expostas ao As.

No fígado, a hepatotoxicidade crônica tem sido extensivamente diagnosticada em populações expostas ao arsênio. Segundo os estudos revistos por Sakuma (2004), a toxicidade hepática manifesta-se principalmente como cirrose, hipertensão portal sem cirrose, degeneração gordurosa e neoplasia primária do fígado.

São diversas as potenciais causas de infertilidade masculina, fazendo com que fatores ambientais assumam particular relevância nos dias de hoje. As alterações causadas pelos agentes ambientais podem incluir toxicidade reprodutiva, com alterações da fertilidade e toxicidade no desenvolvimento do organismo, provocado pela agressão em fases diversas, desde a exposição anterior à concepção, durante o desenvolvimento pré-natal até a fase de maturação sexual. Este tipo de toxicidade não está tão bem documentado e é mais difícil de se comprovar, mas pode levar a abortos prematuros, maior incidência de anomalias genéticas e aumento das doenças malignas na

infância (Orejuela & Lipshultz, 1998). A função testicular, incluindo a secreção de andrógenos e a produção de espermatozoides férteis, pode ser afetada adversamente por mecanismos diversos como por exemplo, a toxicidade pré-testicular, que engloba perturbações na secreção fisiológica dos hormônios hipofisários FSH e LH, com a resultante falência testicular (Orejuela & Lipshultz, 1998). A exposição ocupacional aos esteróides sexuais, como estrogênios pode inibir a secreção de gonadotrofinas hipofisárias, com a consequente disfunção sexual, ginecomastia e hipogonadismo hipogonadotrófico. Há referências destes efeitos lesivos em trabalhadores da indústria de contraceptivos orais ou lidando com grandes quantidades de químicos estrogênicos não esteróides (Harrington et al.,1978; Finkelstein et al.,1988). A toxicidade testicular direta pode afetar os vários tipos celulares, incluindo as células de Leydig, células de Sertoli e as células germinativas. Há uma sensibilidade elevada das células germinativas às radiações ionizantes e aos agentes alquilantes. As células mais sensíveis são as espermatogônias, as únicas que se desenvolvem na base do epitélio seminífero, fora da barreira protetora hemato-testicular (Parada et al., 2004). A toxicidade pós-testicular é relativamente incomum. A maioria dos casos foi descoberta durante a investigação de novos contraceptivos químicos masculinos (Cooper et al., 1999). A secreção de fluido pelo epitélio epididimário e o transporte epididimário de espermatozoides são potenciais alvos adicionais de agentes tóxicos, podendo daí resultar uma perda completa de motilidade dos espermatozoides e consequente esterilidade (Wilton et al.,1988).

Com relação ao efeito do arsênio no sistema reprodutor masculino, tem sido reportada a inibição da androgênese testicular, a redução dos pesos dos testículos e dos órgãos sexuais acessórios e a diminuição da contagem e motilidade espermática em animais experimentais (Srivastava & Murthy, 2001). De acordo com Ferm et al. (1977), o arsenato de sódio induz malformação no desenvolvimento embrionário em animais experimentais. De acordo com estes autores, a administração de  $20,0 \text{ mg kg}^{-1}$  de arsenato de sódio intravenoso em embriões de hamster, durante 8 a 9 dias de gestação, provocaram malformações congênitas neste animal, incluindo defeitos no esqueleto e malformação no sistema urogenital. Grupos de ratos Wistar expostos a diferentes metais (cádmio, chumbo e arsênio) apresentaram danos no DNA de espermátócitos primários maiores do que os observados nos grupos controles. Lesões no DNA de células germinativas levam a alterações na fertilidade e anormalidades reprodutivas, tais como aborto espontâneo, doenças genéticas e aumento da incidência de câncer (Nava-Hernández et al, 2009). Adicionalmente, acúmulo significantes de arsênio nos testículos, epidídimo, vesícula seminal e próstata foram observados em animais tratados (Srivastava & Murthy, 2004).

### 1.3. Organização morfofuncional do testículo

O testículo é um órgão produtor de espermatozóides e andrógenos, e que mantém as funções reprodutivas e as características sexuais secundárias masculinas da espécie. As células germinativas dão origem aos espermatozóides, no processo espermatogênico, enquanto as células somáticas fornecem o suporte para ambas as funções (Russell & França, 1995). Este órgão é envolvido pela albugínea testicular, uma espessa cápsula de tecido conjuntivo denso, a qual emite septos fibrosos para o interior do testículo, formando uma região adensada, o mediastino, onde se localiza a *rete testis*. Esta região é bastante rica em vasos e tecido conjuntivo. Nos mamíferos, o testículo é dividido em dois compartimentos principais: o intertubular ou intersticial, também chamado de espaço intertubular, e o compartimento de túbulos seminíferos (Russell et al., 1990). Os túbulos constituem a maior parte do testículo, ocupando, na maioria dos mamíferos, de 70 a 90% do parênquima testicular (França & Russell, 1998; Godinho, 1999). Eles formam alças bastante contorcidas, as quais possuem suas duas extremidades conectadas à *rete testis*. A partir desta região, a *rete testis* encontra-se conectada ao epidídimo através dos ductos eferentes.

Os túbulos seminíferos são desprovidos de vascularização ou inervação e são constituídos por túnica própria, epitélio seminífero e lume. A túnica própria reveste o túbulo externamente, sendo composta por células mióides e elementos acelulares, como fibras colágenas e a membrana basal. As células mióides são contráteis, sendo responsáveis pela movimentação de fluidos e propulsão dos espermatozóides através do lume dos túbulos. No epitélio seminífero são encontrados dois tipos celulares de origens embriológicas distintas: as células germinativas, originárias do epiblasto, e as células de Sertoli, provenientes do epitélio celomático (Russell et al., 1990).

### 1.4. Espermatogênese

A organização geral da espermatogênese é basicamente a mesma em todos os mamíferos. A espermatogênese é um processo sincrônico, no qual uma espermatogônia (célula diplóide) se divide várias vezes e se diferencia gradativamente em uma célula haplóide altamente especializada, o espermatozóide. Esse processo pode ser dividido em três fases, de acordo com as diferentes características funcionais: (1) fase proliferativa (espermatogonial), na qual as espermatogônias sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas; (2) fase meiótica (espermatócitos), na qual o material genético é recombinado e segregado, ocorrendo duas divisões, uma reducional e outra equacional; (3) fase de diferenciação ou espermiogênica, onde cada espermátide arredondada (célula haplóide) passa por mudanças estruturais e bioquímicas e

diferencia-se em espermatozóide, um tipo celular estruturalmente especializado para alcançar e fertilizar o ovócito (Russell et al, 1990; Sharpe, 1994; Kerr et al., 2006).

O epitélio seminífero compõe-se de três camadas de gerações distintas de células germinativas, sustentadas morfofisiologicamente por um tipo de célula somática denominada célula de Sertoli. Na camada basal do epitélio seminífero observam-se as espermatogônias e células em pré-leptóteno; na camada intermediária encontram-se as gerações de espermatócitos em leptóteno e na camada adluminal localizam-se os espermatócitos primários em meiose I, os espermatócitos secundários e as espermátides (Russell et al., 1990). As espermatogônias podem ser classificadas em duas categorias básicas: indiferenciadas e diferenciadas. As espermatogônias isoladas ( $A_{is}$ ), pareadas ( $A_{pr}$ ) e alinhadas ( $A_{al}$ ) pertencem à primeira categoria. As espermatogônias do tipo A, espermatogônia intermediária (In) e espermatogônia do tipo B pertencem à segunda categoria e estão comprometidas com a formação de espermatozóides (De Rooij, 1998). As espermatogônias podem ser identificadas com base na morfologia, dinâmica e volume do núcleo, número de nucléolos por núcleo, posição topográfica em relação a outras células e a lâmina basal, e a disposição dos cromossomos durante a divisão (Clermont & Antar, 1973; Kerr et al., 2006). A espermatogênese inicia-se com a célula germinativa primitiva, a espermatogônia A, que é a célula fonte, localizada junto à membrana basal. As espermatogônias se dividem por mitose e as células neoformadas podem continuar a dividir e originar novas espermatogônias ou cessar a divisão e crescer, originando os espermatócitos, células que entram em meiose (Kierszenbaum, 2008; Junqueira & Carneiro, 2008). A meiose compreende duas divisões: as células da primeira divisão são chamadas de espermatócitos primários (I) e as da segunda, espermatócitos secundários (II). Os espermatócitos I são as maiores células da linhagem espermatogênica e caracterizam-se pela presença de cromossomos em diferentes fases de condensação. Os espermatócitos II ficam mais próximos da luz dos túbulos seminíferos sendo difícil observá-los em cortes histológicos, pois entram logo na segunda divisão meiótica. Desta divisão resultam as espermátides, células que são caracterizadas pelo pequeno tamanho, núcleos com zona de cromatina condensada e por sua localização próxima à luz dos túbulos seminíferos (Junqueira & Carneiro, 2008; Kierszenbaum, 2008). Estas células possuem a forma inicialmente arredondada (Clermont, 1972; Russell et al., 1990; Kerr et al., 2006). Depois que as espermátides arredondadas são formadas, uma série de mudanças morfológicas, histoquímicas e bioquímicas vão ocorrer em seu núcleo e componentes do citoplasma (Guraya, 1987). Esta fase de mudanças é denominada espermiogênese, e vai culminar com a formação de células haplóides altamente diferenciadas e especializadas que são os espermatozóides (Menezes, 2006). Em seguida, ocorre a espermição, quando os espermatozóides formados são liberados para o lume dos túbulos seminíferos.

Durante o processo espermatogênico, as células de Sertoli e as células germinativas interagem de maneira bastante complexa, tanto física quanto bioquimicamente. Existem diversas formas de junções intercelulares entre estes dois tipos de células, incluindo-se os desmossomos, as junções do tipo “gap”, as junções à base de actina, conhecidas como especializações ectoplasmáticas e os complexos túbulo-bulbares. Apesar de serem postuladas várias funções para estes componentes juncionais, existem ainda poucas evidências experimentais para apoiar o papel preciso dos mesmos (Skinner & Griswold, 2004). No entanto, fica bastante evidente a necessidade da interação das células germinativas com os componentes somáticos do testículo, principalmente células de Sertoli, células de Leydig e células mióides, para que o processo espermatogênico transcorra de maneira normal e eficiente (França & Russell, 1998; Skinner, 2004).

### **1.5. Células de Sertoli**

A célula de Sertoli, descrita originalmente por Enrico Sertoli na Itália (1865), é uma célula somática residente entre as células germinativas no túbulo seminífero (Russell et al, 1990; Hess & França, 2004). Estas células possuem extensões citoplasmáticas que contornam os espermatócitos e espermatídes e apresentam estreita interação com as células germinativas durante todo o seu desenvolvimento (Russell & Griswold, 1993; Stanbenfeld & Edqvist, 1996). O citoesqueleto é responsável por manter a forma celular e os movimentos ativos no citoplasma, essencial à acomodação dos constantes movimentos das células germinativas (Dadoune & Demoulin, 1993; Russell & Griswold, 1993). Durante o desenvolvimento testicular, as células de Sertoli multiplicam-se por mitose, porém após a puberdade não sofrem mais divisões, mantendo sua população estável (Courot et al., 1970; Russell & Griswold, 1993). O seu número total por testículo, estabelecido durante o desenvolvimento testicular, está relacionado com o tamanho do testículo e com a produção espermática do animal (Russell & Griswold, 1993; Sharpe, 1994).

As células de Sertoli desempenham papel fundamental na regulação da espermatogênese (Russell & Griswold, 1993; Hess & França, 2004), já que intermedeiam a ação da testosterona e do FSH nos testículos, sendo responsáveis pelo início, manutenção e regulação deste processo (Sharpe, 1994). Apresentam capacidade relativamente fixa de suporte das células germinativas de maneira espécie-específica; além de outras funções que incluem a compartimentalização do túbulo seminífero, pelas junções oclusivas entre as células de Sertoli, propiciando um ambiente isolado do sistema imunitário e especializado para as células germinativas em desenvolvimento; o sustento e suporte nutricional especiais das células germinativas em diferenciação, a translocação destas células em direção ao lúmen tubular; a secreção de fluidos e proteínas e a eliminação

fagocítica de células germinativas em degeneração e do citoplasma excedente resultante da espermiogênese (Russell et al., 1990).

A atividade secretória da célula de Sertoli é controlada pelo FSH. Os receptores de membrana para FSH e os receptores nucleares e citoplasmáticos para andrógenos estão presentes nessas células. Nas células de Sertoli, é realizada a conversão de testosterona em diidrotestosterona, andrógeno de maior potência biológica, que se desloca para o ambiente adluminal, onde sofre ação da proteína ligadora de andrógenos (ABP), produzida pelas células de Sertoli. A ABP se une aos andrógenos dentro desse ambiente, parecendo ser uma proteína que estabiliza a concentração de androgênios nos túbulos seminíferos para utilização na espermatogênese, atuando também na função das células de Sertoli. A célula de Sertoli também converte a testosterona produzida pelas células de Leydig em estrogênios. Esses estrogênios passam para o ambiente adluminal e o basal dos túbulos seminíferos e a partir deste último para o sistema vascular sanguíneo (Stabenfeldt & Edqvist, 1996).

Juntamente com as células mióides, as células de Sertoli elaboram a membrana basal que serve de suporte estrutural para as próprias células de Sertoli e para as células germinativas que se encontram na porção basal do epitélio seminífero. Através de junções de oclusão, dividem o epitélio seminífero em dois ambientes: o ambiente basal, onde se localizam as espermatogônias e os espermatócitos primários na fase inicial da prófase meiótica (pré-leptóteno), e o ambiente adluminal, no qual se encontram os espermatócitos primários a partir da fase de zigóteno, espermatócitos secundários e espermátides, arredondadas e alongadas. Desta forma, o ambiente adluminal está totalmente sob o controle das células de Sertoli, propiciando microambiente isolado do sistema imunitário, essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (Russell et al., 1990; Setchell, 1991; Poccia, 1994; Sharpe, 1994). Um terceiro ambiente é criado transitoriamente quando ocorre a translocação do espermatócito em preleptóteno, do ambiente basal para o adluminal. A célula geralmente encontrada nesse local transitório é o espermatócito primário na fase de leptóteno (Russell et al., 1990). Além das funções já citadas das células de Sertoli, ela também é responsável pela manutenção da integridade do epitélio seminífero, pela secreção de fluido para formar o lume, também participa do processo de espermiação, realiza fagocitose, permite a movimentação de células no epitélio, secreta proteínas e regula o ciclo espermatogênico através das junções com as demais células.

No espaço intertubular estão as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, e uma população celular variável constituída principalmente de fibroblastos, macrófagos e mastócitos (Russell et al., 1990; Setchell, 1991). Em geral, os roedores apresentam um padrão de intertúbulo em que as células de Leydig e o tecido conjuntivo ocupam sua maior parte, contrastando assim com o espaço linfático (Fawcett et al., 1973; Setchell & Breed, 2006).

O processo espermatogênico é controlado por duas principais regulações: endócrina (LH e FSH da glândula pituitária) e comunicações intercelulares locais, através de efetores parácrinos tais como testosterona, fatores de crescimento e citocinas ou por contato direto entre células adjacentes (Fiorini et al., 2004; Hess & França, 2004).

### **1.6. Células de Leydig**

Distribuídas no tecido conjuntivo frouxo no espaço intertubular do parênquima testicular, encontram-se as células produtoras de esteróides denominadas células de Leydig. São relativamente grandes, poliédricas e limitadas por uma membrana plasmática que contém microvilos. Seu núcleo está localizado excentricamente no citoplasma, apresenta um a três nucléolos e usualmente tem forma arredondada ou oval. Grânulos de heterocromatina formam uma camada intimamente associada ao envoltório nuclear, sendo uma característica universal destas células (Setchell, 1991).

As células de Leydig surgem nos testículos durante o período embrionário. No início do desenvolvimento, a proliferação das células de Leydig e sua produção de hormônios esteróides é regulada pela célula de Sertoli e por macrófagos (Cooke, 1996). Sugere-se que os macrófagos testiculares remova radicais livres produzidos pelas enzimas esteroidogênicas nas células de Leydig, além de secretarem citocinas, tais como interleucina 1 e Fator de crescimento alfa ( $TGF\alpha$ ), que podem estimular os progenitores destas células (Pelliniemi, 1996).

Duas populações distintas de células de Leydig são responsáveis pelos períodos de esteroidogênese testicular: durante o período fetal-neonatal (células do tipo fetal) e no adulto (células do tipo adulto), que diferem em sua morfologia, produção hormonal, regulação parácrina e funções fisiológicas (Colleta & Carvalho, 2005). Segundo estes autores, a produção ativa de testosterona inicia-se cedo e é essencial para a diferenciação masculina normal.

Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies quanto à proporção volumétrica (%) dos diferentes componentes do compartimento intertubular de maneira geral, a célula de Leydig é o tipo celular mais abundante neste compartimento (Setchell & Breed, 2004).

As células de Leydig se encontram em contato íntimo com o sistema de capilares e são responsáveis pela síntese e armazenamento de testosterona, importante para promover o comportamento sexual normal (libido) e a ocorrência do processo espermatogênico, juntamente com os hormônios foliculo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), além de manter a função das glândulas acessórias (Dellmann & Wrobel, 1982; Russell, 1996).

A produção de testosterona pelas células de Leydig é controlada pelo LH que se une especificamente às membranas das células de Leydig e ativa a adenosina-monofosfato cíclica (cAMP). Este processo dá início à ativação das proteínas cinases que catalisam a fosforilação das

proteínas intracelulares e a mobilização de precursores dos esteróides, principalmente através da conversão do colesterol para pregnenolona. O LH também tem efeito trófico sobre as células de Leydig, estimulando-as a se hipertrofiar. A remoção do LH cessa a produção de testosterona e leva a uma grande redução no tamanho das células de Leydig (Stanbenfeld & Edqvist, 1996).

A testosterona produzida pelas células de Leydig tem uma ação parácrina ao se difundir para os túbulos seminíferos, atravessando facilmente a barreira-hematotesticular (Stanbenfeld & Edqvist, 1996; Goodman, 2000). Altas concentrações são necessárias para a espermatogênese e especialmente para o processo de meiose. A ação dos andrógenos na espermatogênese acontece via células de Sertoli, já que as células germinativas não possuem receptores para andrógenos (Lyu & Handelsman, 2003). Particularmente, a diidrotestosterona é responsável pela manutenção funcional das glândulas sexuais acessórias e do epidídimo (Luke e Coffey, 1994; Fan e Robaire, 1998; Goyal et al., 1999).

Durante o desenvolvimento testicular, mais precisamente na puberdade e durante a recrudescência testicular em animais sazonais, a célula de Sertoli deixa de ser modulada unicamente pelo hormônio folículo estimulante (FSH), que gradativamente, é substituído pela testosterona. Assim, como preparação para esta substituição, as células de Leydig devem ser adequadas numérica e fisiologicamente para dar suporte ao novo requerimento de testosterona, sendo que o FSH parece influenciar diretamente no desenvolvimento desta população (Sharpe, 1994).

Inúmeros fatores podem influenciar na quantidade de células de Leydig por animal. Destacam-se a quantidade de LH disponível, o número de receptores de LH por células, a quantidade de testosterona que a célula de Leydig é capaz de secretar por unidade de tempo, a velocidade pela qual a testosterona deixa o testículo via vasos linfáticos, vasos sanguíneos e fluidos seminais, e a taxa de metabolismo da testosterona (Russell et al., 1994; Russell, 1996).

### **1.7- Biomarcadores séricos de hepatotoxicidade e testosterona sérica**

Atributos ideais para biomarcadores de danos hepáticos incluem órgão-especificidade para fígado, forte correlação com mudanças histomorfológicas hepáticas bem definidas ou informações adicionais para os valores de alanina-aminotransferase (ALT) e /ou aspartato-aminotransferase (AST), adaptações para ensaios de “screening” para modalidades que são comercialmente disponíveis, acessibilidade de amostras por processos uni-invasivos tais como coleta de sangue e no conceito de translação clínica, aplicações entre espécies pré-clínicas chaves para humanos, incluindo ratos, cachorros e macacos. Recomendações para seleção de marcadores de hepatotoxicidade apropriados para “screening” pré-clínico têm sido previamente discutidos (Boone

et al.,2005; Ramaiah, 2007). Ensaios pré-clínicos incluem atualmente algumas combinações das atividades de AST e ALT séricas, atividade alcalina fosfatases (ALP), bilirrubina total, atividade gamma-glutamil transferase (GG T) e atividades de ácidos biliares e/ou dehidrogenases sorbitol (SDH). Entre estes ensaios, alguns são mais específicos e/ou sensíveis que outros para a toxicidade do fígado. Por exemplo, a atividade sérica de AST é associada com toxicidade do fígado, mas também pode estar elevada em associação com injúria de músculo esquelético ou cardíaco (Burhop et al.,2004; Nathwani et al., 2005). A atividade sérica de ALT é também associada com necrose muscular e exerce um papel importante no metabolismo de aminoácidos e na gliconeogênese. As enzimas ALT e AST catalisam a transferência reducional de um grupamento amino originado da alanina ou aspartato, respectivamente, para alfa-cetoglutarato para formar glutamato e piruvato ou oxaloacetato, respectivamente. Hepatócitos danificados liberam seus conteúdos incluindo ALT e AST no espaço extracelular. As enzimas liberadas entram na circulação e aumentam as concentrações séricas de ALT e AST comparados com os controles. A aspartato transaminase está localizado no coração, cérebro, músculo esquelético e tecido hepático. A alanina transaminase é primariamente localizado no fígado, com atividade enzimática baixa encontrada no músculo esquelético e tecido cardíaco. Aumento nas concentrações séricas enzimáticas de AST e ALT podem também ser originado de injúrias extra-hepáticas, particularmente do músculo esquelético (Ozer et al., 2008).

