

**WELLINGTON DE SOUZA MATA**

**TOXICIDADE DO ARSENATO E EFEITO PROTETOR DO GUARANÁ  
E DA VITAMINA E NO APARELHO REPRODUTOR DE  
CAMUNDONGOS MACHOS ADULTOS.**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2009**

**WELLINGTON DE SOUZA MATA**

**TOXICIDADE DO ARSENATO E EFEITO PROTETOR DO GUARANÁ E DA  
VITAMINA E NO APARELHO REPRODUTOR DE CAMUNDONGOS**

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

APROVADA: 18 de dezembro de 2009.

---

Prof<sup>a</sup>. Maria do Carmo G. Peluzio  
(Co-orientadora)

---

Prof. Juraci Alves de Oliveira  
(Co-orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Mariana Machado Neves

---

Prof<sup>a</sup>. Juliana Silva Rocha

---

Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta  
(Orientador)

**A Deus pelo Dom da Vida e pela Esperança Renovada  
a Cada Dia.  
A minha Família  
Aos amigos.**

**Ao meu orientador Sérgio Luis Pinto da Matta.**

“O que faz a estrada? É o sonho. Enquanto a gente sonhar a estrada permanecerá viva. É para isso que servem os caminhos, para nos fazerem parentes do futuro”

(Mia Couto).

## AGRADECIMENTOS

**A Deus**, por esta existência e por este momento tão especial a que eu sempre almejei. Não só este trabalho, mas todas as ações da minha vida só tiveram sentido quando o intuito principal foram o de lhe servir.

**A meu Pai, Aluizio da Mata Pereira, a minha mãe, Odeni de Souza Pereira**, a minha irmã **Wérica de Souza Mata**. É preciso renovar a esperança sempre e acreditar que amanhã tudo pode ser diferente.

**Ao Izaedis Machado da Silva**, pela amizade e companheirismo sempre.

**Ao meu Orientador, Sérgio Luis Pinto da Matta**, os meus sinceros agradecimentos pela oportunidade, pelo tempo dispensado, pelo esforço para que sempre fossem obtidos os melhores resultados. Sua determinação, disciplina e o carisma que lhe é inerente são seu principal legado como orientador. Obrigado pela confiança e por ajudar a escrever minha história.

**Aos meus coorientadores Maria do Carmo Gouveia Peluzio e Juraci Alves de Oliveira** por todo empenho e tempo dispensado para que esse trabalho se concretizasse. Muito Obrigado pela atenção dispensada.

**À Universidade Federal de Viçosa (UFV)**. Pela contribuição responsável em capacitar novos profissionais.

**Aos professores do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural – Universidade Federal de Viçosa – UFV**. Agradeço pela oportunidade, disposição e sugestões ao longo do curso.

**Ao Centro Universitário de Caratinga – UNEC** – Pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional.

**Aos amigos do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural** - Obrigado por todo apoio e amizade ao longo deste período, foi fundamental a participação de vocês na concretização desse projeto. Valeu!

**Aos grandes amigos de hoje e sempre.** Quero ser sempre amigo, nem demais e nem de menos. Nem tão longe e nem tão perto. Na medida mais precisa que eu puder. Mas amar-te, sem medida, e ficar na tua vida, da maneira mais discreta que eu souber. (Pe. Zezinho).

## BIOGRAFIA

Wellington de Souza Mata, filho de Aluizio da Mata Pereira e Odeni de Souza Pereira, nasceu em Lajinha, Minas Gerais, em 14 de dezembro de 1974.

Em Dezembro de 1997 graduou-se como Licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais. Durante sua graduação, desenvolveu trabalhos como monitor e bolsista de iniciação científica nos departamentos de Morfologia e Microbiologia da UFMG.

Em março de 1998, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia no Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, defendendo a dissertação em 25 de janeiro de 2000 com o título “Estudo da atividade hemolítica de amostras do gênero *Fusobacterium* isoladas da cavidade oral de primatas humanos e não humanos”.

Em fevereiro de 2000, ingressou-se no Centro Universitário de Caratinga (UNEC), onde permanece como docente de Histologia e Embriologia. Atualmente é Coordenador Geral da CPA-UNEC (Comissão Própria de Avaliação).

Em março de 2007, ingressou no programa de doutorado em Biologia Celular e Estrutural na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>X</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XII</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>01</b>
1. SISTEMA ANTIOXIDANTE E ESTRESSE OXIDATIVO NOS TESTÍCULOS .....	01
2. ASPECTOS QUÍMICOS DO ARSÊNIO .....	03
3. O ARSÊNIO E A SAÚDE HUMANA .....	05
4. FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO .....	07
5. ORGANIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL DO TESTÍCULO .....	08
6. ESPERMATOGÊNESE .....	10
7. CÉLULA DE SERTOLI .....	12
8. CÉLULA DE LEYDIG .....	13
9. PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS DO GUARANÁ ( <i>Paullinia cupana</i> ) E DA VITAMINA E .....	15
11. REFERÊNCIAS .....	18
<b>1. Presença de arsênio em órgãos do aparelho reprodutor masculino, fígado, rim e osso após administração de arsenato de sódio, associado ou não ao tratamento com guaraná (<i>Paullinia cupana</i>) e vitamina E em camundongos Suíços adultos</b>	
RESUMO .....	29
1. INTRODUÇÃO .....	31
2. MATERIAL E MÉTODO .....	33
2.1. Preparo da suspensão .....	33
2.2. Animais, Grupos Experimentais e Tratamentos .....	34
2.3. Coleta de Amostras .....	35
2.4. Determinação dos teores de arsênio .....	35
2.5. Análises estatísticas .....	35
3. RESULTADOS .....	36
4. DISCUSSÃO .....	37
5. CONCLUSÕES .....	41
6. REFERÊNCIAS .....	42
<b>2. Estresse oxidativo induzido por administração de arsenato de sódio e possível papel protetor do guaraná (<i>Paullinia cupana</i>) e vitamina E em transaminases séricas e características testiculares de camundongos adultos.</b>	
RESUMO .....	55
1. INTRODUÇÃO .....	57
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	59
2.1. Preparo da suspensão .....	9
2.2. Coleta de Amostras .....	59
2.3. Análises morfológicas e morfométricas .....	60

2.3.1. Proporções volumétricas (%) e volume dos componentes do testículo .....	61
2.3.2. Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos .....	61
2.4. Análises estatísticas .....	62
3. RESULTADOS .....	62
4. DISCUSSÃO .....	63
5. CONCLUSÕES .....	66
6. REFERÊNCIAS .....	66
<b>3. Morfometria do compartimento tubular de testículos de camundongos adultos expostos a arsenato de sódio e suplementados com Guaraná (<i>Paullinia cupana</i>) e Vitamina E.</b>	
RESUMO .....	76
INTRODUÇÃO .....	78
MATERIAL E MÉTODOS .....	79
2.1. Preparo da suspensão .....	79
2.2. Animais, Grupos Experimentais e Tratamento .....	80
2.3. Coleta de Amostras e preparação histológica .....	80
2.4. Contagem da população celular de túbulos no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero .....	81
2.5. Razões entre os números celulares .....	82
2.6. Número de células de Sertoli por testículo .....	83
2.7. Cálculo da produção espermática diária por testículo e por grama de testículo .....	83
2.8. Análises estatísticas .....	84
3. RESULTADOS .....	84
DISCUSSÃO .....	85
5. CONCLUSÕES .....	88
6. REFERÊNCIAS .....	88
<b>4. Administração oral de arsenato de sódio e ação do guaraná (<i>Paullinia cupana</i>) e vitamina E como protetores dos componentes intertubulares do testículo de camundongos Suíços adultos.</b>	
RESUMO .....	99
INTRODUÇÃO .....	101
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	103
2.1. Preparo da suspensão .....	103
2.2. Animais, Grupos Experimentais e Tratamento .....	103
2.3. Coleta de Amostras e preparação histológica .....	104
2.4. Proporção volumétrica e volume dos elementos do intertúbulo .....	104
2.5. Morfometria da célula de Leydig .....	105
2.6. Dosagem hormonal .....	106
2.7. Análises estatísticas .....	106
3. RESULTADOS .....	106

4.DISSCUSSÃO .....	107
5. CONCLUSÕES.....	111
6. REFERÊNCIAS .....	112
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>123</b>

## RESUMO

MATA, Wellington de Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2009.  
**Toxicidade do arsenato e efeito protetor do guaraná e da vitamina E no aparelho reprodutor de camundongos machos adultos.** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.  
Coorientadores: Juraci Alves de Oliveira e Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

A exposição ao arsênio (As) pode ocorrer, principalmente, pela água de beber e, em algumas situações, por ingestão de alimentos contaminados, inalação e absorção cutânea. Processos naturais, industriais e antrópicos têm contribuído para aumentar os teores de As no meio. O As influencia a função reprodutiva masculina, afetando o processo espermatogênico, e várias evidências indicam sua ação tóxica está relacionado ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. Estes efeitos deletérios podem ser minimizados pela administração de diversas substâncias, incluindo aminoácidos, vitaminas e compostos quelantes. O guaraná, planta originária da região amazônica, é rico em cafeína, flavonóides e taninos com propriedades antioxidantes, sendo utilizado na fitoterapia para a prevenção e o tratamento de doenças relacionadas ao desequilíbrio da atividade oxidante da célula. A vitamina E suprime a peroxidação lipídica no testículo e mitocôndrias, sendo capaz de reverter efeitos deletérios decorrentes da exposição testicular a diversos fatores como ozônio, ciclofosfamida, toxinas e contaminantes policlorados bifenílicos. O presente trabalho avaliou a capacidade do testículo e outras estruturas teciduais acumularem arsênio e os efeitos tóxicos decorrentes desse acúmulo, assim como o potencial antioxidante do guaraná e da vitamina E. Foram utilizados 35 camundongos Suíços com idade de 70 dias, divididos em cinco grupos contendo sete animais cada: CTR-(controle negativo) em que os animais receberam apenas água destilada e 0,5 mL do veículo de suspensão carboxi-metil celulose (CMC) via intraperitoneal (i.p); ARS-(controle positivo) em que os animais receberam 100 mg L<sup>-1</sup> de arsenato e 0,5 mL de CMC/i.p; VTE – em que os animais receberam 100 mg L<sup>-1</sup> de arsenato e vitamina E/i.p (2mg em 0,5 mL de CMC); GUA- em que os animais receberam 100 mg L<sup>-1</sup> de arsenato e guaraná/i.p (2 mg g<sup>-1</sup> de peso corporal em 0,5 mL de CMC); GUA/VTE – em que os animais receberam 100 mg L<sup>-1</sup> e vitamina E (2mg em 0.5 mL de CMC) associada ao guaraná (2mg g<sup>-1</sup> de peso corporal em 0.5 mL de CMC). O arsenato foi fornecido aos animais na água de beber e os tratamentos administrados em intervalos de 72 h. Após 42 dias, o que corresponde a um ciclo espermatogênico, os animais sofreram eutanásia e procedeu-se às

análises. Os animais do grupo ARS apresentaram redução significativa no peso corporal, peso do parênquima e peso testicular, maior acúmulo tecidual de arsênio e concentrações elevadas de ALT, o que sugere ação hepatotóxica do arsenato além de uma redução no volume dos túbulos seminíferos, diâmetro tubular, na proporção da túnica própria, altura e proporção do epitélio germinativo e na produção espermática diária total. No compartimento intertubular, observou-se aumento da proporção volumétrica de tecido conjuntivo, macrófagos, espaço linfático, redução na proporção e volume da célula de Leydig, diâmetro nuclear, volume nuclear número das células de Leydig por testículo e na concentração plasmática de testosterona. A administração isolada ou associada de guaraná e vitamina E minimizou a maioria dos efeitos deletérios do arsenato na estrutura e função do aparelho reprodutor masculino. Esses dados indicam papel protetor de compostos não-enzimáticos presentes na dieta, como a vitamina E e o guaraná, capazes de minimizar os efeitos de espécies reativas de oxigênio.

## ABSTRACT

MATA, Wellington de Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November of 2009.  
**Toxicity of the arsenate and protective effect of guarana and vitamin E in the reproductive tract of adult male mice.** Adviser: Sérgio Luis P. da Matta. Co-advisers: Juraci Alves Oliveira and Maria Carmo Gouveia Peluzio.

Exposure to arsenic occurs mainly via drinking water and, in some situations, via polluted foods, inhalation, and cutaneous absorption. Natural, industrial, and anthropical processes have been contributing to increased levels of arsenic in the environment. Arsenic affects male reproductive functions, affecting the spermatogenic process, and there is a lot of evidence that indicates its poisonous action is related to increased production of reactive species of oxygen. These harmful effects can be minimized by the administration of several substances, including amino acids, vitamins and quelants compounds. Guaraná, a plant typical of the Amazonian area, is rich in caffeine, flavonoyds and tannins with antioxidant properties, used in Phitoterapy for the prevention and the treatment of diseases associated with the unbalance of the cell's oxidant activity. Vitamin E suppresses lipidic peroxidation in the testes and mitochondria and is capable of reverting current harmful effects of the testicular exposure to several factors such as ozone, ciclofosfamide, toxins and policlorate bifenilics pollutants. The present work evaluated the capacity of the testes and other tecidual structures to accumulate arsenic and the current poisonous effects of that accumulation, as well as the antioxidant potential of guarana and vitamin E. 35 seventy- day-old Swiss mice were used. They were divided in five groups containing seven animals each: CTR - (negative control) in which the animals just received distilled water and 0,5 mL of the vehicle of suspension carboxi-methyl cellulose (CMC) intraperitonially (i.p); ARS - (positive control) in which the animals received 100 mg L-1 arsenate and 0,5 mL of CMC/i.p; Vitamine E in which the animals received 100 mg L-1 arsenate and vitamin E/i.p (2mg in 0,5 mL of CMC); Guarana - in which the animals received 100 mg L-1 arsenate and guarana/i.p (2 mg g-1 of body weight in 0,5 mL of CMC); GUA / Vitamin E in which the animals received 100 mg L-1 and vitamin E (2mg in 0.5 mL of CMC) combined with guarana (2mg g-1 of body weight in 0.5 mL of CMC). The arsenate was supplied to the animals in drinking water and the treatments were administered in intervals of 72 h. After 42 days, which corresponds to a spermatogenic cycle,

the animals underwent euthanasia and subsequent analyses were done. The animals of the ARS group presented significant reduction in body, parhenquima and testicular weights, larger tecidual accumulation of arsenic and high concentrations of ALT, which suggests hepatotoxic action of the arsenate, besides a reduction in the volume of the seminiferous tubules, tubular diameter, in the proportion of the tunic own, height and proportion of the germinative epithelium and in the total daily spermatic production. In the intertubular compartment, increased proportion of volumetric of conjunctive tissue, macrophages and lymphatic space was observed, reduction in the proportion and volume of the cell of Leydig, nuclear diameter, nuclear volume, number of the cells of Leydig per testes and in the plasmatic concentration of testosterone. The sole administration of guaraná or guarana combined with vitamin E minimized most of the harmful effects of the arsenate in the structure and function of the male reproductive tract. Those data indicate the protective role of non-enzymatic compounds present in the diet such as vitamin E and guarana, which are capable of minimizing the effects of reactive species of oxygen.

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. SISTEMA ANTIOXIDANTE E ESTRESSE OXIDATIVO NOS TESTÍCULOS

A capacidade de reproduzir é um fenômeno essencial para a manutenção dos genes ao longo das gerações. Entretanto, tal processo não se apresenta inalterável em decorrência de variações no meio ambiente. A literatura científica tem mostrado, tanto em humanos quanto em outros animais, que fatores ambientais podem contribuir para a fertilidade ou infertilidade do indivíduo. A compreensão de como o meio pode interferir de forma positiva ou deletéria na fertilidade torna-se essencial para a manutenção da capacidade reprodutiva.

A espermatogênese é um processo replicativo extremamente ativo que permite a formação de gametas em intervalos de tempo. As altas taxas de divisão celular inerentes a esse processo implicam um alto consumo de oxigênio mitocondrial pelas células do epitélio germinativo. Entretanto, devido sua natureza anatomo-fisiológica, a tensão de oxigênio nesses tecidos é baixa, tornando extremamente intensa a competição por esse elemento (Aitken & Roman, 2008).

Tanto a espermatogênese quanto a esteroidogênese são vulneráveis ao estresse oxidativo. A baixa tensão de oxigênio associada à grande quantidade de enzimas antioxidantes característica desse tecido são um importante mecanismo de proteção contra danos mediados pela formação de radicais livres (Aitken & Roman, 2008).

Tem havido atualmente um aumento na preocupação quanto aos potenciais efeitos de vários contaminantes ambientais, muitos deles considerados desreguladores endócrinos ou agentes de ativação hormonal. Esta preocupação se originou, em parte, através de observações acerca do desenvolvimento e de alterações no sistema reprodutivo de populações que foram expostas a químicos sintéticos e seus subprodutos, lançados em grande quantidade no ambiente desde a Segunda Guerra Mundial. Muitos destes contaminantes estão presentes na

água de consumo, sendo tóxicos para a população (Saradha & Marthus, 2006; Veeramachaneni, 2008).

Várias evidências indicam que um dos mecanismos de ação tóxica do arsênio é o aumento na produção de radicais livres, os quais geram danos oxidativos em DNA, lipídios e proteínas (Haider & Najar, 2008). O termo radical livre é utilizado para designar as espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, o radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) que, uma vez formado, inicia o processo de oxidação de lipídios e forma uma cadeia autocatalítica na produção de mais radicais livres (Haslam, 1996).

Células e tecidos possuem normalmente mecanismos endógenos de defesa antioxidante e exógenos provenientes da dieta, como vitamina E e guaraná, que são especializados na remoção de radicais livres. No entanto, alterações no sistema endógeno de defesa antioxidante têm sido observadas após exposição ao arsênio, inativando importantes enzimas antioxidantes e predispondo a efetivação de uma variedade de processos patológicos.

O estresse altera mecanismos neuroquímicos e endócrinos, como a resposta do sistema nervoso autônomo e a liberação dos hormônios adrenais (Manna et al., 2004), afetando características somáticas e hormonais do aparelho reprodutor interferindo na gametogênese. O estresse prolongado ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal inibindo as funções reprodutivas por uma depressão no eixo hipotálamo-hipófise-testículo, podendo desencadear uma redução no volume das células germinativas com subsequente atrofia testicular (Rivier & Rivest, 1991; Richburg, 2000).

Os fatores ambientais podem ser classificados como físicos, químicos, biológicos, comportamentais e sociais (Negro-Vilar, 1993; Schneid-Kofman & Sheiner, 2005). Em várias circunstâncias, múltiplos fatores podem afetar de forma adversa a saúde do indivíduo. As funções reprodutivas e/ou a espermatogênese podem ser inibidas por uma variedade de fatores, como hipertermia (Maines & Ewing, 1996), exposição a microrganismos ou a

componentes da sua membrana (Ozawa et al., 2002), drogas antitumorais e imunossupressoras (Das et al., 2002), contaminantes ambientais (Murugesan et al., 2005) e utilização de medicamentos em altas dosagens e de forma prolongada (Ratnassoriya & Jayakody, 2000; Ward et al., 1994).

Em animais o estresse social, fatores ambientais, lesões teciduais, altas altitudes e estresse de contenção podem afetar o peso corporal, a concentração de testosterona e de enzimas relacionadas ao metabolismo oxidativo, assim como o comportamento sexual e a morfologia testicular (Hardy et al., 2002). Tem sido mostrado também que o estresse social-emocional durante a gestação inicial tem afetado a capacidade reprodutiva de ratos machos recém-nascidos (Kartavtseva, 2004).

Os mecanismos pelo qual o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) ou mesmo os hormônios corticosteróides influenciam no processo reprodutivo ainda não estão totalmente esclarecidos. Tem sido demonstrado o efeito direto dos glicocorticóides nos receptores para o hormônio luteinizante (LH) e na esteroidogênese, evidenciando a existência da regulação da função testicular pelas adrenais. Como consequência da redução nos receptores para LH, o estresse causa redução na secreção de testosterona. Entretanto, os agentes estressores podem interferir na via endócrina e também alterar fatores locais, influenciando a espermatogênese (Hardy & Ganjam, 1997; Hardy et al., 2002; Andersen et al., 2004).

## **2. ASPECTOS QUÍMICOS DO ARSÊNIO.**

O arsênio é um elemento químico de símbolo As com número atômico 33 (33 prótons) e com massa atômica 74,92 u. É um semimetal (metalóide) pertencente ao grupo 15 (5A) da Classificação Periódica dos Elementos.

O arsênio ocorre naturalmente em compostos inorgânicos e orgânicos em diversos estados de oxidação: -3, 0, +3, +5 (De Sessa et al., 1998). Os compostos inorgânicos solúveis

encontrados nas águas, onde o arsênio possui valências +3 e +5, são os ácidos arsenioso ( $\text{H}_3\text{AsO}_3$ ) e arsenico ( $\text{H}_3\text{AsO}_4$ ) e suas espécies desprotonadas, i.e.,  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$ ,  $\text{HAsO}_4^{2-}$ ,  $\text{AsO}_4^{3-}$  (Thornton & Farago, 1997). A espécie inorgânica depende das condições do pH e Eh do meio. Na presença de microrganismos pode ocorrer biometilação dos oxiânions de arsênio levando à formação de compostos organometálicos como o ácido metilarsênico e dimetilarsênico (Cullen & Reimer, 1989).

O arsênio entra na corrente sanguínea é excretado na urina, apresentando uma meia vida de 30-60 h. O arsênio é excretado de várias formas, incluindo o arsenito ( $\text{As}^{+3}$ ), arsenato ( $\text{As}^{+5}$ ), ácido metilarsênico (MAA), ácido dimetilarsênico (DMAA) e outras formas ligadas a compostos orgânicos. O  $\text{As}^{+3}$  tende a se acumular no corpo, sendo oxidado a  $\text{As}^{+5}$  e depois excretado. Tanto o  $\text{As}^{+3}$  como o  $\text{As}^{+5}$  sofrem metilação. Quando o  $\text{As}^{+3}$  é ingerido, uma pequena porção é excretada como ( $\text{As}^{+3}$ ), aproximadamente 5h após a ingestão, mas a maior parte é metilada formando ácido metilarsênico e ácido dimetilarsênico. Assim como ( $\text{As}^{+3}$ ) a excreção de arsênio metilado começa em torno de 5h após a ingestão, mas alcança concentração máxima mais tardiamente (Crecelius, 1977).

A toxicidade de diversas espécies de arsênio decresce na seguinte ordem: compostos de  $\text{As}^{3+}$  inorgânico > compostos de  $\text{As}^{5+}$  inorgânico > compostos de  $\text{As}^{3+}$  orgânico > compostos de  $\text{As}^{5+}$  orgânico (USEPA, 2000). As espécies inorgânicas de arsênio são cerca de 100 vezes mais tóxicas comparadas às formas orgânicas. (Thompson, 1993).

Das formas químicas que o homem frequentemente é exposto, o  $\text{As}^{+3}$  é a variação mais tóxica. Os processos que convertem  $\text{As}^{+3}$  para outras formas pode ser parte do mecanismo de proteção normal do organismo em resposta a intoxicação (De Sesso et al., 1998).

Após ingestão o arsenato é distribuído através das membranas celulares por transportadores de fosfato inorgânico (Villa-Bellosta & Sorribas, 2008). Os mecanismos

celulares de toxicidade do arsenato incluem a geração de EROS (espécies reativas de oxigênio), o bloqueio da produção de ATP na via glicolítica e o desacoplamento da fosforilação oxidativa através da substituição do fosfato na reação de (ADP- ATP). À medida que os elétrons são transferidos ao oxigênio forma-se ADP-arsenato e não ATP, sendo a energia do transporte de elétrons consumida sem formar ATP (De Sesso et al., 1998).

### **3. O ARSÊNIO E A SAÚDE HUMANA**

Traços deste elemento são lançados na atmosfera, tanto de fontes naturais como de atividades antrópicas (Rosen & Liu, 2008). O meio industrial representa outra fonte de As, especialmente as fundições de chumbo, ouro, prata, cobre, zinco e cobalto (Gontijo & Bittencourt, 2005).

Apesar da contribuição da mineração para a sociedade atual, diversos poluentes são provenientes de suas atividades. As minerações de ferro e especialmente de ouro lidam com enormes quantidades de elementos potencialmente tóxicos, como o As, que sob certas condições, podem ser mobilizados para o ambiente durante e após as operações de exploração mineral. No Brasil as fontes naturais de contaminação por As identificadas até o momento estão relacionadas às rochas de auríferos sulfetados e as fontes antrópicas associadas a atividades de mineração e refino de minério como as situadas no Quadrilátero Ferrífero no sudoeste do estado de Minas Gerais (Magalhães et al., 2001). A contaminação dos sedimentos por As, no Quadrilátero Ferrífero foi inicialmente descrito por Borba et al. (2000) que constataram também presença de As em águas superficiais e subterrâneas.

A intoxicação por arsênio pode resultar em efeitos tóxicos, agudos ou crônicos, relativos a exposições curtas ou longas, respectivamente, ocasionando diferentes patologias (Danielsson et al., 1984; Jana et al., 2006; Chang et al., 2007).

Os efeitos carcinogênicos da intoxicação por As estão associados à exposição crônica por vários anos. Os tipos de câncer associados são o câncer de pele, pulmão, próstata, bexiga, rim e fígado (NRC, 1999; Waalkes et al., 2003; Modi et al., 2006; Baastrup et al., 2008).

A intoxicação aguda e crônica por As pode provocar outras doenças tais como, hiperpigmentação, hiperqueratose, diarreia e hemorragias gastrointestinais, arritmias cardíacas, hipotensão, falha congestiva no coração, alterações vasculares podendo levar a gangrena, distúrbios hematológicos, fibrose pulmonar, dores de cabeça, confusão mental, coma, alteração no metabolismo de carboidratos e respiração celular, abortos espontâneos e fetos com baixo peso (USEPA, 2000; WHO, 2001a).

Em 1984, a Organização Mundial de Saúde (WHO) indicou que as águas potáveis deveriam ter no máximo 0,05 mg/L de As. Com base em novas evidências toxicológicas, a WHO reduziu, em 1993, a concentração máxima de As em água para 0,01 mg/L (WHO, 2001b).

Apesar de seus efeitos tóxicos, o trióxido de arsênio ( $As_2O_3$ ) tem recebido especial atenção devido ao seu potencial terapêutico no tratamento de tumores como a leucemia promielocítica aguda, mielodisplasia, mieloma múltiplo, assim como uma variedade de tumores sólidos e de linhagens celulares, incluindo neuroblastoma, tumores renais, próstata, colorretal e hepatocelular (Liu et al., 2006). O trióxido de arsênio ( $As_2O_3$ ) é aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) como agente quimioterápico no tratamento da leucemia promielocítica aguda. Atualmente, encontra-se na literatura científica um número considerável de trabalhos com triagens clínicas para avaliação da eficácia do trióxido de arsênio como agente terapêutico (Litzow, 2008). No entanto, ainda são necessários novos trabalhos para uma melhor compreensão dessa ação paradoxal do arsênio, de agir como carcinógeno e como agente quimioterápico.

