

GRAZIELA DOMINGUES DE ALMEIDA LIMA

**FERTILIDADE E MORFOFISIOLOGIA EPIDIDIMÁRIA DE RATOS WISTAR  
SUBMETIDOS A INGESTÃO DE ARSENATO E ARSENITO DE SÓDIO**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013**

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

T

L732f  
2013  
Lima, Graziela Domingues de Almeida, 1981-  
Fertilidade e morfofisiologia epididimária de ratos Wistar  
submetidos a ingestão de arsenato e arsenito de sódio / Graziela  
Domingues de Almeida Lima. – Viçosa, MG, 2013.  
ix, 49 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Mariana Machado Neves.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Rato - Reprodução. 2. Rato - Histologia. 3. Arsênio.  
4. Espermatozoides. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

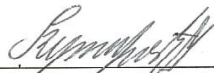
CDD 22. ed. 599.352

GRAZIELA DOMINGUES DE ALMEIDA LIMA

**FERTILIDADE E MORFOFISIOLOGIA EPIDIDIMÁRIA DE RATOS WISTAR  
SUBMETIDOS A INGESTÃO DE ARSENATO E ARSENITO DE SÓDIO**

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: 30 de julho de 2013.



Izabel Regina Santos Costa Maldonado



Marc Roger Jean Marie Henry



Mariana Madhado Neves  
(Orientadora)

## **Maria, Maria**

(M. Nascimento / F. Brant)

“Mas é preciso ter força  
É preciso ter raça  
É preciso ter gana sempre  
Quem traz no corpo a marca  
Maria, Maria  
Mistura a dor e a alegria

Mas é preciso ter manha  
É preciso ter graça  
É preciso ter sonho sempre  
Quem traz na pele essa marca  
Possui a estranha mania  
De ter fé na vida.”

“Aquele que estuda a forma como as coisas se originaram e passaram a existir, quer se trate do estado ou de qualquer outra coisa, terá delas a mais bela visão.”

Aristóteles

**Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais, aos meus irmãos e a uma menina de seis anos de idade que um dia sonhou em ser cientista.**

Meu filho, escute a disciplina de seu pai, e não despreze o ensinamento de sua mãe, porque serão para você uma coroa formosa na cabeça e um colar no pescoço.

Provérbios 1, 8-9

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pelo privilégio de dedicá-la ao estudo e admiração de sua criação e por me ajudar a superar e aprender com as dificuldades.

Viver esta experiência de forma verdadeiramente plena não seria possível sem o companheirismo, parceria, colaboração, amizade e ensinamentos de pessoas que humildemente eu agradeço.

Ao professor Marc Henry, por aceitar participar da banca e pelo tempo disponibilizado na correção deste trabalho e arguição.

À professora Izabel Regina Santos Costa Maldonado pelo tempo dedicado na correção deste trabalho e arguição e por me ensinar que ninguém faz nada sozinho (a).

Ao professor Juraci Alves de Oliveira, pela disponibilização de equipamentos e laboratório, pelos ensinamentos e pelo tempo dedicado na correção deste trabalho.

À professora Mariana Machado Neves, pela amizade, orientação, apoio, confiança e companheirismo. Mari, ter conhecido a histologia por meio de você fez toda a diferença. Obrigada por me mostrar com alegria e entusiasmo como é maaaaaaravilhoso o que fazemos e, além de tudo, que sempre é possível melhorar.

Ao professor Sérgio Luis Pinto da Matta, pela amizade, ensinamentos e ajuda incondicional, por me ensinar como é importante dedicarmos 100% de nossa atenção ao que fazemos e por me mostrar que “saber vender bem o peixe” é uma arte e pode mudar o rumo dos acontecimentos. Valeu Sérgio!

Aos professores, discentes e responsáveis técnicos do Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica e Cirurgias Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais), Laboratório de Reprodução do Departamento de Zootecnia (UFV), Laboratório de Biofísica (UFV), Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros e Laboratório de Sistemática Molecular (UFV).

Aos professores do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV, Clóvis, Adilson e Juliana pela colaboração e ensinamentos.

Aos professores da Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pelos ensinamentos e profissionalismo.

Aos meus amados pais, Rosélia e Edmar, por serem meus olhos nos momentos de minhas cegueiras e meu conforto nos momentos de provação.

Aos meus amados irmãos, Aline, Ícaro e Rodrigo, pelo apoio, incentivo e por sempre acreditarem que eu era capaz.

Aos meus familiares, por torcerem por mim e entenderem minhas ausências.

Ao meu amado Emerson, por colorir a minha vida, por me fazer sempre sorrir, por me permitir amá-lo.

Às minhas amigas e companheiras de república e de vida, Gilda, Natália, Priscila e Tatiana. Obrigada meninas pela amizade sempre desafiadora, pelo companheirismo e apoio, pelos momentos de diversão e alegria e pelos momentos de dificuldades que muito me inspiraram e construíram. De forma especial a Gilda, por me ensinar que em determinados momentos a objetividade é o melhor caminho e por sempre estar disposta a longas reflexões, a Natália, por me mostrar que o silêncio e a disciplina são uma arte, a Priscila, por me mostrar que é possível, com simplicidade e elegância, realizar um trabalho de sucesso. E a minha amiga Tatiana, pelos pratos culinários deliciosos, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos e principalmente, por me incentivar a embarcar nesta “enrascada” : ). Caminhar ao lado de vocês nesta estrada foi um presente de Deus.

À amiga Lisa, pela amizade e ensinamentos que muito me ajudaram a crescer. “Maria”, obrigada por caminhar ao meu lado em momentos decisivos e pela ajuda e contribuição ao meu trabalho. Sua amizade foi uma feliz “coincidência” do destino.

Às amigas, Paola, Ednalva e Ângela (Beré) por sempre torcerem por mim.

Às amigas, Jerusa, Viviane, Suzana, Camila e Geisla pela amizade, apoio e ajuda em todos os momentos.

À amiga Petronilha e família, pelo carinho, amizade e torcida.

Aos padrinhos Wanda e Zoca, e aos irmãos Samuel e Shara Tereza, pelo carinho, apoio e parceria na estrada da vida.

Ao padre Jorge Abdala (*in memoriam*), por me ensinar por meio de seu testemunho, que na vida é sempre necessário manter a coragem e a resistência.

Aos meus alunos da APAC, pelos ensinamentos de vida.

Ao professor Casali, por ser o primeiro a me acolher em Viçosa e na UFV, por cuidar da minha saúde e pelos ensinamentos.

À professora Marlúcia da Rocha e Silva, por ter me apresentado a biologia celular, deste momento em diante eu tive certeza de que a biologia era minha escolha de vida.

A todos os professores do Centro Universitário do Leste de Minas Gerais, por contribuírem na minha formação.

Ao professor Leonardo Lopes Bhering pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos meus companheiros do grupo de reflexão, pela amizade e por me acolherem com carinho em suas vidas.

À Fabrícia de Souza Predes, por me ensinar a técnica de trânsito epididimário e por sempre responder prontamente as minhas perguntas.

À Fernanda Farnese, pela ajuda no preparo das soluções e pelos ensinamentos.

À Cristiane e Regiane, pela ajuda e dicas na descontaminação das vidrarias e descarte de soluções.

À Ana Cláudia, pela parceria ao longo da realização deste trabalho e ao Marcinho pela ajuda.

Ao “Seu” Ivo, pela amizade e carinho e ao Charrão, por não me deixar esquecer que “a luta continua companheiro”.

Ao Carlos (Carlinhos), pela ajuda na digestão das amostras e ao Monteiro, por sempre tirar meu “pai da força” quando faltava algum reagente ou equipamento.

À Carmen, funcionária do hospital veterinário da UFV, por sempre me atender com carinho e atenção.

Aos companheiros de laboratório e disciplinas: Marli, Suellen, Kyvia, Daiane, Alex, Matheus, Maytê, Marta, Carol Torres, Ana Paula, Bruna Moraes, Rômulo, Mariana Moraes, Michele, Bruno Edésio, Stephanie, Mário, Dani, Juliana, Glenda, Helen, Kenner, Ítalo, Bárbara, Willerson, e Vítor pela convivência durante estes anos.

À professora Fernanda e aos colegas do curso de plantas medicinais e homeopatia.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Geral, por me tratarem sempre com carinho e atenção. Em especial à Beth, por estar sempre disposta a ajudar.

Aos estagiários, Nayara, Rafael, Sarah, Daniel e Marcela pela ajuda e colaboração. “Turminha”, a ajuda de vocês foi fundamental. Muito obrigada!

Aos funcionários do Biotério Central da UFV, Adão e Juliano, pelo fornecimento dos animais.

Aos funcionários do Departamento de Educação Física, pela disponibilização de equipamentos e laboratório para execução deste projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado Minas Gerais pelo suporte financeiro do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de estudos.

À UFV pela oportunidade de aperfeiçoamento.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Arsênio.....	4
2.2 Arsênio e sua toxicidade sobre o aparelho reprodutor masculino	6
2.2.1 Testículo.....	6
2.2.2 Epidídimo.....	8
2.2.3 Espermatozoides e fertilidade.....	10
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
ARTIGO.....	20
Fertilidade e morfofisiologia epididimária de ratos wistar submetidos a ingestão de arsenato e arsenito de sódio.....	20
1. Introdução.....	20
2. Material e métodos.....	21
3. Resultados.....	27
4. Discussão.....	38
5. Conclusões.....	41
6. Referências.....	43

## RESUMO

LIMA, Graziela Domingues de Almeida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Fertilidade e morfofisiologia epididimária de ratos wistar submetidos a ingestão de arsenato e arsenito de sódio.** Orientadora: Mariana Machado Neves.

O objetivo deste estudo foi comparar o efeito da exposição a diferentes concentrações de arsênio nas formas pentavalentes (arsenato;  $As^{+5}$ ) e trivalentes (arsenito;  $As^{+3}$ ) sobre parâmetros reprodutivos. Utilizou-se 30 ratos divididos em cinco grupos (n= 6 animais/grupo). Animais controle receberam NaCl a 0,9%, enquanto que os demais foram tratados diariamente por via oral com 0,01 e 10mg/L de arsênio, nas formas de arsenato e arsenito de sódio por 56 dias. Animais tratados com 10mg/L de arsenito tiveram redução na produção espermática diária, no número de espermátides no testículo e por grama de testículo, no número de espermatozoides nas regiões epididimárias e no percentual de espermatozoides com membranas íntegras ( $P < 0,05$ ). Já 0,01mg/L de arsenito causou redução no número de espermatozoide nas regiões de cabeça/corpo do epidídimo e no percentual de espermatozoides íntegros ( $P < 0,05$ ). Houve aumento no percentual de vasos sanguíneos no segmento inicial do epidídimo de animais tratados com arsenito (0,01 e 10mg/L) e arsenato (0,01mg/L). Arsenato de sódio, na concentração de 10mg/L, alterou o percentual de espermatozoides íntegros e o percentual de lúmen sem espermatozoides na cauda do epidídimo ( $P < 0,05$ ). 81,8% de fêmeas conceberam de machos controle, 50% quando os machos foram tratados com arsenato 0,01 mg/L e arsenito 10 mg/L e 63,6% quando 10mg/L de arsenato foi utilizado. Não houve diferença entre os grupos de fêmeas para número de corpos lúteos e de implantações ( $P > 0,05$ ), sendo o potencial de fertilidade (%) de machos tratados com arsenato 0,01mg/L ( $40,6 \pm 12,8$ ) e arsenito 10mg/L ( $40,6 \pm 11,7$ ) menor que o dos machos controle ( $71,0 \pm 21,4$ ). A perda embrionária pré-implantação foi de 59% para machos tratados com arsenato 0,01mg/L e arsenito 10mg/L e 29% para animais controle. Pode-se concluir que o arsenito foi mais danoso que o arsenato de sódio para parâmetros testiculares, epididimários e espermáticos. Arsênio presente na água de beber na concentração de 0,01mg/L alterou parâmetros de fertilidade de ratos quando na forma de arsenato de sódio.

## ABSTRACT

LIMA, Graziela Domingues de Almeida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2013. **Fertility and morphophysiology epididymal of rats wistar subject to intake sodium arsenate and arsenite.** Adviser: Mariana Machado Neves.

The aim of this study was to compare the effect of exposure to different concentrations of arsenic in the pentavalent (arsenate,  $As^{+5}$ ) and trivalent forms (arsenite,  $As^{+3}$ ) on reproductive parameters. Were used 30 Wistar rats randomly divided into five experimental groups (n = 6 animals/group). The control animals received saline, while the treated animals were exposed orally to sodium arsenate and arsenite, testing for each chemical form with concentrations of 0.01mg/L and 10mg/L, daily for 56 days. Animals exposed to 10mg/L of arsenite had reduced daily sperm production, the number of spermatids in the testis and per gram of testis, the number of sperm in the epididymal regions and the percentage of sperm with intact membranes ( $P < 0.05$ ). Already 0.01mg/L arsenite caused a reduction in the number of sperm in the caput/corpus regions of the epididymis and the percentage of sperm with intact membranes ( $P < 0.05$ ). In addition, there was increase in the percentage of blood vessels in the initial segment of the epididymis to the animals exposed to arsenite (0.01 and 10mg/L) and arsenate (0.01mg/L). Sodium arsenate at the concentration to 10mg/L, only changed the percentage of sperm with intact membranes and percentage of lumen without sperm in the cauda of the epididymis ( $P < 0.05$ ). Regarding the fertility parameters, there was obtained 81.82% of pregnant females to males control, 50% of males exposed with arsenate 0.01 mg/L and arsenite 10 mg/L and 63.64% of males exposed to 10mg/L of arsenate. 81.8% of the females conceived from males, 50% when the males were treated with 0.01 mg/L of arsenate and 10 mg/L of arsenite and 63.6% when 10 mg/L of arsenate were used. There was no difference between females groups for number of corpora lutea and implantations ( $P > 0.05$ ), and the fertility potential (%) for the males exposed with arsenate 0.01mg/L ( $40.6 \pm 12.8$ ) and arsenite 10mg/L ( $40.6 \pm 11.7$ ) was lower than the control males ( $71.0 \pm 21.4$ ). The pre-implantation loss was 59% for males exposed to arsenite 10mg/L and arsenate 0.01mg/L and 29% for control animals. In conclusion, the arsenite was more damaging than sodium arsenate some parameters for testicular and epididymal sperm. Arsenic present in drinking water at 0.01mg/L altered fertility parameters in the form of sodium arsenate.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A humanidade sempre esteve exposta a diferentes metais e metaloides, que, por serem elementos naturais, estão presentes em todo ambiente, como água, ar e solo. No entanto, a exposição humana a estes elementos aumentou no último século, devido a maior disponibilidade dos mesmos no meio ambiente consequência de lançamentos de origem antrópica, resultado do crescimento industrial e urbano (Carpenter et al., 2002).

