

KYVIA LUGATE CARDOSO COSTA

**DANOS TESTICULARES EM RATOS SUBMETIDOS A DIFERENTES
DOSES DE CHUMBO: AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA,
ULTRAESTRUTURAL E BIOQUÍMICA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

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

T

C837d
2013

Costa, Kyvia Lugate Cardoso, 1984-

Danos testiculares em ratos submetidos a diferentes doses de chumbo : avaliação histomorfométrica, ultraestrutural e bioquímica / Kyvia Lugate Cardoso Costa. – Viçosa, MG, 2013.

xiii, 86f. : il. ; 29cm.

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Rato - Reprodução. 2. Testículos - Efeito do chumbo.
3. Leydig, Células de. 4. Stress oxidativo. 5. Testosterona.
6. Rato - Toxicologia. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 599.352

KYVIA LUGATE CARDOSO COSTA

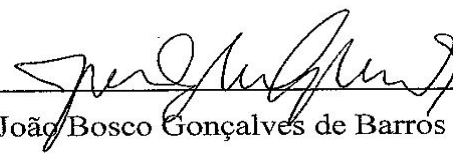
**DANOS TESTICULARES EM RATOS SUBMETIDOS A DIFERENTES
DOSES DE CHUMBO: AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA,
ULTRAESTRUTURAL E BIOQUÍMICA**

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

APROVADA: 11 de Março de 2013.



Hélio Chiarini-Garcia




João Bosco Gonçalves de Barros



Juraci Alves de Oliveira



Mariana Machado Neves



Sérgio Luis Pinto da Matta
(Orientador)

*“Não sei... se a vida é curta
ou longa demais para nós,
mas, sei que nada
do que vivemos tem sentido,
se não tocamos o coração das
pessoas.*

*Muitas vezes basta ser:
o colo que acolhe,
o braço que envolve,
a palavra que conforta,
o silêncio que respeita,
a alegria que contagia,
a lágrima que corre,
o olhar que acaricia,
o desejo que sacia,
o amor que promove.*

*E isso não é coisa de outro mundo,
é o que dá sentido à vida.
É o que faz com que ela não
seja nem curta, nem longa demais,
mas que seja intensa, verdadeira,
pura enquanto ela durar...*

*Feliz aquele que transfere o que sabe
e aprende o que ensina.”*

Cora Coralina

Aos meus amados pais, Sebastião e Selma

Aos meus amados irmãos, Kelly e Kyrk

Ao meu amor, Leandro

AGRADECIMENTOS

A Deus por colocar tantas pessoas iluminadas em meu caminho, por estar comigo em todos os momentos e por me presentear a cada dia com novos ensinamentos.

Aos meus amados pais, Sebastião e Selma, pelo amor incondicional, pelo aprendizado constante, pelo exemplo de força em momentos difíceis e por compreenderem as escolhas da minha vida. Nada disso seria possível sem o apoio de vocês.

Aos meus amados irmãos, Kelly e Kyrk, por vibrarem comigo a cada conquista, por me apoiarem e torcerem por mim. Amo vocês!

Ao Leandro, grande companheiro, amigo, conselheiro, pelo qual tenho imensa admiração e amor! A vida ao seu lado é simples, doce e feliz! Sem você, minha jornada seria muito mais difícil. Essa conquista é nossa! Te amo!

À minha querida família de Carangola-MG e Itabirito-MG pelo carinho e incentivo em todos os momentos.

Aos amigos e professores de graduação, Fabiana C. S. A. de Melo, Fabiano R. de Melo e Braz A. P. Cosenza por me permitirem sonhar com a pesquisa. Vocês me fizeram acreditar que tudo isso seria possível.

Ao amigo e Prof. Luiz Eduardo F. Fontes por me apoiar com a primeira bolsa de estágio, garantindo por um tempo a minha estada em Viçosa-MG. Devo muito a você que com carinho, confiou em mim e me permitiu ir em busca de meus sonhos.

Ao querido orientador e para sempre amigo Prof. Sérgio Luis P. Matta. Chegar até aqui só foi possível porque você esteve em meu caminho. Agradeço a confiança, os ensinamentos, a paciência durante todos esses anos juntos. Você é muito especial em minha vida! Muito obrigada por tudo!

Aos professores Juraci Alves de Oliveira, João Paulo Viana Leite, Mariana Machado Neves e Juliana Silva Rocha, por toda dedicação, amizade, estímulo e apoio dispensados ao longo do trabalho.

Aos estagiários, Arthur, Silvana, Thamires, Raquel, Clarissa e Vivi pela confiança e ajuda na condução dos experimentos. Em especial, à Marcela e Patrícia, pela amizade, carinho e auxílio em algumas análises. Muito obrigada!

Aos funcionários, professores e alunos da Fundação FAFILE de Carangola/UEMG que me acolheram com carinho. Em especial, aos amigos e

professores Alex, Vivi, Vidigal, Braz e Jaquelina, por todo carinho e pela oportunidade de crescimento profissional.

À amiga Karine que nunca mediu esforços para me ajudar, pela amizade e carinho, pela força em todos os momentos e grande ajuda no processamento do material para microscopia eletrônica.

Ao amigo e parceiro Marcos de Lucca, por todo carinho, atenção e ajuda ao longo desses anos. Você é muito especial!

As amigas-irmãs, Marli, Susu, Aninha, Juliana, Fabíola, Karine, Bruninha, Fefê, Ana Guria, Cris, Ana Laura, Tássya e Camilinha pelo grande apoio, pela força nos momentos de dificuldade, por todo carinho e pela amizade linda que construímos! Tudo isso valeu a pena porque vocês sempre estiveram vibrando e torcendo comigo! Amo vocês!

À grande amiga e companheira de todas as horas e experimentos, Marli, com quem tive a oportunidade de compartilhar momentos maravilhosos. Obrigada pelo prazer de ter a sua amizade e carinho. Você é o meu orgulho!

As “sobrinhas” lindas, Ana Clara, Ana Luiza e Liz, que muito me encantam.

Aos amigos do laboratório e da vida: Karine, Marli, Suellen, Fabíola, Juliana Silveira, Daiane, Diane, Pamella, Bruna Moraes, Bruna Fontana, Alex, Matheus, Dani, Marta, Ana Paula, Rômulo, Arlete, Reggiani, Grazi, Tati, Susana, Camila, Vivi, Carol, Claudinha, Marcinha, Edson, Michele, Maytê, Glenda, Ana Cláudia, Helen, Kenner, Jefferson e Ítalo, pelos momentos de cooperação e descontração. Todos os momentos com vocês foram de grande aprendizado.

Aos amigos do Museu de Zoologia João Moojen da UFV, pelos momentos de descontração e carinho. Vocês são muito especiais!

Aos amigos e irmãos de república, Bebê, Rique, Fefê, Ana Guria, Cris, Ana Laura, Tássya, Camilinha e Camilinho (agregado), pela convivência e por serem a minha família em Viçosa! Jamais esquecerei tudo o que vivemos! Amo vocês!

Aos amigos Vivi, Thiago, Gláucia, Renato, Letícia, Marim, Jéssica, Fafá, Palito, André, Nina, Camilinha, pelo incentivo, carinho e convivência agradável todos esses anos.

À Dona Maria, pelas palavras de incentivo, carinho e orações.

À professora Maria do Carmo Pelúzio e a estudante Carol pelo auxílio e disponibilização de equipamentos e laboratórios para análises de enzimas de estresse oxidativo.

Aos funcionários de Pós-graduação de Biologia Celular e Estrutural e do Departamento de Biologia Geral, especialmente à Elizabeth, pelo atendimento atencioso, pela competência, carinho e amizade.

Aos funcionários do Biotério Central da UFV, Adão e Juliano, pelo apoio no fornecimento dos animais e ao Sr. Toninho, funcionário do departamento de Nutrição, pela preciosa ajuda e bons momentos de descontração.

Ao Departamento de Medicina Veterinária e Biologia Vegetal por cederem o equipamento para a captura de imagens.

Ao Prof. Antonio José Natali e Prof.^a Hércia Stampini Duarte Martino por disponibilizarem o espaço e a estrutura necessária para realização dos experimentos.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização de um sonho, pelo crescimento profissional e pessoal.

Ao Instituto Estadual de Florestas (IEF) pela concessão de bolsa de pesquisa durante o primeiro ano de doutorado.

À FAPEMIG pela participação na aquisição de materiais usados na pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro imprescindível na minha estada em Viçosa-MG.

À professora Dr.^a Heidi Dolder (UNICAMP) pela receptividade e parcerias.

Aos professores do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV, Isabel, Lino, Clóvis, Adilson, Juliana e Mariana pela colaboração na análise do material histológico, no uso de equipamentos e materiais e pelo exemplo de profissionalismo.

Aos Professores Dr. Hélio Chiarini-Garcia, Dr. João Bosco Gonçalves de Barros, Dr. Juraci Alves Oliveira e Dr.^a Mariana Machado Neves que gentilmente aceitaram participar da banca examinadora, por todas as sugestões e críticas fundamentais à complementação deste trabalho.

Aos ratinhos utilizados neste e nos outros trabalhos ainda não finalizados.

À Serra do Brigadeiro, em especial ao Lar dos Muriquis, por ser a minha fonte de inspiração e o exemplo de simplicidade e humildade.

Agradeço ainda, a todos com que tive a oportunidade de conviver nestes últimos anos e que muito contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui.

Sigo com a certeza de que vivi intensamente cada momento em Viçosa-MG. Levo no coração a alegria de ter realizado um dos meus sonhos... Obrigada a todos que fizeram parte dessa conquista!

BIOGRAFIA

Kyvia Lugate Cardoso Costa, filha de Sebastião de Paula Costa e Selma Helena Cardoso Costa, nasceu em Carangola, Minas Gerais, em 07 de Julho de 1984.

Em dezembro de 2005 graduou-se como licenciada em Ciências Biológicas pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras (FAFILE/UEMG), Carangola, Minas Gerais.

Em novembro de 2006 concluiu o curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* em Educação Ambiental na Faculdade de Filosofia Ciências e Letras (FAFILE/UEMG), Carangola, Minas Gerais.

Em fevereiro de 2007 iniciou o curso de Mestrado em Biologia Animal na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, defendendo a dissertação em fevereiro de 2009 com o título “Avaliação morfofuncional da espermatogênese de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira* FISCHER, 1814)”.

Em março de 2007 iniciou o curso de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, defendendo a tese em 11 de março de 2013.

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo Geral.....	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Metais	4
3.1.1. Metais pesados	4
3.1.2. Chumbo: aspectos gerais	5
3.1.3. Toxicocinética do chumbo.....	7
3.1.4. Estresse oxidativo e chumbo.....	9
3.1.5. Efeitos do chumbo sobre o aparelho reprodutor masculino.....	10
3.2. O testículo e o processo espermatogênico.....	13
3.2.1. Testículo.....	13
3.2.2. Espermatogênese	15
3.2.3. Células de Sertoli.....	16
3.2.4. Células de Leydig.....	16
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
ARTIGO I	28
Danos oxidativos, histomorfométricos e ultraestruturais nos testículos de ratos intoxicados com acetato de chumbo	28
Resumo	28
1. Introdução.....	30
2. Material e métodos.....	31
2.1. Animais.....	31
2.2. Tratamentos.....	32
2.3. Estudos histológicos	32
2.3.1. Preparação do testículo para microscopia de luz	32
2.3.3. Análises morfométricas e estereológicas	33
2.3.4. Preparação do testículo para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	35
2.4. Determinação da concentração de chumbo tecidual	35
2.5. Análises enzimáticas	35
2.6. Análise estatística	36
3. Resultados.....	36
3.1. Histopatologia	36
3.1.1. Avaliação estrutural.....	36
3.1.2. Avaliação ultraestrutural.....	36
3.2. Análises morfométricas e estereológicas.....	37
3.3. Concentração de chumbo no testículo	38
3.4. Parâmetros bioquímicos.....	38
4. Discussão	38
5. Conclusões.....	46
Agradecimentos	47
6. Referências bibliográficas	47

ARTIGO II.....	63
Avaliação histomorfométrica e ultraestrutural do intertúbulo de ratos Wistar expostos ao acetato de chumbo.....	63
Resumo.....	63
1. Introdução.....	64
2. Material e métodos.....	65
2.1. Animais.....	65
2.2. Tratamentos.....	66
2.3. Fixação e processamento do testículo.....	66
2.4. Análises estereológicas dos componentes intertubulares.....	66
2.4.1. Estereologia das células de Leydig.....	67
2.5. Testosterona sérica.....	68
2.6. Análise estatística.....	68
3. Resultados.....	68
3.1. Análises estruturais e ultraestruturais.....	68
3.2. Análises estereológicas.....	69
3.3. Estereologia das células de Leydig.....	69
3.4. Concentração de testosterona sérica.....	70
4. Discussão.....	70
5. Conclusão.....	73
Agradecimentos.....	74
6. Referências bibliográficas.....	74
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	86

RESUMO

COSTA, Kyvia Lugate Cardoso, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **Danos testiculares em ratos submetidos a diferentes doses de chumbo: Avaliação histomorfométrica, ultraestrutural e bioquímica.** Orientador: Sérgio Luis P. da Matta.

O chumbo é um dos contaminantes ambientais mais comuns sem nenhuma função biológica conhecida e potencialmente capaz de induzir diversos efeitos tóxicos no sistema reprodutor de homens e outros animais. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da exposição subcrônica ao acetato de chumbo sobre os testículos de ratos Wistar. Foram utilizados 25 ratos Wistar adultos divididos em cinco grupos: o grupo controle (I) recebeu água destilada e os grupos tratados (II, III, IV e V), receberam solução de acetato de chumbo nas doses de 16, 32, 64 e 128 mg Pb/kg, respectivamente, por gavagem, durante 30 dias consecutivos. Fragmentos testiculares foram fixados e processados para microscopia de luz e eletrônica. A concentração de chumbo no testículo, a atividade das enzimas antioxidantes dismutase do superóxido (SOD) e catalase (CAT) e os níveis séricos de testosterona foram quantificados. As avaliações estruturais e ultraestruturais revelaram diferentes níveis de patologias no epitélio seminífero dos animais intoxicados por chumbo, tais como vacuolizações, descamação de células germinativas, presença de corpos apoptóticos e de grandes gotículas lipídicas, além de ruptura da barreira de célula de Sertoli. A presença de edema foi evidenciada no intertúbulo dos animais tratados com chumbo. Além disso, avaliações ultraestruturais revelaram alterações nas células de Leydig e vasos sanguíneos. A túnica própria diminuiu nos grupos II e III, enquanto o percentual de epitélio seminífero foi menor nos grupos IV e V. Houve aumento no volume do espaço linfático nos grupos III e V. A proporção do espaço linfático foi maior nos grupos III, IV e V em relação ao controle. Observou-se redução significativa na proporção volumétrica das células de Leydig nos grupos expostos ao chumbo. Houve aumento no volume e proporção de tecido conjuntivo nos grupos tratados em relação ao controle. O volume e a proporção de macrófagos não variaram entre os grupos experimentais, exceto no grupo II. O volume citoplasmático e o volume das células de Leydig reduziram nos grupos tratados em relação ao controle. O percentual de lúmen tubular aumentou nos grupos II, IV e V. Observou-se redução da altura do epitélio e aumento no diâmetro do lúmen tubular

em todos os ratos expostos ao chumbo. A população de células germinativas do epitélio seminífero diminuiu nos grupos tratados, ao passo que o número de células de Sertoli não sofreu alterações. A produção espermática diária e a reserva espermática, ambas por grama de testículo apresentaram redução nos grupos III, IV e V. Observou-se um aumento dose dependente na concentração de chumbo nos testículos dos ratos expostos ao metal. Houve redução significativa na atividade da catalase (CAT) e da dismutase do superóxido (SOD) nos grupos tratados. Houve redução significativa nos níveis séricos de testosterona nos grupos que receberam chumbo. Em conclusão, os resultados sugerem que a exposição subcrônica de chumbo pode induzir o estresse oxidativo através da redução da atividade das enzimas antioxidantes, promovendo uma série de alterações morfológicas, morfométricas e ultraestruturais no testículo, inibindo a esteroidogênese e comprometendo assim a função espermática.

ABSTRACT

COSTA, Kyvia Lugate Cardoso, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2013. **Testicular damage in rats subjected to different doses of lead: histomorphometric evaluation, ultrastructural and biochemical.** Adviser: Sérgio Luis P. da Matta.

Lead is one of the most common environmental pollutants with no biological function known and potentially able to induce several toxic effects on male and animal reproductive system. In this context, the aim of this study was to evaluate the effects of subchronic exposure to lead acetate on testes of Wistar rats. Twenty-five adult Wistar rats were used and divided into five groups: Group I (control) received distilled water and treated groups (II, III, IV and V) received lead acetate solution at concentrations of 16, 32, 64 and 128 mg Pb/kg, respectively, by gavage for 30 consecutive days. Testicular fragments were fixed and processed for light and electron microscopy. The concentration of lead in the testis, the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and serum testosterone levels were quantified. Structural and ultrastructural evaluations revealed different levels of pathology in the seminiferous epithelium of animals intoxicated by lead, such as vacuolization, shedding of germ cells, presence of apoptotic bodies and large lipid droplets, and rupture of blood-testis barrier. Presence of edema was observed in the intertubule of animals treated with lead. Furthermore, ultrastructural evaluations revealed changes in Leydig cells and blood vessels. Tunica propria decreased in groups II and III, while the percentage of seminiferous epithelium was lower in groups IV and V. There was an increase in the volume of lymphatic space in groups III and V. The proportion of lymphatic space was higher in groups III, IV and V compared to control. Significant reduction in volumetric proportion of Leydig cells in groups exposed to lead was observed. There was an increase in the volume and proportion of connective tissue in the treated groups compared to control. The volume and proportion of macrophages did not differ between experimental groups, except in group II. Cytoplasmic volume and volume of Leydig cells decreased in the treated groups compared to control. The percentage of tubular lumen increased in groups II, IV and V. Reduction in height of the epithelium and increase in diameter of tubular lumen were observed in all rats exposed to lead. Population of germ cells in seminiferous epithelium decreased in the treated groups,

whereas the number of Sertoli cells remained unchanged. Daily sperm production and sperm reserves, both per gram of testis decreased in groups III, IV and V. A dose-dependent increase in lead concentration in the testes of mice exposed to metal was observed. There was significant reduction in the activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) as in serum testosterone levels in treated groups. In conclusion, the results suggest that subchronic exposure of lead can induce oxidative stress by reducing the activity of antioxidant enzymes, promoting a series of morphological, morphometric and ultrastructural testicle, inhibiting steroidogenesis and thus compromising sperm function.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A exposição das populações humanas a uma variedade de metais tóxicos encontrados no ambiente é um problema de saúde pública (Flora et al., 2011) e, devido ao amplo emprego industrial destes compostos, a exposição ocupacional constitui uma das principais formas de intoxicação. Dentre os metais pesados de maior preocupação estão o chumbo, o mercúrio e o cádmio (Liu et al., 2008). Há um crescente interesse no papel da exposição ocupacional e ambiental a poluentes tóxicos, tais como os metais pesados, pois se entende ser esta uma das causas de declínio da concentração espermática na população humana (Becker & Berhane, 1997; Apostoli & Catalani, 2011). Os metais pesados como o chumbo têm despertado grande interesse ambiental, principalmente pelo fato de não apresentarem caráter de biodegradabilidade. Uma vez introduzidos nos organismos são capazes de bioacumular-se e promover uma série de disfunções nos diversos órgãos, inclusive nos testículos, já que não possuem qualquer função biológica conhecida (Kakkar & Jaffery, 2005). A disfunção testicular induzida por metais pode levar a distúrbios nas células de Sertoli, que sustentam as células germinativas, ou nas células de Leydig, que são responsáveis pela produção de andrógenos sob controle do eixo hipotálamo-hipófise-testículo (Bizarro et al., 2003).

Por ser um metal onipresente no ambiente, como resultado de sua ocorrência natural e sua ampla utilização industrial, o chumbo permanece associado a diversas patologias sendo por isso, considerado um poluente com séria ameaça para saúde humana (Liu et al., 2008; Flora et al., 2011). Vários estudos têm indicado o aumento na prevalência de diversas anormalidades no sistema reprodutor de homens e animais expostos a este metal (Apostoli et al., 1998; Landrigan et al., 2000; Watson et al., 2004; Apostoli & Catalani, 2011). Um dos mecanismos pelos quais o chumbo exerce seu efeito tóxico está associado à indução do estresse oxidativo. De fato, um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi observada após exposição ao chumbo nos testículos e espermatozoides em ratos (Hsu et al., 1997; Hsu et al., 1998; Batra et al., 1998; Acharya et al., 2003; Marchlewicz et al., 2007) e humanos (Solliway et al., 1996; Kasperczyk et al., 2008). Alterações histológicas nos testículos de ratos tratados com chumbo mostraram danos testiculares, tais como desorganização do epitélio germinativo, vacuolização epitelial e perda celular (Batra et al., 1998; El-Sayed & El-Neweshy, 2010; El-Neweshy & El-Sayed, 2011; Shafai

et al., 2011). O chumbo também pode afetar diretamente as células de Leydig e reduzir sua capacidade esteroidogênica. Vários trabalhos têm demonstrado redução nos níveis séricos de testosterona em ratos após exposição ao chumbo (Sokol et al., 1985; Thoreux-Manlay et al., 1995; Hsu et al., 1998; Biswas & Ghosh, 2004; Haw et al., 2012).

O declínio da saúde reprodutiva masculina é uma das principais manifestações da toxicidade do chumbo (Kakkar & Jaffery, 2005). Entender, portanto os mecanismos que levam às alterações no parênquima testicular, inclusive nas células de Leydig produtoras de testosterona, é de extrema importância para a busca de alternativas na prevenção ou tratamento para tais agravos. O estudo qualitativo e quantitativo da espermatogênese permite avaliar os tipos de respostas morfológicas, bem como a severidade e a frequência de danos oxidativos causados ao parênquima testicular, permitindo uma detecção mais acurada e sensível dos efeitos adversos provocados por tóxicos ambientais (França & Russell, 1998). Embora seja bem conhecido que o chumbo exerce efeitos tóxicos sobre os testículos, poucos estudos têm quantificado e qualificado, ao mesmo tempo, as alterações morfológicas e ultraestruturais no parênquima testicular após exposição ao metal. Dentro desse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da exposição subcrônica ao acetato de chumbo sobre os compartimentos tubular e intertubular de ratos Wistar adultos através de análises histomorfométricas, ultraestruturais e bioquímicas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da exposição subcrônica em diferentes concentrações de acetato de chumbo sobre os testículos de ratos Wistar adultos.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar qualitativa e quantitativamente, através de análises histomorfométricas, estereológicas e ultraestruturais possíveis alterações no parênquima testicular;
- Avaliar a concentração de chumbo acumulada no testículo;
- Determinar a atividade das enzimas dismutase do superóxido e catalase nos testículos;
- Dosar os níveis séricos de testosterona;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Metais

3.1.1. Metais pesados

Os metais pesados são definidos como elementos químicos que apresentam densidade maior que 5 g/cm^3 (Lars, 2003). Esses elementos ocorrem naturalmente no ambiente, em baixas concentrações, devido à ação do intemperismo e de outros processos pedogênicos em rochas e no material de origem do solo (Apostoli, 2002). Os principais metais pesados são o cádmio (Cd), cobre (Cu), chumbo (Pb), zinco (Zn), cromo (Cr), níquel (Ni), bário (Ba), cobalto (Co), mercúrio (Hg) e antimônio (Sb), sendo alguns desses elementos essenciais para várias funções fisiológicas nos seres vivos, enquanto outros, não possuem funções biológicas conhecidas e geralmente prejudicam os organismos por formarem complexos estáveis com as biomoléculas (Lasat, 2002). Embora alguns metais sejam essenciais para o desempenho de vários processos bioquímicos, todos são considerados potencialmente tóxicos quando presentes em concentrações elevadas (Liu et al., 2008). A toxicidade dos metais está diretamente associada à dose, tempo de exposição, forma física e química do elemento, via de absorção e espécie envolvida (Apostoli, 2002; Plum et al., 2010).

Um dos principais problemas ambientais está relacionado ao fato dos metais pesados serem altamente reativos e bioacumuláveis, ou seja, os organismos são incapazes de eliminá-los quimicamente, ficando retidos no ecossistema (Schmitt-Jansen et al., 2008; Liu et al., 2008). Como esses metais são amplamente utilizados na vida cotidiana, podem representar risco contínuo para a saúde humana e animal (Calderón et al., 2003; Lars, 2003). Uma vez absorvidos, os metais pesados interagem com as proteínas sendo transportados pelo sangue até os tecidos onde podem ser estocados ou biotransformados (Liu et al., 2008). A toxicidade causada por estes metais se deve à ocorrência de dois principais mecanismos de ação: formação de complexos com os grupos funcionais das enzimas, o que prejudica o perfeito funcionamento do organismo e a combinação com as membranas celulares, o que perturba ou impede completamente o transporte de substâncias essenciais (Goldhaber, 2003). Além disso, alguns metais pesados são capazes de imitar os metais essenciais unindo-se a sítios fisiológicos que normalmente seriam ocupados por estes, o que pode contribuir para a bioacumulação de metais tóxicos no

organismo (Liu et al., 2008). Os efeitos tóxicos exercidos por esses metais podem incluir a letalidade e efeitos subletais, como alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, respostas farmacocinéticas, patológicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais (Liu et al., 2008; Flora et al., 2011).

3.1.2. Chumbo: aspectos gerais

O chumbo (do latim *plumbum*) é um elemento químico de símbolo Pb, número atômico 82, com massa atômica igual a 207,19, pertencente ao grupo 14 ou IVA da classificação periódica dos elementos químicos. Este metal foi um dos primeiros a serem manipulados pelo homem por possuir características como baixo ponto de fusão, durabilidade, ductibilidade e facilidade em formar ligas metálicas (Sheets, 1998; Liu et al., 2008).

Uma das primeiras civilizações a explorar extensivamente os depósitos de chumbo foi a população do Império Romano, no século V a.C., utilizando as reservas existentes na Península Ibérica para variadas aplicações, como a confecção de objetos (taças e utensílios), fabricação de tubulações e torneiras, produtos de beleza e até na correção da acidez do vinho, através da adição de acetato de chumbo (“açúcar de chumbo”), que conferia à bebida um sabor adocicado (Nriagu, 1983; Hernberg, 2000). Incorporados ao padrão de vida do império romano, estima-se que a confecção de produtos baseados no chumbo consumia cerca de 60 mil toneladas deste metal por ano (Hernberg, 2000). Como consequência, o envenenamento por chumbo foi epidêmico e parece ter causado muitos óbitos, deformidades e danos cerebrais (Milton, 1988). Considerando que a exposição a esse metal também reduz a fertilidade, tem sido sugerido que o envenenamento generalizado por chumbo contribuiu para a decadência e, posteriormente, para a queda do Império Romano (Gilfillan, 1965). De fato, elevadas concentrações de chumbo foram encontrados em ossos de romanos (Mackie et al., 1975; Lessler, 1988).