#### 4. FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NO TESTÍCULO

O arsênio é um poluente ambiental que interfere na função reprodutiva masculina, afetando o processo espermatogênico (Sanghamitra et al., 2008). O estresse oxidativo tem sido apontado como a maior causa de alterações que incluem diminuição no peso testicular, na quantidade e motilidade dos espermatozóides, nos marcadores testiculares como fosfatase ácida, sorbitol desidrogenase e da 17- $\beta$  hidroxisteróide-desidrogenase, aumento nos níveis de lactato desidrogenase e  $\gamma$ -transpeptidase (Liu et al., 2001; Pant et al., 2004). O aumento na atividade da lactato desidrogenase e da transpeptidase sugerem a depleção das células da linhagem germinativa no túbulo seminífero e alterações na fisiologia normal das células de Sertoli (Liu et al., 2001; Pant et al., 2004). As células de Leydig são o principal sítio de biossíntese de esteróides e contém enzimas esteroidogênicas como a 17- $\beta$  hidroxisteróide-desidrogenase, que catalisa a interconversão de androstenediona em testosterona. A atividade da 17- $\beta$  hidroxisteróide-desidrogenase é regulada pela ação dos hormônios FSH (hormônio foliculo estimulante) e LH que ficam diminuídos em situações de estresse oxidativo (Srivastava & Srivastava, 1991).

As EROS geradas em resposta a exposição ao arsênio levam a um acúmulo intracelular de  $H_2O_2$  por ativação de flavoproteínas dependentes de superóxido, produzindo enzimas como a NADPH oxidase. Além de aumentar a produção de EROS, o tratamento com arsênio inibe a ação de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase o que provavelmente torna o tecido mais suscetível às alterações bioquímicas. Observa-se um efeito menos pronunciado do arsênio no tratamento combinado com outros íons, como o fluoreto, sugerindo ação antagonista pela supressão da ionização do arsenito de sódio pelo fluoreto em soluções aquosas ou por formarem compostos insolúveis com outros cátions no trato gastrointestinal (Zheng et al., 2002).

O espermatozóide de mamíferos contém grande quantidade de protaminas ricas em tiol na cromatina nuclear e grupos sulfidril no flagelo, que parecem estar envolvidos na sua manutenção e motilidade. O arsênio é capaz de se ligar a grupos tiol presentes no sítio ativo, deprimindo muitos processos enzimáticos e inibindo a motilidade do espermatozóide no epidídimo, onde a célula reprodutiva masculina completa seu processo de maturação. O arsênio, devido a sua natureza eletrofílica, é capaz de se ligar a radicais sulfatados em proteínas, alterando a conformação das mesmas. Esta ligação protéica proporciona um período maior de meia vida corporal (John et al., 1998).

## **5. ORGANIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL DO TESTÍCULO**

O testículo é um órgão com funções exócrina e endócrina, geralmente localizado no escroto e envolvido por espessa cápsula de tecido conjuntivo, a albugínea testicular. Esta túnica, de maneira variada nas diferentes espécies de mamíferos, emite septos para o interior do órgão até a região do mediastino testicular, dividindo o testículo em lóbulos muitas vezes incompletos (França & Russell, 1998).

Funcionalmente o testículo dos mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos principais: o intertubular ou intersticial e o tubular (Russell et al., 1990). No compartimento intertubular encontram-se as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável, constituída principalmente de fibroblastos, macrófagos e mastócitos (Russell et al., 1990; Setchell, 1991). Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies quanto à proporção volumétrica (%) dos diferentes componentes do compartimento intertubular (Fawcett et al., 1973; França & Russell, 1998; Godinho, 1999), de maneira geral a célula de Leydig é o tipo celular mais freqüente neste compartimento.

O compartimento tubular constitui a maior parte do testículo ocupando, na maioria dos mamíferos, de 70% a 90% do parênquima testicular (França & Russell, 1998; Godinho,

1999). Estes túbulos formam alças bastante contorcidas, as quais possuem suas duas extremidades conectadas à rede testicular, que se encontra localizada numa região bastante rica em vasos sanguíneos e tecido conjuntivo denominada de mediastino testicular. A partir desta região, a rede testicular encontra-se conectada ao epidídimo através dos ductos eferentes (França & Russell, 1998; Godinho, 1999).

Os túbulos seminíferos são constituídos por túnica própria, epitélio seminífero e lume tubular. A túnica própria reveste o túbulo externamente, sendo composta de células mióides ou peritubulares e membrana basal. As células mióides são contráteis, sendo consideradas responsáveis pela movimentação de fluidos e propulsão dos espermatozóides através do lume dos túbulos seminíferos. No epitélio seminífero são encontrados dois tipos celulares de origem embriológica distintos: as células germinativas, originárias do epiblasto, e as células de Sertoli, provenientes do epitélio celomático (Karl & Capel, 1998). Juntamente com as células mióides, as células de Sertoli elaboram a membrana basal que serve de suporte estrutural para a própria célula de Sertoli e para as células germinativas que se encontram na porção basal do epitélio seminífero. As células de Sertoli, através de junções de oclusão, dividem o epitélio seminífero em dois ambientes: o ambiente basal, onde se localizam as espermatogônias e os espermátocitos primários na fase inicial da prófase meiótica (pré-leptótenos/leptóteno), e o ambiente adluminal, no qual se encontram os espermátocitos primários a partir da fase de zigóteno, espermátocitos secundários e espermátides em diferentes etapas de diferenciação. Desta forma, o ambiente adluminal está totalmente sob o controle das células de Sertoli, propiciando um microambiente isolado do sistema imunitário, o que é essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (Russell et al., 1990; Setchell, 1991; Sharpe, 1994). Um terceiro ambiente é criado transitoriamente quando ocorre a transposição do espermátocito I em pré-leptóteno, do ambiente basal para o adluminal. A célula geralmente encontrada nesse local transitório é o espermátocito primário na fase de

leptóteno (Russell et al., 1990). Além das funções já citadas, as células de Sertoli são ainda responsáveis pela manutenção da integridade do epitélio seminífero, secreção de fluido para o lúmen, participação no processo de espermiacção, realização de fagocitose, secreção de proteínas, regulação do ciclo espermatogênico através das junções com as demais células, permitindo ainda a movimentação de células germinativas no epitélio.

Existe grande variação no número e nas dimensões de diâmetro e comprimento dos túbulos seminíferos nas diferentes espécies de mamíferos (França & Russell, 1998). O comprimento total de túbulos seminíferos está relacionado a três parâmetros estruturais: tamanho do testículo, diâmetro tubular e densidade volumétrica dos túbulos seminíferos. O camundongo, por exemplo, possui aproximadamente 20 túbulos seminíferos por testículo, perfazendo no total cerca de 2 metros de comprimento tubular por testículo (Bascom & Ostrud, 1925). Já no suíno doméstico existem de várias centenas a alguns poucos milhares de túbulos seminíferos por testículo e aproximadamente 3000 metros de túbulos no total (França & Russell, 1998). De maneira geral, o valor observado para o diâmetro tubular na grande maioria das espécies de mamíferos está entre 180 e 300  $\mu\text{m}$  (Roosen-Runge, 1977; França e Russell, 1998). A medida do diâmetro tubular é uma abordagem classicamente utilizada como indicador da atividade espermatogênica em investigações envolvendo a função testicular (Attal & Courot, 1963; Sinha Hikim et al., 1991; Russell et al., 1994; Muñoz et al., 1998).

## **6. ESPERMATOGÊNESE**

A espermatogênese é um processo altamente complexo e bem organizado que ocorre nos túbulos seminíferos e dura de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos (França & Russell, 1998; Godinho, 1999). Baseado em características morfológicas e funcionais, o processo espermatogênico pode ser dividido em três fases: a) fase proliferativa ou espermatogonial caracterizada por várias e sucessivas divisões mitóticas dos diferentes tipos de

espermatogônias; b) fase meiótica ou espermatocitogênica, na qual, teoricamente, cada espermatócito em paquíteno dará origem a quatro espermátides haplóides e durante a qual ocorre uma divisão reducional acompanhada de recombinação gênica e uma divisão equacional; c) fase de diferenciação ou espermiogênica, onde cada espermátide arredondada passa por profundas alterações estruturais e bioquímicas diferenciando-se em espermatozóide, um tipo celular morfologicamente especializado para alcançar e fertilizar o ovócito (Sharpe, 1994).

As espermatogônias localizam-se na periferia dos túbulos seminífero próximo à lâmina basal, onde proliferam continuamente. Algumas dessas espermatogônias deixam o ciclo celular e sofrem duas divisões meióticas sucessivas. Quando entra na prófase da primeira divisão meiótica (prófase I) passa a espermatócito primário. Este, ao final da primeira divisão forma dois espermatócitos secundários, com o número cromossômico e conteúdo de DNA igual a  $1N$  e  $2C$ , respectivamente. Para concluir a meiose, os espermatócitos secundários sofrem a segunda divisão, dando origem a quatro espermátides ( $1N$  e  $1C$ ). Como ocorrem trocas de segmentos entre cromossomos homólogos durante a meiose, tem-se a possibilidade de inúmeras variações gênicas, ocasionando variações nas características de cada indivíduo (De Rooij & Grootegoed, 1998). Nesta fase terminam as divisões celulares da espermatogênese e cada espermátide passará por um processo de modificações complexas, denominado espermiogênese, que levará à formação dos espermatozoides. Podem ser observadas nas preparações histológicas espermátides com morfologia variada, de acordo com a fase da espermiogênese em que se encontram (Junqueira & Carneiro, 2008; Kierszenbaum, 2004).

Durante o processo espermatogênico, as células de Sertoli e as células germinativas interagem de maneira bastante complexa, tanto física quanto bioquimicamente. Existem diversas formas de junções intercelulares entre esses dois tipos celulares, incluindo

desmosomas, junções do tipo *gap* e as junções à base de actina. Apesar de serem postuladas várias funções para estes componentes juncionais, existem poucas evidências experimentais para apoiar o papel preciso dos mesmos (Russell & Griswold, 1993). No entanto, fica bastante evidente a necessidade da interação das células germinativas com os componentes somáticos do testículo, principalmente células de Sertoli, células de Leydig e células mióides, para que o processo espermatogênico transcorra de maneira normal e eficiente (Skinner, 1991; Daduone & Demuolin, 1993; Spiteri-Grech & Nieschlag, 1993, Pescovitz et al., 1994; Russell et al., 1994; Griswold, 1995; Schlatt et al., 1997; França & Russell, 1998). A integridade funcional da membrana basal elaborada pelas células de Sertoli e células mióides é também essencial para o processo espermatogênico (Dym, 1994).

## **7. CÉLULA DE SERTOLI**

Estudos utilizando microscopia eletrônica de transmissão, em cortes seriados do epitélio seminífero, mostraram que a célula de Sertoli apresenta um perfil irregularmente colunar, estendendo-se da base do epitélio seminífero até o lúmen tubular (Russell, 1999). A forma colunar da célula de Sertoli permite que esta célula faça contatos com a membrana basal, com outras células de Sertoli adjacentes, como na barreira hematotesticular quanto em outros locais como o intertúbulo, bem como com as células germinativas de perfil arredondado e com espermátides alongadas localizadas em criptas profundas (França & Russel, 1998). De maneira geral, a conformação da célula de Sertoli é ditada pela forma das células germinativas com as quais faz contato. Assim, há numerosos recessos com o perfil arredondado e em forma de cripta, nos quais as células germinativas se encaixam (Russell, 1999; Griswold, 1999).

As células de Sertoli estão envolvidas no fornecimento de nutrientes e inúmeros outros fatores importantes para as células germinativas, como a mediação da ação do FSH e da

testosterona na espermatogênese, participação ativa no processo de espermiação, fagocitose do excesso de citoplasma (corpos residuais) resultante da liberação das células espermiadas e fagocitose de células germinativas que sofrem apoptose. As células de Sertoli secretam fluido em direção ao lúmen tubular que serve, dentre outras funções, como veículo para o transporte de espermatozóides para o epidídimo. A secreção do fluido também ocorre em direção ao compartimento intertubular, estando envolvida com os mecanismos de regulação parácrina de outros tipos celulares do testículo como as células mióides, células de Leydig e células musculares lisas dos vasos sanguíneos (Russell & Griswold, 1993; Sharpe, 1994; França & Russel, 1998).

As células de Sertoli são afetadas por diversos agentes químicos tóxicos (Fiorini et al., 2004). Por exercer também papel vital na regulação da espermatogênese, qualquer disfunção das células de Sertoli pode resultar em alterações e/ou degenerações das células germinativas e infertilidade. Os principais sinais de injúria nas células de Sertoli são as vacuolizações precocemente observadas na porção basal do citoplasma dessas células. Após o aparecimento de vacuolização e alterações no aparelho de Golgi, a secreção do fluido pelas células de Sertoli mostra-se abruptamente diminuída. Como conseqüência, anormalidades na forma do núcleo das espermátides, formação de células gigantes, progressiva perda de espermátócitos e espermatogônias, descamação de células germinativas podem ser observados, com conseqüente atrofia testicular (Fiorini et al., 2004).

## **8. CÉLULA DE LEYDIG**

As células de Leydig estão localizadas no interstício dos testículos, constituindo o principal componente endócrino deste órgão. Essas células são responsáveis pela produção de cerca de 95% da testosterona circulante no homem adulto. A síntese de testosterona ocorre a partir da molécula de colesterol e envolve várias enzimas na sua via sintética (Bardin, 1996).

Nos testículos existem receptores para andrógenos nas células de Sertoli, células mióides, células musculares lisas dos vasos sanguíneos e na própria célula de Leydig (Schlatt et al., 1997). A testosterona e a diidrotestosterona são responsáveis pela diferenciação do aparelho reprodutor e da genitália externa na fase fetal (Pelliniemi et al., 1996) e pelo aparecimento e manutenção dos caracteres sexuais secundários e a sustentação qualitativa da espermatogênese a partir da puberdade (Sharpe, 1994). Particularmente, a diidrotestosterona é responsável pela manutenção funcional das glândulas sexuais acessórias e do epidídimo (Goyal et al., 1999).

Nos mamíferos, as células de Leydig podem ser temporalmente subdivididas em seis categorias e incluem as células de Leydig fetais; do recém-nascido; da puberdade; adultas; sazonais e envelhecidas. Dos tipos citados, podem ser destacadas as células de Leydig fetais, que são produtoras de testosterona responsável pela masculinização fetal e as células de Leydig do tipo adulto produtoras de testosterona responsável pelas características sexuais secundárias e pelo processo espermatogênico (Kerr & Knell, 1988).

O desenvolvimento pós-natal das células de Leydig envolve a proliferação celular, diferenciação morfológica e aquisição da capacidade de produção de testosterona. De acordo com Rouiller-Fabre et al. (1998), a transição das células de Leydig em proliferação, originadas de células progenitoras, para as células de Leydig do tipo adulto é regulada hormonalmente. O LH induz primariamente a diferenciação das células de Leydig, não estando envolvido com a estimulação da proliferação das mesmas. Os andrógenos e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) aumentam a sensibilidade das células de Leydig progenitoras ao LH. A proliferação é estimulada por IGF-I e fatores secretados pelas células de Sertoli e macrófagos, enquanto o estradiol provavelmente limita o crescimento da população de células de Leydig por meio da inibição da proliferação das progenitoras e células de Leydig (Ge et al., 1996).

## **9. PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS DO GUARANÁ (*Paullinia cupana*) E DA VITAMINA E**

A nutrição apresenta um papel essencial na fertilidade ou infertilidade do indivíduo. Ao contrário, a desnutrição ou desordens nos processos alimentares podem determinar de forma potencial o estresse oxidativo, comprometendo a fertilidade do indivíduo. A prática de hábitos alimentares saudáveis e a suplementação alimentar podem reverter alterações somáticas e hormonais (Jedlinska-Krakowska et al., 2002). Desta forma, os vegetais têm papel crucial na alimentação humana, podendo fornecer nutrientes imprescindíveis ao funcionamento de órgãos e tecidos.

A cultura popular remanescente da difusão do conhecimento das tribos indígenas e de povos orientais tem difundido amplamente a utilização de extratos vegetais na regulação da fertilidade em homens (Quin et al., 2000).

O guaraná é uma planta originária da região amazônica, rica em cafeína, flavonóides e taninos. As propriedades biológicas dos flavonóides dependem de sua estrutura química e de sua biodisponibilidade (Di Carlo et al., 1999). Os efeitos biológicos dos flavonóides, tanto nos sistemas celulares *in vitro*, quanto nos sistemas *in vivo*, os classificam como agentes plurifarmacológicos ou fitoquímicos, com propriedades e funções biológicas tanto profiláticas quanto terapêuticas (Zhang et al., 2005).

Suas propriedades biológicas estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada composto fenólico exerce sobre determinado meio. Por sua vez, a atividade dos antioxidantes depende de sua estrutura química, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor, velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais (Wang et al., 1999). É utilizado na fitoterapia para a prevenção e tratamento de doenças relacionadas ao desequilíbrio da atividade oxidante da célula (Campos et al., 2005; Otobone et al., 2007).

O extrato de guaraná reduz significativamente a peroxidação lipídica, resultando em maior proteção celular (Basile et al., 2005; Campos et al., 2003). Segundo Mattei et al. (1998), a propriedade antioxidante do guaraná se deve, provavelmente, à sua alta concentração de taninos, sendo possível que grande parte dos efeitos revitalizantes relacionados ao guaraná sejam devido à propriedade de redução dos processos oxidativos do organismo. Os taninos presentes no guaraná são compostos fenólicos amplamente distribuídos entre os vegetais superiores, com grande capacidade de neutralização de radicais livres (Haslam, 1996). Os taninos disponibilizam ferro ionizado que se complexa com o arsênio diminuindo a ação deste sobre os tecidos e órgãos (Wang et al., 1999).

Tem sido relatado que a administração de flavonóides determina o aumento dos níveis de testosterona, LH e no número e afinidade dos receptores de gonadotrofina coriônica humana (hCG) pelo testículo, evidenciando sua diversidade funcional e de atuação no sistema endócrino-reprodutor (Quin et al., 2000, Watcho et al., 2004). Além disso, os flavonóides podem prevenir danos teciduais causados por radicais livres agindo diretamente sobre os mesmos e estabilizando as espécies reativas de oxigênio ao se ligar com o composto reativo do radical (Nijveldt et al., 2001).

A vitamina E ( $\alpha$ - tocoferol) é um antioxidante lipofílico indispensável para a manutenção da espermatogênese em mamíferos. Está presente em grande quantidade nas células de Sertoli, nos espermátócitos na fase de paquíteno e em menor extensão nas espermátides arredondadas. Deficiência de vitamina E testicular leva a um estado de estresse oxidativo que desregula o processo espermatogênico e a produção de testosterona (Aitken & Roman, 2008). Vários pesquisadores têm mostrado que a vitamina E suprime a peroxidação lipídica no testículo e mitocôndrias, sendo capaz de reverter efeitos adversos decorrentes da exposição testicular a diversos fatores como ozônio, ciclofosfamida, toxinas e contaminantes policlorados bifenílicos (Jedlinka-Krakowska et al., 2002; Machecha et al., 2002; Murugesan

et al., 2005; Jedlinska-Krakowska et al., 2006). De acordo com Aruldas et al. (2005), concentrações de vitamina E testicular diminuem significativamente nos quadros de estresse oxidativo induzido por estímulos pró-oxidantes como o cromo.

No presente trabalho, objetivou-se analisar os efeitos da administração oral de arsenato de sódio e possível papel protetor do guaraná e da vitamina E nos testículos de camundongos adultos, avaliando quantitativamente, através de análises histométricas, possíveis alterações no processo espermatogênico, bem como nas estruturas testiculares,

Os parâmetros analisados foram:

- Índice gonadossomático (IGS);
- Proporção volumétrica e volume dos componentes do parênquima testicular;
- Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero;
- Comprimento total dos túbulos seminíferos;
- Contagem das células de túbulos no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero;
- Razões entre os números celulares obtendo-se assim o coeficiente da eficiência de mitoses espermatogoniais, rendimento geral da espermatogênese, índice meiótico e capacidade total de suporte da célula de Sertoli;
- Cálculo do número de células de Sertoli por testículo;
- Cálculo da produção espermática diária por testículo e por grama de testículo;
- Volume e número de células de Leydig por grama e peso total do testículo.
- Volume total de células de Leydig por testículo e por grama de testículo;
- Volume nuclear, citoplasmático e celular de Leydig.

Foram também realizadas as quantificações dos níveis séricos de testosterona e detransaminases. Adicionalmente quantificaram-se, por meio de espectrofotometria de

absorção atômica, as concentrações de arsênio nas estruturas do aparelho reprodutor masculino, fígado, rins, músculo estriado esquelético e osso.

## **11. HIPÓTESE**

O guaraná, a vitamina E e a combinação das duas substâncias, pelos seus efeitos antioxidantes, exercerão efeito protetor contra o estresse oxidativo causado pela administração de arsenato de sódio, no aparelho reprodutor de camundongos adultos, particularmente nos testículos.

## **12. REFERÊNCIAS**

- Aitken RJ, Roman SD. 2008. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Adv Exp Med Biol.*, 636:154-171.
- ANDERSEN ML, BIGNOTTO M, MACHADO RB, TUFIK, S. 2004. Different stress modalities result in distinct steroid hormone responses by male rats. *Braz J Med Biol Res* 37:791-797.
- ARULDHAS MM, SUBRAMANIAN S, SEKAR P, VENGATESH G, CHANDRAHASAN G, GOVINDARAJULU P, AKBARSHA MA. 2005. Chronic chromium exposure-induced changes in testicular histoarchitecture are associated with oxidative stress: study in a non-human primate (*Macaca radiata* Geoffroy). *Hum Reprod* 20:2801-2813.
- ATTAL J, COUROT M. 1963. Developpement testiculaire et etablissement de la spermatogeneses chez le taureau. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 3:219-241.
- BAASTRUP R, SORENSEN M, BALSTROM T, FREDERIKSEN K, LARSEN CL, TJONNELAND A, OVERVAD K, RAASCHOU-NIELSEN O. 2008. Arsenic in drinking water and risk for cancer in Denmark. *Environ Health Persp* 116: 231-237.

- BARDIN CW. Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man. In: Payne, AH., Hardy, MP., Russell, LD. Cap 2. (Eds). The Leydig cell. Vienna, Cache River Press, 1996. 231-42.
- BASCOM KF, OSTRUD HL. 1925. Quantitative studies of testicle. II. Pattern and total tubule length in the testicles of certain common mammals. Anat Rec 31:159-169.
- BASILE A, FERRARA L, PEZZO M, MELE G, SORBO S, BASSIF P, MONTESANO D. 2005. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana*. J Ethnopharmacol 102:32-36.
- BORBA, RP, FIGUEIREDO, BR, RAWLLINS, BG, MATCHULLAT, J. 2000. Arsenic in water and sediment in the Iron Quadrangle, Minas Gerais state, Brasil. Rev Bras Geoci 30:554-557.
- CAMPOS AR, BARROS AI, ALBUQUERQUE FA, LEAL LK, RAO, VS. 2005. Acute effects of guarana (*Paullinia cupana*) on mouse behavior in forced swimming and open field tests. Phytother Res 19:441-443.
- CAMPOS AR, BARROS AJ, SANTOS FA, RAO VS. 2003. Guarana (*Paullinia cupana*) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. Phytother Res 17:1199-1202.
- CHANG SI, JIN B, YOUN P, CHANGBO P, PARK JD, RYU DY. 2007. Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. Toxicol Appl Pharmacol 218:196-203.
- CONAMA. 1986. Resolução CONAMA nº 20, de junho de 1986 – Resolução do CONAMA – 1984/1986, Brasília: SEMA, 92p.
- CRECELIUS, EA. 1977. Changes in the chemical speciation of arsenic following ingestion by man. Environ Health Persp 19:147-150.
- CULLEN WR, REIMER KJ. 1989. Arsenic in the environment Chem Rev 98:713-764.

DADUONE JP, DEMUOLIN A. Structure and functions of the testis. In: THIBAUT, C., LEVASSEUR, M., HUNTER, RHF. (Org). *Reproduction mammals and man*. Paris: Ellipses, 1993. cap. 13, p. 227-250.

DANIELSSON BRG, DENCKER L, LINDGREEN A, TJALVE, H. 1984. Accumulation of toxic metals in male reproductive organs. *Arch Toxicol Suppl* 7:177-180.

DAS UB, MALLICK M, DEBNATH JM, GHOSH D. 2002. Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide-induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. *Asian J Androl* 4:201-207.

DE ROOIJ DG, GROOTEGOED JA. 1998. Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Biol* 10:694-701.

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

DI CARLO G, MASCOLO N, IZZO AA, CAPASSO F. 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Science* 65: 337-353.

DYM M.1994. Basement membrane regulation of Sertoli cells. *Endocrine Rev* 15:102-115.

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

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

FRANÇA LR, RUSSELL LD. The testis of domestic mammals. In: MATINEZ-GARCIA, F & RECADERA, J. (Org.). *Male reproduction; a multidisciplinary overview*. Ed. Madrid: Churchill Communications, 1998, cap 16, p.198-219.

GE RS, SHAN L, HARDY MP. Pubertal development of Leydig cells. In: PAYNE, HARDY MP, RUSSELL LD. The Leydig cell. Vienna: Cache River Press, 1996. cap.6, p. 159-174.

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

GONTIJO B, BITTENCOURT F. 2005. Arsênio – Uma revisão histórica. An Bras Dermatol 80:91-95.

GOYAL HO, WILLIAMS CS, KHALIL MK, VIG MM, MALONEY MA. 1999. Postnatal differentiation of ductus deferents, tail of the epididymis, and distal body of epididymis in goats occurs independently of rete testis fluid. Anat Rec 254:508-520.

GRISWOLD MD. 1995. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. Biol Reprod 52:211-216.

GRISWOLD MD. 1999. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. Semin Cell Dev Biol 9:371-380.

HAIDER SS, NAJAR MS. 2008. Arsenic induces oxidative stress, sphingolipidosis, depletes proteins and some antioxidants in various regions of rat brain. Kathmandu Uni Med J 6:60-69.

HARDY MP, GANJAM VK. 1997. Stress, 11 $\beta$ -HSD, and Leydig cell function. J Androl 18:475-479.

HARDY, MP., SOTTAS, CM., GE, R., MCKITTRICK, C.R., TAMASHIRO, KL., MCEWEN BS, HAIDER SG, MARKHAM CM, BLANCHARD RJ, BLANCHARD DC., SAKAI RR. 2002. Trends of reproductive hormones in male rats during psychosocial stress: Role of glucocorticoid metabolism in behavioral dominance. Biol Reprod 67:1750-1755.

HASLAM E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. J Nat Prod 59:205-215.

JANA K, JANA S, SAMANTA K. 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* 4:01-13.

JEDLINSKA-KRAKOWSKA M, BOMBA G, JAKUBOWSKI K, ROTKIEWICZ T, JANA B, PENKOWSKI A 2006. Impact of oxidative stress and supplementation with vitamins E and C on testes morphology in rats. *J Reprod Dev* 52:2003-2009.

JEDLINSKA-KRAKOWSKA M, JAKUBOWSKI K, KOWALSKI A. 2002. Effect of increased ozone concentration in the air on the level of some immunological indices in rats given vitamin E and vitamin C. *Acta Pol Toxicol* 10:81-87.

JOHN MD, JACOBSON CF, ANTHONY RS, CRAIG HF, JOSEPH FH. 1998. An assessment of the development toxicity of inorganic arsenic. *Reprod Toxicol* 12:385-433.

JUNQUEIRA LCU, CARNEIRO J. *Histologia Básica*. 11<sup>a</sup> Ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008 418 p.

KARL J, CAPEL B. 1998. Sertoli cells of mouse testis originate from the celomic epithelium. *Dev Biol* 203:323-333.

KARTAVTSEVA OV. 2004. Effect of maternal stress during first trimester of pregnancy on fertility of male offspring. *Fiziol Zh* 50:69-72.

KERR JB, KNELL CM. 1988. The fate of fetal Leydig cell during the development of the fetal and postnatal. *Development* 103:535-544.