A atividade sérica da AST é considerada um biomarcador menos específico para a função hepática comparada com a atividade ALT. AST é liberado oriundo de danos em miócitos tão bem quanto em hepatócitos. A razão entre AST sérico para ALT pode ser usada para diferenciar danos no fígado de danos em outros órgãos. Níveis de ALT são maiores que níveis de AST em certos tipos de doença crônica de fígado tais como hepatite. Necrose muscular induz um pico agudo na concentração de AST que tipicamente normalizam dentro de alguns dias. Pacientes humanos induzidos por exercícios extremos, mas com nenhuma doença hepática conhecida mostram atividade sérica AST /ALT de 3:1, que foram reduzidas para 1:1 após muitos dias. Na ausência de outras informações destas mudanças na taxa AST/ALT poderiam ser interpretados como evidência de um evento hepatotóxico (Nathwani et al., 2005). Injúrias de músculo esquelético pode frequentemente ser verificado por elevada cinase creatinina sérica, dehidrogenase lactato e/ou atividade aldolase, porém estes marcadores ainda não podem ser mensurados (Ozer et al.,2008).

A testosterona, em particular, conhecida como principal andrógeno circulante, juntamente com a testosterona intratesticular (TIT) são responsáveis pela manutenção da espermatogênese normal e dos órgãos sexuais masculinos e do aparecimento dos caracteres sexuais secundários masculinos (Ros et al., 2009). Como a testosterona intratesticular é raramente mensurada, um estudo comparando a concentrações séricas e intratesticulares de testosterona em homens que

recebiam contraceptivo hormonal verificou que níveis de TIT comparáveis com a testosterona sérica foram insuficientes para manter a espermatogênese normal. A bioatividade androgênica intratesticular foi maior que a TIT durante o tratamento, sugerindo que outros andrógenos podem prevalecer em ambientes com baixos níveis de TIT (Coviello et al., 2004).

## **1.8 Histopatologia Testicular**

Evidências histopatológicas podem revelar distúrbios no tecido testicular, particularmente no epitélio seminífero e podem ser usadas como base da ação regulatória. As pesquisas para avaliação histopatológica nos testes toxicológicos estão mudando para permitir uma detecção mais acurada e sensível dos efeitos adversos (Russel et al., 1990).

Ultimamente, as razões para se testar componentes químicos, incluindo fármacos, são para se determinar se eles são capazes de causar efeitos que influenciam a saúde animal, e se o fazem, permitir a estimativa dos níveis de exposição que podem ser considerados seguros ou suficientemente benéficos. Distinções são frequentemente feitas nos níveis regulatórios entre químicos ambientais, aditivos alimentares, fármacos e cosméticos. Exposições a químicos ambientais podem ser considerados separadamente como exposições dentro ou fora do local de trabalho (Russel et al., 1990).

Proteção contra efeitos adversos ou determinação dos níveis de dose ou níveis que produzem benefícios que excedem os riscos são usualmente usadas para exposições humanas potenciais a um agente.

Para uma avaliação abrangente do sistema reprodutor masculino, é importante se determinar a produção e a qualidade espermática tão bem quanto a habilidade de acasalamento e fertilidade. Associados à adequada avaliação histopatológica do testículo e do epidídimo, pontos-chaves da avaliação não-histopatológica (peso testicular e da cauda epididimária, contagem espermática, avaliações de motilidade e morfologia da cauda epididimária, número de espermatozoides na cauda epididimária) podem fornecer um padrão razoável da habilidade do animal de produzir sêmen normal. Alguns pontos-chaves para o exame histopatológico do epitélio seminífero são: presença de células germinativas degeneradas, desprendidas e/ou infiltradas, ausência de lúmen tubular, ausência de espermátides alongadas, tipos celulares avançados predominantes, altura do epitélio germinativo, diâmetro tubular, formação de agregados celulares (Russel et al., 1990).

## 2. Objetivos

Neste trabalho, objetivou-se analisar os efeitos crônicos do arsenato sobre os testículos de camundongos *Swiss* adultos, tratados durante 42 e 84 dias, avaliando, qualitativa e quantitativamente, através de análises histométricas, possíveis alterações no processo espermatogênico, bem como nas estruturas testiculares quanto a (ao):

- Índices gonadossomático (IGS), tubulossomático (ITS) e Leydigossomático (ILS);
- Proporção volumétrica e volume de túbulos seminíferos, tecido intertubular e seus componentes;
- Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero;
- Comprimento total dos túbulos seminíferos (CTT) e comprimento por grama de testículo (CT/g);
- Número total de células de Leydig por testículo e por grama de testículo;
- Volume nuclear, citoplasmático e celular de Leydig;
- Teores de arsênio;
- Determinação de enzimas séricas.

## 3. Material e métodos

### 3.1. Animais, grupos experimentais e tratamentos

Foram utilizados 24 camundongos *Swiss* em idade reprodutiva, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Este trabalho foi submetido ao comitê de ética da Universidade de Brasília (protocolo: 95790/2009). Os animais foram divididos em quatro grupos, pesados e colocados em gaiolas individuais. Os grupos de tratamento receberam uma solução de arsênio oralmente na água de beber na forma de arsenato de sódio na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ . O primeiro grupo As1 (n=8) foi eutanasiado após 42 dias e o segundo grupo As2 (n=8) após 84 dias. Os grupos controles receberam água destilada, sendo C1 (n=4) eutanasiado após 42 dias e C2 (n=4) após 84 dias. A avaliação correspondeu a 2 ciclos espermatogênicos completos.

Todo o regime líquido foi fornecido *ad libitum* assim como a alimentação sólida (ração). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura de  $24^{\circ}\text{C}$  e luminosidade de 12 horas, em gaiolas individuais.

### 3.2. Preparo da solução de arsenato de sódio

A solução foi preparada utilizando o arsenato de sódio heptahidratado ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ). Foi pesado 0,0416g deste sal e diluído em 10,0 ml de água destilada obtendo assim uma solução padrão. A partir desta, foi retirado 1,0 ml e completado o volume para 1,0 L obtendo, portanto a solução cuja concentração administrada nos tratamentos é de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de As.

### 3.3. Coleta de Amostras

Aos 42 e 84 dias, os animais foram contidos, anestesiados com mistura de cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina e pesados, para então serem retirados os testículos e órgãos acessórios, que foram pesados em balança digital e medidos. Todos os órgãos coletados foram imersos em solução de Karnovsky por 24 horas, sob refrigeração.

Fragmentos de um dos testículos, destinados ao estudo em microscopia de luz, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin® - Leica), seccionados na espessura de  $3 \mu\text{m}$  e corados com azul de toluidina - borato de sódio 1%. Imagens do parênquima testicular foram obtidas em microscópio Olympus AX-70 e analisadas utilizando-se o programa Image-Pro Plus 4 (Media Cybernetics).

O sangue, coletado através de punção cardíaca, foi centrifugado em 4.319 g. O soro foi separado e armazenado em freezer  $-80^\circ\text{C}$  para posterior análise das transferases e para dosagem de testosterona.

Foram destinados às análises do teor de arsênio os seguintes órgãos e tecidos: testículo, epidídimo, vesícula seminal, osso, fígado e rim.

### 3.4. Biometria corporal e testicular

Para determinar o peso do parênquima, que se refere à massa testicular sem a albugínea, a mesma foi retirada e estimada. Baseado nos pesos corporais e testiculares foi calculado o índice gonadossomático (IGS) a partir da fórmula  $\text{IGS} = \text{PG}/\text{PC} \times 100$ , onde PG = peso total das gônadas e PC = peso corporal. O IGS representa a proporção (%) do peso corporal alocado em testículo.

Como a densidade do testículo de mamíferos é em torno de 1 (Johnson & Neaves, 1981; França, 1991; Paula, 1999; Tae et al., 2005), a massa do testículo foi considerada igual ao seu volume.

### 3.5. Proporções volumétricas (%) e volume dos componentes do testículo

As proporções volumétricas de túbulo (túnica própria, lúmen e epitélio) e intertúbulo foram estimadas a partir da contagem de 2.660 pontos projetados sobre imagens capturadas

utilizando objetiva de 10X, totalizando 10 campos aleatórios nos cortes histológicos do testículo de cada animal.

Baseado nos volumes de túbulos seminíferos e nos pesos corporais, foi calculado o índice tubulossomático (ITS) a partir da fórmula  $ITS = VT/PC \times 100$ , onde VT = volume de túbulo seminífero e PC = peso corporal.

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

Foi obtido o diâmetro tubular médio por animal a partir da mensuração, ao acaso, de 30 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular, foi mensurada a altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada da túnica própria até o limite do lume tubular.

### *3.7. Comprimento total dos túbulos seminíferos*

O comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo (m) foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos mesmos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal, empregando-se a fórmula (Attal & Courot, 1963; Dorst & Sajonski, 1974):  $CT = VTS/\pi R^2$ , onde VTS = volume total de túbulos seminíferos;  $\pi R^2$  = área da secção transversal dos túbulos seminíferos, R = diâmetro tubular/2. O comprimento total por grama de testículo é calculado empregando-se a fórmula:  $CT/g = \text{comprimento total de túbulos (m)} / \text{peso bruto dos testículos}$ .

### *3.8. Proporção Volumétrica, relação nucleoplasmática e volumes dos componentes intertubulares do parênquima testicular*

Para se obter as proporções volumétricas (%) dos componentes intertubulares, foram contados 1.000 pontos projetados sobre imagens capturadas da região do intertúbulo, nos diferentes cortes histológicos do testículo de cada animal. Os elementos quantificados foram: tecido conjuntivo, macrófago, vaso sanguíneo, espaço linfático e célula de Leydig. O percentual de células de Leydig foi obtido pela soma de pontos registrados sobre o núcleo e o citoplasma. O cálculo do percentual ocupado pelos elementos no intertúbulo foi obtido multiplicando-se o número de pontos contados por 100 e dividindo-se o valor resultante por 1000.

Para calcular a relação nucleoplasmática (%) das células de Leydig, dividiu-se o percentual ocupado pelo núcleo pelo percentual ocupado por citoplasma.

O volume (mL) dos elementos intertubulares foi calculado a partir da porcentagem do elemento no testículo multiplicado pelo peso do parênquima de um testículo.

### 3.9. Morfometria das células de Leydig

Trinta núcleos de células de Leydig foram mensurados em cada animal, escolhendo-se os que apresentavam contorno esférico, cromatina perinuclear e nucléolos evidentes.

Para se calcular os volumes ( $\mu\text{m}^3$ ) nuclear, citoplasmático e de cada célula de Leydig por animal, foram utilizadas seguintes fórmulas:

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

Volume citoplasmático = % citoplasma x volume nuclear / % núcleo

Volume celular = volume nuclear + volume citoplasmático

Os números de células de Leydig por testículo e por grama de testículo foram calculados de acordo com as fórmulas abaixo:

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

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

Onde:

Volume que a célula de Leydig ocupa por testículo = proporção da célula de Leydig no testículo X peso do parênquima de um testículo / 100

Volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo = volume que a célula de Leydig ocupa por testículo / peso bruto de um testículo

O índice Leydigossomático (ILS) foi calculado através da seguinte fórmula:

ILS = volume que a célula de Leydig ocupa nos testículos / PC x 100, onde PC=peso corporal

### 3.10. Alterações Histopatológicas

Análises histopatológicas qualitativas foram realizadas observando-se de alterações teciduais tubulares e intertubulares, nas mesmas preparações utilizadas para a morfometria de túbulo e intertúbulo. As imagens analisadas foram obtidas em microscópio Olympus AX-70. Foram analisadas três lâminas por animal com doze cortes semi-seriados por lâmina.

### 3.11. Determinação dos níveis plasmáticos de testosterona e transaminases (ALT e AST)

A dosagem de testosterona foi feita através da técnica de ELISA e a de transaminases foi feita por kits colorimétricos, utilizando-se processador bioquímico multiparamétrico.

### *3.12. Espectrofotometria de Emissão de plasma*

As estruturas analisadas (testículo, epidídimo, vesícula seminal, osso, fígado e rim) foram secas em estufa e submetidas à mineralização úmida com 3,0 ml de uma mistura nítrico-perclórica 2:1, em temperatura de 100-120°C, para evitar a volatilização do arsênio, até a completa oxidação da matéria orgânica. Amostras mineralizadas foram filtradas e diluídas para 5,0 ml com água desionizada e, então analisadas por espectrofotometria de emissão em plasma indutivamente acoplado para determinação dos teores de arsênio, num espectrofotômetro Perkin Elmer Optima 3300DV.

### *3.13. Análises estatísticas*

As variáveis foram submetidas aos testes de Normalidade (Lilliefors) e Homoscedasticidade (Cochran). Depois das transformações, quando necessário, elas foram submetidas à análise de variância (ANOVA). Quando significativo foi utilizado o teste de Duncan (SAEG, 1999) em nível de significância de 5%. Todos os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão da média (DPM). Como não houve diferença entre os controles aos 42 e 84 dias, eles foram agrupados para as análises estatísticas.

#### 4. Referências

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., PILLAI, S. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier; 574p, 2008.
- AKSHATA, S.N., CHRISTOPHER, R.L., CAROL, H.K. Effects of low concentrations of arsenic on the innate immune system of the zebrafish (*Danio rerio*). Toxicological Sci., 98, 118-24, 2007.
- ANDRÉS, A. Cancer incidence after immunosuppressive treatment following kidney transplantation. Crit. Rev. Oncol. Hematol., 56, 71-85, 2005.
- APOSHIAN, H.V.; ZAKHARYAN, R.A.; WILDFANG, E.K. How is inorganic arsenic detoxified?. In: Chappell, W.R, Albernaty, C.O.; Calderon RI (Eds), Arsenic Exposure and health effects, Amsterdam, Elsevier, 289-97, 1999.
- APOSHIAN, H.V; ZAKHARYAN, R.A.; HEALY, S.M. et al. Biodiversity of inorganic arsenite methyltransferases. Toxicolog. Sci., 42S:353, 1998.
- ARGUELLO, R.A., CENGET, D.D., TELLO, E.E. Cáncer y arsenicismo regional endémico en Córdoba. Rev. Argent. Dermatosisifilogr., 22,461-87, 1938.
- ATTAL, J., COUROT, M. Developpement testiculaire et etablissement de la spermatogeneses chez le taureau. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 3,219-241, 1963.
- BORBA, R.P. Arsênio em ambiente superficial: Processos geoquímicos naturais e antropogênicos em uma área de mineração aurífera. Campinas, SP: (Dissertação de doutorado), 169p., 2002.
- BOONE,L.,MEYER,D.,CUSICK,p.,ENNULAT,D.,BOLLIGER,A.P.,EVERDS,N.,MEADOR,V., ELLIOTT,G., HONNOR,D.,BOUNOUS,D.,JORDAN,H. Selection and interpretation of clinical pathology indicators of hepatic injury in preclinical studies. Vet. Clin.Phamol., 34,182-188, 2005.
- BURHOP, K., GORDON, D., ESTEP, T. Review of hemoglobin induced myocardial lesions. Artif. Cells Blood Substit. Immobil.Biotechnol. 32, 353-374, 2004.

CLERMONT, Y., ANTAR, M. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and the spermatogonial renewal in the monkey (*Macaca arctoides*). Am. J. Anat., 136,153-166, 1973.

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals, seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol. Rev., 52,198-236, 1972.

COVIELLO, A.D., BREMNER, W. J., MATSUMOTO, A. M., HERBST K, L., AMORY, J. K., ANAWALT, B. D., XIAOHUA, Y., BROWN, T. R., WRIGHT, W. W., ZIRKIN, B. R.; JAROW, J. P. Intratesticular testosterone concentrations comparable with serum levels are not sufficient to maintain normal sperm production in men receiving a hormonal contraceptive regimen. J. of Androl., 5, 931-938, 2004.

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: Manole, pp: 325-334, 2005.

COMPREHENSIVE, ENVIRONMENTAL. RESPONSE., COMPENSATION AND LIABILITY, ACT. (CERCLA). Priority List of Hazardous Substances. U.S. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. [Citado 2008 Mar 30]. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/index.html>.

COOKE, B.A. Transduction of the luteinizing hormone signal within the Leydig cell. In: PAYNE, A.H.; HARDY, M.P.; RUSSEL, L.D., (Eds). The Leydig Cell. Vienna: Cache River Press, pp: 352-363, 1996.

COOPER, T.G.; YEUNG, C.H. Recent biochemical approaches to post-testicular, epididymal contraception. Hum. Reprod. Update.,5, 141-152,1999.

COUROT, M.; HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R.; VANDENMARK, N.L. Ed. The testis. New York: Academic Press., Cap.6, pp: 339-432, 1970.

DADOUNE, J. P.; DEMUOLIN, A. Structure and functions of the testis. In: Thibault, C., Levasseur, M. & Hunter, R. H. F. (Eds). Reproduction in mammals and man. Paris: Ellipses, Cap.13, pp: 227-250, 1993.

DAS, D; CHATTERJEE, A; MANDAL, BK; SAMANTA, G; CHAKRABORTI, D; CHANDA B. Arsenic in ground water in six districts of West Bengal, India: the biggest arsenic calamity in the world. Part 2. Arsenic concentration in drinking water, hair, nails, urine, skin-scale and liver tissue (biopsy) of the affected people. *Analyst.*,120,917-24,1995.

DE ROOIJ, D. G. Stem cells in the testis. *Int. J. Exp. Path.*, 79,67-80, 1998.

DELLMANN, H. ; WROBEL, K. Sistema reprodutor masculino, In: Dellmann, H., Brown, E. M. *Histologia Veterinária*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 12, pp.: 232-253, 1982.

DESCHAMPS, E.; MATSCHULLAT,J.; Arsênio antropogênico e natural: um estudo em regiões do quadrilátero ferrífero, Fundação Estadual do Meio Ambiente, Belo Horizonte, MG, 2007.

DESESSO, J.M. An Assessment of the Developmental Toxicity of Inorganic Arsenic. *Reproductive Toxicology Review.*, 12, 385–433, 1998.

DORST, V. J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchunhen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. *Monotsh. Ver. Med.*, 29, 650-652, 1974.

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

FAWCETT, D. W.; NEAVES, W. B.; FLORES, M. N. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol. Reprod.*, 9, 500-532, 1973.

FERGURSON, J.F.; ANDERSON, M.A. Chemical forms of arsenic in water supplies and their removal. In: Rubi, A.J. (ed.) *chemistry of water supply, treatment and distribution*. Ann Arbor Science, Ann Arbor, chapter 7, 1974.

FERM, V.H. Arsenic as a teratogenic agent. *Environm. Heal. Perspect.*, 19,215-217, 1977.

FINDELSTEIN, J.S.; MCCULLY, W.F.; MACLAUGHLIN, D.T. The mortician's mystery. Gynecomastia and reversible hypogonadotropic hypogonadism in an embalmer. *Engl. J. Med.*, 318, 961-965, 1988.

FIORINI, C.; TILLOY-ELLUL, A.; CHEVALIER, S.; CHARUEL, C.; POINTIS, G. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reprod. Toxicol.*, 18, 413- 421, 2004.

FRANÇA, L.R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. (Dissertação de doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 180p., 1991.

FRANÇA, L.R., RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: *Male reproduction; a multidisciplinary overview*. Madrid, Churchill Communications, cap 16, pp.:198-219, 1998.

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

GONTIJO, B., BITTENCOURT, F. Arsênio – Uma revisão histórica. *Na. Brás. Dermatol.*, 80, 91-5, 2005

GOODMAN, H. M. Controle Hormonal da Reprodução Masculina. In: Johnson, L.R. *Fundamentos de Fisiologia Médica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 45, 2000.

GOYAL, H.O., WILLIAMS, C.S.; KHALIL, M.K., VIG, M.M., MALONEY, M.A. Postnatal differentiation of ductus deferents, tail of the epididymis, and distal body of epididymis in goats occurs independently of rete testis fluid. *Anat. Records.*, 254, 508-520, 1999.

GUNN, S.A., GOULD, T.C. Cadmium and other mineral element. In: *The testis*. V.3: Influencing factors. Eds. Johnson, A.D.; Gomes, W.R.; VanDemark, N.L.; New York Academ. Press., p.337, 1970.

GURAYA, S. S. *Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals*. Springer-Verlag Berlin, 430 p., 1987.

HARRINGTON, J.M; STEIN, G.F; RIVERA, R.O. The occupational hazards of formulating oral contraceptives- a survey of plant employees. *Arch. Environ. Health*, 33, 12-15,1978.

HOLLADAY, S.D.; WANG, A.; WOLF, D.C.; AHMED, S.A.; ROBERTSON, J.L. Reproductive and developmental toxicity of arsenic in rodents: A Review. *International J. of Toxicol.*, 25, 319-331, 2006.

