

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

JOHN LENNON DE PAIVA COIMBRA

**PARÂMETROS ESPERMÁTICOS, TESTICULARES E EPIDIDIMÁRIOS DE
RATOS WISTAR EXPOSTOS AO ARSÊNIO**

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2020

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

T

C679p
2020

Coimbra, John Lennon de Paiva, 1993-
Parâmetros espermáticos, testiculares e epididimários de
ratos Wistar expostos ao arsênio / John Lennon de Paiva
Coimbra. – Viçosa, MG, 2020.
44 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Mariana Machado Neves.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.38-44.

1. Arsênio. 2. Toxicologia. 3. Toxicologia reprodutiva.
4. Morfologia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 615.925715

JOHN LENNON DE PAIVA COIMBRA

**PARÂMETROS ESPERMÁTICOS, TESTICULARES E EPIDIDIMÁRIOS DE
RATOS WISTAR EXPOSTOS AO ARSÊNIO**

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

Orientadora: Mariana Machado Neves

Co-orientadora: Ana Cláudia Ferreira Souza

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2020

JOHN LENNON DE PAIVA COIMBRA

**PARÂMETROS ESPERMÁTICOS, TESTICULARES E EPIDIDIMÁRIOS DE
RATOS WISTAR EXPOSTOS AO ARSÊNIO**

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

APROVADA: 12 de fevereiro de 2020.

Assentimento:

John Lennon de Paiva Coimbra
Autor

Mariana Machado Neves
Orientadora

Dedico este trabalho aos meus pais, Angelita de Paiva Santos e Valdeildo Coimbra Evangelista, que são as minhas inspirações diárias.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que durante essa caminhada, me fortaleceu e me confortou nos momentos mais difíceis.

A minha mãe Angelita e meu pai Valdeildo, que desde a aprovação no mestrado se mostram entusiasmados, vibrando com mais essa conquista. Eles, que me apoiaram de todas as formas possíveis, que são; casa e abrigo seguro, provedores de bons conselhos, ensinamentos e fonte inspiração diária.

Ao meu irmão Angelo, com quem eu posso compartilhar todos os momentos profissionais e pessoais vividos. Ele que muitas vezes, me escuta, me aconselha e é companhia nos dias felizes e nos dias não tão felizes assim.

A minha irmã Angélica, que torce por mim e se alegra com cada etapa vencida e conquistada. Ela, que sempre está sorrindo, mesmo em meio a condições não favoráveis, não desisti, e se mostra perseverante, o que me ensina a trilhar esse mesmo caminho.

Aos meus amigos, Felipe, Cassio, Daniella, Elisa, Ianca, Paula, Marina, Tauan e Gabriela, que são meus companheiros diários. Não existe modo de descrever aqui, a importância de cada um de vocês dentro da minha vida, cada momento só se faz único por conta da presença de vocês. Vocês que estiveram longe dos olhos alguns dias, mas sempre dentro do meu coração.

A minha amiga Palloma, minha dupla durante a disciplina de biologia celular e seminários. Uma pessoa extremamente competente, inteligente e segura. Alguém que pode servir de espelho, para muitos que queiram se inspirar, alguém que eu admiro enormemente.

A minha amiga Jordana, pela amizade, parceira e companheiros. Pelas conversas, divisão de experiências vividas e risos que tornaram a vida mais leve dentro da pós-graduação.

A Gabriela Alves, que com paciência, humildade e leveza, dividiu comigo seus conhecimentos em experimentos laboratoriais. Sempre se mostrou bastante acessível e pronta para ajudar quem precisasse. Ela, que me proporcionou momentos de aprendizagem e com quem pude ministra um curso ao seu lado. Ela, que se transformou em uma grande amiga, dentro e fora do laboratório, se tornando alguém com quem pude compartilha diversos momentos.

A professora Mariana Machado Neves, pelo apoio e motivação, por ser uma profissional totalmente ética, justa e bondosa. Sempre se preocupando com o bem-estar dos seus orientados

e co-orientados, que trabalha muito, e mesmo com muito trabalho, sabe ser generosa, até mesmo nas horas das correções.

Aos amigos do laboratório; Ana, que co-orientou este trabalho, Luiz Otávio, Daniel e Felipe. Pessoas, com quem pude trabalhar diretamente e me proporcionaram inúmeros momentos de aprendizagem. Esse trabalho é nosso!! E não seria possível sem a ajuda de vocês. Aos amigos, Iara, Luiz Pedro, Arabela e Renner, por toda ajuda fornecida em algum momento, conversas e risos durante essa caminhada.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e a todos funcionários, professores e laboratórios que auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho. Em especial, a secretaria da pós-graduação em Biologia celular e Estrutural; Beth, por toda ajuda fornecida e seu trabalho de extrema qualidade realizado. Aos professores; Wellington Ronildo Clarindo, Isabel Regina dos Santos Costa Maldonado, e Clóvis Andrade Neves, por serem totalmente acessíveis, pacientes e pelos momentos de aprendizagem.

As agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, que nesses últimos anos, sofrem com cortes orçamentais e constantemente são ameaçadas por governos que não valorizam a educação e/ou pesquisa no Brasil, mas que ainda resistem, financiando pesquisas científicas no país.

A todos vocês, o meu mais sincero obrigado!!! Pois, cada um, de alguma forma, contribuiu para a conclusão deste trabalho, realização deste sonho e para meu amadurecimento, profissional e pessoal, Gratidão eterna!!!

“A palavra abre portas. Cê tem noção? É por isso que educação, você sabe, é a palavra-chave. É como um homem nu, todo vestido por dentro, é como um soldado da paz, armado de pensamentos, é como uma saída, um portal, um instrumento.” *(Emicida)*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 – Arsênio: caracterização química	12
2.2 – Metabolismo do arsênio	13
2.3 – Toxicidade em órgãos reprodutores masculinos	13
2.4 – Mecanismos de ação do arsênio na reprodução	14
2.5 – Consequências da intoxicação pelo arsênio para o espermatozoide	15
3. MATERIAL E METÓDOS	18
3.1. Animais	18
3.2. Delineamento experimental.....	18
3.3. Eutanásia, coleta dos órgãos e mensuração de parâmetros biométricos.....	19
3.4. Dosagem de testosterona sérica.....	20
3.5. Análise Histopatológicas.....	20
3.6. Histomorfometria testicular.....	20
3.7. Marcadores de estresse oxidativo e enzimas antioxidantes.....	20
3.8. Análises espermáticas	21
3.9. Ensaio cometa	21
3.10. Análise estatística.....	22
4. RESULTADOS	23
4.1. Consumo de água	23
4.2. Peso corporal, peso de órgãos reprodutivos masculinos e testosterona sérica	23
4.3. Histologia de testículo e epidídimo	25
4.4. Histomorfometria testicular.....	28
4.5. Motilidade e morfologia espermática.....	28
4.6. Atividade de enzimas antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo.....	28
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÃO	36
7. REFERÊNCIAS	38

RESUMO

COIMBRA, John Lennon de Paiva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Parâmetros espermáticos, testiculares e epididimários de ratos Wistar expostos ao arsênio.** Orientadora: Mariana Machado Neves. Coorientadora: Ana Cláudia Ferreira Souza.

O arsênio é um metaloide encontrado no solo, ar e água e sua contaminação ocorre principalmente pela ingestão de água contaminada com o elemento. Tal exposição, está associada com o surgimento de patologias e lesões em órgãos de diversos sistemas orgânicos, inclusive do aparelho reprodutor masculino. Neste contexto, tem-se concentrado esforços para descrever a influência da exposição em diferentes concentrações de arsênio para a espermatogênese, atividade antioxidante nos órgãos reprodutores e o possível potencial genotóxico do metaloide nas células espermáticas. Nesse sentido, esse trabalho objetivou investigar consequências da exposição ao arsenito de sódio, em duas concentrações, em órgãos do sistema reprodutor masculino durante 56 dias, focando nos parâmetros morfológicos e funcionais. Para isso, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais (n = 10 / grupo). O grupo controle (C), em que os animais receberam água filtrada, e os grupos As1 e As10 em que os roedores receberam solução de arsenito de sódio a 1 mg/L e 10 mg/L durante um ciclo do epitélio seminífero em ratos. A exposição ao elemento acarretou em alterações na histologia dos túbulos seminíferos e desregulação das atividades de enzimas antioxidantes testiculares e epididimárias. A presença do arsênio não afetou a biometria corporal, a dosagem de testosterona sérica, a morfometria testicular, e parâmetros morfológicos e de genotoxicidade nos espermatozoides epididimários. Entretanto, o grupo que recebeu 10 mg/L do arsenito de sódio, apresentou a motilidade espermática reduzida. Esses resultados, mostram que o metaloide nas concentrações testadas possuiu efeito negativo em alguns dos parâmetros morfofuncionais dos testículos, epidídimo e dos espermatozoides.

Palavras-chave: Arsênio, toxicologia, toxicologia reprodutiva, parâmetros morfofuncionais

ABSTRACT

COIMBRA, John Lennon de Paiva, M.Sc., Federal Universidade Federal de Viçosa, February 2020. **Sperm, testicular and epididymal parameters of Wistar rats exposed to arsenic.** Advisor: Mariana Machado Neves. CO-Advisor: Ana Cláudia Ferreira Souza

Arsenic is a heavy metal found in soil, air and water and its contamination occurs mainly by drinking water contaminated with the element. Such exposure is associated with the appearance of pathologies and injuries in organs of several organic systems, including the male reproductive system. In this context, efforts have been concentrated to describe the influence of exposure on different concentrations of arsenic for spermatogenesis, antioxidant activity in reproductive organs and the possible genotoxic potential of metal in sperm cells. In this sense, this study aimed to investigate the consequences of exposure to sodium arsenite, in two concentrations in male reproductive system organs during 56 days, focusing on morphological and functional parameters. For this, the animals were randomly divided into three experimental groups (n = 10 / group). The control group (C), where the animals received filtered water, and the groups As1 and As10, in which the rodents received sodium arsenite solution at 1 mg / L and 10 mg / L during a cycle of the seminiferous epithelium in rats. Exposure to the element resulted in changes in the histology of seminiferous tubules, deregulation of the activities of testicular and epididymal antioxidant enzymes. The presence of arsenic did not affect biometrics, serum testosterone levels, testicular morphometry, morphological and genotoxic damage to epididymal sperm, however the group that received 10mg / L of sodium arsenite, had reduced sperm motility. These results show that the metal at the tested concentrations had a negative effect on some of the morphofunctional parameters of the testicles, epididymis and sperm.

Keywords: Arsenic, toxicology, reproductive toxicology, morphofunctional parameters.

1. INTRODUÇÃO

A interação entre tóxicos ambientais e organismos biológicos se tornou temática de estudo de diversos pesquisadores preocupados com o bem-estar social e suas consequências para a saúde pública. No centro destas pesquisas, destacam-se os metais pesados e metalóides, como o arsênio, que têm sido considerado um importante contaminante ambiental com efeitos agudos e crônicos que podem promover acometimento de doenças, injúrias, bem como lesões em órgãos de diversos sistemas orgânicos inclusive do aparelho reprodutor masculino. Seu efeito, no entanto, depende de fatores como tempo de exposição, vias de exposição e concentração do tóxico (Ratnaike, 2003; Akter et al., 2006; Zinco, 2014).

O principal veículo de exposição humana ao arsênio é a água potável contaminada. Este metaloide possui alta capacidade de se solubilizar não apresentando odor ou paladar que possam servir como indicativo de sua presença na água. Acredita-se que milhões de pessoas no mundo estão sendo expostas diariamente a concentrações de arsênio por meio da ingestão de águas que contém o metaloide solubilizado. Este fato é entendido como um problema ambiental sério em todo o mundo, levantando a preocupação de países em desenvolvimento com Bangladesh, que é um exemplo de local com maior acometimento de pessoas pelo arsênio, e em países desenvolvidos como os Estados Unidos (Ng et al., 2003; Hei et al., 2004).

No sistema reprodutor a exposição ao arsênio pode promover um quadro de estresse oxidativo, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que provocam danos diretos e indiretos a biomoléculas importantes, como proteínas, enzimas, lipídeos e na molécula de desoxirribonucleico (DNA) (Sharma et al., 2014). A produção destas espécies nos sistema reprodutor está frequentemente associada a eventos que desregulam a homeostase testicular e epididimária (Zubair et al., 2017). A perda da eficiência na espermatogênese, alterações histomorfométricas e histopatológicas nos órgãos reprodutores, somado a menor concentração de espermatozoides no lúmen desses órgãos estão associadas a falhas no sistema de defesa antioxidantes em combater os espécimes gerados pelo metal (Johnson et al., 2000; Jana, 2006; Souza et al., 2016 ; Lima et al., 2018).