KIERSZENBAUM AL. *Histologia e Biologia Celular – Uma Introdução à Patologia*. Editora Elsevier, Rio de Janeiro, 2004. 654p.

LITZOW MR. 2008. Arsenic trioxide. *Expert Opin Pharmacother* 9:1773-1785.

LIU B, PAN S, DONG X, QIAO H, JIANG H, KRISSANSEN GW, SUN X. 2006. Opposing effects of arsenic trioxide on hepatocellular carcinomas in mice. *Cancer Sci* 97:675-681.

- LIU J, KADUSKA M, KIU Y, QU W, MASON RP, WALKER MP. 2001. Acute arsenic induced free radical production and oxidative stress related gene expression in mice. *Toxicologist* 54:280-281.
- MACHECHA AA, HALES BF, ROBAIRE B. 2002. Chronic cyclophosphamide treatment alters the expression of stress response genes in rat male germ cells. *Biol Reprod* 66:1024-32.
- MAGALHÃES VF, CARVALHO CEV, PFEIFFER WC. 2001. Arsenic contamination and dispersion in the Engenho Inlet, Sepetiba Bay, SE, Brazil. *Water Air Soil Poll* 129: 83-90.
- MAINES MD, EWING JF. 1996. Stress response of the rat testis: In situ hybridization and immunohistochemical analysis of heme oxygenase-1 (HSP32) induction by hyperthermia. *Biol Reprod* 54:1070-1079.
- MANNA I, JANA K, SAMANTA PK. 2004. Intensive swimming exercise-induced oxidative stress and reproductive dysfunction in male Wistar rat: protective role of alpha-tocopherol succinate. *Can J Appl Physiol*. 29:172-85.
- MATTEI R, DIAS RF, SPÍNOLA EB, CARLINE EA, BARROS SBM. 1998. Guarana (*Paullina cupana*): Toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. *J Ethnopharmacol* 60:111-116.
- MODI M, KAUL RK, KANNAN GM, FLORA SJS. 2006. Co-administration of zinc and n-acetylcysteine prevents arsenic induced tissue oxidative stress in male rats. *J Trace Elem Med Biol* 20:197-204.
- MUÑOZ EM, FOGAL T, DOMINGUEZ S, SCARDAPANE L, GUZMAN J, CAVICCHIA, JC, PIEZZI RS. 1998. Stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the viscacha (*Lagostomus maximul maximus*). *Anat Rec* 252:8-16.
- MURUGESAN P, MUTHUSAMY T, BALASUBRAMANIAN K, ARUNAKARAN J. 2005. Studies on the protective role of vitamin C and E against polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) induced oxidative damage in Leydig cells. *Free Radic Res* 39:1259-1272.

- NEGRO-VILAR A. 1993. Stress and other environmental factors affecting fertility in men and women: Overview. *Environ Health Persp* 101:59-64.
- NIJVELDT RJ, NOOD EV, VAN HOORN DEC, BOELENS PG, NORREN KV, LEEUWEN PAM. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74:418-425.
- NRC: Arsenic in the drinking water. Washington, DC: National Academy Press; p. 1-310, 1999.
- OTOBONE FJ, SANCHES AC, NAGAE R, MARTINS JV, SELA VR, MELLO JC, AUDI EA. 2007. Effect of lyophilized extracts from guarana seed (*Paullinia cupana var. sorbilis* (mart.) on behavioral profile in rats. *Phytother Res.* 21:531-535.
- OZAWA N, GODA N, MAKINO N, YAMAGUCHI T, YOSHIMURA Y, SUEMATSU M. 2002. Leydig cell-derived heme oxygenase-1 regulates apoptosis of premeiotic germ cells in response to stress. *J Clin Invest* 109:457-467.
- PANT N, MURTHY RC, SRIVASTAVA SP. 2004. Male reproductive toxicity of sodium arsenite in mice. *Hum Exp Toxicol* 23:399-403.
- PELLINIEMI LJ, KUOPIO T, FROJDMAN K. The cell biology and function of the fetal Leydig cell. In: PAYNE AH, HARDY MP, RUSSELL LD. (Org.), *The Leydig cell*. Vienna: Cache River Press, 1996, cap.5, p. 143-157.
- PESCOVITZ OH, SRIVASTAVA CH, BREYER PR, MONTS BA. 1994. Paracrine control of spermatogenesis. *Trend Endocrinol Metabol* 5:126-131.
- QIN DN, SHE BR, SHE YC, WANG JH. 2000. Effects of flavonoids from semen *Cuscutae* on the reproductive male rats. *Asian J Androl.* 2:99-102.
- RATNASSORIYA WD, JAYAKODY JR. 2000. Long term administration of large doses of paracetamol impairs the reproductive competence of male rats. *Asian J Androl.* 2:247-255.

- RICHBURG JH. 2000. The relevance of spontaneous – and chemically-induced alterations in testicular germ cell apoptosis to toxicology. *Toxicol Lett* 112-113: 79-86.
- RIVIER C, RIVEST S. 1991 Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary gonadal axis: peripheral and central mechanism. *Biol Reprod* 45:523-32.
- ROOSEN-RUNGE EC. The process of spermatogenesis in animals. Cambridge: Academic Press, 1977. 123p.
- ROSEN BP, LIU Z. 2008. Transport pathways for arsenic and selenium: A minireview. *Environ Int* : 1-4.
- ROUILLER-FABRE V, LECERF L, GAUTIER CM, SAEZ JM, HABERT R. 1998. Expression and effects of insulin-like growth factor I on rat fetal Leydig cell function and differentiation. *Endocrinology* 139:2926-2934.
- RUSSELL LD, GRISWOLD MD. The Sertoli Cell. Clearwater: Cache River Press, 1993. 801p.
- RUSSELL LD, CHANDRASKEKAR V, BARTKE A, SINHA-HIKIM AP. 1994. The hamsters Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. *Int J Androl* 17:93-106.
- RUSSELL LD, ETTLIN RA, SINHA HIKIM AP, CLEGG ED. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL LD, ETTLIN RA, SINHA HIKIM AP, CLEGG ED. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River Press, 1990. cap. 1, p.1-40.
- RUSSELL LD. “Sertoli cells, overview”. *Encyclopedia of Reproduction*. v.4: p.381-387, 1999.
- SANGHAMITRA S, HAZRA J, UPADHYAY SN, SINGH RK, AMAL RC. 2008. Arsenic induced toxicity on testicular tissue of mice. *Indian J Physiol Pharmacol* 52: 84-90.
- SARADHA B, MARTHUS PP. 2006. Effect of environmental contaminants on male reproduction. *Environ Toxicol Pharmacol* 21:34-41.

- SCHLATT S, MEINHARDT A, NIESCHLAG E. 1997. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *Eur J Endocrinol* 137:107-117.
- SCHNEID-KOFMAN N, SHEINER E. 2005. Does stress effect male infertility? *Med Sci Monit* 11:11-13.
- SETCHELL BP. Male reproductive organs and semen. In: CUPPS PT. *Reproduction in Domestic Animals*. (Org.): San Diego: Academic Press, 1991. cap. 6, pp. 221-250.
- SHARPE RM. Regulation of Spermatogenesis. In: KNOBIL E, NEILL JD. *The Physiology of Reproduction*, New York: Raven Press, 1994. cap 22, p.1363-1434.
- SINHA-HIKIM AP, SINHA-HIKIM IS, AMADOR AG, BARTKE A, WOOLF A, RUSSELL LD. 1991. Reinitiation of spermatogenesis by exogenous gonadotropins in a seasonal breeder, the woodchuck (*Marmota monax*), during gonadal inactivity. *Am J Anat* 92:194-213.
- SKINNER MK. 1991. Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Rev* 12:45-77.
- SPITERI-GRECH J, NIESCHLAG E. 1993. Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis – a review. *J Reprod Fertil* 98:1-14.
- SRISVASTAVA S, SRISVASTAVA SP. 1991. Effect of 2- ethylhexyl - phthalate on 17-beta-hydroxysteroid in testis of rats. *Toxicol Lett* 57:235-239.
- THOMPSON DJ. 1993. A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals. *Chem. Biol Interact* 88:89-114.
- THORNTON I, FARAGO M. The geochemistry of arsenic. In: CO. ABERNATHY; RL. CALDERON; WR. (Org.). *Arsenic Exposure and health effects*, New York: Chapman, Hall, 1997, p. 1-16.
- USEPA 2000. National Primary Drinking Water Regulations; Arsenic and Classifications to Compliance and New Source Contaminants Monitoring; Proposed Rule. *Federal Register*, vol.65, No. 121, June 22, p.38888-38983.

- VEERAMACHANENI DN. 2008. Impact of environmental pollutants on the male: effects on germ cell differentiation. *Anim Reprod Sci* 105:144-157.
- VILLA BELLOSTA R, SORRIBAS V. 2008. Role of rat sodium/phosphate cotransporters in the cell membrane transport of arsenate. *Toxicol Appl Pharmacol* 232:125-134.
- WAALKES MP, WARD JM, LIU J, DIWAN BA. 2003. Transplacental carcinogenicity of inorganic arsenic in the drinking water: induction of hepatic, ovarian, pulmonary, and adrenal tumor in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 186:7-17.
- WANG H, NAIR MG, STRASBURG GM, CHANG YC, BOOREN AM, GRAY JI. 1999. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *J Nat Prod* 62: 294-296.
- WARD IL, WARD OB, WINN RJ, BIELAWSKI D. 1994. Male and female sexual behavior potential of male rats prenatally exposed to the influence of alcohol, stress, or both factors. *Behav Neurosci* 108:1188-1195.
- WATCHO P, KAMTCHOUING P, SOKENG SD, MOUNDIPA PF, ESSAME JT, KOUETA N. 2004. Androgenic effect of *Mondia whitei* roots in male rats. *Asian J Androl* 6:269-272.
- WHO 2001a. United Nations Synthesis report on Arsenic in Drinking water. Geneva, World Health Organization. ([http://www.who.int/water sanitation health/arsenic,arsenic UNReptoc .htm](http://www.who.int/water_sanitation_health/arsenic,arsenic_UNReptoc.htm)).
- WHO 2001b. Arsenic in drinking water. Fact Sheet. 120, [http:// www.who.int/inf-fs/en/fact210.htm](http://www.who.int/inf-fs/en/fact210.htm)).
- ZHANG Y, VARRED SK, NAIR M G. 2005. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sciences* 13: 1465-1472.
- ZHENG Y, JIYAO W, JACK C, GUOQUAN W, LIAN W. 2002. The absorption and excretion of fluoride and arsenic in humans. *Toxicol Lett* 133:77-82.

## **Capítulo 1**

**Parâmetros biométricos e concentração de arsênio em órgãos do aparelho reprodutor masculino, fígado, rim, osso e músculo estriado esquelético e de transaminases séricas em camundongos Suiços adultos expostos ao arsenato e efeito protetor do guaraná e da vitamina E.**

**Wellington de Souza Mata<sup>1</sup>**

**Sérgio Luis P. da Matta<sup>1\*</sup>**

**Maria do Carmo Gouveia Peluzio<sup>2</sup>**

**Tarcízio Antônio R. de Paula<sup>3</sup>**

**Juraci Alves de Oliveira<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>**Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa**

<sup>2</sup>**Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Viçosa**

<sup>3</sup>**Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa**

**\* Autor para correspondência**

**Sérgio Luis P. da Matta**

**Tel: +55-31-3891-4064 / +55-31-3899-3361**

**smatta@ufv.br**

## RESUMO

A exposição ao As pode ocorrer, principalmente, pela água de beber e, em algumas situações, por ingestão de alimentos contaminados, inalação e absorção cutânea. Processos naturais, industriais e antrópicos têm contribuído para aumentar os teores de As no meio. O As influencia a função reprodutiva masculina, afetando o processo espermatogênico, e várias evidências indicam sua ação tóxica está relacionado ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. Estes efeitos deletérios podem ser minimizados pela administração de diversas substâncias, incluindo aminoácidos, vitaminas e compostos quelantes. O guaraná, planta originária da região amazônica, é rico em cafeína, flavonóides e taninos com propriedades antioxidantes, sendo utilizado na fitoterapia para a prevenção e o tratamento de doenças relacionadas ao desequilíbrio da atividade oxidante da célula. A vitamina E suprime a peroxidação lipídica no testículo e mitocôndrias, sendo capaz de reverter efeitos deletérios decorrentes da exposição testicular a diversos fatores como ozônio, ciclofosfamida, toxinas e contaminantes policlorados bifenílicos. O objetivo do presente estudo foi avaliar os parâmetros biométricos, o acúmulo tecidual de arsênio e as concentrações séricas de transaminases e o efeito protetor do guaraná e da vitamina E no acúmulo de As tecidual. Foram utilizados 35 camundongos Suíços com idade de 70 dias, divididos em cinco grupos contendo sete animais cada: CTR-(controle negativo) em que os animais receberam apenas água destilada e 0,5 mL do veículo de suspensão carboxi-metil celulose (CMC) via intraperitoneal (i.p); ARS-(controle positivo) em que os animais receberam 100 mg L<sup>-1</sup> de arsenato e 0,5 mL de CMC/i.p; VTE – em que os animais receberam 100 mg L<sup>-1</sup> de arsenato e vitamina E/i.p (2mg em 0,5 mL de CMC); GUA- em que os animais receberam 100 mg L<sup>-1</sup> de arsenato e guaraná/i.p (2 mg g<sup>-1</sup> de peso corporal em 0,5 mL de CMC); GUA/VTE – em que os animais receberam 100 mg L<sup>-1</sup> e vitamina E (2mg em 0.5 mL de CMC) associada ao guaraná (2mg g<sup>-1</sup> de peso corporal em 0.5 mL de CMC). O arsenato foi fornecido aos animais

na água de beber e os tratamentos administrados em intervalos de 72 h. Após 42 dias, o que corresponde a um ciclo espermatogênico, os animais sofreram eutanásia e procedeu-se às análises. Os animais expostos ao arsenato sem tratamento concomitante à base de antioxidantes apresentaram redução do peso corporal e testicular, aumento na concentração de ALT e no acúmulo tecidual de As na maioria dos tecidos avaliados, comparados ao controle negativo e aos grupos que receberam algum tipo de tratamento. Os resultados indicam que os tratamentos administrados, isolados ou em combinação, minimizaram as alterações decorrentes da exposição ao arsenato.

**Palavras-chave:** Arsênio, espectrofotometria, testículo, transaminases, estresse oxidativo.

## 1. Introdução

A contaminação por As pode ocorrer, principalmente, pela ingestão de água e alimentos e, em algumas situações, por inalação e absorção cutânea. Processos naturais, industriais e antrópicos têm contribuído para aumentar os teores de As no meio (USEPA, 2000; WHO, 2001). Muitos países, incluindo a Argentina, Bangladesh, Índia, México, Tailândia e Taiwan têm documentado toxicidade aguda e crônica em humanos e outros animais devido à contaminação das águas (Thornton & Farago, 1997; Tchounwou et al., 1999; Dikanpar, 2000; Jin et al., 2004).

No Brasil, as fontes naturais de contaminação por As, identificadas até o momento, estão relacionadas às rochas de auríferos sulfetados e as fontes antropogênicas associadas a atividades de mineração e refino de minério como as situadas no Quadrilátero Ferrífero, no sudoeste do estado de Minas Gerais (Magalhães et al., 2001). A contaminação dos sedimentos por As no Quadrilátero Ferrífero foi inicialmente descrito por (Borba et al. 2000) que constataram também presença de As em águas superficiais e subcutâneas.

O As ingerido entra na corrente sanguínea, onde se liga fracamente a proteínas plasmáticas, sendo distribuído a vários tecidos e órgãos (Vahter, 1983). Os compostos de As apresentam meia-vida de 30 a 60 h, antes de ser excretado na urina. O As é excretado em várias formas químicas incluindo o arsenito ( $\text{As}^{+3}$ ), arsenato ( $\text{As}^{+5}$ ), ácido metilarsênico (MAA), ácido dimetilarsênico (DMAA) e outras formas ligadas a compostos orgânicos (Crececius, 1977; Thompson, 1993).

Após ingestão, o arsenato é distribuído através das membranas celulares por transportadores de fosfato inorgânico (Villa Bellosta & Sorribas, 2008). O As, na forma de arsenato quando administrado em soluções aquosas é extensivamente absorvido (>90%) pelo trato gastrointestinal humano e da maioria dos animais experimentais (Vather & Norin, 1980), possivelmente pela utilização dos mesmos transportadores de fosfato existentes na membrana.

O As é capaz de se ligar a grupos específicos em determinados tecidos, o que justifica seu acúmulo em alguns órgãos (Pant et al., 2001).

A alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima encontrada predominante no fígado, em concentração moderada nos rins e em menores quantidades no coração e músculos esqueléticos. Na célula hepática, ela localiza-se no citoplasma (90%) e na mitocôndria (10%). Qualquer lesão ou doença afetando o parênquima hepático liberará maior quantidade da enzima para a corrente sanguínea, elevando a concentração sérica. Em geral, as causas mais comuns de elevação da alanina aminotransferase no sangue ocorrem por disfunção hepática. Desta maneira, além de ser sensível, ela é também bastante específica para o diagnóstico de doença hepatocelular (Dufour et al., 2000).

A aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima encontrada em concentração muito alta no músculo cardíaco, músculos esqueléticos e em menor concentração nos rins e pâncreas. Na maioria das vezes, a dosagem de AST é realizada juntamente com ALT e a relação AST/ALT pode ser determinada para auxiliar no diagnóstico diferencial das doenças (Panteghini, 1990).

O As influencia a função reprodutiva masculina, afetando o processo espermatogênico (Sanghamitra et al., 2008). Isso se deve, provavelmente, ao estresse oxidativo que causa diminuição no peso testicular, na quantidade e motilidade dos espermatozoides, diminuição dos níveis de marcadores testiculares, como a fosfatase ácida, sorbitol desidrogenase e da 17- $\beta$  hidroxisteróide-desidrogenase, aumento nos níveis de lactato desidrogenase e  $\gamma$ -transpeptidase. (Liu et al., 2001, Pant et al., 2004). Diversos componentes dos alimentos, como os flavonóides e a vitamina E podem interagir com o arsênio, adsorvendo-o e limitando sua dissolução e absorção (Mckinney, 1992), ou atuando como protetores dos danos resultantes da ação das EROS.

O guaraná é uma planta originária da região amazônica, rica em cafeína, flavonóides e taninos. Apresenta propriedades antioxidantes, sendo utilizado na fitoterapia para a prevenção e tratamento de doenças relacionadas ao desequilíbrio da atividade oxidante da célula (Basile et al., 2005, Campos et al., 2005, Otobone et al., 2007). Já a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) é um antioxidante lipofílico indispensável para a manutenção da espermatogênese em mamíferos. O tocoferol está incluído na classe dos antioxidantes convencionais que apresentam estrutura fenólica e pode reagir com radicais peroxil, protegendo membranas contra danos oxidativos (Ribeiro et al., 2008). Está presente em grande quantidade nas células de Sertoli, nos espermatócitos em fase de paquíteno e, em menor extensão, nas espermátides arredondadas (Yoganathan et al., 1989). A deficiência de vitamina E em nível testicular leva a um estado de estresse oxidativo que desregula o processo espermatogênico e a produção de testosterona (Aitken & Roman, 2008).

Uma vez que o principal mecanismo de ação tóxica do As é o estímulo a processos oxidativos no organismo, o objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade do testículo e de outros órgãos acumularem As e os efeitos desse acúmulo sobre os parâmetros biométricos e as concentrações séricas de transaminases, envolvendo o potencial antioxidante do guaraná e da vitamina E.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Preparo das suspensões**

A solução de guaraná foi preparada com a adição de 64 g de guaraná<sup>®</sup> em pó em água destilada a 60°C completando-se o volume para 50 mL. Em seguida, sob agitação, foi adicionado 0,25 g de carboxi-metil celulose (CMC), seguido da adição de propilenoglicol ajustando volume para 400 mL. A solução de vitamina E<sup>®</sup> foi preparada com a adição de 3,2 g em água destilada a 60°C completando-se o volume para 50 mL. Em seguida, sob agitação

foi adicionado 0,25 g de CMC, seguido da adição de propilenoglicol ajustando o volume para 400 mL. A solução de guaraná<sup>®</sup> + vitamina E<sup>®</sup> foi preparada com a adição de 64 g de guaraná<sup>®</sup> e 3,2 g de vitamina E<sup>®</sup> em água destilada a 60°C completando-se o volume para 50 mL. Em seguida, sob agitação adicionou-se 0,25g de CMC, seguido da adição de propilenoglicol, ajustando o volume para 400 mL.

## **2.2 - Animais, Grupos Experimentais e Tratamentos**

Foram utilizados 35 camundongos Suíços com 70 dias, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Os animais foram divididos em cinco grupos de sete indivíduos cada, pesados e colocados em gaiolas individuais. O grupo controle negativo - CTR recebeu água destilada e injeção intraperitoneal (i.p) de 0,5 mL de CMC e o grupo controle positivo - ARS recebeu As, na forma de arsenato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – Merck) na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> e 0,5 mL de CMC/(i.p). Os demais grupos receberam solução de arsenato de sódio 100 mg L<sup>-1</sup> e injeção intraperitoneal de 0,5 mL contendo 2 mg de vitamina E ou contendo 2 mg g<sup>-1</sup> de peso de guaraná - GUA, ou associação de vitamina E e guaraná nas mesmas doses anteriores - GUA/VTE. A concentração de guaraná e de vitamina E foi determinada segundo Leite (2008) e Jedlinska (2002), respectivamente.

O arsenato foi oferecido aos animais na água de beber, de forma contínua e os tratamentos, com vitamina E e guaraná, aplicados a cada 72 h, por 42 dias, que corresponde a um ciclo espermatogênico..

Todo o regime líquido foi fornecido *ad libitum*, assim como a alimentação sólida (ração), mantendo-os em condições controladas de temperatura (média de 24,7 °C) e fotoperíodo (12-12h claro/escuro).

### **2.3. - Coleta de Amostras**

Os animais foram anestesiados com associação de quetamina e xilazina na dose de 10 e 1mg/kg de peso corporal, respectivamente, e pesados, para então se proceder à retirada dos testículos, órgãos sexuais acessórios, fígado, rim, músculo estriado esquelético (MEE) e o fêmur. O fêmur foi limpo para retirar qualquer tecido associado. Todos os órgãos coletados foram imersos em solução de Karnovsky por 24 horas sob refrigeração. Após esse período, os órgãos foram pesados, em balança digital de precisão (BEL Mak 160 classe 2).

### **2.4. Determinação dos teores de Arsênio.**

Frações dos órgãos coletados, com peso conhecido, foram secas em estufa e submetidas à mineralização úmida com 3 mL de uma mistura nitro-perclórica 2:1, à temperatura de 100-120 °C para evitar a volatilização do As, até a completa oxidação da matéria orgânica. Amostras mineralizadas, foram diluídas e filtradas para 25 mL com água desionizada e analisadas em espectrofotômetro de emissão, (Perkin Elmer, modelo Optima 3300 DV), em plasma indutivamente acoplado, para determinação dos teores de As.

### **2.5. Determinação dos níveis plasmáticos de transaminases (AST e ALT)**

A dosagem das transaminases foi feita utilizando-se kits comerciais, em processador bioquímico multiparamétrico.

### **2.4. - Análises estatísticas**

Após testes de normalidade e homocedasticidade, as médias dos parâmetros estudados foram comparadas entre os grupos por meio de análise de variância (ANOVA) utilizando-se o teste de Student Newman-Keuls. Foi utilizado o software STATISTICA 3.11, sendo  $p < 0,05$  considerado significativo. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão.

### 3. Resultados

Os animais do grupo controle negativo (CTR) apresentaram concentrações de As muito baixas ou abaixo do limite de detecção (Tabela 1). Nos grupos tratados com arsenato, todas as amostras de órgãos do aparelho reprodutor masculino, fígado, rim, MEE e osso apresentaram acúmulo de As. O As foi detectado em maior concentração nos testículos, epidídimo, próstata e glândula vesicular, respectivamente. Foi observada redução na concentração de As nos testículos dos animais que receberam os tratamentos com guaraná, vitamina E e associação de ambos. Resultado semelhante foi observado na próstata. No entanto, no epidídimo e na glândula vesicular, não foram observadas variações significativas, em todos os grupos tratados com As mais antioxidante, em comparação ao grupo controle positivo (Tabela 1).

Em todos os animais do controle positivo foi verificado acúmulo de As no fígado, rim, MEE e osso (Tabela 2). Não houve diferença significativa entre o grupo ARS e os demais grupos tratados, em relação à concentração de As nos rins e MEE. Por outro lado, os animais que receberam tratamentos com vitamina E e ou guaraná apresentaram redução na concentração de As no osso e no fígado, comparados ao grupo ARS.

Os resultados das características biométricas referentes ao peso corporal, peso testicular, peso da albugínea, peso do parênquima e índice gonadossomático encontram-se na tabela 3. O peso corporal, testicular, peso do parênquima e o IGS no grupo ARS apresentaram uma redução significativa em relação aos demais tratamentos. Observou-se um aumento significativo da albugínea testicular do grupo GUA/VTE em relação aos grupos CTR, ARS e GUA, apesar de não apresentar variações significativas em relação ao grupo VTE.

O peso do epidídimo, glândula vesicular e próstata encontram-se na Tabela 4. Os pesos de epidídimo e próstata apresentaram aumento significativo no grupo GUA/VTE em relação

aos demais tratamentos. Não foram observadas variações significativas no peso da glândula vesicular em todos os grupos testados.

O peso dos rins, fígado e osso encontram-se na Tabela 5 e não apresentaram variações significativas entre os diferentes grupos testados.

Os níveis séricos de AST e ALT estão demonstrados nas Figuras 1 e 2, respectivamente. Não houve variação nos níveis séricos de AST. Porém, a ALT aumentou em ARS em comparação aos grupos CTR, VTE e GUA/VTE. Adicionalmente, os animais dos grupos VTE e GUA/ VTE mostraram redução de ALT em relação aos grupos ARS e GUA.

#### **4. Discussão**

A administração oral de arsenato de sódio levou à redução significativa no peso corporal, testicular, peso do parênquima e no índice gonadossomático. Nandi et al. (2005) também relataram uma diminuição do peso corporal em ratos submetidos à exposição por arsenito por um período de 12 semanas. O peso dos testículos constitui um elemento importante na avaliação da toxicidade reprodutiva em animais adultos machos (Aman, 1982), podendo ser utilizado como indicador quantitativo da produção espermática, uma vez que o principal componente testicular é o túbulo seminífero (França & Russel, 1998).

O IGS representa o percentual de massa corporal alocado em testículo. Esta alteração está provavelmente relacionada à diminuição significativa, no peso corporal e testicular dos animais submetidos à exposição ao arsênio na água de beber sem nenhum tratamento concomitante (ARS). Sanghamitra et al. (2008) também relataram redução no índice gonadossomático em camundongos submetidos ao tratamento com arsênio durante 60 dias.

Animais com tratamento antioxidante associado apresentaram aumento significativo do epidídimo, próstata em relação aos demais grupos. O aumento no peso de órgãos reprodutivos acessórios pode estar relacionado às propriedades antioxidantes da vitamina E

(Ramanathan et al., 2002) e do guaraná (Basile et al., 2005, Campos et al., 2005). Não foram observadas variações significativas no peso da glândula vesicular entre os grupos testados

Pant et al. (2001) não observaram variações no peso dos órgãos reprodutivos acessórios após administração de arsenito durante 35 dias.