JÉGOU, B. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int. Rev. Cytol.*, 147,25-95, 1993.

JOHNSON, L., NEAVES, W.B. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. *Biol. Reprod.*, 24,703-712, 1981.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor masculino. IN: Junqueira, L.C.; Carneiro, J. *Histologia Básica*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,11 ed., cap 21,pp.323-334, 2008.

KIERSZENBAUM, A.L. *Histologia e Biologia Celular. Uma introdução à Patologia*. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier,654p, 2008.

KUMAGAI, Y.; SUMI, D. Arsenic: signal transduction, transcription factor, and biotransformation involved in cellular response and toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 47,243–62, 2007.

LEE, J.S., CHON, H.T., KIM, K.W. Human risk assessment of As, Cd, Cu and Zn in the abandoned metal mine site. *Environ. Geochem. Health*,27,185-91, 2005.

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, pp: 1435-1488, 1994.

LYU, P. Y.; HANDELSMAN, D. J. The present and future state of hormonal treatment for male infertility. *Hum. Reprod. Updat.*, 9, 9-23, 2003.

MABUCHI, K.; LILIENFELD, A.M.; SNELL, L.M. Lung-cancer among pesticide workers exposed to inorganic Arsenicals. *Arch. Environ. Health*, 34, 312-320, 1979.

MATSCHULLAT, J.; BORBA, R.P.; DESCHAMPS, E.; FIGUEIREDO, B.F.; GABRIO, T.; SCHWENK, M. Human and environmental contamination in the Iron Quadrangle, Brazil. *Appl. Geochem.*, 15, 181-190, 2000.

McKINNEY, J.D. Metabolism and disposition of inorganic arsenic in laboratory animals and humans. *Environ. Geochem. Health*, 14,43-8, 1992.

MENEZES, C. M. C. Análise morfofuncional da espermatogênese de queixadas (*Tayassu pecari* LINK, 1975), (Dissertação de mestrado) - Programa de Pós-graduação em Produção Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Campos dos Goytacazes-RJ, 96p., 2006.

MORTON, W.E., DUNNETE, D.A. Health effects of environmental arsenic. In: Nriagu JO (Eds), *Arsenic in the Environment, Part II: Human Health and Ecosystem Effects*. New York: John Wiley e Sons Inc; 1994.

NATHWANI, R.A., PAIS,S., REYNOLDS,T.B., KAPLOWITZ,N. Serum alanine-aminotransferases in skeletal muscle diseases. *Hepatology*, 41, 380-382, 2005.

NAVA-HERNÁNDEZ, M.P.; HAUAD-MARROQUÍN, L.A.; BASSOL-MAYAGOITIA, S.; GARCÍA-ARENAS, G.; MERCADO-HERNÁNDEZ, R.; ECHÁVARRI-GUZMÁN, M.A.; CERDA-FLORES, R.M. Lead, cadmium, and arsenic induced DNA damage in rat germinal cells. *DNA and Cell Biol.*, 28, 241-248, 2009.

OLDEIREID, N.B.; THOMASSEN,Y.; ATTRMADAL, A.; OLAISEN,B.; PURVIS,K. Concentration of lead, cadmium and zinc and the tissues of reproductive organs of men. *J. Reprod.Fert.*, 99, 421-425, 1993.

OMS 2000a Arsenic in drinking water. Fact Sheet No 210, [Http:// www.who.int/inf-fs/en/fact210.html](http://www.who.int/inf-fs/en/fact210.html)

OREJUELA, F.; LIPSHULTZ, L.I. Effects of working environment on reproductive health. *Contemp. Urol.*, 10, 86-92, 1998.

OZER,J., RATNER,M., SHAW,M., BAILEY,W., SCHOMAKER, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicol.*, 245, 194-205, 2008.

PARADA, B.; REQUIXA, A.; FIGUEIREDO, A.; MOTA, A. Infertilidade Masculina e factores ambientais. *Act. Urol.*, 21, 9-15, 2004.

PATTERSON, R., VEJA, L., TROUBA, K., BORTNER, C., GERMOLEC, D. Arsenic-induced alterations in the contact hypersensitivity response in Balb/c mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 198,434-443, 2004.

PAULA, T.A.R. Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). (Dissertação de doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 84p.,1999.

PELLINIEMI, L. J.; KUOPIO, T.; FROJDMAN, K. The cell biological and function of the fetal Leydig cell. In: PAYNE, A. H.; HERDY, M. P.; RUSSEL, L. D., (eds). *The Leydig cell*. Vienna: Cache River Press, pp: 144-174, 1996.

PESCOVITZ, O. H.; SRIVASTAVA, C. H.; BREYER, P. R. & MONTS, B. A. Paracrine control of spermatogenesis. *Trends Endocrinol. Metabol.*, 5,126-131, 1994.

POCCIA, D. Molecules of the somatic cells. In: Poccia, D. *Molecular biology intelligence unit: molecular aspects of spermatogenesis*. Austin: R. G. Landes Company, Cap.4, p.75-90, 1994.

RAMAIAH,S.K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic Biochemical parameters. *Food Chem. Toxicol.*, 45, 1551-1557, 2007.

RANA, S.V.S. *Environmental Pollution. Health and Toxicology*. Alpha Science, Oxford, 269p, 2007.

RODRIGUES, A.S.L.; MALAFAIA, G. Effects of arsenic exposure in human health. *Rev.Saúde.Com.*, 4, 148-159, 2008.

ROS, C.T.D.,TELOKEN,C.,TANNHAUSER,M.,HARTMANN,A.Does intratesticular testosterone administration modify the evolution of transitory testicular ischemia in pubertal rats. The J. of Urol.,159,1752-1754, 2009.

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

RUSSELL, L. D. ; FRANÇA, L. R. Building a testis. Tiss. Cell., 27,129-147, 1995.

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, Cap. 10, p. 218-222, 1996.

RUSSELL, L. D.; CHANDRASHEKAR, V.; BARTKE, A., SINHA-HIKIM, A. P. The hamsters Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. Int. J. Androl., 17, 93-106, 1994.

RUSSELL, L. D.; GRISWOLD, M. D. The Sertoli cell. (ed) Clearwater, Florida: Cache River Press, p. 1-37, 1993.

SAKUMA, AMA. Avaliação da exposição humana ao arsênio no Alto Vale do Ribeira, Brasil (Dissertação de mestrado), São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas; 2004.

SARADHA, B.; MARTHUR, P.P. Effect of environmental contaminants on male reproduction. Environm. Toxicol. and Pharmacol., 21, 34-41, 2006.

SCHLATT, S.; MEINHARDT, A.; NIESCHLAG, E. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. Eur. J. Endocrinol., 137,107-117, 1997.

SETCHELL, B.P. Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P.T. Reproduction in Domestic Animals. 4th Ed. San Diego: Academic Press, Inc., cap. 6, pp. 221-250, 1991.

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil. E, Neill, J.D. (Eds.). The Physiology of Reproduction, ed.2, New York: Raven Press., cap 22, pp.1363-1434, 1994.

SKINNER, M. Cell-cell interactions in the testis. *Endoc. Rev.*, 12,45-77, 1994.

SPITERI-GRECH, J.; NIESCHLAG, E. Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis - a review. *J. Reprod. Fertil.*, 98,1-14, 1993.

SRIVASTAVA, S.P.; MURTHY, R.C. Male reproductive effect of arsenic in mice. *Biome.*, 14, 113–117, 2001.

SRIVASTAVA, S.P.; MURTHY, R.C. Male reproductive toxicity of sodium arsenic in mice. *Hum. & Experim. Toxicol.*, 23, 399- 403, 2004.

STANBENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. In: Swenson, M. J.; Reece, W. O. Dukes: *Fisiologia dos animais domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., Cap. 35, p. 603-614, 1996.

TAE, H.J.; JANG, B.G.; AHN, D.C., CHOOI, 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. *Vet. Res. Commun.*,29,629-643, 2005.

THOMPSON, D.J. A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals. *Chem. Biol. Interact.*, 88, 89-114, 1993.

USEPA 2000a. National Primary Drinking Water Regulations; Arsenic and Classifications to Compliance and New Source Contaminants Monitoring; Proposed Rule. *Federal Register*, vol.65, No. 121, June 22, p.38888-38983, 2000;

USEPA 2000b. Technologies and Costs for Removal of Arsenic from Drinking Water. EPA 815-R-00-028.

VAHTER; M. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicol.*, 18, 211–217, 2002.

VAHTER; M. Metabolism of arsenic. In: Fowler BA, ed. *Biological and environmental effects of arsenic*. Amsterdam: Elsevier:pp.171-98, 1983.

VAHTER, M. Species differences in the metabolism of arsenic compounds. *Appl Organomet Chem.*,8,175-82, 1994.

VAHTER, M.; MARAFANTE, E.; LINDGREN, A.; DENCKER, L. Tissue distribution and subcellular binding of arsenic in marmoset monkeys after injection of <sup>74</sup>As-arsenite. *Arch. Toxicol.*, 51,65-77, 1982.

VILLA-BELLOSTA, R.; SORRIBAS,V. Role of rat sodium/phosphate cotransporters in the cell membrane transport of arsenate. *Toxicol. and Appl. Pharm.*, 232,125-134, 2008.

WAALKES, M.P.; COOGAN, T.P.; BARTER, R.A. Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. *Crit. Rev. Toxicol.*, 22, 175-201,1992a.

WAALKES, M.P.; FRIDBERG,L.; NELSON,N.; BEAUMONT,J.; FOWLER,B.A.; LAUWERYYS,R.; NOSDBERG,G.; VOSTAL,J.; ZIELHUIS,R. WORKGROUP. Problem of epidemiological evidence. *Environm. Health Perspec.*,40, 11-20, 1992b.

WINSKI, WINSKI; SL,; CARTER, CARTER; DE. Arsenic toxicity in human erythrocytes characteristics of morphologic changes and determination of the mechanism of damage J.. *Toxicol. Environ. Hlth.*, 53, 345–355, 1998.

## Capítulo 1

### Avaliação do efeito crônico de arsenato sobre a biometria corporal e de túbulos seminíferos de camundongo *Swiss* adulto

#### RESUMO

O arsênio (As) distribuído na crosta terrestre, na água e nos organismos vivos e por meio de processos antrópicos têm atingido concentrações elevadas, que pode se apresentar na forma orgânica ou inorgânica, sendo esta última, predominante na água de consumo. Este metal é um tóxico cumulativo e sua exposição crônica através da água contaminada é problema mundial de saúde. Este trabalho objetivou a investigação dos efeitos crônicos do arsênio sobre a biometria corporal e testicular e dos túbulos seminíferos de camundongos adultos. O trabalho foi conduzido dentro dos preceitos éticos para animais de laboratório. Vinte e quatro camundongos foram divididos em três grupos: o controle, que recebeu apenas água destilada e os grupos de tratamento que receberam solução de arsenato de sódio na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , durante 42(As1) e 84(As2) dias. Os animais foram contidos, anestesiados com ketamina e xilazina, pesados sendo retirados os órgãos citados, que foram imersos em Karnovsky por 24 horas, sob refrigeração. Os testículos foram processados, corados em azul de toluidina. As análises histopatológicas foram realizadas em microscopia de luz sendo obtidas imagens em microscópio Olympus AX-70. Para determinação do acúmulo tecidual de As, os órgãos foram processados e analisados por espectrofotometria de emissão em plasma. Níveis plasmáticos de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), foram determinados utilizando-se Kit comercial. A comparação das médias foi feita pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ). Quanto ao peso corporal, houve aumento em As2 ( $p < 0,05$ ) se comparado aos outros grupos. Não foram observadas variações para os pesos de gônada, glândula vesicular, ducto deferente e epidídimo. O peso da próstata diminuiu em As1 e As2 ( $p < 0,05$ ). Os pesos do rim e fígado aumentaram ( $p < 0,05$ ) em ambos os grupos tratados. Observou-se aumento de arsênio nos grupos tratados ( $p < 0,05$ ) em todos os órgãos analisados. O acúmulo no fígado, rim e testículo foi dependente do tempo de exposição, sendo maior em As2. Para as transaminases, observou-se aumento apenas na AST ( $p < 0,05$ ), comparando-se os grupos As2 e controle. Este resultado indica possível toxicidade do As no fígado e rim, uma vez que AST é liberada no plasma quando um destes órgãos é danificado. Não foram observadas variações significativas ( $p > 0,05$ ) para a altura de epitélio germinativo e diâmetro tubular. Os dados encontrados para o diâmetro tubular se mantiveram próximos da média relatada para roedores. A proporção volumétrica de túbulos seminíferos em mamíferos é bastante variável, refletindo na eficiência da produção espermática nas diversas espécies. Neste parâmetro não houve diferença significativa entre os grupos tratados em relação aos seus respectivos

controles. Consequentemente, os volumes de túbulo e intertúbulo, bem como a proporção de intertúbulo, não apresentaram alterações. O ITS, que visa quantificar o investimento em túbulos seminíferos em relação à massa corporal, também não diferiu entre os grupos experimentais. No grupo controle, observaram-se túbulos íntegros com as células germinativas (CG) e células de Sertoli (CS) bem preservadas e epitélio seminífero bem organizado mostrando arranjo normal. Em As1 e As2 verificaram-se alguns danos testiculares sendo detectada uma série de patologias, dentre elas vacúolos citoplasmáticos nas CS. A vacuolização é o primeiro sinal morfológico de injúria testicular, mostrado para muitos tóxicos de célula de Sertoli. Além disto observou-se desprendimento de CG, túbulos em degeneração, formação de agregados celulares em direção ao lúmen tubular. Espermátides arredondadas com aparência apoptóticas foram observadas exclusivamente em As2. Os dados apresentados permitem sugerir que a exposição a essa concentração de arsênio, não interferiu na morfometria tubular, porém causou alterações na biometria testicular e corporal, além da confirmação da sua natureza cumulativa em vários órgãos e fortes indicativos de sua toxicidade na função hepática e renal de camundongos em idade reprodutiva. O epitélio germinativo nos dois grupos tratados se apresentou desorganizado, o que certamente compromete o processo espermatogênico.

Palavras-chave: contaminante, glândulas anexas reprodutivas, testículo, toxicidade.

## 1. INTRODUÇÃO

O arsênio é amplamente distribuído através da crosta terrestre, nos solos, sedimentos, água e nos organismos vivos, e a exposição a este metalóide tem se tornado preocupante nos dias de hoje. Processos antropogênicos, industriais e naturais, têm implicação nos altos níveis ambientais deste composto. O arsênio pode se apresentar nas formas orgânica ou inorgânica, sendo que esta última é predominante na água de consumo (Rodrigues & Malafaia, 2008).

O arsênio é um agente cumulativo e sua exposição crônica através da água contaminada tem se tornado um problema mundial de saúde (Nandi et al., 2006). Este elemento é rapidamente distribuído pelo sangue após absorção pelos pulmões ou pelo trato gastrointestinal. Embora se distribua uniformemente entre todos os órgãos e tecidos, o arsênio acumula-se inicialmente no fígado, rins e pulmões. Entretanto, observa-se rápida liberação do arsênio a partir destes órgãos e, após duas ou quatro semanas, a maior parte do arsênio remanescente no corpo encontra-se ligada aos tecidos ricos em proteínas que contém cisteína, como a pele, os cabelos e as unhas. Uma hierarquia de deposição de arsênio nos tecidos poderia ser provisoriamente estabelecida desta forma: fígado → rim → músculos → coração → baço → pâncreas → pulmões → cérebro → pele → sangue, e em grau bem menor em ossos e dentes (Benramdane et al., 1999). A concentração tecidual do arsênio inorgânico varia pela valência:  $As^{+5}$  exibe afinidade por ossos e dentes, provavelmente pela sua similaridade ao fosfato (Klaassen, 1990), enquanto  $As^{+3}$  é fortemente atraído por grupamentos sulfidrilas contidos na pele, cabelos e unhas (Vahlter, 1981).

A toxicidade do arsênio depende da forma química, da dose e do tempo de exposição. Manifestações clínicas podem ser observadas em vários órgãos, tais como pele e sistemas nervoso, cardiovascular, gastrointestinal e respiratório, além de efeitos renais e hepáticos. Porém, os efeitos tóxicos do arsênio inorgânico sobre o sistema reprodutor masculino não são ainda muito claros, ocorrendo comprovações principalmente de malformações congênitas em muitas espécies de animais de experimentação, uma vez que o arsênio pode atravessar a barreira placentária e atingir o feto. Muitos trabalhos mostram que alterações nas concentrações hormonais são provocadas pela exposição ao arsênio, nas formas de arsenito de sódio, mostrando um efeito inibitório na atividade das enzimas esteroideogênicas testiculares (Biswas, et al., 2003). Níveis ideais de testosterona circulante são requeridos para manter a função testicular e de órgãos sexuais acessórios e, por isso, variações no peso testicular, prostático, da glândula vesicular e do epidídimo podem indicar alterações nos níveis deste hormônio (Gupta et al., 1993; Lohiya & Ansari, 1999; Chauhan et al., 2007). Produção espermática, estimulada pela testosterona, diretamente correlacionada com o peso testicular (Amann, 1970; Russell et al., 1990; França & Russell, 1998; Paula, 1999).

Alterações nos pesos dos rins e fígado são fortes indicativos de toxicidade do arsênio. Assim, estudos biométricos desses órgãos podem indicar alterações, direcionando para estudos histológicos e morfométricos renais e hepáticos. Ratos expostos cronicamente ao arsenato na água de beber acumulam arsênio no fígado e rim (Carmignani et al., 1983).

O testículo dos mamíferos é dividido em dois compartimentos: tubular e intertubular. O tubular é formado pelos túbulos seminíferos, constituídos de túnica própria, epitélio germinativo e lume. O intertubular é constituído de células de Leydig, células do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e espaço linfático (Russell et al., 1990a). Na maioria dos mamíferos, os túbulos ocupam de 70% a 90% do parênquima testicular (Russell et al., 1990; França & Russell, 1998) existindo, portanto, relação direta entre tamanho testicular e o volume ocupado pelos túbulos seminíferos, o que reflete na produção espermática individual (Chierigatto, 2005). O termo parênquima testicular é amplamente utilizado na literatura para descrever o testículo após a remoção da albugínea e do mediastino testiculares, e sua quantificação histológica é requisito básico para estudos que envolvam parâmetros reprodutivos masculinos (Paula et al., 2002).

O objetivo deste trabalho foi investigar a ação do arsênio administrado de forma crônica, cobrindo dois ciclos espermatogênicos de camundongos adultos, visando determinar sua interferência nos testículos e órgãos reprodutivos anexos. O arsenato de sódio foi escolhido levando-se em conta que arsenato é a forma encontrada em maior quantidade em regiões do quadrilátero ferrífero, em Minas Gerais, representando o principal contaminante nesse local. Adicionalmente, outros órgãos e tecidos importantes como rim e fígado também foram analisados.

## **2. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### *2.1. Biometrias corporais e testiculares*

O peso corporal teve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no grupo As2 quando comparado com o controle e grupo As1. Com relação ao peso gonadal, IGS, peso da albugínea e do parênquima testicular, não houve diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ). A produção espermática é altamente correlacionada com o peso testicular (Amann, 1970; Russell et al., 1990; França e Russell, 1998). Mudanças nos pesos absolutos e relativos dos órgãos reprodutivos são evidências suficientes para classificar inicialmente um agente como potencial tóxico reprodutivo masculino (Zenick and Clegg, 1994). Portanto, a massa testicular pode ser usada como indicador quantitativo da produção espermática, uma vez que o componente testicular mais abundante é aquele formado pelos túbulos seminíferos. Porém, neste trabalho, não houve variações nos pesos testiculares dos grupos tratados, o que poderia indicar pouca interferência do arsênio na produção espermática dos camundongos. Em um trabalho com cimetidina, um tóxico reprodutivo que afeta as células

peritubulares, a administração de duas doses diferentes (50,0 mg e 250,0 mg) também não provocou diferença significativa nos pesos corporais e testiculares em nenhum dos grupos estudados (França et al., 2000). Em estudo feito com boro observou-se aumento no peso do testículo e da vesícula seminal nos grupos tratados com a concentração que variava de 2,0 a 6,0 mg L<sup>-1</sup> (tratado1) e na concentração de 12,0 mg L<sup>-1</sup> (tratado2) em relação ao grupo controle, que recebeu água contendo uma concentração de boro permitida (0,54 mg L<sup>-1</sup>). Este resultado expressa o efeito de altas doses de boro causando hipertrofia destes órgãos reprodutivos (Espinoza-Navarro et al, 2007). Arena (2006) testou o efeito do inseticida fenvalerato, um piretróide sintético ligado a disruptores endócrinos, sobre testículos de ratos adultos tratados por 30 dias consecutivos com uma dose de 40,0 mgkg<sup>-1</sup> por dia por gavagem. Este autor observou uma diminuição significativa nos pesos absolutos do testículo e epidídimo, nos animais tratados em relação ao controle. Uma perda acentuada de peso testicular foi observada em um experimento utilizando cádmio na dose de 10,0 μmol kg<sup>-1</sup> por 83 dias (Cabral, 1996). Já uma dose de 3,0 μmol kg<sup>-1</sup> por 56 dias, não provocou alterações nos pesos testiculares e corporais e IGS dos animais tratados em relação ao controle (Predes et al., 2007). Ratos expostos ao arsenito de sódio (10,0 ppm) via água de beber, tiveram seus pesos corporais diminuídos após a décima semana de tratamento (Nandi et al, 2006). Neste último trabalho, foi concluído que baixas doses de exposição ao arsênio por curto período de tempo causa ativação intrínseca de defesa antioxidante, enquanto prolongado insulto suprime tal defesa. Ratos albinos que receberam arsenito de sódio na dose de 5,0 mg L<sup>-1</sup> por dia administrado na água de beber destes animais durante quatro semanas, detectou-se uma redução significativa no peso testicular dos animais tratados em relação ao controle, indicando uma atrofia testicular. Já em relação ao peso corporal, não houve variação significativa entre os grupos. Assim concluiu-se que o arsenito de sódio diminuiu a massa testicular e inibiu a androgênese testicular (Jana et al. 2006).