O arsênio é um metaloide considerado na atualidade como o elemento químico mais perigoso da *Priority List of Hazardous Substances* de 2011. A exposição a este elemento representa uma grave ameaça a saúde pública. A Organização Mundial da Saúde estima que mais de 140 milhões de indivíduos estão expostos ao arsênio por meio da água de beber, seja ele proveniente de fontes geológicas naturais ou como resultado de atividades antropogênicas, como mineração, processos de fabricação de eletrônicos e fundição de metais (States et al., 2011; Naujokas et al., 2013).

No ambiente, o arsênio ocorre em diferentes formas químicas, como orgânica e inorgânica, e estados de oxidação, -3, 0, +3 e +5. Sua toxicidade depende desses dois fatores, sendo que as formas inorgânicas trivalentes (arsenito;  $As^{+3}$ ) e pentavalentes (arsenato;  $As^{+5}$ ) são consideradas as mais tóxicas. A ação do arsênio no organismo está relacionada com seu acúmulo em tecidos e células, produção de espécies reativas de oxigênio e função de enzimas relacionadas com a metilação, uma das etapas do processo de metabolização e eliminação deste elemento. Com isto podem ocorrer alterações degenerativas, inflamatórias e neoplásicas em vários sistemas orgânicos, como nervoso, respiratório, hematopoiético, cardiovascular e reprodutor (Cui e Okayasu, 2008; Chen et al., 2011; Watanabe e Hirano, 2013).

Exposição a altas concentrações de arsênio são tóxicas ao aparelho reprodutor masculino (Chang et al., 2007; Ahmad et al., 2008). Estudos relatam que a ação deste metaloide está associada a comprometimento da atividade da célula de Leydig, redução das concentrações séricas de testosterona e inibição da espermatogênese. Além disso, há comprometimento da qualidade seminal e redução do peso de órgãos sexuais acessórios como o epidídimo (Pant et al., 2001; Ahmad et al., 2008; Li et al., 2012a; Li et al., 2012b).

Historicamente, estudos que avaliam a toxicidade do arsênio sobre o aparelho reprodutor masculino têm focado a toxicidade do arsenito de sódio sobre as características histológicas e a fisiologia testicular, e poucas informações relatam sobre

os efeitos deste composto no epidídimo e espermatozoide (Savabieasfahani et al., 1998; Pant et al., 2004; Ahmad et al., 2008; Chen et al., 2011). É importante avaliar os efeitos do arsênio sobre o epidídimo, ao considerar que este órgão é responsável pela maturação espermática, processo no qual os espermatozoides produzidos no testículo adquirem motilidade e capacidade fecundante (Cornwall, 2009; Shum et al., 2009).

São escassos os estudos sobre os efeitos do arsênio em parâmetros histomorfométricos e funcionais do epidídimo, principalmente quando este elemento apresenta-se na água em baixas concentrações. Sabe-se que organizações brasileiras e internacionais toleram uma ingestão diária de arsênio na água de beber na concentração máxima de 0,01mg/L (BRASIL, 2005; WHO, 2011). Com base no presente exposto, formulou-se a hipótese de que a exposição a diferentes concentrações de arsenito causa mais danos em parâmetros histofisiológicos epididimários e de fertilidade que o arsenato de sódio. Para testá-la, foram estabelecidos os seguintes objetivos:

#### Objetivo geral:

- Avaliar o efeito de baixas concentrações de arsênio, nas formas de arsenato e arsenito de sódio, sobre parâmetros testiculares, epididimários, espermáticos e de fertilidade em ratos Wistar adultos.

#### Objetivos específicos:

- Mensurar o peso absoluto e peso relativo de órgãos do aparelho reprodutor masculino, considerando diferentes formas químicas e concentrações;
- Determinar a concentração sérica de testosterona;
- Comparar os efeitos da ingestão de arsenito e arsenato de sódio sobre os epidídimos, analisando parâmetros microscópicos qualitativos, como arquitetura tecidual, e quantitativos, como morfometria e proporção volumétrica dos componentes tubulares e intertubulares nas quatro regiões do órgão, segmento inicial, cabeça, corpo e cauda, em microscopia de luz;
- Avaliar parâmetros espermáticos, como morfologia, motilidade e cinética espermáticas, além da integridade estrutural das membranas, plasmática e acrossomal;
- Analisar a influência do arsênio, em duas concentrações e formas químicas, no número de espermátides testicular, na produção espermática diária, na contagem de espermatozoides no epidídimo, bem como no trânsito epididimário.

- Comparar a fertilidade de fêmeas híbridas cruzadas com machos expostos ao arsenato e arsenito de sódio, a partir de resultados obtidos para taxa de acasalamento, taxa de prenhez, peso de ovário, número de corpos lúteos, número de implantações, número de fetos, peso de fetos, potencial de fertilidade, taxa de perdas pré e pós implantação.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Arsênio

O arsênio é um elemento químico natural amplamente distribuído na crosta terrestre, sendo encontrado em água, ar e solo. Fontes geológicas naturais e locais aonde ocorre a ação do homem, como mineração, processos de fabricação de eletrônicos, incineração de resíduos, combustão do carvão e fundição de metais, podem tornar esse elemento disponível no ambiente. A agência internacional *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR) considera o arsênio como o elemento químico mais perigoso da *Priority List of Hazardous Substances*, o que o faz merecedor de atenção (ATSDR, 2011; Hughes et al., 2011; WHO, 2011). Isto porque a contaminação do homem pode ocorrer por exposição inalatória, em pessoas que trabalham em fundições, indústrias de fabricação de vidro e semicondutores, ou oral, via água doce (Jana et al., 2006).

Atualmente a contaminação da água pelo arsênio tem sido considerada uma ameaça a saúde pública, por ser uma das principais vias de contaminação. A Organização Mundial da Saúde estima que mais de 140 milhões de indivíduos estão expostos ao arsênio por meio da água de beber (WHO, 2011; States et al., 2011; Naujokas et al., 2013). Muitos países como Argentina, Chile, México, China, Bangladesh, Índia e Estados Unidos têm relatado aumento das concentrações de arsênio na água potável, sendo sua ingestão implicada em diferentes efeitos tóxicos, como diarreia, hemorragias gastrointestinais e lesões cutâneas (WHO, 2011; Naujokas et al., 2013). Os maiores focos endêmicos estão localizados em Bangladesh, onde estima-se que mais de 50 milhões de pessoas estão expostas a concentrações tóxicas de arsênio na água, sendo esta exposição implicada em cardiopatias e diferentes tipos de câncer, como de pulmão, bexiga e pele (Jiang et al., 2012; George et al., 2013).

Com relação ao Brasil, são poucas as informações sobre a ocorrência natural e antropogênica do arsênio. Estudos integrados do ambiente e exposição humana a este elemento químico foram realizados em apenas três áreas do território nacional, Quadrilátero Ferrífero – Minas Gerais, Vale do Ribeira – Paraná/São Paulo e Santana – Amapá, onde constatou-se grande quantidade deste elemento químico liberada para o ambiente devido a mineração de ouro, refino de metais, intemperismo de rochas e associação deste composto ao minério de manganês lavrado (Figueiredo et al., 2007).

O arsênio é um metaloide pertencente ao grupo 15 (5A) da classificação periódica dos elementos químicos, com número atômico 33 e massa atômica 74,92 u. Este metaloide está presente na natureza em diferentes formas químicas, orgânica e inorgânica, e estados de oxidação, -3, 0, +3 e +5, na forma de óxidos de arsênio ou sais destes óxidos. Sua toxicidade varia de acordo com suas características químicas, sendo que os compostos inorgânicos são 100 vezes mais tóxicos que os orgânicos, e os compostos trivalentes 60 vezes mais tóxicos que os pentavalentes (Chatterjee et al., 1995; Hughes et al., 2011; Watanabe e Hirano, 2013).

A solubilidade do arsênio em água, nas formas químicas de arsenito e arsenato, é um fator importante para sua absorção nas regiões gastrointestinais do aparelho digestório, que corresponde de 60 a 90% do arsênio total ingerido (Deschamps e Matschullat, 2007). Após ser absorvido, o arsênio é rapidamente distribuído pelo sangue à diferentes órgãos, como rins, pulmões, testículo, epidídimo e fígado (Pant et al., 2001; Cui e Okayasu, 2008), sendo este último o principal local de sua biotransformação. Arsenito e arsenato entram nos hepatócitos por meio de proteínas de membranas específicas. O arsenito é transportado para dentro do compartimento intracelular pelas aquagliceroporinas tipo 7 e 9 ou por hexoses permeases, enquanto que o arsenato entra via transportadores de fosfato (Liu et al., 2002; Watanabe e Hirano, 2013). Dentro dos hepatócitos o arsenato é biotransformado em arsenito por meio de reações de oxirredução. O arsenito intracelular resultante ou não desta reação se conjuga com a glutatona e é metilado pela enzima arsênio-metiltransferase, produzindo ácido metilarsênico e ácido dimetilarsênico (Ren et al., 2011; Watanabe e Hirano, 2013). Estes compostos são transportados para fora do espaço intracelular via proteínas transportadoras ATP-dependentes, sendo liberados na bile e na corrente sanguínea para serem excretados principalmente por fezes e urina (Ren et al., 2011; Watanabe e Hirano, 2013).

A intoxicação por arsênio pode resultar em efeitos agudos ou crônicos, dependendo do tempo de exposição. Os mecanismos pelos quais o arsênio tem efeitos tóxicos estão relacionados com produção de espécies reativas de oxigênio e alteração em estrutura do DNA, síntese de proteínas e proliferação celular (Ren et al., 2011; States et al., 2011; Li et al., 2012b; Wang et al., 2013). Com isto podem ocorrer alterações degenerativas, inflamatórias e neoplásicas em vários sistemas orgânicos, como nervoso, respiratório, hematopoiético, cardiovascular e reprodutor (Ahmad et al., 2008; Chen et al., 2011; Flora, 2011; Naujokas et al., 2013).

## 2.2 Arsênio e sua toxicidade sobre o aparelho reprodutor masculino

Uma vez que o testículo desempenha função na produção de espermatozoides e andrógenos (Russell et al., 1990) e o epidídimo seja responsável pela maturação espermática (Sullivan et al., 2005; Cornwall, 2009), agentes tóxicos que alterem a fisiologia destes órgãos podem causar redução na produção e viabilidade espermáticas, influenciando na fertilidade (Ahmad et al., 2008; Fossato et al., 2011).

Vários estudos têm caracterizado a ação nociva do arsênio sobre a morfologia e a função testicular, sendo poucas as informações sobre seus efeitos em epidídimo, espermatozoides e parâmetros de fertilidade. Efeitos conhecidos do arsênio na reprodução envolvem diminuição da androgênese testicular, inibição da espermatogênese, redução do peso testicular e de órgãos sexuais acessórios, como próstata e epidídimo, além de diminuição da motilidade espermática e do número de espermatozoides epididimais (Jana et al., 2006; Chang et al., 2007; Ahmad et al., 2008; Chiou et al., 2008; Reddy et al., 2011).

### 2.2.1 - Testículo

O testículo é o órgão responsável pela produção de espermatozoides e andrógenos. São órgãos pares revestidos por uma espessa cápsula de tecido conjuntivo denso, a albugínea testicular, a qual emite septos para o interior do órgão até a região do mediastino, dividindo o testículo em lóbulos. Histologicamente e funcionalmente, o testículo dos mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos, compartimento intertubular e tubular (Russell et al., 1990; França e Godinho, 2003).

No compartimento intertubular encontram-se as células de Leydig, célula responsável pela produção de testosterona, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, fibroblastos, macrófagos e mastócitos (Russell et al., 1990). O compartimento tubular representa de 70 a 90% do parênquima testicular na maioria dos mamíferos. Os túbulos seminíferos são constituídos por túnica própria, epitélio seminífero e lúmen. A túnica própria reveste o túbulo externamente, apresentando em sua constituição células mioídes, fibras colágenas e membrana basal, sendo responsável pela movimentação de fluido testicular através do lume tubular (Russell et al., 1990). No epitélio seminífero são encontrados dois tipos celulares, as células germinativas e as células de Sertoli. A célula de Sertoli é responsável pela manutenção da integridade do epitélio seminífero e

pela secreção de fluido para formar o lume, além de participar do processo de espermiogênese, realizar fagocitose, permitir a movimentação de células no epitélio, secretar proteínas e regular o ciclo espermatogênico, através das junções com as demais células (Skinner e Griswold, 2005). Já as células germinativas, após sucessivas divisões, se diferenciarão gradativamente em espermatozoides durante o processo de espermatogênese (França et al., 2005).

A espermatogênese é um processo complexo e sincronizado, que ocorre nos túbulos seminíferos e dura cerca de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos (França et al., 2005). Durante este processo, uma espermatogônia (célula diploide) sofre uma série de divisões e se diferencia gradativamente em espermatozoide (célula haplóide). Baseado em características morfológicas e funcionais, o processo espermatogênico pode ser dividido em três fases: 1) fase proliferativa ou espermatogonial, na qual as espermatogônias sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas; 2) a fase meiótica ou espermatocitogênica, na qual cada espermatócito dará origem a quatro espermátides haploides e durante a qual ocorre uma divisão reducional e outra equacional; 3) fase de diferenciação ou espermiogênica, onde cada espermátide arredondada passa por mudanças estruturais e bioquímicas diferenciando-se em espermatozoide, um tipo celular especializado para alcançar e fertilizar o ovócito (França e Russell, 1998).