Soma-se ao dano do efeito oxidativo por meio das diferentes formas de arsênio disponibilizados no ambiente a capacidade de promover genotoxicidade celular (Mass et al., 2001; Hei et al., 2004), implicando em danos diretos na molécula de DNA, resultando em aberrações e mutações cromossômicas. Em casos mais graves, a genotoxicidade do metal se associa ao surgimento de neoplasias (Hei et al., 2004).

Dentro desse contexto, tem-se intensificado esforços para descrever a influência da exposição em diferentes concentrações de arsênio no sistema reprodutor masculino,

relacionando tais achados com o evento espermatogênico, atividade antioxidante nos órgãos reprodutores e o possível potencial genotóxico do metal nas células espermáticas. Nesse sentido, esse trabalho objetivou investigar consequências da exposição ao arsenito de sódio, em duas concentrações (1 mg/L e 10 mg/L), em órgãos do sistema reprodutor masculino durante um ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar adultos, focando em parâmetros morfológicos e funcionais. Como objetivos específicos temos:

- Avaliar os espermatozoides de animais expostos ao arsênio quanto a parâmetros morfológicos e funcionais, identificando possíveis danos ao DNA celular;

- Analisar o ambiente testicular em que estas células estão sendo produzidas após à exposição a este metaloide, quanto a parâmetros morfológicos, histomorfométricos e funcionais;

- Dosar a concentração sérica de testosterona nestes animais no momento histofisiológico em análise;

- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes que atuam no processo de estresse oxidativo, bem como outros indicadores de dano oxidativo nos testículos e epidídimos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Arsênio: caracterização química

O arsênio é definido como um metaloide por ter características físicas e químicas que transitam entre os elementos metais e não metais (Baker e Chesnin, 1975). Este elemento compõe o grupo 15 (5A) da tabela periódica (Chou, 2003) e apresenta consistência sólida, sendo cristalino e de cor acinzentada. Ele pode estar em diferentes valências químicas (3-, 0, 3+ e 5+) quando combinado com oxigênio, cloro e enxofre. Neste caso ele é chamado de arsênio inorgânico, como no caso do arsenito e arsenato. Quando combinado com carbono e hidrogênio, apresenta-se na sua forma orgânica, como arsina e derivados orgânicos (Graeme, 1998 ; Chou et al., 2003; Jomova et al., 2011). Os estados de oxidação do arsênio, As (III) e As (V), são os biologicamente mais relevantes, já que são considerados os mais tóxicos. Ao longo da história, esses elementos foram utilizados como medicamentos contra doenças como a sífilis e neoplasias (Graeme, 1998). O arsênio é um elemento químico amplamente distribuído no planeta, sendo o 20º mais abundante na crosta terrestre (Jomova et al., 2011; Chou, 2003). O metaloide está presente no ar, água, solo e nos vários tipos de rocha, especialmente em minérios que contêm chumbo e cobre. As fontes naturais de liberação do elemento para o ambiente incluem processos de erosão, lixiviação e fenômenos e vulcânicos (Ribas, 2013). Ações

antrópicas como a combustão e atividade de usinas que utilizam carvão podem liberar quantidades de arsênio na atmosfera, que se depositam no solo, ficam retidos no ar, sendo transportado por longas distâncias ou ainda dissolver-se em água, sendo comum sua presença em lagos, rios ou águas subterrâneas em decorrência de descarga de resíduos industriais resultantes das ações humanas (Chou, 2003).

O termo metal pesado não possui uma definição clara. Sobre o ponto de vista químico, metais pesados são aqueles que apresentam densidade específica de mais de 5 g/cm^3 (Filho, 2016). No ponto de vista da toxicologia, o grupo de metais pesados é composto por elementos químicos da tabela periódica que são considerados tóxicos, não sendo destruídos dentro do organismo contaminado e, além disso, sendo bioacumulados. Como poluentes ambientais, eles representam um sério risco à saúde de organismos biológicos, inclusive humanos. Dentre os metais pesados mais conhecidos destacam-se os que, ainda hoje, mesmo se sabendo do potencial toxicológico, são amplamente utilizados por pessoas do mundo todo (Souza et al., 2014). Seus representantes em destaque são o chumbo, cádmio, mercúrio e arsênio. O arsênio, dentro da área toxicológica é referido como um metal pesado por possuir densidade de $5,72 \text{ g/cm}^3$, que pode se bioacumular em tecidos e órgãos, promovendo toxicidade nos mesmos (Järup, 2003).

2.2 – Metabolismo do arsênio

O arsênio é absorvido principalmente pela ingestão ou inalação, sendo que a principal forma de exposição humana ao elemento é pela água de beber. Uma vez ingerido, sua absorção e distribuição pelos órgãos biológicos ocorre em até 24 horas (Graeme, 1998). O arsenito chega dentro dos compartimentos celulares por meio das aquagliceroporinas 7 e 9 ou por hexoses permeases. No caso do arsenato, estes são transportados por meio de transportadores fosfatos (Liu et al., 2002). Uma vez dentro da célula, o arsênio é metilado no fígado pela ação de enzimas de metiltransferases, formando compostos menos tóxicos para o organismo: ácido monometilarsônico e ácido dimetilarsínico, os quais chegam ao espaço extracelular e são excretados pela urina. Entretanto, leva-se de três a cinco dias para que 50% consiga ser eliminado do organismo (Ratnaike, 2003; Wang et al., 2006).

A toxicidade dos metais como o arsênio relaciona-se com a capacidade destes elementos de se ligarem ao grupo tiol de proteínas e enzimas, desestabilizando suas conformações funcionais, e, conseqüentemente, suas atividades. Além de serem fatores de risco para o desenvolvimento de algumas doenças, eles podem afetar negativamente os sintomas e progressão de doenças pré-existentes (Akinola et al., 2016).

A nível molecular, Abernathy et al. (1999) explicam que o arsênio pode interromper a expressão de genes envolvidos com as vias de transdução de sinal, o que pode implicar no declínio de funções celulares relevantes para o organismo. Cerca de 200 proteínas envolvidas com processos vitais, como o mecanismo de replicação e reparo do DNA e/ou síntese de ATP, podem ser inibidos por ação do arsênio, devido a inativação enzimática (Ratnaike, 2003).

As patologias que surgem devido a toxicidade do arsênio estão relacionadas ao tempo de exposição ao metal, que pode ocorrer de forma aguda ou crônica. Os efeitos acarretados, devido a exposição aguda, incluem náusea, vômito, dor abdominal, encefalopatia e neuropatia. Enquanto na exposição crônica é comum o surgimento de neoplasias no pulmão, bexiga, pele e fígado, além de distúrbios metabólicos como diabetes, doenças cardíacas e problemas de fertilidade (Ratnaike, 2003).

2.3 – Toxicidade em órgãos reprodutores masculinos

No sistema reprodutor masculino, o arsênio é conhecido por promover danos aos testículos e epidídimos, prejudicando as funções destes órgãos. Estudos epidemiológicos em homens demonstram que a exposição ao arsênio promove a redução da qualidade dos espermatozoides (Nie et al., 2006; Hsieh et al., 2008). De acordo com Souza et al. (2016a), roedores expostos ao arsenito e arsenato de sódio apresentaram vacúolos no epitélio testicular, além de redução na produção espermática. Mudanças na biometria testicular, como a diminuição de seu peso e redução do número de espermatozoides normais também foram identificadas em animais expostos a diferentes compostos de arsênio (Pant et al., 2004; Guvvala et al., 2016). A exposição ao arsênio foi ainda capaz de promover a degeneração das células germinativas (Picut e Remick., 2017). Camundongos expostos ao arsênio exibiram reduções graduais no diâmetro tubular seminífero (Sanghamitra et al., 2008) e, em ratos, o conteúdo micromineral do órgão foi alterado (Lima et al., 2018). Estudos experimentais demonstram que, tanto o testículo como o epidídimo, são órgãos-alvos dentro da ação toxicológica do arsênio (Souza et al., 2016b; Lima et al., 2018), o que pode comprometer a fisiologia destes órgãos.

O testículo é um órgão do sistema reprodutor masculino responsável pela produção dos espermatozoides e da testosterona (Russell et al., 1993). Ele é formado no embrião a partir das células germinativas primordiais e no adulto apresenta um compartimento tubular, composto por células de Sertoli e células germinativas, e um compartimento intertubular, onde se encontram as células intersticiais que produzem esteroides (Gonzalez, 2002). O órgão é responsável pela produção dos espermatozoides, evento que ocorre dentro dos túbulos seminíferos de modo regulado e coordenado, envolvendo diferentes fatores: endócrinos, gênicos e transicionais (Hess e Franca, 2008). Este fenômeno recebe o nome de

espermatogênese, que pode ser explicado de modo geral como: a diferenciação das espermatogônias (células germinativas indiferenciadas) que compõe o epitélio do túbulo seminífero em espermatozoides maduros (Costa, 2017).

Sabe-se que os espermatozoide saem dos testículos sem apresentarem a capacidade de motilidade, adquirindo esta e outras especificações no epidídimo (Sostaric et al., 2008). O epidídimo é um órgão altamente enovelado, dividido em quatro regiões anatômicas, segmento inicial, cabeça, corpo e cauda (Robaire et al., 2015). O epidídimo possui como função a maturação, estocagem e transporte dos espermatozoides, criando um ambiente luminal especializado para a promoção de tais eventos. A maturação espermática, se inicia na cabeça do epidídimo e segue pelo corpo chegando até a cauda (Sostaric et al., 2008). O espermatozoides, no epidídimo, sofrem transformações como as modificações na membrana plasmática, que são induzidas pelo ambiente iônico, somado a presença ou ausência de macromoléculas específicas dentro do lúmen do órgão (Sostaric et al., 2008). Neste processo, o espermatozoide sofre modificações bioquímicas, morfológicas e funcionais, estimuladas por proteínas estruturais, enzimáticas e por glicoproteínas sintetizadas e adicionadas ao mesmo por células do epidídimo (Robaire et al., 2015). O ambiente epididimal fornece ao espermatozoide disponibilidade de substratos, temperatura, tensões de oxigênio e pH adequados, auxiliares no processo inicial da capacitação espermática (Visconti et al., 2011). Assim, a exposição ao arsênio, pode prejudicar tanto a função testicular de produção espermática quanto a de maturação exercida pelo epidídimo, resultando em uma menor qualidade e viabilidade dos espermatozoides.

2.4 – Mecanismos de ação do arsênio na reprodução

Ainda não está totalmente elucidado todos os mecanismos pelos quais o arsênio exerce sua toxicidade nos órgãos do sistema reprodutor masculino. Entretanto, é bem caracterizado sua ação via promoção em excesso de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Isto gera um desequilíbrio entre tais espécies e as enzimas antioxidantes que buscam neutralizar os efeitos negativos da presença exacerbada das espécies reativas de oxigênio e de seus subprodutos, gerando no ambiente celular um quadro de estresse oxidativo (Davies, 2000). Em situações fisiológicas, os espécimes participam como mediadores de eventos celulares, atuam durante respostas inflamatórias e, por meio da cadeia transportadora de elétrons, auxiliam na capacitação final do espermatozoide no momento da fertilização (Barbosa et al., 2010).

O sistema antioxidante é composto de enzimas como a superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona S-transferase (GSH), que compõem a primeira linha de defesa para as células. A ação da SOD no ambiente celular relaciona-se com a remoção do radical

superóxido (O_2^-), gerando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e em seguida, tem-se a atuação da CAT que catalisa a reação de H_2O_2 , em água e oxigênio, evitando danos celulares e/ou teciduais (Davies, 2000). A GSH possui papel na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrolítico (Huber, 2008). Essas enzimas trabalham em conjunto para neutralização e transformação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em moléculas inofensivas para as células, tecidos e órgãos (Ighodaro et al., 2018).