O fígado é um órgão importante para o metabolismo e desintoxicação. A maioria do arsênio absorvido do trato gastrointestinal é metilado no fígado durante as primeiras etapas do metabolismo. A metilação é a via predominante para arsênio inorgânico em humanos e a maioria dos animais de laboratório. Essas formas orgânicas exibem pouco ou nenhuma toxicidade são rapidamente excretadas na urina (De Sesso et al., 1998). No presente trabalho, não foram observadas variações significativas no peso do fígado, rins para os diferentes grupos tratados, o que não elimina a possibilidade de uma possível toxicidade do arsênio. A dosagem das enzimas ALT e AST é utilizada comumente como indicadores bioquímicos de hepatotoxicidade. Neste trabalho, animais do grupo ARS apresentaram concentrações significativamente elevadas de ALT em relação ao grupo CTR e aos tratamentos antioxidantes GUA e VTE. Modi et al. (2006) e Mittal & Flora (2006), descreveram aumento nos níveis séricos de ALT após administração oral de arsenito. No entanto, a suplementação com ácido ascórbico (Nandi et al., 2005), a administração combinada com zinco ou n-acetilcisteína (Modi et al., 2006) ou a co-administração com fluoreto de sódio (Mittal et al., 2006) levaram a um decréscimo nas concentrações plasmáticas, demonstrando, portanto, efeito hepatoprotetor. As concentrações de AST geralmente estão elevadas em patologias que cursam com lesão de músculo estriado (Dufour, 2000). Não foram observadas variações significativas nas concentrações de AST entre os diferentes tratamentos, concordando com os resultados de Nandi et al. (2005) que demonstraram um aumento significativo nos níveis de creatinina e ALT sem alterações significativas nas concentrações séricas de AST, uréia e proteína total.

O fêmur foi utilizado como parâmetro para comparações entre o peso ósseo e o acúmulo de arsênio tecidual. Não foram observadas variações significativas no peso entre os grupos testados, embora o arsenato de sódio apresente uma maior afinidade para ossos e dentes, provavelmente devido a sua similaridade química com o fosfato (De Sesso et al., 1988).

Os animais expostos ao arsenato apresentaram acúmulo de arsênio nos testículos, próstata, epidídimo e glândula vesicular. Uma das conseqüências da intoxicação por As é o estresse oxidativo, resultante da produção aumentada de EROS, e tem sido apontado com um dos principais mecanismos responsáveis pelos efeitos tóxicos do As em diferentes tecidos e órgãos, ocasionando alterações na estrutura dos fosfolipídios da membrana celular, alterando suas propriedades físico-químicas e inativando suas funções (Haider & Najjar, 2008). As EROS são capazes de alterar funções celulares como transcrição, proliferação e morte celular (Yu et al., 2008).

As maiores concentrações de As observadas no testículo e próstata justificam-se pela capacidade do As de se ligar a grupos específicos nestes tecidos. Pant et al. (2001) relataram acúmulo tecidual de As, sendo este específico e dose-dependente, nos testículos, próstata, epidídimo e glândula vesicular, com maior acúmulo na próstata. Danielsson et al. (1984) relataram altos teores de As radioativo no lume do epidídimo, após injeção intravenosa de arsenato e/ou arsenito de sódio, indicando risco de redução da viabilidade espermática e comprometimento da reprodução. No presente estudo, o fornecimento de guaraná isolado ou associado com vitamina E, levou à redução tecidual de arsênio em testículo e próstata. No entanto, o tratamento isolado com guaraná não alterou significativamente as concentrações teciduais de As na glandula vesicular e epidídimo.

A exposição dos animais ao arsenato resultou em acúmulo significativo no osso, rim fígado e músculo estriado esquelético, o que pode levar ao aparecimento de neoplasias,

conforme demonstrado por Baastrup et al. (2008) no estudo que revelou significativa a exposição ao As e risco de câncer de pulmão, bexiga, fígado, rim, próstata, intestino e pele.

Normalmente, o As absorvido se distribui nos diversos órgãos de modo relativamente rápido, conforme demonstrado por Hughes et al. (1999) em que foi verificado acúmulo tecidual de As na pele, rins e fígado. A suplementação com micronutrientes, antioxidantes, vitaminas e aminoácidos podem auxiliar na proteção dos tecidos, alterar a capacidade de ligação do agente tóxico e sua absorção tecidual. Assim, a eficácia terapêutica da administração de antioxidantes tem sido avaliada em diversos trabalhos envolvendo estresse oxidativo induzidos pela administração de As (Ramanathan et al., 2002; Nandi et al., 2005; Modi et al., 2006; Chang et al., 2007). Modi et al. (2006) verificaram que a suplementação conjugada de zinco e n-acetilcisteína foi mais efetiva na proteção contra os efeitos tóxicos da exposição ao As.

No presente estudo, o tratamento com As isolado ou associado com antioxidante, não desencadeou redução significativa no teor de As no rim. Assim, embora a reabsorção de arsenato de sódio ocorra no túbulo contorcido proximal (Tsukamoto et al., 1983), provavelmente o As não tenha sido eliminado do ambiente renal, apesar da presença de antioxidantes. A terapia com vitamina E e guaraná não alterou a distribuição tecidual de As no MEE.

No presente estudo, tanto a vitamina E quanto o guaraná, assim como a sua associação, mostraram ser determinantes na redução significativa do acúmulo do As no fígado. Verificou-se acúmulo significativo de As nos ossos dos animais do grupo ARS, em relação aos demais tratamentos, sendo, inclusive, o osso o local de maior concentração de As, se comparado a fígado e rim. Provavelmente esse acúmulo se deve à maior afinidade do arsênio na forma  $As^{+5}$  para ossos e dentes, devido à sua similaridade química ao fosfato (Dixon, 1997, De Sesso et al., 1998).

A suplementação com determinadas substâncias podem reduzir o acúmulo de As em alguns órgãos, conforme demonstrado por Modi et al. (2006), que verificaram redução de As sanguíneo e renal após suplementação com n-acetilcisteína. Nandi et al. (2005) observaram que o acúmulo de As no fígado, rim e sangue, após exposição de ratos ao arsenito na água de beber, por 12 semanas, foi reduzido com a administração concomitante de vitaminas como ácido ascórbico e tiamina e aminoácidos como cisteína e metionina. Isso se deve, provavelmente, a diferentes modelos biocinéticos de distribuição do As nos tecidos (Kannan et al., 2001). Gupta et al. (2005) demonstraram os efeitos terapêuticos da semente de *Moringa oleifera* em ratos, expostos ao arsenito na água de beber durante quatro semanas, relatando alterações significativas em parâmetros bioquímicos que são indicativos de estresse oxidativo além de uma redução nas concentrações teciduais de arsênio no sangue, fígado e rins.

## **5. Conclusões.**

A exposição ao arsenato reduziu o peso corporal e testicular com aumento das concentrações séricas de ALT e revelou especificidade no acúmulo tecidual de As, com uma maior preferência para testículo, próstata e epidídimo respectivamente. Os resultados também indicam um papel protetor do guaraná e da vitamina E que, provavelmente, agiram como quelantes e antioxidantes, minimizando as alterações decorrentes da exposição ao arsenato..

## **Agradecimentos**

Ao Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa, pelas análises das amostras teciduais e ao Centro Universitário de Caratinga (UNEC) pelo apoio e licença das atividades acadêmicas.

## 5. Referências.

- Aman RP. 1982. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J Androl* 2: 37-38.
- Aitken RJ, Roman SD. 2008. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Adv Exp Med Biol.*, 636:154-171.
- Baastrop R, Sorensen M, Balstrom T, Frederiksen K, Larsen CL, Tjonneland A, Overvad K, Raaschou-Nielsen O. 2008. Arsenic in drinking-water and risk for cancer in Denmark. *Environ Health Perspect* 116: 231-237.
- Basile A, Ferrara L, Pezzo M, Melle G, Sorbo S, Bassif P, Montesano D. 2005. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullina cupana*. *J Ethnopharmacol* 102:32-36.
- Borba RP, Figueiredo BR, Rawllins BG; Matchullat J. 2000. Arsenic in water and sediment in the Iron Quadrangle, Minas Gerais state, Brasil. *Revista Brasileira de Geociências*, 30: 554-557.
- Campos AR, Barros AI, Albuquerque FA, Leal LK, Rao VS. 2005. Acute effects of guarana (*Paullinia cupana*) on mouse behavior in forced swimming and open field tests. *Phytother Res* 19: 441-443.
- Chang SI, Jin B, Youn P, Changbo P, Park JD, Ryu DY. 2007. Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicol Appl Pharmacol* 218: 196-203.
- Crecelius EA. 1977. Changes in the chemical speciation of arsenic following ingestion by man. *Environ Health Perspect* 19: 147-150.
- Danielsson BRG, Dencker L, Lindgreen A, Tjalve H. 1984. Accumulation of toxic metals in male reproductive organs. *Arch Toxicol Suppl* 7: 177-180.
- De Sesso JM, Jacobson CF, Scialli AR, Farr CH, Holson JF. 1998. An assessment of the developmental toxicity of inorganic arsenic. *Reprod Toxicol Rev* 12: 385-433.

- Dipankar C. 2000. Groundwater arsenic contamination in Bangladesh and West Bengal, India. *Environ Health Persp* 108: 393-397.
- Dixon HBF. 1997. The biochemical action of arsenic acids especially as phosphate analogues. *Adv Inorg Chem* 44: 191-227.
- Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. 2000. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin Chem* 46: 2027-2049.
- Gupta R, Kannan GM, Sharma M, Flora SJS. 2005. Therapeutic effects of *Moringa oleifera* on arsenic-induced toxicity in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 20: 456-464.
- França LR, Russell LD. The testis of domestic mammals. In: *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. Madrid: Ed. Churchill Communications Europe, 1998. p. 198.
- Haider SS, Najar MS. 2008. Arsenic induces oxidative stress, sphingolipidosis, depletes proteins and some antioxidants in various regions of rat brain. *Kathmandu Univ Med J* 6:60-69.
- Hughes MF, Kenyon EM, Edwards BC, Mitchell CT, Thomas DJ. 1999. Strain-dependent disposition of inorganic arsenic in the mouse. *Toxicol* 137: 95-108.
- Jin Y, Sun G, Li X, Li G, Lu C, Qu L. 2004. Study on the toxic effects induced by different arsenicals in primary cultured rat astroglia. *Toxicol Appl Pharmacol* 196: 396-403.
- Jedlinska-Krakowska M, Jakubowski K, Kowalski A. 2002. Effect of increased ozone concentration in the air on the level of some immunological indices in rats given vitamin E and vitamin C. *Acta Pol Toxicol* 10: 81-87.
- Kannan GM, Tripathi N, Dube SN, Gupta M, Flora SJS. 2001. Toxic effects of arsenic (III) on some haematopoietic and central nervous system variables in rats and guinea pigs. *J. Toxicol Clin Toxicol* 39: 675-682.

- Leite, RP. Efeitos da associação de cloreto de cádmio e guaraná (*Paullinia cupana*) no testículo de ratos wistar: Análise morfométrica, estrutural e ultraestrutural. 2008. 74p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2008.
- Liu J, Kaduska M, Kiu Y, Qu W, Mason RP, Walker MP. 2001. Acute arsenic induced free radical production and oxidative stress related gene expression in mice. *Toxicologists* 54: 280-281.
- Magalhães VF, Carvalho CEV, Pfeiffer WC. 2001. Arsenic contamination and dispersion in the Engenho Inlet, Sepetiba Bay, SE, Brazil. *Water, air and soil pollution*, 129: 83-90.
- Mckinney D. 1992. Metabolism and disposition of inorganic arsenic in laboratory animals and humans. *Environ Geochem Health* 14: 43-48.
- Mittal M, Flora SJS. 2006. Effects of individual and combined exposure to sodium arsenite and sodium fluoride on tissue oxidative stress, arsenic and fluoride levels in male mice. *Chem Biol Interac* 162: 128-139.
- Modi M, Kaul RK, Kannan GM, Flora SJS. 2006. Co-administration of zinc and n-acetylcysteine prevents arsenic induced tissue oxidative stress in male rats. *J Trace Elem Med Biol* 20: 197-204.
- Nandi D, Patra RC, Swarup D. 2005. Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress and biochemical alterations in rats. *Toxicology* 211: 26-35.
- Otobone JF, Sanches AC, Nague R, Martins JV, Sela VR, Mello JC, Audi E. 2007. Effect of lyophilized extracts from guarana seed (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (mart.) on behavioral profile in rats. *Phytother Res* 21: 531-535.
- Pant N, Kumar R, Murthy RC, Srivastava, SP. 2001. Male reproductive effect of arsenic in mice. *BioMetals* 14: 113–117.

Pant N, Murthy RC, Srivastava SP. 2004. Male reproductive toxicity of sodium arsenite in mice. *Hum Exp Toxicol* 23: 399-403.

Panteghini M. 1990. Aspartate aminotransferase isoenzymes. *Clin Biochem* 23: 311-319.

Ramanathan K, Balakumar BS, Panneerselvam C. 2002. Effects of ascorbic acid and alpha tocopherol on arsenic induced oxidative stress. *Hum Exp Toxicol* 21:675-680.

Ribeiro SMR, Queiroz MELR, Peluzio MCG, Costa NMB, Matta SLP, Queiroz JH. 2008. Antioxidantes da dieta. In: Costa NMB & Peluzio MCG, *Nutrição Básica e Metabolismo*. Editora UFV. 382-400.

Sanghamitra S, Hazra J, Upadhyay SN, Singh RK, Amal RC. 2008. Arsenic induced toxicity on testicular tissue of mice. *Indian J Physiol Pharmacol* 52: 84-90.

Tchounwou PB, Wilson B, Ishaque A. 1999. Important considerations in the development of public health advisories for arsenic and arsenic containing compounds in drinking water. *Rev Environ Health* 14: 211-219.

Thompson DJ. 1993. A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals. *Chem Biol Interact* 88: 89-114.

Thornton I, Farago M. 1997. The geochemistry of arsenic. In: C.O. Abernathy; RL. Calderon; WR. Chappell (eds). *Arsenic Exposure and Health Effects*, New York, Chapman , Hall, p. 1-16.

Tsukamoto H, Parker HR, Peoples SA. 1983. Metabolism and renal handling of sodium arsenate in dogs. *Am J Vet Res* 44: 2331-2335.

USEPA 2000. National Primary Drinking Water Regulations; Arsenic and Classifications to Compliance and New Source Contaminants Monitoring; Proposed Rule. *Federal Register*, 65: 38888-38983.

Vather M, Norin H. 1980. Metabolism of <sup>74</sup>As- labeled trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice. *Environ Res* 21: 446-467.

- Vather M. 1983. Metabolism of arsenic. In: Fowler BA, ed. Biological and Environmental effects of Arsenic. Amsterdam, Elsevier, 171-98.
- Villa Bellosta R, Sorribas V. 2008. Role of rat sodium/phosphate cotransporters in the cell membrane transport of arsenate. *Toxicol Appl Pharmacol* 232:125-134.
- WHO 2001. United Nations Synthesis report on Arsenic in Drinking water, Geneva, World Health Organization.
- Yoganathan T, Eslild W, Hansson V. 1989. Investigation of detoxification capacity of rat testicular germ cells and Sertoli cells. *Free Radic Biol Med* 7: 355-359.
- Yu X, Robinson JF, Grible E, Hong SW, Sidhu JS, Faustman EM. 2008. Gene expression profiling analysis reveals arsenic-induced cell cycle arrest and apoptosis in p53-proficient and p53-deficient cell through differential gene pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* 233:389-403.

Tabela 1. Concentração de arsênio ( $\mu\text{g/g}^{-1}$  de tecido) no testículo, glândula vesicular, epidídimo e próstata de camundongos adultos após administração de água destilada (CTR), arsenato de sódio (ARS), e tratamento concomitante com arsenato + suspensão de guaraná (GUA), arsenato + vitamina E (VTE) e arsenato + guaraná + vitamina E (GUA/VTE).

<b>Tratamentos</b>	<b>Testículo</b>	<b>Glândula Vesicular</b>	<b>Epidídimo</b>	<b>Próstata</b>
CTR	$0,015 \pm 0,037^c$	$0,003 \pm 0,0004^c$	$0,016 \pm 0,037^c$	$0,001 \pm 0,003^c$
ARS	$10,841 \pm 3,642^a$	$2,353 \pm 2,073^a$	$7,771 \pm 6,011^a$	$8,299 \pm 2,644^a$
GUA	$4,971 \pm 3,058^b$	$1,465 \pm 1,218^a$	$7,088 \pm 2,614^a$	$3,305 \pm 1,314^b$
VTE	$4,373 \pm 2,743^b$	$0,693 \pm 0,679^b$	$2,800 \pm 1,116^b$	$3,232 \pm 1,738^b$
GUA/VTE	$2,757 \pm 1,983^b$	$1,650 \pm 0,427^a$	$2,332 \pm 1,227^b$	$3,629 \pm 1,830^b$

Letras diferentes nas colunas representam valores significativos ( $p < 0,05$ ) ( $n=7$ ).

Média  $\pm$  desvio-padrão.

Tabela 02. Acúmulo tecidual ( $\mu\text{g/g}$  de tecido) de arsênio no fêmur, músculo estriado esquelético (MEE), rim e fígado de camundongos adultos, após administração de água destilada (CTR), arsenato de sódio (ARS), tratamento concomitante com arsenato + suspensão de guaraná (GUA), arsenato + vitamina E (VTE) e arsenato + guaraná + vitamina E (GUA/VTE).

<b>Concentração de arsênio</b>				
<b>Tratamentos</b>	<b>Osso</b>	<b>MEE</b>	<b>Rins</b>	<b>Fígado</b>
CTR	$0,001 \pm 0,0003^c$	$0,001 \pm 0,0003^c$	$0,001 \pm 0,0003^b$	$0,001 \pm 0,0003^c$
ARS	$5,24 \pm 2,519^a$	$1,42 \pm 0,851^a$	$1,27 \pm 0,280^a$	$0,91 \pm 0,281^a$
GUA	$1,18 \pm 0,871^b$	$0,82 \pm 0,705^b$	$1,20 \pm 0,612^a$	$0,13 \pm 0,18^b$
VTE	$0,94 \pm 0,947^b$	$0,86 \pm 0,371^b$	$1,23 \pm 0,643^a$	$0,18 \pm 0,13^b$
GUA/VTE	$1,49 \pm 1,175^b$	$0,90 \pm 0,401^b$	$0,79 \pm 0,501^a$	$0,05 \pm 0,13^b$

Letras diferentes nas colunas representam valores significativos ( $p < 0,05$ ) ( $n=7$ ).

Média  $\pm$  desvio-padrão.

Tabela 3 – Peso corporal, peso testicular, índice gonadossomático (IGS), peso da albugínea e peso do parênquima de camundongos adultos, após administração de água destilada (CTR), arsenato de sódio (ARS), tratamento concomitante com arsenato + suspensão de guaraná (GUA), arsenato + vitamina E (VTE) e arsenato + guaraná + vitamina E (GUA/VTE).

<b>Tratamento</b>	<b>Peso corporal (g)</b>	<b>Peso testicular (g)</b>	<b>IGS (%)</b>	<b>Peso da albugínea (g)</b>	<b>Peso do parênquima (g)</b>
CTR	39,13 ± 2,25 <sup>b</sup>	0,28 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,73 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,0082 ± 0,0004 <sup>b</sup>	0,28 ± 0,02 <sup>b</sup>
ARS	34,20 ± 2,84 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,0094 ± 0,0032 <sup>b</sup>	0,20 ± 0,03 <sup>a</sup>
GUA	36,64 ± 0,73 <sup>b</sup>	0,26 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,67 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,0087 ± 0,0018 <sup>b</sup>	0,25 ± 0,02 <sup>b</sup>
VTE	39,88 ± 1,06 <sup>b</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,70 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,0118 ± 0,0030 <sup>ab</sup>	0,26 ± 0,01 <sup>b</sup>
GUA/VTE	39,80 ± 1,61 <sup>b</sup>	0,28 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,71 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,0151 ± 0,0050 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>b</sup>

Letras diferentes nas colunas representam valores significativos ( $p < 0,05$ ) ( $n=7$ ).

Média ± desvio-padrão.

Tabela 4 – Peso do epidídimo, peso da vesícula seminal, e peso da próstata de camundongos adultos, após administração de água destilada (CTR), arsenato de sódio (ARS), tratamento concomitante com arsenato + suspensão de guaraná (GUA), arsenato + vitamina E (VTE) e arsenato + guaraná + vitamina E (GUA/VTE).

<b>Tratamento</b>	<b>Peso do epidídimo (g)</b>	<b>Peso da glândula vesicular (g)</b>	<b>Peso da próstata (g)</b>
CTR	0,09 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,29 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,01 <sup>b</sup>
ARS	0,08 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,31 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,10 <sup>b</sup>
GUA	0,09 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,31 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,01 <sup>b</sup>
VTE	0,09 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,30 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,05 <sup>b</sup>
GUA/VTE	0,14 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,91 ± 0,03 <sup>a</sup>

Letras diferentes nas colunas representam valores significativos ( $p < 0,05$ ) ( $n=7$ ).

Média ± desvio-padrão.

Tabela 5 – Peso do fígado, peso dos rins e peso do fêmur direito de camundongos adultos, após administração de água destilada (CTR), arsenato de sódio (ARS), tratamento concomitante com arsenato + suspensão de guaraná (GUA), arsenato + vitamina E (VTE) e arsenato + guaraná + vitamina E (GUA/VTE).

<b>Tratamento</b>	<b>Peso do fígado (g)</b>	<b>Peso dos rins (g)</b>	<b>Peso do fêmur (g)</b>
CTR	1,79 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,49 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,010 <sup>a</sup>
ARS	1,71 ± 0,26 <sup>a</sup>	0,51 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,003 <sup>a</sup>
GUA	1,98 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,56 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,008 <sup>a</sup>
VTE	1,71 ± 0,35 <sup>a</sup>	0,56 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,010 <sup>a</sup>
GUA/VTE	2,06 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,006 <sup>a</sup>

Letras diferentes nas colunas representam valores significativos ( $p < 0,05$ ) ( $n=7$ ).

Média ± desvio-padrão.

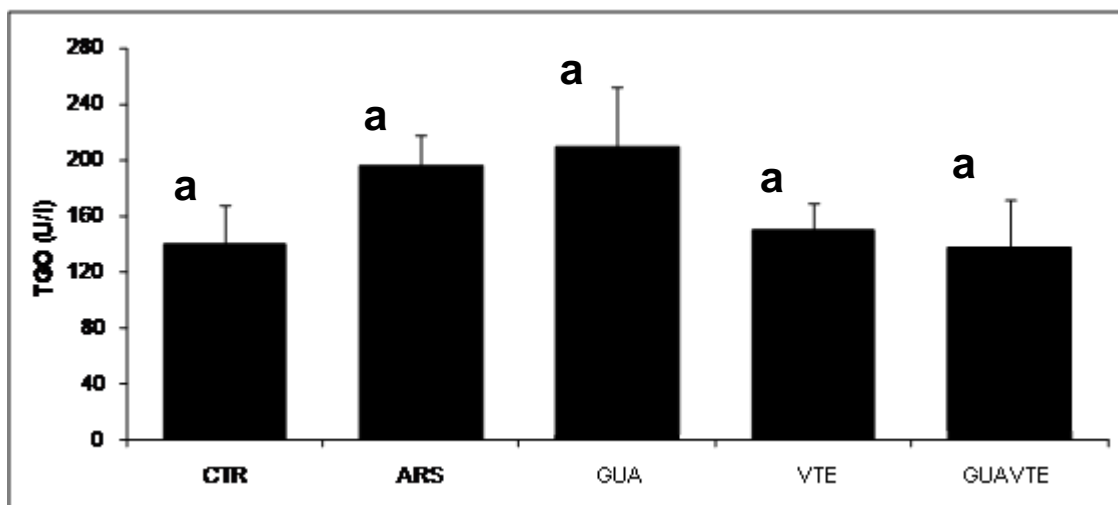


Figura 01. Níveis séricos de AST em camundongos adultos, após administração de água destilada (CTR), arsenato de sódio (ARS), tratamento concomitante com arsenato + suspensão de guaraná (GUA), arsenato + vitamina E (VTE) e arsenato + guaraná + vitamina E (GUA/VTE). Letras iguais representam valores não significativos ( $P > 0,05$ ).

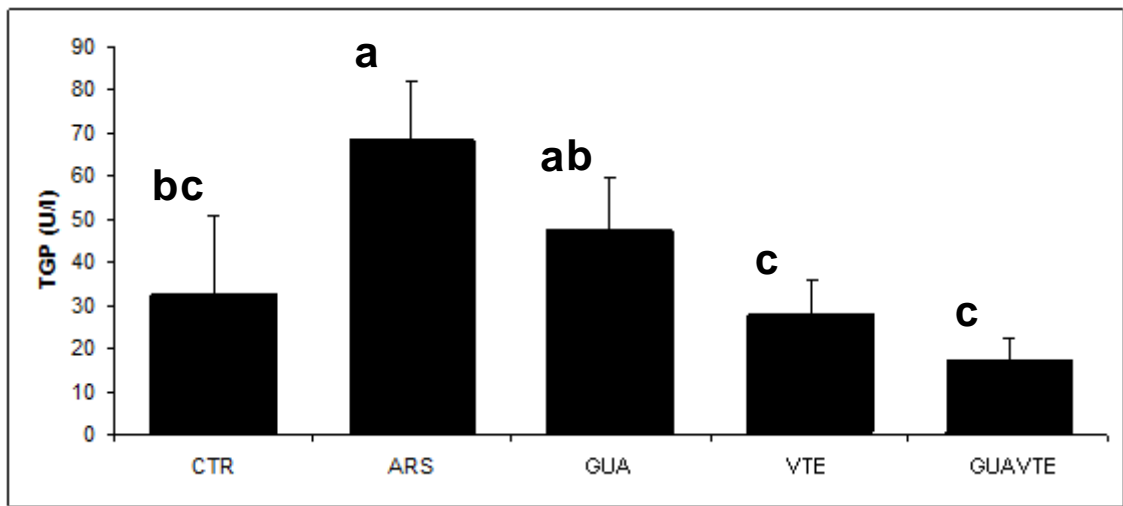


Figura 02. Níveis séricos de ALT em camundongos adultos, após administração de água destilada (CTR), arsenato de sódio (ARS), tratamento concomitante arsenato + suspensão de guaraná (GUA), arsenato + vitamina E (VTE) e guaraná + vitamina E (GUA/VTE). Letras iguais representam valores não significativos ( $P > 0,05$ ).