Estudos relatam que a toxicidade causada pelo arsênio no testículo se deve principalmente ao esgotamento de enzimas antioxidantes testiculares, como a glutatona, e a elevação da concentração de espécies reativas de oxigênio (Chang et al., 2007; Reddy et al., 2011). Ahmad et al. (2008) observaram que o arsênio foi capaz de reduzir o diâmetro dos túbulos seminíferos, causar alterações degenerativas nas células de Leydig e comprometer a espermatogênese de ratos tratados com 6 mg/kg arsenito de sódio por 30 dias. Pant et al. (2004) encontraram acúmulo significativo de arsênio nos testículos e órgãos sexuais acessórios, além de redução significativa em marcadores de enzimas testiculares, como 17- $\beta$  hidroxisteroide-desidrogenase, sorbitol desidrogenase e fosfatase ácida, alteração nestas enzimas sugerem danos as células da linhagem germinativa. O acúmulo de arsênio no testículo também está relacionado ao aumento na atividade de enzimas testiculares como a  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase. Aumento significativo na atividade desta enzima indica que o arsênio pode interferir na fisiologia normal das células de Sertoli, afetando o desenvolvimento de espermatócitos e espermátides (Pant et al., 2004). Ratos wistar expostos oralmente ao trióxido de arsênio, nas concentrações de 50mg/L e 100mg/L, por 90 dias, apresentaram danos no DNA de

espermatozoides primários. Este dano leva a alterações na fertilidade e danos reprodutivos, tais como aborto espontâneo e doenças genéticas (Nava-Hernández et al., 2009).

Carvalho (2009), ao tratar camundongos com arsenato de sódio na concentração de  $1,0 \text{ mgL}^{-1}$  por 84 dias, observou acúmulo de arsênio no testículo e redução na altura do epitélio seminífero. Mata (2009) observou acúmulo de arsênio no testículo e redução no peso absoluto e do parênquima deste órgão em camundongos expostos oralmente a  $100 \text{ mg/L}^{-1}$  de arsenato de sódio, por 70 dias.

### 2.2.2 - Epidídimo

Os espermatozoides saem dos testículos imóveis e incapazes de fertilizar um ovócito. Eles só adquirem motilidade e capacidade fecundante após sua passagem pelo ducto epididimário (Shum et al., 2009).

O epidídimo consiste em um único e longo ducto, altamente enovelado e contorcido, que conecta os ductos eferentes ao ducto deferente (Sullivan, 2004). Anatomicamente o epidídimo pode ser dividido em quatro regiões principais, segmento inicial, cabeça, corpo e cauda. Esta regionalização baseia-se no estudo da altura do epitélio, do diâmetro tubular e da variação na frequência dos diferentes tipos celulares que compõem seu epitélio (Hermo e Robaire, 2002; Cornwall, 2009).

Cada região do epidídimo apresenta funções distintas, sendo que o segmento inicial está relacionado com a absorção de fluidos vindos do testículo, as regiões da cabeça e corpo estão envolvidas com os processos iniciais e tardios de maturação espermática, como a aquisição da motilidade progressiva e da capacidade de reconhecimento e fertilização do ovócito, enquanto que a região da cauda está associada com o armazenamento espermático e com a fagocitose de espermatozoides anormais (Robaire e Viger, 1995; Cornwall, 2009).

Histologicamente o epitélio epididimário é classificado como pseudoestratificado prismático com estereocílios. O epitélio é composto por uma população variada de células que incluem as células principais, basais, apicais, halo, claras e estreitas (Hermo e Robaire, 2002; Oliva et al., 2009). Estas células exercem funções diferenciadas, que são necessárias para a função deste órgão, como secreção e absorção de proteína (células principais), endocitose (células claras), atividade secretória responsável pela acidificação do fluido luminal (células claras e estreitas),

defesa imune, fagocitose e produção de antioxidantes (células basais) (Hermo e Robaire, 2002; França et al., 2005; Cornwall, 2009).

As células principais constituem cerca de 80% do epitélio epididimário. Estas células possuem em sua membrana apical proteínas transportadoras, como a aquaporina 9, que semelhante as aquagliceroporinas presentes nos hepatócitos, pertence a uma classe de proteínas que formam poros na membrana plasmática e estão relacionadas com o transporte de água e outros solutos (Agre et al., 1995; Pastor-Soler et al., 2001). As células principais mostram uma morfofuncionalidade diferente entre as regiões do epidídimo. No entanto, independente do segmento considerado, na região apical destas células estão presentes junções de oclusão que são responsáveis pela formação da barreira hemato-epididimária. Neste sentido, o epitélio epididimário é responsável por criar um microambiente altamente especializado responsável pelo transporte, maturação, estocagem e proteção espermática (Robaire e Viger, 1995; Hermo e Robaire, 2002).

A maturação espermática é definida pela aquisição da habilidade de fertilização pelos espermatozoides (Sullivan et al., 2005; Cornwall, 2009). Este processo envolve uma interação orquestrada entre o espermatozoide e proteínas que são produzidas e secretadas pelo epitélio epididimário, sendo a presença delas região-dependente (Robaire et al., 2006; Cornwall, 2009). O fluido luminal do ducto epididimário contém diversas proteínas e enzimas, como as enzimas antioxidantes gamaglutamiltransferase e óxido nítrico-sintetase. A produção de espécies reativas de oxigênio em espermatozoides está associada à função fisiológica normal, mas o descontrole e o excesso de tais espécies representam um dos maiores fatores relacionados com a infertilidade, comprometendo a motilidade do espermatozoide e a sua viabilidade em promover fertilização (Oliva et al., 2009).

O transporte dos espermatozoides através do ducto epididimário depende do gradiente de pressão hidrostática diferencial entre as porções proximal e distal do ducto epididimário, da atividade contrátil da parede do ducto, controlada pelo sistema nervoso autônomo e da ação de andrógenos (Cosentino e Cockett, 1986; Robaire e Viger, 1995; Klinefelter, 2002). A regulação destes mecanismos garante um tempo do trânsito espermático adequado para a ocorrência da maturação espermática (Kempinas et al., 1998; França et al., 2005). O tempo da passagem dos espermatozoides pelo ducto epididimário é espécie-específico, variando de 3 a 15 dias (Cosentino e Cockett, 1986). No rato, o tempo de trânsito é de 8 dias (Robb et al., 1978; França et al., 2005) e uma

alteração nesse tempo pode alterar o processo de maturação espermática. Dados da literatura mostram que o atraso no tempo de trânsito pelo epidídimo não altera a capacidade fértil dos gametas, mas quando ele é acelerado a fertilidade fica comprometida (Kempinas et al., 1998). Este prejuízo ocorre porque o tempo disponível dos processos requeridos para a aquisição da capacidade fértil fica diminuído. Uma alteração no tempo de trânsito espermático também altera a quantidade de espermatozoides disponíveis para a ejaculação (Klinefelter, 2002).

São poucos os trabalhos avaliando a ação do arsênio na morfofisiologia epididimária. Mata (2009) observou acúmulo de arsênio no epidídimo de camundongos expostos oralmente a  $100 \text{ mg/L}^{-1}$  de arsenato de sódio, por 70 dias. Carvalho (2009) também relatou acúmulo de arsênio no epidídimo de camundongos expostos oralmente a  $1,0 \text{ mgL}^{-1}$  de arsenato de sódio, por 84 dias. Reddy et al. (2011) relataram redução de peso do epidídimo de camundongos expostos oralmente a  $4 \text{ mg/L}$  de arsenito de sódio, por 35 dias. Li et al. (2012b) observaram redução de peso e alteração na arquitetura tecidual do epidídimo, como redução na área de lúmen e lúmen com espermatozoides, de camundongos expostos oralmente, via água de beber, a  $2$  e  $4 \text{ mg/L}$  de trióxido de arsênio, por 60 dias. Estes autores também relataram que este composto reduziu a expressão do gene *Ddx3y*, que está relacionado à funcionalidade do epidídimo comprometendo sua fisiologia normal (Li et al., 2012b).

### 2.2.3 Espermatozoides e fertilidade

Os espermatozoides são morfologicamente divididos em cabeça e cauda. A cabeça contém o núcleo haploide, com cromatina altamente compactada, e o acrossoma, uma estrutura de dupla parede situada entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo. Ele é derivado do complexo de Golgi, sendo formado durante a etapa final da espermatogênese, a espermiogênese. No rato e no hamster a cabeça do espermatozoide é alongada em formato de gancho (Hafez, 1970; Alberts et al., 2004; Robaire et al., 2006).

A cauda é formada por um longo flagelo composto de quatro segmentos, peça de ligação, peça intermediária, peça principal e terminal. Na peça intermediária existe um grande número de mitocôndrias que possuindo a função de produzir a energia necessária para a motilidade espermática. O axonema do flagelo se inicia na região da peça intermediária e se mantém ao longo de toda a cauda. Ele apresenta nove pares de microtúbulos periféricos e um par central, além de duas proteínas contráteis principais, a

dineína e a tubulina, que utilizam adenosina trifosfato (ATP), produzido pelas mitocôndrias presentes na peça intermediária, no mecanismo da motilidade espermática (Gilbert, 2003; Alberts, 2010; Robaire et al., 2006).

Análises espermáticas *in vitro* permitem avaliar parâmetros morfofuncionais de espermatozoides que podem ser correlacionados com a fertilidade. Motilidade, morfologia e concentração espermáticas são importantes parâmetros para avaliação do potencial reprodutivo de machos, sendo a determinação da porcentagem de espermatozoides móveis, um dos testes mais utilizados para prever a qualidade seminal (Verstegen et al., 2002). A quantificação da motilidade espermática pode ser feita por subjetivamente, usando uma estimativa visual do número de espermatozoides móveis (Verstegen et al., 2002; Amann e Hammerstedt, 2004). Para reduzir a subjetividade, sistemas automáticos para análise computadorizada de sêmen (CASA) vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de fornecer dados acurados da motilidade dos espermatozoides e resumo estatístico de suas subpopulações (Verstegen et al., 2002).

As anormalidades morfológicas nos espermatozoides têm sido classificadas por localização do defeito, cabeça, peça intermediária e cauda, ou de acordo com seu efeito na fertilidade. Os defeitos maiores incluem a maioria das anormalidades na cabeça e peça intermediária, gota citoplasmática proximal e alterações individuais presentes em porcentagem elevada, enquanto que defeitos menores incluem cabeças de espermatozoides destacadas e gota citoplasmática distal (Menon et al., 2011).

Outro parâmetro espermático analisado é a integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal. Esta análise é feita utilizando a combinação de dois fluorocromos, o diacetato de carboxifluoresceína (DACF) e o iodeto de propídeo (IP), e se baseia na permeabilidade do DACF à membrana plasmática e na impermeabilidade do IP. O DACF, um éster não fluorescente e apolar, é hidrolisado por esterases não específicas no interior da célula, resultando na formação de 6-carboxifluoresceína, composto impermeável à membrana plasmática que emite fluorescência verde nos compartimentos celulares onde há integridade de membrana. Já o IP, corante de forte afinidade por ácidos nucleicos, apenas cora células com membrana plasmática lesada, dando à mesma coloração vermelha fluorescente (Harrison e Vickers, 1990; Neves, 2008).

Li et al. (2012b), ao tratar oralmente camundongos com 2 e 4 mg/L de trióxido de arsênio por 60 dias, observaram aumento do percentual de espermatozoides imóveis e com malformações. Chang et al. (2007) verificaram redução na motilidade

espermática e redução no número de espermatozoides epididimários em camundongos tratados com 20 e 40 mg/L de arsenito de sódio. Jana et al. (2006) também observaram redução no número de espermatozoides da cauda epididimária em ratos tratados com 5 mg/kgPC de arsenito de sódio.

No que se refere ao arsênio, não foram encontrados trabalhos que avaliam a capacidade fecundante e taxas de fertilidade de machos após a administração de diferentes formas químicas deste elemento. Apesar das análises de concentração espermática, motilidade e morfologia destas células predizerem a fertilidade do animal, o uso de testes *in vivo* com fêmeas, seja por monta natural seja por inseminação artificial, é a comprovação da capacidade do macho em gerar proles. Modelos animais que visem avaliar a fertilidade *in vivo* são importantes para compreender a toxicidade reprodutiva de uma substância ou elemento (Favareto et al., 2011; Garcia et al., 2012). Fernandes et al. (2007) observaram menor número de fetos vivos em fêmeas acasaladas com machos tratados com 125 mg/Kg/dia do herbicida diuron após 30 dias de tratamento. Garcia et al. (2012) relataram redução no potencial reprodutivo de camundongos machos tratados com 5mg/Kg/dia do fármaco finasteride por 56 dias após acasalamento natural com fêmeas híginas.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR. Priority List of Hazardous Substances for 2011. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>.

AGRE P, BROWN D, NIELSEN S. 1995. Aquaporin water channels: unanswered questions and unresolved controversies. *Curr Opin Cell Biol* 7(4): 472-83.

AHMAD I, AKTHAR KM, HUSSAIN T. 2008. Arsenic induced microscopic changes in rat testis. *Professional Medical Journal* 15: 287-91.

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS R, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. 2010. *Biologia Molecular da Célula*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed.

AMANN RP, KATZ DF. 2004. Reflections on CASA after 25 years. *J Androl* 2004; 25(3):317-25.

BRASIL. Resolução N° 357, de 17 de Março 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Publicada no Diário Oficial da União nº 053, de 18 de março de 2005. 58-63.

CARPENTER DO, ARCARO K, SPINK DC. 2002. Understanding the human health effects of chemical mixtures. *Environ Health Perspect* 110 (1): 25-42.

CARVALHO FAR. 2009. Morfologia e morfometria testicular de camundongos adultos submetidos a exposição crônica ao arsenato. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

CHANG SI, JIN B, YOUN P, PARK C, PARK JD, RYU DY. 2007. Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicol Appl Pharmacol* 218(2): 196-203.

CHATTERJEE A, DAS D, MANDAL BK, CHOWDHURY TR, SAMANTA G, CHAKRABORTI D, CHANDA B. 1995. Arsenic in ground water in six districts of West bengal, India: the biggest arsenic calamity in the world. Part 1. Arsenic Species in Drinking Water and Urine of the Affected People. *Analyst* 120(3): 643-50.

CHEN B, ARNOLD LL, COHEN SM, THOMAS DJ, LE XC. 2011. Mouse arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase genotype affects metabolism and tissue dosimetry of arsenicals after arsenite administration in drinking water. *Toxicol Sci* 124(2): 320-26.

CHIOU TJ, CHU ST, TZENG WF, HUANG YC, LIAO CJ. 2008. Arsenic trioxide impairs spermatogenesis via reducing gene expression levels in testosterone synthesis pathway. *Chem Res Toxicol* 21(8): 1562-9.

CORNWALL GA. 2009. New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 15: 213-27.