O chumbo é encontrado na natureza tanto no estado livre como em associação com outros elementos químicos. Combinado com o enxofre, ocorre sob a forma de galena (PbS) que é um dos mais abundantes minérios de chumbo (Paoliello & Chasin, 2001). As maiores fontes naturais de chumbo são emissões vulcânicas, intemperismo geoquímico e névoas aquáticas (WHO, 1995). Entre as fontes antrópicas destacam-se as fábricas de baterias de automóveis, as ligas metálicas, os pigmentos de tinta, a munição, a mineração, a fundição e a gasolina (Liu et al.,

2008). Outras aplicações importantes são na fabricação de revestimentos de cabos elétricos, tubulações, conduítes, soldas para dispositivos elétricos, radiadores de automóveis, inseticidas e mantas protetoras para os aparelhos de raios-X. Compostos de chumbo também podem ser adicionados em cerâmicas, plásticos, vidros e argamassa (Crosby, 1998; Henretig, 2002). A contaminação antrópica é a principal responsável pela liberação de chumbo no ambiente. A cada ano, a indústria produz cerca de 2,5 milhões de toneladas de chumbo em todo mundo (Flora et al., 2011). A introdução de compostos orgânicos de chumbo (chumbo tetraetila) como aditivo para gasolina contribuiu para o aumento das concentrações de chumbo no ambiente, mas em alguns países, incluindo o Brasil, o uso se tornou restrito (WHO, 1995). Da mesma forma, a quantidade de chumbo acrescida a determinados produtos como tintas, tem sido reduzida nos últimos anos com objetivo de minimizar a exposição (Liu et al., 2008). Porém, em decorrência de sua persistência no ambiente, a exposição ao metal representa, ainda, um sério problema de saúde ocupacional e ambiental em todo mundo (Patocka & Cerny, 2003; Liu et al., 2008).

Os principais setores envolvendo a exposição de trabalhadores ao metal são a fabricação e reforma de baterias ácidas de chumbo, reparadores de radiadores, fundições secundárias e refino de metais, cujos trabalhadores sofrem altos níveis de exposição (Goldsberg et al., 1997). Nos países em desenvolvimento, a fabricação de baterias em pequena escala ou operações de reparos são responsáveis pela maioria das intoxicações ocupacionais por chumbo notificadas (Liu et al., 2008). O chumbo pode ser encontrado no ar, na água de beber, nos rios, lagos e oceanos, na poeira, no solo e na cadeia alimentar. Portanto, uma das mais importantes formas de exposição ambiental ao metal pode ocorrer pela ingestão de comida ou águas contaminadas. A exposição ao chumbo também pode ocorrer durante atividades como a demolição e restauração de construções velhas, cujas tintas contenham o metal em sua composição (Flora et al., 2011).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece o chumbo como um dos elementos químicos mais perigosos à saúde humana (WHO, 1999). O chumbo também foi classificado como o segundo elemento dentre as substâncias mais tóxicas listadas pela “Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)” (ATSDR, 2011). A legislação brasileira, por meio da Norma Regulamentadora NR-7 (Portaria nº 24, de 29/12/94), estabelece que a concentração máxima de chumbo no sangue de trabalhadores não deve ultrapassar 40µg/dl (Valor de Referência de

Normalidade) e o limite de tolerância biológica (Índice Biológico Máximo Permitido) é de 60µg/dl (Jacob et al., 2002).

3.1.3. Toxicocinética do chumbo

Existem dois grupos principais de compostos de chumbo e que apresentam diferenças quanto à toxicidade: o chumbo inorgânico (sais de chumbo e chumbo metálico) e o chumbo orgânico. A intoxicação por chumbo inorgânico ocorre predominantemente através da via respiratória e trato gastrointestinal (Liu et al., 2008). No organismo humano o chumbo inorgânico não sofre metabolização, mas é complexado com macromoléculas, sendo diretamente absorvido, distribuído e excretado (Tsalev & Zapriav, 1985). Com relação ao chumbo orgânico a intoxicação é mais freqüente através do chumbo tetraetila e tetrametila. Por serem lipossolúveis, são facilmente absorvidos pela pele, pelo trato gastrointestinal e pelos pulmões (Liu et al., 2008). Ao contrário do chumbo inorgânico, o chumbo orgânico é metabolizado pelo fígado a chumbo trietil e chumbo inorgânico, os quais são responsáveis pelos efeitos tóxicos no organismo (Kosnett, 2003).

A absorção do chumbo é determinada por sua espécie química, suas características físico-químicas e pela dose, freqüência, duração e via de exposição, podendo ser influenciada por fatores como idade, sexo, estilo de vida, estado fisiológico e nutricional e ainda pela suscetibilidade individual do organismo exposto (Wang et al., 2008). Baixa ingestão de cálcio, ferro, fósforo e proteínas pode provocar aumento na absorção do chumbo. Por outro lado, a vitamina C reduz a absorção do chumbo, provavelmente por facilitar a absorção do ferro (Liu et al., 2008). Diferenças na absorção intestinal, metabolismo ósseo e o rápido desenvolvimento do sistema nervoso central, predispõem uma absorção do chumbo cinco vezes maior nas crianças em relação aos adultos (Lockitch, 1993). Os adultos podem absorver 5 a 15% de uma dose oral de chumbo solúvel em água, enquanto crianças absorvem 42% (Liu et al., 2008).

Uma vez absorvido, o chumbo distribui-se no compartimento sanguíneo em duas formas: uma delas, não difusível, ligada aos eritrócitos e outra difusível no plasma. Aproximadamente 95% do metal encontram-se associado aos eritrócitos, seja na superfície externa de suas membranas ou no meio intracelular ligado a proteínas, como a ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALAD) e a hemoglobina (Simons, 1993). Os 5% restantes de chumbo podem ser encontrados no plasma, de

forma livre ou associado à albumina, à γ -globulina e a outros compostos de baixo peso molecular contendo sulfidrilas (SH) (cisteína, hemocisteína e cisteamina), constituindo a fração potencialmente tóxica do metal, que é capaz de alcançar os órgãos e tecidos-alvo (Al-Modhefer et al., 1991). A meia vida para o chumbo no sangue é em torno de 36 dias (Paoliello & Chasin, 2001; Kosnet, 2003).

Do sangue o chumbo distribui-se para os tecidos moles como cérebro, fígado, rins e testículo onde permanece, predominantemente, ligado a proteínas. Complexos formados pelo chumbo e proteínas ácidas denominados corpos de inclusão intranucleares podem ser observados em células do túbulo renal proximal de indivíduos que apresentam nefropatia induzida pelo metal (Gonick, 2008). A meia vida do chumbo nos tecidos moles é em torno de 40 dias (Paoliello & Chasin, 2001; Kosnet, 2003).

Finalmente o chumbo deposita-se nos ossos onde substitui o cálcio, já que os íons Pb^{2+} e Ca^{2+} são similares em tamanho (Baird, 2002). Em adultos contaminados com chumbo, os ossos contêm cerca de 90% a 95% do conteúdo corpóreo total de chumbo, enquanto que 80% a 95% são encontrados em crianças (Hu, 1998). O tecido ósseo constitui o principal sítio de estocagem de longo prazo, de onde o metal pode ser mobilizado, levando o organismo a uma exposição sistêmica continuada (Smith et al., 1995; Flora et al., 2011). A toxicidade do chumbo pode ser atribuída, em parte, à sua capacidade para imitar o cálcio e substituí-lo em muitos processos celulares fundamentais dependentes de cálcio (Flora et al., 2011). A meia vida do chumbo nos ossos é em torno de 20 a 30 anos (Paoliello & Chasin, 2001; Kosnet, 2003).

Independente da via de absorção, o chumbo é eliminado principalmente pelas fezes (excreção biliar-15%) e urina (75-80%), e por outras vias de menor eliminação, como saliva, suor, cabelo e unhas (<8%) (WHO, 1995; ATSDR, 2007). Uma via especial de excreção do chumbo endógeno é através do leite materno (Skerfving et al., 1993). O chumbo possui a capacidade de atravessar a barreira transplacentária, podendo passar do organismo materno para o fetal. Portanto, a exposição da criança pode ter início ainda na vida intrauterina (Ong et al., 1993; Liu et al., 2008).

O chumbo pode afetar uma série de sistemas nos organismos vivos cujos efeitos serão dependentes do nível e da duração da exposição (Liu et al., 2008; Flora et al., 2011). Este metal é extremamente tóxico para os sistemas nervoso central (SNC) e periférico, renal, hematopoiético e trato gastrintestinal. Pode afetar também o sistema cardiovascular, causar alterações endócrinas, imunológicas, danos

reprodutivos e causar efeitos carcinogênicos e mutagênicos (Skerfving et al., 1993; Liu et al., 2008). A diversidade de sistemas afetados gera vários sintomas que, juntos, levam a um estado patológico denominado Saturnismo. Os sintomas mais comuns são: dor abdominal, fadiga, sonolência, cefaléia inespecífica, dores articulares, irritabilidade, impotência sexual, depressão, anorexia, mialgia, tremores, alterações do ritmo intestinal, hipertensão arterial sistêmica e perda de peso (WHO, 1995).

3.1.4. Estresse oxidativo e chumbo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas como consequência de processos metabólicos celulares normais. Em concentrações fisiológicas as EROs têm funções biológicas, porém quantidades excessivas podem induzir o estresse oxidativo (Sharma & Agarwal, 1996). As EROS incluem um grande número de moléculas quimicamente reativas oriundas do oxigênio, dentre elas, o ânion radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\cdot OH$) (Riley & Behrman, 1991).

O estresse oxidativo pode estar relacionado ao surgimento de condições patológicas no organismo por promover danos em muitos constituintes celulares, como lipídios insaturados, proteínas e DNA (Pande & Flora, 2002). A homeostase entre a formação e a degradação de EROS no organismo é mantida por moléculas e proteínas antioxidantes que removem as EROS e restauram o balanço pró-oxidante/antioxidante (Sharma & Agarwal, 1996). Dentre as enzimas de defesa antioxidante presentes na célula, destacam-se a dismutase do superóxido (SOD), que catalisa a conversão do radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a catalase (CAT) que reduz o H_2O_2 à água e oxigênio (O_2) (Riley & Behrman, 1991).

Os testículos e a função espermática são particularmente sensíveis às injúrias produzidas por EROs (Fraga et al, 1991; Lucesoli & Fraga, 1995). O dano oxidativo pode afetar as células germinativas e influenciar o processo espermatogênico o qual pode levar a disfunções na função espermática (Aitken, 1995). Estudos têm confirmado que a susceptibilidade do espermatozóide aos danos oxidativos causados pelas EROs decorrem da alta quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes na sua membrana plasmática. Estes ácidos graxos são altamente predispostos ao ataque dos radicais livres e conseqüentemente, a peroxidação dos lipídios. A acumulação de peróxidos de lipídios na superfície do espermatozóide causa

disfunção e morte celular (Armstrong et al., 1999; Krzyzosiak et al., 2000; Baumber et al., 2002; Bilodeau et al., 2001).

Alguns dos efeitos tóxicos do chumbo têm sido atribuídos à indução do estresse oxidativo, pois o chumbo prejudica o balanço pró-oxidante/antioxidante dos tecidos, levando ao aparecimento de disfunções fisiológicas, bioquímicas e comportamentais (Hsu & Guo, 2002). Estudos têm mostrado que o estresse oxidativo induzido pelo chumbo pode afetar a reprodução em homens e outros animais. De fato, um aumento da produção de EROs foi observada após exposição ao chumbo nos testículos e espermatozóides em ratos (Hsu et al., 1997; Hsu et al., 1998; Batra et al., 1998; Acharya et al., 2003; Marchlewicz et al., 2007) e humanos (Solliway et al., 1996; Kasperczyk et al., 2008). Estas EROs induzidas pelo chumbo foram associadas com a diminuição na contagem de espermatozóides (Hsu et al., 1998; Acharya et al., 2003; Kasperczyk et al., 2008), perda da mobilidade espermática (Hsu et al., 1997; Hsu et al., 1998; Kasperczyk et al., 2008) e aumento de espermatozóides anormais (Acharya et al., 2003). O chumbo pode alterar a atividade antioxidante das enzimas pela sua capacidade de se ligar aos grupos sulfidrilos, inibindo assim as suas funções normais (Batra et al., 1998; Hsu & Guo, 2002; Sainath et al., 2011). Além disso, o Pb pode competir com alguns elementos-traço essenciais presentes nessas enzimas, substituindo-os e alterando sua atividade (Hsu & Guo, 2002; Flora et al., 2008).

As atividades das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e dismutase do superóxido(SOD) são os parâmetros mais comumente utilizados para a avaliação do dano oxidativo induzido pelo chumbo em estudos com humanos e outros animais (Pande & Flora, 2002).

3.1.5. Efeitos do chumbo sobre o aparelho reprodutor masculino

Estudos com humanos e outros animais têm demonstrado que a exposição ao chumbo promove uma série de alterações sobre o sistema reprodutor, especialmente nos testículos (Apostoli et al., 1998). A severidade da toxicidade do chumbo parece ser dependente de fatores tais como idade do animal, duração e frequência da exposição, rota de entrada, espécies animais utilizadas no experimento e dose administrada (Ronis et al., 1996; Wang et al., 2008). Alterações macroscópicas nos órgãos acessórios sexuais tais como, diminuição do peso testicular, vesícula seminal, epidídimo e próstata ventral têm sido relatadas em estudos usando animais experimentais expostos ao chumbo (Sokol, 1990; Thoreux-Manlay et al. 1995; Ronis

et al., 1996; Wadi & Ahamad, 1999; Ahmad et al., 2003; Biswas & Ghosh, 2004; Ait Hamadouche et al., 2009).

Alterações nos testículos, especialmente nos túbulos seminíferos, foram observadas em diversos trabalhos quando o chumbo foi administrado. Ahmad et al. (2003) e Ait Hamadouche et al. (2009) observaram redução significativa do diâmetro tubular em ratos tratados com acetato de chumbo por via intraperitoneal e oral durante 30 e 90 dias, respectivamente. Massanyi et al. (2006) observaram alterações dose-dependentes na altura do epitélio seminífero. Graça et al. (2004) mostraram que camundongos expostos ao chumbo apresentaram redução no peso testicular, no diâmetro dos túbulos seminíferos e nas contagens de espermatozoides.

A exposição ao chumbo pode afetar as interações entre as células espermatogênicas. Os efeitos citotóxicos desse metal sobre as interações celulares foram avaliados *in vitro*. As diferentes concentrações testadas induziram considerável toxicidade na cocultura de células germinativas-Sertoli, indicando distúrbios na interação normal entre esses tipos celulares (Gray & Beaman, 1984; Adhikari et al., 2001). As funções das células de Sertoli também foram alteradas em macacos cronicamente expostos ao metal (Gustafson, 1989; McGregor & Mason, 1990). Massanyi et al. (2006) relataram o efeito negativo do chumbo sobre a estrutura testicular observando diminuição do número de células germinativas, bem como aumento da incidência de células apoptóticas no epitélio seminífero, o que culminou com o aumento do diâmetro do lúmen tubular. Ratos expostos a altas concentrações de chumbo mostraram uma série de alterações, tais como, danos na membrana basal, desorganização do epitélio seminífero com redução da população de células germinativas e vacuolização das células de Sertoli, o que culminou com a inibição do processo espermatogênico (Batra et al., 2001). Em outros estudos também ocorreram reduções significativas nas populações celulares do epitélio seminífero como consequência da exposição ao chumbo (Corpas et al., 2002; Massanyi et al., 2006; Nava-Hernández et al., 2009). Além disso, a presença de apoptose em células germinativas também foi detectada (Murthy et al., 1991; Shafai et al., 2011).

Análises em microscopia eletrônica têm revelado que em macacos (*Macaca fascicularis*) expostos ao chumbo durante a infância podem desenvolver alterações testiculares que persistem na vida adulta, mesmo com a redução da concentração de chumbo no sangue (Foster et al., 1998). Desta maneira, o testículo pode ser um

importante alvo para toxicidade do chumbo e até mesmo exposições neonatais podem ser suficientes para reduzir a fertilidade em machos adultos (Flora et al., 2011). Shafai et al. (2011) também descreveram uma série de alterações ultraestruturais nos túbulos seminíferos de ratos como consequência da exposição ao chumbo. A exposição a este metal está associada com a diminuição da motilidade e do número de espermatozoides e com o aumento de anormalidades morfológicas dos espermatozoides em animais (Sokol & Berman, 1991) e humanos (Alexander et al., 1996). Hsu et al. (1998) demonstraram que a exposição ao chumbo pode diminuir a capacidade de defesa do espermatozoide ao estresse oxidativo e aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio, o que está negativamente associado com a fertilidade. O chumbo pode afetar diretamente as células de Leydig e reduzir sua capacidade esteroidogênica. Vários trabalhos têm demonstrado redução nos níveis séricos de testosterona em ratos após exposição ao chumbo (Sokol et al., 1985; Thoreux-Manlay et al., 1995; Hsu et al., 1998; Biswas & Ghosh, 2004; Haw et al., 2012)

Desde 1970 vários autores têm reafirmado a possível queda na qualidade espermática e, conseqüentemente, um aumento das taxas de infertilidade no sexo masculino (Nelson & Bunge, 1974; Pasqualotto et al., 2003). As causas do aumento da infertilidade permanecem controversas (Swan et al., 1997; Golden et al., 1999; Pasqualotto et al., 2003), mas os pesquisadores sugerem que muitas substâncias a que os homens estão expostos, principalmente no trabalho, podem afetar sua fertilidade (Lerda & Rezzi, 1991; Petrelli et al., 2000). Acredita-se que o desenvolvimento agrícola no século XX esteja envolvido nesse processo, pois favoreceu o manuseio e exposição a várias substâncias que são nocivas aos seres humanos, algumas delas afetando o sistema reprodutor, tais como pesticidas e metais (Cox, 1996; Cooper & Kavlock, 1997; Pasqualotto et al., 2003). Isso levanta a hipótese de que os efeitos dessas substâncias sobre os órgãos reprodutores masculinos podem estar relacionados com o aumento da infertilidade masculina (Queiroz & Waissmann, 2006).

A disfunção reprodutiva tem sido descrita em homens expostos ao chumbo no local de trabalho, incluindo oligozoospermia e astenozoospermia (Lancranjan et al., 1975; Rom, 1976). Assennato et al. (1987), verificaram diminuição significativa na contagem de espermatozóides em trabalhadores expostos ao chumbo, porém não foram encontradas diferenças nas concentrações hormonais, sugerindo um efeito

tóxico direto deste metal na produção de espermatozóides. Rodamilans et al. (1988) demonstraram os efeitos tóxicos do chumbo diretamente sobre o testículo acompanhado por distúrbio no hipotálamo ou hipófise após um longo período de exposição ao metal. Gustafson (1989) realizaram um estudo na Suécia com um grupo de trabalhadores na fundição do chumbo. Este estudo mostrou um complexo efeito da moderada exposição ao metal sobre o sistema endócrino, possivelmente mediado por mudanças no eixo hipotálamo-hipófise. Outros autores também relataram hipogonadismo e diminuição nos níveis de testosterona sérica em trabalhadores na fundição do chumbo (Cullen et al., 1983; Cullen et al., 1984). McGregor et al. (1990) sugeriram que o chumbo pode causar danos aos túbulos seminíferos em concentrações maiores que 47 µg/dl. Porém, as concentrações de testosterona foram normais, contrastando com os resultados de Rodamilans et al (1988). Amostras de sangue e sêmen foram analisadas em trabalhadores de fábricas de baterias, mostrando uma inversa associação entre níveis de chumbo no plasma, volume e concentração de espermatozóides (Telisman et al., 2000). A redução da espermatogênese entre os trabalhadores nas fábricas de baterias também têm sido descrita como resultado da intoxicação por chumbo (Rachootin & Olsen, 1983; Cullen et al., 1984; Kumar, 2004). O aumento da concentração de chumbo no sangue está associado com a diminuição da libido e aumento de anomalias no sêmen de homens expostos ao metal no local de trabalho (Ellis & Desjardins, 1982).

3.2. O testículo e o processo espermatogênico

3.2.1. Testículo

O testículo é um órgão com função endócrina e exócrina revestido por uma espessa cápsula conjuntiva, a albugínea, que envia septos para o interior do órgão formando o mediastino testicular. O parênquima testicular apresenta dois compartimentos principais: o tubular e o intersticial ou intertubular (Russell et al., 1990). O compartimento tubular constitui a maior parte do testículo, ocupando, na maioria dos mamíferos, de 70% a 90% do parênquima testicular (França & Russell, 1998). Neste compartimento, responsável pela produção dos espermatozoides, encontram-se túbulos seminíferos, que se conectam através das duas extremidades à rede testicular localizada no mediastino de onde o conteúdo tubular é direcionado para dentro dos túbulos eferentes e epidídimos. Existe grande variação no número e

nas dimensões (diâmetro e comprimento) dos túbulos seminíferos nas diferentes espécies de mamíferos (França e Russell, 1998).

Os túbulos seminíferos são constituídos, de sua porção externa para a interna, de túnica própria, epitélio seminífero e lume. Na túnica própria são observadas as células mióides ou peritubulares, a membrana basal e fibras colágenas. Dois tipos celulares estão presentes no epitélio seminífero: as células de Sertoli e as células germinativas ou espermatogênicas. As células de Sertoli, através de junções de oclusão, dividem o epitélio seminífero em dois ambientes: o basal onde se localizam as espermatogônias e os espermatócitos primários na fase inicial da prófase meiótica (preleptótenos e leptótenos), e o adluminal, no qual se encontram os espermatócitos primários a partir da fase de zigóteno, espermatócitos secundários e espermátides. Juntamente com as células mióides, as células de Sertoli elaboram a membrana basal que serve de suporte estrutural para a própria célula de Sertoli e para as células germinativas que se encontram na porção basal do epitélio seminífero. Desta forma, o ambiente adluminal está totalmente sob o controle das células de Sertoli, propiciando um microambiente isolado do sistema imunitário, o que é essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (Russell et al., 1990; Setchell, 1991; Poccia, 1994; Sharpe, 1994). No lume tubular é encontrado o fluido secretado pelas células de Sertoli e os espermatozóides recém-espermiados (Russell et al., 1990).

O compartimento intertubular é constituído de vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células e fibras do tecido conjuntivo e células de Leydig. Estas células são bastante conhecidas por sua marcante produção de andrógenos, os quais são sintetizados a partir de uma molécula base, o colesterol, e responsáveis pela manifestação dos caracteres sexuais secundários e pela manutenção da espermatogênese em animais sexualmente maduros (Bardin, 1996). Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies quanto à proporção volumétrica dos diferentes componentes do compartimento intertubular (Fawcett et al., 1973; França & Russell, 1998), a célula de Leydig é usualmente o tipo celular mais freqüente neste compartimento. Assim, o percentual ocupado pelas mesmas nos testículos de animais sexualmente maduros, no período reprodutivo, pode variar de aproximadamente 1% em carneiros até cerca de 35% em capivaras (França & Russell, 1998; Paula et al., 2002). De modo geral, os roedores apresentam o padrão intertubular do tipo I descrito por Fawcett et al. (1973), onde pequena quantidade de células de Leydig e

os vasos sangüíneos encontram-se separados dos túbulos seminíferos por um espaço linfático bem desenvolvido. Este espaço linfático é revestido pela camada endotelial visceral, a qual envolve as células de Leydig e os vasos sangüíneos, e pela camada parietal que se encontra em contato com a túnica própria dos túbulos seminíferos.

3.2.2. Espermatogênese

A espermatogênese é um processo altamente complexo e bem organizado que ocorre nos túbulos seminíferos e dura de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos (França & Russel, 1998; França et al., 1998). Baseado em características morfológicas e funcionais o processo espermatogênico pode ser dividido em três fases: (a) fase proliferativa (espermatogonial), caracterizada por divisões mitóticas rápidas e sucessivas das espermatogônias; (b) fase meiótica, que envolve a síntese de DNA no espermatócito em pré-leptóteno, síntese de RNA no espermatócito em paquíteno e finalização da meiose, durante a qual ocorre uma divisão reducional, acompanhada de recombinação gênica e uma divisão equacional na qual, teoricamente, cada espermatócito paquíteno dará origem a quatro espermátides haplóides; (c) fase de diferenciação ou espermiogênica, onde cada espermátide arredondada passa por profundas mudanças estruturais e bioquímicas e diferencia-se em espermatozóide, um tipo celular estruturalmente especializado para alcançar e fertilizar o ovócito (Sharpe, 1994; Hess & França, 2008).

Nos túbulos seminíferos de indivíduos sexualmente maduros, as células germinativas não estão organizadas ao acaso, e sim em associações celulares distintas denominadas estádios, que se encontram arranjados de forma cíclica, permitindo, na maioria das espécies, a ocorrência de um único estádio por secção transversal do túbulo seminífero (Russell et al., 1990). Os estádios do ciclo do epitélio seminífero podem ser classificados pelo método da morfologia tubular (Berndtson, 1977; Hess & França, 2008) e pelo método do sistema acrossômico (Hess & França, 2008). No primeiro, 8 estádios do ciclo são obtidos para todas as espécies, enquanto que pelo sistema acrossômico o número de estádios classificados varia conforme a espécie. A duração do ciclo do epitélio seminífero é uma constante biológica espécie-específica, a qual está sob o controle do genótipo da célula germinativa (França et al., 1998). De maneira geral, em torno de 4,5 ciclos são necessários para que o processo espermatogênico se complete em mamíferos, ou

seja, desde uma espermatogônia do tipo A₁ até a liberação dos espermatozoides no lume do túbulo seminífero (Amann & Schanbacher, 1983; Hess & França, 2008).

É importante salientar 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; Hess & França, 2008).

3.2.3. Células de Sertoli

As células de Sertoli têm o importante papel de regular a espermatogênese (Russell & Griswold, 1993), já que intermediam a ação da testosterona e do FSH nos testículos, sendo responsáveis pelo início, manutenção e regulação deste processo (Sharpe, 1994). Além da formação da barreira de célula de Sertoli, que propicia um ambiente protegido do sistema imune no epitélio seminífero, as células de Sertoli desempenham outras funções essenciais para o desenvolvimento das células germinativas. Assim, podem ser citadas a síntese de várias proteínas, o fornecimento de nutrientes e inúmeros outros fatores importantes para as células germinativas, mediação da ação do FSH (hormônio folículo estimulante) e da testosterona na espermatogênese, fornecimento de suporte físico (sustentação) para as células espermatogênicas, participação ativa no processo de liberação (espermição) das espermátides para o lume tubular, fagocitose do excesso de citoplasma (corpos residuais) resultante da liberação das células espermiadas e fagocitose de células germinativas que sofrem apoptose. As células de Sertoli secretam ainda fluido em direção ao lume tubular, o qual possui substâncias importantes para a função epididimária e maturação espermática, servindo também de veículo para o transporte dos espermatozoides. A secreção também ocorre em direção ao interstício, estando envolvida com os mecanismos de regulação parácrina de outros tipos celulares do testículo tais como células mióides, células de Leydig e células musculares lisas dos vasos (Sharpe, 1994; Hess & França, 2008). 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).