O arsênio consegue liga-se aos grupos sulfidrilas nas proteínas interferindo em suas funções. A exposição ao metal leva comumente o surgimento da peroxidação lipídica, implicando em lesões celulares relacionados com alterações na permeabilidade seletiva da membrana biológicas e desestruturando o aparato que suporta receptores hormonais envolvidos com mecanismos de sinalização. Como consequência desse processo, ocorre o aumento nos níveis de malondialdeído, que relacionam-se com a proporção de danos celulares gerados pela peroxidação lipídica (Lima et al., 2001; Reddy et al., 2011). Outro importante marcador de dano oxidativo é a carbonilação de proteínas, o que implica em perda da função destas. Sabe-se que a carbonilação pode ocorrer mediada diretamente por ação radicais livres ou de forma indireta, por meio da formação dos malondialdeído (Vincent et al., 2007; Žitňanová et al., 2007; Reddy et al., 2011). O excesso de óxido nítrico induz a diminuição da motilidade, da viabilidade dos espermatozoides e compromete a capacitação da reação acrossômica (Aitken, 1997).

Em homens, a exposição ao metal acarretou em uma diminuição do peso dos testículos e em uma menor contagem de espermatozoides (Kim e Kim, 2015). De acordo com Chiou et al. (2008), ratos tratados com trióxido de arsênio apresentaram diminuição na motilidade e viabilidade espermática, redução nos níveis de testosterona plasmática, não alterando a testosterona testicular nas condições testadas, mas ocorreu a expressão reduzida do mRNA envolvido na síntese de testosterona testicular. A diminuição do número de espermatozoides, esfoliação de células que compõem os túbulos seminíferos, proporção alterada do núcleo / citoplasma das células de Leydig e uma menor expressão de receptores de andrógenos no epidídimo, foi relatada como consequências da exposição ao arsênio devido ao quadro de estresse oxidativo (Silva et al., 2017).

Kim e Kim (2015) sugerem que os espécimes reativos de oxigênio e nitrogênio gerados pelo metal podem exercer sua toxicidade, afetando o eixo-hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Assim, o arsênio exerce seus efeitos tóxicos, tanto no cérebro e/ou hipófise, provocando via estresse oxidativo desregulação endócrina, o que prejudica as funções testiculares e epididimárias, uma vez que estes órgãos são andrógenos dependentes. A exposição ao metal

em modelos experimentais foi capaz de reduzir concentrações do hormônio luteinizante (LH), hormônio folículoestimulante (FSH) e produção de testosterona pelas células de Leydig, implicando em perturbações nos processos de perturbado espermatogênese.

2.5 – Consequências da intoxicação pelo arsênio para o espermatozoide

Os espermatozoides são células haploides altamente especializadas dotadas de capacidade de fertilização. Durante sua produção, que corresponde a um ciclo completo do epitélio seminífero, que é específico por espécie animal, essas células passam por mudanças morfológicas e estruturais de suas características (Holstein et al., 1987). A anatomia do espermatozoide maduro, consiste em uma região denominada cabeça e outra chamada de cauda, revestidas por membrana plasmática (Brito, 2007). Na cabeça, encontra-se o núcleo com seus cromossomos condensados, citoesqueletos aderentes ao núcleo e o acrossoma, que é uma organela delimitada por membrana, dotada de enzimas fundamentais ao processo de fertilização (Olson et al., 2002). A cauda, também chamada de flagelo, é a estrutura dotada de movimentos, sendo dividida em peça média, peça principal e peça final. O axonema estende-se por todo o comprimento da cauda e organiza-se em um formato de nove duplas de microtúbulos, apresentando um par central (Brito, 2007). Nesta organização estrutural, encontram-se proteínas motoras dotadas de ATPases que utilizam moléculas de adenosina trifosfato (ATP), produzidas pelas mitocôndrias, para proporcionar motilidade ao espermatozoide (Inaba e Mizuno, 2016).

Os espermatozoides podem ter seu processo de produção e maturação prejudicado em decorrência da produção de espécies reativas de oxigênio, sendo este iniciado nas mitocôndrias destas células, envolvendo uma gama de vias de sinalização celular (Aitken et al., 2012). A exposição a metais pesados como arsênio, podem promover a ativação em maior quantidade dos espécies reativos de oxigênio pelas mitocôndrias espermáticas (Barbosa et al., 2010). Sabe-se que a produção em pequenas quantidades de tais espécies é necessária para a função espermática normal, como o aumento da fluidez da membrana plasmática, eventos de fosforilação da tirosina que se associam a capacitação espermática (Aitken, 2011). Se relacionam, também, com a hiperativação da motilidade, reação acrossomal e a penetração do espermatozoide ao ovócito II (Maia e Bicudo, 2009). Contudo, o excesso de espécies reativas de oxigênio, promove a ativação de diversos eventos moleculares, que perturbam organelas, desencadeiam ou aumentam da peroxidação lipídica, promovem a formação de proteínas carboniladas e levam a danos oxidativos no DNA espermático tendo como consequências espermatozoides com sua motilidade, viabilidade e integridade gênica diminuída (Aitken, 2011; Aitken et al., 2012).

Agentes tóxicos podem exercer papéis de disruptores endócrinos, promovendo variações ou interrupções na produção de hormônios que são necessários para uma produção espermática normal. A avaliação de fertilidade pode ser averiguada por análises padrões como motilidade e morfologia. Para a morfologia, considera-se espermatozoides anormais os que apresentam defeitos nas regiões da cabeça e ao longo da cauda. A motilidade espermática é um parâmetro que pode ser usado para medir a viabilidade do espermatozoides, sendo que os espermatozoides imóveis são considerados inviáveis (Khatun et al., 2018).

Soma-se a esta verificação, ensaios que permitem detectar dano oxidativo ao DNA espermático. Algumas técnicas podem ser utilizadas para tal investigação, como medir níveis de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) que encontram-se aumentados quando existe dano oxidativo ao DNA, o teste *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA), que permite a avaliação da estrutura da cromatina dos espermatozoides, a técnica de TUNEL que se baseia na incorporação de nucleótidos deoxyuridina trifosfatados (dUTP) e o ensaio cometa, que é uma técnica rápida, de baixo custo, sensível e que permite avaliar a fragmentação do DNA de cadeia simples ou de cadeia dupla a depender de adaptações metodológicas.

De modo geral, o princípio do ensaio cometa baseia-se na inclusão dos núcleos espermáticos em um gel de agarose sobre lâminas histológicas, submetendo-as em uma corrente elétrica. Em situações de fragmentação nuclear, o DNA, por possuir carga negativa, irá migrar para fora do núcleo, essa migração forma um aspecto de cauda de cometa. Quanto maior a fragmentação, maior a relação com o dano oxidativo ao DNA, sendo que na ausência de lesões nucleares o DNA permanece armazenado dentro do núcleo (Evenson, 1987 ; Shen et al., 2000 ; Olive et al., 2006). A integridade do DNA da célula espermática se faz necessária para o processo de fertilização, já que o DNA íntegro pode refletir no sucesso reprodutivo de um indivíduo (Noblanc et al., 2013). De acordo com Niño et al. (2016), roedores expostos ao trióxido de arsênio mostraram uma diminuição na concentração de espermatozoides, na motilidade e aumento da fragmentação no DNA espermático.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Este trabalho é uma continuidade dos trabalhos da linha de pesquisa sobre toxicologia reprodutiva desenvolvidos pelo grupo de pesquisa em reprodução animal e toxicologia. Ratos Wistar adultos (n = 30, 80 dias de idade), pesando aproximadamente 310,40g vieram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa e foram mantidos individualmente em gaiolas de polipropileno, sob temperatura (21 ± 2 °C) e iluminação controlada (12-12 h claro / escuro), no Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Estrutural

do Departamento de Biologia Geral. Durante o experimento, os modelos experimentais tiveram acesso a ração e a água *ad libitum*. A administração das quantidades de arsênio ocorreu de forma oral, sendo a água o veículo escolhido para promoção de exposição dos roedores ao elemento. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV; número de protocolo 81/2018) e foi conduzido de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2. Delineamento experimental

Os animais foram submetidos a um período de aclimação de dez dias e em seguida, foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais (n = 10 / grupo). O grupo controle (C), em que os animais receberam água filtrada, e os grupos As1 e As10 em que os roedores receberam solução de arsenito de sódio a 1 mg/L e 10 mg/L (NaAsO₂; Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) respectivamente, por meio da água de beber por 56 dias, sendo o consumo de água, medido diariamente ao longo do experimento. Um total de 0,017g de arsenito (NaAsO₂) foi dissolvido em 1 L de água destilada para obter um total de 1 mg/L de arsênio, enquanto 0,052g de arsenito (NaAsO₂) foi dissolvido em 1 L de água destilada para se obter 10 mg/L de arsênio. As concentrações de arsênio, presentes na água de beber dentro deste estudo são maiores que o limite permitido pela Organização Mundial de Saúde que atualmente é de 0,01 mg/L (Who, 2011). Entretanto, considera-se que populações humanas em regiões endêmicas do mundo, estão sujeitas a exposição e conseqüentemente contaminações com níveis muito acima do permitido por lei. O período experimental correspondeu a um ciclo do epitélio seminífero em ratos, sendo o consumo de água e da solução medido diariamente. Os animais foram pesados semanalmente de acordo com Lima et al., (2013) e Souza et al., (2016), para a monitoração do peso corporal.

3.3. Eutanásia, coleta dos órgãos e mensuração de parâmetros biométricos

Após 56 dias de exposição ao arsênio, todos os animais (n = 30) foram pesados, e sedados (xilazina 10 mg/ kg/ intraperitoneal) e depois anestesiados (quetamina 150 mg / kg/ intraperitoneal) assim como descrito em Souza et al., (2016). Posteriormente, testículos, epidídimos, próstata ventral e vesícula seminal (sem glândula coagulante) foram removidos, dissecados e pesados, registrando-se os pesos dos órgãos para a mensuração de parâmetros biométricos. Os testículos e epidídimos direitos, foram utilizados para a análise histopatológica e histomorfométrica e os esquerdos, destinados ao estresse oxidativo, ensaio cometa e parâmetros espermáticos.

3.4. Dosagem de testosterona sérica

O sangue foi coletado por punção cardíaca durante o período de anestesia do animal e posteriormente centrifugado a 4.119 x g. por 15 min. O soro obtido foi utilizado para quantificação da testosterona, utilizando-se do kit testosterona ELISA (ADI-900-065, Enzo Life Sciences, Plymouth, PA, EUA) seguindo as instruções do fabricante (Lima et al., 2018; Souza et al., 2016a, 2016c).

3.5. Análise Histopatológica

Testículos e epidídimos (n = 5/grupo) foram fixados por imersão por 24 horas em paraformaldeído a 4%. Posteriormente, tanto os fragmentos dos testículos como os das regiões do epidídimo (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda) foram desidratados em série crescente de etanol (70, 80, 90 e 100%). Posteriormente, eles foram diafinizados em xilol e embebidos em parafina histológica. Cortes histológicos com 5 µm foram obtidos utilizando um micrótomo rotativo (RM 2255, Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha) e corados com hematoxilina e eosina. Em aumentos de 10, 20 e 40 x analisou-se 100 túbulos seminíferos considerando túbulos com células acidófilas, células multinucleadas, degeneração tubular, vacuolização do epitélio e células germinativas destacadas na região luminal (Picut et al., 2017). Na análise histopatológica do epidídimo, a aparência do epitélio, o conteúdo luminal e o interstício foram observados, classificados de acordo com as diretrizes para estudos toxicológicos (Grava et al., 2014).

3.6. Histomorfometria testicular

Para as análises morfométricas, imagens digitais do parênquima testicular foram obtidas utilizando o microscópio de luz (Olympus BX-53, Toquio, Japão) equipado com câmera digital (Olympus DP73, Toquio, Japão) e analisadas com o programa Image-Pro Plus® 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). Obteve-se o diâmetro médio dos túbulos seminíferos e diâmetro luminal dos modelos experimentais a partir da medida, ao acaso, de 30 secções transversais de túbulos que apresentaram o contorno o mais circular possível. As mesmas secções utilizadas para medir o diâmetro tubular, foram usadas na mensuração da altura do epitélio seminífero, compreendida da túnica própria ao lúmen tubular. O valor encontrado para altura do epitélio, em cada túbulo, representa a média de duas medidas diametralmente opostas (Souza et al., 2016a).