COSENTINO MJ, COCKETT ATK. 1986. Review Article: Structure and Function of the Epididymis. *Urol Res* 14:229-240.

CUI X, OKAYASU R. 2008. Arsenic accumulation, elimination, and interaction with copper, zinc and manganese in liver and kidney of rats. *Food Chem Toxicol* 46(12): 3646-50.

DESCHAMPS E, MATSCHULLAT J. 2007. Arsênio antropogênico e natural: um estudo em regiões do Quadrilátero Ferrífero. Belo Horizonte: Fundação Estadual do Meio Ambiente, 38-44.

FAVARETO AP, DE TOLEDO FC, KEMPINAS WDE G. 2011. Paternal treatment with cisplatin impairs reproduction of adult male offspring in rats. *Reprod Toxicol* 32(4): 425-33.

FERNANDES GS, ARENA AC, FERNANDEZ CD, MERCADANTE A, BARBISAN LF, KEMPINAS WG. 2007. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod Toxicol* 2007; 23(1): 106-12.

FIGUEIREDO BR, BORBA RT, ANGELICA RS. 2007. Arsenic occurrence in Brazil and human exposure. *Environ Geochem Health* 29: 109-18.

FLORA SJ. 2011. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic Biol Med* 51(2): 257-81.

FOSSATO DA SILVA DA, TEIXEIRA CT, SCARANO WR, FAVARETO AP, FERNANDEZ CD, GROTTTO D, BARBOSA F JR, KEMPINAS WDE G. 2011. Effects of methylmercury on male reproductive functions in Wistar rats. *Reprod Toxicol* 31(4): 431-9.

FRANÇA LR, AVELAR GF, ALMEIDA FF. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 63(2): 300-18.

FRANÇA LR, GODINHO CL. 2003. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod* (5): 1554-61.

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

GARCIA PV, BARBIERI MF, PEROBELLI JE, CONSONNI SR, MESQUITA SDE F, KEMPINAS WDE G, PEREIRA LA. 2012. Morphometric-stereological and functional epididymal alterations and a decrease in fertility in rats treated with finasteride and after a 30-day post-treatment recovery period. *Fertil Steril* 97(6): 1444-51

GEORGE CM, GAMBLE M, SLAVKOVICH V, LEVY D, AHMED A, AHSAN H, GRAZIANO J. 2013. A cross-sectional study of the impact of blood selenium on blood and urinary arsenic concentrations in Bangladesh. *Environ Health* 2(1):52.

GILBERT SF. 2003. *Developmental Biology*. 7th ed. USA: Sinauer Associates Inc.

HAFEZ ESE. 1970. Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. Detroit: Lea & Febiger.

HARRISON RAP, VICKERS SE. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil* 8: 343-53.

HERMO L, ROBAIRE B. 2002. Epididymal cell types and their functions. In: Robaire B, Hinton BT, editors. *The Epididymis- from molecules to clinical practice*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher 81-102.

HUGHES MF, BECK BD, CHEN Y, LEWIS AS, THOMAS DJ. 2011. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicol Sci* 123(2): 305-32.

JANA K, JANA S, SAMANTA PK. 2006. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. *Reprod Biol Endocrinol* 16: 4-9.

JIANG JQ, ASHEKUZZAMAN SM, JIANG A, SHARIFUZZAMAN SM, CHOWDHURY SR. 2012. Arsenic contaminated groundwater and its treatment options in Bangladesh. *Int J Environ Res Public Health* 10(1): 18-46.

KEMPINAS WG, SUAREZ JD, ROBERTS NL, STRADER L, FERRELL J, GOLDMAN JM, ET AL. 1998. Rat epididymal sperm quantity, quality and transit time after guanethidine-induced sympathectomy. *Biol. Reprod.* 59, 890–896.

KLINEFELTER GR. 2002. Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. In: 29 Robaire B, Hinton BT, editors. *The Epididymis – from molecules to clinical practice*. 30 New York: Kluwer Academic/ Plenum Publisher 353-369.

LI P, ZHONG Y, JIANG X, WANG C, ZUO Z, SHA A. 2012a Seminal plasma metals concentration with respect to semen quality. *Biol Trace Elem Res* 148(1): 1-6.

LI Y, WANG M, PIAO F, WANG X. 2012b. Subchronic exposure to arsenic inhibits spermatogenesis and downregulates the expression of ddx3y in testis and epididymis of mice. *Toxicol Sci* 128(2): 482-89.

LIU Z, SHEN J, CARBREY JM, MUKHOPADHYAY R, AGRE P, ROSEN BP. 2002. Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(9): 6053-8.

MATA WS. 2009. Toxicidade do arsenato e efeito protetor do guaraná e da vitamina E no aparelho reprodutor de camundongos machos adultos. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

MENON AG, BARKEMA HW, WILDE R, KASTELIC JP, THUNDATHIL JC. 2011. Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 75: 241-7.

NAUJOKAS MF, ANDERSON B, AHSAN H, APOSHIAN HV, GRAZIANO JH, THOMPSON C, SUK WA. 2013. The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem. *Environ Health Perspect* 121(3): 295-302.

NAVA-HERNÁNDEZ MP, HAUAD-MARROQUÍN LA, BASSOL-MAYAGOITIA S, GARCÍA-ARENAS G, MERCADO-HERNÁNDEZ R, ECHÁVARRI-GUZMÁN MA, CERDA-FLORES RM. 2009. Lead, cadmium, and arsenic induced DNA damage in rat germinal cells. *DNA Cell Biol* 28(5): 241-8.

NEVES MM. 2008. Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de *Gallus domesticus* e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

OLIVA SU, RINALDO PA, STUMPP T. 2009. Biologia epididimária: maturação espermática e expressão gênica. *O mundo da Saúde* 33(4): 419-25.

PANT N, KUMAR R, MURTHY RC, SRIVASTAVA SP. 2001. Male reproductive effect of arsenic in mice. *Biometals* 14: 113-17.

PANT N, MURTHY RC, SRIVASTAVA SP. 2004. Male reproductive toxicity of sodium arsenite in mice. *Hum Exp Toxicol* 23(8): 399-403.

PASTOR-SOLER NM, FISHER JS, SHARPE R, HILL E, VAN HOEK A, BROWN D, BRETON S. 2010. Aquaporin 9 expression in the developing rat epididymis is modulated by steroid hormones. *Reproduction* 139(3): 613-21.

REDDY PS, RANI GP, SAINATH SB, MEENA R, SUPRIYA CH. 2011. Protective effects of N-acetylcysteine against arsenic-induced oxidative stress and reprotoxicity in male mice. *J Trace Elem Med Biol* 25(4): 247-53.

REN X, MCHALE CM, SKIBOLA CF, SMITH AH, SMITH MT, ZHANG L. 2011. An emerging role for epigenetic dysregulation in arsenic toxicity and carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 119(1): 11-9.

ROBAIRE B, HINTON BT, ORGEBIN-CRIST MC. 2006. The Epididymis. In: Neill JD, editor. *Physiology of Reproduction*. USA: Elsevier Inc; 2006.

ROBAIRE B, VIGER RS. 1995. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod* 52(2): 226-36.

ROBB GW, AMMAN RP, KILLIAN GJ. 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil* 54: 103-7.

RUSSELL LD, ETTLIN RA, HIKIM APS, CLEGG ED. 1990. *Histological And Histopathological Evaluation Of The Testis*. Cache River Press, Florida: Cache River Press 1990; 1-40.

SAVABIEASFAHANI M, LOCHMILLER RL, RAFFERTY DP, SINCLAIR JA. 1998. Sensitivity of wild cotton rats (*Sigmodon hispidus*) to the immunotoxic effects of low-level arsenic exposure. *Arch Environ Contam Toxicol* 34(3): 289-96.

SHUM WW, DA SILVA N, BROWN D, BRETON S. 2009. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *J Exp Biol* 2009; 212: 1753-61.

SKINNER MK, GRISWOLD MD. 2005. *Sertoli Cell Biology*. Elsevier Academic Press.

STATES JC, BARCHOWSKY A, CARTWRIGHT IL, REICHARD JF, FUTSCHER BW, LANTZ RC. 2011. Arsenic toxicology: translating between experimental models and human pathology. *Environ Health Perspect* 119(10): 1356-63.

SULLIVAN R, SAEZ F, GIROUARD J, FRENETTE G. 2005. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis* 35(1): 1-10.

SULLIVAN R. 2004. Male fertility markers, myth or reality. *Anim Reprod Sci* 82-83: 341-7.

VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M, ONCLIN K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57:149-179.

WANG Z, HUMPHRIES B, XIAO H, JIANG Y, YANG C. 2013. Epithelial to mesenchymal transition in arsenic-transformed cells promotes angiogenesis through activating  $\beta$ -catenin-vascular endothelial growth factor pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 271(1): 20-29.

WATANABE T, HIRANO S. 2013. Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. *Arch Toxicol* 87(6): 969-79.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. 2011. *Guidelines for drinking water quality*. 4th Edition. Geneva.

## ARTIGO

---

### Fertilidade e morfofisiologia epididimária de ratos wistar submetidos a ingestão de arsenato e arsenito de sódio

#### 1. Introdução

O arsênio é um metaloide tóxico encontrado naturalmente em solo, ar e água. Atualmente o aumento dos lançamentos antrópicos deste elemento no ambiente, especialmente na água potável, é considerado um problema de saúde pública (Carpenter et al., 2002; WHO, 2011; Naujokas et al., 2013). O arsênio ocorre em diferentes formas químicas e estados de valência e, sob a forma de óxidos de arsênio ou sais destes óxidos, sendo as formas inorgânicas trivalentes (arsenito) e pentavalentes (arsenato) as mais comuns (Ren et al., 2011).

As formas inorgânicas trivalentes são consideradas as mais tóxicas devido a sua reatividade com compostos contendo enxofre, como grupos tiol, sulfidril (Neves et al., 2004; Hughes et al., 2011) e resíduos de cisteína (Kurooka et al., 2013). Uma vez absorvidos, o arsenito e o arsenato são biotransformados no fígado em metabólitos metilados menos tóxicos, como os ácidos metilarsônico e dimetilarsônico. Parte destes compostos são eliminados via urina e fezes, enquanto que o restante se distribui pelos tecidos, como hepático, renal, testicular e epididimário (Pant et al., 2001; Cui et al., 2008; Ren et al., 2011; Watanabe e Hirano, 2013), podendo alterar a estrutura do DNA e proliferação celular (Ren et al., 2011; States et al., 2011). Com isto podem ocorrer alterações degenerativas, inflamatórias e neoplásicas em vários sistemas orgânicos, como nervoso, respiratório, hematopoiético, cardiovascular e reprodutor (Chen et al., 2011; Naujokas et al., 2013).

Estudos sobre toxicidade do arsênio têm avaliado os efeitos do arsenito de sódio sobre as características histológicas e a fisiologia do testículo, no entanto, poucas informações de seus efeitos sobre o epidídimo, espermatozoides e fertilidade estão disponíveis. Exposição a altas concentrações de arsênio são tóxicas ao aparelho reprodutor masculino (Chang et al., 2007; Ahmad et al., 2008). Efeitos deletérios desta exposição têm sido associados a alterações estruturais do parênquima testicular, redução das concentrações séricas de testosterona, inibição da espermatogênese, além de

redução do peso do epidídimo e do número de espermatozoides no seu interior (Chang et al., 2007; Fernandes et al., 2007; Ahmad et al., 2008).

Informações detalhadas sobre os efeitos do arsênio em parâmetros histomorfométricos e funcionais do epidídimo são importantes para o conhecimento de sua toxicologia reprodutiva, ao considerar que ele é o órgão responsável pela maturação espermática (Cornwall, 2009). Sabe-se que organizações brasileiras e internacionais toleram uma ingestão diária de arsênio na água de beber na concentração máxima de 0,01mg/L (BRASIL, 2005; WHO, 2011) e não existem informações sobre os danos causados por esta concentração em órgãos genitais masculinos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi comparar os efeitos da exposição subcrônica de baixas concentrações de arsênio, nas formas de arsenato e arsenito de sódio, sobre parâmetros histomorfométricos epididimários, espermáticos e de fertilidade.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Animais

Ratos Wistar machos (n = 30, 70 dias de idade, peso 255-300g) e fêmeas (n = 59, 65 dias de idade, peso 214-270g), oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV), foram mantidos no Biotério do Departamento de Educação Física (UFV) alojados individualmente em caixas de polipropileno (30 cm x 20 cm x 13 cm) e em condições controladas de temperatura ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e luminosidade (12 - 12h claro/escuro). Cada animal recebeu diariamente 30 g de ração peletizada, sendo realizada a pesagem das sobras para cálculo do consumo médio semanal. A água foi fornecida *ad libitum* e foi utilizada para administração oral das quantidades de arsênio. Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFV; número de protocolo 19/2011).

### 2.2 Tratamentos

Os machos foram pesados (0.01 g, AS500C, Marte) e aleatoriamente divididos em cinco grupos experimentais (n = 6 animais/grupo). Os animais do grupo controle receberam solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%, enquanto que os demais animais

receberam para hidratação por via oral água contendo a 0,01 mg/L ou 10 mg/L de arsênio nas formas de arsenato ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; Sigma-Aldrich Co., St. Luis, MO) ou arsenito ( $\text{AsNaO}_2$ , Sigma-Aldrich Co., St. Luis, MO) de sódio. A concentração de 0,9% da solução de cloreto de sódio foi escolhida para o grupo controle por apresentar condutividade média semelhante à das soluções de arsenato e arsenito de sódio, o que minimiza possíveis efeitos na ingestão do líquido. As soluções foram fornecidas diariamente por 56 dias, período equivalente ao tempo total de duração de um ciclo do epitélio seminífero (Russell et al., 1990) e substituídas por água filtrada até o final do experimento.

### 2.3 Acasalamento natural

No 57º dia de experimento, duas fêmeas híginas foram colocadas na caixa de cada macho e permitiu-se o acasalamento por três dias. Foi feito esfregaço vaginal de todas as fêmeas nos dias 2 e 3 após o contato com o macho, para a confirmação de monta a partir da visualização de espermatozoides no esfregaço. Para tal, utilizou-se uma haste flexível contendo algodão umedecido com soro fisiológico em uma das extremidades. A haste foi inserida pela vulva, na fêmea contida, e gentilmente rolada contra a parede vaginal (Byers et al., 2012). O material colhido foi transferido para uma lâmina de vidro e corada por panótico rápido (Larboclin), sendo analisada em microscópio óptico (Olympus CX-40) no aumento de 400x.