Os primeiros indicadores de possíveis alterações no estado androgênico são alterações nos pesos dos órgãos sexuais acessórios. Suas funções secretórias são andrógeno-dependentes e variam sensivelmente com as concentrações circulantes de testosterona (Creasy, 2001). Neste trabalho, não foram encontradas diferenças significativas no peso de epidídimo, glândula vesicular e ducto deferente, entre os três grupos de camundongos. Porém, houve redução significativa no peso da próstata, o qual foi menor no grupo As2, seguido do grupo As1 e do controle (Tabela 1). Esta alteração no peso da próstata pode indicar possível alteração dos níveis de testosterona circulante. França et al. (2000), ao trabalharem com cimetidina em duas doses diferentes, observaram diminuição significativa nos pesos do epidídimo, vesícula seminal e próstata no grupo de maior dose (250,0 mg). Em estudo feito com um tóxico testicular, a ciclosporina A, não foram observadas variações significativas entre o grupo tratado e o controle no que diz respeito aos pesos

do epidídimo, vesícula seminal e próstata (Monteiro et al., 2008). Sarkar et al. (2003) observaram redução no peso da vesícula seminal e da próstata em ratos que receberam arsenito de sódio intraperitonealmente nas doses diárias de 5,0 e 6,0 mg Kg<sup>-1</sup>, por 26 dias. Em outro trabalho com arsenito de sódio em camundongos, o tratamento com uma dose de 4,0 ppm na água de beber por 365 dias não induziu variações significativas no peso do epidídimo e órgãos acessórios, cujos valores permaneceram próximos aos dos animais controles (Pant et al., 2004). Chiou et al. (2008) ao analisarem camundongos machos que receberam trióxido de arsênio por injeção subcutânea por 3 semanas nas dosagens de 0,15 até 3,0 mg Kg<sup>-1</sup>, observaram que não houve variações significativas nos pesos do epidídimo dos animais tratados em relação ao controle. Em estudo feito por Predes et al. (2007), ao testar o efeito de cádmio em ratos Wistar, foi observado que a dose de 3,0 µmol Kg<sup>-1</sup> de cloreto de cádmio, não provocou variações significativas nos pesos dos epidídimos, vesícula seminal e próstata nos animais tratados, em relação aos seus controles. Em outro estudo, com sulfato de níquel administrado oralmente em camundongos machos adultos nas doses de 5,0 e 10,0 mg Kg<sup>-1</sup> por 35 dias, observou-se redução dos pesos dos órgãos acessórios tais como epidídimos, vesícula seminal e próstata (Pandey et al., 1999).

Observou-se aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos pesos de fígado e rim nos grupos tratados em relação ao controle (Tabela 1). Este fato pode indicar maior atividade desses órgãos na desintoxicação e na filtração plasmática, sugerindo maior acúmulo de arsênio hepático e renal.

Tabela 1 – Biometria corporal e testicular de camundongos em idade reprodutiva, após tratamento com arsenato [1,0 mg L<sup>-1</sup>] (Média ± desvio-padrão).

Biometrias	Grupo Controle	Grupo As1	Grupo As2
Peso Corporal (g)	36,05 ± 2,00 <sup>b</sup>	37,36 ± 1,43 <sup>b</sup>	40,03 ± 2,81 <sup>a</sup>
Peso Testicular (g)	0,26 ± 0,021 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,07 <sup>a</sup>
Peso da Albugínea (g)	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>
Peso do Parênquima (g)	0,25 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,07 <sup>a</sup>

Peso dos Epidídimos (g)	0, 10 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,02 <sup>a</sup>
Peso da Glândula Vesicular(g)	0, 41 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,04 <sup>a</sup>
Peso da Próstata (g)	0, 07 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>c</sup>
Peso do Ducto Deferente (g)	0, 03 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>a</sup>
Peso do Fígado (g)	1, 39 ± 0,21 <sup>b</sup>	1,66 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,64 ± 0,21 <sup>a</sup>
Peso dos Rins (g)	0, 46 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,55 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,56 ± 0,09 <sup>a</sup>
IGS (%)	0, 72 ± 0,076 <sup>a</sup>	0,66 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,09 <sup>a</sup>

Letras iguais nas colunas não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ). Média ± desvio-padrão.

As1: animais eutanasiados aos 42 dias; As2: animais eutanasiados aos 84 dias.

## 2.2. Bioacúmulo de arsênio

Os resultados do acúmulo de arsênio nos órgãos analisados estão mostrados nas Figuras 1, 2, 3, 4 e 5. Foi observado que em todos os órgãos analisados (testículo, epidídimo, vesícula seminal, rim e fígado) ocorreu acúmulo de arsênio nos grupos tratados, quando comparados ao grupo controle. Porém, entre os grupos tratados apenas no testículo, rim e fígado foi detectado aumento significativo, sendo este gradativo e diretamente dependente do tempo de exposição ao As. Outros trabalhos com diferentes dosagens e tempos de exposição ao arsênio também mostraram acúmulo deste metal em diferentes órgãos. Sarkar et al. (2003) avaliando os efeitos de arsenito de sódio nas concentrações de 4,0; 5,0 e 6,0 mg Kg<sup>-1</sup> por 26 dias, observaram que a concentração de arsênio no testículo foi maior em todos os animais tratados de maneira dose dependente. Em outro estudo, utilizando também arsenito de sódio, na concentração de 10,0 ppm em ratos durante 4, 8 e 12 semanas de tratamento, observou-se concentração de arsênio aumentada no fígado e rim ao final de 12 semanas de tratamento (Nandi et al, 2006). Pant et al. (2004) administrando a concentração de 4,0 ppm de arsenito de sódio, via água de beber em

camundongos, por 365 dias, observaram acúmulo de arsênio no testículo, epidídimo, vesícula seminal e próstata no grupo tratado em relação ao controle.

Um estudo utilizando fêmeas de camundongos examinou a disposição de arsênio depois de repetidas administrações de arsenato de sódio radioativo ( $0,5 \text{ mg Kg}^{-1}$ ). Observou-se maior radioatividade no rim e pele (Hughes et al., 2003). Em um trabalho onde foi analisada a distribuição de arsênio nos tecidos em duas diferentes espécies de animais (camundongos e ratos), com diferentes capacidades metabólicas e toxicidade ao arsenito de sódio ( $5,0 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), observou-se que a quantidade de arsênio encontrada nos rins e fígado foi maior no camundongo do que em ratos, sendo também comprovado que o acúmulo maior e por mais tempo ocorre nos rins de ambos os animais. Adicionalmente, camundongos exibem uma distribuição mais uniforme e uma excreção mais rápida de arsênio do que ratos (Naranmandura et al., 2007). Ratos Wistar machos tratados por 3 semanas, foram expostos ao arsenito de sódio ( $2,0 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), via oral através de intubação gástrica. Observou-se acúmulo de arsênio no fígado e rim dos animais tratados de forma significativa em relação ao grupo controle (Modi et al, 2006). Fêmeas de camundongos foram expostas a 0,5; 2,0; 10,0 ou 50,0 ppm de arsênio, na forma de arsenato, na água de consumo, por 12 semanas e apresentaram acúmulo de arsênio tecidual total maior nos rins, pulmão, bexiga urinária, pele, sangue, e fígado, respectivamente. O arsênio monometil ( $\text{MMA}^{\text{III}}$  e  $\text{MMA}^{\text{IV}}$ ) foi o metabólito predominante nos rins. No fígado, foram detectadas igualmente as três formas: inorgânicas, monometiladas e dimetiladas. Estes dados indicam que o modelo farmacocinético para o metabolismo de arsênio precisa incluir mecanismos de acumulação órgão-específicos (Kenyon et al, 2008). Camundongos machos que receberam trióxido de arsênio por injeção subcutânea por 3 semanas, apresentaram acúmulo significativo de arsênio nos testículos nas dosagens de 0,3 e  $3,0 \text{ mg Kg}^{-1}$  de  $\text{As}_2\text{O}_3$  (Chiou et al, 2008).

Pandey et al. (1999) ao administrar sulfato de níquel nas doses de 5,0 e  $10,0 \text{ mg Kg}^{-1}$  em camundongos via água de consumo, observaram acúmulo de níquel nos testículos, epidídimo e vesícula seminal. O grau de acúmulo de níquel nos órgãos reprodutivos dos animais tratados foi observado, em ordem crescente, no epidídimo, testículo, vesícula seminal e glândula prostática.

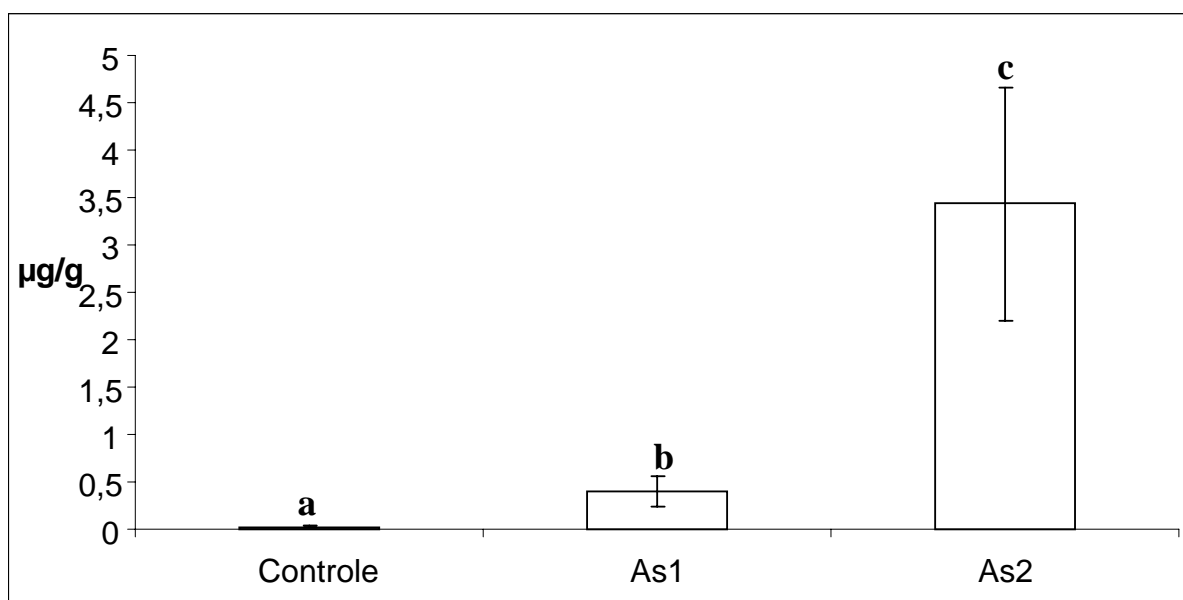


Figura 1: Concentração de arsênio em micrograma por grama ( $\mu\text{g/g}$ ) no fígado de camundongos adultos após administração de arsenato. As1 = 42 dias; As2 = 84 dias de tratamento.

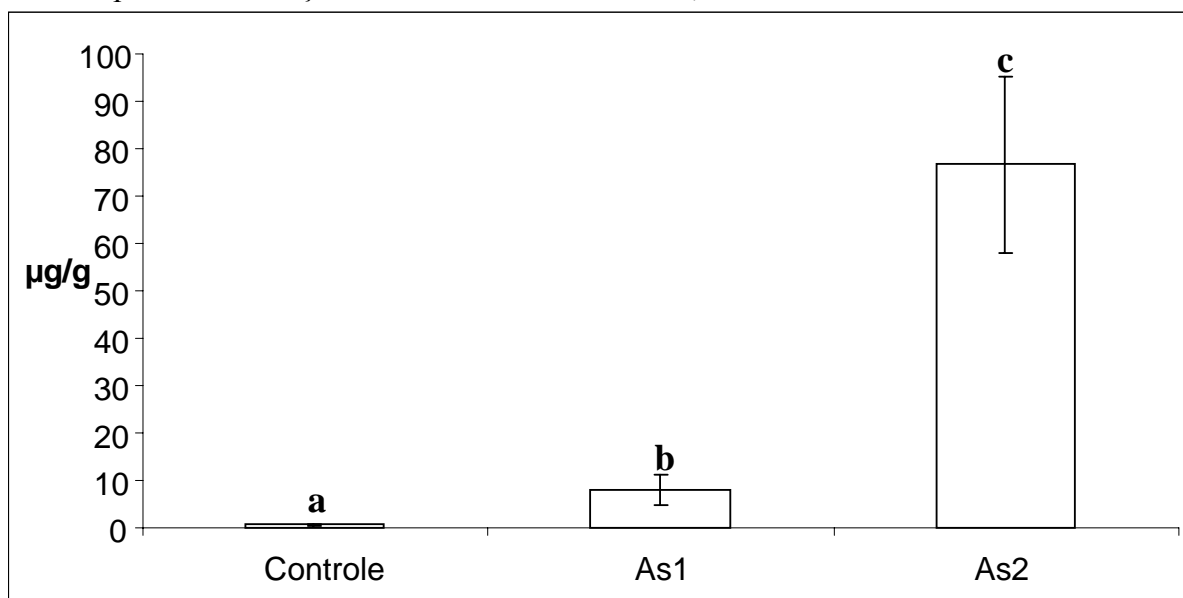


Figura 2: Concentração de arsênio em micrograma por grama ( $\mu\text{g/g}$ ) no rim de camundongos adultos após administração de arsenato. As1 = 42 dias; As2 = 84 dias de tratamento.

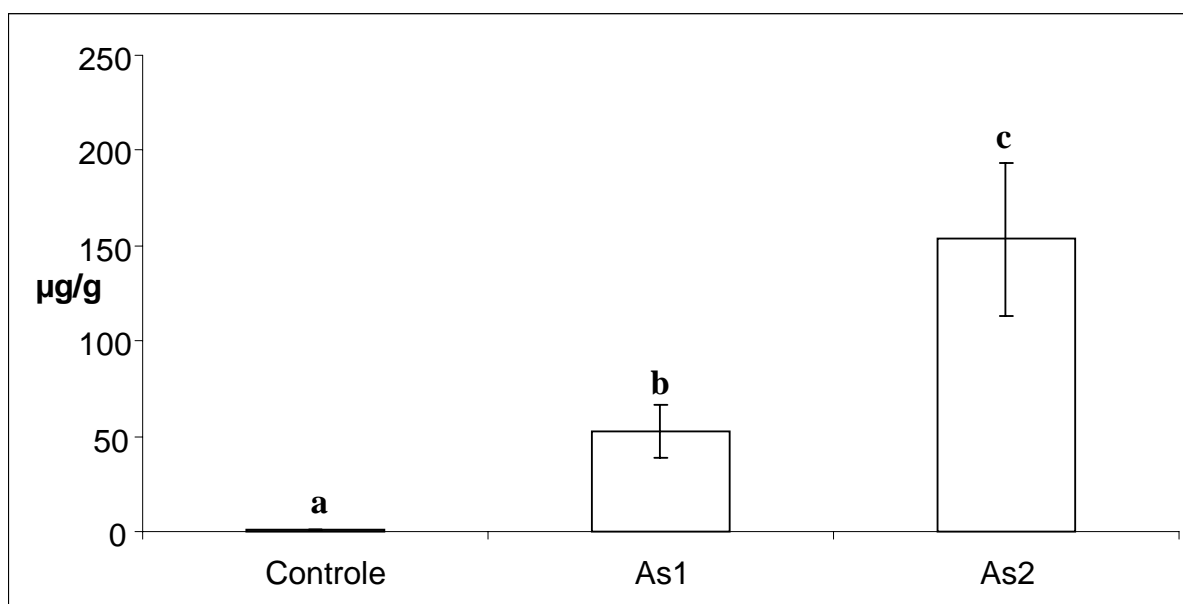


Figura 3: Concentração de arsênio em micrograma por grama ( $\mu\text{g/g}$ ) no testículo de camundongos adultos após administração de arsenato. As1 = 42 dias; As2 = 84 dias de tratamento.

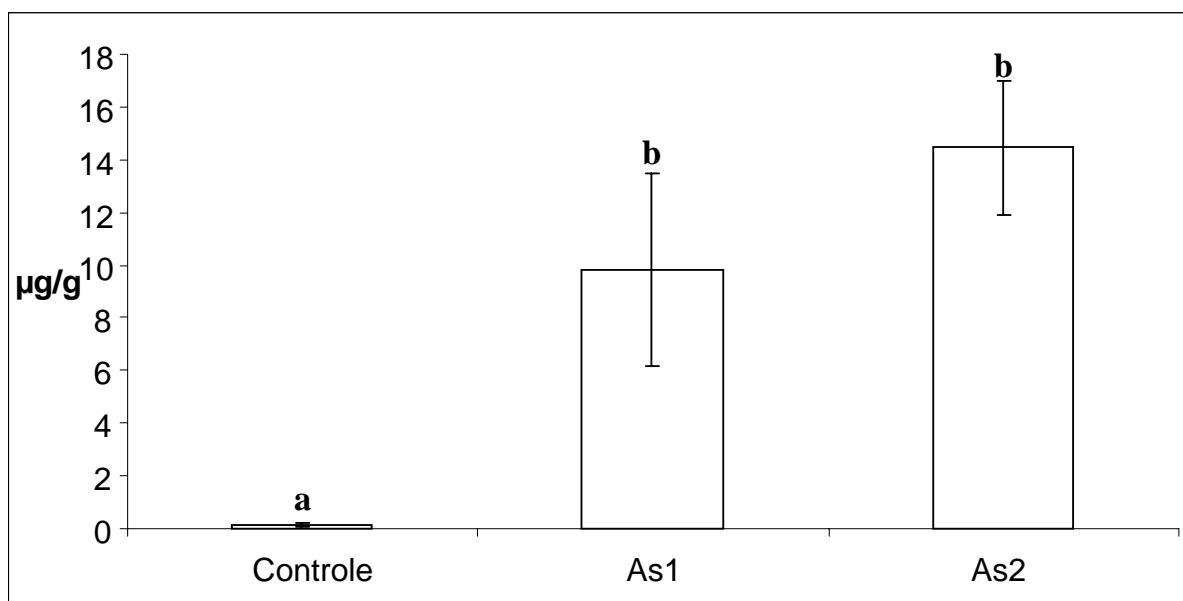


Figura 4: Concentração de arsênio em micrograma por grama ( $\mu\text{g/g}$ ) na glândula vesicular de camundongos adultos após administração de arsenato. As1 = 42 dias; As2 = 84 dias de tratamento.

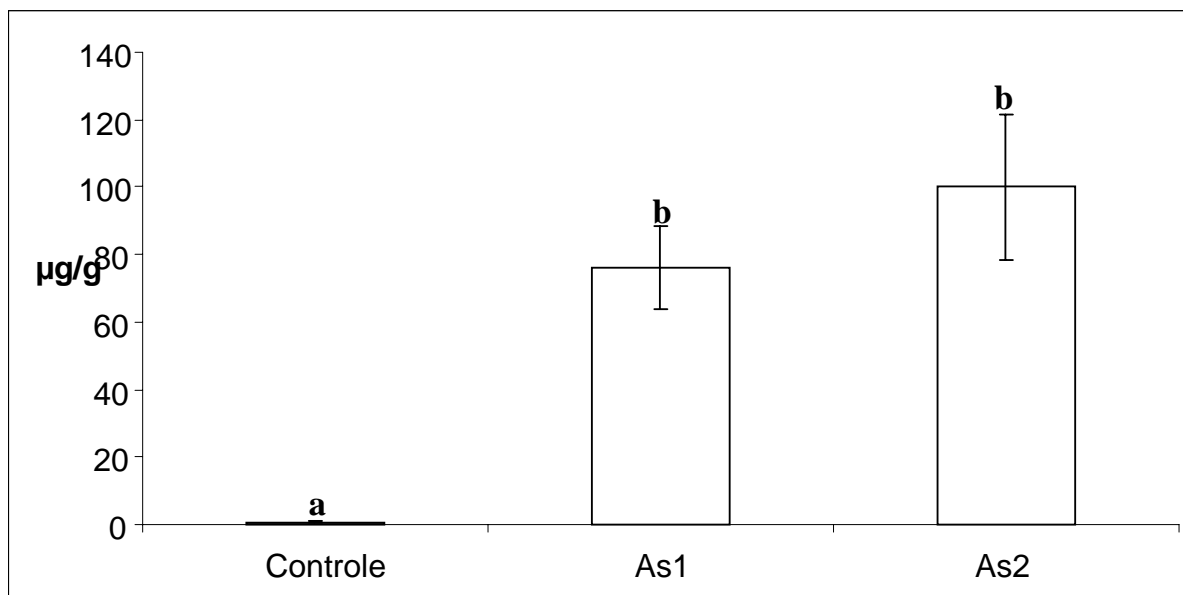


Figura 5: Concentração de arsênio em micrograma por grama ( $\mu\text{g/g}$ ) no epidídimo de camundongos adultos após administração de arsenato. As1 = 42 dias; As2 = 84 dias de tratamento.