3.7. Marcadores de estresse oxidativo e enzimas antioxidantes

Para a análise das atividades superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e glutathione S-transferase (GST), foram utilizados 100 mg de testículo e cauda do epidídimo ($n = 5$ / grupo) previamente congelados, onde foram homogeneizados em tampão fosfato e centrifugado a 4000 g a 5 ° C por 10 minutos, de acordo com Souza et al., (2016b,2019). A atividade da SOD, foi avaliada pelo método do pirogalol, com base na capacidade dessa enzima de catalisar a reação de superóxido (O^2) e peróxido de hidrogênio (Dieterich et al., 2000). A atividade de CAT, foi avaliada de acordo com o método AEBI (1984), medindo a cinética da decomposição do peróxido de hidrogênio. A atividade de GST foi estimada pelo espectrofotômetro a 340 nm, como descrito por Habig et al.,(1974) e calculado pela taxa de oxidação do NADPH. Para a análise do malondialdeído, o produto final de peroxidação lipídica, 50 mg do testículo e da cauda epididimal ($n = 5$ / grupo) foram homogeneizados em tampão fosfato (pH 7,0) seguido de centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi então reagido com solução TBARS (15% de ácido tricloroacético, 0,375% de ácido tiobarbitúrico, 0,25N HCL) por 15 minutos. A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi monitorada a 535 nm, conforme descrito por Buege e Aust (1978). Os níveis de óxido nítrico, foram indiretamente determinados pela quantificação dos níveis de nitrito / nitrato nos testículos e na cauda dos epidídimos de acordo com a metodologia de Griess (Tsikas, 2007). A concentração de proteínas carboniladas, foram medidas bioquimicamente pela adição de 0,5 mL de solução de dinitrofenil-hidrazina aos grânulos de tecido testicular. O dano proteico foi determinado no sobrenadante final, com base nos grupos carbonila da reação DNPH e medido em espectrofotometria a 370 nm (Levine et al., 1990).

3.8. Análises espermáticas

A região da cauda epididimária, obtida dos machos controle e tratados com arsênio ($n = 10$ / grupo) foram cortadas várias vezes usando uma lâmina de bisturi sobre uma placa de Petri. Estes cortes foram realizados sobre 500 μ l de NaCl a 0,09% a fim de facilitar a saída do fluido epididimário contendo espermatozoides deste órgão. Para analisar a motilidade espermática, 10 μ l de fluido epididimário, foram colocados entre lâmina e lamínula previamente aquecidos a 37 °C (Souza et al., 2016c). E posteriormente avaliados em microscópio óptico (L - 1000B, Bioval, São Paulo, Brasil) em aumento de 400x. As células foram então classificadas como móveis ou imóveis, e os resultados foram expressos em percentual (Morakinyo et al., 2010).

Para a morfologia espermática ($n = 10$ / grupo) utilizou-se 50 μ l do fluido epididimário fixado em 100 μ l de paraformaldeído a 4% tamponado, sendo mantido refrigerado a -20°C até

o momento da análise. Foram analisados 200 espermatozoides em microscópio de contraste de fase (Bioval L - 1000B) em aumento de, 200x e 1000x. As anormalidades espermáticas foram classificadas quanto a defeitos de cabeça (núcleo e acrossoma), peça intermediária (quebrada, fracamente dobrada e fortemente dobrada) e peça principal (fracamente enrolada e fortemente enrolada), sendo os resultados expressos em porcentagem (Lima et al., 2018; Souza et al., 2016a).

3.9. Ensaio cometa

Espermatozoides das três regiões do epidídimo, cabeça, corpo e cauda, (n = 5 / grupo) foram coletados durante a eutanásia dos animais e centrifugados em 600 rpm por 20 minutos, descartando-se o sobrenadante nos intervalos e adicionado-se ao *pellet* uma solução de *red blood cells*, para a remoção de células sanguíneas no meio. Esse processo se repetiu por quatro vezes, para cada amostra dos animais tratados e controle. Posteriormente 100 µl do material foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a 20C° até o momento do processamento. O dano no DNA dos espermatozoides foi avaliado pelo teste do cometa de acordo com (Duydu et al., 2012), com algumas modificações. Lâminas histológicas, foram cobertas com agarose com ponto de fusão normal e armazenadas em estufa 37° C durante a noite para permitir a solidificação da agarose. 100 µl de tampão de isolamento nuclear foram adicionados a cada amostra e após 20 minutos, 50 µl destas, foram adicionados às lâminas histológicas, e em seguida, 60 µl de agarose com baixo ponto de fusão (*low-melting*) foi aplicado sobre as lâminas histológicas, cobrindo-se com lamínulas de 24 x 50mm. Logo após esses eventos, as lâminas foram armazenadas no congelador por 10 minutos a 4 ° C e levadas a geladeira por 1 mim. Posteriormente, as lâminas histológicas, sem lamínulas foram armazenadas por 5 minutos em tampão de eletroforese alcalina (TRIS 250 mM, EDTA 1 mM e NaOH 10 mM), e após esse tempo, a eletroforese foi iniciada, durando 20 minutos em uma corrente elétrica de 25 V / e a amperagem ajustada para 270 mA. Três lavagens com Tris-HCl foram então realizadas por 5 minutos cada. Para a coloração das amostras, utilizou-se 100 µl de Acridine Orange (50 µm) durante 15 minutos no escuro. Para remoção do excesso do corante, as lâminas foram lavadas três vezes com água destilada por 5 minutos. Após a secagem das lâminas histológicas, 100 células foram contadas para documentar a fragmentação do DNA espermático. A visualização ocorreu em um microscópio de epifluorescência Olympus IX80 (Tóquio, Japão), com uma ampliação de 200x.

3.10. Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto a sua normalidade pelo teste de ShapiroWilk. Variáveis paramétricas, foram comparadas pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Student Newman Keuls, para comparação entre médias. Os resultados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis, sendo suas médias comparadas pelo teste de Dunn. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (Média \pm SEM). As análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism (versão 7.0).

4. RESULTADOS

4.1. Consumo de água

Após 56 dias de tratamentos, não houve diferença entre os grupos quanto ao consumo de água ($P > 0,05$). Animais do grupo controle ingeriram $43,18 \pm 0,44$ mL de água de beber, enquanto animais expostos a 1 mg/L de arsênio ingeriram $43,06 \pm 0,37$ mL da solução. Já os animais do grupo que recebeu a maior concentração de arsênio na água de beber ingeriram $43,66 \pm 1,66$ mL.

4.2. Peso corporal, peso de órgãos reprodutivos masculinos e testosterona sérica

Não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais para os parâmetros biométricos avaliados ($P > 0,05$; Tab. 1). A concentração sérica de testosterona também não sofreu alteração entre os animais dos grupos experimentais ($P > 0,05$; Tab. 1).

Tabela 1. Parâmetros biométricos e testosterona sérica de ratos Wistar adultos expostos ao arsênio nas concentrações de 1 mg /L (As1) e 10 mg / L (As10 por 56 dias na água de beber

Parâmetros	Controle	As1	As10
Peso corporal final (g)	378,5 ± 12,34 ^a	426,6 ± 12,89 ^a	414,8 ± 20,34 ^a
Testículos (g)	1,75 ± 0,04 ^a	1,67 ± 0,08 ^a	1,78 ± 0,03 ^a
Testículos (g/100g)	0,46 ± 0,01 ^a	0,39 ± 0,02 ^a	0,44 ± 0,02 ^a
Epidídimos (mg)	698,3 ± 14,02 ^a	729,0 ± 30,48 ^a	731,8 ± 20,68 ^a
Epidídimos (mg/100g)	185,8 ± 5,29 ^a	171,9 ± 8,13 ^a	179,7 ± 8,92 ^a
Vesícula seminal (mg)	1254 ± 115,8 ^a	1140 ± 96,9 ^a	1301 ± 119,2 ^a
Vesícula seminal (mg/100g)	316,1 ± 33,05 ^a	284,6 ± 28,21 ^a	331 ± 33,03 ^a
Próstata Ventral (mg)	605,7 ± 52,59 ^a	680,6 ± 25,24 ^a	579,7 ± 16,71 ^a
Próstata Ventral (mg/100g)	152,1 ± 13,17 ^a	169,8 ± 9,75 ^a	149,7 ± 15,71 ^a
Testosterona sérica (ng/dl)	904,5 ± 56,71 ^a	823,6 ± 78,07 ^a	843,1 ± 69,14 ^a

Valores expressos em média ± SEM pelo teste de Student Newman Keuls (P >0,05).

4.3. Histologia de testículo e epidídimo

Os animais do grupo controle possuíam túbulos seminíferos normais, compostos por túnica própria, epitélio germinativo e lúmen (Figura 1). No entanto, os animais do grupo As1 apresentaram vacúolos na base do epitélio seminífero e menor número de espermatozoides no lúmen dos túbulos (Figura 1). Essas alterações, também foram visualizadas nos animais pertencentes ao grupo As10, somado a presença de células germinativas no lúmen tubular (Figura 1). Não foram observadas alterações histopatológicas no epitélio do epidídimo em todas as regiões avaliadas nos animais expostos a ambas concentrações de arsênio. No entanto, observou-se uma discreta diminuição no número de espermatozoides no lúmen dos ductos pertencentes ao seguimento inicial em As1 e As10, na região da cabeça em As10 e no corpo do epidídimo em As1 e As10 (Figura 2).

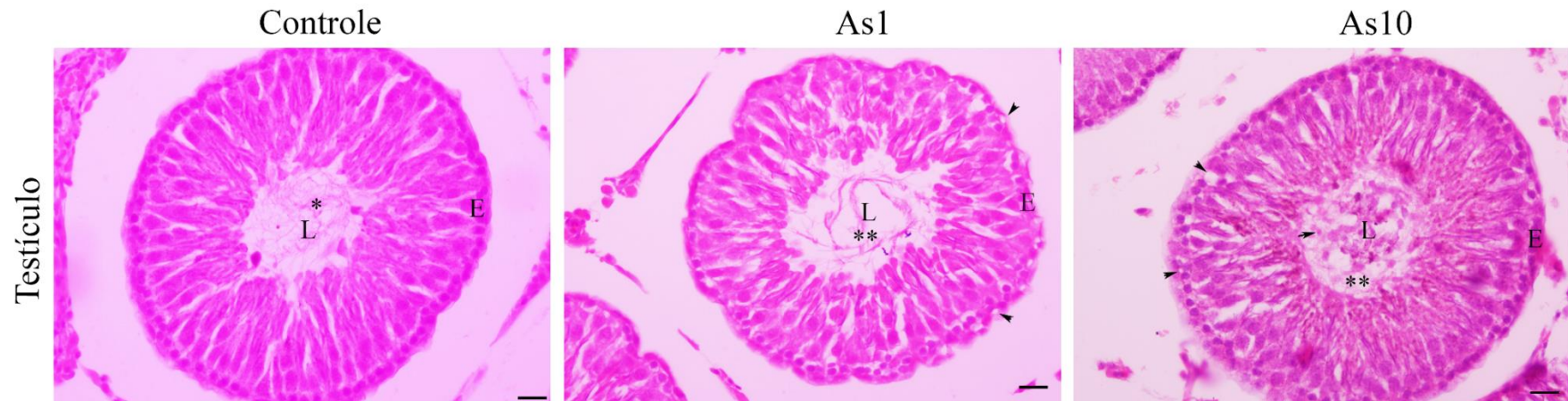


FIGURA 1: Túbulos seminíferos de ratos Wistar adultos. Controle água potável; As1: 1 mg / L de e As10: 10 mg / L de arsênio. E = epitélio, L = lúmen, In = Interstício * = indica presença dos espermatozoides. ** indica aparente redução espermática, observada pelos espaços em branco no lúmen, cabeça da ponta de seta = vacúolos. Seta = células germinativas no lúmen. Coloração hematoxilina & eosina. Barras de escala = 20 μ m.