## **Capítulo 02**

**Toxicidade do arsenato e papel protetor do guaraná e vitamina E em características testiculares de camundongos adultos.**

**Wellington de Souza Mata<sup>1</sup>**

**Sérgio Luis P. da Matta<sup>1</sup>**

**Maria do Carmo Gouveia Peluzio<sup>2</sup>**

**Juraci Alves de Oliveira<sup>1</sup>**

**Tarcízio Antônio R. de Paula<sup>3</sup>**

**<sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa**

**<sup>2</sup>Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Viçosa**

**<sup>3</sup>Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa**

**\* Autor para correspondência**

**Sérgio Luis P. da Matta**

**Tel: +55-31-3891-4064 / +55-31-3899-3361**

**smatta@ufv.br**

## RESUMO

O As influencia a função reprodutiva masculina, afetando o processo espermatogênico, e várias evidências indicam sua ação tóxica está relacionado ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. Estes efeitos deletérios podem ser minimizados pela administração de diversas substâncias, incluindo aminoácidos, vitaminas e compostos quelantes. O guaraná, planta originária da região amazônica, é rico em cafeína, flavonóides e taninos com propriedades antioxidantes, sendo utilizado na fitoterapia para a prevenção e o tratamento de doenças relacionadas ao desequilíbrio da atividade oxidante da célula. A vitamina E suprime a peroxidação lipídica no testículo e mitocôndrias, sendo capaz de reverter efeitos deletérios decorrentes da exposição testicular a diversos fatores como ozônio, ciclofosfamida, toxinas e contaminantes policlorados bifenilicos. O presente trabalho teve o objetivo de avaliar a influência do arsenato de sódio e possível papel protetor do guaraná e vitamina E em características testiculares de camundongos adultos. Foram utilizados 35 camundongos Suíços com idade de 70 dias, divididos em cinco grupos contendo sete animais cada: CTR-(controle negativo) em que os animais receberam apenas água destilada e 0,5 mL do veículo de suspensão carboxi-metil celulose (CMC) via intraperitoneal (i.p); ARS-(controle positivo) em que os animais receberam 100 mg L<sup>-1</sup> de arsenato e 0,5 mL de CMC/i.p; VTE – em que os animais receberam 100 mg L<sup>-1</sup> de arsenato e vitamina E/i.p (2mg em 0,5 mL de CMC); GUA- em que os animais receberam 100 mg L<sup>-1</sup> de arsenato e guaraná/i.p (2 mg g<sup>-1</sup> de peso corporal em 0,5 mL de CMC); GUA/VTE – em que os animais receberam 100 mg L<sup>-1</sup> e vitamina E (2mg em 0.5 mL de CMC) associada ao guaraná (2mg g<sup>-1</sup> de peso corporal em 0.5 mL de CMC). O arsenato foi fornecido aos animais na água de beber e os tratamentos administrados em intervalos de 72 h. Após 42 dias, o que corresponde a um ciclo espermatogênico, os animais sofreram eutanásia e procedeu-se às análises para determinação dos teores de arsênio. Os animais expostos ao arsenato sem tratamento concomitante

apresentaram significativa redução na altura do epitélio germinativo, na proporção volumétrica, diâmetro tubular, índice gonadossomático e no índice tubulossomático. Não foi observada variação significativa no comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo. O tratamento com antioxidante conferiu proteção aos efeitos deletérios resultantes da exposição ao arsenato.

**Palavras-chave:** Arsênio, espermatogênese, testículo, túbulo seminífero, estresse oxidativo.

## **1. Introdução**

O processo reprodutivo se altera em decorrência de variações ambientais. A literatura científica tem mostrado, tanto em humanos quanto em outros animais, que fatores ambientais podem contribuir para a fertilidade ou infertilidade do indivíduo. Metais pesados como o cádmio, encontrados entre os poluentes ambientais, podem causar danos na barreira testicular com efeito adverso subsequente na espermatogênese (Greaves, 2007). A compreensão de como o meio pode interferir de forma positiva ou deletéria na fertilidade torna-se essencial para a manutenção da capacidade reprodutiva.

Funcionalmente o testículo dos mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos principais: o intertubular ou intersticial e o tubular (Russell et al., 1990). O compartimento tubular constitui a maior parte do testículo ocupando, na maioria dos mamíferos, 70% a 90% do parênquima testicular (França & Russell, 1998; Godinho, 1999). Os túbulos seminíferos são constituídos por túnica própria, epitélio seminífero e lume tubular. A túnica própria reveste o túbulo externamente, sendo composta de células mióides ou peritubulares e membrana basal. As células mióides são contráteis, sendo consideradas responsáveis pela movimentação de fluidos e propulsão dos espermatozóides através do lume dos túbulos seminíferos. No epitélio seminífero são encontrados dois tipos celulares de origem embriológica distintos: as células germinativas originárias do epiblasto e as células de Sertoli, provenientes do epitélio celomático (Karl & Capel, 1998; Cupp & Skinner, 2005). Juntamente com as células mióides, as células de Sertoli elaboram a membrana basal que serve de suporte estrutural para a própria célula de Sertoli e para as células germinativas que se encontram na porção basal do epitélio seminífero (Russell et al., 1990).

As funções reprodutivas e/ou a espermatogênese podem ser afetadas por uma variedade de fatores, como hipertermia (Maines & Ewing, 1996), exposição a microrganismos ou a componentes da sua membrana (Ozawa et al., 2002), drogas antitumorais e

imunossupressoras (Das et al., 2002), contaminantes do meio (Murugesan et al., 2005), utilização de medicamentos em altas dosagens e de forma prolongada (Ward et al., 1994; Ratnassoriya & Jayakody, 2000).

O As ocorre naturalmente em compostos inorgânicos e orgânicos em diversos estados de oxidação: -3, 0, +3, +5 (De Sesso et al., 1998). Exposição ao arsênio pode resultar em efeitos tóxicos, agudos ou crônicos, relativos a exposições curtas ou longas, respectivamente, ocasionando diferentes patologias (NRC, 1999; Waalkes et al., 2003; Jana et al., 2006; Modi et al., 2006, Bastrup et al., 2008), incluindo alterações na função reprodutiva masculina e na espermatogênese (Srivastava & Srivastava, 1991; Liu et al., 2001; Pant et al., 2001., Pant et al., 2004; Chiou et al., 2008; Yu et al., 2008).

O guaraná é uma planta originária da região amazônica, rica em cafeína, flavonóides e taninos. O guaraná apresenta propriedades antioxidantes, sendo utilizado na fitoterapia para a prevenção e tratamento de doenças relacionadas ao desequilíbrio da atividade oxidante da célula (Campos et al., 2005; Otobone et al., 2007). Já a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) é um antioxidante lipofílico indispensável para a manutenção da espermatogênese em mamíferos e está incluída na classe dos antioxidantes convencionais que apresentam estrutura fenólica e pode reagir com radicais peroxil, protegendo membranas contra danos oxidativos (Ribeiro et al., 2008). Está presente em grande quantidade nas células de Sertoli, nos espermatócitos na fase de paquíteno e em menor grau nas espermátides arredondadas. Deficiência de vitamina E testicular leva a um estado de estresse oxidativo que desregula o processo espermatogênico e a produção de testosterona (Aitken & Roman, 2008).

O crescimento industrial e a mineração têm levado ao aumento dos níveis de arsênio nos solos e nas águas. O impacto dessas alterações na saúde humana e em especial no aparelho reprodutor masculino nos levou a escolha desse tema. A utilização do guaraná e da vitamina E como suplementação se justifica pela sua propriedade antioxidante. O presente

trabalho teve o objetivo de avaliar a influência da exposição ao arsenato e possível papel protetor do guaraná e vitamina E sobre parâmetros testiculares de camundongos adultos.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Preparo das suspensões**

A solução de guaraná foi preparada com a adição de 64 g de guaraná<sup>®</sup> em pó em água destilada a 60°C completando-se o volume para 50 mL. Em seguida, sob agitação, foi adicionado 0,25 g de carboxi-metil celulose (CMC), seguido da adição de propilenoglicol ajustando volume para 400 mL. A solução de vitamina E<sup>®</sup> foi preparada com a adição de 3,2 g em água destilada a 60°C completando-se o volume para 50 mL. Em seguida, sob agitação foi adicionado 0,25 g de CMC, seguido da adição de propilenoglicol ajustando o volume para 400 mL. A solução de guaraná<sup>®</sup> + vitamina E<sup>®</sup> foi preparada com a adição de 64 g de guaraná<sup>®</sup> e 3,2 g de vitamina E<sup>®</sup> em água destilada a 60°C completando-se o volume para 50 mL. Em seguida, sob agitação adicionou-se 0,25g de CMC, seguido da adição de propilenoglicol, ajustando o volume para 400 mL.

### **2.2 - Animais, Grupos Experimentais e Tratamentos**

Foram utilizados 35 camundongos Suíços com 70 dias, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Os animais foram divididos em cinco grupos de sete indivíduos cada, pesados e colocados em gaiolas individuais. O grupo controle negativo - CTR recebeu água destilada e injeção intraperitoneal (i.p) de 0,5 mL de CMC e o grupo controle positivo - ARS recebeu As, na forma de arsenato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – Merck) na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> e 0,5 mL de CMC/(i.p). Os demais grupos receberam solução de arsenato de sódio 100 mg L<sup>-1</sup> e injeção intraperitoneal de 0,5 mL contendo 2 mg de vitamina E ou

contendo 2 mg g<sup>-1</sup> de peso de guaraná - GUA, ou associação de vitamina E e guaraná nas mesmas doses anteriores - GUA/VTE. A concentração de guaraná e de vitamina E foi determinada segundo Leite (2008) e Jedlinska (2002) respectivamente.

O arsenato foi oferecido aos animais na água de beber, de forma contínua e os tratamentos, com vitamina E e guaraná, aplicados a cada 72 h, por 42 dias, que corresponde a um ciclo espermatogênico..

Todo o regime líquido foi fornecido *ad libitum*, assim como a alimentação sólida (ração), mantendo-os em condições controladas de temperatura (média de 24,7 °C) e fotoperíodo (12-12h claro/escuro).

### **2.3. - Coleta de Amostras e preparação histológica**

Os animais foram anestesiados com associação de quetamina e xilazina (10 e 1mg/kg de peso corporal, respectivamente), contidos e pesados, utilizando balança digital de precisão (0,001g), para então serem retirados os testículos e órgãos acessórios. Todos os órgãos coletados foram imersos em Karnovsky por 24 horas, sob refrigeração.

Fragmentos de cada órgão foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 95% e 100% GL), com trocas a cada trinta minutos. A seguir, procedeu-se a pré-inclusão e inclusão em hidroxietil metacrilato (Historesin® Leica). Cortes de 3µm foram obtidos em micrótomo rotativo (Reichert Jung 2045), com utilização de navalhas de vidro, e as preparações foram coradas com azul de toluidina-borato de sódio 1%, montadas com Entellan (Merck) e analisadas em microscópio de luz (Olympus BX-50).

### **2.4 – Análises morfológicas e morfométricas**

Imagens do parênquima testicular foram obtidas em microscópio Olympus AX-70 e analisadas utilizando-se o programa Image-Pro Plus 4 (Media Cybernetics).

Baseado nos pesos corporais e testiculares foi calculado o índice gonadossomático (IGS) a partir da fórmula  $IGS = PG/PC \times 100$ , onde PG = peso total das gônadas e PC = peso corporal.

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

As proporções volumétricas dos compartimentos testiculares foram estimadas a partir da contagem de 3000 pontos projetados sobre imagens capturadas, utilizando objetiva de 10X, totalizando 10 campos aleatórios em diferentes cortes histológicos do testículo de cada animal.

O volume de cada componente testicular, expresso em ml, foi estimado pela multiplicação do percentual ocupado por túbulos e intertúbulo pelo volume líquido do testículo. O peso líquido testicular (massa do parênquima) foi obtido subtraindo-se o peso da albugínea do peso bruto do testículo. Como a densidade do testículo é em torno de 1 (Johnson & Neaves, 1981; França, 1991; Paula, 1999; Tae et al., 2005), a massa do testículo foi considerada igual ao seu volume.

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

#### **2.4.2. Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos.**

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 30 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível, não levando em consideração o estágio do ciclo do epitélio seminífero. Estas

medidas foram realizadas utilizando-se programa de análise de imagem (Image Pro Plus), em imagens aumentadas 200x.

Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi mensurada a altura do epitélio seminífero, a qual foi obtida da túnica própria até o lume tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio, em cada túbulo, representa a média de duas medidas tomadas de forma diametralmente opostas.

O comprimento total (CT) dos túbulos seminíferos por testículo, expresso em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos nos testículos e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal, empregando-se a fórmula:  $CT = VTS / \pi R^2$  (Attal & Courot, 1963), onde VTS = volume total de túbulos seminíferos;  $\pi R^2$  = área da secção transversal dos túbulos seminíferos; R = diâmetro tubular/2.

O comprimento total de túbulo por grama de testículo foi calculado a partir da fórmula:  $CT/g = \text{Comprimento total de túbulos (m)} / \text{Peso bruto dos testículos}$ .

## **2.5. - Análises estatísticas**

Após testes de normalidade e homocedasticidade as médias dos parâmetros estudados foram comparadas entre os grupos por meio de análise de variância (ANOVA) utilizando-se o teste de Student Newman-Keuls. Foi utilizado o software STATISTICA 3.11, sendo  $p < 0,05$  considerado significativo. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão.

## **3. Resultados**

As proporções volumétricas, volume dos compartimentos testiculares e o ITS estão demonstrados na Tabela 1. A proporção volumétrica, o volume ocupado pelos túbulos seminíferos e o ITS apresentaram redução no grupo ARS, em relação aos demais grupos. Essas variações foram acompanhadas por um aumento na proporção de intertúbulo.

As proporções volumétricas do túbulo seminífero e suas estruturas estão na Tabela 2. As proporções volumétricas da túnica própria e do epitélio seminífero reduziram significativamente no grupo ARS onde foi observado também o aumento do lume tubular em relação aos demais tratamentos.

Na Tabela 3 são apresentadas as medidas de diâmetro tubular, altura do epitélio, comprimento total dos túbulos seminíferos e comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo. Observaram-se redução no diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero no grupo ARS em relação aos demais tratamentos. Não foi observada variação significativa no comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo entre os grupos estudados.

#### **4. Discussão**

Os animais expostos ao arsênio na água de beber, sem tratamento concomitante, apresentaram redução na proporção de túbulo, acompanhado de um aumento na proporção de intertúbulo. As alterações no diâmetro tubular foram acompanhadas de diminuição na proporção de túnica própria, epitélio germinativo e do aumento no lume tubular, o que reflete uma atividade espermatogênica diminuída em relação aos demais grupos. Segundo França & Russell (1998), a proporção volumétrica de túbulos seminíferos em mamíferos é bastante variável sendo este um dos principais fatores responsáveis pela diferença observada na eficiência da produção espermática em diversas espécies, o que está de acordo com os dados do presente trabalho.

A redução na proporção volumétrica na túnica própria dos animais expostos ao arsenato no grupo ARS em relação aos demais grupos nos leva a sugerir que o arsênio provavelmente altera os mecanismos de interação entre essas células comprometendo seu papel regulador e protetor contra substâncias tóxicas de origem externa. Os grupos que

receberam suplementação concomitante apresentaram valores proporcionais equivalentes ao grupo CTR. Nos testículos de roedores, a túnica própria ao redor dos túbulos seminíferos é constituída por elementos acelulares como a membrana basal e fibrilas de colágeno tipo I e celulares como as células mióides peritubulares (Russell et al., 1990). A membrana basal estabelece contato com as células de Sertoli e espermatogônias, sendo constituída por proteínas, colágeno tipo IV, laminina, proteoglicanas e entactina (Siu & Cheng, 2004). A integridade funcional da membrana basal elaborada é essencial para o processo espermatogênico (Dym,1994).

O ITS é um parâmetro que visa quantificar o investimento em túbulos seminíferos em relação à massa corporal. A administração oral de arsenato sem tratamento concomitante determinou uma diminuição significativano ITS. Isto representa um menor investimento corporal na produção espermática em relação aos animais que não foram expostos ao arsenato e aos grupos que receberam arsenato com ou sem antioxidante. Chiou et al. (2008) mostraram redução significativa na frequência de túbulos seminíferos nos estágios VII e VIII em camundongos adultos machos após administração de arsenato na água de beber por um período de 03 semanas.

A medida do diâmetro tubular é uma abordagem classicamente utilizada como indicador da atividade espermatogênica em investigações envolvendo a função testicular (Attal & Courot, 1963; Sinha Hikim et al., 1991; Russell et al., 1994; Muñoz et al., 1998). No presente estudo, os animais expostos ao arsenato na água de beber, sem nenhum tratamento concomitante, apresentaram redução no diâmetro tubular e na altura do epitélio seminífero, o que reflete o efeito anti-espermatogênico do arsênio. Resultados semelhantes foram encontrados por Sanghamitra et al. (2008), que relataram uma redução gradual e dose dependente, no diâmetro do túbulo seminífero de camundongos adultos, após administração de arsenato na água de beber por um período de 30 a 60 dias.

O comprimento total dos túbulos seminíferos está relacionado a três parâmetros estruturais: tamanho do testículo, diâmetro tubular e volume dos túbulos seminíferos. As medidas do comprimento total dos túbulos seminíferos nos animais expostos ao arsenato, no presente estudo, apresentaram uma tendência a menores médias em relação aos demais grupos testados, embora essas diferenças não tenham sido significativas.

A administração isolada ou associada de guaraná e vitamina E bloqueou a maioria dos efeitos deletérios do arsênio mediados por estresse oxidativo na estrutura e função do aparelho reprodutor masculino, refletindo na maioria dos parâmetros analisados com um possível aumento na capacidade espermatogênica nos grupos tratados em relação ao grupo CTR. Esses dados sugerem a natureza antioxidante de compostos não-enzimáticos que são capazes de bloquear os efeitos de EROS, como o ácido ascórbico (Chang et al., 2007), vitamina E (Ramanathan et al., 2002), flavonóides (Basile et al., 2005, Campos et al., 2005).

As EROS são produzidas por células animais quando estas são expostas a agentes estressores ambientais. Quando as EROS são geradas em grande quantidade, elas podem superar a capacidade de neutralização celular, promovendo alterações em componentes celulares como lipídeos e proteínas, podendo comprometer a estrutura e função celular (Chang et al., 2007, Bastrup et al., 2008). As células animais são equipadas com uma variedade de enzimas antioxidantes (Aitken & Roman, 2008), como a SOD e a glutathione peroxidase. Enzimas que controlam o potencial redox como a glutathione S-transferase e glutathione reductase também protegem o organismo contra o estresse oxidativo. Alterações no sistema endógeno de defesa antioxidante foram observadas após a exposição ao arsênio (Chang et al., 2007).

## 5. Conclusões.

Houve forte relação entre a exposição ao arsenato pela da água de beber com alterações na proporção volumétrica tubular, concomitante com aumento na proporção de intertúbulo. Observou-se ainda, redução na proporção da túnica própria, epitélio germinativo e um aumento do lume tubular. A exposição ao arsenato determinou redução no volume total de túbulos seminíferos, no ITS, no diâmetro tubular e na altura do epitélio germinativo. Os resultados indicam um papel protetor do guaraná e da vitamina E contra os efeitos deletérios desencadeados pelo estresse oxidativo decorrente da ingestão oral de arsenato.

## Agradecimentos

Ao Laboratório de Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade e ao Centro Universitário de Caratinga (UNEC) pelo apoio e licença das atividades acadêmicas.

## 5. Referências

- Aitken RJ, Roman SD. 2008. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Adv Exp Med Biol.*, 636:154-171.
- Attal J, Courot M. 1963. Developpement testiculaire et etablissement de la spermatogeneses chez le taureau. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 3: 219-241.
- Baastrop R, Sorensen M, Balstrom T, Frederiksen K, Larsen CL, Tjonneland A, Overvad K, Raaschou-Nielsen O. 2008. Arsenic in drinking water and risk for cancer in Denmark. 2008. *Environ Health Persp* 116: 231-237.
- Basile A, Ferrara L, Pezzo M, Melle G, Sorbo S, Bassif P, Montesano D. 2005. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana*. *J Ethnopharmacol* 102: 32-36.

- Campos AR, Barros AI, Albuquerque FA, Leal LK, Rao VS. 2005. Acute effects of guarana (*Paullinia cupana*) on mouse behavior in forced swimming and open field tests. *Phytother Res* 19: 441-443.
- Chang SI, Jin B, Youn P, Changbo P, Park JD, Ryu DY. 2007. Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicol Appl Pharmacol* 218: 196-203.
- 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: 1562-1569.
- Cupp AS, Skinner MK. 2005. Embryonic Sertoli cell differentiation. In: Skinner MK, Griswold MD (Eds), *Sertoli cell biology*. San Diego, Elsevier. p. 43-70
- Das UB, Mallick M, Debnath JM, Ghosh D. 2002. Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide-induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. *Asian J Androl* 4: 201-207.
- De Sesso JM. 1988. An Assessment of the developmental toxicity of inorganic arsenic. *Reprod Toxicol Rev* 12: 385-433.
- Dym M. 1994. Basement membrane regulation of Sertoli cells. *Endocrine Rev* 15: 102-115.
- Fang YZ, Yang S, Wu G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18: 872-879.
- França LR, Russell LD. The testis of domestic mammals. In: *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. Madrid: Ed. Churchill Communications Europe, 1998. p. 198.
- França LR. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. 1991. 180p. Tese (Doutorado em Morfologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1991.

- Godinho CL. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros. 1999. 74 p. Tese (mestrado em Biologia Celular) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1999.
- Greaves P. 2007. Histopathology of preclinical toxicity studies. Interpretation and relevance in drug safety evaluation. 3<sup>rd</sup> Ed., New York, Academic Press. p. 676-697
- Healy SM, Casarez EA, Fierro FA, Aposhian HV. 1998. Enzymatic methylation of arsenic compounds. V. Arsenite methyltransferase activity in tissues of mice. Toxicol Appl Pharmacol 148: 65-70.
- Jana K, Jana S, Samanta K. 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 4: 01-13.
- Jedlinska-Krakowska M, Jakubowski K, Kowalski A. 2002. Effect of increased ozone concentration in the air on the level of some immunological indices in rats given vitamin E and vitamin C. Acta Pol Toxicol 10: 81-87.
- Johnson L, Neaves WB. 1981. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in Stallions. Biol Reprod 24:703-712.
- Karl J, Capel B. 1998. Sertoli cells of mouse testis originate from the celomic epithelium. Dev Biol 203: 323-333.
- Leite, RP. Efeitos da associação de cloreto de cádmio e guaraná (*Paullinia cupana*) no testículo de ratos wistar: Análise morfométrica, estrutural e ultraestrutural. 2008. 74p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2008.

Liu J, Kaduska M, Kiu Y, Qu W, Mason RP, Walker MP. 2001. Acute arsenic induced free radical production and oxidative stress related gene expression in mice. *Toxicologist* 54: 280-281.

Maines MD, Ewing JF. 1996. Stress response of the rat testis: In situ hybridization and immunohistochemical analysis of heme oxygenase-1 (HSP32) induction by hyperthermia. *Biol Reprod* 54: 1070-1079.

Modi M, Kaul R, Kannan GM, Flora SJS. 2006. Co-administration of zinc and n-acetylcysteine prevents arsenic induced tissue oxidative stress in male rats. *J Trace Elem Med Biol* 20: 197-204.

Muñoz EM, Fogal T, Dominguez S, Scardapane L, Guzman J, Cavicchia JC, Piezzi RS. 1998. Stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the viscacha (*Lagostomus maximul maximus*). *Anat Rec* 252: 8-16.

Murugesan P, Muthusamy T, Balasubramanian K, Arunakaran J. 2005. Studies on the protective role of vitamin C and E against polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) induced oxidative damage in Leydig cells. *Free Radic Res* 39: 1259-1272.

NRC: Arsenic in the drinking water. Washington, DC: National Academy Press; p. 1-310, 1999.

Otobone FJ, Sanches AC, Nagae R, Martins JV, Sela VR, Mello JC, Audi EA. 2007. Effect of lyophilized extracts from guarana seed (*Paullinia cupana var. sorbilis* (mart.) on behavioral profile in rats. *Phytother Res* 21: 531-535.

Ozawa N, Goda N, Makino N, Yamaguchi T, Yoshimura Y, Suematsu M. 2002. Leydig cell-derived heme oxygenase-1 regulates apoptosis of premeiotic germ cells in response to stress. *J Clin Invest* 109: 457-467.

Pant N, Murthy RC, Srivastava SP. 2004. Male reproductive toxicity of sodium arsenite in mice. *Hum Exp Toxicol* 23: 399-403.

- Pant NJ, Kumar R, Murthy RC, Srivastava SP. 2001. Male reproductive effect of arsenic in mice. *BioMetals* 14: 113-117.
- Paula, TAR. Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). 1999. 84f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1999.
- Ramanathan K, Balakumar BS, Panneerselvam C. 2002. Effects of ascorbic acid and tocopherol on arsenic-induced oxidative stress. *Hum Exp Toxicol* 21: 675-680.
- Ratnassoriya WD, Jayakody JR. 2000. Long term administration of large doses of paracetamol impairs the reproductive competence of male rats. *Asian J Androl* 2 : 247-55.
- Ribeiro SMR, Queiroz MELR, Peluzio MCG, Costa NMB, Matta SLP, Queiroz JH. 2008. Antioxidantes da Dieta. In: Costa NMB & Peluzio MCG, *Nutrição Básica e Metabolismo*. Editora UFV. 382-400.
- Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. Mammalian spermatogenesis. In: Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Bolesta: Cache River Press, 1990. cap. 1, pp. 1-40.
- Russell LD, Chandrashekar V, Bartke A, Sinha-Hikim AP. 1994. The hamsters Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. *International J Androl* 17: 93-103.
- Sanghamitra S, Hazra J, Upadhyay SN, Singh RK, Amal RC. 2008. Arsenic induced toxicity on testicular tissue of mice. *Indian J Physiol Pharmacol* 52: 84-90.
- Sinha-Hikim AP, Sinha-Hikim IS, Amador AG, Bartke A, Woolf A, Russell LD. 1991. Reinitiation of spermatogenesis by exogenous gonadotropins in a seasonal breeder, the woodchuck (*Marmota monax*), during gonadal inactivity. *Am J Anat* 92: 194-213.
- Siu MKY , Cheng CY. 2004. Extracellular matrix: Recent advances on its role in junction dynamics in the seminiferous epithelium during Spermatogenesis. *Biol Reprod* 71: 375-391.

- Srisvastava S, Srisvastava SP. 1991. Effect of 2-ethylhexyl-phthalate on 17-beta-hidroksiteroide in testis of rats. *Toxicol Lett* 57: 235-239.
- Tae HJ , Jang BG, Ahn DC, Chooi EY, Kang HS, Kim NS, Lee JH, Park SY, Yang HH, Kim IS. 2005. Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus* Karpowi) during the breeding and non-breeding seasons. *Vet Res Commun* 29: 629-643.
- Waalkes MP, Ward JM, Liu J, Diwan BA. 2003. Transplacental carcinogenicity of inorganic arsenic in the drinking water: induction of hepatic, ovarian, pulmonary, and adrenal tumor in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 186: 7-17.
- Ward IL, Ward OB, Winn RJ, Bielawski D. 1994. Male and female sexual behavior potential of male rats prenatally exposed to the influence of alcohol, stress, or both factors. *Behav Neurosci* 108: 1188-1195.
- Yu X, Robinson JF, Gribble E, Hong SW, Sidhu JS, Faustman EM. 2008. Gene expression profiling analysis reveals arsenic-induced cell cycle arrest and apoptosis in p53-proficient and p53-deficient cell through differential gene pathways. *Toxicol appl pharmacol* 233: 389-403.

Tabela 1 - Proporção volumétrica testicular do compartimento tubular e intertubular (%), volume dos compartimentos do parênquima testicular (mL) e índice tubulossomático – ITS (%) de camundongos adultos, após administração de água destilada (CTR), arsenato de sódio (ARS), tratamento concomitante com arsenato + suspensão de guaraná (GUA), arsenato + vitamina E (VTE) e arsenato + guaraná + vitamina E (GUA/VTE).