### 2.3. Determinação plasmática das enzimas transaminases

Os resultados da determinação plasmática da enzima aminotransferase glutâmico oxaloacética (TGO) e aminotransferase glutâmico pirúvica (TGP) estão representados nas Figuras 7 e 8, respectivamente.

Neste trabalho, observamos que a ALT não variou significativamente entre os grupos tratados e o controle. Já a AST variou significativamente no grupo As2 comparado com o controle. Estes resultados são fortes indicativos de toxicidade do arsênio na função hepática e renal, motivando assim estudos histológicos e morfométricos destes órgãos. Modi et al. (2006) trabalhando com ratos Wistar machos expostos ao arsenito de sódio ( $2,0 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), observaram aumento das transaminases AST e ALT no soro do grupo tratado, comparado com o grupo controle, e associaram este aumento com danos hepáticos devido à toxicidade do arsênio.

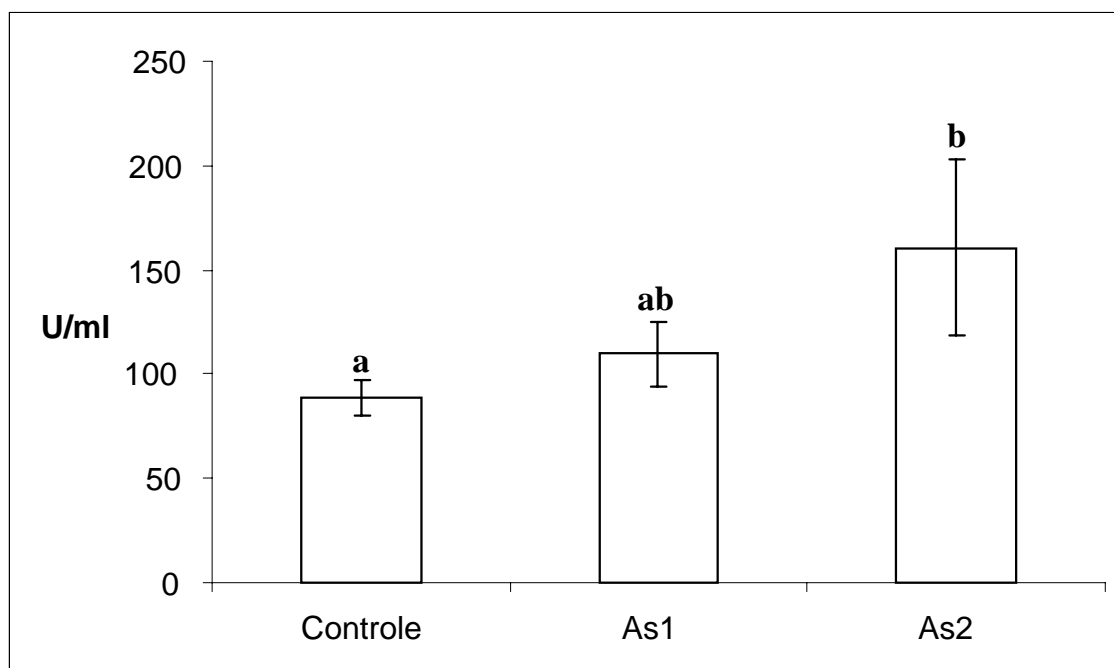


Figura 7: Atividade da enzima AST (aspartato aminotransferase) no plasma em unidade por mL ( U/mL) de camundongos adultos após administração de arsenato. As1 = 42 dias; As2 = 84 dias.

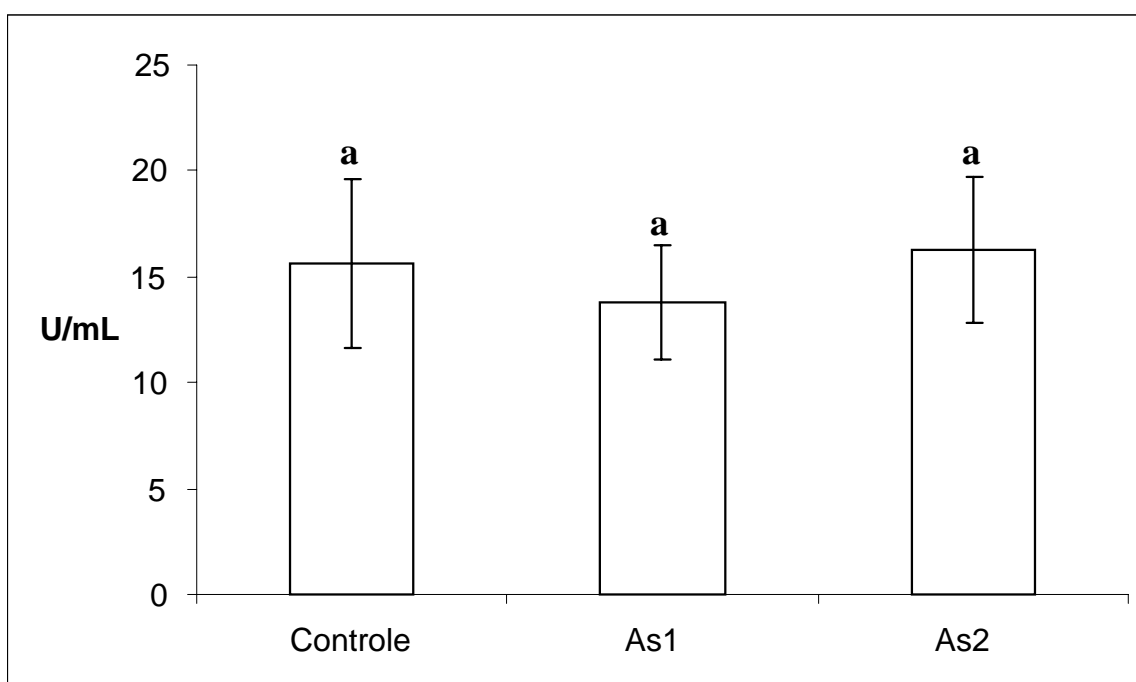


Figura 8: Atividade da enzima ALT (alanina aminostransferase) em unidade por mL ( U/mL) de camundongos adultos após administração de arsenato. As1 = 42 dias; As2 = 84 dias.

#### *2.4. Proporções volumétricas de túbulo seminífero e intertúbulo*

Quanto à proporção volumétrica dos componentes testiculares (Tabela 2), não houve diferença entre os grupos com relação ao lume e aos túbulos seminíferos, embora tenha havido diferença no percentual de epitélio seminífero, cuja proporção foi menor nos dois tratamentos, sendo significativo apenas no grupo As1, se comparado ao controle. A túnica própria aumentou significativamente no grupo As2, se comparado com o controle. O grupo As1 também apresentou um aumento considerável em relação ao controle, mas não significativamente ( $p = 0,09$ ). O aumento da túnica própria nos animais eutanasiados aos 84 dias sugere possível proteção da ação do arsenato nos túbulos seminíferos, uma vez que a túnica própria faz parte da barreira hematotesticular, que promove a proteção das células da linhagem espermatogênica dentro dos túbulos seminíferos. A proporção volumétrica do intertúbulo não apresentou variação. Segundo Russell et al. (1990) e França & Russell (1998), a proporção volumétrica dos elementos testiculares, particularmente dos túbulos seminíferos em mamíferos é bastante variável, sendo esta um dos principais fatores responsáveis pela diferença observada na eficiência de produção espermática nas diversas espécies. Os valores referentes à proporção de túbulos seminíferos entre animais dos grupos controle e tratados com arsenato de sódio permaneceram próximos das médias relatadas para roedores, como camundongos (85%), hamster dourado (85%), cobaio (90%) e degu (93%) (Russell et al., 1990). Ao trabalhar com um tóxico de células peritubulares, a cimetidina, em ratos machos, França et al. (2000) observaram redução na densidade volumétrica de túnica própria no grupo que recebeu 250,0 mg de da droga se comparado aos controles. No grupo que recebeu 50,0 mg de cimetidina, houve também redução, porém não significativa. Os demais componentes (epitélio, lúmen, túbulo e intertúbulo) não variaram significativamente entre os grupos.

#### *2.5. Volumes tubulares, intertubulares e índice tubulossomático*

Os volumes tubulares, intertubulares e ITS não apresentaram variação estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o controle (Tabela 3). Em estudo feito com paracetamol em doses terapêuticas e supraterapêuticas oferecidas para ratos Wistar, verificou-se redução do ITS e do volume tubular nos animais que foram eutanasiados 53 dias após o término do tratamento, em relação à aqueles que foram eutanasiados logo após o tratamento. A redução do IGS e ITS sugere um prejuízo na produção espermática, uma vez que os IGS e ITS, que representam respectivamente, o percentual de massa corporal alocado nos testículo e nos túbulos seminíferos, avaliados conjuntamente, quantificam o investimento do corpo na produção espermática (Morais, 2008). No presente trabalho, nenhum destes parâmetros foi alterado nos grupos tratados.

Tabela 2: Proporção volumétrica (%) de Túbulo seminífero (Túnica própria, lúmen, epitélio) e Intertúbulo de camundongos em idade reprodutiva, após tratamento com arsenato (Média  $\pm$  desvio-padrão).

Proporções (%)	Controle	As1	As2
Túnica Própria	2,66 $\pm$ 0,43 <sup>b</sup>	3,19 $\pm$ 0,56 <sup>ab</sup>	3,77 $\pm$ 0,78 <sup>a</sup>
Lúmen	4,68 $\pm$ 1,31 <sup>a</sup>	5,59 $\pm$ 1,02 <sup>a</sup>	5,43 $\pm$ 1,99 <sup>a</sup>
Epitélio Seminífero	84,52 $\pm$ 1,48 <sup>a</sup>	82,37 $\pm$ 1,60 <sup>b</sup>	83,21 $\pm$ 2,47 <sup>ab</sup>
Túbulo Seminífero	91,87 $\pm$ 1,38 <sup>a</sup>	91,15 $\pm$ 1,45 <sup>a</sup>	92,42 $\pm$ 1,38 <sup>a</sup>
Intertúbulo	8,12 $\pm$ 1,38 <sup>a</sup>	8,84 $\pm$ 1,45 <sup>a</sup>	7,58 $\pm$ 1,38 <sup>a</sup>

Letras iguais nas colunas não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

As1 = 42 dias; As2 = 84 dias.

Tabela 3: Volume dos compartimentos do parênquima testicular (ml) e índice tubulossomático – ITS (%) de camundongos em idade reprodutiva, após tratamento com arsenato de sódio (Média  $\pm$  desvio-padrão).

Parâmetros	Grupo Controle	As1	As2
Volume Tubular	0,11 $\pm$ 0,010 <sup>a</sup>	0,11 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,13 $\pm$ 0,030 <sup>a</sup>
Volume Intertubular	0,01 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	0,01 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,010 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>
ITS	0,32 $\pm$ 0,040 <sup>a</sup>	0,29 $\pm$ 0,055 <sup>a</sup>	0,32 $\pm$ 0,075 <sup>a</sup>

Letras iguais nas colunas não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

As1 = 42 dias; As2 = 84 dias.

## 2.6. Diâmetros tubulares, Altura de epitélio e Comprimento de túbulos seminíferos

Em relação ao diâmetro tubular, observou-se variação significativa apenas no grupo As1, onde foi observada redução, comparado ao controle e ao grupo As2. Esta mesma variação foi também observada em relação à altura de epitélio seminífero (Tabela 4). A medida do diâmetro tubular é uma abordagem classicamente utilizada como indicador da atividade espermatogênica em investigações envolvendo a função testicular (França e Russell, 1998; Paula et al., 2002). Diferentemente deste trabalho, França et al. (2000) observaram uma tendência de redução no diâmetro tubular nos grupos tratados com 50,0 mg e 250,0 mg de cimetidina em relação aos controles, porém esta redução não foi significativa. Em relação à altura do epitélio seminífero, foi observada redução significativa nos animais que receberam alta dose desta droga, comparado aos controles. Em estudo feito com administração de boro através da ingestão de água, na concentração de 12,0 mg L<sup>-1</sup> em camundongos machos (*Mus musculus* – CF1), foi observado aumento no diâmetro tubular e na altura do epitélio seminífero no grupo tratado, comparado ao controle que recebeu água na concentração permitida de boro (Bustos-Obregón et al., 2007a).

Bustos-Obregón et al. (2007b), ao testarem o efeito de malation (80,0 mg Kg<sup>-1</sup>) em camundongos machos CF1 por períodos de 1, 7, 14 e 21 dias, observaram que a altura do epitélio seminífero foi aumentada no dia 1, reduzindo significativamente no dia 7 e voltando aos valores normais no dia 14, comparado ao grupo controle. O diâmetro tubular diminuiu significativamente nos dias 7, 14 e 21 em relação ao controle. Em outro estudo, também feito com injeção de malation, porém numa concentração maior (240,0 mg L<sup>-1</sup>), foi detectada diminuição no diâmetro e altura do epitélio seminífero em 8 dias após a injeção, com o valor destes parâmetros tendendo a se normalizar após 35 a 40 dias da aplicação do pesticida (Bustos-Obregón e González-Hormazábal, 2003). Cabral (1996), trabalhando com cádmio, observou redução significativa nos diâmetros de túbulos seminíferos na dose de 15,0 µmol Kg<sup>-1</sup>. Porém, na dose de 2,5 µmol Kg<sup>-1</sup>, o cádmio não teve efeito significativo sobre os diâmetros tubulares. Morais (2008), ao testar o efeito de paracetamol, considerado um tóxico para o sistema reprodutor masculino, em doses terapêuticas e supraterapêuticas em ratos Wistar adultos, não observou variações significativas no diâmetro tubular nos grupos tratados, verificando porém, redução na altura do epitélio germinativo. A administração simultânea de cádmio (7,5 e 15,0 µmol kg<sup>-1</sup>) com paracetamol (8,8 mmol Kg<sup>-1</sup>) em ratos Wistar potencializou os efeitos tóxicos sobre os testículos destes ratos, verificados pela redução altamente significativa dos diâmetros dos túbulos seminíferos (Cabral,1996). No presente estudo, foi observada uma recuperação da altura do epitélio germinativo no grupo As2. Entendemos que tal fato se deve ao aumento significativo da túnica própria neste grupo, o que funcionou como proteção para os elementos do epitélio seminífero.

Pode-se afirmar então que, aos 84 dias, os túbulos seminíferos sofreram uma adaptação, para manutenção da sua estrutura.

Parâmetros estruturais como tamanho do testículo, diâmetro tubular e volume dos túbulos seminíferos, estão intimamente relacionados com o comprimento total dos túbulos (França e Russell, 1998). O comprimento total de túbulo não variou significativamente, porém o comprimento de túbulo por grama de testículo aumentou significativamente no grupo As1, comparado aos grupos As2 e controle (Tabela 4). Verifica-se que os animais do grupo As1 compensaram a redução do diâmetro tubular com um aumento no comprimento de túbulo seminífero por grama de testículo. França et al. (2000), ao administrarem cimetidina em duas doses (50,0 e 250,0 mg) em ratos machos, não observaram diferença significativa no comprimento de túbulos seminíferos. Da mesma forma, estudos com paracetamol em doses terapêuticas e supraterapêuticas em ratos, não mostraram variações no comprimento dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo (Morais, 2008).

Tabela 4: Diâmetro tubular ( $\mu\text{m}$ ), altura do epitélio seminífero ( $\mu\text{m}$ ), comprimento total dos túbulos seminíferos (m) e comprimento dos túbulos por grama de testículo (m/g) de camundongos em idade reprodutiva, após tratamento com arsenato (Média  $\pm$  desvio-padrão).

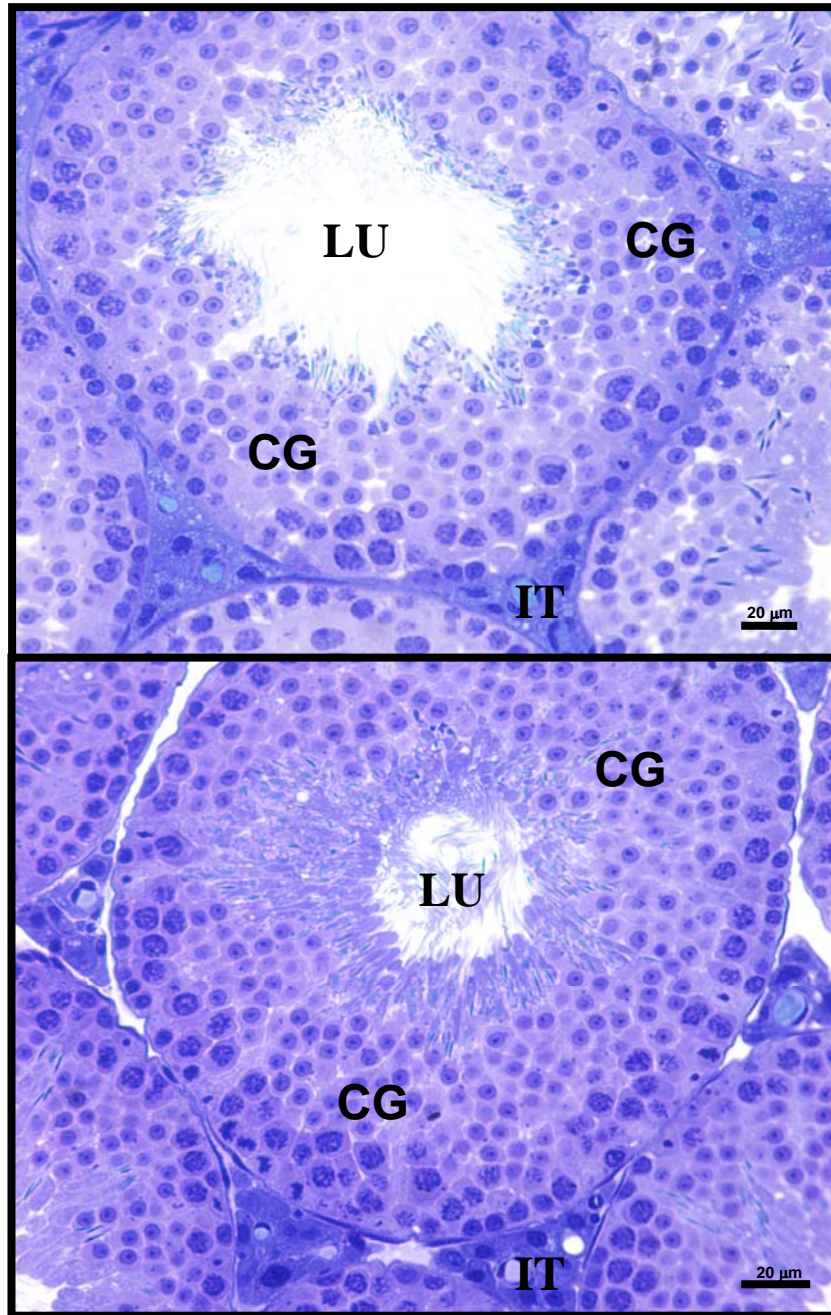
Parâmetros	Grupo Controle	As1	As2
Diâmetro Tubular	161,58 $\pm$ 13,14 <sup>ab</sup>	154,05 $\pm$ 6,80 <sup>b</sup>	166,00 $\pm$ 5,91 <sup>a</sup>
Altura do Epitélio	58,61 $\pm$ 3,94 <sup>ab</sup>	55,74 $\pm$ 3,35 <sup>b</sup>	59,37 $\pm$ 1,97 <sup>a</sup>
Comprimento Total de Túbulos	5,68 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup>	5,75 $\pm$ 0,91 <sup>a</sup>	5,99 $\pm$ 1,91 <sup>a</sup>
Comprimento de Túbulo/ grama de testículo	21,97 $\pm$ 3,23 <sup>ab</sup>	23,63 $\pm$ 2,28 <sup>a</sup>	20,75 $\pm$ 1,60 <sup>b</sup>

Letras iguais nas colunas não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

As1 = 42 dias; As2 = 84 dias.

### 2.7. Alterações histopatológicas

A Figura 1 se refere aos animais controle. Na Figura 1A(C1) e B(C2), observa-se túbulo íntegro com as células germinativas (CG) bem preservadas e epitélio seminífero bem organizado determinando um arranjo normal.