3.2.4. Células de Leydig

Distribuídas no tecido conjuntivo frouxo do estroma, no espaço intertubular do parênquima testicular, estão as células produtoras de esteróides denominadas

células de Leydig. São células relativamente grandes, poliédricas e limitadas pela membrana plasmática que usualmente contém microvilos. Seu núcleo está localizado excêntricamente no citoplasma com um a três nucléolos, usualmente de formato arredondado 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 são responsáveis pela síntese e armazenamento de testosterona, importante para promover o comportamento sexual normal (libido) e a ocorrência do processo espermatogênico (juntamente com FSH e LH), além de manter a função das glândulas acessórias (Haider et al., 2007). A testosterona produzida pelas células de Leydig tem uma ação parácrina ao se difundir para os túbulos seminíferos, atravessando facilmente a barreira-hematotesticular (Weinbauer & Wessels, 1999). Altas concentrações de testosterona 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).

Inúmeros fatores podem influenciar na quantidade de células de Leydig por animal, dentre os quais podem ser destacados 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 uma unidade de tempo, a velocidade pela qual a testosterona deixa o testículo via vasos linfáticos, vasos sanguíneos e fluidos seminiais, o volume sanguíneo do animal e a taxa de metabolismo da testosterona (Russell et al., 1994; Russell, 1996).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acharya, U. R.; Rathore, R. M.; Mishra, M. 2003. Role of vitamin C on lead acetate induced spermatogenesis in Swiss mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13:9-14.
- Adhikari, N.; Sinha, N.; Narayan, R.; Saxena, D. K. 2001. Lead-induced cell death in testes of young rats. *J. Appl. Toxicol.* 21:275-277.
- Ahmad, I.; Muhammad, S.; Yasin, K. F. 2003. Study of the effects of lead poisoning on the testes in albino rats. *Pakistan J. Med. Res.* 42:1-9.
- Ait Hamadouche, N.; Slimani, M.; Merad-Boudia, B.; Zaoui, C. 2009. Reproductive toxicity of lead acetate in adult male rats. *Am. J. Sci. Res.* 3:38-50.
- Aitken, R. J. 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod. Fertil. Devel.* 7:659-668.
- Al-Modhefer, A. J. A.; Bradbury, M. W. B.; Simmons, T. J. B. 1991. Observations on the chemical nature of lead in human blood serum. *Clin. Sci.* 81:823-829.
- Alexander, B. H.; Checkoway, H.; van Netten, C.; Muller C. H.; Ewers T. G.; Kaufman J. D.; Mueller, B. A.; Vaughan T. L.; Faustman, E. M. 1996. Semen quality of men employed at a lead smelter. *J. Occup. Environ. Med.* 53: 411-416.
- Amann, R. P.; Schanbacher, B. D. 1983. Physiology of male reproduction. *J. Anim. Sci.* 57: 380-403.
- Apostoli, P.; Kiss, P.; Porru, S.; Bonde, J. P.; Vanhoorne, M. 1998. Male reproductive toxicity of lead in animals and humans. *Occup. Environ. Med.* 55:364-374.
- Apostoli, P. 2002. Elements in environmental and occupational medicine. *J. Chromatogr. B.* 778:63-97.
- Apostoli, P.; Catalani, S. 2011. Metal ions affecting reproduction and development. *Met. Ions Life Sci.* 8:263-303.
- Armstrong, J. S.; Rajasekaran, M.; Chamulitrat, W.; Gatti, P.; Hellstrom, W. J.; Sikka S. C. 1999. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radical Biol. Med.* 26:869-880.
- Assennato G.; Paci C.; Baser, M. E.; Molinini, R.; Candela, R. G.; Altamura, B. M.; Giorgino, R. 1987. Sperm count suppression without endocrine dysfunction in lead-exposed men. *Arch. Environ. Health* 42:124-127.

- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2007. Toxicological Profile for Lead. Atlanta, Georgia, pp. 1-528.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2011. The Priority List of Hazardous Substances. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2013.
- Baird, C. 2002. Metais pesados tóxicos. In: Química Ambiental. 2. ed. São Paulo: Bookman, pp. 403-439.
- Bardin, C. W. 1996. Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man. In: Payne, A. H., Hardy, M. P., Russell, L. D. (Eds). The Leydig cell. Vienna: Cache River Press, pp. 31-42.
- Batra, N.; Nehru, B.; Bansal, M. P. 1998. The effect of zinc supplementation on the effects of lead on the rat testis. *Reprod. Toxicol.* 12:535-540.
- Batra, N.; Nehru, B.; Bansal, M. P. 2001. Influence of lead and zinc on rat male reproduction at 'biochemical and histopathological levels'. *J. Appl. Toxicol.* 21: 507-512.
- Baumber, J.; Vo, A.; Sabeur, K; Ball, B. A. 2002. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology.* 57:1025-1033.
- Becker, S.; Berhane, K. 1997. A meta-analysis of 61 sperm count studies revisited. *Fertil. Steril.* 67:1103-1108.
- Berndtson, W. E., 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J. Anim. Sci.* 44:818-883.
- Bilodeau, J. F.; Blanchette, S.; Gagnon, C.; Sirard, M. A. 2001. Thiols prevent H₂O₂ mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology.* 56:275-288.
- Bizarro, P.; Acevedo, S.; Niño-Cabrera, G.; Mussali-Galante, P.; Pasos, F.; Avila-Costa, M. R.; Fortoul, T. I. 2003. Ultrastructural modifications in the mitochondrion of mouse Sertoli cells after inhalation of lead, cadmium or lead-cadmium mixture. *Reprod. Toxicol.* 17:561-566.
- Biswas, N. M.; Ghosh, P. 2004. Effect of lead on male gonadal activity in Albino rats. *Kathmandu Univ. Med. J.* 2:43-46.
- Calderón, J.; Ortiz-Pérez, D.; Yáñez, L.; Díaz-Barriga, F. 2003. Human exposure to metals. Pathways of exposure, biomarkers of effect, and host factors. *Ecotox. Environ. Safe.* 56:93-103.

- Cooper R. L.; Kavlock R. J. 1997. Endocrine disruptors and reproductive development: a weight-of evidence overview. *J. Endocrinol.* 152:159-166.
- Corpas, I.; Castillo, M.; Marquina, D.; Benito, M. 2002. Lead intoxication in gestational and lactational periods alters the development of male reproductive organs. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 53:259-266.
- Courot, M.; Hochereau-De-Reviers, M.T.; Ortavant, R. Spermatogenesis. 1970. In: Johnson, A.D.; Gomes, W.R.; Vandemark, N.L. (Eds.). *The testis*. New York: Academic Press, pp.339-432.
- Cox, C. 1996. Masculinity at risk. *J. Pesticide Reform.* 16:2-7
- Crosby, D. G. 1998. *Environmental toxicology and chemistry*. New York: Oxford University Press, pp. 216-218.
- Cullen, M. R.; Robins J. M.; Eskenazi, B. 1983. Adult organic lead intoxication: presentation of 31 new cases and review of the recent advances in literature. *Medicine* 62:221-247.
- Cullen, M. R.; Kayne R. D.; Robins J. M. 1984. Endocrine and reproductive dysfunction in men associated with occupational inorganic lead intoxication. *Arch. Environ. Health* 39:431-40.
- El-Sayed, Y. S.; El-Neweshy, M. S. 2010. Impact of lead toxicity on male rat reproduction at “hormonal and histopathological levels”. *Toxicol. Environ. Chem.* 92:765-774.
- El-Neweshy, M. S.; El-Sayed, Y. S. 2011. Influence of vitamin C supplementation on lead-induced histopathological alterations in male rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 63:221-227.
- Ellis, G. B.; Desjardins, C. 1982. Male rats secrete luteinizing hormone and testosterone episodically. *Endocrinology* 110:1618-1627.
- Fawcett, D. W.; Neaves, W. B.; Flores, M. N. 1973. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol. Reprod.* 9: 500-532.
- Flora, S. J. S.; Mittal, M.; Mehta, A. 2008. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J. Med. Res.* 128:501-523.
- Flora, S. J. S.; Pachauri, V.; Saxena, G. 2011. Arsenic, cadmium and lead. In: Gupta, R. C. (Ed.). *Reproductive and developmental toxicology*. Academic Press, London, pp. 416-438.

- Foster, W. G.; Singh, A.; McMahon, A.; Rice, D. C. 1998. Chronic lead exposure effects in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) testis. *Ultrastruct. Pathol.* 22: 63-71.
- Fraga, C. G.; Motchnik, P. A.; Shigenaga, M. K.; Helbock, R.A., Ames, B.N., 1991. Ascorbic acid protects against oxidative DNA damage in human sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:11003-11006.
- França, L. R.; Parreira, G. G.; Gates, R. J.; Russell, L. D. 1998. Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: quantitation of germ-cell population and effect of elimination of residual testosterone after long-term hypophysectomy. *J. Androl.* 19:335-342.
- França, L. R.; Russell, L. D. 1998. The testis of domestic mammals. In: *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Communications, pp.198-219.
- Gilfillan SC. 1965. Lead poisoning and the fall of Rome. *J. Occup. Med.* 7:53-60.
- Golden, A. L.; Moline, J. M.; Bar-Chama N. Male reproduction and environmental and occupational exposures: a review of epidemiologic methods. *Salud Pública Méx.* 41:93-105, 1999.
- Goldhaber, S. B. 2003. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regul. Toxicol. Pharm.* 38: 232-242.
- Goldsberg, M.; Levin, S. M.; Doucette, J. T.; Griffin, G. A. 1997. Task-based approach to assessing lead exposure among iron workers engaged in bridge rehabilitation. *Am. J. Ind. Med.* 31:310-318.
- Gonick, H. C. 2008. Nephrotoxicity of cadmium & lead. *Indian J. Med. Res.* 128:335-352.
- Graça, A.; Ramalho-Santos, J.; de Lourdes Pereira, M. 2004. Effect of lead chloride on spermatogenesis and sperm parameters in mice. *Asian J. Androl.* 6: 237-241.
- Gray, T. J. B.; Beamand, J.A. 1984. Effect of some phthalate esters and other testicular toxins on primary cultures of testicular cells. *Food Chem. Toxicol.* 22:123-131.
- Gustafson, A. 1989. Occupational lead exposure and pituitary function. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 61:277-281.

- Haider, S. G.; Servos, G.; Tran, N. 2007. Structural and histological analysis of Leydig cell steroidogenic function. In: Payne, A. H.; Hardy, M. P. (Eds). Contemporary Endocrinology. The Leydig cell in the health and disease. New Jersey: Humana Press, pp. 33-45.
- Haw, K. Y.; Chakravarthi, S.; Haleagrahara, N.; Rao, M. 2012. Effects of *Etilingera elatior* extracts on lead acetate-induced testicular damage: A morphological and biochemical study. *Exp. Ther. Med.* 3:99-104.
- Henretig, F. M. 2002. Lead. In: Lewis, G., Lewis, N., Howland, M.A., Nelson, L. (Eds.). Gold frank's toxicological emergencies. New York: McGraw Hill Companies, pp. 1200-1237.
- Hernberg, S. 2000. Lead poisoning in a historical perspective. *Am. J. Ind. Med.* 38:244-254.
- Hess, R. A., França, L. R., 2008. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Cheng, C.Y. (ed.). Molecular mechanisms in spermatogenesis. Landes Bioscience, pp. 1-15.
- Hu, H. 1998. Bone lead as a new biologic marker of lead dose: recent findings and implications for public health. *Environ. Health Perspect.* 106:961-967.
- Hsu, P. C.; Liu, M. Y.; Hsu, C. C.; Chen, L. Y.; Guo, Y. L. 1997. Lead exposure causes generation of reactive oxygen species and functional impairment in rat sperm. *Toxicology* 122:133-43.
- Hsu, P. C.; Hsu, C. C.; Liu, M. Y.; Chen, L. Y.; Guo, Y. L. 1998. Lead-induced changes in spermatozoa function and metabolism. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 55:45-64.
- Hsu, P. C.; Guo, Y. L. 2002. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology.* 180:33-44.
- Jacob, L. C. B.; Alvarenga, K. F.; Morata, T. C. 2002. Os efeitos da exposição ocupacional ao chumbo sobre o sistema auditivo: uma revisão da literatura. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 68:564-569.
- Kakkar, P.; Jaffery, F. N. 2005. Biological markers for metal toxicity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19:335-349.
- Kasperczyk, A.; Kasperczyk, S.; Horak, S.; Ostalowska, A.; Grucka-Mamczar, E.; Romuk, E. 2008. Assesment of semen function and lipid peroxidation among lead exposed men. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 228:378-384.

- Kosnett, M. J. 2003. Intoxicação por metais pesados e quelantes. In: Katzung, B. G. Farmacologia e clínica. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. pp. 867-870.
- Krzyzosiak, J.; Evenson, D.; Pitt, C.; Jost, L.; Molan, P.; Vishwanath, R. 2000. Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation, during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. *Reprod. Fertil.* 12:251-26.
- Kumar, S. 2004. Occupational exposure associated with reproductive dysfunction. *J. Occup. Health* 46:1-19.
- Lancranjan, I.; Popescu, J. I.; Gavenescu, O.; Klepsch, I.; Serbanescu, M. 1975. Reproductive ability of workmen occupationally exposed to lead. *Arch. Environ. Health* 30:396-401.
- Landrigan, P. J.; Boffetta, P.; Apostoli, P. 2000. The reproductive toxicity and carcinogenicity of lead: a critical review. *Am. J. Ind. Med.* 38: 231-43.
- Lars, J. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Brit. Med. Bull.* 68:167-182.
- Lasat, M. M. 2002. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *J. Environ. Qual.* 31:109-120.
- Lerda, D.; Rezzi, R. 1991. Study of reproductive function in persons occupationally exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Mutat. Res.* 262: 47-50.
- Lessler, M. A. 1988. Lead and lead poisoning from antiquity to modern times. *Ohio J. Sci.* 88:78-84.
- Liu, J.; Goyer, R. A.; Waalkes, M. P. 2008. Toxic effects of metals. In: Klaassen, C.D. (Ed.). *Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons.* 7 ed. New York: McGraw Hill, pp. 931-979.
- Lockitch, G. 1993. Perspectives on lead toxicity. *Clin. Biochem.* 26:371-381.
- Lucesoli, F.; Fraga, C. G. 1995. Oxidative damage to lipids and DNA concurrent with decrease of antioxidants in rat testes after acute iron intoxication. *Arch. Biochem. Biophys.* 316:567-571.
- Lyu, P. Y.; Handelsman, D. J. 2003. The present and future state of hormonal treatment for male infertility. *Hum. Reprod. Updat.* 9:9-23.
- Mackie, A. C.; Townsend, A.; Waldron, H. A. 1975. Lead concentrations in the bones of Roman York. *J. Arch Soc.* 2:235-237.

- Marchlewicz, M.; Wiszniewska, B.; Gonet, B.; Baranowska-Basiocka, I.; Safranow, K.; Kolasa, A.; Glabowski, W.; Kurzawa, R.; Jakubowska, K.; Rac, M. E. 2007. Increased lipid peroxidation and ascorbic acid utilization in testis and epididymis of rats chronically exposed to lead. *Biometals* 20:13-19.
- Massanyi, P.; Lukac, N.; Makarevich, A. V.; Chrenek, P.; Forgacs, Z.; Zakrzewski, M.; Stawarz, R.; Toman, R.; Lazor, P.; Flesarova, S. 2006. Lead-induced alterations in rat kidneys and testes in vivo. *J. Toxicol. Environ. Health. Part A* 41:671-676.
- McGregor, A. J.; Mason, H. J. 1990. Chronic occupational lead exposure and testicular endocrine function. *Hum. Exp. Toxicol.* 9:371-376.
- Milton, A. L. 1988. Lead and lead poisoning from antiquity to modern times. *Ohio J. Sci.* 88:78-84.
- Murthy, C.; Saxena, K. D.; Gupta, K. S.; Chandra, V. S. 1991. Lead induced ultrastructural changes in the testis of rats. *Exp. Pathol.* 42:95-100.
- 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. 2009. Lead, cadmium, and arsenic-induced DNA damage in rat germinal cells. *DNA Cell Biol.* 28:241-248.
- Nelson, C.; Bunge, R. 1974. Semen analysis: evidence for changing parameters of male fertility potential. *Fertil. Steril.* 25:503-507.
- Nriagu, J. O. 1983. Lead and lead poisoning in antiquity. New York: John Wiley and Sons. 437p.
- Ong, C. N.; Chia, S. E.; Foo, S. C.; Ong, H. Y.; Tsakok, M.; Liouw, P. 1993. Concentrations of heavy metals in maternal and umbilical cord blood. *Biometals* 6:61-66.
- Pande, M.; Flora, S. 2002. Lead induced oxidative damage and its response to combined administration of lipoic acid and succimers in rats. *Toxicology.* 177:187-96.
- Paoliello, M. M. B.; Chasin, A. A. M. 2001. Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos. Salvador: CRA, p.1-144.
- Pasqualotto, F. F.; Locambo, C. V.; Athayde, K. S.; Arap, S. 2003. Measuring male infertility: epidemiological aspects. *Rev. Hosp. Clín.* 58:173-178.
- Patocka, J.; Cerny, K. 2003. Inorganic lead toxicology. *Acta Med.* 46:65-72.

- Paula, T. A. R., Costa, D. S., Matta, S. L. P. 2002. Avaliação histológica quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas. *Biosci. J.* 18:121-136.
- Petrelli, G.; Musti, M.; Figa-Talamanca, I. 2000. Exposure to pesticides in greenhouses and male fertility. *G. Ital. Med. Lav. Ergon.* 22:291-295.
- Plum, L.; Rink, L.; Haase, H. 2010. The essential toxin: impact of zinc on human health. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7:1342-1365.
- Poccia, D. 1994. Molecules of the somatic cells. In: Poccia, D. *Molecular biology intelligence unit: molecular aspects of spermatogenesis*. Austin: R. G. Landes Company, pp.75-90.
- Queiroz, E. K. R; Waissmann, W. 2006. Occupational exposure and effects on the male reproductive system. *Cad. Saúde Pública* 22:485-493, 2006.
- Riley, J. C. M.; Behrman, H. R., 1991. Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 198:781-791.
- Rachootin, P.; Olsen, J. 1983. The risk of infertility and layer conception associated with exposures in the Danish workplace. *J. Occup. Med.* 25:394-402.
- Rodamilans, M.; Osaba, M. J. M.; To-Figueras, J.; Rivera Fillat, F.; Ma Marques, J.; Pérez, P.; Corbella, J. 1988. Lead toxicity on endocrine testicular function in an occupational exposed population. *Hum. Exp. Toxicol.* 7:125-128.
- Rom, W. N. 1976. Effects of lead on the female and reproduction: a review. *Mt. Sinai J. Med.* 43:542-52.
- Ronis, M. J.; Badger, T. M.; Shema, S. J.; Roberson, P. K.; Shaikh, F. 1996. Reproductive toxicity and growth effects in rats exposed to lead at different periods during development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 136:361-371.
- Russell, L. D.; Ettlin, R. A.; Sinha Hikim, A. P.; Clegg, E. D., (Eds). 1990. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Bolesta: Cache River Press, pp.1-40.
- Russell, L. D.; Griswold, M. D. 1993. *The Sertoli cell*. Florida: Cache River Press, pp.1-37.
- Russell, L. D.; Chandrashekar, V.; Bartke, A.; Sinha-Hikim, A. P. 1994. The hamsters Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. *Int. J. Androl.* 17: 93-106.

- Russell, L. D. 1996. Mammalian Leydig cell structure. In: Payne, A. H.; Hardy, M. P.; Russell, L. D. (Eds). The Leydig cell. Vienna: Cache River Press, pp. 218-222.
- Sainath, S. B.; Meena, R.; Supriya, C.; Pratap Reddy K.; Sreenivasula Reddy, P. 2011. Protective role of *Centella asiatica* on lead-induced oxidative stress and suppressed reproductive health in male rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 32:146-154.
- Schmitt-Jansen, M.; Veit, U.; Dudel, G.; Altenburger, R. 2008. An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: Approaches and challenges. *Basic Appl. Ecol.* 9:337-345.
- Setchell, B. P. 1991. Male reproductive organs and semen. In: Cupps, P. T. (Ed): *Reproduction in domestic animals*, 4 ed., San Diego: Academic, 6:221-250.
- Shafai, A. E.; Zohdy, N.; Mulla, K. E. Hassan, M.; Morad, N. 2011. Light and electron microscopic study of the toxic effect of prolonged lead exposure on the seminiferous tubules of albino rats and the possible protective effect of ascorbic acid. *Food Chem. Toxicol.* 49:734-743.
- Sharma, R. K.; Agarwal, A. 1996. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology.* 48:835-850.
- Sharpe, R. M. 1994. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E.; Neill, J. D. (Eds). *The physiology of reproduction*, 2 ed., New York: Raven Press, pp. 1363-1434.
- Sheets, R. W. 1998. Release of heavy metals from European and Asian porcelain dinnerware. *Sci.Total Environ.* 212:107-113.
- Simons, T. J. B. 1993. Lead transport and binding by human erythrocytes in vitro. *Pfugers Arch.* 423:307-313.
- Skerfving, S.; Nilsson, U.; Schutz, A.; Gerhardsson, L. 1993. Biological monitoring of inorganic lead. *Scand. J. Work Environ. Health* 19:59-64.
- Smith, C. M.; Wang, X.; Hu, H.; Kelsey, K. T. 1995. A Polymorphism in the δ -aminolevulinic acid dehydratase gene may modify the pharmacokinetics and toxicity of lead. *Environ. Health Perspect.* 103:248-253.
- Sokol, R. Z.; Madding, C. E.; Swerdloff, R. S. 1985. Lead toxicity and the hypothalamic-pituitary-testicular axis. *Biol. Reprod.* 33:722-728.
- Sokol, R. Z. 1990. The effect of duration of exposure on the expression of lead toxicity on the male reproductive axis. *J. Androl.* 11:521-526.

- Sokol, R. Z.; Berman, N. 1991. The effect of age of exposure on lead-induced testicular toxicity. *Toxicology*. 69:269-278.
- Solliway, B. M.; Schaffer, A.; Pratt, H.; Yannai, S. 1996. Effects of treatment to lead on selected biochemical and hematological variables. *Pharmacol. Toxicol.* 78:18-22.
- Swan, H. S.; Elkin, E. P.; Fenster, L. 1997. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ. Health Perspect.*, 105:1228-32.
- Telisman, S.; Cvitkovic, P.; Jurasovic, J.; Pizent, A.; Gavella, M.; Rocic, B. 2000. Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. *Environ. Health Perspect.* 108:45-53.
- Thoreux-Manlay, A.; Le Goascogne, C.; Segretain, D.; Jégou, B.; Pinon-Lataillade, G. 1995. Lead affects steroidogenesis in rat Leydig cells in vivo and in vitro. *Toxicology*. 103:53-62.
- Tsalev, D. L.; Zaprianov, Z. K. 1985. Lead. In: *Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice*. Florida: CRC Press, pp. 137-150.
- Wadi, S. A.; Ahmad, G. 1999. Effects of lead on the male reproductive system in mice. *J. Toxicol. Environ. Health A* 56:513-521.
- Wang, L.; Xun, P.; Zhao, Y.; Wang, X.; Qian, L.; Chen, F. 2008. Effects of lead exposure on sperm concentrations and testes weight in male rats: a meta-regression analysis. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 71:454-463.
- Weibauer, G. F.; Wessels, J. 1999. Paracrine control of spermatogenesis. *Andrology* 31:249-262.
- Watson, W. A.; Litovitz, T. L.; Klein-Schwartz, W. I. 2004. Annual report of the American association of poison control centers toxic exposure surveillance system. *Am. J. Emerg. Med.* 22:335-404.
- WHO (World Health Organization). 1995. *Environmental Health, criteria 165-Inorganic lead*. Geneva.
- WHO (World Health Organization). 1999. *Guidelines for Air Quality*. Geneva.

Danos oxidativos, histomorfométricos e ultraestruturais nos testículos de ratos intoxicados com acetato de chumbo

Resumo

O chumbo é um poluente ambiental amplamente distribuído nos sistemas biológicos. Evidências indicam que a exposição a este metal pode causar efeitos tóxicos na reprodução de humanos e outros animais, induzindo alterações histopatológicas nos testículos e interferindo no sistema enzimático de defesas antioxidantes. Os objetivos deste trabalho foram quantificar e qualificar os efeitos da exposição subcrônica ao chumbo, através da avaliação do estresse oxidativo e de análises histopatológicas, morfométricas e ultraestruturais nos testículos de ratos Wistar adultos. Foram utilizados 25 ratos Wistar divididos em cinco grupos: o grupo controle (I) recebeu água destilada e os grupos tratados (II, III, IV e V), receberam chumbo nas doses de 16, 32, 64 e 128 mg /kg, respectivamente, em solução de acetato de chumbo por gavagem, durante 30 dias consecutivos. Após o tratamento, os animais foram anestesiados, eutanasiados e pesados, procedendo-se a coleta dos testículos. Fragmentos testiculares foram fixados e processados para microscopia de luz e eletrônica. A concentração de chumbo no testículo e a atividade das enzimas antioxidantes dismutase do superóxido (SOD) e catalase (CAT) também foram quantificadas. Análises morfométricas foram realizadas com o auxílio do programa Image Pro-Plus[®] sobre imagens digitais obtidas do parênquima testicular. As avaliações estruturais e ultraestruturais revelaram diferentes níveis de patologias no epitélio seminífero dos animais intoxicados por chumbo, tais como vacuolizações, descamação de células germinativas, presença de corpos apoptóticos e de grandes gotículas lipídicas, além de ruptura da barreira de célula de Sertoli. Observou-se redução dose-dependente da altura do epitélio e aumento no diâmetro do lúmen tubular em todos os ratos expostos ao chumbo. A população de células germinativas do epitélio seminífero diminuiu nos grupos tratados, ao passo que o número de células de Sertoli não sofreu alterações. A produção espermática diária e a reserva espermática, ambas por grama de testículo apresentaram redução nos grupos III, IV e V. Observou-se um aumento dose dependente na concentração de chumbo nos testículos dos ratos expostos ao metal. Houve redução significativa na atividade da catalase (CAT) e da dismutase do superóxido (SOD) nos grupos tratados. Conclui-se

que a exposição ao chumbo pode induzir o estresse oxidativo através da redução da atividade das enzimas antioxidantes, promovendo uma série de alterações histopatológicas e ultraestruturais nos testículos e comprometendo assim a produção espermática.

Palavras-chave: Metal pesado, túbulo seminífero, célula de Sertoli, estresse oxidativo.

1. Introdução

Com o advento da industrialização, houve grande aumento na produção de poluentes liberados no ambiente. Muitos desses poluentes são considerados tóxicos reprodutivos e causam efeitos adversos no organismo, destacando-se dentre esses, os metais pesados (Bustos-Obrégon & Hartley, 2008). A maioria dos metais pesados é desprovida de funções biológicas, ou seja, são elementos que não participam de reações bioquímicas necessárias à manutenção da vida. Contudo, uma vez introduzidos no organismo através de contaminação exógena, estes elementos podem acumular-se nos tecidos, interagindo de várias formas com a maquinaria celular e induzindo diversas alterações nos processos metabólicos dos seres vivos (Stohs & Bagchi, 1995; Benoff et al., 2000; Calderón et al., 2003; Flora et al., 2008). Um dos principais mecanismos envolvidos na toxicidade dos metais pesados tem sido atribuído ao estresse oxidativo, pois estes são capazes de provocar distúrbios no balanço pró-oxidante/antioxidante das células através da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Gurer & Ercal, 2000). As EROs estão envolvidas em diversos tipos de eventos oxidativos ocasionando a oxidação de estruturas celulares como membranas, proteínas e ácidos desoxirribonucléicos (DNA), podendo causar disfunção celular (Hsu & Guo, 2002).