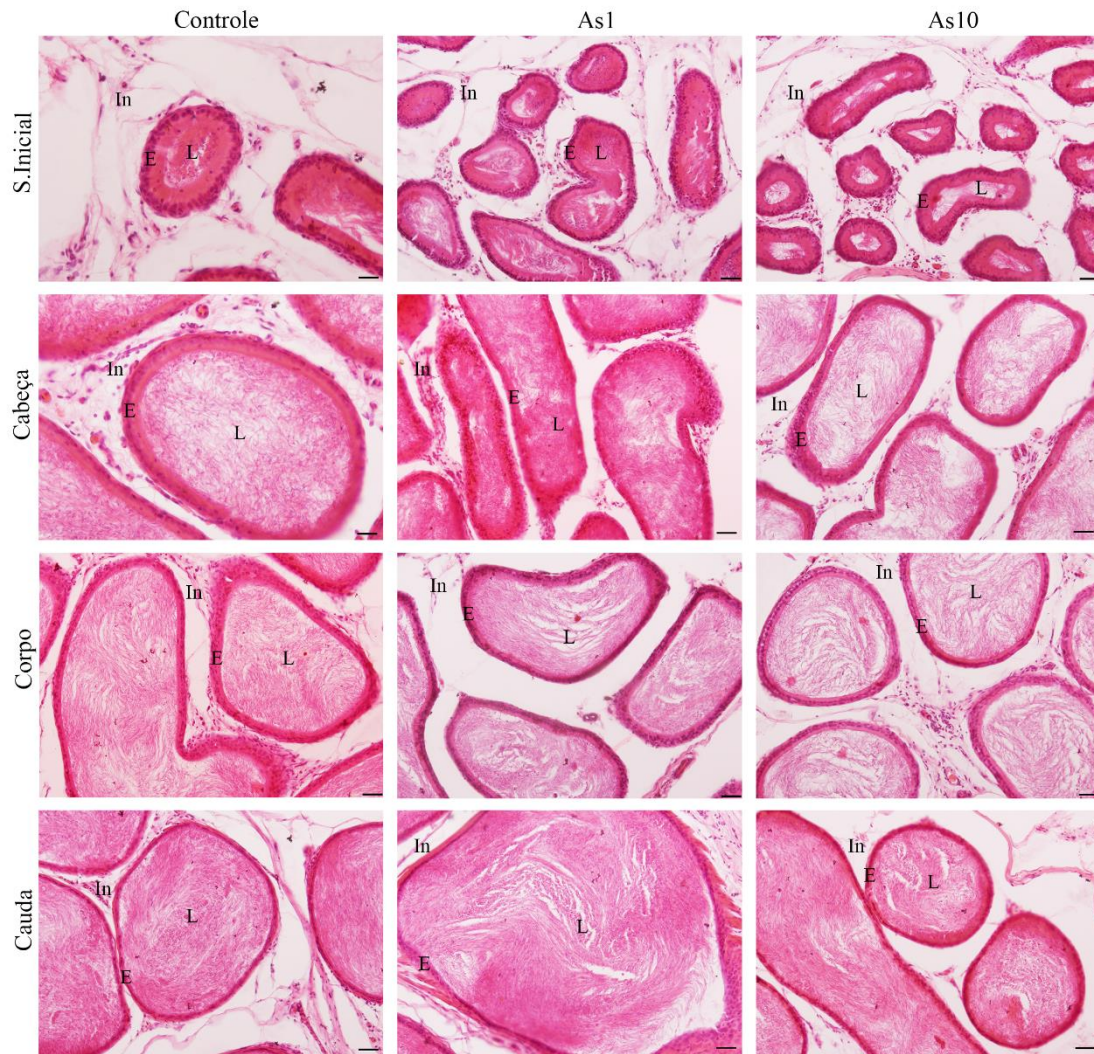


FIGURA 2: Secções histológicas de epidídimo de ratos Wistar adultos. Controle água potável; As1: 1 mg / L de e As10: 10 mg / L de arsênio. E = epitélio, L = lúmen, In = Interstício. Indica uma aparente redução espermática, enxergada pelos espaços em branco no lúmen. Coloração hematoxilina & eosina. Barras de escala = 20 μ m

4.4. Histomorfometria testicular

Os dados morfométricos dos túbulos seminíferos não apresentaram diferenças entre os grupos experimentais para os parâmetros diâmetro tubular, diâmetro luminal e altura do epitélio ($P > 0,05$; Tab. 2).

Tabela 2. Parâmetros morfométricos de testículos de ratos adultos expostos ao arsênio nas concentrações de 1 mg /L (As1) e 10 mg / L (As10) na água de beber.

Parâmetros	Controle	As1	A10
Diâmetro tubular (μm)	231,9 \pm 6,93 ^a	235,8 \pm 7,21 ^a	219,7 \pm 3,31 ^a
Diâmetro luminal (μm)	91,31 \pm 3,72 ^a	92,72 \pm 5,84 ^a	91,33 \pm 7,49 ^a
Altura do epitélio (μm)	70,28 \pm 2,32 ^a	71,53 \pm 1,87 ^a	65,02 \pm 4,41 ^a

Valores expressos em Média \pm SEM pelo teste de Student Newman Keuls ($P > 0,05$).

4.5. Motilidade e morfologia espermática

A motilidade espermática foi reduzida em animais tratados com 10 mg/L arsênio em relação aos animais do grupo controle e aqueles expostos a concentração de 1 mg/L do metal ($P < 0,05$; Tab. 3). Por outro lado, o parâmetro morfológico dos espermatozoides não diferiu entre os animais controles e expostos ao arsênio ($P > 0,05$; Tab. 3).

Tabela 3. Motilidade e Morfologia de espermatozoides de ratos adultos expostos ao arsênio durante 56 dias em duas concentrações de 1 mg /L (As1) e 10 mg / L (As10) na água de beber.

Parâmetros	Controle	As1	A10
Motilidade espermática (%)	83 \pm 1,85 ^a	78,5 \pm 1,50 ^a	48,5 \pm 2,47 ^b
Morfologia espermática normal (%)	96,4 \pm 0,47 ^a	97,6 \pm 0,26 ^a	96,5 \pm 0,5 ^a

Valores expressos em média \pm SEM. ^{a, b} letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Student Newman Keuls ($P < 0,05$).

4.6. Atividade de enzimas antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo

No testículo dos animais expostos ao arsênio a 10 mg/L, a enzima antioxidante SOD, apresentou aumento significativo em relação aos animais do grupo controle e aos expostos a 1 mg/L ($P < 0,05$; Fig. 3). A atividade testicular de CAT, foi menor nos animais expostos ao arsênio (As1 e As10) quando comparados com os animais do grupo controle ($P < 0,05$; Fig. 3). Já os níveis de GST, apresentaram um aumento nos roedores que ingeriam as concentrações de arsênio testadas neste estudo comparados aos animais

controle ($P < 0,05$; Fig. 3). Os níveis do marcador de estresse oxidativo, óxido nítrico e de MDA no testículo não se alteraram nos grupos que receberam arsênio comparados ao grupo controle ($P > 0,05$; Fig. 4). Por outro lado, o conteúdo de proteína carbonilada no testículo aumentou no grupo As10 comparado aos demais grupos analisados ($P < 0,05$; Fig. 4).

Na região da cauda do epidídimo as enzimas antioxidantes SOD e GST, não sofreram alterações nos animais expostos ao arsênio, quando comparados com os animais do grupo controle ($P > 0,05$; Fig. 3). Já os níveis de CAT, apresentaram redução significativa nos animais dos grupos As1 e As10 em relação aos do controle ($P < 0,05$; Fig. 3). Os níveis dos marcadores de óxido nítrico, se mantiverem sem alterações na região da cauda do epidídimo ($P > 0,05$; Fig. 4). O conteúdo de proteína carbonilada sofreu aumento significativo em roedores que receberam 1mg/L de arsênio ($P < 0,05$; Fig. 4) comparados aos outros grupos analisados. No caso do marcador malondialdeído, apenas o grupo As10 exibiu níveis mais elevados, quando comparados com os outros grupos experimentais ($P < 0,05$; Fig. 4).

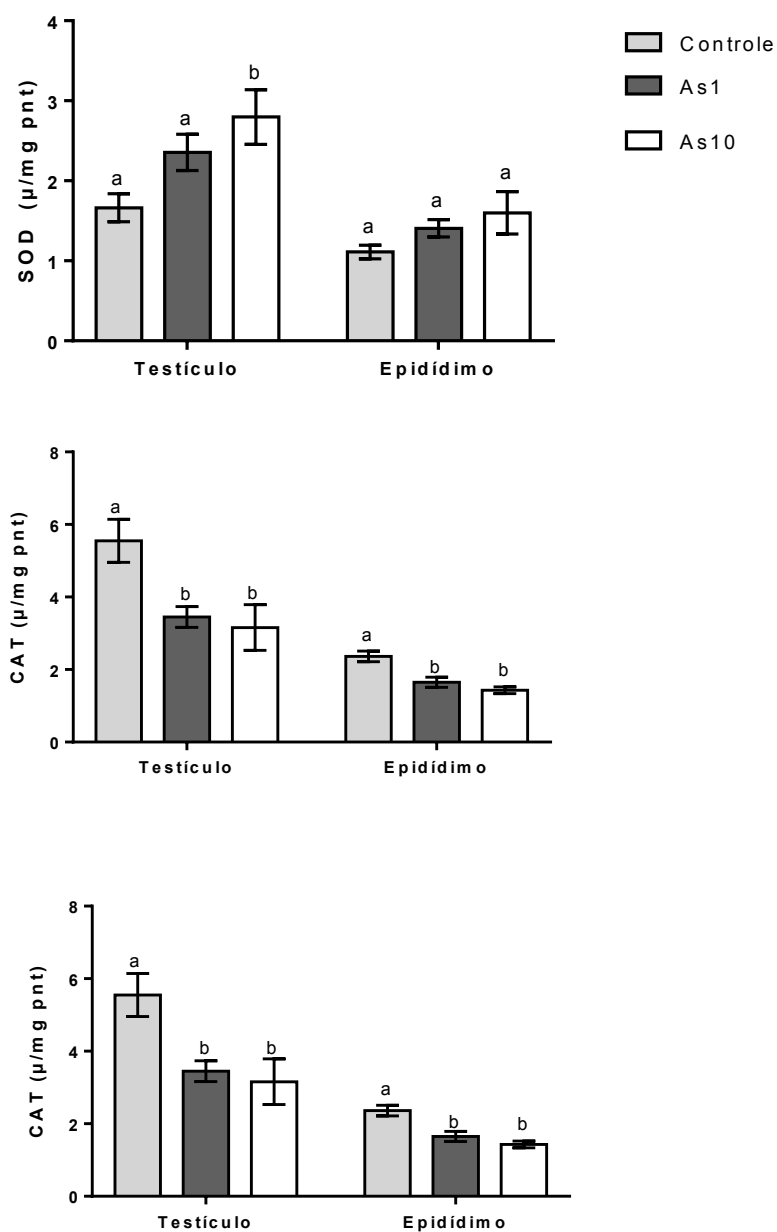


FIGURA 3: Atividade de enzimas antioxidantes relacionadas ao quadro de estresse oxidativo nos órgãos reprodutivos, testículo e epidídimo de ratos Wistar adultos expostos ao arsênio por 56 dias por meio da água potável. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GST: glutationa S-transferase. Modelos experimentais; controle; água potável; As1: 1 mg / L de arsenito de sódio; As10: 10 mg / L de arsenito de sódio. Média \pm SEM. a, b, cDiferentes letras indicam diferenças significativas entre as medidas pelo teste de Student Newman Keuls ($P < 0,05$).