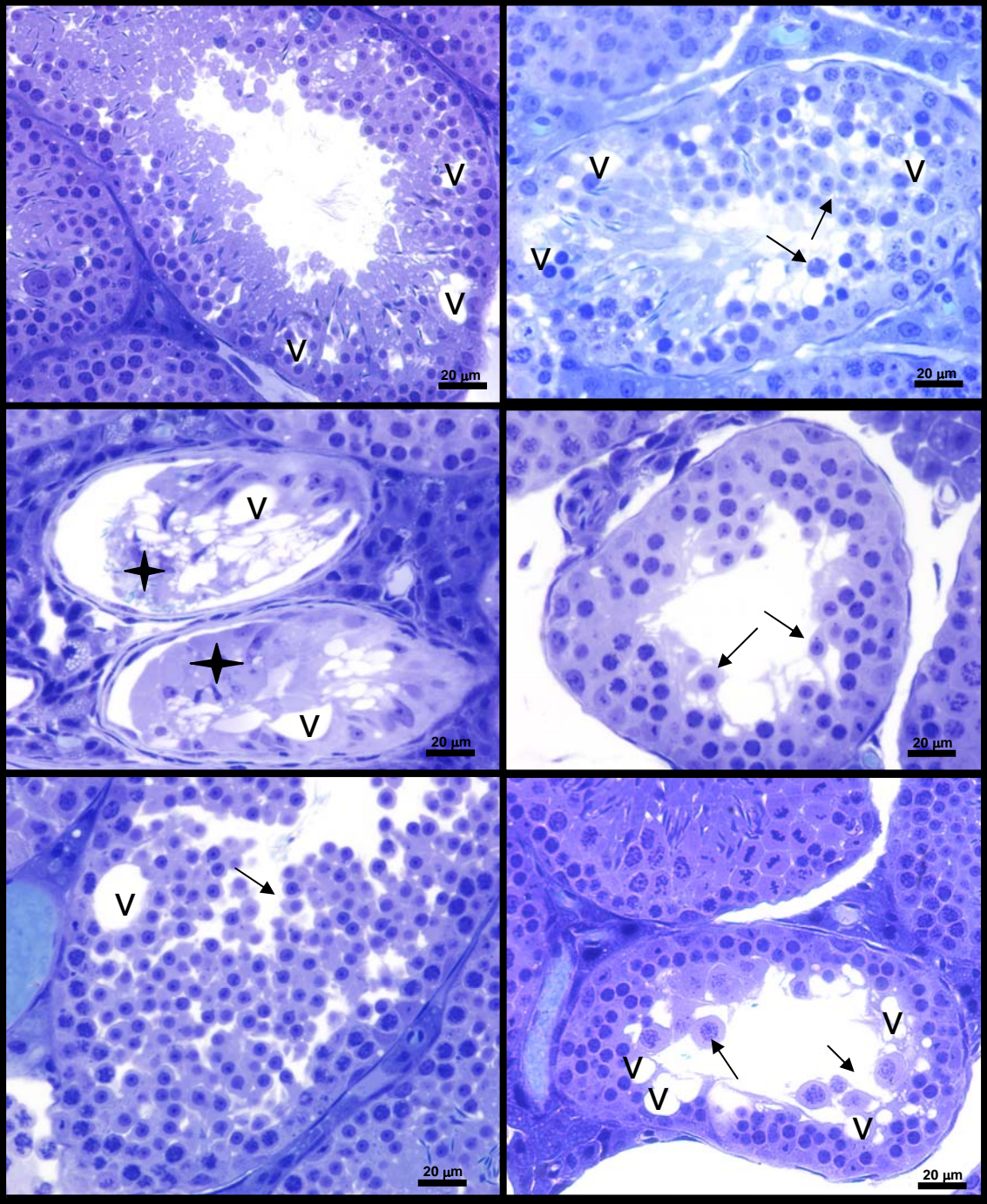


**FIGURA 1:** Fotomicrografia testicular de camundongo *Swiss* do grupo controle. A e B – observa-se túbulos íntegros com processo espermatogênico normal com integridade celular. (CG): células germinativas; (IT): intertúbulo; (LU): lume; Barra: 20 µm. Coloração: Azul de Toluidina.

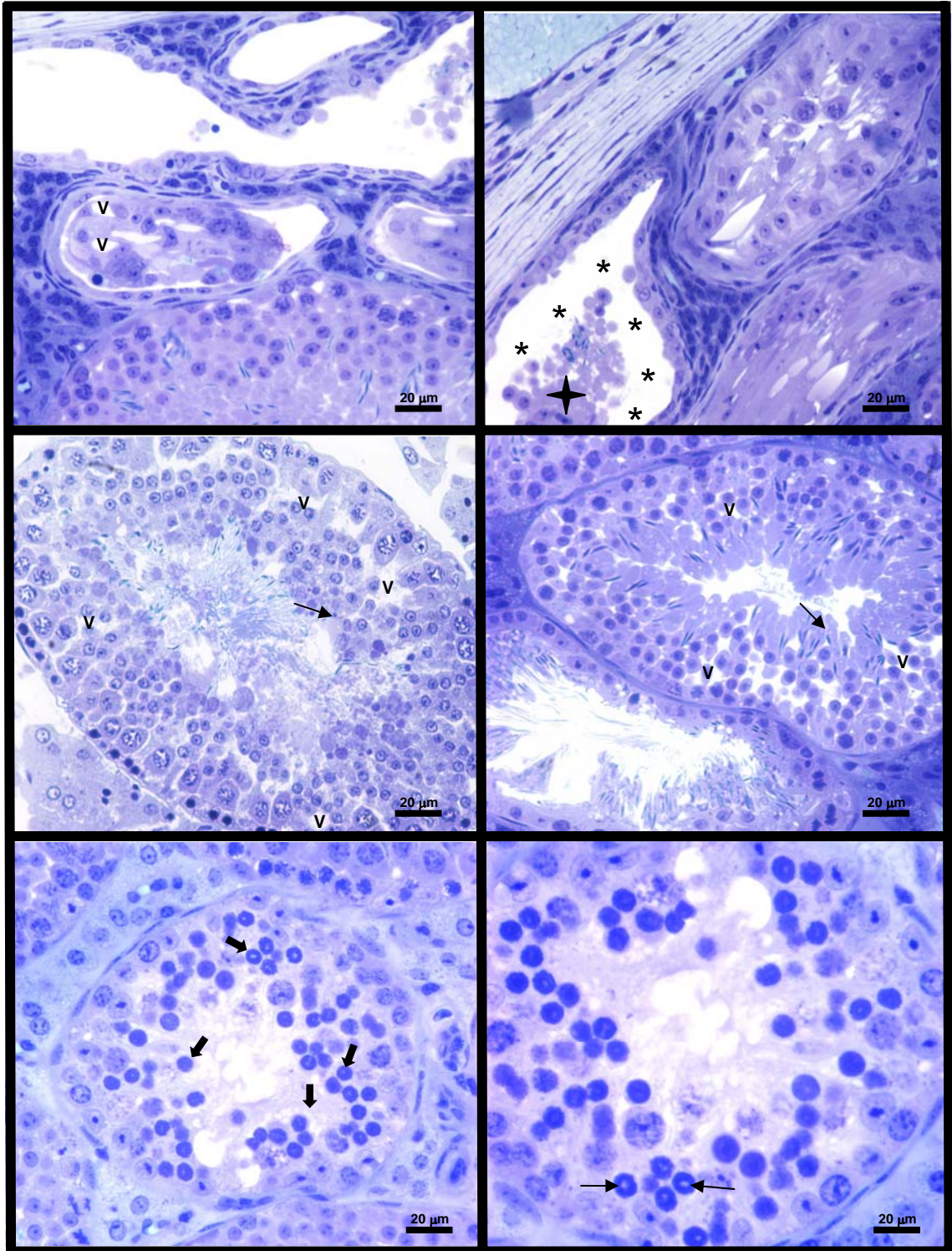
Animais dos grupos As1 e As2 apresentaram danos testiculares, especialmente referentes a patologias de túbulos seminíferos. Na Figura 2 que representa animais do grupo As1, podemos observar algumas alterações tubulares. Em 2A, observa-se uma série de vacúolos citoplasmáticos dos mais variados tamanhos em células de Sertoli ao longo de praticamente todo o epitélio seminífero. A vacuolização é o primeiro sinal morfológico de injúria testicular, mostrado para muitos tóxicos de célula de Sertoli. Na figura 2B, observa-se um túbulo com vacúolos maiores e bem mais definidos, além do início de desprendimento de células germinativas. Células germinativas também mostram vacúolos no citoplasma, além de aparente degeneração nuclear e células com características apoptóticas. Na figura 2C, são mostrados dois túbulos em estado de degeneração mais avançado, onde se pode detectar a ausência de células germinativas restando apenas uma massa de células de Sertoli, caracterizando atrofia tubular. Os vacúolos citoplasmáticos das células de Sertoli preenchem praticamente todo o túbulo. Na figura 2D, evidencia-se o desprendimento de células germinativas em direção ao lúmen, com redução da altura do epitélio seminífero. Esta descamação de células germinativas pode ser devido à perda das junções celulares destas células com a célula de Sertoli e de junções entre elas. Nas figuras 2E e 2F também se observa desprendimento de células da linhagem germinativa para o lúmen, sendo esta patologia mais visível na figura 2F, além de vacúolos distribuídos ao longo do epitélio. Observa-se também a formação de agregados celulares em direção ao lúmen tubular, com o epitélio germinativo apresentando-se desorganizado e comprometendo a espermatogênese.

Pode-se observar algumas patologias encontradas no tratamento As2, semelhantes àquelas do grupo As1. Na figura 3A, observa-se um túbulo onde não são identificadas células germinativas, ocorrendo a formação de um agregado de células de Sertoli em um túbulo nitidamente atrofiado. Neste agregado, observam-se vacúolos citoplasmáticos nas células de Sertoli. Em 3B, observa-se grande desprendimento apical das células germinativas, restando apenas células de Sertoli na porção basal do túbulo. Ainda nesta figura, um espaço claro é visualizado entre o agregado celular e a camada de célula de Sertoli na porção basal do túbulo. Nas figuras 3C e 3D, podem ser detectados vacúolos citoplasmáticos em células de Sertoli e o início do processo de descamação das células germinativas, além de atrofia tubular. Na figura 3E, observa-se espermátides arredondadas apoptóticas, evento observado exclusivamente nos animais do grupo As2. Podem ser detectados também vacúolos e desprendimento celular. A figura 3F representa um aumento da figura anterior, evidenciando uma característica comum em células apoptóticas, que é um halo branco no centro do núcleo uma vez que a cromatina tende a se localizar na periferia nuclear (Figura 3).

**FIGURA 2: Microscopia de luz de tecido testicular de camundongos Swiss do grupo de tratamento 1(42 dias): A- Presença de vacúolos (V) ao longo do epitélio germinativo; B- Evidenciam-se vacúolos(V) e desprendimento celular (seta); C- Túbulos degenerados com presença de vacúolos(V) e massa de células de Sertoli ( \* ); D- Presença de desprendimento celular (seta); E e F- Evidencia-se vacúolos (V) e desprendimento celular para o lúmen (seta), Barra: 20 µm. Coloração: Azul de Toluidina.**



**FIGURA 3: Microscopia de luz de tecido testicular de camundongos *Swiss* do grupo de tratamento 2(84 dias): A- Túbulo com agregado celular no lúmen ( \* ) e presença de vacúolos (V) neste agregado; B- Desprendimento apical de células com formação de agregado celular ( \* ) e um espaço branco se forma entre o agregado e a camada de célula de Sertoli na porção basal do túbulo (\*); C e D- Presença de túbulos com vacúolos e início de descamação de células germinativas (seta); E- Túbulo com presença de espermátides arredondadas apoptóticas (seta); F- Aumento das espermátides apoptóticas evidenciando o halo branco no centro do núcleo característico destas células (seta), Barra: 20  $\mu$ m. Coloração: Azul de Toluidina.**



França et al. (2000), administrando duas doses de cimetidina em ratos machos (50,0 mg e 250,0 mg), observaram anormalidades tubulares como células em degeneração, altura anormal de epitélio e vacuolização epitelial, em ambos grupos tratados. O grupo de menor dose apresentou 17% dos túbulos alterados enquanto o grupo de maior dose teve 15% de alterações. Foram observadas naquele trabalho algumas áreas de túbulos com ausência de células germinativas restando apenas células de Sertoli. Estas mesmas anormalidades foram encontradas nos dois grupos de tratamento com arsênio na presente investigação. Bustos-Obregón et al. (2007a) observaram no grupo de camundongos expostos a 12,0 mg L<sup>-1</sup> de boro, algumas histopatologias como atrofia tubular, obstrução tubular sendo a maioria dessas patologias identificadas como vacuolizações celulares. Espinoza-Navarro et al. (2007), trabalhando com camundongos CF1 que receberam também 12,0 mg L<sup>-1</sup> de boro na água, observaram, além de vacuolização, núcleos picnóticos situados na zona basal do epitélio, sugerindo apoptose de células do túbulo. À semelhança deste trabalho, em um estudo feito com flutamida (10,0 mg Kg<sup>-1</sup> BW) utilizando-se camundongos, foi observado em alguns túbulos seminíferos, o descolamento do epitélio seminífero, no grupo eutanasiado 72 horas após a administração intraperitoneal deste tóxico (Bustos-Obregón et al., 2006). Monteiro et al. (2008) observaram em microscopia de luz, inúmeros vacúolos citoplasmáticos de células de Sertoli em ratos Wistar tratados com Ciclosporina A, como também foi observado neste trabalho, nos grupos tratados com arsênio. Caneguim et al. (2009), ao trabalhar com o imunossupressor tracolimus, numa dosagem de (1,0 mg Kg<sup>-1</sup> por dia) durante 30 dias (T1) e 60 dias (T2), verificaram que os túbulos dos animais controle apresentaram-se normais, com as células germinativas organizadas em camadas concêntricas e o lúmen tubular vazio. As células de Sertoli (SC) possuíam núcleo característico com nucléolo evidente sendo foi observadas no compartimento basal adjacente as células peritubulares, a semelhança do observado nos grupos controle deste presente estudo. Nos grupos tratados, os túbulos seminíferos apresentavam contornos irregulares, mostrando desarranjo das camadas epiteliais e lúmen cheio de células germinativas destacadas. A perda de células foi evidente em túbulos atrofiados (Caneguim et al., 2009). Os núcleos de SC eram irregulares, adjacentes a estes núcleos foram frequentemente observados espaços vacuolares. Ao redor do epitélio alterado, o tecido peritubular se apresentava com contorno irregular e intensamente dobrado. Sendo assim, uma avaliação cuidadosa dos componentes peritubulares pode ser necessária para esclarecer se estas alterações estão relacionadas com o efeito de tracolimus no tecido peritubular (Caneguim et al., 2009).

O tecido peritubular tem importância funcional e estrutural na manutenção das células de Sertoli. Em um estudo com cimetidina, um agente antiandrogênico que causa alterações nos

túbulos seminíferos, incluindo alterações no tecido peritubular e apoptose de células mióides, utilizando-se ratos machos que receberam  $50,0 \text{ mg Kg}^{-1}$  de peso corporal de cimetidina por 52 dias, foi observado com base na microscopia de luz que nos animais controles, os túbulos seminíferos mostraram arquitetura normal, com células germinativas organizadas em camadas concêntricas e destacamentos de células germinativas no lúmen raramente encontrados. Nos animais tratados, os túbulos seminíferos mostraram-se irregulares, espaços intra-epiteliais e células germinativas destacadas enchendo o lúmen tubular, semelhante ao que foi detectado nos grupos tratados do presente estudo. Porções do tecido peritubular com células mióides não evidentes e o núcleo SC deslocado do compartimento basal. Em alguns túbulos, o tecido peritubular se apresentou com contorno irregular e espermatídes alongadas estavam anormalmente distribuídas no epitélio. Desta forma, os números de SC se apresentaram diminuídos nos animais tratados em relação ao controle, provavelmente devido à morte destas células por apoptose (Sasso-Cerri e Cerri, 2008).

Uma íntima relação entre alterações nucleares de SC, incluindo o deslocamento do núcleo da porção basal e os danos no tecido peritubular foram observados. E estes resultados indicam um possível desarranjo do citoesqueleto de SC, incluindo as estruturas de adesão. Estas alterações são relacionadas a apoptose de SC e provavelmente resultam de distúrbios induzidos por cimetidina no tecido peritubular. A redução significativa do tecido peritubular associado à presença de células mióides peritubulares apoptóticas adjacentes a áreas epiteliais normais tem indicado que as células mióides são as primeiras células a serem afetadas pelo tratamento com cimetidina (Sasso-Cerri e Cerri, 2008). Chandra et al. (2007), em análise sob microscopia de luz, observaram que os animais controles mostraram arranjos celulares normais. Por outro lado, nos animais tratados com sais de cromo (Cr) nas doses média ( $0,4 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) e alta ( $0,6 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) por 26 dias e na dose alta ( $0,6 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) por 13 dias, pode ser observados nos testículos tratados diminuição no túbulo seminífero. Nos testículos tratados com alta dose ( $0,6 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) de Cr por 26 dias pode ser observado também destacamento de células germinativas, resultado semelhante ao detectado nos grupos tratados da presente investigação.

Predes et al. (2007), analisando grupos de ratos Wistar tratados com cloreto de cádmio na dose de  $3,0 \text{ } \mu\text{mol Kg}^{-1}$ , observaram em microscopia de luz em alguns túbulos, vacuolização de citoplasma de células de Sertoli, estando de acordo com o observado nos grupos tratados com arsenato. Em outro estudo feito por Yano (2001) foram utilizados ratos Wistar adultos que foram submetidos ao tratamento de cádmio em dose única de cloreto de cádmio administrados intraperitonealmente  $3,0 \text{ } \mu\text{mol Kg}^{-1}$  e/ou tratamento com paracetamol em dose única de  $4,4 \text{ mmol Kg}^{-1}$  em via oral. Os testículos foram analisados após 5, 10 e 15 dias nos tratamentos isolados e 5, 10, 15, 30, 50 e 70 dias no tratamento com ambas as substâncias. Nos cortes dos animais

controles, não foram observadas mudanças significativas após 5, 10 e 15 dias de experimento. O epitélio seminífero manteve a estratificação típica de células em graus progressivos de desenvolvimento após 5 dias. Túbulos em diferentes fases de desenvolvimento, circundados por tecido intersticial discreto e vascularizado foram observados após 10 dias. Observou-se um aumento de células descamadas na luz de alguns túbulos após 15 dias. Nos animais tratados com dose única de cádmio, observaram-se alguns túbulos com epitélio reduzido, em degeneração, e uma abundante descamação de células imaturas na luz tubular. A presença de reentrâncias resultantes do desprendimento de células da camada basal foi evidente aos 10 dias de tratamento. Após 15 dias, houve recuperação na estrutura dos túbulos seminíferos e diminuição das células descamadas na luz em relação ao que foi observado com 5 e 10 dias de tratamento. Nos animais tratados com doses únicas de paracetamol foram observadas lesões tais como, túbulos seminíferos deformados, com desprendimento de células basais, além de edema intertubular e vasodilatação. Nos animais tratados com cádmio e paracetamol associados, as lesões apresentaram-se mais acentuadas. Foi observada uma total descaracterização dos túbulos seminíferos, com desprendimento de células da camada basal com consequente formação de reentrâncias para o interior de túbulos e grandes espaços edematosos. É importante ressaltar que a descamação de células basais em direção ao lúmen tubular e a presença de túbulos degenerados observados nos tratamentos com paracetamol, cádmio e com estes dois compostos associados, foi também observado no presente estudo nos grupos tratados com arsenato de sódio nos dois tempos de exposição diferentes deste composto.

### **3. CONCLUSÕES**

O compartimento tubular dos animais tratados com arsênio foi alterado tanto nas análises morfológicas quanto nas análises de patologias testiculares. Um dado relevante foi o aumento da proporção de túnica própria nos grupos tratados, sugerindo uma possível proteção da ação do arsenato nos túbulos seminíferos, uma vez que a túnica própria faz parte da barreira hemato-testicular que promove a proteção das células da linhagem espermatogênica dentro dos túbulos seminíferos. É importante ressaltar que pode ser observado acúmulo do metal em questão em todos os órgãos analisados confirmando a natureza cumulativa do arsênio. Observou-se alterações bioquímicas, nas enzimas transaminases, sugerindo possíveis danos no fígado e rins, motivando estudos histológicos e patológicos destes órgãos posteriormente.

### **4. AGRADECIMENTOS**

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa.

## 5. REFERÊNCIAS

AMANN, R.P., 1970. The male rabbit. IV. Quantitative testicular histology and comparisons between daily sperm production as determined histologically and daily sperm output. *Fertility and Sterility* 21, 662-672.

ARAÚJO, B.M. Morfometria testicular em ratos wistar adultos tratados com paracetamol (acetaminofeno). (Dissertação de mestrado), 68p. UFV, 2008.

ARENA, A.C. Parâmetros reprodutivos masculinos e fertilidade de ratos adultos expostos ao inseticida fenvalerato. (Dissertação de doutorado). 96p. UNICAMP, 2006.

BENRAMDANE, L.; ACCOMINOTTI, M.; FANTON, L.; MALICIER, D.; VALLON, J.J. Arsenic speciation in human organs following fatal arsenic trioxide poisoning- a case report. *Clin. Chem.*, 45, 301-306, 1999.

BISWAS, N.M.; CHATTOPADHYAY, A.; CHAUDHURI, G.R.; SARKAR, M. Effect of sodium arsenite on spermatogenesis, plasma gonadotrophins and testosterone in rats. *Asian J. Androl.*, 5, 27-31, 2003.

BUSTOS-OBREGÓN, E.; CARVALHO, M.; HARTLEY-BELMAR, R.; SARAIBA, L.; PONCE, C. Histological and histometrical assessment of boron exposure effects on mouse spermatogenesis. *Int. J. Morphol.*, 25, 919-925, 2007 a.