Por ser um metal onipresente no ambiente, como resultado de sua ocorrência natural e sua ampla utilização industrial, o chumbo (Pb) permanece associado a diversas patologias (Apostoli et al., 1998; Landrigan et al., 2000; Watson et al., 2004; Apostoli & Catalani, 2011; Awadalla et al., 2011). Estudos têm mostrado que o estresse oxidativo induzido pelo Pb pode afetar a reprodução em homens e outros animais. De fato, um aumento da produção de EROs foi observada após exposição ao Pb nos testículos e espermatozóides em ratos (Hsu et al., 1997; Hsu et al., 1998; Batra et al., 1998; Acharya et al., 2003; Marchlewicz et al., 2007) e humanos (Solliway et al., 1996; Kasperczyk et al., 2008). Estas EROs induzidas pelo Pb foram associadas com a diminuição na contagem de espermatozóides (Hsu et al., 1998; Acharya et al., 2003; Kasperczyk et al., 2008), perda da mobilidade espermática (Hsu et al., 1997; Hsu et al., 1998; Kasperczyk et al., 2008) e aumento de espermatozóides anormais (Acharya et al., 2003). Alterações histológicas nos testículos de ratos tratados com Pb também mostraram danos testiculares, tais como desorganização do epitélio germinativo, vacuolização epitelial e perda celular (Batra et al., 1998; El-Sayed & El-Neweshy, 2010; El-Neweshy & El-Sayed, 2011; Shafai et al., 2011).

Uma consequência drástica da exposição a tóxicos reprodutivos é a infertilidade (Skakkebaek et al., 1994). Vários estudos têm mostrado que a qualidade do sêmen em homens normais está em declínio (Carlsen et al., 1992; Auger et al., 1995; Paulozzi et al., 1997; Huyghe et al., 2003) e parte dos casos de infertilidade masculina de etiologia desconhecida pode ser atribuída a vários fatores ambientais e ocupacionais (Benoff et al., 2000; Awadalla et al., 2011). Desta maneira, há um crescente interesse no papel da exposição ocupacional e ambiental a poluentes tóxicos, tais como os metais pesados, pois se entende ser esta uma das causas de declínio da concentração espermática na população humana (Becker & Berhane, 1997; Apostoli & Catalani, 2011).

Devido ao risco potencial da exposição do sistema reprodutor ao Pb torna-se necessário compreender melhor os efeitos da toxicidade desse metal sobre os mecanismos de indução do estresse oxidativo nos testículos e os danos histológicos e ultraestruturais decorrentes desse processo nos túbulos seminíferos. Os túbulos seminíferos abrigam o epitélio germinativo, elemento dinâmico e sujeito a ação de diversos agentes tóxicos (Creasy, 2001). O estudo qualitativo e quantitativo da espermatogênese permite avaliar os tipos de respostas morfológicas, bem como a severidade e a frequência de danos oxidativos causados ao parênquima testicular, permitindo a detecção mais acurada e sensível dos efeitos adversos provocados por tóxicos ambientais (Russell et al., 1990; França & Russell, 1998). Além disso, o conhecimento das alterações que ocorrem no compartimento tubular do testículo é pré-requisito para o desenvolvimento de terapias que possam ser usadas no tratamento da infertilidade masculina (Holstein et al., 2003). Dentro deste contexto, os objetivos deste trabalho foram quantificar e qualificar os efeitos da exposição subcrônica ao acetato de chumbo, através da avaliação do estresse oxidativo e de análises histopatológicas, morfométricas e ultraestruturais nos testículos de ratos Wistar adultos.

2. Material e métodos

2.1. Animais

Foram utilizados 25 ratos Wistar adultos com idade de 100 dias provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB), da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. Os animais foram mantidos sob

as mesmas condições quanto à dieta (água e ração *ad libitum*), luminosidade (12h) e temperatura (21-23°C).

2.2. Tratamentos

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) do Departamento de Veterinária da UFV (protocolo 69/2010). Os animais foram colocados em gaiolas individuais e distribuídos em 5 grupos experimentais de 5 animais cada: o grupo controle (I) recebeu água destilada e os quatro grupos tratados (II, III, IV e V) receberam chumbo nas doses de 16, 32, 64 e 128 mg/kg, respectivamente, na forma de acetato de chumbo [(C₂H₃O₂)₂Pb.3H₂O] (Sigma-Aldrich). Os tratamentos foram administrados uma vez ao dia, por gavagem, durante 30 dias consecutivos. Para impedir a precipitação do acetato de chumbo, foi adicionado 1 mL de HCl 5N para cada litro de água destilada usada para dissolver o chumbo (Allouche et al., 2009). Ao final do período experimental, os animais foram pesados e eutanasiados por inalação de CO₂. Um dos testículos, destinado às análises bioquímicas foi pesado e resfriado em nitrogênio líquido, sendo mantido armazenado em ultrafreezer (-80°C) até sua utilização.

2.3. Estudos histológicos

2.3.1. Preparação do testículo para microscopia de luz

Os testículos foram removidos, dissecados e pesados e, em seguida, imersos em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas. Fragmentos testiculares foram incluídos em hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica), seccionados em espessura de 3 µm e corados com azul de toluidina/borato de sódio 1%. Imagens do parênquima testicular foram obtidas utilizando-se microscópio Olympus AX-70 e analisadas com o auxílio do software Image-Pro Plus® (v. 6.0 – Media Cybernetics).

2.3.2. Alterações histopatológicas

Análises histopatológicas qualitativas foram realizadas observando-se alterações teciduais tubulares, nas mesmas preparações utilizadas para a morfometria de tubular. Foram analisadas duas lâminas por animal com quinze cortes semisseriados por lâmina.

2.3.3. Análises morfométricas e estereológicas

O peso do parênquima testicular foi obtido subtraindo-se a massa ocupada pela albugínea do peso total dos testículos, obtendo-se assim o peso líquido da porção funcional do órgão. O índice gonadossomático (IGS), definido pela razão entre peso corporal e testicular, foi calculado usando a fórmula: $(PG/PC) \times 100$ (PG = peso total das gônadas e PC = peso corporal (Amann, 1970).

As densidades volumétricas (V.v.) de túbulo seminífero e intertúbulo foram obtidas utilizando-se uma grade contendo 266 pontos projetados sobre imagens digitalizadas do parênquima testicular, totalizando 2660 pontos por animal. Foram registrados os pontos coincidentes sobre túbulo seminífero (túnica própria, epitélio seminífero e lúmen) e intertúbulo e, em seguida, calculado o percentual dos pontos sobre cada componente. O volume (mL) de cada componente testicular foi estimado a partir da fórmula: $\% \text{ túbulo (ou seus constituintes)}/100 \times \text{volume total do parênquima testicular}$ (Melo et al., 2010). Como a densidade do testículo de mamíferos é em torno de 1 (Paula et al., 2002; Tae et al., 2005; Leal & França, 2006; Costa et al., 2011), a massa do testículo foi considerada igual ao seu volume. Baseado nos volumes de túbulos seminíferos e nos pesos corporais foi calculado o índice tubulossomático (ITS) a partir da fórmula: $(VT/PC) \times 100$ (VT=Volume de túbulo seminífero e PC= Peso corporal).

O diâmetro tubular médio foi obtido a partir de 20 secções transversais de túbulo seminífero para cada animal. As secções escolhidas foram as mais circulares possíveis, independentes do estágio em que se encontravam. Considerou-se para tal abordagem o menor diâmetro observado em cada secção transversal, conforme recomendação de Berndtson et al. (1989). A altura do epitélio seminífero foi mensurada na mesma secção transversal em que foi aferido o diâmetro dos túbulos seminíferos. Neste caso, considerou-se a distância desde a túnica própria até a borda luminal, tomando-se duas medidas diametralmente opostas em cada secção transversal, sendo considerada como medida representativa a média das duas. O diâmetro do lúmen foi obtido subtraindo-se o diâmetro tubular das duas alturas obtidas para o epitélio seminífero.

O comprimento total (metros) dos túbulos seminíferos foi estimado a partir do volume ocupado pelos túbulos seminíferos nos testículos e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal, empregando-se a fórmula onde $CT = VTS / \pi R^2$ (VTS = volume total dos túbulos seminíferos; πR^2 = área da secção transversal dos túbulos

seminíferos; R = raio tubular) (Attal & Courot, 1963). O comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo foi calculado dividindo-se o comprimento total pelo peso bruto dos testículos.

As populações de células germinativas e de células de Sertoli foram estimadas pela contagem de 10 secções transversais de túbulos seminíferos no estágio 1 segundo o método da morfologia tubular (Berndtson, 1977). Os seguintes tipos celulares foram contados: espermatogônias do tipo A (SGA), espermatócitos primários em preleptóteno/leptóteno (PLL) e paquíteno (PQ), espermátides arredondadas (AR) e células de Sertoli (CS) com nucléolos bem evidentes. Os diâmetros nucleares e nucleolares médios, os últimos somente para células de Sertoli, foram obtidos pela mensuração de 20 núcleos ou nucléolos em cada tipo celular supracitado. Devido a variações no tamanho, a contagem dos diferentes tipos celulares foi corrigida pela fórmula proposta por Abercrombie (1946), modificada por Amann & Almquist (1962). Baseado em valores corrigidos, foi possível quantificar os seguintes coeficientes: mitose espermatogonial (PLL/SGA), rendimento meiótico (AR/PQ), rendimento geral da espermatogênese (AR/SGA), índice de célula de Sertoli (AR/CS) e capacidade total de suporte da célula de Sertoli ((SGA + PLL + PQ + AR)/CS). O número total de células de Sertoli foi determinado pelo número corrigido de nucléolos de célula de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero e o comprimento total de túbulos seminíferos (Hochereau-de-Reviere & Lincoln, 1978). A partir deste cálculo e do peso bruto de um testículo, foi estimado o número de células de Sertoli por grama de testículo.

A produção espermática diária (PED) foi calculada de acordo com Amann & Almquist (1962) e Amann (1970). A duração do ciclo do epitélio seminífero em ratos Wistar é de 12,8 dias (Russell et al., 1990; Van Haaster & De Rooij, 1993), sendo esta uma constante biológica espécie-específica. Para se calcular a produção espermática diária por grama de testículo, a produção espermática diária total foi dividida pelo peso bruto dos testículos. Os resultados foram expressos em produção diária de espermátides total e por grama de testículo.

A reserva espermática do testículo (RET) foi calculada com base na população de AR, adaptando-se a fórmula descrita por Amann (1970) e Berndtson (1977), na qual $RET = (\text{comprimento total dos túbulos seminíferos} / \text{espessura do corte}) \times (\text{número corrigido de AR})$.

2.3.4. Preparação do testículo para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Fragmentos testiculares foram fixados em glutaraldeído 5% por 24 horas e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% durante 2 horas, desidratados em acetona e incluídos em resina Epon. Secções ultrafinas (20-60 nm) foram obtidas com navalha de diamante e contrastadas com acetato de uranila 2% (25 min) e citrato de chumbo 2% (10 min), antes da observação em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss®, Leo 906).

2.4. Determinação da concentração de chumbo tecidual

Amostras de testículo foram pesadas em balança digital analítica (precisão 0,0001g - BEL Mark 210A) e posteriormente secas em estufa a 70°C, até peso seco constante. As amostras secas foram colocadas em Erlenmeyers de 25 mL juntamente com 1,5 mL de HNO₃ concentrado e 0,5 mL de HClO₄ (70%) e transferidas para uma chapa aquecedora onde a temperatura foi sendo aumentada gradativamente, a partir de 70 °C até 90 °C, de modo que a digestão do material fosse completa. O tempo médio gasto para a digestão foi de 30 minutos. Após a digestão, as amostras foram diluídas em 25 mL de água deionizada e filtradas em papel de filtro. A determinação da concentração de chumbo nessas amostras foi feita em espectrofotômetro de absorção atômica (SpectrAA 220FS Varian).

2.5. Análises enzimáticas

Para determinar a atividade da catalase (CAT), amostras de 200 mg de testículo foram homogeneizadas em tampão fosfato 50 mM e a suspensão resultante foi centrifugada por 10 min a 5.000 rpm, em 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem das enzimas. A atividade da CAT foi determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio lido em espectrofotômetro (Pró-análise UV.1600) a 240 nm, segundo método descrito por Aebi (1984). A atividade da dismutase do superóxido (SOD) foi determinada segundo protocolo adaptado de Dieterich et al. (2000), o qual é baseado na habilidade da dismutase do superóxido retirar o O₂⁻, diminuindo, assim, a razão de autooxidação do pirogalol com leitura em espectrofotômetro a 570 nm. O conteúdo de proteínas foi mensurado de acordo com o método descrito por Lowry et al. (1951). Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

2.6. Análise estatística

Análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls (SNK) foi usada para comparar médias e desvio-padrão entre os grupos experimentais. O nível de significância foi estabelecido a $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Histopatologia

3.1.1. Avaliação estrutural

Nas secções testiculares dos ratos do grupo controle os túbulos seminíferos apresentaram-se bem organizados. O epitélio seminífero mostrou-se íntegro, com células espermatogênicas em todas as etapas de desenvolvimento e células de Sertoli com seu característico núcleo irregular e nucléolos evidentes (Fig. 1a e b).

O tratamento com acetato de chumbo provocou diferentes níveis de danos aos túbulos seminíferos. Observou-se no citoplasma das células de Sertoli uma série de vacúolos, de tamanhos variados, localizados em diferentes alturas da célula, desde a região basal até o lúmen (Figs. 1c, d e g). A presença aumentada de corpos apoptóticos também foi evidenciada em alguns túbulos seminíferos (Fig. 1c). Houve aumento do espaço intercelular e descamação de células germinativas aparentemente normais em direção ao lúmen tubular, com conseqüente redução da altura do epitélio seminífero (Figs. 1d e h). Evidenciou-se ainda, a presença de túbulos atrofiados (Figs. 1e e f) e túbulos em estado de degeneração avançada, com vacúolos citoplasmáticos das células de Sertoli preenchendo quase todo o túbulo. Nestes túbulos, detectou-se ausência de células germinativas restando apenas aglomerados de células de Sertoli (Fig. 1g).

3.1.2. Avaliação ultraestrutural

Não foram observadas alterações no epitélio seminífero dos ratos do grupo controle (Fig. 2a). Entretanto, os grupos tratados com acetato de chumbo apresentaram alterações no epitélio seminífero sendo a vacuolização do citoplasma das células de Sertoli a patologia mais evidente. Vacúolos elétron-lúcidos foram observados no citoplasma destas células (Figs. 2a, c e d). Houve também aumento no espaço intercelular, tanto em células que ocupam o ambiente basal quanto o adluminal (Figs. 2b, c, d e e). Em alguns túbulos seminíferos, observaram-se corpos

apoptóticos no citoplasma das células de Sertoli (Figs. 2c, d e e). No grupo que recebeu a maior dose de Pb, observou-se maior deposição de colágeno na lâmina basal (Fig. 2f) e gotas lipídicas grandes no epitélio seminífero (Fig. 2f). A barreira de célula de Sertoli sofreu ruptura em todos os grupos tratados com acetato de chumbo (Fig. 2g).

3.2. Análises morfométricas e estereológicas

Os parâmetros biométricos analisados encontram-se na Tabela 1. Não foram observadas variações significativas entre os grupos controle e tratados quanto aos pesos testicular, do parênquima testicular e da albugínea assim como para o IGS.

Os parâmetros morfométricos tubulares do parênquima testicular encontram-se na Tabela 2. A túnica própria diminuiu significativamente nos grupos II e III e o percentual de epitélio seminífero foi menor nos grupos IV e V. O percentual de lúmen tubular aumentou nos grupos II, IV e V, não havendo variação significativa no volume da túnica própria e epitélio seminífero entre os grupos experimentais. O volume do lúmen tubular aumentou nos grupos IV e V em relação ao controle, embora o diâmetro tubular não tenha sofrido alterações entre os grupos experimentais. Entretanto, foi observada redução significativa na altura do epitélio seminífero nos grupos tratados em relação ao controle. O diâmetro do lúmen tubular aumentou nos grupos expostos ao Pb. Não houve alteração no comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, por grama de testículo e no ITS dos grupos tratados em relação ao controle.

O número corrigido de células germinativas por secção de túbulo seminífero no estágio 1 encontra-se na Tabela 3. Espermatogônias do tipo A, espermatócitos primários em preleptóteno, espermatócitos em paquíteno e espermátides arredondadas reduziram nos grupos tratados em relação ao controle, mas o número de células de Sertoli não diferiu entre os grupos experimentais.

As razões entre os números celulares corrigidos para avaliação do processo espermatogênico, índice de célula de Sertoli, produção espermática diária e reserva espermática testicular encontram-se na Tabela 4. Os índices mitótico e meiótico, o rendimento geral da espermatogênese, o índice de eficiência da célula de Sertoli e a capacidade total de suporte da célula de Sertoli não apresentaram variação significativa entre os tratamentos. O número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo, bem como a produção espermática diária também não

apresentaram variações entre os grupos experimentais. Por outro lado, a produção espermática diária por grama de testículo diminuiu significativamente nos grupos III, IV e V em relação ao grupo controle. A reserva espermática do testículo não apresentou variação entre os tratamentos, porém, houve redução significativa na reserva espermática por grama de testículo nos grupos III, IV e V em relação ao controle.

3.3. Concentração de chumbo no testículo

Na figura 3 observam-se os níveis de concentração de chumbo nos testículos de ratos expostos a diferentes doses do metal. Observou-se aumento dose dependente na concentração de chumbo nos diferentes tratamentos. Houve maior concentração do metal nos grupos III, IV e V em relação aos grupos controle e II.

3.4. Parâmetros bioquímicos

Houve redução significativa na atividade da catalase (CAT) e da dismutase do superóxido (SOD) no testículo dos ratos expostos ao chumbo comparados ao controle, como mostrado na Figura 4A e B.

4. Discussão

Análises histopatológicas têm sido amplamente utilizadas como importantes biomarcadores para toxicidade de poluentes ambientais (Hinton et al., 1992). É possível identificar prováveis alvos celulares para ação tóxica de um agente através da avaliação destas alterações. No presente estudo, a exposição ao acetato de chumbo por 30 dias promoveu alterações nos túbulos seminíferos, embora muitas áreas restaram inalteradas e a espermatogênese aparentemente se manteve normal. Alguns túbulos, visualizados em microscópio de luz, apresentaram-se mais vulneráveis do que outros à ação do metal pesado.

As avaliações estruturais e ultraestruturais mostraram-se condizentes quanto às patologias observadas. Análises ultraestruturais revelaram mais detalhes celulares, confirmando o efeito tóxico do metal sobre o epitélio seminífero. Shafai et al. (2011) também descreveram uma série de alterações ultraestruturais nos túbulos seminíferos de ratos como consequência da exposição ao chumbo. As vacuolizações observadas no citoplasma das células de Sertoli no presente estudo podem ser derivadas da dilatação e vesiculação do retículo endoplasmático liso. Segundo Murthy et al.

(1991), essa dilatação pode ser causada pela entrada de água na célula como parte da degeneração hidrópica, uma mudança que pode ocorrer nas células de Sertoli sob a influência nociva do chumbo. A função e a estrutura normal das células de Sertoli e das células germinativas são mutuamente dependentes. Uma das principais funções das células de Sertoli é manter um ambiente apropriado para proliferação e maturação de células germinativas (Creasy, 2001) e a vacuolização das células de Sertoli, o que ocorre frequentemente no início da resposta histopatológica, antecede uma degeneração extensa de células germinativas. Consequentemente, alterações na função das células de Sertoli podem resultar em perda de células germinativas no epitélio seminífero (Boekelheide et al., 2005).

Outra alteração estrutural observada nos túbulos seminíferos foi a descamação de células germinativas para o lúmen tubular. Esta descamação pode ter ocorrido devido à perda das junções celulares entre estas células e as células de Sertoli. As células germinativas normalmente apresentam junções de adesão com as células de Sertoli. Estas junções de adesão são frequentemente alvo de agentes tóxicos devido à sua morfologia ultraestrutural única e composição molecular dinâmica (Boekelheide et al., 2005). A perda de adesão das células germinativas, e seu consequente aparecimento no lúmen, são alterações descritas para muitos tóxicos de célula de Sertoli (Boekelheide et al., 2005). Os espaços intercelulares observados ao MET neste trabalho, tanto em células que ocupam o ambiente basal quanto o adluminal, reforçam a ação negativa do chumbo sobre as junções de adesão. Segundo Adhikari et al. (2001), que avaliaram as relações *in vitro* entre células germinativas e de Sertoli, o chumbo pode perturbar as interações normais entre esses tipos celulares, o que pode levar à descamação de células. Segundo os mesmos autores, a perda celular pode ser a possível razão pela qual o chumbo induz distúrbios na espermatogênese, diminuição na contagem de espermatozoides e redução da taxa espermática. O chumbo pode também funcionar como um agente desregulador de microtúbulos, o que também resulta no desprendimento de células germinativas. Assim, dependendo da severidade e da duração do dano sobre as células de Sertoli, a perda de células germinativas pode ser parcial ou completa e, em quase todas as circunstâncias, as células de Sertoli, mais resistentes à ação de tóxicos, permanecerão intactas compondo túbulos seminíferos com poucas células germinativas ou mesmo desprovidos delas (Murthy et al., 1991).

A presença de corpos apoptóticos no citoplasma das células de Sertoli observada neste trabalho pode indicar um aumento no número de células germinativas destruídas que foram fagocitadas por células de Sertoli. Essa afirmativa corrobora com o encontrado por Murthy et al. (1991) que, trabalhando com ratos contaminados com chumbo, observou corpos apoptóticos no citoplasma de células de Sertoli, além de aumento dos lisossomos. A apoptose é um processo fisiológico no tecido testicular que contribui para manter o número celular e ajuda a remover células danificadas. No entanto, a apoptose excessiva pode causar interrupção da função reprodutiva masculina (John, 2000). A presença de corpos apoptóticos também está de acordo com os resultados encontrados por Shafai et al. (2011), os quais observaram aumento da presença de apoptose em células germinativas de animais expostos ao chumbo.

No presente estudo, os túbulos seminíferos de ratos tratados com a maior concentração de Pb apresentaram maior deposição de colágeno junto às células mióides que constituem a porção externa dos túbulos seminíferos. As células mióides peritubulares podem produzir matriz extracelular e assim modular a morfologia e função das células de Sertoli (Reid & Jefferson, 1984). Há fortes evidências de que as células peritubulares, através de produtos secretores, podem estar diretamente envolvidas no controle das funções testiculares humanas, na saúde e na doença (Schell et al., 2008). Células peritubulares produzem baixos níveis de decorina, uma proteoglicana da matriz extracelular, que tem a capacidade de interferir com a sinalização de fatores de crescimento para as células espermatozóides. Por outro lado, o aumento nos níveis de decorina pode provocar a remodelação fibrótica da região peritubular, o que causaria desequilíbrio das vias de sinalização parácrina nos testículos humanos levando à redução da espermatogênese (Adam et al., 2011). Desse modo, a maior deposição de colágeno observada nos animais que receberam a maior dose do metal no presente estudo, pode ser um mecanismo adicional induzido pelo chumbo no distúrbio das funções das células de Sertoli e das células espermatozóides.

A barreira de célula de Sertoli isola as células que passam pelas fases meiótica e pós-meiótica da espermatogênese, propiciando um ambiente segregado do sistema imune e apropriado para o desenvolvimento do processo espermatozóide (Pelletier, 2011). As alterações ultraestruturais observadas no epitélio seminífero dos animais intoxicados por acetato de chumbo no presente estudo podem estar

associadas ao rompimento desta barreira, o que fatalmente comprometeu o processo espermatogênico normal, afetando diretamente as células germinativas. Esta relação foi descrita por Xia et al., (2005), os quais afirmam que o testículo é extremamente vulnerável a substâncias tóxicas. Eles observaram que, quando expostas a produtos químicos, as junções entre células de Sertoli e as junções de célula de Sertoli com células germinativas são rapidamente desfeitas provavelmente como resultado da regulação negativa de proteínas juncionais. Desse modo, há indução da perda de células germinativas que se manifesta por descamação, em vários modelos animais em experimentos utilizando tóxicos ambientais (Liu et al., 2008; Flora et al., 2011).

Os animais que receberam a maior dose de Pb no presente estudo, também apresentaram grandes gotículas de lipídio no citoplasma das células de Sertoli. Variações estágio-dependentes no conteúdo lipídico das células de Sertoli fornecem evidências morfológicas de que as funções metabólicas das células de Sertoli são sincronizadas com o ciclo espermatogênico para garantir a coordenação local da proliferação e maturação das células germinativas (Ueno & Mori, 1990). Porém, estudos têm mostrado que em ocasiões de prejuízo à espermatogênese combinado com danos às células germinativas, há o acúmulo de grandes gotículas lipídicas no citoplasma das células de Sertoli (Ueno & Mori, 1990; Bensoussan et al., 1998). Desta maneira, o aumento no volume e quantidade de gotículas lipídicas, observado no presente estudo, pode estar associado à degeneração das células germinativas nos túbulos seminíferos dos ratos intoxicados com chumbo.

No presente estudo, não foram encontradas diferenças nos pesos corporal e testicular de ratos intoxicados por chumbo em relação ao grupo controle. Resultados similares também foram observados por Marchlewicz et al. (2004), Allouche et al. (2009), El-Sayed & El-Neweshy (2010), que intoxicaram ratos com acetato de chumbo por via oral durante 180, 168 e 60 dias, respectivamente. Por outro lado, outros estudos têm demonstrado alteração significativa no peso corporal e testicular em animais expostos ao chumbo (Sokol, 1990; Thoreux-Manlay et al. 1995; Wadi & Ahamad, 1999; Ahmad et al., 2003; Biswas & Ghosh, 2004; Ait Hamadouche et al., 2009). Então, parte da heterogeneidade observada nos efeitos do chumbo em vários experimentos pode ser explicada (Allouche et al., 2009), o que dificulta a comparação entre os trabalhos. De fato, a severidade da toxicidade do chumbo parece ser dependente de fatores tais como idade do animal, duração e frequência da

exposição, rota de entrada, espécies animais utilizadas no experimento e dose administrada (Ronis et al., 1996; Wang et al., 2008).

A ausência de alteração no IGS indica que não houve um comprometimento da massa testicular devido aos diferentes tratamentos. Ronis et al., (1996) e El-Sayed & El-Neweshy (2010), que expuseram ratos ao acetato de chumbo por via oral, também não encontraram alterações neste parâmetro. Por outro lado, ratos intoxicados com Pb por via intraperitoneal, durante 30 dias, apresentaram redução significativa do IGS em relação ao grupo controle (Ahmad et al., 2003).

A proporção volumétrica de túbulos seminíferos não variou entre os grupos experimentais do presente estudo, porém os danos observados no epitélio seminífero evidenciam a ação negativa do metal sobre o ambiente tubular.