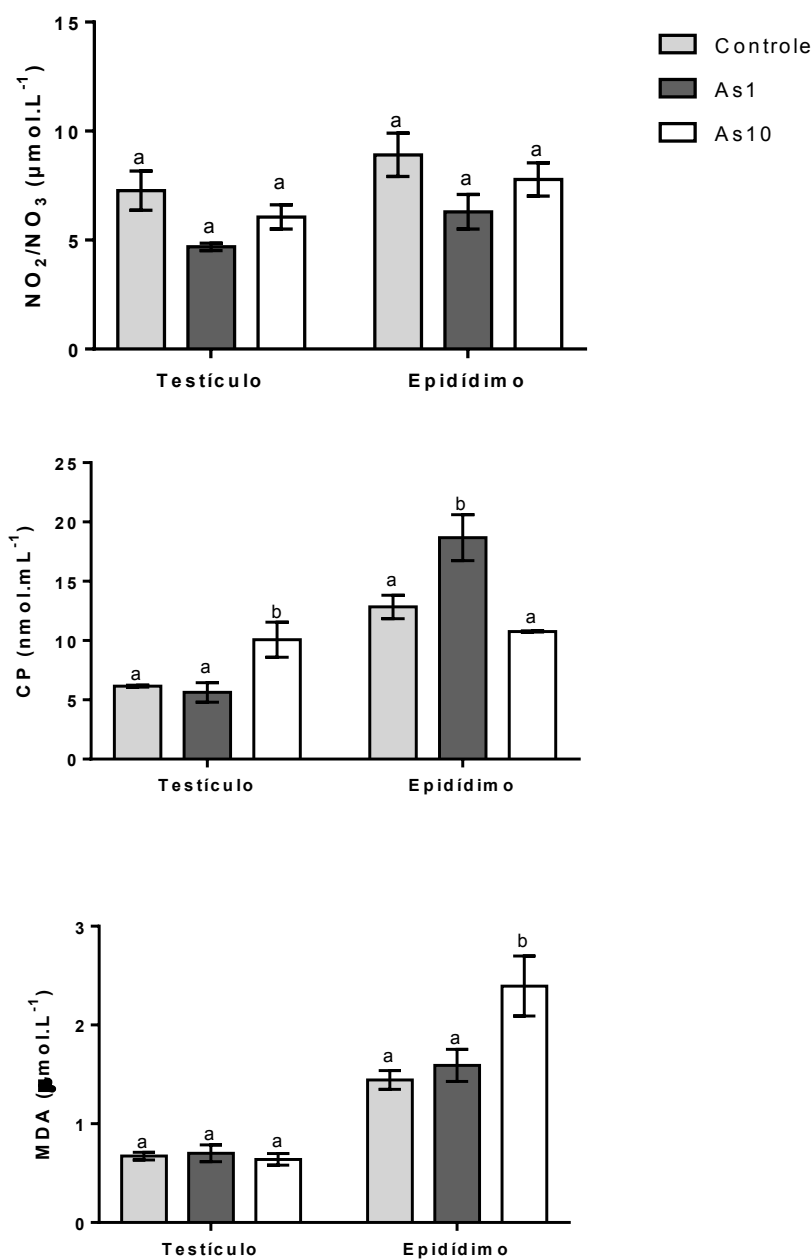


FIGURA 4: Níveis de marcadores relacionadas ao quadro de estresse oxidativo, nos órgãos reprodutivos testículo e epidídimo, de ratos Wistar adultos expostos ao arsênio de sódio por 56 dias por meio da água potável. Em NO₂NO₃: Nitrito e Nitrato; MDA: malondialdeído; CP: proteína carboniladas. Modelos experimentais; controle; água potável; As1: 1 mg / L de arsenito de sódio; As10: 10 mg / L de arsenito de sódio. Média ± SEM. ^{a, b, c}. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as medidas pelo teste de Student Newman Keuls (P < 0,05). A exposição ao arsênio durante 56 dias não foi capaz de induzir danos no DNA dos espermatozoides de ratos Wistar adultos.

Os espermatozoides coletados das três regiões epididimárias, cabeça, corpo e cauda não apresentaram fragmentações de DNA, tanto de animais controle quanto de animais expostos ao arsênio ($P > 0,05$; Fig. 5). A Figura 6 mostra os núcleos dos espermatozoides visualizados ao microscópio de epifluorescência.

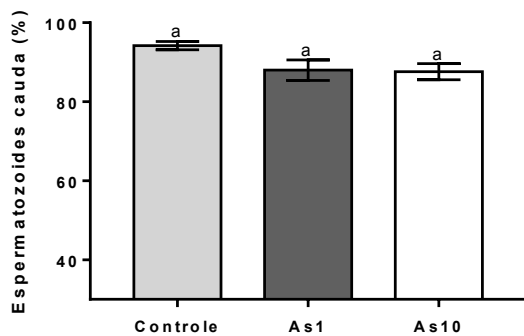
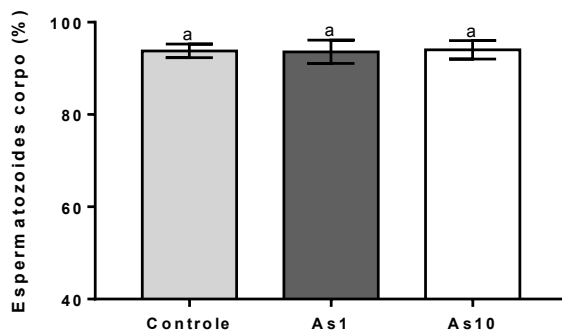
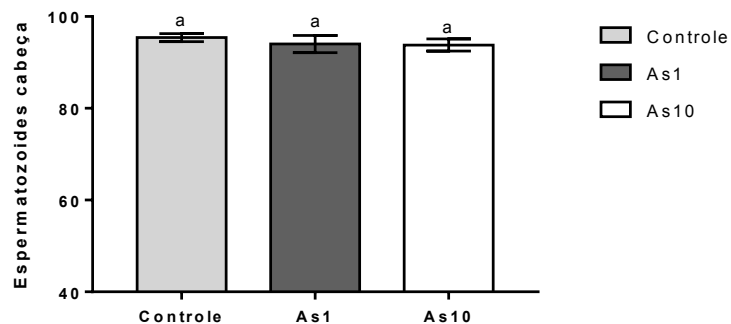


FIGURA 5: Integridade do DNA dos espermatozoides das regiões do epidídimo (cabeça, corpo e cauda); Controle água potável; As1: 1 mg / L de arsenito de sódio; As10: 10 mg / L de arseniato de sódio. Média \pm SEM. Sem diferenças significativas entre os modelos experimentais as medidas pelo teste de Student Newman Keuls ($P > 0,05$).

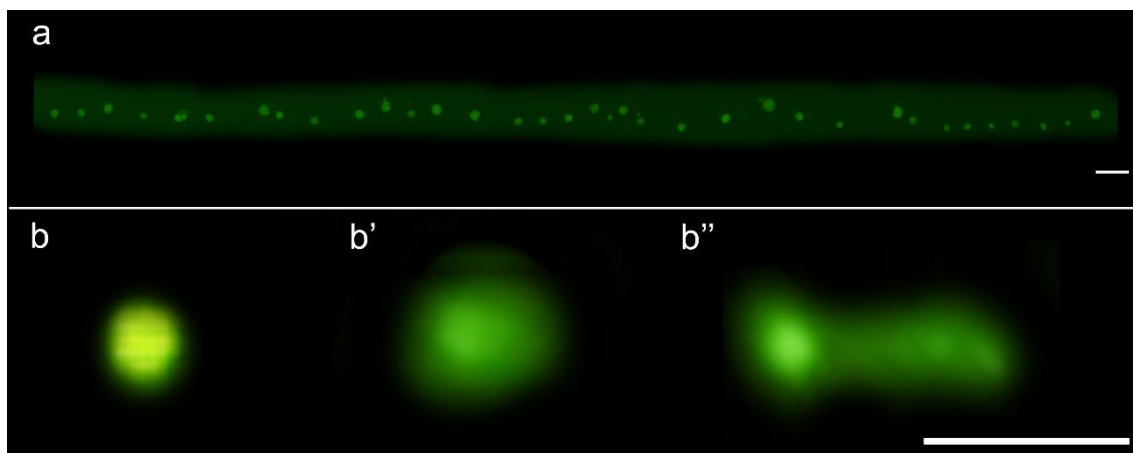


FIGURA 6: Representação da integridade e cometa no DNA dos espermatozoides expostos ao arsênio por 56 dias. a) Representação de uma amostra de núcleos corados com laranja de acridina; b) Núcleo íntegro; b') Núcleo apresentando sinais de danos no DNA; b'') Cometa. Controle água potável; As1: 1 mg / L de e 10: 10 mg / L de arsênio. Barra de escala = 10 μ m

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que animais expostos ao arsênio, na forma de arsenito de sódio por 56 dias, apresentaram alterações morfológicas e funcionais dependendo da concentração administrada. No geral, a histologia e a atividade de enzimas antioxidantes testiculares e epididimárias foram alteradas na presença do arsênio, com conseqüente dano em proteínas e lipídeos celulares. As concentrações de 1 e 10 mg/L de arsênio, no entanto, não foram capazes de alterar negativamente parâmetros biométricos, dosagem de testosterona sérica e morfometria testicular, nem causar danos morfológicos e de genotoxicidade nos espermatozoides epididimários. A motilidade espermática, porém, reduziu em animais expostos a 10 mg/L de arsenito de sódio.

No presente estudo, não é possível afirmar que os animais foram intoxicados pelo metaloide nas concentrações fornecidas, considerados os resultados do consumo de água de beber e peso corporal final. Além de não apresentarem nenhuma sintomatologia clínica. A toxicidade sistêmica de um metal pesado se reflete no ganho de peso dos animais durante o tempo de exposição (Sellers et al., 2007), bem como na redução da

ingestão de água. Por isso, o monitoramento desses parâmetros em ensaios toxicológicos fornecem dados importantes sobre as condições corporais e do metabolismo do animal, indicando se o agente tóxico exerceu ação direta ou acometeu órgãos alvo (Fernandes et al., 2007).

Outros parâmetros aqui avaliados que podem indicar que as concentrações de arsênio aqui administradas, no tempo de exposição previamente determinado, não foram tóxicas ao animal estão relacionadas ao peso dos órgãos reprodutores, como testículo, epidídimo, vesícula seminal e próstata. A pesagem dos órgãos reprodutores se faz necessária em animais sexualmente maduros, pois os pesos dos testículos podem refletir alterações nos túbulos seminíferos ou edema no espaço intersticial. Mudanças no peso dos epidídimos podem refletir em menor produção de espermatozoides pelos testículos e uma capacitação inicial espermática deficiente. As variações que podem ser encontradas nos pesos das vesículas seminais e próstatas sinalizam para que se busque entender a ação andrógenos e estrógenos (Sellers et al., 2007).

De fato, sabe-se que o arsênio pode atuar negativamente sobre a reprodução masculina de duas maneiras, por ação inibitória do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal ou por estresse oxidativo (Kim e Kim, 2015; Souza et al., 2019). No presente estudo, não podemos afirmar que a ação se deve pela primeira forma de atuação, devido a manutenção da concentração plasmática de testosterona nos animais expostos ao metaloide. Este resultado, influenciou os achados para peso absoluto e relativo dos órgãos andrógeno-dependentes avaliados, testículos, epidídimos e glândulas anexas. Resultados similares foram encontrados por (Souza et al., 2016) e (Lima et al., 2018) que administraram diferentes doses e formas de arsênio por 56 dias também na água de beber, num período de 56 dias.

Adicionalmente, a presença de testosterona circulante também foi capaz de manter a arquitetura testicular íntegra, com seus túbulos seminíferos bem característicos e seu espaço intersticial preservado. No presente estudo, também foi observada a manutenção de parâmetros morfométricos testiculares em animais expostos ao arsênio, como diâmetro tubular, diâmetro do lúmen e a altura do epitélio seminífero. Tanto o diâmetro tubular como diâmetro luminal dos túbulos seminíferos, podem ser indicadores da atividade espermatogênica, pois mudanças nessas dimensões podem relacionar-se com um processo de espermatogênese deficiente e em comprometimento da função testicular. Em animais sexualmente maduros e com produção hormonal tais dimensões não apresentam variações (França e Godinho, 2003; Russell et al., 1990; Scolfaro et al., 2003). Enquanto

a média da altura do epitélio seminífero, a partir do qual os espermatozoides são originados, auxilia na avaliação da produção espermática; se existe ou não, comprometimento da função testicular (Pintus et al., 2015).

Nos testículos, tanto a concentração 1 mg/L quanto a 10 mg/L foram capazes de induzirem alterações histopatológicas, como o surgimento de vacuolizações na base do epitélio seminífero, redução de espermatozoides, presença de células germinativas no lúmen, sendo que estes efeitos foram mais graves nos animais expostos à maior dose do metaloide. A vacuolização é uma das respostas morfológicas mais comuns apresentadas pelas células de Sertoli a injúrias iniciais de caráter reversível, mas que pode ser agravada caso o agente tóxico continue sendo fornecido ao longo do tempo, evoluindo para processos patológicos irreversíveis (Creasy, 2001). A presença de células germinativas no lúmen testicular indica um achado histopatológico importante, pois pode implicar em túbulos seminíferos compostos apenas por células de Sertoli e alterações no processo de espermatogênese (Creasy, 2001). A presença de vacúolos nas células de Sertoli também foi observada por Souza et al., (2016b) e Lima et al., (2018) quando expuseram ratos Wistar adultos por 56 dias a diferentes formas químicas e concentrações de arsênio.