BUSTOS-OBREGÓN, E.; RIO, F.C.; SARABIA, L. Morphometric analysis of mice testicular tubules after administration of malathion and maca. *Int. J. Morphol.*, 25, 245-248, 2007 b.

BUSTOS-OBREGÓN, E.; ESPONDA, P.; SARABIA, L. Effect of flutamide in mouse spermatogenesis and on the function of seminal vesicle and prostate. *Int. J. Morphol.*, 24, 171-174, 2006.

BUSTOS-OBREGÓN, E.; GONZÁLEZ-HORMAZÁBAL, P. Mice testicular damage elicited by Malation. *Int. J. Morphol.*, 21, 155-159, 2003.

CABRAL, F.H.C. Alterações morfológicas testiculares provocadas pelo cádmio, paracetamol e ao cádmio associado ao paracetamol, em ratos. (Dissertação de mestrado), 176p. UNICAMP, 1996.

CANEGUIM, B.H.; CERRI, P.S.; SPOLIDORIO, L.C.; MIRAGLIA, S.M.; SASSO-CERRI, E. Structural alterations in the seminiferous tubules of rats treated with immunosuppressor tacrolimus. *Reproduc.Biol. and Endocrinol.*, **7**,19,2009.

CARMIGNANI, M., BOSCOLO, P., IANNACCONE, A. Effects of chronic exposure to arsenate on the cardiovascular function of rats. *Br. J. Ind. Med.*, **40**, 280–284,1983.

CHANDRA, A.K.; CHATTERJEE, A.; GHOSH, R.; SARKAR, M.; CHAUBE, S.K. Chromium induced testicular impairment in relation to adrenocortical activities in adult albino rats. *Reproduct. Toxicol.*, **24**, 388–396, 2007.

CHAUHAN, A., AGARWAL, M., KUSHWAHA, S., MUTREJA, A. Suppression of fertility in male albino rats following the administration of 50% ethanolic extract of *Aegle marmelos*. *Contraception* **76**, 474-481, 2007.

CHANG, S.I.; JIN, B.; YOUN, P.; PARK, C.; PARK, J.; RYU, D. Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, **218**, 196-203, 2007.

CHIEREGATTO, L.C. Efeito do tratamento crônico com extratos de *Heteropterys aphrodisiaca* O. Mach. E *Anemopaegma arvense* (Vell.) Steff. no testículo de ratos Wistar adultos. (Dissertação de mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 67p., 2005.

CHIOU, T.; CHU, S.; TZENG, W.; HUANG, Y. LIAO, C. Arsenic trioxide impairs spermatogenesis via reducing gene expression levels in testosterone synthesis pathway. *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 1562-1569, 2008.

CREASY DM. Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicol Pathol*, **29**, 64-76, 2001.  
CUI, X.; OKAYASU, R. Arsenic accumulation, elimination, and interaction with copper, zinc and manganese in liver and kidney of rats. *Food and Chem. Toxicol.*, **46**, 3646-3650, 2008.

ESPINOZA-NAVARRO, O.; VILAXA, A.; GRANIFO, L.; ROJAS, S.; RODRÍGUEZ, H. Histological study on the male reproductive organs of mouse CF1 treated with boron. *Int J. Morphol*, 25, 341-346, 2007.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: F. Martinez-Garcia e J. Regadera (Eds), *Male reproduction-a multidisciplinary overview*, Churchill Communications, Madrid, pp. 198-219, 1998.

FRANÇA, L.R.; LEAL, M.C.; SASSO-CERRI, E.; VASCONCELOS, A.; DEBELJUK, L.; RUSSELL, L.D. Cimetidine (Tagamet) is a reproductive toxicant in male rats affecting peritubular cells. *Biology of Reproduction*, 63, 1403-1412, 2000.

GODINHO, C.L. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros. (Dissertação, mestrado). Belo Horizonte, UFMG, 74p, 1999.

GUPTA, G., SRIVASTAVA, A.K., SETTY, B.S. Androgenic regulation of glycolytic and HMP pathway in epididymides and vas deferens of rhesus monkey. *Ind. J. of Experim. Biol.*, 31, 305–311, 1993.

HUGHES, M.F.; KENYON, E.M.; EDWARDS, B.C.; MITCHELL, C.T.; RAZO, L.M.D.; THOMAS, D.J. Accumulation and metabolism of arsenic in mice after repeated oral administration of arsenate. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, 191, 202–210, 2003.

JANA, K.; JANA, S.; SAMANTA, P.K. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. *Reproduct. Biol. and Endocrinol.*, 4, 9, 1-13, 2006.

JORGE, S.G. Hepcentro. In: [www.hepcentro.com.br](http://www.hepcentro.com.br), acessado em 30 de agosto de 2009.

KENYON, E.M.; HUGHES, M.F.; ADAIR, B.M.; HIGHFILL, J.H.; CRECELIUS, E.A.; LLEWELL, H.J.; YAGER, J.W. Tissue distribution and urinary excretion of inorganic arsenic and its methylated metabolites in C57BL6 mice following subchronic exposure to arsenate in drinking water. *Toxicol. and Pharmacol.*, 232, 448-455, 2008.

KLAASSEN, C.D. Heavy metals and heavy metal antagonists. In: Gilman, A.G.; Rall, T.W.; Nies, A.S.; Taylor, P. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 8<sup>a</sup> edição, New York, 1592-614, 1990.

LOHIYA, N.K.; ANSARI, A.S. Male contraceptive agents. In: Joy, K.P. Krishna, A. Krishna, C. Haldar, (Eds.), Comparative endocrinology and reproduction, Narosa Publishing House, New Dehli, 260-77, 1999.

McINTYRE, N. Clinical biochemistry of the liver. In: The Liver in Biology and Disease, Bittar E.E. (Ed.), Elsevier, 2004.

MODI, M.; KAUL, R.K.; KANNAN, G.M.; FLORA, S.J.S. Co-administration of Zinc and n-acetylcysteine prevents arsenic-induced tissue oxidative stress in male rats. Jour. of Trace Elem. in Med. and Biol., 20, 197-204, 2006.

NARANMANDURA, H.; SUZUKI, N.; IWATA, K.; HIRANO, S.; SUZUKI, T. Arsenic metabolism and thioarsenicals in hamsters and rats. Chem. Res. Toxicol., 20, 616-624, 2007.

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

PANT, N.; KUMAR, R.; MURTHY, R.C.; SRIVASTAVA, S.P. Male reproductive effect of arsenic in mice. Biom., 14, 113-117, 2001.

PANT, N.; MURTHY, R.C.; SRIVASTAVA, S.P. Male reproductive toxicity of sodium arsenite in mice. Hum. & Experim. Toxicol., 23, 399-403, 2004.

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

PONNAPAKKAM, T.P.; BAILEY, K.S.; GRAVES, K.A.; ISZARD, M.B. Assessment of male reproductive system in the CD-1 mice following oral manganese exposure. Reproduct. Toxicol., 17, 547-551, 2003.

PREDES, F.S. Associação de cádmio e *Ginkgo biloba* em ratos: avaliação do testículo quanto a modificações de estrutura, ultraestrutura e morfometria. (Dissertação de mestrado), UNICAMP, 64p, 2007.

RODRIGUES, A.S.L.; MALAFAIA,G. Effects of arsenic exposure in human health. Rev.Saúde.Com., 4, 148-159, 2008.

RUSSELL, D.L.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. Mammalian spermatogenesis. In: Russell, D.L., Ettlin, R.A., Sinha Hikim, A.P.; Clegg, E.D.; (eds). Histological and histopathological evaluation of the testis. Florida, Cache River Press, 40p, 1990.

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

SALAWU, E.O.; ADEEYO, O.A.; FALOKUN, O.P.; YUSUF,U.A.; OYERINDE, A.; ADELEKE, A.A. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) prevents lead-induced testicular toxicity. J.Human Reprod. Science, 2, 30-34, 2009.

SASSO-CERRI, E.; CERRI, P.S. Morphological evidences indicate that the interference of cimetidine on the peritubular components is responsible for detachment and apoptosis of Sertoli cells. Reproduct. Biol, and Endocrinol., 6,18, 2008.

NANDI, D.; PATRA, R.C.; SWARUP, D. Oxidative stress indices and plasma biochemical parameters during oral exposure to arsenic in rats. Food and Chemical Toxicology., 44, 1579-1584, 2006.

VALHTER, M. Biotransformation of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice and rats. Environ. Res.,25, 286-293, 1981.

MONTEIRO,J.C.; PREDES,F.S.; MATTA,S.L.P.; DOLDER,H. *Heteropterys aphrodisiaca* infusion reduces the collateral effects of Cyclosporine A on the testis. The Anatom. Rec., 291, 809-817, 2008.

ZENICK, H., CLEGG, E.D., PERREAULT, S.D., KLINEFELTER, G.R., GRAY, L.E. Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach. In: Principles and methods of toxicology. 3. ed. New York: Raven, pp. 937-988, 1994.

YANO, C.L. Aspectos estruturais e ultraestruturais de testículos de ratos submetidos ao tratamento com cádmio e paracetamol. (Dissertação de mestrado), UNICAMP, 88p, 2001.

## Capítulo 2

### Efeitos do arsenato sobre as células de Leydig e componentes intertubulares de testículo de camundongo suíço adulto

#### RESUMO

A preocupação com os potenciais efeitos de vários contaminantes ambientais, dentre eles o arsênio (As) inorgânico, um dos principais poluentes da água, tem atingido alcance mundial. A exposição ao As pode resultar em efeitos tóxicos, agudos ou crônicos, ocasionando diversas patologias, dentre elas aquelas que afetam o sistema reprodutor masculino, como a inibição da androgênese testicular e redução do peso dos testículos. Este trabalho avaliou os efeitos crônicos de arsênio sobre a morfometria de células de Leydig de camundongos adultos. O trabalho foi conduzido dentro dos preceitos éticos para animais de laboratório. Vinte e quatro camundongos foram divididos em três grupos: o controle, que recebeu apenas água destilada e os grupos de tratamento que receberam solução de arsênio na concentração de 1mg/L, durante 42(As1) e 84(As2) dias. Os animais foram contidos e anestesiados com ketamina e Xilazina, pesados e então tiveram os testículos retirados e imersos em Karnovsky por 24 horas, sob refrigeração. Fragmentos dos testículos foram desidratados em série crescente de etanol, incluídos em metacrilato, seccionados na espessura de 3,0 µm e corados com azul de toluidina/borato de sódio. Imagens do parênquima testicular foram obtidas em microscópio de luz e analisadas com o programa Image-Pro Plus. Para a análise da morfometria de Leydig, foram medidos trinta núcleos, escolhendo-se os que apresentavam contorno mais esférico, determinando-se assim o diâmetro nuclear. Foram calculados os volumes nucleares, citoplasmáticos e celulares, além do Índice Leydigossomático (ILS), número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo e a relação nucleopasmática (RNP). Os níveis de testosterona plasmática foram mensurados pelo método ELISA. Para a comparação das médias, foi utilizado o teste de Duncan ( $p < 0,05$ ). Observou-se redução no valor do diâmetro nuclear em As1 e As2, sendo significativo apenas em As1. A RNP foi reduzida apenas em As1 ( $p < 0,05$ ). O ILS diminuiu nos dois grupos tratados ( $p < 0,05$ ). O volume nuclear diminuiu em As1 e As2, sendo significativo apenas em As1. O volume nuclear está correlacionado com o nível de testosterona plasmático. Este dado foi confirmado na mensuração dos níveis deste hormônio, os quais diminuíram nos dois grupos tratados ( $p < 0,05$ ). O volume citoplasmático e celular e o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo, não variaram significativamente. Houve aumento expressivo de macrófagos nos animais expostos por mais tempo à ação do arsênio. A proporção de vasos sanguíneos apresentou queda significativa em As2 em relação ao As1 e controle, ao contrário do ocorrido em relação ao As1, onde ocorreu aumento nesta proporção. Para o vaso linfático, o aumento expressivo nos grupos tratados foi estatisticamente significativo. O volume de células de

Leydig e tecido conjuntivo foram diminuídos nos grupos tratados. Para o volume de macrófago, observou-se aumento expressivo em As2 em relação a As1 e controle. Em relação ao volume de vasos sanguíneos, As1 apresentou aumento em relação ao controle, diminuindo significativamente em As2. Em relação aos dois grupos tratados, o volume de vaso sanguíneo reduziu em As2. Já para o volume de vaso linfático, observou-se aumento significativo nos grupos tratados em relação ao controle. Conclui-se que o As altera os parâmetros morfométricos das células de Leydig além de provocar redução nos níveis de testosterona plasmática.

Palavras chaves: Arsênio, camundongo, célula de Leydig, testosterona

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a ingestão de arsênio inorgânico através da água, tem se tornado uma importante questão de saúde pública. Milhões de pessoas no mundo, principalmente em países em desenvolvimento, são expostas ao arsênio. Este elemento chega aos corpos d'água por fontes de depósitos naturais ou por práticas agrícolas e industriais, principalmente a mineração. Os altos níveis de toxicidade de arsênio são muito bem conhecidos, pois compostos de arsênio são facilmente absorvidos, tanto oralmente quanto por inalação (Barra et al., 2000). As conseqüências da exposição crônica ao arsênio para a saúde humana incluem aumento no risco de várias formas de câncer e numerosos efeitos patológicos, tais como doenças cutâneas (hiperpigmentação e hiperqueratose), gastrointestinais, vasculares, diabetes melitus e neuropatias periféricas (Rodrigues & Malafaia, 2008).

Quanto à ação do arsênio inorgânico, principal forma encontrada na água, no sistema reprodutor masculino pouco é conhecido principalmente no que diz respeito à morfometria testicular. Os principais achados do efeito de arsênio nos testículos e órgãos acessórios são alterações na motilidade e contagem espermática (Sarkar et al, 2003) e alterações hormonais (Chang et al, 2007).

O testículo está dividido em dois compartimentos: o tubular e o intertubular. O primeiro é formado por túbulos seminíferos constituídos de túnica própria, epitélio germinativo e lume. O intertúbulo é formado pelas células de Leydig, que representam a porção endócrina dos testículos dos mamíferos, por células do tecido conjuntivo (macrófagos, mastócitos e fibroblastos), além de vasos sanguíneos e linfáticos (Russell et al., 1990; Sharpe, 1994). As células de Leydig sintetizam a testosterona que mantém a espermatogênese, promove a diferenciação do trato genital masculino, mantém os caracteres sexuais secundários e a função das glândulas acessórias (O'Donnel et al., 2001; Colleta et al., 2005). Em geral, roedores apresentam um padrão de intertúbulo em que as células de Leydig e o tecido conjuntivo ocupam sua maior parte, contrastando assim com o espaço linfático (Fawcett et al., 1973).

A escassez de dados sobre a ação do arsênio sobre a porção androgênica testicular, motivou uma investigação mais detalhada dos seus efeitos. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do arsênio sobre as células de Leydig e os demais componentes do compartimento intertubular de testículos de camundongos adultos, além de verificar alterações nos níveis séricos de testosterona.

## 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1. *Proporção volumétrica dos componentes do intertúbulo*

Observou-se redução da proporção de células de Leydig e de tecido conjuntivo nos dois tratamentos, em relação ao controle. Adicionalmente, a redução em As1 também foi significativa em relação ao grupo As2. Os macrófagos aumentaram significativamente no grupo As2 enquanto o espaço linfático mostrou-se maior nos dois grupos de tratamento. Vasos sanguíneos aumentaram em As1 e apresentaram redução em As2, se comparados ao controle (Tabela 1).

O compartimento intertubular representa a porção endócrina do testículo dos mamíferos. O arranjo e proporção dos seus diferentes componentes, embora variem sobremaneira entre as diferentes espécies estudadas, são responsáveis pela manutenção dos níveis fisiológicos espécie-específicos de andrógenos, tanto no fluido intersticial testicular, como no plasma (Fawcett et al., 1973). A testosterona e a diidrotestosterona sintetizados pelas células de Leydig são andrógenos responsáveis pela diferenciação do trato genital masculino e da genitália externa na fase fetal (Pelliniemi et al., 1996), pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários e pela manutenção quantitativa da espermatogênese a partir da puberdade (Sharpe, 1994; Zirkin et al., 1994; Payne et al., 1996). Os demais componentes do intertúbulo apresentam variação menos evidente quanto à percentagem (Paula et al., 2007).

Monteiro et al. (2008) observaram que no tratamento de ratos Wistar adultos com ciclosporina A, houve diminuição significativa na proporção de células de Leydig e tecido conjuntivo em relação ao controle. Este fato também foi observado no presente trabalho. Em estudo feito com cloreto de cádmio na dose de  $3,0 \mu\text{mol Kg}^{-1}$  em ratos Wistar adultos, não foram observadas variações nas proporções volumétricas dos elementos intertubulares no grupo tratado em relação ao controle (Predes, 2007). Araújo (2008), ao testar o paracetamol em doses terapêutica e supraterapêutica em ratos Wistar adultos, observou redução na proporção de células de Leydig na dose supraterapêutica, 53 dias após o tratamento. Para os outros parâmetros, não foram observadas variações significativas.

Tabela 1: Proporção volumétrica (%) dos componentes no intertúbulo de camundongos em idade reprodutiva, após o tratamento com arsenato. (Média  $\pm$  desvio-padrão).

Proporções	Grupo Controle	As1	As2
Célula de Leydig	73,94 $\pm$ 5,27 <sup>a</sup>	57,22 $\pm$ 5,03 <sup>c</sup>	65,59 $\pm$ 5,07 <sup>b</sup>
Tecido Conjuntivo	3,34 $\pm$ 0,91 <sup>a</sup>	1,40 $\pm$ 0,62 <sup>b</sup>	0,91 $\pm$ 0,58 <sup>b</sup>
Macrófagos	2,86 $\pm$ 0,75 <sup>b</sup>	3,24 $\pm$ 1,10 <sup>b</sup>	8,56 $\pm$ 1,77 <sup>a</sup>
Vaso Sanguíneo	11,05 $\pm$ 4,00 <sup>b</sup>	15,30 $\pm$ 3,48 <sup>a</sup>	5,46 $\pm$ 2,51 <sup>c</sup>
Espaço Linfático	8,81 $\pm$ 3,99 <sup>b</sup>	22,34 $\pm$ 5,80 <sup>a</sup>	19,47 $\pm$ 4,56 <sup>a</sup>

Letras iguais nas colunas não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

As1 = 42 dias; As2 = 84 dias

## 2.2. Volume dos componentes do intertúbulo por testículo

Os volumes dos componentes do intertúbulo por testículo estão expressos na Tabela 2. Houve redução no volume das células de Leydig no grupo As1 ( $p < 0,05$ ), comparado ao controle e ao grupo As2, enquanto o volume de tecido conjuntivo reduziu nos dois grupos de tratamento. Macrófagos aumentaram significativamente em As2, comparado ao controle e As1. Vasos sanguíneos apresentaram aumento de volume em As1 e redução em As2, em relação ao controle. O espaço linfático aumentou ( $p < 0,05$ ) nos dois grupos de tratamento.

Em um estudo feito com ciclosporina A (15,0 mg Kg<sup>-1</sup> por dia) em ratos Wistar adultos, foi observada variação significativa apenas no que diz respeito ao aumento do volume de tecido conjuntivo (Monteiro et al., 2008). No presente trabalho, observamos redução no volume de tecido conjuntivo. Predes (2007), trabalhando com cloreto de cádmio na dose de 3,0  $\mu\text{mol Kg}^{-1}$  em ratos Wistar adultos, não observou variações significativas nos volumes dos componentes intertubulares. Em estudo feito com paracetamol em doses terapêuticas e supraterapêuticas

(Araújo, 2008), os volumes dos vasos sanguíneos e dos vasos linfáticos não variaram de forma significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). O menor valor observado para o volume total do tecido conjuntivo foi registrado no grupo que recebeu dose supraterapêutica e foi sacrificado 53 dias após o término do tratamento. O volume total das células de Leydig também reduziu significativamente nos grupos que receberam dose terapêutica e supraterapêutica e que foram sacrificados 53 dias após o tratamento (Araújo, 2008). No presente trabalho, observou-se também redução no volume total de células de Leydig nos grupos tratados com arsenato de sódio em dois tempos de exposição diferentes, e o menor valor observado para volume de tecido conjuntivo foi observado no maior tempo de exposição ao arsenato de sódio. Diferentemente do que foi observado no estudo com paracetamol, no presente estudo, os volumes dos demais componentes intertubulares sofreram variações entre os grupos tratados com arsênio.

Tabela 2: Volume dos elementos do intertúbulo (ml) por testículo de camundongos em idade reprodutiva, após tratamento com arsenato (Média  $\pm$  desvio-padrão).