A ausência de variação do volume da túnica própria e do epitélio seminífero entre os grupos experimentais do presente estudo se deve ao maior peso testicular observado nos grupos que receberam as maiores doses do metal. Por outro lado, houve redução no percentual de túnica própria nos grupos II e III, o que sugere possível interferência do chumbo sobre a barreira de célula de Sertoli.

A redução no percentual de epitélio seminífero e o aumento no percentual e volume do lúmen tubular dos grupos que receberam as maiores doses no presente estudo reforçam a influência negativa deste metal sobre as células germinativas. Massanyi et al. (2006) também relataram o efeito negativo do chumbo sobre a estrutura e função dos testículos de ratos expostos à diferentes doses do metal. Estes autores observaram redução do número de células germinativas, bem como aumento da incidência de células apoptóticas no epitélio seminífero, o que culminou com o aumento do diâmetro do lúmen tubular.

No presente trabalho, o tratamento com acetato de chumbo não afetou o diâmetro tubular. Ratos que receberam acetato de chumbo por via intraperitoneal por 35 dias também não apresentaram alteração no diâmetro dos túbulos seminíferos (Thoreux-Manlay et al., 1995). Por outro lado, Ahmad et al. (2003) e Ait Hamadouche et al. (2009) observaram redução significativa do diâmetro tubular em ratos tratados com acetato de chumbo por via intraperitoneal e oral durante 30 e 90 dias, respectivamente.

Sabe-se que a altura do epitélio seminífero é uma mensuração mais efetiva para avaliação da produção espermática por ser este um elemento dinâmico do túbulo seminífero (Wing & Christensen, 1982). Neste trabalho, a altura do epitélio

seminífero apresentou redução nos grupos tratados, de forma proporcional às doses administradas. Resultados similares foram observados por Massanyi et al. (2006), que observaram alterações dose-dependentes nos testículos de ratos expostos ao chumbo. Com base nos resultados encontrados, estes autores acreditam que um longo período de exposição ao metal pode levar a um quadro de esterilidade. Ait Hamadouche et al. (2009) também relataram redução significativa neste parâmetro em ratos expostos ao chumbo por via oral durante 90 dias.

O diâmetro do lúmen tubular aumentou significativamente nos grupos tratados com acetato de chumbo em relação ao controle no presente estudo. Resultados similares foram observados por Massanyi et al. (2006) em ratos expostos a diferentes concentrações de nitróxido de chumbo por via intraperitoneal. Sabe-se que o chumbo pode afetar a integridade funcional da barreira de célula de Sertoli, danificando o epitélio seminífero e levando à diminuição da sua altura devido à perda de células germinativas, o que resulta em aumento do lúmen tubular (Bustos-Obregón & Hartley, 2008), o qual pode também ser resultante de uma obstrução dos túbulos ou um bloqueio no sistema de ductos (Russell et al., 1990).

Parâmetros estruturais como volume testicular, diâmetro tubular e proporção volumétrica dos túbulos seminíferos, estão intimamente relacionados com o comprimento total dos túbulos seminíferos (França & Russell, 1998). Como não houve alterações nestes parâmetros, o comprimento total de túbulos também permaneceu sem variações significativas entre os grupos experimentais. Os valores médios do comprimento de túbulos seminíferos por grama de testículo dos animais tratados com acetato de chumbo permaneceram dentro da faixa média de 10 a 15 metros descritos para os mamíferos (França & Russell, 1998).

O índice tubulossomático (ITS) é um parâmetro que visa quantificar o investimento em túbulos seminíferos em relação à massa corporal. Os grupos experimentais não diferiram significativamente entre si em relação a este parâmetro, sugerindo que o investimento em massa tubular não sofreu alterações com o tratamento no presente estudo. Porém, redução no ITS foi observada em animais tratados com baixas concentrações de cádmio (Cupertino, 2012).

O tratamento com acetato de chumbo no presente estudo não afetou o número de células de Sertoli entre os grupos experimentais, mas provocou redução numérica significativa de todos os tipos de células germinativas encontradas no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero. Similarmente, ratos tratados com diferentes

concentrações de chumbo por 90 dias também não apresentaram alteração no número de células de Sertoli, mas apresentaram redução significativa da população de pré-leptótenos, paquítenos e espermátides (Batra et al., 2004). Em outros estudos também foram relatadas reduções significativas nas populações celulares do epitélio seminífero como consequência da exposição ao chumbo (Corpas et al., 2002; Massanyi et al., 2006; Nava-Hernández et al., 2009). As células de Sertoli são mais resistentes à ação de agentes tóxicos do que as células germinativas, porém são muito sensíveis a perturbações funcionais que afetam as vias metabólicas e regulatórias, o que pode rapidamente levar a uma degeneração das células germinativas (Russell et al., 1990). A diminuição no número de células germinativas demonstra a severidade da toxicidade do chumbo nas células espermatogênicas, o que pode levar ao declínio na fertilidade em longo prazo. Interações entre as células de Sertoli e células germinativas tem sido estudadas *in vitro* utilizando culturas de células testiculares, especialmente em coculturas de células germinativas-Sertoli (Gray & Beamand, 1984; Adhikari et al., 2001). Adhikari et al. (2001) avaliaram os efeitos citotóxicos do chumbo sobre as interações entre células germinativas e células de Sertoli de ratos. Os autores observaram que as diferentes concentrações testadas induziram considerável citotoxicidade na cocultura de células germinativas-Sertoli, indicando distúrbios na interação normal entre esses tipos celulares. Assim, parece certo que o chumbo interfere nas relações Sertoli-Sertoli e Sertoli-células germinativas, fato também já comprovado para ação do cádmio (Xia et al., 2005).

As razões entre os diferentes tipos de células germinativas constituem um modo bastante seguro de se analisar a eficiência do processo espermatogênico (Berndtson, 2011). Os principais índices utilizados, baseados nas razões celulares, são o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (CEME), o rendimento meiótico (RM) e o rendimento geral da espermatogênese (RGE) os quais correspondem, respectivamente, ao grau de perdas celulares na fase espermatogonial ou proliferativa, à eficiência das duas divisões meióticas e à eficiência do processo espermatogênico como um todo (França & Russell, 1998; Berndtson, 2011). As razões entre os números celulares calculadas para avaliação do processo espermatogênico no presente estudo não variaram entre os grupos experimentais, pois, como o número de células germinativas foi progressivamente reduzido, a razão entre eles também não sofreu alterações.

Os parâmetros que avaliam a eficiência funcional das células de Sertoli, como o índice da célula de Sertoli e a capacidade total de suporte das células de Sertoli, não mostraram diferença significativa entre os grupos experimentais no presente estudo. Porém, um dos primeiros sinais de comprometimento da função das células de Sertoli está diretamente associado a danos nas células germinativas (Russell et al., 1990; Creasy, 2001). Como as células germinativas foram afetadas com o tratamento, acredita-se que o acetato de chumbo apresente ação direta sobre as células de Sertoli.

A determinação da produção espermática diária (PED) e por grama de testículo é um método quantitativo importante para avaliar a eficiência do processo espermatogênico (Amann, 1970). O tratamento com acetato de chumbo do presente estudo promoveu redução significativa da PED por grama de testículo nos grupos III, IV e V. Este resultado reflete o efeito deletério do chumbo sobre a população celular do epitélio seminífero nos animais que receberam as maiores doses do metal.

A reserva espermática testicular (RET) quantifica o número potencial de espermatozoides em produção no testículo ou por grama de testículo a cada ciclo do epitélio seminífero (Amann & Lambiase, 1969; Berndtson, 1977; França & Russell, 1998), constituindo um parâmetro útil em experimentações envolvendo a produção espermática. Neste trabalho, a redução da RET por grama de testículo nos grupos III, IV e V confirma os dados da PED, a qual também foi reduzida nesses mesmos grupos. Vários trabalhos têm descrito anormalidades e redução no número de espermatozoides em animais expostos ao chumbo (Hsu et al., 1997; Hsu et al., 1998; Wadi & Ahmad, 1999; Acharya et al., 2003), demonstrando os efeitos deletérios desse metal sobre as células germinativas. Nossos resultados comprovam a interferência negativa do acetato de chumbo sobre a produção de espermatozoides como resultado de danos gerados no epitélio seminífero, o que pode levar a um quadro de esterilidade em casos de longos períodos de exposição ao metal.

Vários trabalhos têm mostrado que a exposição ao Pb pode levar a um acúmulo do metal nos testículos (Batra et al., 1998, Haw et al., 2012) e em outros órgãos (Barry, 1975; Rader et al., 1981, Mestek et al., 1998). Os metais pesados possuem a capacidade de se acumular nos tecidos, pela estimulação da produção excessiva de EROs, gerando alterações nas funções normais das células e induzindo-as ao estresse oxidativo (Gurer & Ercal, 2000; Hsu & Guo, 2002). Altas

concentrações de Pb foram observadas nos testículos dos animais tratados em relação ao controle, indicando que o testículo é um órgão sensível a intoxicação por Pb.

No presente estudo, os animais expostos ao Pb apresentaram diminuição significativa na atividade da CAT e da SOD no testículo. Esses resultados estão em concordância com o observado por Batra et al. (1998) e Sainath et al. (2011) que também relataram redução da atividade enzimática nos testículos após exposição ao Pb. SOD e CAT são compostos enzimáticos responsáveis pela defesa antioxidante do organismo. Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades de O_2^- e de H_2O_2 , evitando assim, a formação do radical hidroxila (Harold et al., 2007). Sob condições normais, os sistemas antioxidantes das células minimizam os danos causados pelas EROs, mas quando a produção de radicais livres excede a capacidade protetora da célula, observa-se o estresse oxidativo (Hsu & Guo, 2002). Um dos principais mecanismos envolvidos na toxicidade dos metais pesados é atribuído ao estresse oxidativo (Ercal et al., 2001; Flora et al., 2008). Estudos sugerem que a exposição ao Pb altera o balanço pró-oxidante/antioxidante existente nas células de mamíferos e pode contribuir, pelo menos em parte, para a toxicidade desse elemento por afetar membranas, DNA e os sistemas de defesas antioxidantes das células (Pande & Flora, 2002; Hsu & Guo, 2002; Bolin et al., 2006; Patrick, 2006; Marchlewicz et al., 2007; Xu et al., 2008). O Pb pode alterar a atividade antioxidante das enzimas pela sua capacidade de se ligar aos grupos sulfidrilos, inibindo assim as suas funções normais (Hsu & Guo, 2002). Além disso, o Pb pode competir com alguns elementos-traço essenciais presentes nessas enzimas, substituindo-os e alterando sua atividade (Hsu & Guo, 2002; Flora et al., 2008). Desta maneira, a redução da atividade das enzimas SOD e CAT nos grupos expostos ao Pb pode ser o resultado dos efeitos inibitórios desse metal sobre os sistemas de defesa antioxidantes das células, tornando-as mais suscetíveis a danos oxidativos.

5. Conclusões

O tratamento com chumbo pode induzir o estresse oxidativo através da redução da atividade das enzimas antioxidantes, promovendo uma série de alterações morfológicas, morfométricas e ultraestruturais no testículo e comprometendo assim, a produção espermática.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo, e à FAPEMIG pelo auxílio financeiro no desenvolvimento de parte do trabalho.

6. Referências bibliográficas

- Abercrombie, M. 1946. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Ant. Rec.* 94:238-248.
- Acharya, U. R.; Rathore, R. M.; Mishra, M. 2003. Role of vitamin C on lead acetate induced spermatogenesis in Swiss mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13:9-14.
- Adam, M.; Schwarzer, J. U.; Köhn, F. M.; Strauss, L.; Poutanen, M.; Mayerhofer, A. 2011. Mast cell tryptase stimulates production of decorin by human testicular peritubular cells: possible role of decorin in male infertility by interfering with growth factor signaling. *Hum. Reprod.*, 26:2613-2625.
- Adhikari, N.; Sinha, N.; Saxena, D. K. 2001. Effect of lead on Sertoli-germ cell coculture of rat. *Toxicol. Lett.* 116:45-49.
- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* 105:121-126.
- Ahmad, I.; Muhammad, S.; Yasin, K. F. 2003. Study of the effects of lead poisoning on the testes in albino rats. *Pakistan J. Med. Res.* 42:1-9.
- Ait Hamadouche, N.; Slimani, M.; Merad-Boudia, B.; Zaoui, C. 2009. Reproductive Toxicity of Lead Acetate in Adult Male Rats. *Am. J. Sci. Res.* 3:38-50.
- Allouche, L.; Hamadouche, M.; Touabti, A. 2009. Chronic effects of low lead levels on sperm quality, gonadotropins and testosterone in albino rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 61:503-510.
- Amann, R. P., Almquist, J. O. 1962. Reproductive capacity of dairy bulls, VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *J. Dairy Sci.* 45:774-781.
- Amann, R. P.; Lambiase, J. T. 1969. The male rabbit III: determination of daily sperm production by means of testicular homogenates. *J. Anim. Sci.* 28:369-374.
- Amann, R. P. Sperm production rates. 1970. In: Johnson, A. D.; Gomes, W. R.; Vandemark, N. L. (eds). *The testis*. New York: Academic Press, v.1, Cap.7, pp. 433-482.
- Apostoli, P., Catalani, S. 2011. Metal ions affecting reproduction and development. *Met. Ions Life Sci.* 8:263-303.

- Apostoli, P.; Kiss, P.; Porru, S.; Bonde, J. P.; Vanhoorne, M. 1998. Male reproductive toxicity of lead in animals and humans. *Occup. Environ. Med.* 55:364-374.
- Attal, J.; Courot, M. 1963. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 3:219-241.
- Auger, J.; Kunstmann J. M.; Czyglik, F.; Jouannet, P. 1995. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *New Eng. J.* 332:281-285.
- Awadalla, N. J.; El-Helaly, M.; Gouida, M.; Mandour, R.; Mansour, M. 2011. Sperm chromatin structure, semen quality and lead in blood and seminal fluid of infertile men. *In. J. Occup. Environ. Med.* 1:27-36.
- Barry, P. S. 1975. A comparison of concentrations of lead in human tissues. *Brit. J. Ind. Med.* 32:119-139.
- Batra, N.; Nehru, B.; Bansal, M. P. 1998. The effect of zinc supplementation on the effects of lead on the rat testis. *Reprod. Toxicol.* 12:535-540.
- Batra, N.; Nehru, B.; Bansal, M. P. 2004. Reproductive potential of male Portan rats exposed to various levels of lead with regard to zinc status. *Br. J. Nutr.* 91:387-391.
- Becker, S.; Berhane, K. 1997. A meta-analysis of 61 sperm count studies revisited. *Fertil. Steril.* 67:1103-1108.
- Benoff, S.; Jacob, A.; Hurley, R. I. 2000. Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Hum. Reprod.* 6:107-121.
- Bensoussan, K.; Morales, C. R.; Hermo, L. 1998. Vitamin E deficiency cause incomplete spermatogenesis and affects the structural differentiation of epithelial cells of the epididymis in the rat. *J. Androl.* 19: 266-288.
- Berndtson, W. E. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J. Anim. Sci.* 44:818-883.
- Berndtson, W. E.; Neefus, C.; Foote, R. H.; Amann, R. P. 1989. Optimal replication for histometric analyses of testicular function in rats or rabbits. *Fundam. Appl. Toxicol.* 12: 291-302.
- Berndtson, W. E. 2011. The importance and validity of review technical assumptions required for quantifying sperm production rates: A Review. *J. Androl.*, 32:2-14.
- Biswas, N. M.; Ghosh, P. 2004. Effect of lead on male gonadal activity in albino rats. *Kathmandu Univ. Med. J.* 2:43-46.

- Boekelheide, K.; Johnson, K. J.; Richburg, J. H. 2005. In: Skinner, M. K.; Griswold, M. D. (Eds). Sertoli cell Biology. London: Elsevier Academic Press, pp. 345-382.
- Bolin, C. M.; Basha, R.; Cox, D.; Zawia, N. H.; Maloney, B.; Lahiri, D. K.; Cardozo-Pelaez, F. 2006. Exposure to lead and the developmental origin of oxidative DNA damage in the aging brain. *Faseb. J.* 20:788-790.
- Bustos-Obregón, E.; Hartley, B. R. 2008. Ecotoxicology and testicular damage (Environmental chemical pollution). A Review. *Int. J. Morphol.* 26:833-840.
- Calderón, J.; Ortiz-Pérez, D.; Yáñez, L.; Díaz-Barriga, F. 2003. Human exposure to metals. Pathways of exposure, biomarkers of effect, and host factors. *Ecotox. Environ. Safe.*, 56:93-103.
- Carlsen, E.; Giwercman, A.; Keiding, N.; Skakkebaek, N. E. 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Med. J.* 305:609-613.
- Corpas, I.; Castillo, M.; Marquina, D.; Benito, M. 2002. Lead intoxication in gestational and lactational periods alters the development of male reproductive organs. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 53:259-266.
- Costa, K. L. C.; Matta, S. L. P.; Gomes, M. L. M.; Paula, T. A. R.; Freitas, K. M.; Carvalho, F. A. R.; Silveira, J. A.; Dolder, H.; Mendis-Handagama, C. 2011. Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Anim. Reprod. Sci.* 127:202-212.
- Creasy, D. M. 2001. Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicol. Pathol.* 29:64-70.
- Cupertino, M. C. 2012. Danos oxidativos e histológicos crônicos causados pelo cádmio no fígado e na espermatogênese de ratos. *Dissertação Mestrado. Universidade Federal de Viçosa.* 70p.
- Dieterich, S.; Bieligk, U.; Beulich, K.; Hasenfuss, G.; Prestle, J. 2000. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation* 101:33-39.
- El-Sayed, Y. S.; El-Neweshy, M. S. 2010. Impact of lead toxicity on male rat reproduction at “hormonal and histopathological levels”. *Toxicol. Environ. Chem.* 92:765-774.
- El-Neweshy, M. S.; El-Sayed, Y. S. 2011. Influence of vitamin C supplementation on lead-induced histopathological alterations in male rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 63:221-227.

- Ercal, N.; Gurer-Orhan, H.; Aykin-Burns, N. 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.* 1:529-539.
- Flora, S. J. S.; Mittal, M.; Mehta, A. 2008. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J. Med. Res.* 128:501-523.
- Flora, S. J. S.; Pachauri, V.; Saxena, G. 2011. Arsenic, cadmium and lead. In: Gupta, R. C. (Ed.). *Reproductive and developmental toxicology*. Academic Press, London, pp. 416-438.
- França, L. R.; Russell, L. D. 1998. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia F, Regadera J (Eds). *Male reproduction - a multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Communications. pp. 198-219.
- Gray, T. J. B.; Beamand, J.A. 1984. Effect of some phthalate esters and other testicular toxins on primary cultures of testicular cells. *Food Chem. Toxicol.* 22:123-131.
- Gurer, H.; Ercal, N. 2000. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radical Biol. Med.*, 29:927-945.
- Harold, E. S.; Darrell E. A.; Evan, I. F.; John, A. M. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J. Nutr. Biochem.* 18:567-579.
- Haw, K. Y.; Chakravarthi, S.; Haleagrahara, N.; Rao, M. 2012. Effects of *Etlingera elatior* extracts on lead acetate-induced testicular damage: A morphological and biochemical study. *Exp. Ther. Med.* 3:99-104.
- Hinton, D. E.; Bauman, P. C.; Gardner, G. R.; Hawkins, W. E.; Hendricks, J. D.; Murchelano, R. A.; Okihiro, M. S. 1992. Histopathologic biomarkers. In: Huggett, R. J.; Kimerle, R. A.; Mehrle, P. M. Jr.; Bergman, H. L. (Eds.). *Biomarkers: bio-chemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publ. Boca Raton, pp.155-209.
- Hochereau-de Reviers, M. T.; Lincoln, G. A. 1978. Seasonal variation in histology of testis of red deer, *Cervus elaphus*. *J. Reprod. Fertil.* 54:209-213.
- Holstein, A. F.; Schulze, W.; Davidoff, M. 2003. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1:107.
- Hsu, P. C.; Liu, M. Y.; Hsu, C. C.; Chen, L. Y.; Guo, Y. L. 1997. Lead exposure causes generation of reactive oxygen species and functional impairment in rat sperm. *Toxicology* 122:133-43.

- Hsu, P. C.; Hsu, C. C.; Liu, M. Y.; Chen, L. Y.; Guo, Y. L. 1998. Lead-induced changes in spermatozoa function and metabolism. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 55:45-64.
- Hsu, P. C.; Guo, Y. L. 2002. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology* 180:33-44.
- Huyghe, E.; Matsuda, T.; Thonneau, P. 2003. Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *J. Urol.* 170:5-11.
- John, H. 2000. The relevance of spontaneous and chemically induced alterations in testicular germ cell apoptosis to toxicology. *Toxicol. Lett.* 112:79-86.
- Karnovsky, M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27:137-138.
- Kasperczyk, A.; Kasperczyk, S.; Horak, S.; Ostalowska, A.; Grucka-Mamczar, E.; Romuk, E. 2008. Assessment of semen function and lipid peroxidation among lead exposed men. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 228:378-384.
- Landrigan, P. J.; Boffetta, P.; Apostoli, P. 2000. The reproductive toxicity and carcinogenicity of lead: a critical review. *Am. J. Ind. Med.* 38:231-43.
- Leal, M. C.; França, L. R. 2006. The seminiferous epithelium cycle length in the black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) is similar to humans. *Biol. Reprod.* 74:616-624.
- Liu, J.; Goyer, R. A.; Waalkes, M. P. 2008. Toxic effects of metals. In: Klaassen, C.D. (Ed.). *Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 7th ed. New York: McGraw Hill, pp. 931-979.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Marchlewicz, M.; Michalska, T.; Wiszniewska, B. 2004. Detection of lead-induced oxidative stress in the rat epididymis by chemiluminescence. *Chemosphere* 57:1553-1562.
- Marchlewicz, M.; Wiszniewska, B.; Gonet, B.; Baranowska-Basiocka, I.; Safranow, K.; Kolasa, A.; Glabowski, W.; Kurzawa, R.; Jakubowska, K.; Rac, M. E. 2007. Increased lipid peroxidation and ascorbic acid utilization in testis and epididymis of rats chronically exposed to lead. *Biometals* 20:13-19.

- Massanyi, P.; Lukac, N.; Makarevich, A. V.; Chrenek, P.; Forgacs, Z.; Zakrzewski, M.; Stawarz, R.; Toman, R.; Lazor, P.; Flesarova, S. 2006. Lead-induced alterations in rat kidneys and testes in vivo. *J. Toxicol. Environ. Health. Part A* 41:671-676.
- Melo, F. C. S. A.; Matta, S. L. P.; Paula, T. A. R.; Gomes, M. L. M.; Oliveira, L. C. 2010. The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult Wistar rats. *Biol. Res.* 43:445-450.
- Mestek, O.; Deyl, Z.; Miksík, I.; Novotná, J.; Pfeifer, I.; Herget, J. 1998. Accumulation of lead in tissues after its administration in drinking water to laboratory rats. *Physiol. Res.* 47:197-202.
- Murthy, C.; Saxena, K. D.; Gupta, K. S.; Chandra, V. S. 1991. Lead induced ultrastructural changes in the testis of rats. *Exp. Pathol.* 42:95-100.
- 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. 2009. Lead, cadmium, and arsenic-induced DNA damage in rat germinal cells. *DNA Cell Biol.* 28:241-248.
- Pande, M.; Flora, S. 2002. Lead induced oxidative damage and its response to combined administration of lipoic acid and succimers in rats. *Toxicology* 177:187-96.
- Patrick, L. 2006. Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern. Med. Rev.* 11:114-127.
- Paula, T. A. R.; Costa, D. S.; Matta, S. L. P. 2002. Avaliação histológica quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas. *Biosci. J.* 18:121-136.
- Paulozzi, L. J.; Erickson, J. D.; Jackson, R. J. 1997. Hypospadias trends in two US surveillance systems. *Pediatrics* 100:831-834.
- Pelletier, R. M. 2011. The blood-testis barrier: the junctional permeability, the proteins and the lipids. *Prog. Histochem. Cytochem.* 46:49-127.
- Rader, J.; Peeler, J. T.; Mahaffey, K. R. 1981. Comparative toxicity and tissue distribution of lead acetate in weanling and adult rats. *Environ. Health Persp.* 42:187-195.

- Reid, L. M.; Jefferson, D. 1984. Cell culture studies using extracts of extracellular matrix to study growth and differentiation in mammalian cells. In: Mather, J. P. (Ed.). Mammalian Cell Culture. New York: Plenum Publishing Corp.
- Ronis, M. J.; Badger, T. M.; Shema, S. J.; Roberson, P. K.; Shaikh, F. 1996. Reproductive toxicity and growth effects in rats exposed to lead at different periods during development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 136:361-371.
- Russell, L. D.; Ettlin, R. A.; Sinha Hikim, A. P.; Clegg, E. D. 1990. Mammalian spermatogenesis. In: Russell, L. D.; Ettlin, R. A.; Sinha Hikim, A. P.; Clegg, E. D. (Eds). Histological and histopathological evaluation of the testis. Bolesta: Cache River Press, pp.1-40.
- Sainath, S. B.; Meena, R.; Supriya, C.; Pratap Reddy K.; Sreenivasula Reddy, P. 2011. Protective role of *Centella asiatica* on lead-induced oxidative stress and suppressed reproductive health in male rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 32:146-154.
- Schell, C.; Albrecht, M.; Mayer, C.; Schwarzer, J. U.; Frungieri, M. B.; Mayerhofer, A. 2008. Exploring human testicular peritubular cells: Identification of secretory products and regulation by tumor necrosis factor- β . *Endocrinology* 149:1678-686.
- Shafai, A. E.; Zohdy, N.; Mulla, K. E. Hassan, M.; Morad, N. 2011. Light and electron microscopic study of the toxic effect of prolonged lead exposure on the seminiferous tubules of albino rats and the possible protective effect of ascorbic acid. *Food Chem. Toxicol.* 49:734-743.
- Skakkebaek, N. E.; Giwercman, A.; de Kretser, D. 1994. Pathogenesis and management of male infertility. *Lancet* 343:147-149.
- Sokol, R. Z. 1990. The effect of duration of exposure on the expression of lead toxicity on the male reproductive axis. *J. Androl.* 11:521-526.
- Solliway, B. M.; Schaffer, A.; Pratt, H.; Yannai, S. 1996. Effects of treatment to lead on selected biochemical and hematological variables. *Pharmacol. Toxicol.* 78:18-22.
- Stohs, S. J.; Bagchi, D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metals ions. *Free Radical Biol. Med.* 18:321-336.