<b>Tratamento</b>	<b>Túbulo seminífero</b>	<b>Intertúbulo</b>	<b>Volume tubular</b>	<b>Volume intertubular</b>	<b>ITS</b>
CTR	83,98 ± 0,44 <sup>b</sup>	16,02 ± 0,44 <sup>b</sup>	0,115 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,022 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,298 ± 0,03 <sup>b</sup>
ARS	80,13 ± 0,69 <sup>a</sup>	19,87 ± 0,70 <sup>a</sup>	0,081 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,020 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,237 ± 0,03 <sup>a</sup>
GUA	84,13 ± 0,26 <sup>b</sup>	15,87 ± 0,26 <sup>b</sup>	0,108 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,020 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,273 ± 0,02 <sup>b</sup>
VTE	84,11 ± 0,35 <sup>b</sup>	15,89 ± 0,35 <sup>b</sup>	0,113 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,021 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,285 ± 0,02 <sup>b</sup>
GUA/VTE	84,40 ± 0,31 <sup>b</sup>	16,60 ± 0,31 <sup>b</sup>	0,114 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,021 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,288 ± 0,02 <sup>b</sup>

Letras diferentes nas colunas representam valores significativos ( $p < 0,05$ ) (n=7).

Média ± desvio-padrão.

Tabela 2 – Proporção volumétrica tubular e dos componentes tubulares (%), após administração de água destilada (CTR), arsenato de sódio (ARS), tratamento concomitante com arsenato + suspensão de guaraná (GUA), arsenato + vitamina E (VTE) e arsenato + guaraná + vitamina E (GUA/VTE).

<b>Tratamento</b>	<b>Túbulo seminífero</b>	<b>Túnica própria</b>	<b>Epitélio seminífero</b>	<b>Lume tubular</b>
CTR	83,98 ± 0,44 <sup>b</sup>	6,45 ± 0,57 <sup>b</sup>	82,49 ± 3,72 <sup>b</sup>	11,06 ± 3,64 <sup>b</sup>
ARS	80,13 ± 0,69 <sup>a</sup>	5,10 ± 0,75 <sup>a</sup>	76,43 ± 2,77 <sup>a</sup>	18,47 ± 2,66 <sup>a</sup>
GUA	84,13 ± 0,26 <sup>b</sup>	7,90 ± 0,95 <sup>b</sup>	79,87 ± 4,50 <sup>b</sup>	12,23 ± 3,92 <sup>b</sup>
VTE	84,11 ± 0,35 <sup>b</sup>	8,06 ± 0,86 <sup>b</sup>	82,08 ± 3,53 <sup>b</sup>	9,86 ± 3,07 <sup>b</sup>
GUA/VTE	84,40 ± 0,31 <sup>b</sup>	7,49 ± 1,20 <sup>b</sup>	83,37 ± 4,49 <sup>b</sup>	9,14 ± 4,20 <sup>b</sup>

Letras diferentes nas colunas representam valores significativos ( $p < 0,05$ ) (n=7).

Média ± desvio-padrão.

Tabela 3 – Diâmetro tubular ( $\mu\text{m}$ ), altura do epitélio seminífero ( $\mu\text{m}$ ), comprimento total dos túbulos seminíferos (m) e comprimento dos túbulos por grama de testículo (m/g) de camundongos adultos, após administração de água destilada (CTR), arsenato de sódio (ARS), tratamento concomitante com arsenato + suspensão de guaraná (GUA), arsenato + vitamina E (VTE) e arsenato + guaraná + vitamina E (GUA/VTE).

<b>Tratamento</b>	<b>Diâmetro tubular</b>	<b>Altura de epitélio seminífero</b>	<b>Comprimento total de túbulo</b>	<b>Comprimento de túbulo/grama de testículo</b>
CTR	236,96 $\pm$ 13,98 <sup>b</sup>	82,90 $\pm$ 1,79 <sup>b</sup>	2,65 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	9,33 $\pm$ 1,10 <sup>a</sup>
ARS	215,25 $\pm$ 6,98 <sup>a</sup>	74,90 $\pm$ 4,54 <sup>a</sup>	2,25 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>	10,54 $\pm$ 0,85 <sup>a</sup>
GUA	228,78 $\pm$ 5,96 <sup>b</sup>	83,40 $\pm$ 3,74 <sup>b</sup>	2,65 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	9,93 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>
VTE	234,80 $\pm$ 2,79 <sup>b</sup>	86,90 $\pm$ 8,73 <sup>b</sup>	2,63 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	9,44 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>
GUA/VTE	236,32 $\pm$ 15,35 <sup>b</sup>	86,80 $\pm$ 6,07 <sup>b</sup>	2,64 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>	9,29 $\pm$ 1,26 <sup>a</sup>

Letras diferentes nas colunas representam valores significativos ( $p < 0,05$ ) ( $n=7$ ).

Média  $\pm$  desvio-padrão.

### **Capítulo 03**

**Toxicidade do arsenato na espermatogênese de camundongos adultos e efeito protetor do guaraná e da vitamina E.**

**Wellington de Souza Mata<sup>1</sup>**

**Sérgio Luis P. da Matta<sup>1</sup>**

**Maria do Carmo Gouveia Peluzio<sup>2</sup>**

**Juraci Alves de Oliveira<sup>1</sup>**

**Tarcízio Antônio R. de Paula<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>**Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa**

<sup>2</sup>**Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Viçosa**

<sup>3</sup>**Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa**

**\* Autor para correspondência**

**Sérgio Luis P. da Matta**

**Tel: +55-31-3891-4064 / +55-31-3899-3361**

**smatta@ufv.br**

## RESUMO

A vulnerabilidade dos testículos aos efeitos acumulativos e tóxicos do arsênio associados a uma crescente exposição a este elemento, principalmente devido ao crescimento industrial e a ação antrópica, justifica o presente trabalho que teve como objetivo avaliar os efeitos da administração de arsenato e o possível papel protetor do guaraná e da vitamina E espermatogênese de camundongos Suíços adultos. Foram utilizados 35 camundongos Suíços com idade de 70 dias, divididos em cinco grupos contendo sete animais cada: CTR-(controle negativo) em que os animais receberam apenas água destilada e 0,5 mL do veículo de suspensão carboxi-metil celulose (CMC) via intraperitoneal (i.p); ARS-(controle positivo) em que os animais receberam 100 mg L<sup>-1</sup> de arsenato e 0,5 mL de CMC/i.p; VTE – em que os animais receberam 100 mg L<sup>-1</sup> de arsenato e vitamina E/i.p (2mg em 0,5 mL de CMC); GUA- em que os animais receberam 100 mg L<sup>-1</sup> de arsenato e guaraná/i.p (2 mg g<sup>-1</sup> de peso corporal em 0,5 mL de CMC); GUA/VTE – em que os animais receberam 100 mg L<sup>-1</sup> e vitamina E (2mg em 0.5 mL de CMC) associada ao guaraná (2mg g<sup>-1</sup> de peso corporal em 0.5 mL de CMC). O arsenato foi fornecido aos animais na água de beber e os tratamentos administrados em intervalos de 72 h. Após 42 dias, o que corresponde a um ciclo espermatogênico, os animais sofreram eutanásia e procedeu-se às análises para determinação dos teores de arsênio. Os animais do grupo ARS apresentaram redução nos componentes celulares do epitélio germinativo, índice mitótico, índice da célula de Sertoli, capacidade suporte de Sertoli e na produção espermática diária total. O número corrigido de espermatogônias e células de Sertoli não apresentaram alterações em relação aos tratamentos. O tratamento isolado ou associado com guaraná e da vitamina E conferiu proteção contra os efeitos deletérios da exposição ao arsenato referentes à espermatogênese, provavelmente devido à capacidade estabilizadora da membrana celular dos antioxidantes.

**Palavras-chave:** produção espermática, célula de Sertoli, células espermatogênicas, espermatogênese, estresse oxidativo, vitamina E, guaraná.

## 1. Introdução

A espermatogênese é um processo altamente complexo e bem organizado que ocorre nos túbulos seminíferos e dura de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos (França & Russell, 1998; Godinho, 1999). As altas taxas de divisão celular inerentes desse processo implicam em um alto consumo de oxigênio mitocondrial pelas células do epitélio germinativo (Aitken & Roman, 2008).

Tanto a espermatogênese quanto a esteroidogênese são vulneráveis ao estresse oxidativo. A baixa tensão de oxigênio associada à grande quantidade de enzimas antioxidantes característica desse tecido são um importante mecanismo de proteção contra danos mediados pela formação de radicais livres (Aitken & Roman, 2008).

A contaminação por arsênio (As) pode ocorrer, principalmente, pela ingestão de água e alimentos e, em algumas situações, por inalação e absorção cutânea. Processos naturais, industriais e antrópicos tem contribuído para aumentar os teores de As no meio (Gontijo & Bittencourt, 2005, Rose & Liu, 2009). A intoxicação aguda e crônica por As provoca diversas patologias como câncer de pele, pulmão, próstata, bexiga, rim e fígado (NRC, 1999; Waalkes et al., 2003; Modi et al., 2006; Bastrup et al., 2008) além de outras não cancerígenas, como alterações cutâneas, gastrointestinais, cardiovasculares, hematológicas, pulmonares, neurológicas, endocrinológicas, reprodutivas e de desenvolvimento como abortos espontâneos e fetos com baixo peso (USEPA, 2000; WHO, 2001).

Células e tecidos normalmente possuem mecanismos de defesa antioxidante endógenos e exógenos, podendo a defesa exógena ser os antioxidantes provenientes da dieta como a vitamina E e compostos como tanino e flavonóides presentes no guaraná e especializados na remoção de radicais livres. No entanto, alterações no sistema endógeno têm sido observadas após exposição ao arsênio, inativando importantes enzimas antioxidantes e predispondo à efetivação de uma variedade de processos patológicos (Liu et al., 2001, Pant et

al., 2004, Nandi et al., 2005, Jana et al., 2006, Chang et al., 2007, Haider & Najar, 2008).

A propensão dos testículos aos efeitos acumulativos e tóxicos do arsênio, associado à crescente exposição devido ao crescimento industrial, a ação antrópica e ainda, considerando que o principal mecanismo de atuação tóxica do arsênio seja o estímulo a processos oxidativos no organismo, motivam estudos envolvendo o potencial antioxidante de extratos vegetais e outras substâncias, em busca de alternativas terapêuticas para os danos causados por esse metal. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da administração de arsenato de sódio e o possível papel protetor do guaraná e da vitamina E sobre o compartimento tubular de testículos de camundongos suíços adultos.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Preparo das suspensões**

A solução de guaraná foi preparada com a adição de 64 g de guaraná<sup>®</sup> em pó em água destilada a 60°C completando-se o volume para 50 mL. Em seguida, sob agitação, foi adicionado 0,25 g de carboxi-metil celulose (CMC), seguido da adição de propilenoglicol ajustando volume para 400 mL. A solução de vitamina E<sup>®</sup> foi preparada com a adição de 3,2 g em água destilada a 60°C completando-se o volume para 50 mL. Em seguida, sob agitação foi adicionado 0,25 g de CMC, seguido da adição de propilenoglicol ajustando o volume para 400 mL. A solução de guaraná<sup>®</sup> + vitamina E<sup>®</sup> foi preparada com a adição de 64 g de guaraná<sup>®</sup> e 3,2 g de vitamina E<sup>®</sup> em água destilada a 60°C completando-se o volume para 50 mL. Em seguida, sob agitação adicionou-se 0,25g de CMC, seguido da adição de propilenoglicol, ajustando o volume para 400 mL.

## **2.2. Animais, Grupos Experimentais e Tratamento**

Foram utilizados 35 camundongos Suíços com 70 dias, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Os animais foram divididos em cinco grupos de sete indivíduos cada, pesados e colocados em gaiolas individuais. O grupo controle negativo - CTR recebeu água destilada e injeção intraperitoneal (i.p) de 0,5 mL de CMC e o grupo controle positivo - ARS recebeu As, na forma de arsenato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – Merck) na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  e 0,5 mL de CMC/(i.p). Os demais grupos receberam solução de arsenato de sódio  $100 \text{ mg L}^{-1}$  e injeção intraperitoneal de 0,5 mL contendo 2 mg de vitamina E ou contendo  $2 \text{ mg g}^{-1}$  de peso de guaraná - GUA, ou associação de vitamina E e guaraná nas mesmas doses anteriores - GUA/VTE. As concentrações de guaraná e de vitamina E foram determinadas segundo Leite (2008) e Jedlinska (2002), respectivamente.

O arsenato foi oferecido aos animais na água de beber, de forma contínua e os tratamentos, com vitamina E e guaraná, aplicados a cada 72 h, por 42 dias, que corresponde a um ciclo espermatogênico.

Todo o regime líquido foi fornecido *ad libitum*, assim como a alimentação sólida (ração), mantendo-os em condições controladas de temperatura (média de  $24,7 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo (12-12h claro/escuro).

## **2.3. Coleta de Amostras e preparação histológica**

Os animais foram anestesiados com associação de quetamina e xilazina (10 e  $1 \text{ mg/kg}$  de peso corporal, respectivamente), contidos e pesados, utilizando balança digital de precisão ( $0,001 \text{ g}$ ), para então serem retirados os testículos e órgãos acessórios. Todos os órgãos coletados foram imersos em Karnovsky por 24 horas, sob refrigeração.

Fragmentos de cada órgão foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 95% e 100% GL), com trocas a cada trinta minutos. A seguir procedeu-se a pré-inclusão e inclusão em hidroxietil metacrilato (Historesin® Leica). Cortes de 3µm foram obtidos em micrótomo rotativo (Reichert Jung 2045), com utilização de navalhas de vidro, e as preparações foram coradas com azul de toluidina-borato de sódio 1%, montadas com Entellan (Merck) e analisadas em microscópio de luz (Olympus BX-50).

#### **2.4. Contagem da população celular de túbulos no Estádio 1 do ciclo do epitélio seminífero**

A estimativa da população dos diferentes tipos celulares que compõem o epitélio seminífero no estágio 1 do ciclo, classificado de acordo com o método da morfologia tubular (Swierstra, 1968; Courot *et al.*, 1970; Ortavant *et al.*, 1977; Curtis & Amann, 1981; Amann & Schanbacher, 1983) foi feita a partir de contagens dos núcleos das células germinativas e de nucléolos das células de Sertoli. Foram utilizadas dez secções transversais de túbulos para cada animal, sendo contados os núcleos dos seguintes tipos celulares:

- ▶ espermatogônias do tipo A (SPG A);
- ▶ espermatócitos I, na fase de preleptóteno/leptóteno (SPT I PI/L);
- ▶ espermatócitos I, na fase de paquíteno (SPTI P).
- ▶ espermátides arredondadas (SPD Ar).

Com exceção dos núcleos das células de Sertoli, as contagens obtidas foram corrigidas para o diâmetro nuclear e espessura do corte histológico, utilizando-se a seguinte fórmula de Abercrombie (1946) modificada por Amann & Almquist (1962):

$$N^{\circ} \text{ corrigido} = \frac{\text{contagem obtida} \times \text{Espessura do corte}}{\text{Espessura do corte} + \sqrt{(\text{DM}/2)^2 - (\text{DM}/4)^2}}$$

O diâmetro nuclear médio (DM) representa a média dos diâmetros nucleares do tipo celular estudado para cada animal. Os diâmetros nucleares foram medidos utilizando-se o programa de análise de imagens Image Pro Plus associado a microscópio Olympus BX-40, em objetiva de 20X. No caso das espermatogônias do tipo A, que apresentam núcleo ovóide, o valor utilizado foi aquele obtido pela média entre diâmetro nuclear maior e menor.

Os números de células de Sertoli foram corrigidos para o diâmetro nucleolar e espessura do corte histológico. Em virtude disso, contabilizaram-se exclusivamente células de Sertoli com nucléolo visível, o que proporcionou aplicação da mesma fórmula citada anteriormente (Amann & Almquist, 1962).

Foi calculado o número de espermátides arredondadas por testículo considerando-se o número corrigido de espermátides arredondadas por secção transversal de túbulo seminífero no Estádio 1 do Ciclo do Epitélio Seminífero e o comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, permitindo avaliar a produção espermática diária.

## **2.5. Razões entre os números celulares**

Com a finalidade de se avaliar a eficiência do processo espermatogênico e das células de Sertoli nos animais tratados e controle, foram estimadas as razões entre os números corrigidos de células da linhagem espermatogênica, e entre estes números e o número de células de Sertoli no Estádio 1 do ciclo. As seguintes razões foram calculadas:

- ▶ espermátocitos primários em preleptóteno/leptóteno : espermatogônias do tipo A, obtendo-se o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais;
- ▶ espermátides arredondadas : espermatogônias do tipo A, obtendo-se o rendimento geral da espermatogênese;

- ▶ espermátides arredondadas : espermátocitos primários em paquíteno, obtendo-se o índice meiótico;
- ▶ espermátides arredondadas : nucléolo de células de Sertoli, obtendo-se o índice de célula de Sertoli que mede a eficiência desta célula;
- ▶ número total corrigido de células germinativas : nucléolo de células de Sertoli, obtendo-se a capacidade total de suporte da célula de Sertoli.

## 2.6. Número de células de Sertoli por testículo

Esta estimativa foi realizada a partir do número corrigido de nucléolos de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no Estádio 1 e comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, segundo a fórmula empregada por Hochereau-de Reviers & Lincoln, (1978):

$$\text{N}^{\circ} \text{ de CS por testículo} = \frac{\text{CTTB } (\mu\text{m}) \times \text{n}^{\circ} \text{ corrigido de nucléolos de células de Sertoli}}{\text{Espessura do corte}}$$

Onde: CS = célula de Sertoli; CTTB = comprimento total de túbulos seminíferos

A partir deste cálculo e do peso bruto de um testículo, foi estimado o número de células de Sertoli por grama de testículo.

## 2.7. Cálculo da produção espermática diária por testículo e por grama de testículo

Para se obter a produção espermática diária por grama de testículo, a produção espermática diária total foi dividida pelo peso líquido do testículo. Os resultados foram expressos em número de espermátides/g de parênquima/dia x 10<sup>6</sup> e número de espermátides/testículo/dia x 10<sup>9</sup>.

A produção espermática diária (PED) por testículo e por grama de testículo foi estimada de acordo com a fórmula desenvolvida por Amann (1970).

## **2.8. Análises estatísticas**

Após testes de normalidade e homocedasticidade as médias dos parâmetros estudados foram comparadas entre os grupos por meio de análise de variância (ANOVA) utilizando-se o teste de Student Newman-Keuls. Foi utilizado o software STATISTICA 3.11, sendo  $p < 0,05$  considerado significativo. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão.

## **3. Resultados.**

Foi verificada a redução no número de células espermatogênicas por secção transversal de túbulo no Estádio 1 do Ciclo do Epitélio Seminífero e no número de espermátides arredondadas por testículo, nos animais do grupo ARS. O tratamento com guaraná e vitamina E, isolado ou associado, conferiu proteção aos efeitos adversos do estresse oxidativo induzido pela administração de arsênio. Os dados encontram-se na Tabela 1.

As razões entre os números celulares para avaliação do processo espermatogênico e das células de Sertoli encontram-se na Tabela 2. Os índices mitóticos e de eficiência da célula de Sertoli, assim como o rendimento geral da espermatogênese e a capacidade total de suporte da célula de Sertoli apresentaram variação significativa entre os tratamentos. Não foi observada variação significativa para o índice meiótico entre os diferentes tratamentos.

Os resultados relativos ao número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo encontram-se na Tabela 3, não apresentando variação significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos.

Os cálculos da produção espermática diária total e por grama de testículo encontram-se na Tabela 4. Os resultados comprovam redução na produção espermática diária por testículo e por grama de testículo no grupo ARS em relação aos demais.

#### **4. Discussão.**

Neste trabalho, a administração oral de arsenato de sódio sem tratamento concomitante causou redução significativa do número de espermatócitos e de espermatídes arredondadas por secção de túbulo no Estádio 1 do Ciclo do Epitélio Seminífero. No entanto, o tratamento com guaraná e vitamina E, isolado ou associado, promoveu efeito protetor. A interação das células germinativas com os componentes somáticos do testículo, principalmente células de Sertoli, células de Leydig e células mióides, para que o processo espermatogênico transcorra de maneira normal e eficiente (Skinner, 1991; Daduone & Demuolin, 1993; Spiteri-Grech & Nieschlag, 1993, Pescovitz et al., 1994; Russel et al., 1994; Griswold, 1995; Schlatt et al., 1997; França & Russel, 1998) pode ser alterada em situações de estresse oxidativo. Condições adversas do meio podem levar a um prolongamento do ciclo celular, devido à inibição na síntese da ciclina, permitindo um tempo maior para a síntese de elementos que podem conferir proteção contra o estresse oxidativo e reparar danos potenciais ao DNA. Células germinativas são sensíveis a substâncias que inibem radicais sulfidril como o arsênio, devido alta concentração de grupos sulfidril na cromatina nuclear (Coelingh et al., 1969) e flagelo (Calvin & Bedford, 1971). Alterações também foram descritas por Sanghamitra et al. (2008) após administração de meta-arsenito de sódio em camundongos Suíços adultos. Jedlinska-Krakowska et al. (2006) associaram a diminuição do número de camadas epiteliais no túbulo seminífero do testículo de ratos expostos ao ozônio à inibição das mitoses espermatogoniais e relataram proteção contra danos no epitélio seminífero pela administração de vitamina E. Segundo Miller et al. (2002) o prolongamento do ciclo celular induzido pela exposição ao

arsênio está associado ao aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), depleção do sistema antioxidante celular, inibição dos mecanismos de metilação e reparo de DNA e um decréscimo no potencial de membrana mitocondrial acompanhado da liberação de citocromo c e ativação de caspases. O arsênio afeta os mecanismos de transdução de sinais envolvidos na proliferação ou apoptose, podendo induzir apoptose e parada do ciclo celular de maneira dose-dependente em fibroblastos embrionários de camundongos p53<sup>+/+</sup> e p53<sup>-/-</sup> (Yu et al., 2008).

As razões entre os diferentes tipos de células germinativas constituem um modo seguro de se analisar a eficiência do processo espermatogênico, permitindo comparações entre diferentes espécies. São utilizados três índices para avaliação das diferentes fases da espermatogênese: a) o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais, que quantifica o grau de perdas celulares na fase espermatogonial ou proliferativa; b) o rendimento meiótico, que avalia a eficiência das duas divisões mitóticas; e c) o rendimento geral da espermatogênese, que avalia a eficiência do processo espermatogênico como um todo (Paula, 1999). No presente trabalho, animais que foram expostos ao arsênio pela água de beber apresentaram uma redução no coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais e no rendimento geral da espermatogênese, não sendo destacados os efeitos no índice meiótico. Estes resultados podem estar associados à sensibilidade das células germinativas ao estresse oxidativo devido a sua alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados e sua baixa capacidade antioxidante (Vernet et al., 2004), além da associação muito estreita com os radicais livres gerados pela atividade fagocítica das células de Sertoli (Bauche et al., 1994).

A membrana basal testicular estabelece contato com as células de Sertoli e espermatogônias, sendo constituída por proteínas, colágeno tipo IV, laminina, proteoglicanas e entactina (Siu & Cheng, 2004). Estudos *in vitro* têm mostrado o papel crucial da matriz extracelular sobre a morfologia e o comportamento das células de Sertoli. Funções da célula

de Sertoli como diferenciação, crescimento celular e migração são dependentes do substrato ao qual as células estão aderidas (Dym, 1994).

Durante o processo espermatogênico, as células de Sertoli e as células germinativas interagem de maneira bastante complexa, tanto física quanto bioquimicamente. As células de Sertoli são afetadas por diversos agentes químicos tóxicos. Por exercer também papel vital na regulação da espermatogênese, qualquer disfunção das células de Sertoli pode resultar em alterações e/ou degenerações das células germinativas e infertilidade. No entanto, a população de células de Sertoli manteve-se constante nos grupos experimentais do presente estudo, estando de acordo com França & Russell (1998) que consideram que as células de Sertoli não mais se dividem após o período perinatal na maioria dos animais.

A PED está relacionada ao número de espermátides arredondadas e ao comprimento total dos túbulos seminíferos. A tendência a uma redução no comprimento total dos túbulos seminíferos, no presente estudo embora não significativo, e a redução do número de espermátides arredondadas por testículo nos animais expostos ao arsenato na água de beber confirmam diminuição na quantidade de espermatozóides produzidos. A redução na PED reflete nos índices calculados para células de Sertoli (índice de eficiência da célula de Sertoli e capacidade total de suporte da célula de Sertoli), que não foi suficiente para manter a produção espermática diária no grupo ARS em relação aos demais grupos testados.

Os efeitos terapêuticos da administração de guaraná e vitamina E se devem provavelmente, à capacidade estabilizadora da membrana celular dos antioxidantes, protegendo as junções entre as células de Sertoli e células germinativas, restituindo o curso regular da espermatogênese. Estes resultados sugerem que o estresse oxidativo, mediado pela administração de arsenato, pode seletivamente efetivar a repressão de determinados genes que controlam o ciclo celular.

## **5. Conclusões.**

A exposição ao arsenato reduziu significativamente a proporção de células espermatogênicas por secção de túbulo no Estádio 1 do Ciclo do Epitélio Seminífero, número de espermátides arredondadas, coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais, rendimento geral da espermatogênese, índice de eficiência da célula de Sertoli e capacidade total de suporte da célula de Sertoli, determinando uma redução na produção espermática diária total por testículo e por grama de testículo. O tratamento com guaraná e vitamina E, isolado ou associado, teve uma ação protetora contra os efeitos adversos mediados pelo estresse oxidativo causado pelo arsênio.

## **Agradecimentos.**

Ao Laboratório de Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade e ao Centro Universitário de Caratinga (UNEC) pelo apoio e licença das atividades acadêmicas.

## **6. Referências.**

- Aitken RJ, Roman SD. 2008. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Adv Exp Med Biol.*, 636:154-171.
- Amann RP. 1970. Sperm production rates. In: Johnson AD, Gomes WR, Vandermark NL. (ed). *The testis*. New York, Academic Press, cap 7, pp433-482.
- Amann RP, Schanbacher BD. 1983. Physiology of male reproduction. *J. Anim. Sci.* 57: 380-403.
- Amann RP, Almquist JO. 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. VII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *J. Dairy Sci.* 45: 774-781.

- Baastrop R, Sorensen M, Balstrom T, Frederiksen K, Larsen CL, Tjonneland A, Overvad K, Raaschou-Nielsen O. 2008. Arsenic in drinking-water and risk for cancer in Denmark. *Environ. Health Perspect.* 116: 231-237.
- Bauche F, Fouchard MH, Jegou B. 1994. Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Lett.* 349: 392-396.
- Calvin HI, Bedford JM. 1971. Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl Q3*: 65-67.
- Chang SI, Jin B, Youn P, Changbo P, Park JD, Ryu DY. 2007. Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 218: 196-203.
- Coelingh JP, Rozijn TH, Monfoort CH. 1969. Isolation and partial characterization of a basic protein from bovine sperm heads. *Biochim. Biophys.* 188: 353-356.
- Courot M, Hochereau de Reviers MT, Ortavant R. 1970. Spermatogenesis. In: Johnson, AD, Gomes WR, Vandenmark NL. Ed. *The testis*. New York: Academic Press, p. 339-432.
- Curtis SK, Amann RP. 1981. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. *J. Anim. Sci.* 53: 1645-1657.
- Daduone JP, Demuolin A. 1993. Structure and functions of the testis. In: Thibault, C., Levasseur M., Hunter, R.H.F. (Org). *Reproduction in mammal and man*. Paris, Ellipses, cap. 13, p. 227-250.
- Dym M. Basement membrane regulation of Sertoli Cells. 1994. *Endocrine Rev.* 15: 102-115.
- França LR, Russell LD. 1998. The testis of domestic mammals. In: *Male reproduction; a multidisciplinary overview*. Ed. Madrid: Churchill Communications Europe España, cap 16, p.198-219.

Godinho CL. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros. 1999. 74 p. Tese (mestrado em Biologia Celular) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1999.

Gontijo B, Bittencourt F. 2005. Arsênio – Uma revisão histórica. An. Bras. Dermatol. 80: 91-95.