Após o período de acasalamento natural, machos e fêmeas foram separados. As fêmeas foram mantidas em caixas de polipropileno (30 cm x 20 cm x 12 cm) por mais 16 dias, recebendo diariamente água filtrada *ad libitum* e 30 g/animal de ração peletizada. Os machos foram mantidos por mais três dias e eutanasiados, tempo necessário para reposição da reserva espermática da cauda do epidídimo.

### 2.4 Pesagem e coleta dos órgãos reprodutivos dos machos

No 64º dia de experimento, os machos foram pesados (0.01 g, AS500C, Marte) e anestesiados utilizando-se cloridrato de xilazina (10mg/kg/intraperitoneal) e cloridrato de quetamina (150mg/kg/intraperitoneal). Após abertura da cavidade abdominal, testículos, epidídimos, vesícula seminal (sem glândula de coagulação) e próstata ventral

foram removidos e seus pesos (absoluto e relativo ao peso corporal) foram determinados. Os pesos relativos foram calculados utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Peso relativo (g/100g): } \frac{\text{peso do órgão (g)}}{\text{peso corporal final do animal (g)}} \times 100$$

## 2.5 Concentração sérica de testosterona

Durante a anestesia, coletou-se o sangue de cada macho por punção cardíaca. O sangue foi centrifugado a 4.2 xg por 15 minutos e o soro transferido para microtubos e armazenado a -20°C. A concentração sérica de testosterona foi determinada pela técnica de quimioluminescência utilizando kit Access<sup>®</sup> Immunoassay Systems Testosterone (REF 33560) e equipamento Access<sup>®</sup> 2 Immunoassay Systems da Beckman Coulter<sup>®</sup>. O resultado foi expresso em ng/mL.

## 2.6 Processamento histológico e histomorfometria epididimária

O epidídimo direito foi imerso em solução fixadora Karnovsky (glutaraldeído a 4% e paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,2M/pH 7,3) por 24 horas e, posteriormente, segmentado de acordo com as quatro regiões do órgão, segmento inicial, cabeça, corpo e cauda. Em seguida, os fragmentos foram desidratados em série etanólica crescente (70%, 80%, 90% e álcool absoluto) e incluídos em glicol metacrilato (Leica, Historessin<sup>®</sup>). Cortes histológicos semi seriados de 3 µm de espessura foram obtidos utilizando-se micrótomo rotativo (Leica, RM225) com navalhas de vidro. As lâminas contendo os cortes histológicos foram coradas com azul de toluidina/borato de sódio 1% e montadas com Entellan<sup>®</sup> (Merck).

As secções do ducto epididimário foram analisadas em microscópio óptico Olympus CX-40, nos diferentes aumentos, quanto a organização e arquitetura tecidual, como aspectos tubulares e do epitélio que caracterizam cada região, bem como possíveis alterações histológicas.

Quanto a morfometria, foram capturadas dez imagens digitais de campos histológicos aleatórios de cada região epididimária utilizando fotomicroscópio (Olympus BX-50) na objetiva de 10x, sendo essas analisadas pelo software para

análises de imagem *Image Pro Plus 4.5*<sup>®</sup> (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

Os diâmetros, tubular e luminal, foram obtidos a partir da mensuração de 25 secções transversais aleatórias de túbulos epididimários, de cada região, por animal. O diâmetro tubular foi obtido tomando-se uma medida equidistante da porção basal de uma célula principal à porção basal da célula principal oposta, enquanto que o diâmetro luminal foi mensurado a partir da distância equidistante da porção apical de uma célula principal à porção apical da célula principal oposta. Nas mesmas secções foi obtida a altura do epitélio epididimário, medindo da porção basal de uma célula principal até a porção apical da mesma célula. O valor encontrado para a altura do epitélio, em cada túbulo, representou a média de duas medidas tomadas de forma diametralmente opostas.

A proporção volumétrica dos componentes dos compartimentos tubular e intertubular de cada região foi determinada com o uso de uma grade com 266 interseções incididas sobre dez imagens digitalizadas, por região e por animal, totalizando 2660 pontos. Foram contabilizadas interseções coincidentes sobre componentes do compartimento tubular, epitélio, lúmen com presença de espermatozoides, lúmen sem espermatozoides e túnica própria, e intertubular, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e músculo liso.

## 2.7 Avaliação espermática

A cauda do epidídimo esquerdo foi seccionada várias vezes em placa de Petri, com auxílio de lâmina de barbear, para se obter o fluido rico em espermatozoides. O fluido foi diluído em 500 µl de meio diluidor Tris-citrato-frutose (3,025 g de Tris, 1,7 g de ácido cítrico, 1,25 g de frutose e 100 mL água destilada) a 37°C, sendo retiradas alíquotas para análises de morfologia, motilidade e cinética espermáticas e avaliação da integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal.

### 2.7.1 Morfologia espermática

Uma alíquota de 50µl do fluido foi fixada em 100µL de paraformaldeído a 4% tamponado, sendo mantido refrigerado a -20°C. Foram analisados 100 espermatozoides em preparação úmida utilizando microscópio de contraste de fase no aumento de 1000x, sendo a morfologia classificada quanto a defeitos de cabeça (núcleo e acrossoma), peça

intermediária (quebrada, fracamente dobrada e fortemente dobrada) e peça principal (fracamente enrolada e fortemente enrolada). Os resultados foram expressos em porcentagem.

### 2.7.2 Motilidade e cinética espermática

A motilidade e cinética espermática foram avaliadas por sistema automático de análise de espermatozoides (Sperm Class Analyzer - *Automatic system of sperm analysis by computer*, MICROPTIC S.L.<sup>©</sup>, Barcelona, Espanha). O programa foi ajustado para os padrões de movimentação dos espermatozoides de roedor pré-existente. Foram observados três campos com frequência de aquisição de imagens de 25 imagens/s. Foram analisados os seguintes parâmetros: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade linear progressiva (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade média da trajetória (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH,  $\mu\text{m}$ ), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

### 2.7.3 Integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal

A integridade estrutural das membranas, plasmática e acrossomal, dos espermatozoides foi avaliada pela técnica de fluorescência utilizando-se dois fluorocromos, o diacetato de carboxifluoresceína (DACF) e o iodeto de propídio (IP), segundo o protocolo proposto por Harrison e Vickers (1990) e modificado por Zúccari (1998). Para tanto, foi adicionado aos 40 $\mu\text{L}$  da solução de trabalho (20 $\mu\text{L}$  de DDCF, 10 $\mu\text{L}$  de IP, 10 $\mu\text{L}$  de formalina 40%, 960 $\mu\text{L}$  de citrato de sódio) 10  $\mu\text{L}$  de fluido, sendo a solução final incubada por oito minutos em banho-maria a 37°C. Os espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência (Nikon, Eclipse 80i), no aumento de 400X.

Foram avaliados 200 espermatozoides, considerando-se três categorias: íntegros (membrana plasmática e acrossomal íntegras; DDCF<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup>), lesados (membrana plasmática e acrossomal lesadas; DDCF<sup>-</sup>/IP<sup>+</sup>) e semi-lesados (membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal lesada; DDCF<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>). O resultado foi expresso em porcentagem.

## 2.8 Produção diária de espermatozoides, número de espermatozoides e tempo de trânsito epididimário

O parênquima testicular foi pesado e homogeneizado em 5 ml de solução salina-triton resfriada (NaCl a 0,9% e 0,05% Triton X 100 v/v) por 3 minutos. Em seguida, o homogenato foi diluído 10 vezes (1:10) na mesma solução e transferido para a câmara de Neubauer, onde foi contabilizado o número de espermátides (estágio 19 da espermiogênese) resistentes a homogeneização em duas câmaras de Neubauer por animal. Para determinar a produção diária de espermatozoides, o número de espermátides por testículo foi dividido por 6,1, que é o número de dias em que as espermátides maduras estão presentes no epitélio seminífero de ratos (Robb et al., 1978, Kempinas et al., 1998).

Espermatozoides da cabeça/corpo e da cauda do epidídimo foram contabilizados conforme descrito por Robb et al. (1978) e modificado por Kempinas et al. (1998). O epidídimo foi seccionado, sendo que 200 mg de tecido da cabeça/corpo e 100 mg de cauda foram homogeneizados em 1 mL de solução salina-triton por 3 minutos. Em seguida, cada homogenato obtido foi diluído 20 vezes (1:20) e os espermatozoides contabilizados em câmara de Neubauer. Para o cálculo do tempo de trânsito em cada região epididimária em dias, o número total de espermatozoide de cada segmento foi dividido pela produção espermática diária (Robb et al., 1978, Kempinas et al., 1998).

## 2.9 Variáveis reprodutivas das fêmeas acasaladas

As fêmeas foram eutanasiadas no 17º dia após o primeiro dia de acasalamento utilizando cloridrato de xilazina (10mg/kg/intraperitoneal) e quetamina (150mg/kg/intraperitoneal) para sedação e anestesia, seguido de deslocamento cervical. Após abertura da cavidade abdominal, retirou-se o aparelho reprodutor feminino para avaliação dos ovários e do útero. Os ovários foram dissecados, pesados e avaliados quanto a presença e quantidade de corpos lúteos. Já os cornos uterinos foram dissecados e abertos para quantificação das áreas de implantação e dos fetos.

A partir dessas avaliações foram determinadas as seguintes variáveis reprodutivas: taxa de acasalamento ( $n^\circ$  de fêmeas com espermatozoides presentes no esfregaço vaginal /  $n^\circ$  de fêmeas colocadas para acasalar X 100; números absolutos e percentual), taxa de prenhez: ( $n^\circ$  de fêmeas prenhes /  $n^\circ$  de fêmeas com espermatozoides

presentes no esfregaço vaginal X 100; números absolutos e percentual), potencial de fertilidade (sítios de implantação / corpo lúteo X 100), número de fetos, peso dos fetos (g), taxa de perda pré-implantação (nº de corpos lúteos - nº de implantações / nº de corpos lúteos X 100) e taxa de perda pós-implantação (nº de implantações - nº de fetos vivos / nº de implantações X 100) (Guerra et al., 2011).

## 2.10 Análise estatística

Os resultados foram avaliados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, sendo que os dados com distribuição normal submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de Student Newman Kells, para comparação entre médias. Já os resultados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis, sendo suas médias comparadas pelo teste de Dunn. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . Já os resultados obtidos para as taxas de acasalamento e prenhez, foram analisados descritivamente.

## 3. Resultados

### 3.1 Consumo alimentar semanal, peso corporal e peso absoluto e relativo dos órgãos reprodutivos

As médias para consumo alimentar semanal, peso corporal, peso absoluto e relativo dos órgãos reprodutivos, bem como ganho de peso corporal, não diferiram entre os animais do grupo controle e os animais que receberam oralmente uma das duas concentrações de arsenato ou arsenito de sódio ( $P > 0,05$ ; Tab. 1).

Tabela 1. Consumo alimentar semanal (CAS), Peso corporal (PC), Ganho de PC e peso absoluto e relativo dos órgãos genitais de ratos Wistar tratados com diferentes concentrações de arsênio, nas formas de arsenato e arsenito de sódio.

	Controle	Arsenato de sódio		Arsenito de sódio	
		0,01 mg/L	10 mg/L	0,01 mg/L	10 mg/L
CAS (g)	192,80±6,23	179,27±3,73	194,95±4,12	188,81±4,39	191,17±3,80
PC inicial (g)	276,52±7,37	273,02±3,65	274,53±6,25	267,45±4,17	281,86±2,69
PC <sup>1</sup> (g)	406,83±11,69	392,05±4,79	407,78±7,17	405,40±7,83	418,72±11,26
PC final <sup>2</sup> (g)	398,61±7,96	376,26±6,11	395,79±5,90	390,09±5,96	400,57±9,17
Ganho PC (g)	122,09±4,84	103,24±6,88	121,26±3,22	122,64±6,89	118,71±7,47
Testículo (g)	1,86±0,03	1,74±0,04	1,81±0,05	1,78±0,04	1,80±0,02
Testículo (g/100g)	0,47±0,01	0,46±0,01	0,46±0,01	0,46±0,01	0,45±0,02
Epidídimo (g)	0,62±0,03	0,60±0,03	0,62±0,01	0,57±0,02	0,65±0,04
Epidídimo (g/100g)	0,16±0,01	0,16±0,01	0,16±0,00	0,15±0,01	0,16±0,01
Glândula vesicular (g)	1,04±0,06	1,16±0,08	1,08±0,06	0,99±0,03	1,21±0,02
Glândula vesicular (g/100g)	0,26±0,01	0,31±0,02	0,27±0,02	0,25±0,00	0,30±0,01
Próstata ventral (g)	0,50±0,04	0,47±0,02	0,44±0,05	0,43±0,04	0,58±0,02
Próstata ventral (g/100g)	0,13±0,01	0,13±0,01	0,11±0,01	0,11±0,01	0,15±0,01

Valores expressos em média ± EPM. P > 0,05.

<sup>1</sup>56 dias de tratamento; <sup>2</sup>63 dias de experimento.

Ganho de PC (g) = PC final-PC inicial

### 3.2 Concentração sérica de testosterona

A concentração média de testosterona sérica dos animais expostos ao arsenato nas concentrações de 0,01 mg/L (1,18 ± 0,45 ng/mL) e 10 mg/L (0,66 ± 0,15 ng/mL) e arsenito de sódio nas respectivas concentrações (1,09 ± 0,29 ng/mL e 0,59 ± 0,17 ng/mL) não foi diferente do observado para os animais do grupo controle (0,53 ± 0,06 ng/mL; P > 0,05).

### 3.3 Histomorfometria epididimária

A análise histológica do epidídimo dos animais tratados com arsenato e arsenito de sódio não mostrou alterações na sua arquitetura tecidual, quando comparados aos animais controle. Os cortes histológicos de todas as regiões (Fig. 3 A - F) apresentaram secções de túbulo arredondado, compostos por epitélio pseudoestratificado prismático com estereocílios e presença de espermatozoides no lúmen (Fig. 3 G e H). Além disso,

não foram encontradas alterações no compartimento intertubular. Apenas no segmento inicial de ratos tratados com 0,01 mg/L de arsenato de sódio e com as duas concentrações de arsenito de sódio observou-se uma maior quantidade de vasos sanguíneos em diferentes diâmetros (Fig. 3 D e E). Na região da cabeça do epidídimo de todos os animais experimentais observou-se a formação de vesículas apicais originadas do epitélio epididimário e liberação de corpos multivesiculares das células claras (Fig. 3 H).