- Tae, H. J.; Jang, B.G.; Ahn, D. C.; Choi, E. Y.; Kang, H. S.; Kim, N. S.; Lee, J. H.; Park, S.Y.; Yang, H. H.; Kim, I. S. 2005. Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus karpowi*) during the breeding and non-breeding season. *Vet. Res. Commun.* 29:629-643.
- Thoreux-Manlay, A.; de la Calle, J. F. V.; Olivier, M. F.; Soufir, J. C.; Masse, R.; Pinon-Lataillade, G. 1995. Impairment of testicular endocrine function after lead intoxication in the adult rat. *Toxicology* 100:101-109.
- Ueno, H.; Mori, H. 1990. Morphometrical analysis of Sertoli cell ultrastructure during the seminiferous epithelial cyclic in rats. *Biol. Reprod.* 43:769-776.
- Van Haaster, L. H.; De Rooij, D. G. 1993. Spermatogenesis is accelerated in the immature Djungarian and Chinese hamster and rat. *Biol. Reprod.* 49:1229-1235.
- Wadi, S. A.; Ahmad G. 1999. Effects of lead on the male reproductive system in mice. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 56:513-521.
- Wang, L.; Xun, P.; Zhao, Y.; Wang, X.; Qian, L.; Chen, F. 2008. Effects of lead exposure on sperm concentrations and testes weight in male rats: a meta-regression analysis. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 71:454-463.
- Watson, W. A.; Litovitz, T. L.; Klein-Schwartz, W. I. 2004. Annual report of the American association of poison control centers toxic exposure surveillance system. *Am. J. Emerg. Med.* 22:335-404.
- Wing, T. Y.; Christensen, A. K. 1982. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am. J. Anat.* 165:13-25.
- Xia, W.; Mruk, D. D.; Lee, W. M.; Cheng, C. Y. 2005. Cytokines and junction restructuring during spermatogenesis: a lesson to learn from the testis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16:469-493.
- Xu, J.; Lian, L.; Wu, C.; Wang, X.; Fu, W.; Xu, L. 2008. Lead induces oxidative stress, DNA damage and alteration of p53, Bax and Bcl-2 expressions in mice. *Food Chem. Toxicol.* 46:1488-1494.

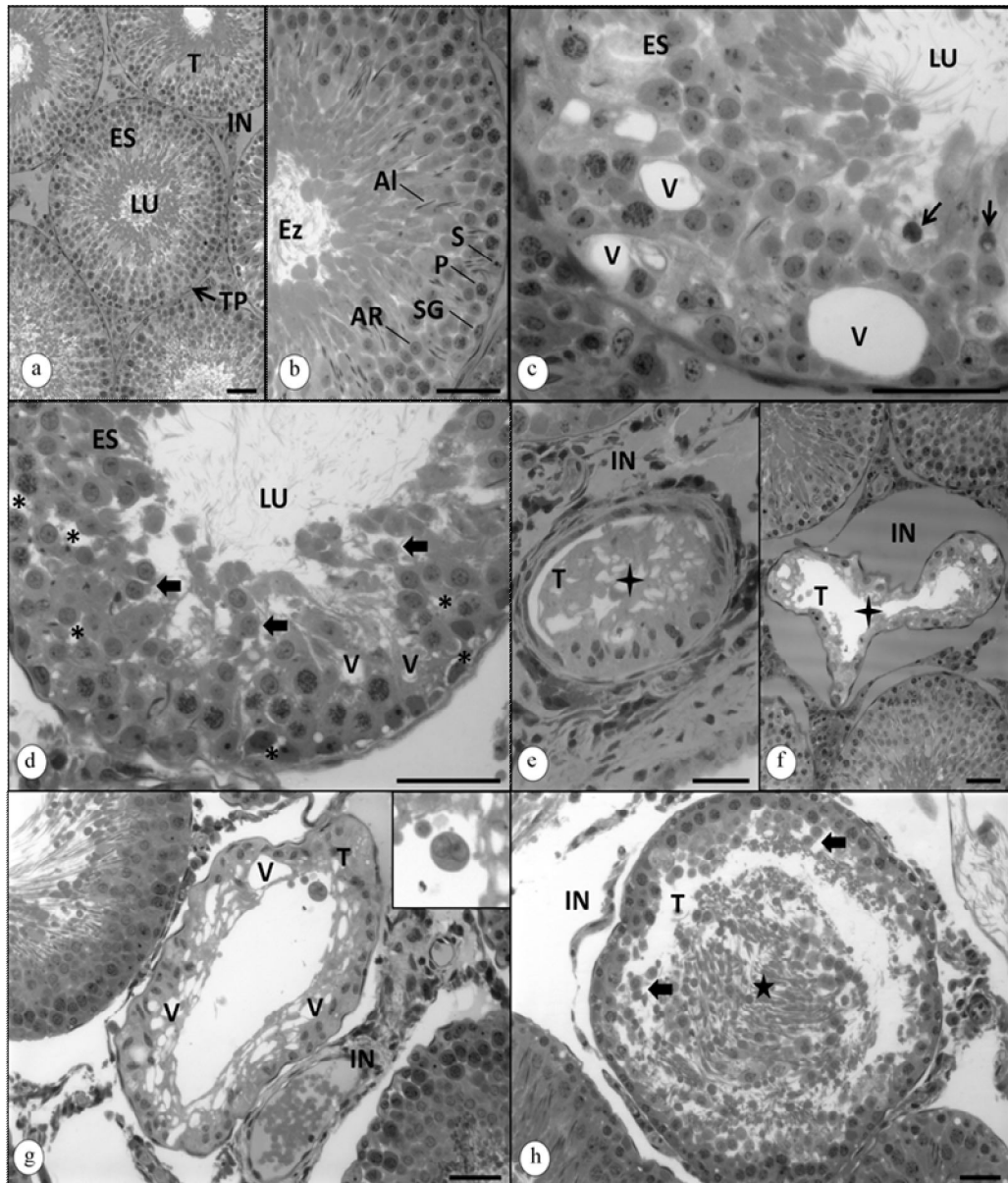


Figura 1. Secções histológicas transversais de túbulos seminíferos de ratos Wistar controle e tratados com acetato de chumbo (AcPb). **a-b:** grupo I (controle); **c:** grupo II (16 mg Pb/kg); **d:** grupo III (32 mg Pb/kg); **e:** grupo V (128 mg Pb/kg); **f:** grupo II (16 mg Pb/kg); **g:** grupo IV (64 mg Pb/kg). Detalhe: agregado celular; **h:** grupo V (128 mg Pb/kg). **TP:** túnica própria; **T:** túbulo seminífero; **ES:** epitélio seminífero; **LU:** lúmen tubular; **IN:** intertúbulo; **SG:** espermatogônia; **S:** célula de Sertoli; **P:** espermátócito primário em paquíteno; **AR:** espermátide arredondada; **AL:** espermátide alongada; **EZ:** espermatozóides; **V:** vacúolo; **➔:** células germinativas em apoptose; **➤:** descamação celular; **+**: túbulo atrofiado; **★:** células germinativas descamadas no lúmen. Barras: 50µm.

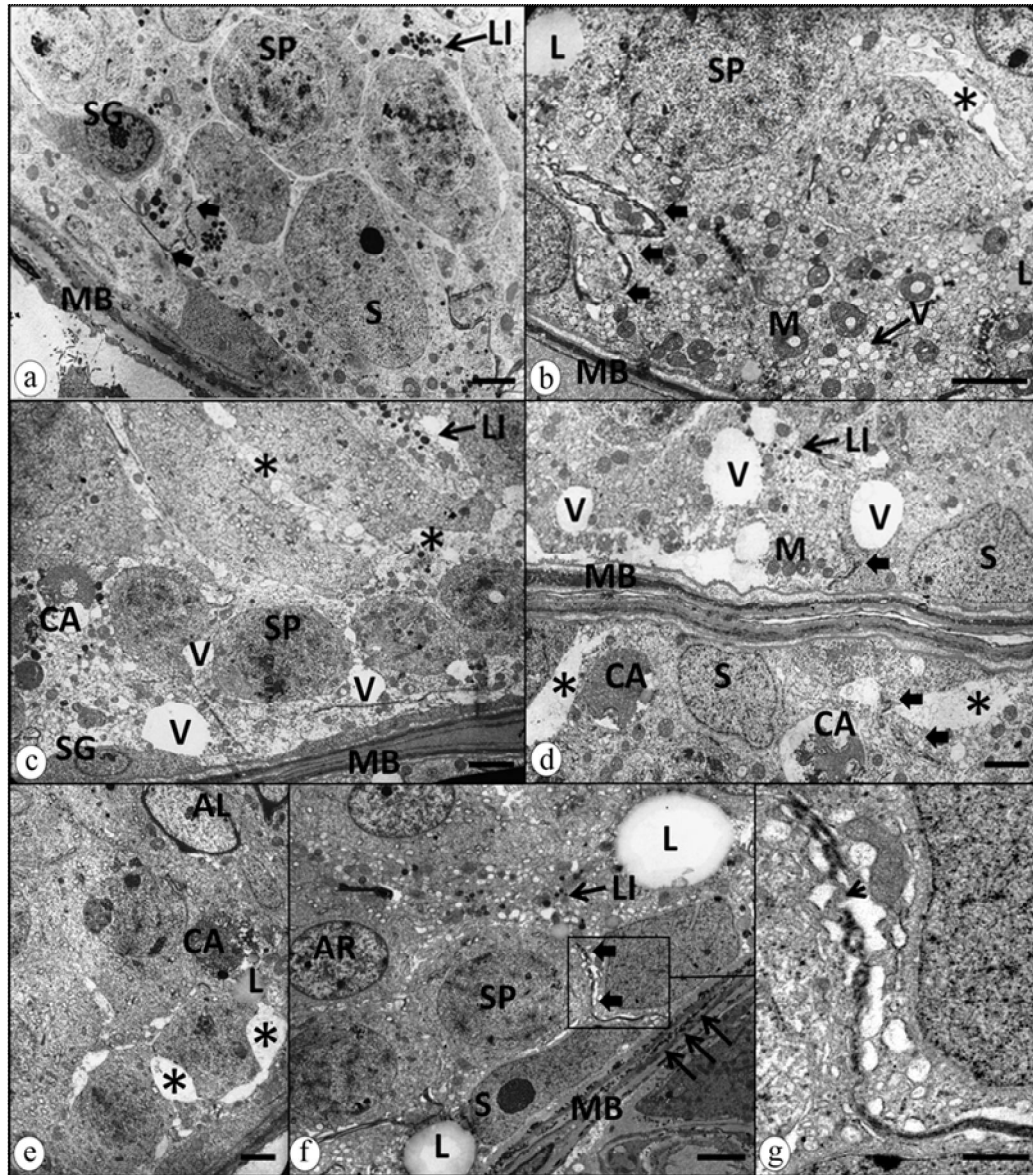


Figura 2. Ultraestrutura de túbulos seminíferos de ratos controle e tratados com acetato de chumbo (AcPb). **a:** grupo I (controle); **b:** grupo II (16 mg Pb/kg); **c-d:** grupo III (32 mg Pb/kg); **e:** grupo IV (64 mg Pb/kg); **f-g:** grupo V (128 mg Pb/kg). **MB:** membrana basal; **S:** célula de Sertoli; **SG:** espermatogônia; **SP:** espermatócito; **AR:** espermátide arredondada; **AL:** espermátide alongada; **L:** lipídio; **Li:** lisossomo; **M:** mitocôndria; **V:** vacúolo; **CA:** corpos apoptóticos; *****: espaço intercelular; **↖:** deposição de colágeno; **➡:** barreira de célula de Sertoli; **◀:** Ruptura da barreira de célula de Sertoli (detalhe) e comunicação entre células de Sertoli. Barras: 5µm.

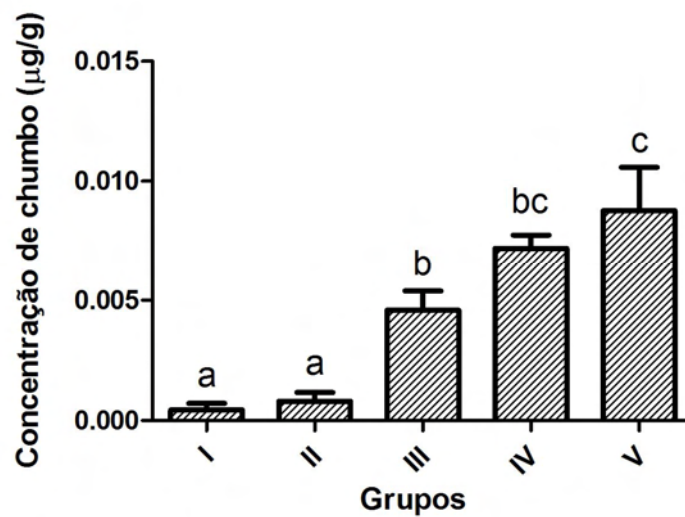


Figura 3. Concentração de chumbo ($\mu\text{g/g}$) nos testículos de ratos Wistar controle e expostos a diferentes doses de acetato de chumbo (AcPb). Letras iguais indicam que as médias não diferem significativamente entre si ($p>0,05$). Grupo I: controle; Grupo II: 16 mg Pb/kg; Grupo III: 32 mg Pb/kg; Grupo IV: 64 mg Pb/kg; Grupo V: 128 mg Pb/kg.

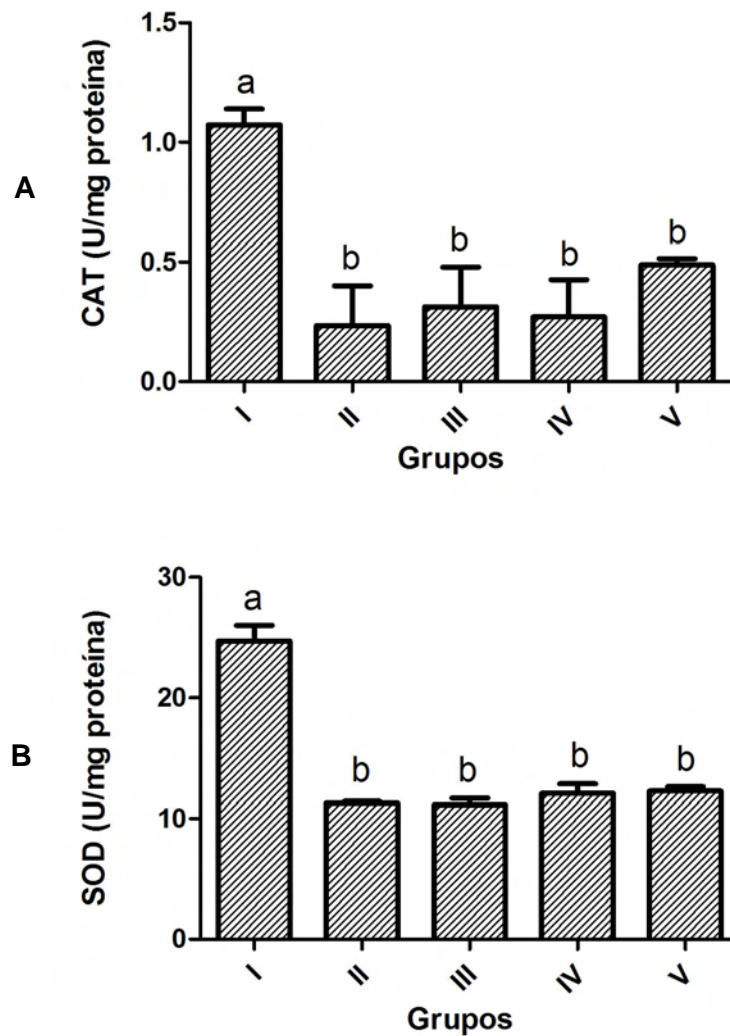


Figura 4. Efeitos do acetato chumbo (AcPb) sobre as enzimas antioxidantes nos testículos de ratos Wistar adultos. **A)** Atividade da catalase (CAT) e **B)** Atividade da dismutase do superóxido (SOD). Letras iguais indicam que as médias não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). Grupo I: controle; Grupo II: 16 mg Pb/kg; Grupo III: 32 mg Pb/kg; Grupo IV: 64 mg Pb/kg; Grupo V: 128 mg Pb/kg.

Tabela 1. Parâmetros biométricos corporais, testiculares e índice gonadossomático (IGS) de ratos Wistar adultos controle e tratados com AcPb (média \pm Desvio padrão; n=5).

Parâmetro	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
Peso corporal(g)	377,50 \pm 10,21 ^a	372,50 \pm 28,01 ^a	398,50 \pm 6,75 ^a	401,40 \pm 19,78 ^a	408,00 \pm 30,59 ^a
Peso testicular(g)	3,13 \pm 0,43 ^a	3,09 \pm 0,20 ^a	3,42 \pm 0,29 ^a	3,36 \pm 0,25 ^a	3,50 \pm 0,34 ^a
Peso do parênquima(g)	3,08 \pm 0,43 ^a	3,04 \pm 0,20 ^a	3,36 \pm 0,30 ^a	3,31 \pm 0,25 ^a	3,45 \pm 0,34 ^a
Peso da albugínea(g)	0,05 \pm 0,01 ^a	0,05 \pm 0,00 ^a	0,05 \pm 0,01 ^a	0,05 \pm 0,01 ^a	0,05 \pm 0,01 ^a
IGS(%)	0,83 \pm 0,12 ^a	0,83 \pm 0,04 ^a	0,86 \pm 0,06 ^a	0,84 \pm 0,05 ^a	0,86 \pm 0,06 ^a

Letras iguais na linha indicam que as médias não diferem significativamente entre si ($p>0,05$). Grupo I: controle; Grupo II: 16 mg Pb/kg; Grupo III: 32 mg Pb/kg; Grupo IV: 64 mg Pb/kg; Grupo V: 128 mg Pb/kg.

Tabela 2. Parâmetros morfométricos tubulares do parênquima testicular de ratos Wistar adultos tratados com AcPb (média \pm Desvio padrão; n=5).

Parâmetro	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
TS (%)	89,20 \pm 1,40 ^a	88,77 \pm 2,90 ^a	84,90 \pm 2,78 ^a	86,47 \pm 2,88 ^a	85,80 \pm 3,14 ^a
TP (%)	3,79 \pm 0,86 ^a	2,63 \pm 0,25 ^b	2,75 \pm 0,41 ^b	4,30 \pm 0,82 ^a	3,20 \pm 0,63 ^{ab}
ES (%)	69,17 \pm 2,65 ^a	66,04 \pm 1,81 ^{ab}	66,21 \pm 3,74 ^{ab}	62,71 \pm 2,49 ^b	62,84 \pm 1,69 ^b
LT (%)	16,24 \pm 1,80 ^a	20,10 \pm 1,82 ^b	15,94 \pm 1,45 ^a	19,46 \pm 2,48 ^b	19,76 \pm 2,04 ^b
TS (mL)	2,76 \pm 0,43 ^a	2,70 \pm 0,21 ^a	2,86 \pm 0,27 ^a	2,87 \pm 0,29 ^a	2,96 \pm 0,29 ^a
TP (mL)	0,12 \pm 0,04 ^a	0,08 \pm 0,01 ^a	0,09 \pm 0,01 ^a	0,14 \pm 0,03 ^a	0,11 \pm 0,01 ^a
ES (mL)	2,13 \pm 0,32 ^a	2,01 \pm 0,15 ^a	2,23 \pm 0,27 ^a	2,08 \pm 0,21 ^a	2,17 \pm 0,25 ^a
LT (mL)	0,50 \pm 0,10 ^a	0,61 \pm 0,07 ^{ab}	0,53 \pm 0,04 ^{ab}	0,65 \pm 0,10 ^b	0,68 \pm 0,06 ^b
DT (μ m)	308,51 \pm 19,9 ^a	293,64 \pm 8,9 ^a	307,99 \pm 6,7 ^a	303,69 \pm 10,0 ^a	295,73 \pm 10,0 ^a
AE (μ m)	96,80 \pm 6,56 ^a	78,13 \pm 3,50 ^b	76,71 \pm 3,23 ^b	65,66 \pm 1,88 ^c	64,07 \pm 1,90 ^c
DL (μ m)	114,90 \pm 9,99 ^a	137,39 \pm 18,25 ^b	154,57 \pm 6,40 ^c	172,36 \pm 9,47 ^c	167,59 \pm 7,46 ^c
CT/T (m)	37,54 \pm 9,34 ^a	39,89 \pm 3,25 ^a	38,48 \pm 4,94 ^a	39,77 \pm 5,82 ^a	43,27 \pm 5,07 ^a
CT/gT(m)	11,87 \pm 1,60 ^a	12,93 \pm 0,84 ^a	11,23 \pm 0,52 ^a	11,81 \pm 1,08 ^a	12,35 \pm 0,95 ^a
ITS (%)	0,73 \pm 0,11 ^a	0,73 \pm 0,05 ^a	0,72 \pm 0,06 ^a	0,71 \pm 0,05 ^a	0,73 \pm 0,04 ^a

Letras iguais na linha indicam que as médias não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). Grupo I: controle; Grupo II: 16 mg Pb/kg; Grupo III: 32 mg Pb/kg; Grupo IV: 64 mg Pb/kg; Grupo V: 128 mg Pb/kg. TS: Túbulo seminífero; TP: Túnica própria; ES: Epitélio seminífero; LT: lúmen tubular; DT: Diâmetro tubular; AE: Altura de epitélio seminífero; LT: lúmen tubular; DL: Diâmetro do lúmen tubular; CT/T: Comprimento total de túbulos seminíferos por testículo; CT/g T: Comprimento total de túbulos seminíferos por grama de testículo; ITS: índice tubulossomático.

Tabela 3. População celular corrigida de ratos Wistar adultos tratados com AcPb (média \pm Desvio padrão; n=5).

Parâmetro	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
SGA	1,67 \pm 0,32 ^a	1,15 \pm 0,26 ^b	1,28 \pm 0,20 ^b	1,27 \pm 0,17 ^b	1,50 \pm 0,06 ^b
PLL	28,83 \pm 3,50 ^a	25,21 \pm 1,57 ^{bc}	25,18 \pm 1,07 ^b	22,86 \pm 1,35 ^{bc}	22,13 \pm 1,25 ^c
PQ	30,65 \pm 3,86 ^a	25,59 \pm 1,23 ^b	24,96 \pm 1,90 ^b	23,33 \pm 0,50 ^b	23,04 \pm 0,47 ^b
AR	82,76 \pm 9,17 ^a	68,93 \pm 3,41 ^b	69,79 \pm 6,48 ^b	66,03 \pm 6,32 ^b	63,63 \pm 2,28 ^b
CS	11,08 \pm 1,59 ^a	9,56 \pm 1,08 ^a	9,72 \pm 0,69 ^a	9,62 \pm 0,86 ^a	10,04 \pm 1,54 ^a

Letras iguais na linha indicam que as médias não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). Grupo I: controle; Grupo II: 16 mg Pb/kg; Grupo III: 32 mg Pb/kg; Grupo IV: 64 mg Pb/kg; Grupo V: 128 mg Pb/kg. SGA: Espermatogônia do tipo A; PLL: Espermatócito primário em pré-leptóteno/leptóteno; PQ: Espermatócito primário em paquíteno; AR: Espermatídes arredondadas; CS: células de Sertoli.

Tabela 4. Razões entre os números celulares, índice de célula de Sertoli, produção e reserva espermática do testículo de ratos Wistar adultos tratados com AcPb (média ± Desvio padrão; n=5).

Parâmetro	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
CEME	17,82±4,26 ^a	22,69±4,37 ^a	20,04±3,53 ^a	18,37±3,13 ^a	18,41±1,27 ^a
RM	2,72±0,30 ^a	2,69±0,03 ^a	2,80±0,15 ^a	2,83±0,21 ^a	2,76±0,10 ^a
RGE	50,48±5,88 ^a	62,41±14,18 ^a	55,42±10,30 ^a	52,90±8,57 ^a	52,42±2,25 ^a
ICS	7,52±0,67 ^a	7,28±0,89 ^a	7,21±0,83 ^a	6,88±0,61 ^a	6,45±0,97 ^a
CTCS	13,10±1,30 ^a	12,77±1,66 ^a	12,52±1,29 ^a	11,84±0,81 ^a	11,20±1,75 ^a
CS/T	69,38±21,75 ^a	63,38±6,63 ^a	62,57±11,10 ^a	63,93±12,69 ^a	72,03±11,43 ^a
CS/g T	43,64±7,79 ^a	41,25±5,52 ^a	36,41±3,71 ^a	37,96±5,81 ^a	41,37±7,52 ^a
PED	80,01±17,59 ^a	71,45±4,54 ^a	70,28±14,32 ^a	69,00±16,63 ^a	71,57±7,56 ^a
PED/g T	25,39±2,77 ^a	23,15±0,58 ^{ab}	20,45±2,66 ^b	20,43±3,84 ^b	20,43±1,23 ^b
RET	1024,15±225,18 ^a	914,60±58,15 ^a	899,63±183,25 ^a	883,18±212,92 ^a	916,14±96,81 ^a
RET/g	325,03±35,45 ^a	296,35±7,48 ^{ab}	261,72±34,02 ^b	261,48±49,18 ^b	261,55±15,70 ^b

Letras iguais na linha indicam que as médias não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). Grupo I: controle; Grupo II: 16 mg Pb/kg; Grupo III: 32 mg Pb/kg; Grupo IV: 64 mg Pb/kg; Grupo V: 128 mg Pb/kg. CEME: Coeficiente de eficiência de mitose espermatogonial; RM: Rendimento meiótico; RGE: Rendimento geral da espermatogênese; ICS: Índice de célula de Sertoli; CTCS: Capacidade total de suporte das células de Sertoli; CS/T: Número de célula de Sertoli por testículo ($\times 10^6$); CS/g T: Célula de Sertoli por grama de testículo ($\times 10^6$); PED: Produção espermática diária ($\times 10^6$); PED/g T: Produção espermática diária por grama de testículo ($\times 10^6$); RET: Reserva espermática do testículo ($\times 10^6$); RET/g: Reserva espermática por grama de testículo ($\times 10^6$).

ARTIGO II

Avaliação histomorfométrica e ultraestrutural do intertúbulo de ratos Wistar expostos ao acetato de chumbo

Resumo

A exposição ao chumbo está associada a uma variedade de efeitos tóxicos nos testículos que interferem negativamente no processo espermatogênico. Estudos têm demonstrado que esta ação pode estar associada a disfunções no eixo hipotálamo-hipófise-células de Leydig. O objetivo desse trabalho foi avaliar, através de análises histomorfométricas, ultraestruturais e da quantificação dos níveis séricos de testosterona, alterações no ambiente intertubular de ratos Wistar adultos expostos ao chumbo. Foram utilizados 25 ratos Wistar divididos em cinco grupos: o grupo controle (I) recebeu água destilada e os grupos tratados (II, III, IV e V), receberam chumbo nas doses de 16, 32, 64 e 128 mg /kg, respectivamente, em solução de acetato de chumbo por gavagem, durante 30 dias consecutivos. Na avaliação estrutural, foi observada a presença de edema no intertúbulo dos animais tratados com chumbo. A microscopia eletrônica revelou maiores detalhes e permitiu a visualização mais precisa de alterações, especialmente, nas células de Leydig e vasos sanguíneos. Houve aumento no volume do espaço linfático nos grupos III e V. A proporção do espaço linfático foi maior nos grupos III, IV e V em relação ao controle. Observou-se redução significativa na proporção volumétrica das células de Leydig nos grupos expostos ao chumbo. Houve aumento no volume e proporção de tecido conjuntivo nos grupos tratados em relação ao controle. O volume e a proporção de macrófagos não variaram entre os grupos experimentais, exceto no grupo II. O volume citoplasmático e o volume das células de Leydig reduziram nos grupos tratados em relação ao controle. Houve redução significativa nos níveis séricos de testosterona nos grupos que receberam chumbo. Em conclusão, os resultados sugerem que as alterações histomorfométricas e ultraestruturais no compartimento intertubular do testículo, observadas após a administração do chumbo, podem ser responsáveis pela inibição da esteroidogênese o que pode afetar o processo espermatogênico promovendo falhas na produção espermática.