Griswold MD.1995. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. Biol. Reprod. 52: 211-216.

Haider SS, Najar MS. 2008. Arsenic induces oxidative stress, sphingolipidosis, depletes proteins and some antioxidants in various regions of rat brain. Kathmandu Univ. Med. J 6: 60-69.

Hochereau-De-Reviere MT , Lincoln GA. 1978. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. J. Reprod. Fertil. 54: 209-213.

Jana K, Jana S, Samanta K. 2006. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. Reprod. Biol. Endocrin. 4: 01-13.

Jedlinska-Krakowska M, Jakubowski K, Kowalski A. 2002. Effect of increased ozone concentration in the air on the level of some immunological indices in rats given vitamin E and vitamin C. Acta Pol. Toxicol. 10: 81-87.

Jedlinska-Krakowska M, Bomba G, Jakubowski K, Rotkiewicz T, Jana B, Penkowski A. 2006. Impact of oxidative stress and supplementation with vitamins E and C on testes morphology in rats. J. Reprod. Develop. 52: 203-209.

Leite, RP. Efeitos da associação de cloreto de cádmio e guaraná (*Paullinia cupana*) no testículo de ratos wistar: Análise morfométrica, estrutural e ultraestrutural. 2008. 74p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2008.

- Liu J, Kaduska M, Kiu Y, Qu W, Mason RP, Walker MP. 2001. Acute arsenic induced free radical production and oxidative stress related gene expression in mice. *Toxicologists* 54: 280-281.
- Miller WH, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S. 2002. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res* 62: 3893-3903.
- Modi M, Kaul RK, Kannan GM, Flora SJS. 2006. Co-administration of zinc and n-acetylcysteine prevents arsenic induced tissue oxidative stress in male rats. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 20: 197-204.
- Nandi D, Patra RC, Swarup, D. 2005. Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress and biochemical alterations in rats. *Toxicology* 211: 26-35.
- NRC: Arsenic in the drinking water. Washington, DC: National Academy Press; p. 1-310, 1999.
- Ortavant R, Courot M, Hochereau-de-Reviere MT. 1977. Spermatogenesis in domestic mammals. In: Cole, H.H., Cupps, P.T. (Eds). *Reproduction in domestic animals*. New York: Academic Press, Cap. 8, p.203-227.
- Pant N, Murthy RC, Srivastava SP. 2004. Male reproductive toxicity of sodium arsenite in mice. *Hum. Exp. Toxicol.* 23: 399-403.
- Paula TAR. Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). 1999. 84f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1999.
- Pescovitz OH, Srivastava CH, Breyer PR, Monts BA. 1994. Paracrine control of spermatogenesis. *Trends Endocrin. Met.* 5: 126-131.
- Rosen BP, Liu Z. 2009. Transport pathways for arsenic and selenium: A minireview. *Environ.*

Int. 35: 512-515.

Russell LD, Chandrashekar V, Bartke A, Sinha-Hikim AP. 1994. The hamsters Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. *Int. J. Androl.* 17: 93-106.

Sanghamitra S, Hazra J, Upadhyay SN, Singh RK, Amal RC. 2008. Arsenic induced toxicity on testicular tissue of mice. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 52: 84-90.

Schlatt S, Meinhardt A, Nieschlag E. 1997. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *Eur. J. Endocrinol.* 137: 107-117.

Siu MKY, Cheng CY. 2004. Extracellular matrix: Recent advances on its role in junction dynamics in the seminiferous epithelium during Spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 71, 375-391.

Skinner MK. 1991. Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Rev.* 12: 45-77.

Spiteri-Grech J, Nieschlag E. 1993. Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis – a review. *J. Reprod. Fertil.* 98: 1-14.

Swierstra EE. 1968. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar: duration of spermatozoa transit through the epididymis. *Anat. Rec.* 161: 171-186.

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

Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR. 2004. Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 216, 31-39.

Waalkes MP, Ward JM, Liu J, Diwan BA. 2003. Transplacental carcinogenicity of inorganic arsenic in the drinking water: induction of hepatic, ovarian, pulmonary, and adrenal tumor in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 186: 7-17.

WHO 2001a. United Nations Synthesis report on Arsenic in Drinking water. Geneva, World Health Organization. ([http://www.who.int/water sanitation health/arsenic, arsenic UNReptoc .htm](http://www.who.int/water_sanitation_health/arsenic_arsenic_UNReptoc.htm)).

WHO 2001b. Arsenic in drinking water. Fact Sheet. 120, [http:// www.who.int/info/en/fact210.htm](http://www.who.int/info/en/fact210.htm)).

Yu X, Robinson JF, Gribble E, Hong SW, Sidhu JS, Faustman EM. 2008. Gene expression profiling analysis reveals arsenic-induced cell cycle arrest and apoptosis in p53-proficient and p53-deficient cell through differential gene pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 233: 389-403.

Tabela 1 - Número corrigido de células espermatogênicas e células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no Estádio 1 do Ciclo do Epitélio Seminífero, após administração de água destilada (CTR), arsenato de sódio (ARS), tratamento concomitante com arsenato + suspensão de guaraná (GUA), arsenato + vitamina E (VTE) e arsenato + guaraná + vitamina E (GUA/VTE).

<b>Tratamento</b>	<b>SPGA</b>	<b>SPTI PL/L</b>	<b>SPTI P</b>	<b>SPD Ar</b>	<b>Sertoli.</b>
CTR	1,10 ± 0,08 <sup>a</sup>	21,12 ± 4,11 <sup>b</sup>	20,83 ± 2,44 <sup>b</sup>	62,37 ± 4,91 <sup>b</sup>	5,56 ± 0,34 <sup>a</sup>
ARS	1,10 ± 0,05 <sup>a</sup>	15,26 ± 1,09 <sup>a</sup>	16,80 ± 0,95 <sup>a</sup>	50,35 ± 5,34 <sup>a</sup>	5,54 ± 0,34 <sup>a</sup>
GUA	1,08 ± 0,06 <sup>a</sup>	22,25 ± 3,93 <sup>b</sup>	18,97 ± 1,20 <sup>b</sup>	62,46 ± 3,13 <sup>b</sup>	5,50 ± 0,28 <sup>a</sup>
VTE	1,12 ± 0,06 <sup>a</sup>	22,34 ± 2,70 <sup>b</sup>	20,57 ± 1,21 <sup>b</sup>	66,60 ± 5,67 <sup>b</sup>	5,37 ± 0,65 <sup>a</sup>
GUA/VTE	1,13 ± 0,09 <sup>a</sup>	21,92 ± 4,41 <sup>b</sup>	20,60 ± 1,20 <sup>b</sup>	66,54 ± 5,97 <sup>b</sup>	5,48 ± 0,26 <sup>a</sup>

Letras diferentes nas colunas representam valores significativos ( $p < 0,05$ ) ( $n=7$ ).

Média ± desvio-padrão.

Tabela 2 - Razões entre os números celulares para avaliação do processo espermatogênico e das células de Sertoli – Índice mitótico; Índice meiótico; Rendimento geral da espermatogênese; Índice da eficiência da célula de Sertoli e Capacidade total de suporte da célula de sertoli em testículos de camundongos em idade reprodutiva, após administração de água destilada (CTR), arsenato de sódio (ARS), tratamento concomitante com arsenato + suspensão de guaraná (GUA), arsenato + vitamina E (VTE) e arsenato + guaraná + vitamina E (GUA/VTE).

<b>Tratamento</b>	<b>Índice mitótico</b>	<b>Índice meiótico</b>	<b>Rendimento geral</b>	<b>Índice da célula de Sertoli</b>	<b>Capacidade suporte Sertoli</b>
CTR	19,39 ± 4,23 <sup>b</sup>	3,03 ± 0,43 <sup>a</sup>	57,61 ± 8,74 <sup>b</sup>	11,22 ± 0,43 <sup>b</sup>	19,01 ± 1,13 <sup>b</sup>
ARS	13,97 ± 1,40 <sup>a</sup>	3,01 ± 0,43 <sup>a</sup>	45,93 ± 4,37 <sup>a</sup>	9,123 ± 1,17 <sup>a</sup>	15,13 ± 1,17 <sup>a</sup>
GUA	20,57 ± 4,21 <sup>b</sup>	3,30 ± 0,16 <sup>a</sup>	57,83 ± 5,43 <sup>b</sup>	11,38 ± 0,65 <sup>b</sup>	19,09 ± 1,23 <sup>b</sup>
VTE	20,00 ± 2,05 <sup>b</sup>	3,24 ± 0,24 <sup>a</sup>	59,73 ± 6,14 <sup>b</sup>	12,62 ± 2,19 <sup>b</sup>	20,91 ± 3,13 <sup>b</sup>
GUA/VTE	19,49 ± 4,86 <sup>b</sup>	3,24 ± 0,36 <sup>a</sup>	59,30 ± 8,74 <sup>b</sup>	12,16 ± 1,24 <sup>b</sup>	20,14 ± 2,04 <sup>b</sup>

Letras diferentes nas colunas representam valores significativos ( $p < 0,05$ ) ( $n=7$ ).

Média ± desvio-padrão.

Tabela 3 - Número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo de camundongos em idade reprodutiva, após administração de água destilada (CTR), arsenato de sódio (ARS), tratamento concomitante com arsenato + suspensão de guaraná (GUA), arsenato + vitamina E (VTE) e arsenato + guaraná + vitamina E (GUA/VTE).

Tratamento	Sertoli por testículo (x 10 <sup>6</sup> )	Sertoli por grama de testículo (x 10 <sup>6</sup> )
CTR	4,88 ± 4,20 <sup>a</sup>	34,52 ± 3,86 <sup>a</sup>
ARS	4,18 ± 9,28 <sup>a</sup>	39,06 ± 5,01 <sup>a</sup>
GUA	4,84 ± 5,17 <sup>a</sup>	36,36 ± 2,32 <sup>a</sup>
VTE	4,70 ± 5,63 <sup>a</sup>	33,73 ± 3,70 <sup>a</sup>
GUA/VTE	4,81 ± 6,41 <sup>a</sup>	33,86 ± 4,08 <sup>a</sup>

Letras diferentes nas colunas representam valores significativos ( $p < 0,05$ ) (n=7).

Média ± desvio-padrão.

Tabela 4 – Produção espermática diária total (PED) e produção espermática diária por grama de testículo (PED/g T) de camundongos em idade reprodutiva após administração de água destilada (CTR), arsenato de sódio (ARS), tratamento concomitante com arsenato + suspensão de guaraná (GUA), arsenato + vitamina E (VTE) e arsenato + guaraná + vitamina E (GUA/VTE).

<b>Tratamento</b>	<b>PED (x 10<sup>6</sup>)</b>	<b>PED/g T (x 10<sup>6</sup>)</b>
CTR	11,45 ± 1,12 <sup>b</sup>	40,39 ± 2,84 <sup>b</sup>
ARS	5,99 ± 1,01 <sup>a</sup>	28,37 ± 4,93 <sup>a</sup>
GUA	10,74 ± 0,89 <sup>b</sup>	40,40 ± 7,72 <sup>b</sup>
VTE	12,59 ± 1,50 <sup>b</sup>	45,20 ± 4,66 <sup>b</sup>
GUA/VTE	12,26 ± 1,61 <sup>b</sup>	43,23 ± 5,24 <sup>b</sup>

Letras diferentes nas colunas representam valores significativos ( $p < 0,05$ ) (n=7).

Média ± desvio-padrão.

## **Capítulo 4**

**Toxicidade do arsenato e ação do guaraná e vitamina E como protetores dos componentes intertubulares do testículo de camundongos Suíços adultos.**

**Wellington de Souza Mata<sup>1</sup>**

**Sérgio Luis P. da Matta<sup>1</sup>**

**Maria do Carmo Gouveia Peluzio<sup>2</sup>**

**Juraci Alves de Oliveira<sup>1</sup>**

**Tarcízio Antônio R. de Paula<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>**Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa**

<sup>2</sup>**Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Viçosa**

<sup>3</sup>**Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa**

**\* Autor para correspondência**

**Sérgio Luis P. da Matta**

**Tel: +55-31-3891-4064 / +55-31-3899-3361**

**smatta@ufv.br**

## RESUMO

O arsênio inorgânico é um dos principais poluentes da água, sendo considerado um problema de abrangência mundial com consequências para a saúde do homem. Esse trabalho teve como objetivo investigar o impacto dessas alterações sobre a porção androgênica testicular e o possível papel protetor do guaraná e da vitamina E sobre as células de Leydig e os demais componentes do compartimento intertubular. Foram utilizados 35 camundongos Suíços com idade de 70 dias, divididos em cinco grupos contendo sete animais cada: CTR-(controle negativo) em que os animais receberam apenas água destilada e 0,5 mL do veículo de suspensão carboxi-metil celulose (CMC) via intraperitoneal (i.p); ARS-(controle positivo) em que os animais receberam 100 mg L<sup>-1</sup> de arsenato e 0,5 mL de CMC/i.p; VTE – em que os animais receberam 100 mg L<sup>-1</sup> de arsenato e vitamina E/i.p (2mg em 0,5 mL de CMC); GUA- em que os animais receberam 100 mg L<sup>-1</sup> de arsenato e guaraná/i.p (2 mg g<sup>-1</sup> de peso corporal em 0,5 mL de CMC); GUA/VTE – em que os animais receberam 100 mg L<sup>-1</sup> de arsenato e vitamina E (2mg em 0.5 mL de CMC) associada ao guaraná (2mg g<sup>-1</sup> de peso corporal em 0.5 mL de CMC). O arsenato foi fornecido aos animais na água de beber e os tratamentos administrados em intervalos de 72 h. Após 42 dias, o que corresponde a um ciclo espermatogênico, os animais sofreram eutanásia e procedeu-se às análises dos componentes intertubulares do testículo. Animais expostos ao arsenato apresentaram alterações significativas na proporção volumétrica de células de Leydig, espaço linfático, tecido conjuntivo e macrófagos, acompanhados de redução no volume intertubular das células de Leydig e aumento do volume intertubular de tecido conjuntivo, concomitante com redução no diâmetro nuclear, proporção nucleoplasmática de Leydig, volume nuclear e no número de células de Leydig por testículo, sem alterações significativas no volume citoplasmático e de uma célula de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ ). Os tratamentos com guaraná e vitamina E, isolado ou associado, conferiram proteção à maioria dos efeitos deletérios no compartimento intertubular. Animais

do grupo ARS apresentaram redução de testosterona sérica se comparados ao grupo controle. Tratamento com guaraná e com vitamina E isoladamente não foi eficiente para manter os níveis normais de testosterona sérica. Porém, o tratamento concomitante de arsenato mais guaraná associado à vitamina E minimizou as alterações na síntese e/ou liberação de testosterona pela célula de Leydig.

**Palavras-chave:** Intertúbulo, célula de Leydig, estresse oxidativo, guaraná, vitamina E.

## **1. Introdução**

Tem havido crescente preocupação quanto aos potenciais efeitos de vários contaminantes ambientais, presentes em água de consumo, muitos deles considerados desreguladores endócrinos ou agentes de ativação hormonal. Um grande número de evidências indica que o arsênio é um desses contaminantes e que o seu mecanismo de ação tóxica está relacionado com aumento da produção de radicais livres, os quais geram danos oxidativos em DNA, lipídios e proteínas. Esta preocupação se originou, em parte, de observações acerca do desenvolvimento e de alterações no sistema reprodutivo de populações que foram expostas a uma ampla gama de químicos sintéticos e seus subprodutos, lançados em grande quantidade no ambiente desde a segunda guerra mundial (Saradha & Mathur, 2006).

Funcionalmente, o testículo dos mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos principais: o intertubular ou intersticial e o tubular (Russell et al., 1990). No compartimento intertubular encontram-se as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável constituída principalmente de fibroblastos, macrófagos e mastócitos (Russell et al., 1990; Setchell, 1991). Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies quanto à proporção volumétrica (%) dos diferentes componentes do compartimento intertubular (Fawcett et al., 1973; França & Russell, 1998; Godinho, 1999) de maneira geral, a célula de Leydig é usualmente o tipo celular mais frequente neste compartimento.

O arsênio existe na natureza numa variedade de formas químicas, incluindo espécies inorgânicas e orgânicas (Ferguson & Anderson, 1974). Essas podem ocorrer em diversos estados de oxidação, sob a forma de óxidos de arsênio ou sais destes óxidos (De Sesso et al, 1998).

A toxicidade de diversas espécies de arsênio decresce na seguinte ordem: compostos de  $As^{3+}$  inorgânico > compostos de  $As^{5+}$  inorgânico > compostos de  $As^{3+}$  orgânico > compostos de  $As^{5+}$  orgânico (USEPA, 2000). As espécies inorgânicas de arsênio são cerca de 100 vezes mais tóxicas comparadas às formas orgânicas. (Thompson, 1993). A intoxicação por arsênio pode resultar em efeitos tóxicos, agudos ou crônicos, relativos a exposições curtas ou longas, respectivamente, ocasionando diferentes patologias (Jana et al., 2006).

O guaraná é uma planta originária da região amazônica, rica em cafeína, flavonóides e taninos. Apresenta propriedades antioxidantes, sendo utilizado na fitoterapia para a prevenção e tratamento de doenças relacionadas ao desequilíbrio da atividade oxidante da célula (Campos et al., 2005; Otobone et al., 2007). O extrato de guaraná reduz significativamente a peroxidação lipídica, resultando em maior proteção celular (Basile et al., 2005, Campos et al., 2005).

A vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) é um antioxidante lipofílico indispensável para a manutenção da espermatogênese em mamíferos. O tocoferol está incluído na classe dos antioxidantes convencionais que apresentam estrutura fenólica e podem reagir com radicais peroxil protegendo membranas contra danos oxidativos (Ribeiro et al., 2008). Está presente em grande quantidade nas células de Sertoli, nos espermátocitos na fase de paquíteno e em menor extensão nas espermátides arredondadas. Deficiência de vitamina E testicular leva a um estado de estresse oxidativo que desregula o processo espermatogênico e a produção de testosterona (Aitken & Roman, 2008).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da administração de arsenato de sódio sobre a porção androgênica testicular e o possível papel protetor do guaraná e da vitamina E sobre as células de Leydig e os demais componentes do compartimento intertubular de testículos de camundongos Suíços adultos.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Preparo da suspensão**

A solução de guaraná foi preparada com a adição de 64 g de guaraná<sup>®</sup> em pó em água destilada a 60°C completando-se o volume para 50 mL. Em seguida, sob agitação, foi adicionado 0,25 g de carboxi-metil celulose (CMC), seguido da adição de propilenoglicol ajustando volume para 400 mL. A solução de vitamina E<sup>®</sup> foi preparada com a adição de 3,2 g em água destilada a 60°C completando-se o volume para 50 mL. Em seguida, sob agitação foi adicionado 0,25 g de CMC, seguido da adição de propilenoglicol ajustando o volume para 400 mL. A solução de guaraná<sup>®</sup> + vitamina E<sup>®</sup> foi preparada com a adição de 64 g de guaraná<sup>®</sup> e 3,2 g de vitamina E<sup>®</sup> em água destilada a 60°C completando-se o volume para 50 mL. Em seguida, sob agitação adicionou-se 0,25g de CMC, seguido da adição de propilenoglicol, ajustando o volume para 400 mL.

### **2.2. Animais, Grupos Experimentais e Tratamento**

Foram utilizados 35 camundongos Suíços com 70 dias, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Os animais foram divididos em cinco grupos de sete indivíduos cada, pesados e colocados em gaiolas individuais. O grupo controle negativo - CTR recebeu água destilada e injeção intraperitoneal (i.p) de 0,5 mL de CMC e o grupo controle positivo - ARS recebeu As, na forma de arsenato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – Merck) na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> e 0,5 mL de CMC/(i.p). Os demais grupos receberam solução de arsenato de sódio 100 mg L<sup>-1</sup> e injeção intraperitoneal de 0,5 mL contendo 2 mg de vitamina E ou contendo 2 mg g<sup>-1</sup> de peso de guaraná - GUA, ou associação de vitamina E e guaraná nas mesmas doses anteriores - GUA/VTE. A concentração de guaraná e de vitamina E foi determinada segundo Leite (2008) e Jedlinska (2002), respectivamente.

O arsenato foi oferecido aos animais na água de beber, de forma contínua e os tratamentos, com vitamina E e guaraná, aplicados a cada 72 h, por 42 dias, que corresponde a um ciclo espermatogênico..

Todo o regime líquido foi fornecido *ad libitum*, assim como a alimentação sólida (ração), mantendo-os em condições controladas de temperatura (média de 24,7 °C) e fotoperíodo (12-12h claro/escuro).

### **2.3. Coleta de Amostras e preparação histológica**

Os animais foram anestesiados com associação de quetamina e xilazina (10 e 1mg/kg de peso corporal, respectivamente), contidos e pesados, utilizando balança digital de precisão (0,001g), para então serem retirados os testículos e órgãos acessórios. Todos os órgãos coletados foram imersos em Karnovsky por 24 horas, sob refrigeração.

Fragmentos de cada órgão foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 95% e 100% GL), com trocas a cada trinta minutos. A seguir procedeu-se a pré-inclusão e inclusão em hidroxietil metacrilato (Historesin® Leica). Cortes de 3µm foram obtidos em micrótomo rotativo (Reichert Jung 2045), com utilização de navalhas de vidro, e as preparações foram coradas com azul de toluidina-borato de sódio 1%, montadas com Entellan (Merck) e analisadas em microscópio de luz (Olympus BX-50).

### **2.4. Proporção volumétrica e volume dos elementos do intertúbulo.**

Do compartimento intertubular foram investigadas as células de Leydig, células e fibras do tecido conjuntivo, macrófagos, vasos sanguíneos e linfáticos, obtendo-se as proporções volumétricas entre estes componentes. Para isto, foram registrados 1000 pontos projetados sobre imagens capturadas da região do intertúbulo, nos diferentes cortes histológicos do testículo de cada animal, utilizando objetiva de 20X.

O volume de cada componente do intertúbulo por testículo, expresso em mL, foi estimado através da multiplicação do percentual ocupado pelos mesmos nos testículos multiplicado pelo peso do parênquima de um testículo e dividido por 100. O cálculo do percentual ocupado pelos elementos do intertúbulo nos testículos foi obtido multiplicando-se a proporção volumétrica de intertúbulo pela proporção volumétrica do elemento/100. Para o cálculo do parênquima testicular, subtraiu-se do peso bruto do testículo o peso da albugínea. Como a densidade do testículo é em torno de 1 (Johnson e Neaves, 1981; França, 1991; Paula, 1999; Tae et al., 2005), a massa do testículo foi considerada igual ao seu volume.

## 2.5. Morfometria da célula de Leydig.

O diâmetro de trinta núcleos de células de Leydig foi medido em cada animal, utilizando-se o programa de análise de imagens (Image Pro plus). Foram mensurados núcleos que apresentaram contorno esférico, cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. Foram calculados os volumes ( $\mu\text{m}^3$ ) nuclear, citoplasmático e o volume de cada célula de Leydig, por animal, utilizando-se as seguintes fórmulas:

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

**Volume citoplasmático** = % citoplasma x volume nuclear /% núcleo;

**Volume celular** = volume nuclear + volume citoplasmático.

Obtido o volume individual da célula de Leydig e o volume total (ml) ocupado por estas células no testículo, foram calculados o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo para cada animal utilizando as seguintes fórmulas:

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

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

**Volume que a célula de Leydig ocupa por testículo** = proporção de Leydig no testículo x peso do parênquima de um testículo/100.

**Volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo** = volume que a célula de Leydig ocupa por testículo/ peso bruto do testículo.

O índice Leydigossomático (ILS) é um parâmetro que visa quantificar o investimento em células de Leydig com relação ao peso corporal, sendo calculado através da fórmula:

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

## **2.6. Dosagem hormonal**

As dosagens plasmáticas de testosterona foram realizadas com kits imunoenzimáticos (ELISA) da marca DSL (DSL-10-4000).

## **2.7. - Análises estatísticas**

Após testes de normalidade e homocedasticidade as médias dos parâmetros estudados foram comparadas entre os grupos por meio de análise de variância (ANOVA) utilizando-se o teste de Student Newman-Keuls. Foi utilizado o software STATISTICA 3.11, sendo  $p < 0,05$  considerado significativo. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão.

## **3. Resultados**

Os percentuais dos componentes do intertúbulo encontram-se na Tabela 1. A exposição ao arsênio determinou uma redução significativa na proporção volumétrica de células de Leydig e um aumento na proporção de espaço linfático, tecido conjuntivo e macrófagos. Não houve alteração na proporção de vasos sanguíneos.

O volume (mL) dos elementos do intertúbulo por testículo encontra-se na Tabela 2. Observou-se redução significativa no volume das células de Leydig e aumento no volume de tecido conjuntivo no compartimento intertubular. Os demais componentes avaliados não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos.

Os resultados dos diâmetros nucleares, proporção de núcleo e citoplasma das células de Leydig, RNP e ILS encontram-se na Tabela 03. Observou-se redução significativa no diâmetro nuclear e no percentual nuclear e citoplasmático de células de Leydig dos animais do grupo ARS em relação aos demais grupos. O ILS reduziu significativamente em relação ao grupo CTR e ao grupo VTE/GUA. A relação nucleoplasmática não foi diferente entre os grupos de animais.

As medidas do volume nuclear, citoplasmático e de uma célula de Leydig encontram-se na Tabela 4. O volume nuclear reduziu significativamente no grupo ARS em relação aos demais tratamentos. No entanto, não houve alterações significativas no volume citoplasmático e de uma célula de Leydig entre os tratamentos.

O número de células de Leydig por testículo reduziu significativamente no grupo ARS em relação aos demais tratamentos. Não houve alterações no número de células de Leydig por grama de testículo entre os tratamentos (Tabela 5).

As concentrações plasmáticas de testosterona encontram-se na Figura 01. Animais do grupo ARS apresentaram redução significativa nos níveis de testosterona em relação ao controle e ao grupo GUA/VTE.

#### **4. Discussão.**

O tratamento com arsenato determinou a redução na proporção e volume (mL) de células Leydig no compartimento intertubular. Segundo Pant et al. (2001), a exposição ao arsenito de sódio durante 35 dias determina uma redução na atividade androgênica testicular,

a qual é exercida pelas células de Leydig. A não redução na proporção e volume das células de Leydig verificada nos grupos tratados com vitamina E e guaraná no presente trabalho, indica atividade protetora desses compostos no intertúbulo testicular.

Animais expostos ao arsenato de sódio na água de beber, sem tratamento concomitante, apresentaram aumento significativo na proporção de espaço linfático, tecido conjuntivo e macrófagos em relação aos demais tratamentos. Pode-se inferir a partir disso que o espaço deixado pela redução das células de Leydig tenha sido ocupado pelos outros elementos do intertúbulo, particularmente pelo espaço linfático. Segundo Fawcett et al. (1973), as implicações fisiológicas da alteração na proporção de espaço linfático estão, provavelmente, relacionadas com a habilidade dos linfáticos de mover para fora dos testículos materiais vascularmente secretados e manter as concentrações adequadas de andrógenos no testículo e nos vasos sanguíneos.