A análise histopatológica do epidídimo revelou um epitélio bem preservado, sem nenhuma alteração morfológica no mesmo. Entretanto, observou-se redução de espermatozoides presentes no lúmen do ducto, ao longo das suas regiões (segmento inicial, cabeça e corpo) sendo o fenômeno mais acentuado nos animais que receberam a maior dose de arsenito de sódio. Tanto Souza et al., (2016a) como Morakinyo (2010), relataram menor produção espermática testicular por dia em animais expostos ao arsênio, o que se refletiu na quantidade destas células no epidídimo. A redução do número de espermatozoides encontrado aqui pode ser um reflexo do desequilíbrio antioxidante testicular, uma vez que os níveis de SOD e CAT aumentaram, na tentativa de proteger o órgão dos espécies reativas geradas pela presença do elemento. Contudo, os níveis de CAT reduziram, indicando exaustão da atividade enzimática o que implica em falhas na neutralização dos danos oxidativos, que se refletiram no aumento de CP, apontando para lesões em proteínas testiculares em decorrência do quadro oxidativo gerado, sendo isto, uma possível causa das vacuolizações e a presença de células germinativas no lúmen. No epidídimo, a atividade de SOD e GST mantiveram-se ativas, trabalhando para neutralização dos espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, mas houve exaustão dos níveis de CAT e conseqüentemente aumento de marcadores da peroxidação lipídica e proteína carbonilada. Apesar dos níveis dos marcadores aumentados, a arquitetura

epitelial do órgão não foi afetada, contudo eles sugerem, que caso a exposição continuem por um período maior que 56 dias, tal arquitetura poderia ser afetada devido a contínuo dano oxidativo gerado em proteínas e fosfolípidios destas células, tendo implicações para a maturação dos espermatozoides.

As desregulações nas atividades enzimáticas indicam a presença de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, pois são enzimas chaves no combate aos subprodutos de geração destes espécies. O aumento da atividade de GST testicular relaciona-se com o processo de metabolização e detoxificação promovida pela exposição ao metal, minimizando as complicações morfofuncionais aqui avaliadas. Já o aumento de SOD no órgão pode estar relacionado com o combate inicial de H_2O_2 . Por outro lado, a queda de CAT tanto nos testículos como na cauda do epidídimo, indica o aumento de espécies reativas nos órgãos devido a falhas na biotransformação do H_2O_2 em moléculas de água e oxigênio. A permeância peróxido de hidrogênio na célula, por sua vez, relaciona-se com o aumento dos níveis de proteínas carboniladas. Sendo este um dano que implica em desregulações nas funções reprodutivas tanto dos testículos quanto dos epidídimos, por promover perda de enzimas e proteínas necessárias para o sucesso da função reprodutiva, como o ganho de motilidade (Aryal et al., 2013; Spiazzi et al., 2013; Manna et al., 2008a; Chang et al., 2007). Os níveis aumentados de malondialdeído, fazem referência ao aumento da peroxidação lipídica na cauda do epidídimo, refletindo em possível inversão da fluidez da membrana biológica das células do órgão, desagregação de grandes complexos enzimáticos, e queda na capacidade seletiva da bicamada lipídica (Ighodaro et al., 2018; Vaca et al., 1988; Reddy et al., 2011). De acordo com Dias (2018) os metais pesados podem promover danos funcionais antes mesmo de acarretarem, mudanças estruturais nos tecidos. Pensa-se que por isso, somado a atividade de GST e SOD aumentada, não foram encontrados os achados histopatológicos severos e mudanças nos padrões morfométricos testiculares pelo tempo de exposição testados.

A concentração de malondialdeído aumentada na cauda do epidídimo e possivelmente gerada pela presença de peróxido de hidrogênio em excesso na célula, se relacionando assim, com a queda da motilidade espermática encontrada nos animais que receberam a maiores doses de arsenito de sódio. Acredita-se que H_2O_2 , pode afetar a enzimas vitais nos espermatozoides, resultando em diminuição da motilidade espermática (Makker et al., 2009). A presença de ácidos graxos poli-insaturados compoem a membrana plasmática dos espermatozoides, os tornam células muito sensíveis a peroxidação lipídica, que é uma resposta a formação de espécies reativas ao oxigênio e

pode ser apontado, também, como um fator responsável pela redução da motilidade espermática (Lenzi et al., 1996). Alguns autores relataram a capacidade do metal se ligar com alta especificidade a tubulina, por meio dos seus grupos tiols e interromper a dinâmica dos microtúbulos flagelar, resultando e queda da motilidade dos espermatozoides. (Li et al., 1999). As concentrações de peróxido de hidrogênio e os subprodutos gerados pelo dano oxidativo, nos animais que receberam 1mg/L de arsenito de sódio, não devem ter sido suficientes, para desregular os mecanismos de motilidade espermática, pelo período de tempo testado neste experimento. É relatado que o quadro de estresse oxidativo, mediado pelas reações dos radicais livres, acarretam em um aumento de espermatozoides com cabeças anormais (Momeni e Eskandari, 2012). O que não aconteceu nos animais deste experimento pois, possivelmente, as concentrações de 1 e 10 m/L não geram espécimes reativas de oxigênio e nitrogênio suficientes para se ligarem a cromatina e induzir anormalidades morfológicas por 56 dias de tratamento. Outro fator que pode ter favorecido a ausência de anormalidades espermáticas, seriam os níveis de GST aumentados no testículo indicando a biotransformação do metal em suas formas menos tóxicas (Momeni e Eskandari, 2012). As análises de morfologia e motilidade dos espermatozoides, são componentes chaves nos estudos voltados para toxicologia reprodutiva masculina, pois são marcadores da espermatogênese, já que se relacionam com a produção destes, pelos testículos e maturação pelo epidídimo, fornecendo informações sobre a fisiologia e/ou patologias nos órgãos (Morakinyo et al., 2010).

É relatado que a exposição ao arsênio pode induzir a quebras de DNA por meio de reações mediadas por radicais livres (Morakinyo et al., 2010). A fragmentação no DNA espermático, das diferentes regiões do epidídimo, foi avaliada nesse estudo por meio do ensaio cometa e não apresentou diferenças entre os grupos experimentais. O reparo do DNA é o processo que está ativo durante a produção dos espermatozoides (Aitken et al., 2011). A fosforilação da proteína histona H2Ax, combinada com a ativação das polimerases poli (ADP-ribose) e ação de glicosilases e nucleases, atuam como um sistema que visa reparar e neutralizar as fragmentações nucleares das células espermáticas (Aitken et al., 2011; Flora et al., 1990; Ighodaro et al., 2000).

Assim, acredita-se que o estresse oxidativo, causado pelo metal não foi capaz de promover lesão, quanto a fragmentação do DNA espermático, devido a eficiência do sistema de reparo que provavelmente manteve-se suas taxas de atuação altas, durante o processo de produção destas células. Quando se pensa em espermatozoides maduros,

acredita-se que os radicais livres gerados nesse experimento em decorrência da ingestão de 1mg e 10 mg/L por 56 dias não conseguem exercer efeitos tóxicos que culminem em danos oxidativos ao DNA dos espermatozoides. Outro fator que pode ter protegido o DNA espermático da ação oxidante do metal é a secreção das células do epidídimo, que secretam enzimas antioxidantes como a glutatina peroxidase 5 (GPx5) no ambiente luminal do órgão, protegendo estas células do dano oxidativo no DNA.

Os níveis de nitros e nitratos não se alteram após a exposição ao arsênio neste trabalho, indicando que a produção de óxido nítrico nos testículos e na região da cauda dos epidídimos, estão dentro das condições fisiológicas esperadas, o que pode ter contribuído para condições patológicas menos severas. Estudos relatam, que em concentrações baixas o óxido nítrico, desempenha um papel importante na regulação, na quantidade e na função das células de Sertoli e Leydig, apoiando os processos de diferenciação das células germinativas (Auharek et al., 2011). Participam também do controle da função testicular, via a ação no eixo-hipotalâmico-gonadal, estimulando a produção hormonal. No epidídimo, a ausência ou excesso de óxido nítrico pode desregular o ambiente luminal adequado, gerando danos oxidativos em proteínas necessárias para maturação e capacitação espermática inicial que ocorre no órgão (Zini et al., 1996).

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados indicaram que as concentrações de 1 e 10 mg/L de arsênio desregularam a atividade de enzimas antioxidantes e acarretaram no aumento de alguns marcadores de danos oxidativos no testículo e no epidídimo de ratos Wistar adultos. O metaloide foi capaz de induzir perda de motilidade espermática, mas sem trazer prejuízos, para a morfologia ou a estrutura do DNA dos espermatozoides. Alterações histopatológicas, doses dependentes surgiram após o tempo de exposição, sem alterar os parâmetros morfométricos, biométricos e os níveis de testosterona. O conjunto desses dados, sugerem, que a toxicologia do metal é exercida pelo quadro de estresse oxidativo. Contudo, são necessários, mais estudos e ensaios para que se entenda, por exemplo, quais proteínas, enzimas, lipídios e/ou vias de sinalização, sofrem lesões pela ação do metal e quais as suas implicações, para os parâmetros morfofuncionais dos testículos, epidídimo e dos espermatozoides.

7. REFERÊNCIAS

Abernathy, C. O., 1999. Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environmental health perspectives*. 593–597.

Aitken, R., 1997. Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Molecular Human Reproduction*. 169–173.

Aitken, R. J., 2011. The Capacitation-Apoptosis Highway: Oxysterols and Mammalian Sperm Function. *Biology of Reproduction*. 9–12.

Aitken, R. J., Jones, K. T., Robertson, S., A. 2012. Reactive Oxygen Species and Sperm Function--In Sickness and In Health. *Journal of Andrology*. 1096–1106.

Aitken, R. J. Koppers, A. J., 2010. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa Asian. *Journal of Andrology*. doi.org/10.1038/aja.2010.68

Akinola, O. B., 2016. Combined effects of chronic hyperglycaemia and oral aluminium intoxication on testicular tissue and some male reproductive parameters in Wistar rats. *Andrologia*. 779–786.

Akter, K., F., 2006. Arsenic speciation and toxicity in biological systems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicolog*. 97–149.

Aryal, B.; Jeong, J.R.A.O., 2013. Doxorubicin-induced carbonylation and degradation of cardiac myosin binding protein C promote cardiotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1–6.

Auharek, S. A., Avelar, G. F., Lara, N. L. Sharpe, M. R. M., França, L. R., 2011. Sertoli cell numbers and spermatogenic efficiency are increased in inducible nitric oxide synthase mutant mice. *International Journal of Andrology*. 1-9.

Baker, D.E., Chesnin, L. 1975. Chemical monitoring of soils for environmental quality and animal and human health. 305-374.

Ballachey, B. E., Hohenboken, W. D., Evenson, d., P. 1987. Heterogeneity of Sperm Nuclear Chromatin Structure and its Relationship to Bull Fertility. *Biology of Reproduction*, 915–925.

Barbosa, K. B. F., Neuza, M.B.C., Rita., C. G.A., Sérgio., O.P., Valéria., P. R. M., Josefina, B., 2010. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*. 629–643.

Brito, L. F. C. . 2007. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*. 249–264.

Chang, S.I. Jin, B., Youn, P., Parque, C., Parque, J.D., Ryu, D. Y., 2007. Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 196–203,

Chiou, T.J., Chu, S.T., Tzeng, W.F., Huang, Y.C., Liao, C. J., 2008. Arsenic Trioxide Impairs Spermatogenesis via Reducing Gene Expression Levels in Testosterone Synthesis Pathway. *Chemical Research in Toxicology*. 1562–1569

Costa, D. S., 2017. Espermatogênese em mamíferos.

Creasy, D. M., 2001. Pathogenesis of Male Reproductive Toxicity. *Toxicologic Pathology*, 64–76,

Silva, R.F., Borges, C.D.S, Almeida-Lamas, C., Cagnon, V. H. A., Kempinas, W., 2017. Arsenic trioxide exposure impairs testicular morphology in adult male mice and consequent fetus viability. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1166–1179.

Davies, K. J. A., Davies, 2000. antioxidant defenses. 279–289

Flora, S., Bagnasco, H. Serra, D. Zanicchi, P., 1990. Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. 99–172.

Kempinas, G. W., Klinefelter, G. R., . 2014. Interpreting histopathology in the epididymis. *Spermatogenesis*. 97911-97912.

Dias, F. C. R. 2000. Extrato Hidroalcoólico Da Raiz De *Pfaffia Glomerata* (Spreng.) Pedersen Interfere Em Parâmetros Reprodutivos E Fertilidade De Camundongos Machos Adultos. 2018.

DIETERICH, S. et al. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart. *Circulation*. 33–39.

Lima, D. G., D., 2013. Fertilidade E Morfofisiologia Epididimária De Ratos Wistar Submetidos a Ingestão De Arsenato E Arsenito De Sódio.