Palavras-chave: Metal pesado, células de Leydig, testosterona, vasos sanguíneos.

1. Introdução

O crescente processo de industrialização tem contribuído de forma contínua para liberação de poluentes nos diversos ambientes incluindo o solo, a água e o ar. Dentre esses poluentes tóxicos, destacam-se os metais pesados que, em sua maioria, são particularmente críticos neste processo, já que entram facilmente na cadeia trófica e podem ser bioacumulados em diferentes organismos (Calderón et al., 2003).

O declínio global no número de espermatozoides produzidos pelos homens, a maior incidência de anomalias urogenitais, a redução da qualidade do sêmen, e a maior incidência de câncer testicular, têm sido atribuídos, pelo menos em parte, à exposição a tóxicos ambientais (Carlsen et al., 1992; Skakkebaek et al., 2001). Evidências indicam que a exposição a agentes químicos interferem na função endócrina resultando em alterações no sistema reprodutor masculino (Colborn et al., 1993; Papadopoulos, 2007). Entre os principais interferentes endócrinos que podem causar infertilidade masculina estão os agrotóxicos e os metais pesados (Skakkebaek et al., 2001; Papadopoulos, 2007; Svechnikov et al., 2010). A disfunção induzida por metais pode levar a distúrbios nas células de Sertoli, as quais sustentam as células germinativas, ou nas células de Leydig, que são responsáveis pela produção de andrógenos sob controle do eixo hipotálamo-hipófise-testículo (Bizarro et al., 2003).

O chumbo é um metal pesado de uso industrial bastante difundido, sendo que sua principal aplicação é na fabricação de baterias ácidas de chumbo, responsáveis pela maioria das intoxicações ocupacionais notificadas (Naha et al., 2005). A intoxicação por chumbo é conhecida pela humanidade desde a antiguidade e mencionada em documentos deixados pelos gregos, romanos, árabes e egípcios (Nriagu, 1983; Milton, 1988). Com o advento da Revolução Industrial a partir do século XVIII, as concentrações de chumbo no ambiente elevaram-se de forma alarmante, principalmente devido à introdução de compostos orgânicos de chumbo (chumbo tetraetila) como aditivo para gasolina, embora em alguns países, incluindo o Brasil, o seu uso tenha sido restringido (WHO, 1995; Crosby, 1998).

Devido ao seu amplo emprego industrial, o chumbo é considerado um poluente com séria ameaça para saúde humana (Pirkle et al., 1998; Landrigan et al., 2000; Watson et al., 2004; Apostoli & Catalani, 2011). O chumbo apresenta uma atividade gonadotóxica que pode induzir diferentes alterações no parênquima testicular (Pinna et al., 1995; El-Sayed & El-Neweshy, 2010; Shafai et al., 2011). A exposição a este metal está associada com a diminuição do número de

espermatozoides, redução da motilidade e aumento de anormalidades morfológicas dos espermatozoides em animais (Sokol & Berman, 1991) e humanos (Alexander et al., 1996). Hsu et al. (1998) demonstraram que a exposição ao chumbo pode diminuir a capacidade de defesa do espermatozoide ao estresse oxidativo e aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que está negativamente associado com a fertilidade. O chumbo pode afetar diretamente as células de Leydig e reduzir sua capacidade esteroidogênica. Vários trabalhos têm demonstrado redução nos níveis séricos de testosterona em ratos após exposição ao chumbo (Sokol et al., 1985; Thoreux-Manlay et al., 1995b; Hsu et al., 1998; Biswas & Ghosh, 2004; Haw et al., 2012).

A contaminação por metais pesados é crescente e causa efeitos adversos à saúde da população exposta. A importância dos interferentes endócrinos tem sido investigada diante das crescentes evidências sobre a relação entre a exposição a estes compostos e o aumento de distúrbios reprodutivos em homens (Sharpe & Irvine, 2004; Maffini et al., 2006; Skakkebaek et al., 2006, Fowler et al., 2007). Embora seja bem conhecido que o chumbo exerce efeitos tóxicos sobre os testículos, culminando na diminuição da capacidade reprodutiva, poucos estudos têm quantificado e qualificado as alterações estruturais e ultraestruturais no ambiente intertubular após exposição ao chumbo. Entender, portanto, os mecanismos que levam às alterações no parênquima testicular, sobretudo nas células de Leydig produtoras de testosterona, é de extrema importância para a busca de alternativas na prevenção ou tratamento para tais agravos. Desta maneira, o objetivo desse trabalho foi avaliar através de análises histomorfométricas, ultraestruturais e da quantificação dos níveis séricos de testosterona, alterações no ambiente intertubular de ratos Wistar adultos expostos ao chumbo.

2. Material e métodos

2.1. Animais

Foram utilizados 25 ratos Wistar adultos com idade de 100 dias provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB), da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. Os animais foram mantidos sob as mesmas condições quanto à dieta (água e ração *ad libitum*), luminosidade (12h) e

temperatura (21-23°C), e aclimatados por um período de 30 dias antes do início do experimento.

2.2. Tratamentos

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) do Departamento de Veterinária da UFV (protocolo 69/2010). Os animais foram colocados em gaiolas individuais e distribuídos em 5 grupos experimentais de 5 animais cada: o grupo controle (I) recebeu água destilada e os quatro grupos tratados (II, III, IV e V) receberam chumbo nas doses de 16, 32, 64 e 128 mg/kg, respectivamente, na forma de acetato de chumbo $[(C_2H_3O_2)_2Pb.3H_2O]$ (Sigma-Aldrich). Os tratamentos foram administrados uma vez ao dia, por gavagem, durante 30 dias consecutivos. Para impedir a precipitação do acetato de chumbo, foi adicionado 1 mL de HCl 5N para cada litro de água destilada (Allouche et al., 2009). Ao final do período experimental, os animais foram pesados e eutanasiados por inalação de CO₂.

2.3. Fixação e processamento do testículo

Os testículos foram removidos, imediatamente imersos em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas e, em seguida, dissecados e pesados. Fragmentos testiculares foram incluídos em hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica), seccionados em espessura de 3 µm e corados com azul de toluidina/borato de sódio 1%. Imagens do parênquima testicular foram obtidas utilizando-se microscópio Olympus AX-70 e analisadas com o auxílio do software Image-Pro Plus® (v. 6.0 – Media Cybernetics).

Para as análises em microscopia eletrônica de transmissão, fragmentos testiculares foram fixados em glutaraldeído 5% por 24 horas e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% durante 2 horas, desidratados em acetona e incluídos em resina Epon. Secções ultrafinas (20-60 nm) foram obtidas com navalha de diamante e contrastadas com acetato de uranila 2% (25 min) e citrato de chumbo 2% (10 min), antes da observação em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss®, Leo 906).

2.4. Análises estereológicas dos componentes intertubulares

Para a obtenção das 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. Foram registrados os pontos coincidentes sobre núcleo e citoplasma de células de Leydig (NC e CL), vaso sanguíneo (VS), espaço linfático (EL), tecido conjuntivo (TC) e macrófagos (M). O percentual de cada elemento no intertúbulo foi obtido multiplicando por 100 o número de pontos contados sobre os elementos e dividindo o valor obtido por 1000. O volume de cada elemento no intertúbulo foi determinado como o produto da proporção do elemento no intertúbulo e o volume de intertúbulo (França et al., 2000).

2.4.1. Estereologia das células de Leydig

O diâmetro nuclear médio das células de Leydig foi obtido a partir de imagens capturadas com objetiva 40x. Trinta núcleos de células de Leydig foram mensurados para cada animal escolhendo-se aqueles que apresentavam o contorno mais circular, cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. Foram calculados os volumes nuclear e citoplasmático e, em seguida, o volume de uma célula de Leydig. Para obtenção do volume nuclear (VN) utilizou-se a fórmula $VN = 4/3 \pi R^3$, onde R = raio nuclear. O volume citoplasmático (VC) foi calculado a partir da fórmula $VC = \% \text{ citoplasma} \times VN / \% \text{ núcleo}$. O volume de uma célula de Leydig foi obtido somando-se o VN ao VC. Estes valores foram expressos em micrômetros cúbicos (μm^3). O cálculo do volume que as células de Leydig ocupam por testículo foi feito a partir da proporção das células de Leydig no parênquima testicular x peso do parênquima de um testículo/100. O peso do parênquima testicular foi obtido subtraindo-se a massa ocupada pela albugínea do peso total dos testículos, obtendo-se assim o peso líquido da porção funcional do órgão.

O volume que as células de Leydig ocupam por grama de testículo foi obtido utilizando-se o peso bruto dos testículos. O número total de células de Leydig por testículo foi calculado a partir do volume que as células de Leydig ocupam por testículo (μm^3)/volume de uma célula de Leydig (μm^3). Para calcular o número total de células de Leydig por grama de testículo utilizou-se a fórmula: volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo (μm^3)/volume de uma célula de Leydig (μm^3).

A fim de se quantificar o investimento em células de Leydig, em relação à massa corporal, foi calculado o índice Leydigossomático (ILS), utilizando-se a fórmula: $ILS = \text{volume total de célula de Leydig no parênquima testicular} / PC \times 100$,

onde PC= peso corporal. A relação nucleoplasmática (RNP) foi obtida dividindo-se o percentual do núcleo de células de Leydig pelo percentual de citoplasma de células de Leydig e multiplicando-se por 100.

2.5. Testosterona sérica

A concentração plasmática de testosterona foi obtida pelo método de quimioluminescência, utilizando-se kit Access® Testosterone (Beckman, USA). As leituras foram realizadas em aparelho Access II (Beckman, USA) e os resultados foram expressos em ng/dL.

2.6. Análise estatística

Análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) foi usada para comparar médias e desvio-padrão entre os grupos experimentais. O nível de significância foi estabelecido a $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Análises estruturais e ultraestruturais

O ambiente intertubular dos grupos tratados com chumbo mostrou poucas alterações estruturais em relação ao grupo controle quando observados em microscópio de luz (Fig. 1). Nos grupos tratados, o tecido intersticial foi similar ao do grupo controle contendo vasos sanguíneos, espaço linfático, tecido conjuntivo, células de Leydig e macrófagos (Fig. 1). A alteração mais evidente foi o aumento do espaço linfático nos grupos III, IV e V em relação aos grupos I e II (Fig. 1c-e). Entretanto, as observações ultraestruturais mostraram alterações induzidas pelo chumbo no tecido intersticial que não foram observadas no microscópio de luz (Fig. 2). As células de Leydig do grupo controle apresentaram-se normais, contendo um núcleo excêntrico e esférico com reentrância pouco profunda. A cisterna perinuclear apresentou aspecto normal. No citoplasma observou-se a presença de retículo endoplasmático liso e rugoso e mitocôndrias (Fig. 2a). As células de Leydig dos grupos tratados (Fig. 2b-e) mostraram-se pleomórficas, geralmente apresentando núcleos irregulares com reentrâncias profundas e nucléolo proeminente. A cisterna perinuclear mostrou-se dilatada. O citoplasma apresentou-se denso e desorganizado. Evidenciou-se ainda muitas projeções na superfície do citoplasma das células de

Leydig (Fig. 2b-f). Nos grupos tratados com chumbo, o espaço linfático mostrou-se denso (Fig. 2b-f) e a presença de colágeno foi mais evidente no grupo intoxicado com a maior dose do metal (Fig. 2f).

Ultraestruturalmente, os vasos sanguíneos testiculares dos ratos do grupo controle apresentaram uma aparência normal contendo junções intercelulares intactas (Fig. 3a). Porém, nos grupos que receberam acetato de chumbo observou-se a presença de vários vacúolos no citoplasma das células endoteliais (Fig. 3b-f). Evidenciou-se também, uma série de pequenos vacúolos que se estenderam pelas junções intercelulares (Fig. 3e).

3.2. Análises estereológicas

Os dados referentes ao volume (mL) e proporção volumétrica (%) dos componentes intertubulares encontram-se na Tabela 1. O volume e proporção de intertúbulo e vasos sanguíneos não variaram entre os grupos experimentais. Houve aumento no volume do espaço linfático nos grupos III e V. A proporção do espaço linfático foi maior nos grupos III, IV e V em relação ao controle. O volume das células de Leydig no intertúbulo não variou, embora tenha sido observada redução significativa na proporção volumétrica das células de Leydig nos grupos expostos ao chumbo. Houve aumento no volume e proporção de tecido conjuntivo nos grupos tratados em relação ao controle. O volume e a proporção de macrófagos não variaram entre os grupos experimentais, exceto no grupo II onde a proporção de macrófagos foi maior em relação ao controle.

3.3. Estereologia das células de Leydig

Os parâmetros estereológicos das células de Leydig encontram-se na Tabela 2. Não houve variação no volume nuclear das células de Leydig entre os grupos estudados. Entretanto, o volume citoplasmático e o volume celular de Leydig reduziram em todos os grupos tratados em relação ao controle. O número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo não sofreu variações. A relação nucleoplasmática das células de Leydig e o índice Leydigossomático não diferiram entre os grupos experimentais.

3.4. Concentração de testosterona sérica

Os dados referentes à testosterona encontram-se na Figura 4. Houve redução significativa nos níveis séricos de testosterona nos grupos que receberam acetato de chumbo em relação ao controle.

4. Discussão

O processo espermatogênico depende da coordenação e interação entre células germinativas, células de Sertoli, células de Leydig, células peritubulares, macrófagos e vasos sanguíneos. A regulação desse processo como um todo é mediada através do eixo hipotálamo-hipófise-células de Leydig, ao mesmo tempo, a regulação local da função celular através de fatores parácrinos e autócrinos também são importantes (Weinbauer & Wessels, 1999; Creasy 2001). Há evidências de que a exposição ao chumbo gera uma variedade de efeitos tóxicos nos testículos que interferem negativamente no processo espermatogênico. Estudos têm demonstrado que esta ação pode estar associada a disfunções no eixo hipotálamo-hipófise-testículo (Sokol et al., 1985; Thoreux-Manlay et al., 1995a; Martin et al., 1996; Ronis et al., 1998; Sokol et al., 2002).

A secreção de fluidos no testículo tem função fundamental no transporte de oxigênio e nutrientes do sangue para o túbulo seminífero através do fluido intersticial. Além disso, é um meio importante para o transporte de fatores parácrinos no testículo (Setchell, 1990). O volume do fluido intersticial é determinado pela permeabilidade das células endoteliais não fenestradas dos capilares testiculares e é regulada em parte por fatores secretados pelas células de Leydig (Maddocks & Sharpe, 1989). Desta maneira, a permeabilidade seletiva dos capilares testiculares, em conjunto com o sistema linfático, mantém um equilíbrio delicado entre os compartimentos vascular e intersticial (Creasy, 2001). Esses capilares parecem ser o alvo para ação tóxica de metais pesados. Alterações no endotélio vascular dos testículos têm sido descritas em ratos expostos a metais pesados, como o cádmio (Predes et al., 2011; Leite et al., 2013). Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que a exposição crônica ao chumbo pode alterar uma série de mecanismos endoteliais em animais experimentais, culminando em disfunção vascular e induzindo diversos quadros patológicos, tais como, hipertensão, arteriosclerose, aterosclerose e trombose (Vaziri, 2008). Assim, as alterações ultraestruturais nos vasos sanguíneos observadas neste estudo, confirmam o efeito negativo da exposição

ao chumbo sobre o endotélio vascular. Além disso, a presença de vacúolos intrajuncionais é um indicativo de que o chumbo pode causar o rompimento das junções intercelulares entre as células endoteliais, aumentando a permeabilidade vascular e conseqüentemente o volume de fluido intersticial nos testículos.

Estudos mostram que os vasos linfáticos testiculares têm uma capacidade limitada para mobilizar quantidades adicionais de fluidos que foram lançados no interstício (Aoki & Hoffer, 1978; Sharpe et al., 1994). Em ratos tratados com cádmio, no entanto, a infiltração excessiva de fluidos rapidamente domina a capacidade de drenagem dos linfáticos e acumula-se uma pressão intratesticular que é responsável pela turgescência e formação de edema no interstício (Aoki & Hoffer, 1978). O edema testicular é uma conseqüência direta da interrupção de continuidade endotelial e da entrada excessiva, no interstício, de fluidos originários do plasma sanguíneo (Setchell, 1990; Witte et al., 2006). No presente estudo, o aumento na proporção e volume do espaço linfático é decorrente do aparecimento de edema intersticial evidenciado também nas análises estruturais. Resultados similares foram encontrados por El-Neweshy & El-Sayed (2011) e Haw et al. (2012) que também detectaram a presença de edema no intertúbulo de ratos intoxicados com acetato de chumbo.

Fatores secretados pelos macrófagos controlam de modo parácrino a atividade esteroidogênica e o desenvolvimento das células de Leydig. Porém a ativação de macrófagos, em condições patológicas, pode inibir a função esteroidogênica das células de Leydig (Hutson, 2006). Os macrófagos ativados produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF), que são inibidores de células de Leydig e parecem atuar como repressores transcricionais da expressão do gene da enzima esteroidogênica. Os macrófagos também produzem espécies reativas de oxigênio, tais como, peróxido de hidrogênio que também inibe as funções das células de Leydig. As espécies reativas de oxigênio parecem atuar sobre mitocôndrias presentes nas células de Leydig resultando na inibição da expressão da proteína StAR que regula a produção dos esteroides (Hales, 2002). Dessa maneira, o aumento de macrófagos nos ratos que receberam a menor dose do metal pode estar relacionado a disfunções na atividade secretória das células de Leydig, já que neste grupo também houve redução dos níveis de testosterona.

Evidenciou-se neste trabalho o aumento volumétrico e percentual de tecido conjuntivo no intertúbulo dos ratos tratados com chumbo. Resultados similares foram

observados por Predes et al. (2009) no intertúbulo de ratos expostos a baixas doses de cádmio. De maneira compensatória, a redução de células de Leydig no interstício levou ao aumento de tecido conjuntivo observado no presente estudo. Sugere-se que o aumento de tecido conjuntivo em animais expostos ao chumbo pode afetar o movimento de fluidos e hormônios na comunicação parácrina entre as células de Leydig e os túbulos seminíferos.

As células de Leydig são responsáveis pela secreção de andrógenos, principalmente a testosterona, fundamental para o desenvolvimento e a função reprodutiva no macho (Russell et al., 1996). A interrupção da biossíntese de testosterona por fatores ambientais, tais como, exposição a metais pesados pode causar disfunção sexual e infertilidade (Papadopoulos, 2007). O tratamento com acetato de chumbo no presente estudo promoveu uma série de alterações ultraestruturais nas células de Leydig, além de redução no percentual das mesmas no intertúbulo. Tais alterações estão condizentes com estudos que também revelaram disfunções nas células de Leydig em ratos intoxicados com outros metais, como o mercúrio, níquel e cádmio (Ernest et al., 1991; Krockova et al., 2011; Predes et al., 2011). Além disso, ratos intoxicados com chumbo têm mostrado distúrbios na espermatogênese com degeneração e atrofia de células de Leydig (Saxena et al., 1987; Chowdhury et al., 1987). Alterações na morfologia das células de Leydig em animais expostos ao chumbo e outros metais pesados, têm provocado disfunção na sua atividade resultando na diminuição dos níveis de testosterona (Ernest et al., 1991; Thoreux-Manlay et al., 1995b; Wenda-Rozewicka et al., 1996; Chengb et al., 2005). Assim, as alterações ultraestruturais observadas nas células de Leydig no presente estudo, bem como, sua redução no intertúbulo, podem estar diretamente associadas a disfunções na secreção de andrógenos, como a testosterona.

Segundo Castro et al. (2002), não há correlação entre altas concentrações de testosterona e aumento da atividade espermatogênica. As concentrações desse hormônio precisam atingir um nível limiar para que a espermatogênese proceda normalmente. Assim sendo, baixas concentrações de testosterona são extremamente prejudiciais para reprodução. Os níveis séricos de testosterona de ratos intoxicados por chumbo foram reduzidos no presente estudo. Outros trabalhos têm relatado diminuição da testosterona em ratos expostos ao chumbo (Sokol et al., 1985; Thoreux-Manlay et al., 1995b; Hsu et al., 1998; Biswas & Ghosh, 2004; Haw et al., 2012). Desta maneira, as alterações ultraestruturais evidenciadas nas células de

Leydig, bem como, a redução dos níveis séricos de testosterona encontrados no presente estudo indicam que estas células são alvo da ação tóxica do chumbo. O seu comprometimento reduz a atividade esteroidogênica podendo induzir falhas no processo reprodutivo.

O volume nuclear das células de Leydig não foi alterado no presente estudo, porém, houve redução no volume citoplasmático o que refletiu na diminuição do volume individual das células de Leydig nos animais tratados com chumbo. Não há correlação entre o volume celular e a produção de testosterona, porém foi determinado que a área de superfície do retículo endoplasmático liso está altamente correlacionada com a capacidade de secreção de testosterona pelas células de Leydig (Russell et al., 1996). Segundo Zirkin et al. (1985) ratos expostos a altas doses de chumbo tiveram o volume das células de Leydig reduzidos. Nesse mesmo trabalho, a área de superfície ocupada por retículo endoplasmático liso por células de Leydig também foram significativamente menores. De fato, a redução observada no citoplasma das células de Leydig no presente estudo poderia estar relacionada à redução da área ocupada pelo retículo endoplasmático liso, já que houve redução no volume citoplasmático, o que justificaria também a redução dos níveis séricos de testosterona nesses animais.

O ILS é um parâmetro que visa quantificar o investimento em células de Leydig, com relação ao peso corporal (Russell, 1996). Neste estudo, animais tratados com chumbo não apresentaram alterações nesse parâmetro, diferente da redução significativa do ILS em ratos tratados com cádmio (Cupertino, 2012). No presente estudo, o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo também não apresentou variações. Leite et al. (2013) também não observaram redução significativa no número de células de Leydig por testículo em ratos expostos ao cádmio.

5. Conclusão

As alterações morfométricas e ultraestruturais das células de Leydig, juntamente com a redução dos níveis de testosterona em animais tratados com chumbo, permitem-nos concluir que essas células são alvo da ação tóxica desse metal. Além disso, as alterações ultraestruturais observadas nos vasos sanguíneos, a presença de edema intersticial e o aumento de tecido conjuntivo nos animais expostos ao chumbo podem ter comprometido o equilíbrio delicado entre esses

ambientes, dificultando a difusão dos hormônios do intertúbulo até o epitélio seminífero, levando à baixa estimulação das células germinativas e afetando assim, o processo espermatogênico.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo, e à FAPEMIG pelo auxílio financeiro no desenvolvimento de parte do trabalho.

6. Referências bibliográficas

- Alexander, B. H.; Checkoway, H.; van Netten, C.; Muller C. H.; Ewers T. G.; Kaufman, J. D.; Mueller, B. A.; Vaughan T. L.; Faustman, E. M. 1996. Semen quality of men employed at a lead smelter. *J. Occup. Environ. Med.* 53:411-416.
- Allouche, L.; Hamadouche, M.; Touabti, A. 2009. Chronic effects of low lead levels on sperm quality, gonadotropins and testosterone in albino rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 61:503-510.
- Aoki, A.; Hoffer, A. P. 1978. Reexamination of the lesions in rat testis caused by cadmium. *Biol. Reprod.* 18:579-591.
- Apostoli, P., Catalani, S. 2011. Metal ions affecting reproduction and development. *Met. Ions Life Sci.* 8:263-303.
- Bizarro, P.; Acevedo, S.; Niño-Cabrera, G.; Mussali-Galante, P.; Pasos, F.; Avila-Costa, M. R.; Fortoul, T. I. 2003. Ultrastructural modifications in the mitochondrion of mouse Sertoli cells after inhalation of lead, cadmium or lead-cadmium mixture. *Reprod. Toxicol.* 17:561-566.
- Biswas, N. M.; Ghosh, P. 2004. Effect of lead on male gonadal activity in Albino rats. *Kathmandu Univ. Med. J.* 2:43-46.
- Calderón, J.; Ortiz-Pérez, D.; Yáñez, L.; Díaz-Barriga, F. 2003. Human exposure to metals. Pathways of exposure, biomarkers of effect, and host factors. *Ecotox. Environ. Safe.* 56:93-103.
- Carlsen, E.; Giwercman, A.; Keiding, N.; Skakkebaek, N. E. 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Med. J.* 305:609-613.
- Castro, A. C. S.; Berndtson, W. E.; Cardoso, F. M. 2002. Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35:493-498.

- Chengb, J.; Fua, J.; Zhoua, Z. 2005. The mechanism of manganese-induced inhibition of steroidogenesis in rat primary Leydig cells. *Toxicol.* 211:1-11.
- Chowdhury, A. R.; Rao, R. V.; Gautam, A. K.; Kashyap, S. K. 1987. Functional changes of testes in lead intoxicated rats. *Ind. Health* 25:55-62.
- Colborn, T.; von Saal, F. S.; Soto, A. M. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101:378-384.
- Creasy, D. M. 2001. Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicol. Pathol.* 29:64-70.
- Crosby, D. G. 1998. *Environmental toxicology and chemistry*. New York: Oxford University Press, pp. 216-218.
- Cupertino, M. C. 2012. Danos oxidativos e histológicos crônicos causados pelo cádmio no fígado e na espermatogênese de ratos. *Dissertação Mestrado*. Universidade Federal de Viçosa. 70p.
- El-Sayed, Y. S.; El-Neweshy, M. S. 2010. Impact of lead toxicity on male rat reproduction at “hormonal and histopathological levels”. *Toxicol. Environ. Chem.* 92:765-774.
- El-Neweshy, M. S.; El-Sayed, Y. S. 2011. Influence of vitamin C supplementation on lead-induced histopathological alterations in male rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 63:221-227.
- Ernest, E.; Moller-Madsen, B.; Danscher, G. 1991. Ultrastructural demonstration of mercury in Sertoli and Leydig cells of the rat following methyl mercuric chloride or mercuric chloride treatment. *Reprod. Toxicol.* 5:205-209.
- Fowler, P. A.; Abramovich, D. R.; Haites, N. E.; Cash, P.; Groome, N. P.; Al-Qahtani, A.; Murray, T. J.; Lea, R. G. 2007. Human fetal testis Leydig cell disruption by exposure to the pesticide dieldrin at low concentrations. *Hum. Reprod.* 11:2919-2927.
- França, L. R.; Leal, M. C.; Sasso-Cerri, E.; Vasconcelos, A.; Debeljuk, L.; Russell, L. D. 2000. Cimetidine (Tagamet) is a reproductive toxicant in male rats affecting peritubular cells. *Biol. Reprod.* 63:1403-1412.
- Hales, D. B. 2002. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J. Reprod. Immunol.* 57:3-18.