O aumento do número de macrófagos, verificado nos animais do grupo ARS, pode ter desencadeado, sob ação do arsênio, aumento nas EROS causando a liberação de fatores pró-inflamatório pelos macrófagos, levando à redução das células de Leydig, sensíveis a estas substâncias. Esta relação é citada por Papadopoulos (2007). O número de macrófagos testiculares aumenta consideravelmente do nascimento até a maturidade sexual, e pode também aumentar no animal adulto sob o controle da hipófise. Fatores secretados pelos macrófagos controlam de modo parácrino a atividade esteroidogênica e o desenvolvimento das células de Leydig (Hales, 1996). O contato direto entre essas duas células permite que o macrófago auxilie a célula de Leydig regulando a sua produção de testosterona pela célula de Leydig. Enquanto o número de macrófagos da maioria dos órgãos aumenta pela migração de monócitos para os tecidos periféricos, o número de macrófagos testiculares aumenta principalmente por proliferação, mas esse aumento não é mediado por testosterona (Raburn et al., 1993). Se entendermos que a produção de ROS afetou as células de Leydig no grupo ARS

podemos inferir que o guaraná, a vitamina E e a combinação dos dois tratamentos apresentaram ação antioxidante.

A redução do volume nuclear das células de Leydig não foi acompanhada pela redução do volume citoplasmático e celular. Sabe-se que o volume nuclear da célula de Leydig está altamente correlacionado com a concentração de testosterona testicular e plasmático (Castro et al., 2002). Portanto, a redução significativa nas concentrações plasmáticas de testosterona nos animais do grupo ARS pode ter sido causada pela redução da atividade nuclear das células de Leydig.

A exposição ao arsênio causou redução significativa no ILS, no grupo ARS em relação ao controle e ao grupo GUA/VIT E, indicando que a combinação dos tratamentos foi efetiva na manutenção deste índice. O ILS é um parâmetro que visa quantificar o investimento em células de Leydig, com relação ao peso corporal. O ILS apresentou redução em camundongos que receberam 1 mg/L de arsênio durante 42 e 84 dias, indicando que pequenas doses também afetam este parâmetro (Carvalho, 2009).

As médias referentes ao número de células de Leydig por testículo no grupo ARS apresentaram redução significativa em relação aos demais tratamentos. Divergindo dos nossos resultados, Chiou et al. (2008) relatam um aumento no número de células de Leydig por testículo após tratamento com trióxido de arsênio (0,3, 1,5, 3,0 mg/Kg de peso corporal). Inúmeros fatores podem influir na quantidade de células de Leydig por animal, dentre os quais podem ser destacados: a quantidade de LH disponível, o número de receptores de LH (hormônio luteinizante) por célula, a quantidade de testosterona que a célula é capaz de secretar em um dado tempo, a velocidade pela qual a testosterona deixa o testículo via vasos linfáticos, vasos sanguíneos, fluído seminal, volume sanguíneo do animal e a taxa de metabolismo da testosterona (Russell et al., 1994; Russell, 1996). O aumento no número de células de Leydig no testículo pós-natal ocorre através da diferenciação de células

mesenquimais em células de Leydig e pela divisão mitótica das células de Leydig recém-formadas durante um período limitado. Os mecanismos celulares que resultam no estabelecimento do número adulto de células de Leydig continuam a funcionar durante a fase adulta para manutenção do número celular. Os mecanismos envolvidos na manutenção da população de células de Leydig no testículo adulto ainda não foram totalmente esclarecidos, no entanto, a perda de células de Leydig por morte celular desencadeia a formação de novas células (Mendis-Handagama & Siril Ariyaratne, 2001). Podemos inferir no presente trabalho que a redução do número de células de Leydig por testículo ocorreu devido ao aumento dos macrófagos, que interferiram negativamente na população dessas células através da estimulação da formação de EROS e da liberação de fatores pro-inflamatórios.

Animais do grupo ARS apresentaram redução de testosterona sérica se comparados àqueles do grupo controle. Tratamentos com guaraná e com vitamina E isoladamente não foram eficientes para manter as concentrações normais de testosterona sérica. Porém, o tratamento antioxidante com guaraná associado à vitamina E impediu as possíveis alterações na síntese e/ou liberação de testosterona pela célula de Leydig. Segundo Jana et al. (2006), a administração de arsenito de sódio desencadeia uma resposta inibitória na atividade de enzimas chave para a biosíntese de testosterona e aumento nas concentrações de fosfatase ácida, fosfatase alcalina e lactato desidrogenase, o que reflete degeneração testicular e citotoxicidade. Estudos correlacionando estrutura e função de células de Leydig, em várias espécies de mamíferos, mostraram que variações na síntese e secreção de testosterona dependem mais da capacidade individual desta célula do que do volume total delas no testículo (Ewing et al., 1979). Zirkin et al. (1980) relataram que a capacidade produtiva das células de Leydig está intimamente associada à quantidade de retículo endoplasmático liso presente no seu citoplasma. Receptores andrógenos presentes na superfície das células de Sertoli ligam-se à testosterona ou diidroxitesterona ativando a transcrição de genes

responsáveis pela espermatogênese (Collins et al., 2003). Segundo Jana et al. (2006), a exposição crônica ao arsenito de sódio interfere no eixo hipotálamo-hipófise-testículo, levando à diminuição nas concentrações plasmáticas e intratesticulares de testosterona, provavelmente por inibir a produção de gonadotrofinas com aumento da atividade adrenocortical. Resultados similares foram encontrados depois do tratamento com estradiol sozinho ou em combinação com o arsênio, sugerindo similaridade entre os mecanismos de ação. Chiou et al. (2008) demonstraram que a exposição ao arsenito de sódio em concentrações menores que (3 mg/Kg) não determinaram uma redução significativa nos níveis de LH e FSH (hormônio folículo estimulante), sugerindo que os efeitos do arsênio na redução nos níveis séricos de testosterona seja menor a nível de hipófise/hipotálamo na supressão da síntese de gonadotrofinas.

O estresse oxidativo resultante da produção aumentada de radicais livres tem sido apontado como um dos principais mecanismos responsáveis pelos efeitos tóxicos do arsênio em diferentes tecidos e órgãos. Entretanto, vários trabalhos têm mostrado que o tratamento com vitaminas, aminoácidos e flavonóides tem apresentado efeito protetor pela sua ação antioxidante (Mattei et al., 1998; Nandi et al., 2005; Chang et al., 2007). Nossos resultados confirmam a ação protetora antioxidante do guaraná e vitamina E isolado ou associado, contra os efeitos adversos mediados pelo estresse oxidativo no intertúbulo testicular.

## **5. Conclusões.**

Foi encontrada associação significativa entre exposição ao arsênio e redução na proporção volumétrica, volume (mL), proporção núcleo/citoplasma e número de células de Leydig por testículo associado a um aumento na proporção de espaço linfático, macrófagos e aumento na proporção e volume (mL) de tecido conjuntivo. Os tratamentos com guaraná e

vitamina E, isolado ou associado, teve ação protetora contra os efeitos deletérios mediados pelo estresse oxidativo no intertúbulo testicular.

### **Agradecimentos**

Ao Laboratório de Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade e ao Centro Universitário de Caratinga (UNEC) pelo apoio e licença das atividades acadêmicas.

### **6. Referências.**

Aitken RJ, Roman SD. 2008. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Adv Exp Med Biol.*, 636:154-171.

Basile A, Ferrara L, Pezzo M, Melle G, Sorbo S, Bassif P, Montesano D. 2005. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana*. *J. Ethnopharmacol.* 102:32-36.

Campos AR, Barros AI, Albuquerque FA, Leal LK, Rao VS. 2005. Acute effects of guarana (*Paullinia cupana*) on mouse behavior in forced swimming and open field tests. *Phytother. Res.* 19:441-443.

Carvalho FAR. Morfologia e morfometria testicular de Camundongos Adultos submetidos à exposição crônica ao arsenato. 2009. 105p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

Castro ACS, Berndtson WE, Cardoso FM. 2002. Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35:493-498.

Chang SI, Jin B, Youn P, Changbo P, Park JD, Ryu DY. 2007. Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 218:196-203.

Chinoy NJ, Tewari K, Jhala DD. 2004. Fluoride and/or arsenic toxicity in mice testis with formation of giant cells and subsequent recovery by some antidotes. *Fluoride* 37:172-184.

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.* 21:1562-1569.

Collins LL, Lee HJ, Chen YT, Chang M, Hsu, HY, Yeh S, Chang C. 2003. The androgen receptor in spermatogenesis. *Cytogen. Genome Res.* 103: 299-301.

De Sesso JM. 1998. An assessment of the developmental toxicity of inorganic arsenic. *Reprod. Toxicol. Rev.* 12: 385-433.

Ewing LL, Zirkin BR, Cochran RC, Kromann N, Peters C, Ruiz Bravo N. 1979. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. *Endocrinology* 105:1135-1142.

Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN. 1973. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol. Reprod.* 9: 500-532.

Ferguson JF, Anderson MA. 1974. Chemical forms of arsenic in water supplies and their removal. In: *Chemistry of water supply, treatment and distribution*. Rubi AJ (ed.). Ann Arbor Science, Ann Arbor, chapter 7.

França LR, Russell LD. 1998. The testis of domestic mammals. In: *Male reproduction; a multidisciplinary overview*. In: Martinez-Garcia F and Regadera J, (eds). Churchill Communications Europe, Madrid, cap 16, p.198-219.

França LR. 1991. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. 180p. Tese (Doutorado em Morfologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

- Godinho CL. 1999. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros. 74 p. Tese (Mestrado em Biologia Celular) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- Hales BD. 1996. Leydig cell-macrophage interactions: an overview. In: The Leydig Cell. Payne AH, Hardy MP, Russell LD (eds). Cache River Press, Vienna, 451-465.
- Jana K, Jana S, Samanta K. 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.* 4: 01-13.
- Jedlinska-Krakowska M, Jakubowski K, Kowalski A. 2002. Effect of increased ozone concentration in the air on the level of some immunological indices in rats given vitamin E and vitamin C. *Acta Pol. Toxicol.* 10: 81-87.
- Johnson L, Neaves WB. 1981. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. *Biol. Reprod.* 24: 703-712.
- Leite, RP. Efeitos da associação de cloreto de cádmio e guaraná (*Paullinia cupana*) no testículo de ratos wistar: Análise morfométrica, estrutural e ultraestrutural. 2008. 74p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2008.
- Mattei R, Dias RF, Spínola EB, Carline EA, Barros SBM. 1998. Guarana (*Paullina cupana*): Toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. *J. Ethnopharmacol.* 60: 111-116.
- Mendis-Handagama SMLC, Siril Ariyaratne, HB. 2001. Differentiation of the adult Leydig cell population in postnatal testis. *Biol. Reprod.* 65: 660-671.
- Nandi D, Patra RC, Swarup D. 2005. Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress and biochemical alterations in rats. *Toxicology* 211: 26-35.

- Otobone JF, Sanches AC, Nagae R, Martins JV, Sela VR, Mello JC, Audi E. 2007. Effect of lyophilized extracts from guarana seed (*Paullinia cupana var. sorbilis* (mart.) on behavioral profile in rats. *Phytother. Res.* 21(6): 531-535.
- Pant N, Kumar N, Murthy RC, Srivastava, SP. 2001. Male reproductive effect of arsenic in mice. *BioMetals* 14: 113–117.
- Papadopoulos V. 2007. Environmental factors that disrupt Leydig cell steroidogenesis. In: Payne AH; Hardy MP (Eds.) *Contemporary Endocrinology: The Leydig cell in health and disease*. New Jersey, Humana Press. p. 393-413.
- Paula TAR. 1999. Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). 84f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- Raburn DJ, Reinhart AJ, Hutson JC. 1993. Regulation of the macrophage population in postnatal rat testis. *J. Reprod. Immunol.* 24: 139-151.
- Ribeiro SMR, Queiroz MELR, Peluzio MCG, Costa NMB, Matta SLP. Queiroz JH. 2008. Antioxidantes da Dieta. In: *Nutrição Básica e Metabolismo*. Costa NMB, Peluzio MCG (eds.). Editora UFV, Viçosa, 382-400.
- Rosen BP, Liu Z. 2009. Transport pathways for arsenic and selenium: A minireview. *Environ. Int.* 35: 512-515.
- Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. Mammalian spermatogenesis. In: *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED (Eds.). Bolesta: Cache River Press, 1990. cap. 1, pp. 1-40.
- Russell LD, Chandrashekar V, Bartke A, Sinha-Hikim AP. 1994. The hamsters Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. *Int. J. Androl.* 17 : 93-106.

- Russell LD. 1996. Mammalian Leydig cell structure. In: The Leydig Cell. Payne AH, Hardy MP, Russel LD (Eds.). Cache River Press, Vienna: 43-96.
- Saradha B, Marthus PP. 2006. Effect of environmental contaminants on male reproduction. Environ. Toxicol. Pharmacol. 21: 34-41.
- Setchell BP.1991. Male reproductive organs and semen. In: Reproduction in Domestic Animals, Cupps PT (Ed.). 4th Ed. San Diego: Academic Press, 1991. cap. 6, pp. 221-250.
- Tae HJ, Jang BG, Ahn DC, Chooi EY, Kang HS, Kim NS, Lee JH, Park SY, Yang HH, Kim IS. 2005. Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus* Karpowi) during the breeding and non-breeding seasons. Vet. Res. Commun. 29: 629-643.
- Thompson DJ. 1993. A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals. Chem. Biol. Interact. 88: 89-114.
- USEPA 2000. National Primary Drinking Water Regulations; Arsenic and Classifications to Compliance and New Source Contaminants Monitoring; Proposed Rule. Federal Register, vol.65, No. 121, June 22, p.38888-38983.
- Zirkin BR, Ewing LL, Kromann N, Cochran RC. 1980. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. Endocrinology 107: 1867-1874.

Tabela 1 – Proporção volumétrica (%) dos componentes do intertúbulo de testículos de camundongos adultos, após administração de água destilada (CTR), arsenato de sódio (ARS), tratamento concomitante com arsenato + suspensão de guaraná (GUA), arsenato + vitamina E (VTE) e arsenato + guaraná + vitamina E (GUA/VTE).

<b>Tratamento</b>	<b>Tecido conjuntivo</b>	<b>Espaço linfático</b>	<b>Vasos sanguíneos</b>	<b>Macrófagos</b>	<b>Células de Leydig.</b>
CTR	4,12 ± 0,89 <sup>b</sup>	19,32 ± 6,23 <sup>b</sup>	11,71 ± 2,06 <sup>a</sup>	1,76 ± 0,72 <sup>b</sup>	63,01 ± 6,78 <sup>b</sup>
ARS	7,54 ± 1,19 <sup>a</sup>	27,45 ± 2,46 <sup>a</sup>	13,94 ± 2,35 <sup>a</sup>	2,86 ± 0,36 <sup>a</sup>	48,05 ± 3,36 <sup>a</sup>
GUA	4,90 ± 1,72 <sup>b</sup>	17,98 ± 2,70 <sup>b</sup>	13,62 ± 1,69 <sup>a</sup>	1,90 ± 0,681 <sup>b</sup>	62,51 ± 4,04 <sup>b</sup>
VTE	4,30 ± 1,08 <sup>b</sup>	17,72 ± 3,52 <sup>b</sup>	13,26 ± 1,57 <sup>a</sup>	2,00 ± 0,24 <sup>b</sup>	62,96 ± 4,48 <sup>b</sup>
GUA/VT E	4,13 ± 0,83 <sup>b</sup>	16,90 ± 5,60 <sup>b</sup>	11,37 ± 0,71 <sup>a</sup>	1,91 ± 0,39 <sup>b</sup>	65,56 ± 5,79 <sup>b</sup>

Letras diferentes nas colunas representam valores significativos ( $p < 0,05$ ) (n=7).

Média ± desvio-padrão.

Tabela 2 - Volume dos elementos do intertúbulo (ml) por testículo de camundongos adultos, após administração de água destilada (CTR), arsenato de sódio (ARS), tratamento concomitante com arsenato + suspensão de guaraná (GUA), arsenato + vitamina E (VTE) e arsenato + guaraná + vitamina E (GUA/VTE).

<b>Tratamento</b>	<b>Tecido conjuntivo</b>	<b>Espaço linfático</b>	<b>Vasos sanguíneos</b>	<b>Macrófagos</b>	<b>Células de Leydig.</b>
CTR	0,0009 ± 0,0002 <sup>b</sup>	0,004 ± 0,0014 <sup>a</sup>	0,0026 ± 0,0005 <sup>a</sup>	0,0004 ± 0,0002 <sup>a</sup>	0,0142 ± 0,002 <sup>b</sup>
ARS	0,0015 ± 0,0003 <sup>a</sup>	0,005 ± 0,0007 <sup>a</sup>	0,0027 ± 0,0007 <sup>a</sup>	0,0006 ± 0,0001 <sup>a</sup>	0,0090 ± 0,002 <sup>a</sup>
GUA	0,0010 ± 0,0004 <sup>b</sup>	0,003 ± 0,0008 <sup>a</sup>	0,0028 ± 0,0003 <sup>a</sup>	0,0004 ± 0,0002 <sup>a</sup>	0,0124 ± 0,002 <sup>b</sup>
VTE	0,0009 ± 0,0002 <sup>b</sup>	0,004 ± 0,0008 <sup>a</sup>	0,0030 ± 0,0005 <sup>a</sup>	0,0004 ± 0,0003 <sup>a</sup>	0,0133 ± 0,001 <sup>b</sup>
GUA/VTE	0,0009 ± 0,0001 <sup>b</sup>	0,004 ± 0,0012 <sup>a</sup>	0,0022 ± 0,0004 <sup>a</sup>	0,0004 ± 0,0001 <sup>a</sup>	0,0141 ± 0,001 <sup>b</sup>

Letras diferentes nas colunas representam valores significativos ( $p < 0,05$ ) ( $n=7$ ).

Média ± desvio-padrão.

Tabela 3 –Diâmetro nuclear ( $\mu\text{m}$ ), proporção de núcleo e citoplasma de células de Leydig (%), relação nucleoplasmática – RNP (%) e índice leydigossomático – ILS (%) em testículos de camundongos adultos, após administração de água destilada (CTR), arsenato de sódio (ARS), tratamento concomitante com arsenato + suspensão de guaraná (GUA), arsenato + vitamina E (VTE) e arsenato + guaraná + vitamina E (GUA/VTE).

<b>Tratamento</b>	<b>Diâmetro nuclear</b>	<b>Núcleo de Leydig</b>	<b>Citoplasma Leydig</b>	<b>RNP</b>	<b>ILS</b>
CTR	7,57 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	10,48 $\pm$ 1,16 <sup>b</sup>	52,80 $\pm$ 2,34 <sup>b</sup>	19,92 $\pm$ 2,92 <sup>a</sup>	0,035 $\pm$ 0,006 <sup>b</sup>
ARS	7,00 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	7,34 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	40,71 $\pm$ 1,40 <sup>a</sup>	18,05 $\pm$ 0,87 <sup>a</sup>	0,028 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>
GUA	7,38 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	10,53 $\pm$ 0,93 <sup>b</sup>	50,56 $\pm$ 3,22 <sup>b</sup>	20,89 $\pm$ 2,23 <sup>a</sup>	0,031 $\pm$ 0,006 <sup>ab</sup>
VTE	7,61 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>	11,22 $\pm$ 0,97 <sup>b</sup>	51,60 $\pm$ 2,74 <sup>b</sup>	21,82 $\pm$ 2,46 <sup>a</sup>	0,033 $\pm$ 0,005 <sup>ab</sup>
GUA/VTE	7,58 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	10,97 $\pm$ 1,05 <sup>b</sup>	54,59 $\pm$ 2,19 <sup>c</sup>	20,18 $\pm$ 2,63 <sup>a</sup>	0,036 $\pm$ 0,004 <sup>b</sup>

Letras diferentes nas colunas representam valores significativos ( $p < 0,05$ ) ( $n=7$ ).

Média  $\pm$  desvio-padrão.

Tabela 4–Volumes nuclear, citoplasmático e de uma célula de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ ) em testículos de camundongos adultos, após administração de água destilada (CTR), arsenato de sódio (ARS), tratamento concomitante com arsenato + suspensão de guaraná (GUA), arsenato + vitamina E (VTE) e arsenato + guaraná + vitamina E (GUA/VTE).

<b>Tratamentos</b>	<b>Volume nuclear</b>	<b>Volume citoplasmático</b>	<b>Volume de uma célula de Leydig</b>
CTR	227,46 $\pm$ 14,83 <sup>b</sup>	1156,90 $\pm$ 146,90 <sup>a</sup>	1384,36 $\pm$ 149,20 <sup>a</sup>
ARS	179,80 $\pm$ 7,23 <sup>a</sup>	997,52 $\pm$ 60,11 <sup>a</sup>	1177,33 $\pm$ 64,50 <sup>a</sup>
GUA	210,49 $\pm$ 14,19 <sup>b</sup>	1015,54 $\pm$ 107,42 <sup>a</sup>	1226,04 $\pm$ 111,81 <sup>a</sup>
VTE	230,92 $\pm$ 18,46 <sup>b</sup>	1065,26 $\pm$ 102,20 <sup>a</sup>	1296,19 $\pm$ 106,40 <sup>a</sup>
GUA/VTE	228,68 $\pm$ 17,30 <sup>b</sup>	1145,46 $\pm$ 140,30 <sup>a</sup>	1374,14 $\pm$ 143,23 <sup>a</sup>

Letras diferentes nas colunas representam valores significativos ( $p < 0,05$ ) ( $n=7$ ).

Média  $\pm$  desvio-padrão.

Tabela 5 - Número de células de Leydig por testículo ( x 10<sup>6</sup> ) e por grama de testículo (x 10<sup>6</sup>) de camundongos adultos, após administração de água destilada (CTR), arsenato de sódio (ARS), tratamento concomitante com arsenato + suspensão de guaraná (GUA), arsenato + vitamina E (VTE) e arsenato + guaraná + vitamina E (GUA/VTE).

Tratamentos	Número de células por testículo ( x 10 <sup>6</sup> )	Número de células por grama de testículo (x10 <sup>6</sup> )
CTR	1,006 ± 0,539 <sup>b</sup>	7,091 ± 2,834 <sup>a</sup>
ARS	0,823 ± 1,228 <sup>a</sup>	7,756 ± 4,237 <sup>a</sup>
GUA	1,025 ± 0,519 <sup>b</sup>	7,749 ± 6,922 <sup>a</sup>
VTE	1,034 ± 0,186 <sup>b</sup>	7,438 ± 2,274 <sup>a</sup>
GUA/VTE	1,035 ± 0,315 <sup>b</sup>	7,307 ± 2,268 <sup>a</sup>

Letras diferentes nas colunas representam valores significativos ( $p < 0,05$ ) (n=7).

Média ± desvio-padrão.

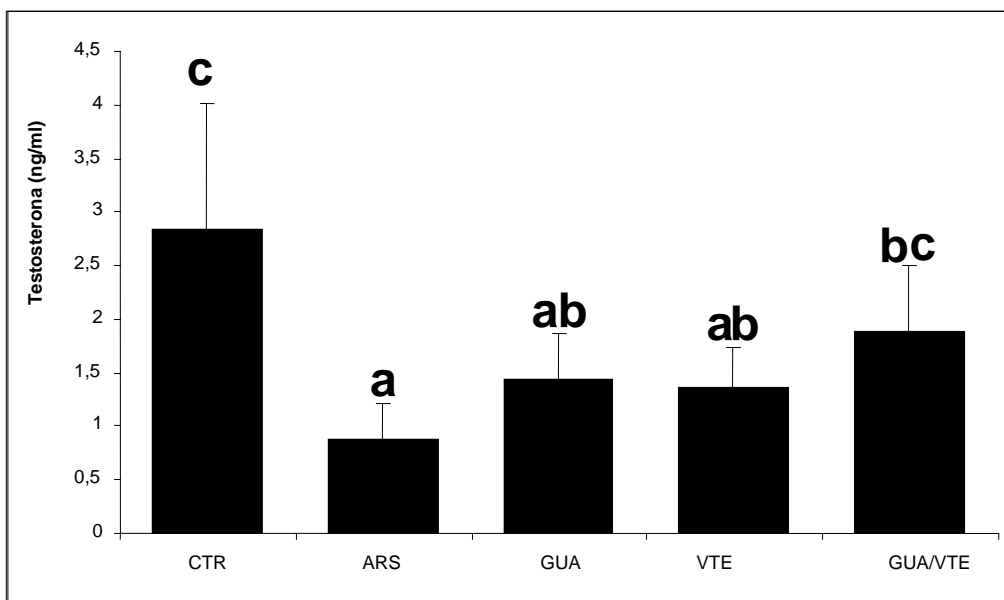


Figura 01. Níveis séricos de testosterona após administração de água destilada (CTR), arsenato de sódio (ARS), tratamento concomitante com arsenato + suspensão de guaraná (GUA), arsenato + vitamina E (VTE) e arsenato + guaraná + vitamina E (GUA/VTE).

## CONCLUSÕES GERAIS

- Animais expostos ao arsenato de sódio (100 mg/l), sem tratamento concomitante, apresentaram redução no peso dos testículos e no parênquima testicular.
- Não houve alterações no peso da glândula vesicular, fígado, rins e osso para os diferentes tratamentos. Entretanto, animais expostos ao arsenato e submetidos ao tratamento combinado de guaraná + vitamina E apresentaram um aumento no peso da albugínea, epidídimo e próstata.
- O índice gonadossomático do grupo (ARS) apresentou redução em relação aos demais tratamentos.
- A exposição ao arsenato determinou um acúmulo de arsênio nos testículos, órgãos sexuais acessórios, osso, músculo, fígado e rins.
- A ligação e absorção do arsênio parece ser tecido-específica e determinada por propriedades cinéticas que também diferem de tecido para tecido.
- O guaraná e a vitamina E provavelmente agem como quelantes, diminuindo o acúmulo tecidual de arsênio na maioria dos tecidos analisados.
- A exposição ao arsenato de sódio levou a um aumento nas concentrações séricas de ALT.
- Houve redução na proporção e volume de túbulo seminífero nos animais expostos apenas ao arsenato.
- Houve redução no ITS, na altura do epitélio seminífero e no diâmetro tubular no grupo exposto ao arsenato sem tratamento concomitante em relação aos demais grupos.
- O tratamento com guaraná e vitamina E, isolado ou associado, conferiu proteção à maioria dos componentes tubulares e intertubulares.
- Animais do grupo ARS apresentaram PED total e por grama de testículo, inferiores aos demais grupos, indicando diminuição na produção espermática.

- A população de células de Sertoli manteve-se constante, embora tenha sido registrada redução nos seus índices para os animais expostos ao arsenato de sódio.
- A exposição ao arsenato na água de beber reduziu o número de espermátócitos na fase de pré-leptóteno/leptóteno, paquíteno e espermátides arredondadas por testículo.
- O tratamento isolado ou associado com guaraná e vitamina E produziu efeitos positivos sobre o compartimento tubular dos testículos de camundongos Suíços adultos.
- A exposição ao arsenato reduziu a proporção volumétrica das células de Leydig e aumentou a proporção de espaço linfático, tecido conjuntivo e macrófagos.
- A presença de arsenato na água de beber proporcionou redução no volume das células de Leydig por testículo e no volume de tecido conjuntivo.
- Houve redução do ILS nos animais que receberam arsenato sem tratamento concomitante.
- A exposição ao arsenato no grupo ARS determinou a redução das concentrações séricas de testosterona em relação ao grupo CTR.
- O tratamento com antioxidante com guaraná + vitamina E reverteu possíveis alterações na síntese e/ou liberação de testosterona.
- As células de Leydig apresentaram redução do diâmetro e volume nuclear.
- O tratamento com guaraná e vitamina E, isolado ou associado, teve ação protetora contra os efeitos adversos mediados pelo estresse oxidativo no intertúbulo testicular.
- O trabalho consolida o potencial antioxidante do guaraná e vitamina E, sugerindo como uma alternativa terapêutica para se evitar danos testiculares causados pelo arsenato e/ou outros fatores que determinem um desequilíbrio da atividade oxidante celular.