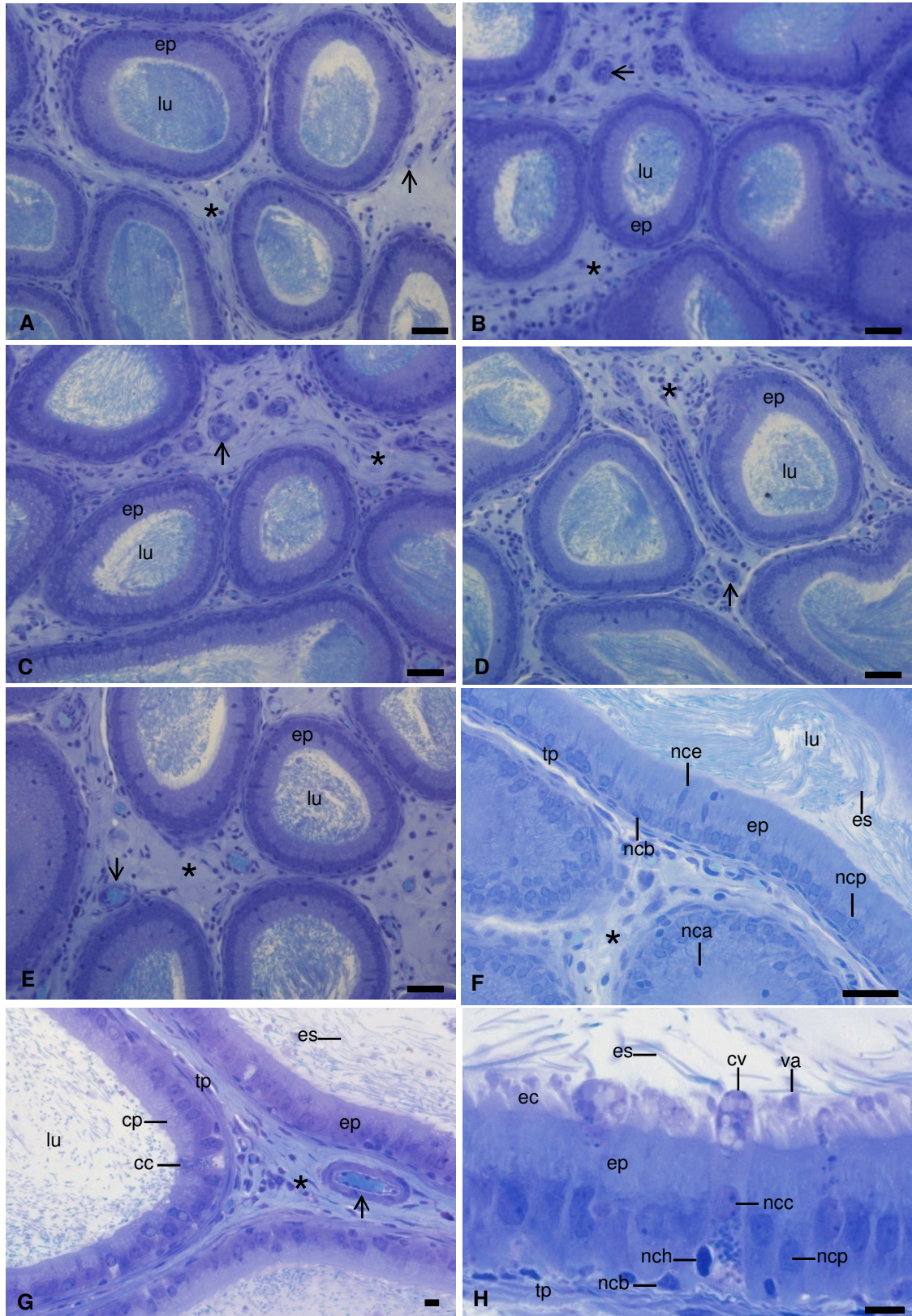


Figura 3 - Fotomicrografia de seções transversais do epidídimo. Segmento inicial de animais A) grupo controle; B e C) tratados com arsenato de sódio (0,01 mg/L e 10 mg/L, respectivamente); D, E e F) tratados com arsenito de sódio (0,01 mg/L, 10 mg/L e 10 mg/L, respectivamente). Região da cabeça em animais G e H) tratados com arsenato de sódio a 10 mg/L. lu: compartimento luminal, ep: epitélio, es: espermatozoide, asterisco: compartimento intertubular, seta: vaso sanguíneo, tp: túnica própria, ncp: núcleo de célula principal, nce: núcleo de célula estreita, ncb: núcleo de célula basal, nca: núcleo de célula apical, ncc: núcleo de célula clara, nch: núcleo de célula halo, cp: célula principal, cc: célula clara, ec: estereocílios, va: vesícula apical, cv: corpos multivesiculares. Coloração: Azul de Toluidina. Barra de escala: 40µm (A,B,C,D e F) e 10 µm (G e H).

Com relação a morfometria, o segmento inicial apresentou aumento no percentual médio de vasos sanguíneos nos animais tratados com 0,01mg/L de arsenato de sódio e com as duas concentrações de arsenito de sódio, em relação aos animais do grupo controle ( $P < 0,05$ ; Tab. 2), sendo o maior aumento observado no tratamento com 10mg/L de arsenito de sódio. Não houve diferença entre os grupos para o percentual dos demais componentes tubulares e intertubulares avaliados, bem como para a morfometria dos diâmetros, tubular e luminal, e altura de epitélio ( $P > 0,05$ ).

A morfometria e a proporção volumétrica das regiões da cabeça e corpo não apresentaram diferenças entre as médias para os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ), enquanto que a cauda apresentou diferença entre os tratamentos apenas no percentual de lúmen sem espermatozoide, que foi maior nos animais tratados com 10mg/L de arsenato e arsenito de sódio ( $P < 0,05$ ; Tab. 2).

Tabela 2 – Proporção volumétrica (%) dos componentes tubulares e intertubulares, diâmetro tubular (DT;  $\mu\text{m}$ ) e luminal (DL;  $\mu\text{m}$ ) e altura epitelial (AE;  $\mu\text{m}$ ) de ratos Wistar tratados com diferentes concentrações de arsênio, nas formas de arsenato e arsenito de sódio.

		Controle		Arsenato de sódio		Arsenito de sódio	
				0,01 mg/L	10 mg/L	0,01 mg/L	10 mg/L
Segmento Inicial	EP	46,07±20,60	51,14±22,87	47,64±21,30	44,25±19,78	44,02±19,68	
	LCE	24,82±11,10	14,73±6,59	13,88±6,20	14,94±6,68	16,04±7,17	
	LSE	2,61±1,16	2,65±1,19	2,99±1,33	4,08±1,82	4,70±2,10	
	TP	7,18±3,21	7,12±3,18	7,51±3,35	9,05±4,04	9,13±4,07	
	TC	18,27±8,17	22,60±10,11	26,62±11,90	25,77±11,52	23,95±10,71	
	VS <sup>1</sup>	1,05±0,46 <sup>a</sup>	1,76±0,76 <sup>bc</sup>	1,36±0,60 <sup>ab</sup>	1,91±0,85 <sup>bc</sup>	2,16±0,96 <sup>c</sup>	
	DT	175,82±78,63	146,42±65,48	141,00±63,06	146,33±65,44	159,10±71,15	
	DL	116,33±52,02	79,45±35,53	82,88±37,06	84,94±37,98	102,90±46,02	
	AE	29,74±13,30	33,48±14,97	29,06±12,99	30,69±13,72	28,10±12,56	
	Cabeça	EP	30,44±13,61	30,56±13,67	32,79±14,66	29,49±13,19	29,17±13,04
LCE		47,73±21,39	48,15±21,54	42,43±18,97	44,81±20,03	40,83±18,26	
LSE		6,18±2,76	6,21±2,78	8,69±3,88	7,74±3,45	12,80±5,72	
TP		5,40±2,42	5,32±2,38	6,65±2,97	8,29±3,70	7,34±3,28	
TC		9,18±4,11	9,03±4,04	8,74±3,90	8,82±3,94	8,83±,99	
VS		1,07±0,48	0,73±0,33	0,70±0,31	0,85±0,38	1,03±0,45	
DT		266,70±119,27	299,32±133,86	264,79±118,41	265,11±118,56	280,02±125,23	
DL		208,32±93,16	237,43±106,18	204,72±91,55	206,60±92,39	224,14±100,23	
AE		29,18±13,05	30,94±13,83	30,03±13,43	29,25±13,08	27,94±12,49	
Corpo		EP	28,83±12,89	29,81±13,33	26,97±12,06	31,51±14,09	30,65±13,70
	LCE	53,19±23,66	53,23±23,80	45,86±20,38	48,28±21,58	50,50±22,58	
	LSE	0,04±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00	0,01±0,00	0,15±0,06	
	TP	7,70±3,44	7,62±3,41	7,34±3,28	7,69±3,44	7,92±3,53	
	TC	9,23±4,26	8,50±3,80	18,13±8,21	11,35±5,07	9,51±4,25	
	VS	1,01±0,45	0,84±0,38	1,70±0,76	1,16±0,52	1,27±0,57	
	DT	263,30±117,75	283,47±126,77	259,83±116,20	246,04±110,03	253,45±113,35	
	DL	204,81±91,59	222,27±99,40	200,82±89,81	190,14±85,03	197,95±88,53	
	AE	29,24±13,07	30,59±13,68	29,50±13,19	27,95±12,50	27,74±12,41	
	Cauda	EP	18,03±8,06	18,87±8,44	17,38±7,77	19,33±8,64	19,44±8,69
LCE		60,53±27,07	59,95±26,81	50,43±22,55	51,35±22,96	54,22±24,24	
LSE <sup>2</sup>		2,77±1,24 <sup>a</sup>	2,59±1,16 <sup>a</sup>	9,48±4,24 <sup>b</sup>	7,43±3,31 <sup>ab</sup>	9,09±4,06 <sup>b</sup>	
TP		3,05±1,36	3,35±1,50	2,09±0,93	1,65±0,73	1,64±0,73	
TC		10,31±4,61	9,92±4,43	14,04±6,27	13,29±5,94	9,86±4,41	
VS		0,80±0,36	0,83±0,37	1,19±0,53	0,77±0,34	0,83±0,37	
TM		4,51±2,02	4,49±2,01	5,39±2,40	6,18±2,76	4,92±2,19	
DT		351,69±157,28	382,21±170,93	348,02±155,64	332,94±148,89	334,64±149,65	
DL		313,60±140,25	340,66±152,35	307,87±137,67	291,22±130,23	296,73±132,70	
AE		19,04±8,51	20,77±9,29	20,08±8,98	20,86±9,00	18,95±8,47	

Valores expressos em média  $\pm$  EPM. <sup>abc</sup>Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ). <sup>1</sup>Teste de Newman Keuls; <sup>2</sup>Teste de Dunn.

EP: epitélio; LCE: lúmen com espermatozoides; LSE: lúmen sem espermatozoides; TP: túnica própria; TC: tecido conjuntivo; VS: vasos sanguíneos; TM: tecido muscular.

### 3.4 Morfologia, motilidade e cinética espermáticas

As análises de morfologia, motilidade e cinética dos espermatozoides presentes no fluido epididimário não diferiram entre os animais submetidos aos tratamentos propostos ( $P > 0,05$ ; Tab.3).

Tabela 3. Morfologia, motilidade e cinética de espermatozoides do fluido da cauda do epidídimo de ratos Wistar tratados com diferentes concentrações de arsênio, nas formas de arsenato e arsenito de sódio.

	Controle	Arsenato de sódio		Arsenito de sódio	
		0,01 mg/L	10 mg/L	0,01 mg/L	10 mg/L
<i>Morfologia (%)</i>					
Normal	70,67±4,91	82,50±5,50	80,25±3,64	79,00±3,03	71,50±5,24
Defeito cabeça	9,33±4,26	4,75±1,03	10,50±2,63	6,25±1,65	12,75±3,01
Defeito peça intermediária	17,67±5,90	11,00±4,08	9,00±2,12	13,25±1,18	13,00±2,42
Defeito cauda	2,33±1,45	1,75±1,11	0,25±0,25	1,50±0,96	2,75±1,11
<i>Motilidade e cinética</i>					
MT (%)	82,70±6,36	82,68±3,07	85,92±2,85	86,49±1,64	75,63±21,21
MP (%)	59,50±6,39	51,67±6,08	53,03±9,45	56,08±3,25	44,68±11,70
VCL (µm/s)	54,41±1,58	47,67±5,16	50,89±7,92	49,10±1,48	43,03±5,98
VSL (µm/s)	37,11±1,83	28,76±4,17	33,16±7,97	32,31±1,97	25,60±5,70
VAP (µm/s)	42,73±1,84	34,86±4,45	38,85±7,87	37,61±1,84	31,52±5,76
LIN (%)	68,14±2,14	59,72±1,89	62,31±7,39	65,66±2,50	57,18±5,82
STR (%)	86,77±0,62	82,03±1,21	82,71±4,76	85,76±1,21	79,04±4,05
ALH (µm)	1,10±0,06	1,21±0,07	1,14±0,13	1,05±0,04	1,15±0,08

Valores expressos em média ± EPM.  $P > 0,05$ .

MT: Motilidade total; MP: Motilidade progressiva; VCL: Velocidade curvilínea; VSL: Velocidade linear progressiva; VAP: Velocidade média da trajetória; ALH: Amplitude de deslocamento lateral da cabeça; STR: Retilinearidade; LIN: Linearidade.

### 3.5 Integridade estrutural da membrana plasmática e acrossomal espermáticas

A avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática e acrossomal mostrou que animais expostos a 10 mg/L de arsenato e arsenito de sódio, nas duas concentrações, tiveram redução no percentual de espermatozoides com as membranas íntegras em comparação aos animais do grupo controle ( $P < 0,05$ ; Fig. 4). Não houve diferença no percentual de espermatozoides com membrana lesada e semi-lesada entre os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ).