- Haw, K. Y.; Chakravarthi, S.; Haleagrahara, N.; Rao, M. 2012. Effects of *Etlingera elatior* extracts on lead acetate-induced testicular damage: A morphological and biochemical study. *Exp. Ther. Med.* 3:99-104.
- Hutson, J. C. 2006. Physiologic interactions between macrophages and Leydig cells. *Exp. Biol. Med.* 231:1-7.
- Hsu, P. C.; Hsu, C. C.; Liu, M. Y.; Chen, L. Y.; Guo, Y. L. 1998. Lead-induced changes in spermatozoa function and metabolism. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 55:45-64.
- Karnovsky, M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27:137-138.
- Krockova, J. Z.; Massanyia, P.; Sirotkinb, A. V.; Pivkob, J.; Makarevichb, A. V.; Lukaca, N.; Capcarovaa, M.; Tomana, R.; Polakovaa, Z. 2011. Nickel induced structural and functional alterations in mouse Leydig cells in vitro. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 25:14-18.
- Landrigan, P. J.; Boffetta, P.; Apostoli, P. 2000. The reproductive toxicity and carcinogenicity of lead: a critical review. *Am. J. Ind. Med.* 38:231-243.
- Leite, R. P.; Predes, F.S.; Monteiro, J. C.; Freitas, K. M.; Wada, R. S.; Dolder, H. 2013. Advantage of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation on cadmium-induced damages in testis of adult wistar rats. *Toxicol. Pathol.* 41:73-79.
- Maddocks, S.; Sharpe, R. M. 1989. Interstitial fluid volume in the rat testis: Androgen dependent regulation by the seminiferous tubules. *J. Endocrinol.* 120: 215-222.
- Maffini, M. V.; Rubin, B. S.; Sonnenschein, C.; Soto, A. M. 2006. Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. *Mol Cell Endocrinol* 254:179-186.
- Martin, J.; Ronis, J.; Badger, T. M.; Shema, S. J.; Roberson, P. K.; Shaikh, F. 1996. Reproductive toxicity and growth effects in rats exposed to lead at different periods during development. *Toxicol. Appl. Pharm.* 136:361-171.
- Milton, A. L. 1988. Lead and lead poisoning from antiquity to modern times. *Ohio J. Sci.* 88:78-84.
- Naha, N.; Bhar, R. B.; Mukherjee, A.; Chowdhury, A. R. 2005. Structural alteration of spermatozoa in the persons employed in lead acid battery factory. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 49:153-162.

- Nriagu, J. O. 1983. Lead and lead poisoning in antiquity. New York: John Wiley and Sons. 437p.
- Papadopoulos, V. 2007. Environmental factors that disrupt Leydig cell steroidogenesis. In: Payne, A. H.; Hardy, M. P. (Eds). Contemporary Endocrinology. The Leydig cell in the health and disease. New Jersey: Humana Press., pp. 393-413.
- Pinna, I. G.; Tharoux, M. A., Caffigay, H.; Masse, R., Soufir, J. H. 1995. Reproductive toxicity of chronic lead exposure in male and female mice. Hum. Exp. Toxicol. 14:872-878.
- Pirkle, J. L.; Kaufmann, R. B.; Brody, D. J.; Hickman, T.; Gunter, E. W.; Paschal, D. C. 1998. Exposure of the U.S population to lead, 1991-1994. Environ. Health Perspect. 106:745-750.
- Predes, F. S.; Diamante, M. A. S.; Dolder, H. 2009. Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. Int. J. Exp. Pathol. 91:125-31.
- Predes, F. S.; Monteiro, J. C.; Matta, S. L. P.; Garcia, M. C.; Dolder, H. 2011. Testicular histomorphometry and ultrastructure of rats treated with cadmium and *Ginkgo biloba*. Bio. Trace Elem. Res. 140:330-341.
- Ronis, M. J.; Gandy, J.; Badger, T. M. 1998. Endocrine mechanisms underlying reproductive toxicity in the developing rat chronically exposed to dietary lead. J. Toxicol. Environ. Health 54:77-99.
- Russell, L. D. 1996. Mammalian Leydig cell structure. In: Payne, A. H.; Hardy, M. P.; Russell, L. D. (Eds). The Leydig cell. Vienna: Cache River Press, pp. 218-222.
- Saxena, S. K.; Srivastava, R. S.; Lal, B.; Chandra, S. V. 1987. The effect of lead exposure on testis of growing rats. Exp. Pathol. 31:249-252.
- Setchell, B. P. 1990. Local control of testicular fluids. Reprod. Fertil. 2:291-309.
- Shafai, A. E.; Zohdy, N.; Mulla, K. E.; Hassan, M.; Morad, N. 2011. Light and electron microscopic study of the toxic effect of prolonged lead exposure on the seminiferous tubules of albino rats and the possible protective effect of ascorbic acid. Food Chem. Toxicol. 49:734-743.
- Sharpe, R. M.; Kerr, J. B.; McKinnell, C.; Millar, M. 1994. Temporal relationship between androgen-dependent changes in the volume of seminiferous tubule fluid, lumen size and seminiferous tubule protein secretion in rats. J. Reprod. Fertil. 101:193-198.

- Sharpe, R. M.; Irvine, D. S. 2004. How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *B. M. J.* 328:447-451.
- Skakkebaek, N. E.; Rajpert-De Meyts, E.; Main, K. M. 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum. Reprod.* 16:972-978.
- Skakkebaek, N. E.; Jorgensen, N.; Main, K. M.; Rajpert-De Meyts, E.; Leffers, H.; Andersson, A.M.; Juul, A.; Carlsen, E.; Mortensen, G. K.; Jensen, T. K.; Toppari, J. 2006. Is human fecundity declining? *Int. J. Androl.* 29:2-11.
- Sokol, R. Z.; Madding, C. E.; Swerdloff, R. S. 1985. Lead toxicity and the hypothalamic-pituitary-testicular axis. *Biol. Reprod.* 33:722-728.
- Sokol, R. Z.; Berman, N. 1991. The effect of age of exposure on lead-induced testicular toxicity. *Toxicol.* 69:269-278.
- Sokol, R. Z.; Wang, S.; Wan, Y. J.; Stanczyk, F. Z.; Gentzschlein, E.; Chapin, R. E. 2002. Long-term dose lead exposure alters the gonadotropin-releasing hormone system in the male rat. *Environ. Health Perspect.* 110:871-874.
- Svechnikov, K.; Izzo, G.; Landreh, L.; Weisser, J.; Söder, O. 2010. Endocrine Disruptors and Leydig Cell Function. *J Biomed. Biotechnol.* 2010:1-11.
- Thoreux-Manlay, A.; Le Goascogne, C.; Segretain, D.; Jégou, B.; Pinon-Lataillade, G. 1995b. Lead affects steroidogenesis in rat Leydig cells in vivo and in vitro. *Toxicology* 103:53-62.
- Thoreux-Manlay, A.; Vélez de la Calle, J. F.; Olivier, M. F.; Soufir, J. C. Masse, R.; Pinon-Lataillade, G. 1995a. Impairment of testicular endocrine function after lead intoxication in the adult rat. *Toxicology* 100:101-109.
- Vaziri, N. D. 2008. Mechanisms of lead-induced hypertension and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295:454-465.
- Watson, W. A.; Litovitz, T. L.; Klein-Schwartz, W. I. 2004. Annual report of the American association of poison control centers toxic exposure surveillance system. *Am. J. Emerg. Med.* 22:335-404.
- Wenda-Rozewicka, L.; Marchlewicz, M.; Barcew-Wiszniewska, B.; Piasecka, M. 1996. The ultrastructure of the testis in rats after long-term treatment with lead acetate. *Andrology* 28:97-102.
- Weinbauer, G. F.; Wessels, J. 1999. 'Paracrine' control of spermatogenesis. *Andrology* 31:249-262.

- WHO (World Health Organization). 1995. Environmental Health, criteria 165-
Inorganic lead, Geneva.
- Witte, M. H.; Jones, K.; Wilting, J.; Dictor, M.; Selg, M.; MChale, N.; Gershenwald,
J. E., Jackson, D. G. 2006. Structure function relationships in the lymphatic
system and implications for cancer biology. *Cancer and Metast. Rev.* 25:159-184.
- Zirkin, B. R.; Gross, R.; Ewing, L. L. 1985. Effects of lead acetate on male rat
reproduction. *Concepts Toxicol.* 3:138-145.

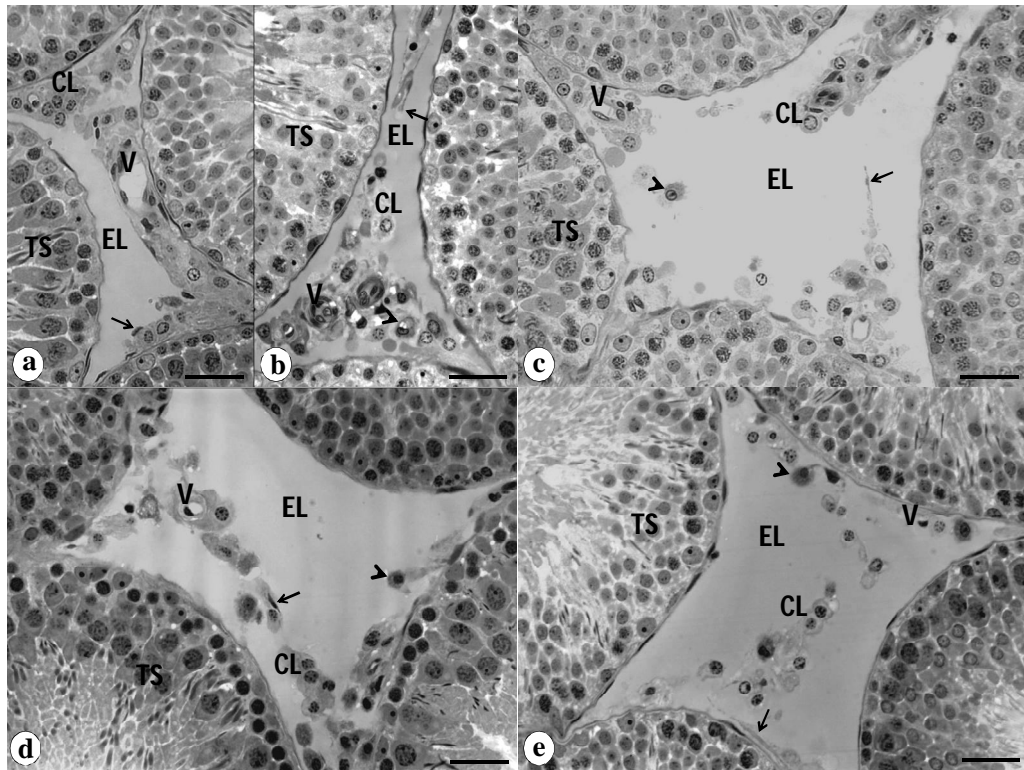


Figura 1. Secções histológicas do compartimento intertubular de ratos Wistar controle e submetidos a diferentes doses de acetato de chumbo (AcPb). **a:** grupo I (controle); **b:** grupo II (16 mg Pb/kg); **c:** grupo III (32 mg Pb/kg); **d:** grupo IV (64 mg Pb/kg); **e:** grupo V (128 mg Pb/kg). **TS:** túbulo seminífero; **VS:** Vaso sanguíneo; **EL:** espaço linfático; **TC:** tecido conjuntivo; **▶:** macrófago; **CL:** células de Leydig. Azul de Toluidina. Barras: 30 μ m.

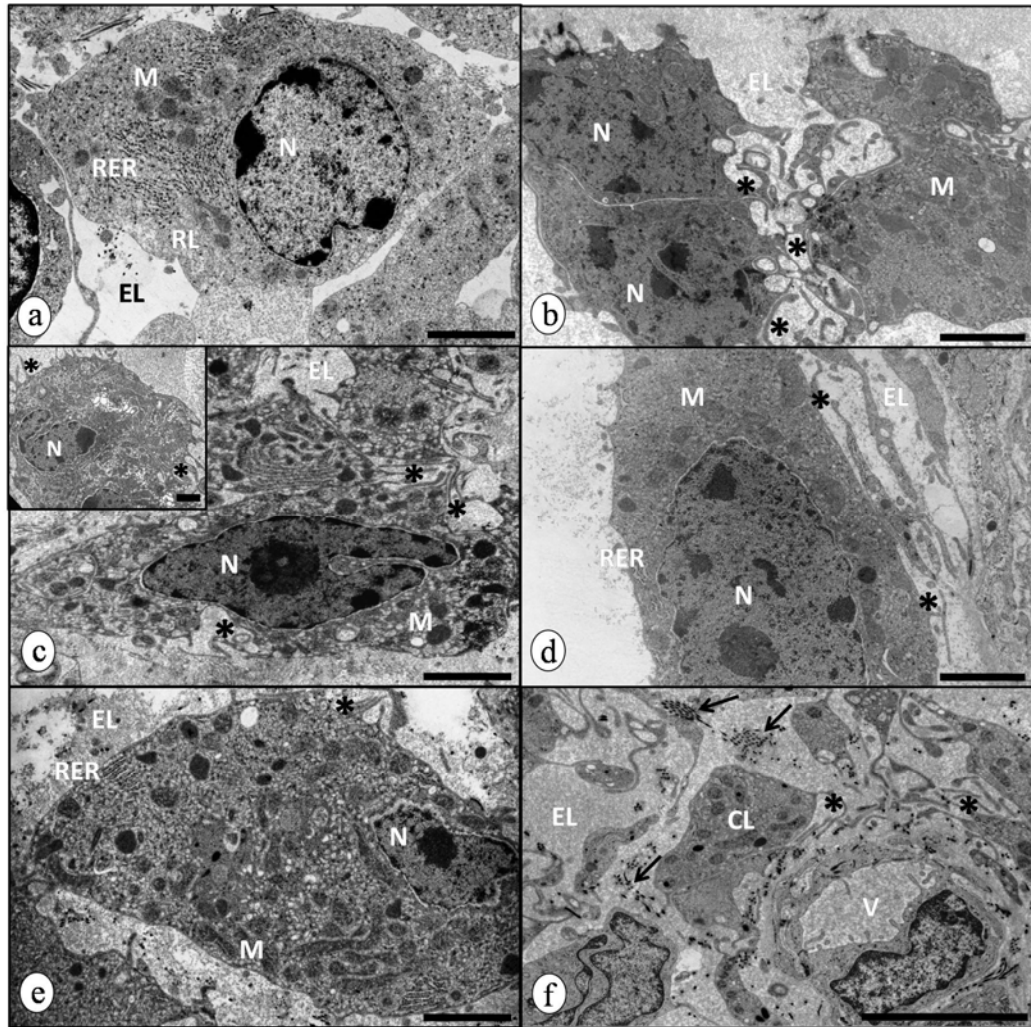


Figura 2. Ultraestrutura das células de Leydig de ratos Wistar controle e tratados com acetato de chumbo (AcPb). **a:** grupo I (controle); **b:** grupo II (16 mg Pb/kg); **c:** grupo III (32 mg Pb/kg); **d:** grupo IV (64 mg Pb/kg); **e-f:** grupo V (128 mg Pb/kg). **N:** núcleo; **M:** mitocôndria; **RER:** retículo endoplasmático rugoso; **RL:** retículo endoplasmático liso; **EL:** espaço linfático; **V:** vaso sanguíneo; **CL:** células de Leydig; *****: protrusões citoplasmáticas das células de Leydig; **↖:** deposição de colágeno. Barras: 2 μ m.

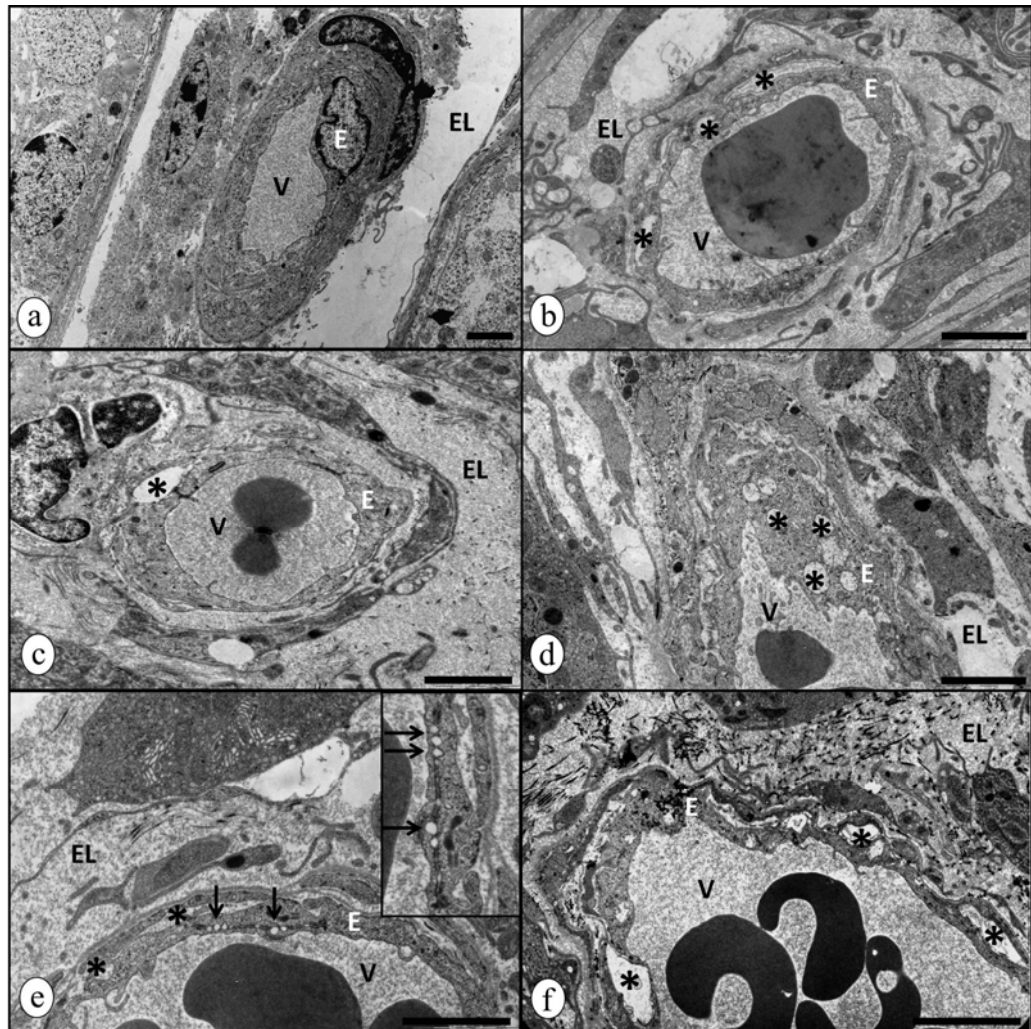


Figura 3. Ultraestrutura dos vasos sanguíneos de ratos Wistar controle e tratados com acetato de chumbo (AcPb). **a:** grupo I (controle); **b:** grupo II (16 mg Pb/kg); **c:** grupo III (32 mg Pb/kg); **d-e:** grupo IV (64 mg Pb/kg); **f:** grupo V (128 mg Pb/kg). **E:** célula endotelial; **V:** vaso sanguíneo; **EL:** espaço linfático; *****: vacúolos citoplasmáticos; **∞:** vacúolos intrajuncionais. Barras: 2 μ m.

Tabela 1. Parâmetros biométricos testiculares, volume (mL) e proporção volumétrica (%) dos componentes intertubulares de ratos Wistar adultos controle e tratados com acetato de chumbo (média \pm Desvio padrão; n=5).

Parâmetro	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
PT(g)	3,13 \pm 0,43 ^a	3,09 \pm 0,20 ^a	3,42 \pm 0,29 ^a	3,36 \pm 0,25 ^a	3,50 \pm 0,34 ^a
PA(g)	0,05 \pm 0,01 ^a	0,05 \pm 0,00 ^a	0,05 \pm 0,01 ^a	0,05 \pm 0,01 ^a	0,05 \pm 0,01 ^a
PPA(g)	3,08 \pm 0,43 ^a	3,04 \pm 0,20 ^a	3,36 \pm 0,30 ^a	3,31 \pm 0,25 ^a	3,45 \pm 0,34 ^a
IN(mL)	0,33 \pm 0,02 ^a	0,34 \pm 0,09 ^a	0,51 \pm 0,10 ^a	0,40 \pm 0,07 ^a	0,49 \pm 0,13 ^a
(%)	10,80 \pm 1,40 ^a	11,23 \pm 2,90 ^a	15,10 \pm 2,78 ^a	13,53 \pm 2,88 ^a	14,20 \pm 3,14 ^a
VS(mL)	0,05 \pm 0,01 ^a	0,05 \pm 0,02 ^a	0,05 \pm 0,01 ^a	0,05 \pm 0,01 ^a	0,06 \pm 0,02 ^a
(%)	13,98 \pm 2,66 ^a	14,12 \pm 3,99 ^a	10,16 \pm 0,80 ^a	11,98 \pm 2,05 ^a	11,66 \pm 2,19 ^a
EL(mL)	0,18 \pm 0,01 ^a	0,18 \pm 0,04 ^a	0,34 \pm 0,08 ^b	0,28 \pm 0,05 ^{ab}	0,32 \pm 0,09 ^b
(%)	53,74 \pm 1,53 ^a	55,16 \pm 7,06 ^a	66,78 \pm 2,62 ^b	62,62 \pm 2,49 ^b	64,08 \pm 5,53 ^b
CL(mL)	0,09 \pm 0,02 ^a	0,07 \pm 0,03 ^a	0,08 \pm 0,02 ^a	0,07 \pm 0,01 ^a	0,07 \pm 0,02 ^a
(%)	26,88 \pm 3,52 ^a	20,00 \pm 3,37 ^b	14,78 \pm 1,88 ^c	15,26 \pm 1,47 ^c	14,42 \pm 2,50 ^c
TC(mL)	0,01 \pm 0,00 ^a	0,03 \pm 0,01 ^b	0,03 \pm 0,01 ^b	0,03 \pm 0,01 ^b	0,04 \pm 0,01 ^b
(%)	3,60 \pm 1,01 ^a	7,30 \pm 1,95 ^b	6,04 \pm 1,02 ^b	7,16 \pm 0,63 ^b	7,40 \pm 2,19 ^b
M(mL)	0,01 \pm 0,00 ^a	0,01 \pm 0,00 ^a	0,01 \pm 0,00 ^a	0,01 \pm 0,00 ^a	0,01 \pm 0,00 ^a
(%)	1,80 \pm 0,67 ^a	3,42 \pm 0,50 ^b	2,24 \pm 0,42 ^a	2,98 \pm 1,16 ^a	2,44 \pm 0,47 ^a

Letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si (p>0,05). Grupo I: controle; Grupo II: 16 mg Pb/kg; Grupo III: 32 mg Pb/kg; Grupo IV: 64 mg Pb/kg; Grupo V: 128 mg Pb/kg. PT: peso testicular; PA: peso da albugínea; PPA: peso do parênquima testicular; IN: intertúbulo; VS: vaso sanguíneo; EL: espaço linfático; CL: célula de Leydig; TC: tecido conjuntivo; M: macrófago.

Tabela 2. Parâmetros estereológicos de células de Leydig de ratos Wistar controle e tratados com acetato de chumbo (média \pm Desvio padrão; n=5).

Parâmetro	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
VN(μm^3)	150,62 \pm 20,28 ^a	175,37 \pm 15,46 ^a	148,82 \pm 40,46 ^a	148,97 \pm 28,85 ^a	137,32 \pm 25,53 ^a
VC(μm^3)	704,65 \pm 65,56 ^a	531,64 \pm 115,01 ^b	488,34 \pm 86,00 ^b	474,10 \pm 72,79 ^b	371,53 \pm 45,25 ^c
VL(μm^3)	855,27 \pm 53,22 ^a	707,02 \pm 12,28 ^b	637,16 \pm 64,96 ^b	623,06 \pm 88,15 ^b	508,85 \pm 42,91 ^c
NCL/T (10 ⁶)	51,77 \pm 7,72 ^a	49,01 \pm 16,28 ^a	59,71 \pm 15,87 ^a	54,07 \pm 3,44 ^a	69,46 \pm 17,94 ^a
NCL/g T(10 ⁶)	33,62 \pm 7,19 ^a	31,78 \pm 10,55 ^a	35,05 \pm 9,90 ^a	32,30 \pm 2,76 ^a	39,40 \pm 8,93 ^a
RNP(%)	21,66 \pm 4,74 ^a	34,11 \pm 6,79 ^a	32,13 \pm 12,80 ^a	31,80 \pm 6,03 ^a	37,67 \pm 9,97 ^a
ILS(%)	0,024 \pm 0,005 ^a	0,019 \pm 0,008 ^a	0,019 \pm 0,004 ^a	0,017 \pm 0,003 ^a	0,017 \pm 0,005 ^a

Letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si ($p>0,05$). Grupo I: controle; Grupo II: 16 mg Pb/kg; Grupo III: 32 mg Pb/kg; Grupo IV: 64 mg Pb/kg; Grupo V: 128mg Pb/kg. VN: volume dos núcleos da célula de Leydig; VC: volume do citoplasma das células de Leydig; VL: volume de células de Leydig por testículo; NCL/T:número de células de Leydig por testículo; NCL/gT: número de células de Leydig por grama de testículo; RNP: relação nucleoplasmática; ILS: índice Leydigossomático.

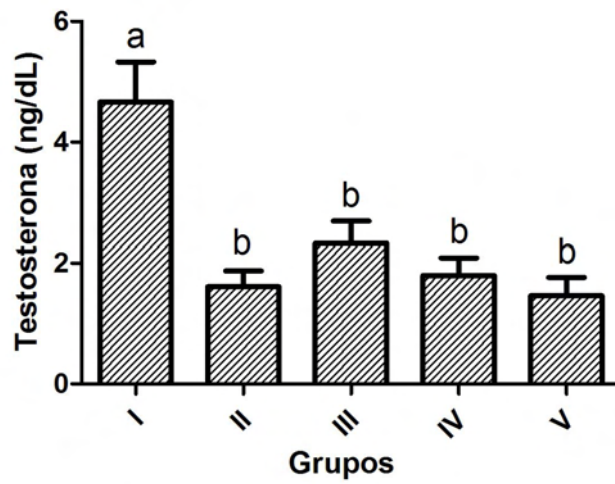


Figura 4. Níveis séricos de testosterona nos grupos controle e tratados com acetato de chumbo. Letras iguais não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). Grupo I: controle; Grupo II: 16 mg Pb/kg; Grupo III: 32 mg Pb/kg; Grupo IV: 64 mg Pb/kg; Grupo V: 128 mg Pb/kg.

5. CONCLUSÕES GERAIS

A exposição ao chumbo interferiu negativamente, tanto no ambiente tubular quanto no interstício dos testículos de ratos Wistar adultos, em todas as doses utilizadas. O acúmulo de chumbo no testículo propicia a ocorrência de reações que culminam na geração de espécies reativas de oxigênio e exercem influência sobre os mecanismos de defesa antioxidante das células, reduzindo a atividade das enzimas SOD e CAT. Danos oxidativos induzidos pelo chumbo afetam as interações existentes entre células germinativas, células de Sertoli, células de Leydig, macrófagos e vasos sanguíneos, promovendo disfunções no processo espermatogênico. Essas disfunções permitem-nos concluir que os testículos são alvo da ação tóxica do chumbo. Assim, a exposição subcrônica a este metal pode induzir o estresse oxidativo devido à inoperância das enzimas antioxidantes, promovendo uma série de alterações morfológicas, morfométricas e ultraestruturais nos testículos, inibindo a esteroidogênese e comprometendo assim a produção espermática.