Volume	Grupo Controle	As1	As2
Célula de Leydig	0,0075 $\pm$ 0,0007 <sup>a</sup>	0,0059 $\pm$ 0,0010 <sup>b</sup>	0,0068 $\pm$ 0,0015 <sup>ab</sup>
Tecido Conjuntivo	0,0003 $\pm$ 0,0001 <sup>a</sup>	0,0002 $\pm$ 0,0001 <sup>b</sup>	0,0001 $\pm$ 0,0001 <sup>b</sup>
Macrófago	0,0003 $\pm$ 0,0001 <sup>b</sup>	0,0003 $\pm$ 0,0001 <sup>b</sup>	0,0009 $\pm$ 0,0001 <sup>a</sup>
Vaso Sanguíneo	0,0011 $\pm$ 0,0004 <sup>b</sup>	0,0016 $\pm$ 0,0005 <sup>a</sup>	0,0006 $\pm$ 0,0003 <sup>c</sup>
Espaço Linfático	0,0009 $\pm$ 0,0006 <sup>b</sup>	0,0024 $\pm$ 0,0007 <sup>a</sup>	0,0020 $\pm$ 0,0006 <sup>a</sup>

Letras iguais nas colunas não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

As1 = 42 dias; As2 = 84 dias

### 2.3. Morfometria de células de Leydig

Os dados de morfometria de células de Leydig estão expostos na Tabela 4. Houve redução do diâmetro nuclear desta célula no grupo As1 apenas. Porém, o volume nuclear apresentou-se menor nos dois grupos que receberam arsênio. A proporção de núcleo e citoplasma das células de Leydig apresentou redução no grupo As1, sendo que no grupo As2, apenas o percentual de núcleo reduziu. O índice Leydigossomático, que é um parâmetro que visa quantificar o investimento em células de Leydig com relação ao peso corporal, apresentou-se reduzido significativamente nos dois grupos de tratamento. Os demais parâmetros analisados não apresentaram alterações significativas ( $p > 0,05$ ).

Estudos correlacionando estrutura e função das células de Leydig em várias espécies de mamíferos mostrou que variações na secreção de testosterona resultam mais da capacidade individual desta célula em secretar andrógenos do que de diferenças no volume total das mesmas (Ewing et al., 1979). Neste sentido, Costa e Paula (2006) correlacionaram positiva e significativamente o volume individual da célula de Leydig com o nível sérico de testosterona na capivara. Para Zirkin et al. (1980), a capacidade produtiva da célula de Leydig está altamente relacionada à quantidade de retículo endoplasmático liso presente nesta célula. Castro et al. (2002) descreveram que, em coelhos, existe uma correlação altamente significativa do percentual volumétrico do núcleo e do número de células de Leydig por grama de testículo, com os níveis plasmáticos e testiculares de testosterona.

Tabela 3: Dados morfométricos de células de Leydig, em camundongos tratados com arsenato durante 42 (As1) e 84 dias (As2). RNP = relação nucleoplasmática; ILS = índice Leydigossomático; número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo ( $\times 10^6$ ) (Média  $\pm$  desvio-padrão).

Parâmetros	Grupo Controle	As1	As2
Diâmetro			
Nuclear ( $\mu\text{m}$ )	7,25 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	6,65 $\pm$ 0,26 <sup>b</sup>	7,07 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>
Núcleo (%)	11,31 $\pm$ 1,55 <sup>a</sup>	7,60 $\pm$ 1,21 <sup>c</sup>	9,19 $\pm$ 0,77 <sup>b</sup>
Citoplasma (%)	62,62 $\pm$ 4,65 <sup>a</sup>	49,62 $\pm$ 4,54 <sup>c</sup>	56,40 $\pm$ 5,03 <sup>b</sup>

RNP	18,10 ± 2,34 <sup>a</sup>	15,38 ± 2,44 <sup>b</sup>	16,40 ± 1,96 <sup>ab</sup>
ILS	0,021 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,016 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,017 ± 0,003 <sup>b</sup>
Volume			
Nuclear (µm <sup>3</sup> )	199,89 ± 11,31 <sup>a</sup>	154,94 ± 17,22 <sup>b</sup>	186,04 ± 20,37 <sup>a</sup>
Volume do			
Citoplasma (µm <sup>3</sup> )	1122,89 ± 182,98 <sup>a</sup>	1021,89 ± 143,23 <sup>a</sup>	1143,19 ± 136,03 <sup>a</sup>
Volume			
Celular (µm <sup>3</sup> )	1322,79 ± 136,41 <sup>a</sup>	1176,63 ± 148,02 <sup>a</sup>	1329,23 ± 146,12 <sup>a</sup>
Número de Células/ Testículo	5,71 ± 0,92 <sup>a</sup>	5,05 ± 1,03 <sup>a</sup>	5,13 ± 1,29 <sup>a</sup>
Número de Células/ grama de Testículo	44,31 ± 8,79 <sup>a</sup>	41,31 ± 5,80 <sup>a</sup>	36,44 ± 7,22 <sup>a</sup>

Letras iguais nas colunas não diferem significativamente entre si (p>0,05).

As1 = 42 dias; As2 = 84 dias

O valor estimado de ILS para camundongos é de 0,03% (Russell, 1996). Animais tratados com arsenato de sódio mantiveram uma média inferior à citada acima, tendo variado significativamente em relação ao grupo controle, que se aproximou do valor referência para este parâmetro.

De acordo com Castro et al. (2002), o volume nuclear da célula de Leydig está altamente correlacionado com o nível de testosterona testicular e plasmático. O presente estudo está em concordância com esses autores, pois houve considerável redução no diâmetro e no volume nuclear de células de Leydig nos animais que receberam arsênio, coincidindo com a redução de testosterona plasmática (Figura 1).

Apesar de as médias referentes ao número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo em animais tratados não terem sofrido variações significativas entre si, os grupos tratados permaneceram abaixo dos valores encontrados para o grupo controle, porém acima das médias encontradas por Mori et al. (1982), em camundongos adultos normais, que foi de 3 milhões para número de Leydig por testículo e 24,9 milhões para número de Leydig por grama de testículo. Inúmeros fatores podem influenciar na quantidade necessária de células de Leydig por

animal, dentre eles, a quantidade de LH disponível, o número de receptores de LH por célula, quantidade de testosterona que a célula de Leydig é capaz de secretar em um dado tempo, a velocidade pela qual a testosterona deixa o testículo via vasos linfáticos, vasos sanguíneos e fluido seminal, o volume sanguíneo do animal e a taxa de metabolismo da testosterona (Russell et al., 1994; Russell, 1996). Trabalhando com camundongos, Chiou et al. (2008) verificaram aumento do número de células de Leydig por testículo após tratamento com trióxido de arsênio ( $As_2O_3$ ) por três semanas, nas doses de 0,15; 0,3; 1,5 e 3,0 mg  $Kg^{-1}$ . Este resultado explica porque a testosterona avaliada não reduziu após tratamento com  $As_2O_3$ , com exceção da dose de 3,0 mg  $Kg^{-1}$  (Chiou et al, 2008). Monteiro et al. (2008), ao analisarem a morfometria de células de Leydig em ratos Wistar tratados com Ciclosporina A (15,0 mg  $Kg^{-1}$  por dia), não observaram variação significativa em nenhum dos parâmetros analisados, comparado-se o grupo tratado e o grupo controle. A administração crônica de doses terapêuticas e supraterapêuticas de paracetamol apresentaram pouco efeito sobre a porção endócrina do testículo, porém, naqueles animais submetidos a tratamento com doses supraterapêuticas de paracetamol e sacrificados 53 dias após o tratamento, houve redução na maioria dos parâmetros analisados. Assim, houve redução do diâmetro do núcleo de células de Leydig, do índice Leydigossomático e no número total de células de Leydig. Os demais parâmetros não variaram significativamente (Araújo, 2008). Em estudo feito com cloreto de cádmio na dose de 3,0  $\mu$ mol  $Kg^{-1}$  administrados em ratos Wistar adultos por 56 dias, observou-se redução significativa no volume individual das células de Leydig, no diâmetro nuclear e nos volumes nucleares e citoplasmáticos destas células. Os outros parâmetros (número de célula de Leydig por testículo e por grama de testículo) não sofreram variações (Predes, 2007), similar ao observado também no presente estudo utilizando arsenato de sódio, nos dois tempos diferentes de exposição.

#### 2.4. Determinação plasmática de testosterona

Os resultados da determinação plasmática de testosterona estão expressos na Figura 1.

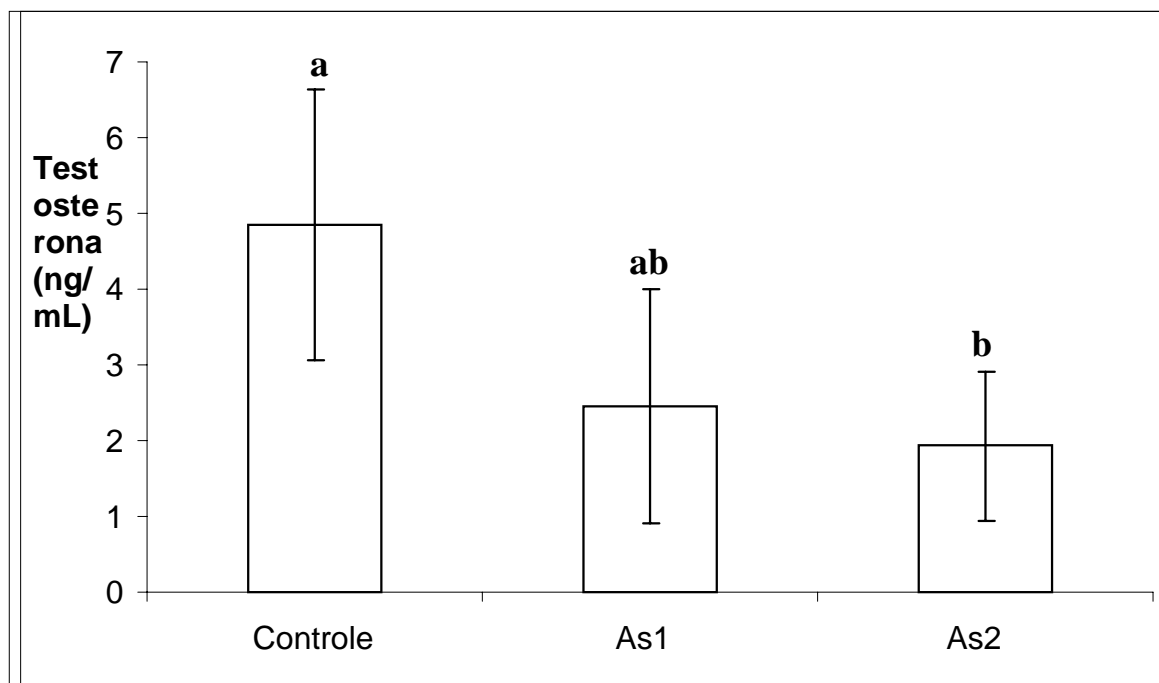


Figura 1: Testosterona plasmática de camundongos adultos após administração de arsênio durante 42 dias (As1) e 84 dias (As2).

Houve redução da testosterona plasmática no grupo As2, que ficou mais tempo exposto à ação do arsênio. Animais do grupo As1, apesar de não apresentarem redução significativa da testosterona plasmática comparados àqueles do grupo controle, mostraram redução nos parâmetros de células de Leydig relacionados à produção hormonal. Em estudo onde o arsenito de sódio foi administrado intraperitonealmente em ratos, nas concentrações de 4,0, 5,0 e 6,0 mg Kg<sup>-1</sup> por dia por 26 dias, foi detectada diminuição dos níveis plasmáticos de testosterona nos animais que receberam as maiores doses de arsenito (Sarkar et al., 2003). Redução dos níveis plasmáticos de testosterona também foi observada em camundongos que receberam arsenito na água de beber nas concentrações de 20,0 e 40,0 mg L<sup>-1</sup>. Neste mesmo estudo, também foi detectado diminuição da atividade de enzimas-chave na rota de biossíntese de testosterona (Chang et al, 2007). Jana et al (2006), ao administrarem arsenito de sódio em ratos albinos na concentração de 5,0 mg Kg<sup>-1</sup> por dia por quatro semanas, observaram também diminuição nos níveis plasmáticos e testiculares de testosterona no grupo tratado quando comparado com seu respectivo controle. Adicionalmente, algumas enzimas importantes na biossíntese de testosterona tiveram suas atividades reduzidas no grupo tratado com arsenito. Camundongos machos que receberam trióxido de arsênio por injeção

subcutânea por 3 semanas nas dosagens de 0,15; 0,3; 1,5; e 3,0 mg Kg<sup>-1</sup>, tiveram seus níveis plasmáticos e testiculares de testosterona reduzidos significativamente nos grupos tratados em relação ao controle. A redução dose-dependente dos níveis plasmáticos de testosterona pode ocorrer pela diminuição da atividade das enzimas androgênicas testiculares ou pela inibição da secreção de testosterona pelas células de Leydig. Verificou-se também diminuição da expressão de mRNA de enzimas envolvidas na síntese de testosterona (Chiou et al, 2008).

### **3. CONCLUSÕES**

O compartimento intertubular se mostrou bastante alterado em resposta à administração de arsênio via água de beber, uma vez que todos os elementos intertubulares analisados tiveram suas proporções e volumes alterados nos grupos tratados. Em se tratando da principal célula deste compartimento, a célula de Leydig, produtora de testosterona, praticamente todos os parâmetros morfométricos relacionados a ela se encontraram alterados, inclusive os níveis de testosterona plasmática determinados neste trabalho.

### **4. AGRADECIMENTOS**

À Fundação de amparo a pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo concessão da bolsa.

## 5. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, B.M. Morfometria testicular em ratos wistar adultos tratados com paracetamol (acetaminofeno). (Dissertação de mestrado), UFV, 65p, 2008.

BARRA, C.M.; SANTELLI, R.E.; ABRÃO, J.J.; GUARDIA, M.D.L. Especificação de arsênio-uma revisão. Quím. Nov., 23, 58-70, 2000.

CASTRO, A.C.S.; BERNDTSON, W.E.; AND CARDOSO, F.M. Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cell and spermatogenic efficiency of rabbits. Brazilian J. of Med. and Biol. Res., 35, 493-498, 2002.

CHANG, S.I.; JIN, B.; YOUN, P.; PARK, C.; PARK, J.; RYU, D. Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. Toxicol. and Appl. Pharmacol., 218, 196-203, 2007.

CHIOU, T.; CHU, S.; TZENG, W.; HUANG, Y.; LIAO, C. Arsenic trioxide impairs spermatogenesis via reducing gene expression levels in testosterone synthesis pathway. Chem. Res. Toxicol., 21, 1562-1569, 2008.

COLLETA HHMD, CARVALHO HF. Células de Leydig. In: CARVALHO HF, COLARES-BUZATO CB (eds) Células: Uma abordagem multidisciplinar. São Paulo: Manole, 325-334, 2005.

COSTA, D.S.; PAULA, T.A.R. Testosterone level, nasal gland volume and Leydig cell morphometry in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Arq. Brás. de Med. Vet. e Zoot., 58, 1086-1094, 2006.

EWING, L.L. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea, pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. Endocrinol., 105, 1135-1142, 1979.

FAWCETT DW, NEAVES WB, FLORES MN. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. Biol. Reprod., 9, 500-532, 1973.

JANA, K.; JANA, S.; SAMANTA, P.K. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. *Reprod. Biol. and Endocrinol.*, 4,1-13, 2006.

MONTEIRO, J.C.; PREDES, F.S.; MATTA, S.L.P.; DOLDER, H. *Heteropterys aphrodisiaca* infusion reduces the collateral effects of Cyclosporine A on the testis. *The Anatom. Record.*, 291,809-817, 2008.

MORI H, SHIMIZU D, FUKUNISHI Y, CHRISTENSEN AK. Morphometric analysis of testicular Leydig cells in normal adult mice. *Anat. Rec.*, 204, 33-339, 1982.

ODONNEL, L., ROBERTSON K.M.; JONES, M.E.; SIMPSON, E.R. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr. Rev.*, 22, 289-318, 2001.

PAULA, T.A.R, MATTA, S.L.P., SILVA, V.A., COSTA, D.S., FONSECA, C.C., NEVES, M.T.D. Intertubular space characterization in adult capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) testis. *Braz. Arch. Biol. Technol.*,50,289-297, 2007.

PELLINIEMI, L.J.; KUOPIO, T.; FROJDMAN, K. The cell biological and function of the fetal Leydig cell. In: PAYNE, A. H.; HARDY, M. P.; RUSSELL, L. D. *The Leydig cell*. Vienna: Cache River Press, 20p, 1996.

PREDES, F.S Associação de cádmio e *Ginkgo biloba* em ratos: avaliação do testículo quanto a modificações de estrutura, ultraestrutura e morfometria. (Dissertação de mestrado), UNICAMP, 64p, 2007.

RODRIGUES, A.S.L.; MALAFAIA,G. Effects of arsenic exposure in human health. *Rev. Saude. Com.*, 4, 148-159, 2008.

RUSSELL, L.D., CHANDRASHEKAR, V., BARTKE,A., SINHA\_HIKIM,A.P.The hamsters Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. Int. J. Androl., 17, 93–106,1994.

RUSSELL,L.D., FRANÇA,L.R. Building a testis. Tiss.Cell., 27, 129-147, 1995.

RUSSELL,L.D. Mammalian Leydig cell structure. In: PAYNE, A.H., HARDY, M.P., RUSSELL, L.D. The Leydig Cell. Vienna: Cache River Press, pp: 43–96, 1996.

SALAWU, E.O.; ADEEYO, O.A.; FALOKUN, O.P.; YUSUF, U.A.; OYERINDE, A.; ADELEKE, A.A. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) prevents lead-induced testicular toxicity. J. Human. Reprod. Sci., 2, 30-34, 2009.

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

SHARPE,R.M.. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E., NEILL, J.D, The physiology of reproduction. New York: Raven Press. pp: 1363-1434, 1994.

ZIRKIN,B.R. Tesstosterone secretion by rat, rabbit, guinea pigs and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell ultrastructure. Endocrinol.,107, 1867-1874, 1980.

ZIRKIN,B.R FSH required for adult spermatogenesis? J. of Androl., 15, 3-276, 1994.

## CONCLUSÕES GERAIS

Em sumo, o presente estudo comprovou o efeito do arsênio na concentração de  $1,00 \text{ mg L}^{-1}$  no testículo de camundongos, sugerindo um possível efeito deletério deste metal na fertilidade masculina, a longo prazo. Mais especificamente, podemos concluir que:

- O tratamento com arsenato de sódio na concentração de  $1 \text{ mg/l}$  via água de consumo em camundongos Swiss adultos, aumentou significativamente o peso corporal no grupo de 84 dias de tratamento em relação ao grupo de 42 dias e o controle. Já o peso testicular não variou significativamente entre os grupos tratados;
- Órgãos sexuais acessórios como epidídimo, vesícula seminal e ducto deferente não apresentaram alteração de peso. A próstata teve seu peso reduzido nos dois grupos de tratamento;
- Fígado e rim apresentaram redução no peso nos dois tratamentos;
- Houve acúmulo de arsênio em todos os órgãos analisados, sendo maior nos animais que ficaram mais tempo expostos ao tóxico;
- A alanina aminotransferase (ALT) não apresentou alterações;
- A aspartato aminotransferase (AST) aumentou no grupo de animais que ficaram mais tempo recebendo arsênio;
- O aumento de AST sinaliza para a toxicidade do arsênio na função hepática e renal, motivando assim estudos histológicos e morfométricos destes órgãos posteriormente;
- A proporção de túnica própria se mostrou aumentada nos grupos tratados em relação ao controle, sugerindo uma possível proteção da ação do arsenato nos túbulos seminíferos, uma vez que a túnica própria faz parte da barreira hemato-testicular que promove a proteção das células da linhagem espermatogênica dentro dos túbulos seminíferos. Já a proporção de epitélio seminífero foi diminuída significativamente no grupo de tratamento de 42 dias;

- O diâmetro tubular e o epitélio seminífero se apresentaram recuperados no grupo de tratamento de 84 dias em relação ao grupo de 42 dias;
- O arsênio causou diferentes patologias testiculares, particularmente nos túbulos seminíferos;
- Houve redução na proporção de células de Leydig, bem como no seu diâmetro nuclear e volume;
- Houve aumento expressivo de macrófagos nos animais expostos por mais tempo à ação do arsênio;
- A proporção de vasos sanguíneos apresentou queda significativa em As2 em relação ao As1 e controle, ao contrário do ocorrido em relação ao As1, onde ocorreu um aumento nesta proporção. Para o vaso linfático, o aumento expressivo nos grupos tratados foi estatisticamente significativo;
- O volume de células de Leydig e tecido conjuntivo foram diminuídos nos grupos tratados. Para o volume de macrófago, observou-se um aumento significativamente expressivo em As2 em relação a As1 e controle. Em relação ao vaso sanguíneo, o volume de As1 aumentou significativamente em relação ao controle, diminuindo significativamente em As2. Em relação aos dois grupos tratados, o volume de vaso sanguíneo reduziu em As2. Já para o volume de vaso linfático, observou-se um aumento significativo nos grupos tratados em relação ao controle;
- Na morfometria de células de Leydig, o diâmetro nuclear, a proporção de núcleo e citoplasma, o ILS e o volume nuclear foram reduzidos significativamente nos dois grupos de tratamento. Já a relação nucleoplasmática (RNP) foi reduzida significativamente apenas no grupo de 42 dias. Desta forma, detectamos que o arsênio afeta a porção endócrina do testículo;
- Os níveis plasmáticos de testosterona apresentaram-se reduzidos nos dois grupos de tratamento;
- Este trabalho confirmou a toxicidade do arsênio na concentração de  $1,00 \text{ mg L}^{-1}$  em dois períodos de exposição diferentes.