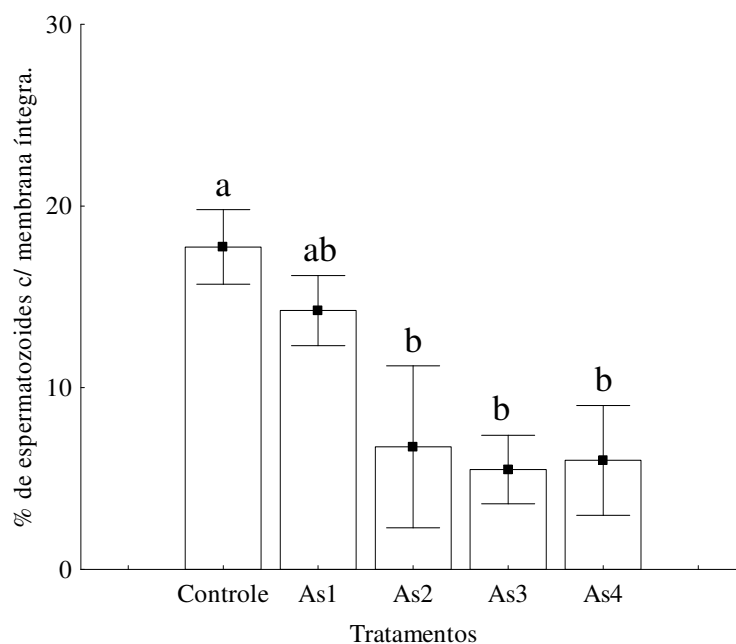


Figura 4 – Percentual (média  $\pm$  EPM) de espermatozoides com membrana plasmática e membrana acrossomal íntegra. Controle: solução salina a 0,9%, As1 e As2: 0,01mg/L e 10 mg/L de arsenato de sódio, As3 e As4: 0,01mg/L e 10 mg/L de arsenito de sódio. <sup>ab</sup>Letras diferentes entre as colunas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Newman Keuls ( $P < 0,05$ ).

### 3.6 Produção espermática diária, número de espermatozoides e tempo de trânsito epididimário

O número de espermátides maduras por testículo e grama de testículo e a produção diária de espermatozoides reduziu somente nos animais expostos a 10 mg/L de arsenito de sódio em comparação aos animais do grupo controle ( $P < 0,05$ ; Tab. 4). O número de espermatozoides na cabeça/corpo do epidídimo dos animais tratados com as duas concentrações de arsenito de sódio e 0,01 mg/L de arsenato de sódio foi menor em comparação aos animais controle e aqueles expostos a 10mg/L de arsenato ( $P < 0,05$ ; Tab. 4). O número de espermatozoides por grama de cabeça/corpo não se alterou entre os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ).

Quando analisada a cauda do epidídimo, foi observada redução no número de espermatozoide nos animais expostos a 0,01mg/L de arsenato e 10mg/L de arsenito de sódio em comparação aos animais do grupo controle ( $P < 0,05$ ; Tab. 4). No entanto, o número de espermatozoides por grama de cauda não se alterou ( $P > 0,05$ ). Não houve

diferença entre os grupos para o tempo de trânsito na cabeça/corpo e cauda do epididimo ( $P > 0,05$ ).

Tabela 4. Parâmetros de contagem espermática em testículo e epidídimo em animais tratados por 56 dias com 0,01 e 10 mg/L de arsênio, nas formas de arsenato e arsenito de sódio,.

	Controle	Arsenato de sódio		Arsenito de sódio	
		0,01 mg/L	10 mg/L	0,01 mg/L	10 mg/L
<i>n° espermátides no testículo</i>					
<sup>1</sup> Órgão (x10 <sup>6</sup> )	198,82±18,83 <sup>a</sup>	174,98±5,84 <sup>ab</sup>	180,56±5,27 <sup>ab</sup>	163,21±10,24 <sup>ab</sup>	142,05±1,73 <sup>b</sup>
<sup>1</sup> (g) de órgão (x10 <sup>6</sup> )	123,00±8,78 <sup>a</sup>	116,67±3,33 <sup>ab</sup>	114,47±9,79 <sup>ab</sup>	103,86±5,71 <sup>ab</sup>	90,79±4,83 <sup>b</sup>
<sup>1</sup> Produção diária de espermatozoide	32,59±3,10 <sup>a</sup>	28,68±0,95 <sup>ab</sup>	29,60±0,86 <sup>ab</sup>	26,75±1,67 <sup>ab</sup>	23,28±2,85 <sup>b</sup>
<i>n° espermatozoides no epidídimo</i>					
<sup>1</sup> Cabeça/corpo (x10 <sup>6</sup> )	131,82±6,46 <sup>a</sup>	94,22±5,34 <sup>c</sup>	116,26±5,05 <sup>ab</sup>	102,98±5,11 <sup>bc</sup>	92,39±1,58 <sup>c</sup>
Cabeça/corpo (x10 <sup>6</sup> /g)	478,95±79,65	321,66±21,34	352,50±18,49	331,66±14,45	289,16±10,31
<sup>1</sup> Cauda (x 10 <sup>6</sup> )	169,83±10,85 <sup>a</sup>	137,59±2,97 <sup>b</sup>	147,39±9,00 <sup>ab</sup>	148,87±3,78 <sup>ab</sup>	127,52±4,35 <sup>b</sup>
Cauda (x 10 <sup>6</sup> /g)	701,30±199,75	648,33±34,65	698,33±18,27	622,95±43,58	574,16±22,65
<i>Tempo de transito em dias</i>					
Cabeça/corpo	4,14±0,57	3,28±0,78	3,94±0,28	3,89±0,39	3,97±0,11
Cauda	5,32±1,25	4,80±0,17	4,99±0,35	5,60±0,36	5,43±0,15

Valores expressos em média ± EPM. <sup>abc</sup>Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Newman Keuls (P < 0,05)

### 3.7 Variáveis reprodutivas das fêmeas

Foi observada redução de 16,67% e 8,33% na taxa de acasalamento nos animais expostos a 0,01 mg/L e 10 mg/L de arsenato de sódio respectivamente, em comparação aos animais do grupo controle. Já para a taxa de prenhez, foi observada redução de 31,82% das fêmeas prenhes de machos que ingeriram arsenato 0,01 mg/L e arsenito de sódio 10 mg/L e redução de 18,18% de fêmeas prenhes de machos expostos a 10 mg/L de arsenato de sódio.

Não foram observadas diferenças entre os grupos para peso de ovários, número de corpos lúteos, número de implantações, número de fetos, potencial de fertilidade, taxa de perda pré-implantação, taxa de perda pós-implantação ( $P > 0,05$ ; Tab 5). Foi observado aumento no peso médio de fetos provenientes do acasalamento de fêmeas não tratadas com machos que receberam oralmente 10mg/L de arsenito de sódio ( $P < 0,05$ ; Tab. 5).

Tabela 5: Tabela 5: Fertilidade de ratos Wistar tratados com diferentes concentrações de arsênio, nas formas de arsenato e arsenito de sódio, após acasalamento natural com fêmeas não tratadas.

	Controle	Arsenato de sódio		Arsenito de sódio	
		0,01 mg/L	10 mg/L	0,01 mg/L	10 mg/L
n° fêmeas colocadas para acasalar <sup>1</sup>	11	12	12	12	12
n° de fêmeas com monta natural confirmada <sup>1*</sup>	11	10	11	12	12
Taxa de acasalamento (%)	100,00	83,33	91,67	100,00	100,00
n° fêmeas prenhes <sup>1</sup>	9	5	7	10	6
Taxa de prenhez (%)	81,82	50,00	63,64	83,33	50,00
Peso dos ovários <sup>2**</sup>	0,13±0,04	0,11±0,04	0,12±0,04	0,13±0,04	0,18±0,05
n° de corpos lúteos <sup>2**</sup>	13,64±4,11	13,50±4,27	12,00±3,62	11,33±3,27	11,17±3,22
n° de implantações <sup>2**</sup>	9,73±2,93	5,90±1,87	9,30±2,94	9,50±2,75	6,08±1,76
Potencial de fertilidade (%) <sup>2**</sup>	71,04±21,42	40,60±12,84	60,57±18,26	66,67±21,07	40,62±11,73
n° de fetos <sup>2**</sup>	9,27±2,80	5,90±1,70	9,20±2,91	9,25±2,67	6,08±1,76
Peso dos fetos (g) <sup>2</sup>	3,04±1,01 <sup>a</sup>	5,17±2,31 <sup>ab</sup>	2,55±0,97 <sup>a</sup>	3,20±1,01 <sup>a</sup>	6,87±2,80 <sup>b</sup>
Taxa de perda pré-implantação (%) <sup>2**</sup>	28,96±8,73	59,40±18,78	30,34±9,15	33,37±10,55	59,38±17,14
Taxa de perda pós-implantação (%) <sup>2**</sup>	4,10±1,37	0,00±0,00	1,10±0,42	2,44±0,77	0,00±0,00

<sup>1</sup>N° absoluto; <sup>\*</sup>Espermatozoides presentes na análise do esfregaço vaginal. <sup>2</sup>Valores expressos em média ± EPM; <sup>2\*\*</sup> P > 0,05.

<sup>ab</sup>Letras diferentes na mesma linha diferem entre si (P < 0,05) pelo teste de Newman Keuls.

#### 4 Discussão

Os resultados obtidos mostraram que o arsênio, quando ingerido diariamente por 56 dias, nas concentrações de 0,01 e 10 mg/L como arsenato e arsenito de sódio, causou alterações significativas, de forma variada, em parâmetros testiculares, epididimários, espermáticos e de fertilidade, sendo o arsenito a forma química causadora de grande parte das alterações.

Com relação aos parâmetros testiculares, animais que receberam 10 mg/L de arsenito de sódio apresentaram redução na produção espermática diária, no número de espermátides por testículo e por grama de testículo. Esses parâmetros são importantes indicadores da fertilidade masculina, pois o número de espermátides maduras está diretamente relacionado à produção diária de espermatozoides (França e Russell, 1998; Fernandez et al., 2007). Essas alterações testiculares causaram redução do número de espermatozoides nas regiões da cabeça/corpo e cauda, sendo essa redução na região da cauda confirmada pelo aumento do percentual de lúmen sem espermatozoides. Working et al. (1985) citam que a redução na contagem de espermátides testiculares é indicativo de que houve depleção ou degeneração de células da linhagem germinativa em estádios anteriores à fase de espermátide. Jana et al. (2006), ao avaliarem os efeitos da ingestão de arsenito de sódio na concentração de 5mg/kgPC durante 24 dias, relataram redução no número de diferentes células da linhagem germinativa com conseqüente redução no número de espermatozoides epididimários. Li et al. (2012b) observaram que camundongos expostos a 2 e 4mg/L de trióxido de arsênio, na água de beber por 60 dias, apresentaram redução no número de diferentes linhagens das células germinativas seguida de redução no peso do epidídimo.

Alterações no número de espermatozoides na região da cabeça/corpo do epidídimo foram observadas em animais que receberam 0,01 mg/L de arsenato e de arsenito, assim como na região da cauda quando fornecido 0,01 mg/L de arsenato. No entanto, essas alterações não foram significativas quando calculou-se o número de espermatozoides por grama de epidídimo. No caso do arsenato de sódio 0,01 mg/L, este resultado pode ter ocorrido devido a um aumento no volume de fluido na luz do ducto, sem alteração no peso do epidídimo, já que estes animais não apresentaram redução da produção espermática diária. O aumento do fluido luminal provavelmente contribuiu para o aumento do diâmetro tubular e luminal do epidídimo desses animais, mesmo que

estatisticamente não significativo, e diluiu os espermatozoides presentes nestas regiões epididimárias.

Arsenito e arsenato de sódio, nas duas concentrações avaliadas, não foram capazes de alterar a produção de testosterona no tempo de exposição de 56 dias. A manutenção da concentração plasmática de testosterona nos animais se refletiu na manutenção do peso absoluto e relativo dos órgãos andrógeno-dependentes avaliados. Segundo Reddy et al. (2011), camundongos expostos a 4 mg/L de arsenito de sódio na água de beber, por 35 dias, apresentaram redução na produção de testosterona sérica devido a diminuição da atividade de  $3\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase e  $17\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase testicular, com consequente redução do peso de órgãos andrógeno-dependentes. A diferença entre respostas observadas no presente trabalho e em Reddy et al. (2011), com relação a produção de testosterona, provalvemente se deveu as espécies estudadas, pois sabe-se que os camundongos são mais sensíveis ao arsênio que os ratos (Hughes, 2002; Deschamps e Matschullat, 2007).

No presente trabalho não foi observada alteração no tempo de trânsito dos espermatozoides no epidídimo dos animais avaliados. Sabe-se que o tempo de trânsito é regulado por andrógenos, gradiente de pressão hidrostática diferencial entre as porções proximal e distal do epidídimo e atividade contrátil do músculo liso presente ao redor do ducto (Cosentino e Cockett, 1986; Robaire e Viger, 1995; Klinefelter, 2002). Dados da literatura mostram que o atraso no tempo de trânsito epididimário não altera a capacidade fértil dos espermatozoides, mas quando este tempo é acelerado a fertilidade fica comprometida. Este prejuízo ocorre porque o tempo disponível dos processos requeridos para a aquisição da capacidade fértil fica diminuído (Kempinas et al., 1998; Garcia et al., 2012).

Como consequência da manutenção do tempo de trânsito dos espermatozoides, não foi observada alteração no percentual de espermatozoides normais, na motilidade e cinética espermáticas nos animais que ingeriram arsênio nas formas químicas e concentrações testadas. No entanto, observou-se redução no percentual de espermatozoides com membranas, plasmática e acrossomal, estruturalmente íntegras dos animais tratados com arsenito, nas duas concentrações, e 10 mg/L de arsenato. O baixo percentual de espermatozoides com membranas estruturalmente íntegras pode ser explicado pela ação do arsênio sobre fosfolipídios e proteínas presentes na membrana plasmática das células em geral e nos espermatozoides (Minassian e Terner, 1966; Flora, 2011). Isso porque muitos dos fosfolipídios são compostos por ácidos graxos

polinsaturados altamente susceptíveis a peroxidação lipídica quando expostos ao arsênio. Esta reação química pode resultar na perda de fosfolipídeos por degradação, causando desestabilização e lesão de membranas (Griveau e Le Lannou, 1997; Lamirande et al., 1997; Carpenter et al., 2002; Chang et al., 2007; Flora, 2011; Reddy et al., 2011). Além disso, proteínas integrais de membranas plasmáticas celulares, inclusive dos espermatozoides, podem conter grupos sulfidril em sua constituição, que são responsáveis pela formação de pontes de sulfeto entre as moléculas. O arsênio, devido a sua natureza eletrolítica, pode inibir a ação dos grupos sulfidril e interferir na integridade das membranas dos espermatozoides (DeSesso et al., 1998; Hughes et al., 2011; Gualtieri et al., 2009).