Duydu, Y., Basaran, N., Stundag, A. U. Aydın, S., Undeger, U., Ataman, Osman. Y., Aydos, K. Duker, Y., Ickstadt, K. Waltrup, B. S., Golka, K., Bolt, H. M. 2012. Assessment of DNA integrity (COMET assay) in sperm cells of boron-exposed workers. *Archives of Toxicology*. 27–35.

Fernandes, G. S, Arena, A. C., Fernandez, C. D., Mercadante, A.. Barbisan, L.F., Kempinas, W.G., 2007. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reproductive Toxicology*. 106–112.

Filho, C. D., 2016 Teores De Metais Pesados Em Alguns Solos Do Estado Do Ceará Fortaleza 67.

França, L. R., Godinho, C. L., 2003. Testis Morphometry, Seminiferous Epithelium Cycle Length, and Daily Sperm Production in Domestic Cats (*Felis catus*). *Biology of Reproduction*. 1554–1561.

Gonzalez, F. H. D., 2002. Introdução a endocrinologia veterinária. 87

Graeme, K. A., 1988. Selected Topics : Toxicology heavy metal toxicity , part i : arsenic and mercur. *The Journal of emergency medicine*. 45–56.

- Habig, W. H., Pabst, M. J., jakoby, W. B., 1974. Glutathione S-transferases The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of biological chemistry*. 7130-7139.
- Hei, T. K., Filipic, M. Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic. *Free Radical Biology and Medicine*, 574–581. 2004.
- Holstein, A. F., Schütte, B., Becker, H., Hartmann, M., 1987. Morphology of normal and malignant germ cells. *International Journal of Andrology*, 1–18.
- Hsieh, F.I., Hwang, T.-S., Hsieh, Y.C., Lo, H.C., Chien, T.S., Shing, H.H. Chen, H.Y.C.J., 2008. Risk of erectile dysfunction induced by arsenic exposure through well water consumption in Taiwan. *Environ. Health Perspect.* 532-536.
- Huber, P.C., W, P. A. 2008. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Revisão*. 1170–1179.
- Ighodaro, O. M., Akinloye, O. A. 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*. 287–293.
- Inaba, K., Mizuno, K. 2016. Sperm dysfunction and ciliopathy. *Reproductive Medicine and Biology*, 77–94.
- Jana, K., Jana, S., Samanta, P. K. 2006. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: Possible an estrogenic mode of action. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1–13,
- Järup, L., 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*. 167–182, 2003.
- Johnson L., Varner, D.D., Roberts, M.E, Smith, T.L., Keillor, G.E, Scrutchfield, W.L., Efficiency of spermatogenesis: A comparative approach. *Animal Reproduction Science*. 471–480.
- Jomova, K., Jenisova, Z., Feszterova, H., Baros, S. Liska, J., Hudecova, D., Rhodes, C.J., Valko, M., 2011. Toxicity, oxidative stress and human disease. *Journal of Applied Toxicology*. 95–107.
- Khatun, A., Rahman, M. S., Pang, M.G., 2018. Clinical assessment of the male fertility. *Obstetrics & Gynecology Science*, 179-191.
- Kim, Y.J., Kim, J.M., 2015. Arsenic Toxicity in Male Reproduction and Development. *Development & Reproduction*, 167–180.
- Lenzi, U., Picardo, H., Gandini, G., Dondero, F., 1996. Lipids of the sperm plasma membrane: From polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Human Reproduction Update*. 246–256.

- Li, Y. M., Broome, J. D., 1999. Arsenic targets tubulins to induce apoptosis in myeloid leukemia cells. *Cancer Research*.776–780
- Lima, G. D. A., Sertório, M. N., Souza, A. C. F., Menezes, T. P., Mouro. V.G.S., Gonçalves, N. M., Oliveira, J. M., Henry, M., Henry, M., Machado-Neves, M., 2018. Fertility in male rats: Disentangling adverse effects of arsenic compounds. *Reproductive Toxicology*.130–140.
- Liu, Z., Shen, J., Carbrey, J. M., Mukhopadhyay,R., Agre, P., Rosen, B. P., 2002. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 6053–6058.
- Maia, M., Bicudo, S., 2009. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 183–193.
- Makker, K., Agarwal, A., Sharma, R., 2009. Oxidative stress & male infertility. *Indian Journal of Medical Research*.357–367.
- Manna, P., Sinha, M., Sil, P. C., 2008.Cadmium induced testicular pathophysiology: Prophylactic role of taurine. *Reproductive Toxicology*.282–291.
- Massa, M.J., Tennant, A., Roop, B.C., Cullen, W.R., , Styblo, M., Thomas, D.J., Kligerman, A.D., 2001.Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chemical Research in Toxicology*.355–361.
- Momeni, H. R., Eskandari, N., 2012.Effect of vitamin E on sperm parameters and DNA integrity in sodium arsenite-treated rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*.249–256.
- Morakinyo, A. O., Achema, P. U., Adegoke, O. A., 2010. Effect of Zingiber Officinale (Ginger) on Sodium Arsenite- Induced Reproductive Toxicity in Male Rats. *Afr. J. Biomed*. 39–45.
- NG, J. C., WANG, J., Shraim, A. A., 2003.global health problem caused by arsenic from natural sources. *Chemosphere*.1353–1359.
- Nie, J. S., Pei, Q. L., Han, G., Xu, J. X., Mu, J. J., 2006.Semen quality decreased by inorganic arsenic. *J Environ Occup Med*.189-190.
- Niño, M.S., Nava, L., Jimenez, J., Betancourt, N., Alcaraz, R., Sambrano, O., Moran, J.M.,
Olivas, E., 2016. Genotoxic damage in sperm cells from Long–Evans rats exposed to arsenic and its relationship with poor quality sperm. *Toxicology Letters*. 236–S237. 2016.
- Noblanc, A., Soubeyrand D., Karrich, C. Henry-Berger, B., Cadet, J., Saez, R., Guiton, F., Janny, R., Pons-Rejraji, L., Alvarez, H., Drevet, J. G., Kocer, J. R., A., 2013.DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected? *Free Radical Biology and Medicine*. 719–723.
- Olive, P. L., Banáth, J. P., 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in

individual cells. *Nature Protocols*. 23–29.

Olson, G. E., Nagdas, S. K., Winfrey, V. P., 2002. Structural Differentiation of Spermatozoa During Post-Testicular Maturation. In: *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. 371–387.

Pant, N., Murthy, R. C., Srivastava, S. P., 2004. Male reproductive toxicity of sodium arsenite in mice. *Human & Experimental Toxicology*. 399–403.

Picut, C. A., Remick, A. K., 2017. Impact of Age on the Male Reproductive System from the Pathologist's Perspective. ***Toxicologic Pathology***, v. 45, n. 1, p. 195–205.

Pintus, E., Ros-Santaella, J. L., Garde, J. J., 2015. Beyond testis size: Links between spermatogenesis and sperm traits in a seasonal breeding mammal. *PLoS ONE*. 1–19.

Ratnaike, R. N., Acute and chronic arsenic toxicity. 2003. *Postgrad Medical Journal*. 91–396.

Reddya, P. S., Rania, G. P., Sainatha, S. B., 2011. Meena, R., Supriyaa, Ch., Protective effects of N-acetylcysteine against arsenic-induced oxidative stress and reprotoxicity in male mice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 247–253.

Rodrigues, A. S. L., Malafaia, G., 2010. A importância dos estudos sobre a contaminação por arsênio na saúde pública. *SaBios: Rev. Saúde e Biol*. 34–38.

Robaire, B., Hinton, B. T., 2015. The Epididymis. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 691–771.

Russell, L. D., Ren, H. P., HIKIM, I. S., SCHULZE, W., HIKIM, A. P. S. A., 1990. Comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the sertoli cell. *American Journal of Anatomy*. 21–30.

Russell, L. D., Robert A. E., Amiya P., Hikim, S. E. D. C., 1993. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. *International Journal of Andrology*. 83–83.

Scolfaro, M. R., Cardinalli, I. A., Guerra Júnior, G., 2003. Gonadal dysgenesis and morphometric histologic analysis. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2003.

Selene, C. H., Chou, J., Rosa, C. T., 2003. Case studies – Arsenic. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 381–386.

Sellers, R.S., Morton, D. Michael, B. Roome, N. Johnson, J.K., Yano, B.L., Perry, R., Schafer, K., 2007. Society of Toxicologic Pathology Position Paper: Organ Weight Recommendations for Toxicology Studies. *Toxicologic Pathology*. 751–755.

Silva, R. F., Borges, C.B., Lamas, C. A., Cagnon, V.H., Kempinas, W.G., 2017. Arsenic trioxide exposure impairs testicular morphology in adult male mice and consequent fetus viability, *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1166–1179,

Sharma, B., Singh, S., Siddiqi, N. J., 2014. Biomedical implications of heavy metals induced imbalances in redox systems. *BioMed Research International*.

Shen, H., Ong, C. 2000. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radical Biology and Medicine*. 529–536.

Sostaric, E. Aalberts, M., Gadella, B.M., Stout, T. A., 2008. The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Animal Reproduction Science*. 237–248.

Souza, A. C. F., Sarah, C. M., Ferraz, R. P., Lima, G. D. A., Oliveira, J. A., Machado-Neves, M., 2016a. Effects of sodium arsenate and arsenite on male reproductive functions in Wistar rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*. 274–286.

Souza, A.C.F., Marchesi, S.C., Lima, D. A.G., Ferraz, R.P., Santos, F.C., Matta, S.L.P., Machado-Neves, M., 2016b. Effects of Sodium Arsenite and Arsenate in Testicular Histomorphometry and Antioxidants Enzymes Activities in Rats. *Biological Trace Element Research*. 354–362,

Souza, A. C. F., Sarah, C. M., Ferraz, R. P., Lima, G. D. A., Oliveira, J. A., Machado-Neves, M., 2016c. Effects of sodium arsenate and arsenite on male reproductive functions in Wistar rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*. 274–286.

Souza, A.C.F., Bastos, D.S.S., Sertório, M.N., Santos, F.C., Ervilha, L.O.G., Oliveira, L.L., Machado-Neves, M. 2019. Combined effects of arsenic exposure and diabetes on male reproductive functions. *Andrology*. 730–740.

Souza, J.M.O., Maria, F. H., Paulellia, C. A., Denise, G. Júnior, A. M. M., Júnior, F. B., Batista, B. B. L., 2014. Arsenic and rice: toxicity, metabolism, and food safety. *Química Nova*, 118–127.

Spiazzi, C.C., Manfredini, V., Barcellos, S. F.E, Flores, E.M., Izaguirry, A.P., Vargas, L.M., Soares, M.B, Santos, F.W., 2013. γ -Oryzanol protects against acute cadmium-induced oxidative damage in mice testes. *Food and Chemical Toxicology*. 526–532.

Tsikis, D., 2007. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography*. 51–70.

Vaca, C. E., Wilhelm, J., Harms-Rringdahl, M., 1988. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. 137–149.

Vincent, H. K., Innes, K. E., Vincent, K. R., 2007. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 813–839,

Visconti P.E., Krapf, D., Vega-Beltrán, J.L., Acevedo, J. J. D., 2011. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian Journal of Andrology*. 395–405.

Wang, A., Holladay, S.D., Wolf, D.C., Ahmed, S.A., Robertson, J.L., 2006. Reproductive and developmental toxicity of arsenic in rodents: A review. *International Journal of Toxicology*, 319–331.

Zinco, C. E., 2014. Importância médico-legal dos metais essenciais : Dissertação de Mestrado em Medicina Legal “ Importância Médico-Legal dos Metais Essenciais : Cobre e Zinco . ”

Zini, A. Moira K., O'Bryan, Margret S., Magid, Peter, N., 1996. SchlegelImmunohistochemical Localization of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Human Testis, Epididymis, and Vas Deferens Suggests a Possible Role for Nitric Oxide in Spermatogenesis, Sperm Maturation, and Programmed Cell Death1. *Biology of Reproduction*. 935–941.

Zitnanová, I. Sumegová, K. Simko, H. Maruniaková, U. Chovanová, Z. Chavko, H. Duracková, Z., 2007. Protein carbonyls as a biomarker of foetal-neonatal hypoxic stress. *Clinical Biochemistry*. 567–570.

Zubair, M., Ahmad, M., Qureshi, Z. I., 2017. Review on arsenic-induced toxicity in male reproductive system and its amelioration. *Andrologia*. 1–8.