Não foi observada alteração na arquitetura tecidual epididimária de todos os animais avaliados. No entanto, animais expostos a 0,01 mg/L de arsenato de sódio e nas duas concentrações de arsenito de sódio apresentaram aumento no número de vasos em diferentes diâmetros, fenômenos observados na histologia, e aumento no percentual de vasos sanguíneos na região do segmento inicial. Este resultado pode ser devido ao efeito do arsênio sobre a atividade angiogênica tecidual (Soucy et al., 2003; Straub et al., 2007). Estudos *in vivo* e *in vitro* têm mostrado que o arsênio é capaz de promover o surgimento de novos vasos sanguíneos por estimular a expressão de fator de crescimento endotelial vascular e fator induzido por hipóxia (Kamat et al., 2005; Klei e Barchowsky, 2008; Wang et al., 2013).

A avaliação de parâmetros de fertilidade mostrou que machos expostos a 0,01 mg/L de arsenato de sódio e 10 mg/L de arsenito de sódio apresentaram queda na taxa de prenhez e no potencial de fertilidade e aumento na taxa de perda pré implantação. Para o arsenito, estes resultados podem ter ocorrido devido a redução na produção espermática diária, no número de espermatozoides presentes nas regiões epididimárias e no percentual de espermatozoides com integridade estrutural de suas membranas. Apesar de não ter sido observada diferença estatística entre os tratamentos para estes parâmetros, é importante considerar o significado biológico desses achados, pois testes de fertilidade *in vivo* estão diretamente relacionados ao real potencial reprodutivo dos machos (Favareto et al., 2011; Garcia et al., 2012). Não foram encontrados trabalhos que avaliam a capacidade fecundante e taxas de fertilidade de machos após ingestão de diferentes formas químicas do arsênio.

Quando avaliada a concentração de 0,01mg/L de arsênio, considerada tolerável por organizações nacionais e internacionais (BRASIL, 2005; WHO, 2011) na água de

beber, observou-se que arsenito e arsenato alteraram poucos parâmetros avaliados neste estudo. Ambos os compostos alteraram o percentual de vasos sanguíneos no segmento inicial, o número de espermatozoides nas regiões epididimárias analisadas e, no caso do arsenito, o percentual de espermatozoides íntegros. Entretanto, ao considerar parâmetros de fertilidade, o arsenato a 0,01 mg/L teve efeito similar ao arsenito a 10 mg/L. Vale ressaltar que baixas concentrações, como as testadas, podem se acumular em diversos tecidos corporais, como testículo e epidídimo (Cui e Okayano, 2008).

Quando absorvido, o arsenato entra nas células, como em hepatócitos e hemácias, via transportadores de fosfato, e é rapidamente reduzido em arsenito. Já o arsenito pode entrar nas células a partir das aquaporinas presentes na membrana, principalmente as aquaporinas do tipo 7 e 9 (Liu et al., 2002; Watanabe e Hirano, 2013). O epidídimo é rico em aquaporinas 9 na superfície apical das células principais (Agre et al., 1995; Pastor-Soler et al., 2001) e possui na região da cauda a enzima arsênio metiltransferase, que converte o arsênio em metil e dimetilarsênico, como ocorre no fígado previamente a eliminação do arsênio pela bile (Liu et al., 2002; Watanabe e Hirano, 2013). Este fato pode ter contribuído para a minimização dos efeitos das concentrações testadas sobre os parâmetros pós-testiculares avaliados, principalmente em relação a concentração de 0,01 mg/L após 56 dias de exposição.

## 5 Conclusões

- As concentrações e formas químicas de arsênio testadas não alteraram ingestão alimentar, peso corporal e dos órgãos genitais, concentração sérica de testosterona, a morfologia avaliada em cortes histológicos e tempo de trânsito epididimário e a maioria dos parâmetros espermáticos analisados;
- A proporção de vasos sanguíneos aumentou no segmento inicial do epidídimo de animais expostos as duas concentrações de arsenito de sódio e 0,01 mg/L de arsenato de sódio;
- A proporção de lúmen sem espermatozoide na cauda do epidídimo foi maior em animais expostos a 10 mg/L de arsenato e arsenito de sódio;
- O percentual de espermatozoides íntegros reduziu nos animais expostos a 10mg/L de arsenato de sódio e arsenito de sódio, nas duas concentrações;
- O número de espermátides por testículo e grama de testículo e a produção diária de espermatozoides diminuiu nos animais expostos a 10 mg/L de arsenito de sódio;

- O número de espermatozoides na cabeça/corpo foi menor nos animais tratados com as duas concentrações de arsenito de sódio e 0,01 mg/L de arsenato de sódio;
- Houve redução no número de espermatozoides na cauda do epidídimo de animais expostos oralmente a 0,01mg/L de arsenato e 10mg/L de arsenito de sódio;
- Houve redução no índice de prenhez para as fêmeas acasaladas com machos expostos oralmente as duas concentrações de arsenato de sódio e 10mg/L de arsenito de sódio.

## 6 Referências

AGRE P, BROWN D, NIELSEN S. 1995. Aquaporin water channels: unanswered questions and unresolved controversies. *Curr Opin Cell Biol* 7(4): 472-83.

AHMAD I, AKTHAR KM, HUSSAIN T. 2008. Arsenic induced microscopic changes in rat testis. *Professional Med J* 15: 287-91.

BRASIL. Resolução N° 357, de 17 de Março 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Publicada no Diário Oficial da União nº 053, de 18 de março de 2005. 58-63.

BYERS SL, WILES MV, DUNN SL, TAFT RA. 2012. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One* 7(4): e35538.

CARPENTER DO, ARCARO K, SPINK DC. 2002. Understanding the human health effects of chemical mixtures. *Environ Health Perspect* 110 (1): 25-42.

CHANG SI, JIN B, YOUN P, PARK C, PARK JD, RYU DY. 2007. Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicol Appl Pharmacol* 218(2): 196-203.

CHEN B, ARNOLD LL, COHEN SM, THOMAS DJ, LE XC. 2011. Mouse arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase genotype affects metabolism and tissue dosimetry of arsenicals after arsenite administration in drinking water. *Toxicol Sci* 124(2): 320-26.

CORNWALL GA. 2009. New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 15: 213-27.

COSENTINO MJ, COCKETT ATK. 1986. Review Article: Structure and Function of the Epididymis. *Urol Res* 14:229-240.

CUI X, OKAYASU R. 2008. Arsenic accumulation, elimination, and interaction with copper, zinc and manganese in liver and kidney of rats. *Food Chem Toxicol* 46(12): 3646-50.

DESCHAMPS E, MATSCHULLAT J. 2007. Arsênio antropogênico e natural: um estudo em regiões do Quadrilátero Ferrífero. Belo Horizonte: Fundação Estadual do Meio Ambiente, 38-44.

DESESSO JM, JACOBSON CF, SCIALLI AR, FARR CH, HOLSON JF. 1998. An assessment of the developmental toxicity of inorganic arsenic. *Reprod Toxicol* 12(4): 385-433.

FAVARETO AP, DE TOLEDO FC, KEMPINAS WDE G. 2011. Paternal treatment with cisplatin impairs reproduction of adult male offspring in rats. *Reprod Toxicol* 32(4): 425-33.

FERNANDES GS, ARENA AC, FERNANDEZ CD, MERCADANTE A, BARBISAN LF, KEMPINAS WG. 2007. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod Toxicol* 23(1): 106-12.

FLORA SJ. 2011. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic Biol Med* 51(2): 257-81.

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

GARCIA PV, BARBIERI MF, PEROBELLI JE, CONSONNI SR, MESQUITA SDE F, KEMPINAS WDE G, PEREIRA LA. 2012. Morphometric-stereological and functional epididymal alterations and a decrease in fertility in rats treated with finasteride and after a 30-day post-treatment recovery period. *Fertil Steril* 97(6): 1444-51

GILBERT SF. 2003. *Developmental Biology*. 7th ed. USA: Sinauer Associates Inc.

GRIVEAU JF, LE LANNOU D. 1997. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 20(2): 61-9.

GUALTIERI R, MOLLO V, DUMA G, TALEVI R. 2009. Redox control of surface protein sulphhydryls in bovine spermatozoa reversibly modulates sperm adhesion to the oviductal epithelium and capacitation. *Reproduction* 138(1): 33-43.

GUERRA MT, DE TOLEDO FC, KEMPINAS WDE G. 2011. In utero and lactational exposure to fenvalerate disrupts reproductive function in female rats. *Reprod Toxicol* (3):298-303.

HARRISON RAP, VICKERS, SE. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 88: 343-352.

HUGHES MF, BECK BD, CHEN Y, LEWIS AS, THOMAS DJ. 2011. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicol Sci* 123(2): 305-32.

JANA K, JANA S, SAMANTA PK. 2006. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. *Reprod Biol Endocrinol* 16: 4-9.

KAMAT CD, GREEN DE, CURILLA S, WARNKE L, HAMILTON JW, STURUP S, CLARK C, IHNAT MA. 2005. Role of HIF signaling on tumorigenesis in response to chronic low-dose arsenic administration. *Toxicol Sci* 86(2): 248-57.

KEMPINAS WG, SUAREZ JD, ROBERTS NL, STRADER L, FERRELL J, GOLDMAN JM, ET AL. 1998. Rat epididymal sperm quantity, quality and transit time after guanethidine-induced sympathectomy. *Biol. Reprod.* 59: 890–896.

KLEI LR, BARCHOWSKY A. 2008. Positive signaling interactions between arsenic and ethanol for angiogenic gene induction in human microvascular endothelial cells. *Toxicol Sci* 102(2): 319-27.

KLINEFELTER GR. 2002. Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. In: 29 Robaire B, Hinton BT, editors. The Epididymis – from molecules to clinical practice. 30 New York: Kluwer Academic/ Plenum Publisher 353-369.

KUROOKA H, SUGAI M, MORI K, YOKOTA Y. 2013. The metalloid arsenite induces nuclear export of Id3 possibly via binding to the N-terminal cysteine residues. *Biochem Biophys Res Commun* 433(4): 579-85

LAMIRANDE E, JIANG H, ZINI A, KODAMA H, GAGNON C. 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 2(1): 48-54.

LI Y, WANG M, PIAO F, WANG X. 2012. Subchronic exposure to arsenic inhibits spermatogenesis and downregulates the expression of ddx3y in testis and epididymis of mice. *Toxicol Sci* 128(2): 482-89.

LIU Z, SHEN J, CARBREY JM, MUKHOPADHYAY R, AGRE P, ROSEN BP. 2002. Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(9): 6053-8.

MINASSIAN ES, TERNER C. 1966. Biosynthesis of lipids by human and fish spermatozoa. *Am J Physiol* 210(3): 615-8.

NAUJOKAS MF, ANDERSON B, AHSAN H, APOSHIAN HV, GRAZIANO JH, THOMPSON C, SUK WA. 2013. The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem. *Environ Health Perspect* 121(3): 295-302.

NEVES RNP, CARVALHO F, CARVALHO M, FERNANDES E, SOARES E, BASTOS ML, ET AL. 2004. Protective activity of hesperidin and lipoic acid against sodium arsenite acute toxicity in mice. *Toxicol Pathol* 32: 527-35.

PANT N, KUMAR R, MURTHY RC, SRIVASTAVA SP. 2001. Male reproductive effect of arsenic in mice. *Biometals* 14: 113-17.

PASTOR-SOLER NM, FISHER JS, SHARPE R, HILL E, VAN HOEK A, BROWN D, BRETON S. 2010. Aquaporin 9 expression in the developing rat epididymis is modulated by steroid hormones. *Reproduction* 139(3): 613-21.

REDDY PS, RANI GP, SAINATH SB, MEENA R, SUPRIYA CH. 2011. Protective effects of N-acetylcysteine against arsenic-induced oxidative stress and reprotoxicity in male mice. *J Trace Elem Med Biol* 25(4): 247-53.

REN X, MCHALE CM, SKIBOLA CF, SMITH AH, SMITH MT, ZHANG L. 2011. An emerging role for epigenetic dysregulation in arsenic toxicity and carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 119(1): 11-9.

ROBAIRE B, VIGER RS. 1995. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod* 52(2): 226-36.

ROBB GW, AMMAN RP, KILLIAN GJ. 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil* 54: 103-7.

RUSSELL LD, ETTLIN RA, HIKIM APS, CLEGG ED. 1990. *Histological And Histopathological Evaluation Of The Testis*. Cache River Press, Florida: Cache River Press 1990; 1-40.

SOUCY NV, IHNAT MA, KAMAT CD, HESS L, POST MJ, KLEI LR, CLARK C, BARCHOWSKY A. 2003. Arsenic stimulates angiogenesis and tumorigenesis in vivo. *Toxicol Sci* 76(2): 271-9.

STATES JC, BARCHOWSKY A, CARTWRIGHT IL, REICHARD JF, FUTSCHER BW, LANTZ RC. 2011. Arsenic toxicology: translating between experimental models and human pathology. *Environ Health Perspect* 119(10): 1356-63.

STRAUB AC, STOLZ DB, VIN H, ROSS MA, SOUCY NV, KLEI LR, BARCHOWSKY A. 2007. Low level arsenic promotes progressive inflammatory angiogenesis and liver blood vessel remodeling in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 222(3): 327-36.

WANG Z, HUMPHRIES B, XIAO H, JIANG Y, YANG C. 2013. Epithelial to mesenchymal transition in arsenic-transformed cells promotes angiogenesis through activating  $\beta$ -catenin-vascular endothelial growth factor pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 271(1): 20-29.

WATANABE T, HIRANO S. 2013. Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. *Arch Toxicol* 87(6): 969-79.

WORKING PK, BUS JS, HAMM TE JR. 1985. Reproductive effects of inhaled methyl chloride in the male Fischer 344 rat. II. Spermatogonial toxicity and sperm quality. *Toxicol Appl Pharmacol* 77(1): 144-57.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. 2011. Guidelines for drinking water quality. 4th Edition. Geneva.

ZÚCCARI CESN. 1998. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina. 121f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.