

AMANDA ALVES LOZI

**TOXICIDADE COMPARADA DOS METAIS PESADOS, ARSÊNIO,
CÁDMIO, CHUMBO, CROMO E NÍQUEL, SOBRE PARÂMETROS
REPRODUTIVOS DE CAMUNDONGOS MACHOS ADULTOS
APÓS EXPOSIÇÃO AGUDA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

L925t
2019 Lozi, Amanda Alves, 1988-
Toxicidade comparada dos metais pesados, arsênio, cádmio, chumbo, cromo e níquel, sobre parâmetros reprodutivos de camundongos machos adultos após exposição aguda / Amanda Alves Lozi. – Viçosa, MG, 2019.
vii, 77 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 39-57.

1. Reprodução animal. 2. Espermatogênese. 3. Metais pesados. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. II. Título.

CDD 22. ed. 573.65

AMANDA ALVES LOZI

**TOXICIDADE COMPARADA DOS METAIS PESADOS, ARSÊNIO,
CÁDMIO, CHUMBO, CROMO E NÍQUEL, SOBRE PARÂMETROS
REPRODUTIVOS DE CAMUNDONGOS MACHOS ADULTOS
APÓS EXPOSIÇÃO AGUDA**

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

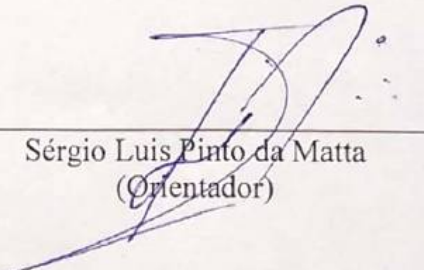
APROVADA: 28 de fevereiro de 2019.



Sirlene Souza Rodrigues Sartori



Marli do Carmo Cupertino



Sérgio Luis Pinto da Matta
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter confortado meu coração nos momentos difíceis, me dando muita saúde, força e persistência.

Ao meu marido Daniel, por sempre confiar em mim e pelo incentivo que me fez chegar até aqui, além de toda paciência, amor e sinceridade.

À minha família, meu pai José Lozi, por todo apoio, por sempre estar ao meu lado, mesmo estando tão distante, me dando bons conselhos e me colocando sempre no caminho certo, minha mãe Eleni, por todas as orações, meus irmãos, Elenice, Rafael e Diego, meus sobrinhos Victor e Lucas, e a Marlúcia, eu amo vocês, não seria quem sou se vocês não fizessem parte da minha vida.

À todas as meninas do Sérgio, Beth, Didi, Analu, Vivi, Jana, Grasi e Ingrid (da Fabiana) obrigada pelo apoio em todos os momentos de desespero. Deixo um obrigada mais que especial para as que não mediram esforços para me ajudar nessa reta final.

À minha amiga e coorientadora Fernanda, obrigada pela paciência e por me ensinar com tanto carinho cada dúvida durante o desenvolver da dissertação, suas correções me ajudaram muito, eu simplesmente amo você.

Ao meu orientador Sérgio Luis Pinto da Matta, por toda dedicação e disponibilidade, pela pessoa e profissional que é, obrigada por todo conhecimento transmitido, por sempre ter acreditado e depositado sua confiança em mim.

À minha coorientadora Fabiana Melo, obrigada pelas correções e disponibilidade, aprendi muito com você, muito obrigada!

À Universidade Federal de Viçosa – UFV, todos os funcionários, alunos, professores e laboratórios que sempre estiveram à disposição para me ajudar no desenvolvimento das análises.

A todos do Laboratório 333, que sempre se disponibilizaram para atender minhas dúvidas, um obrigada especial ao Matheus, Mari, Ana Cláudia, Felipe, Marcelinha, Luiz e Talita.

Aos professores Mariana, Mariella e coorientador Juraci que contribuíram grandiosamente para a realização desse trabalho.

À minha amiga e orientadora da graduação Kyvia Lugate, por todos os ensinamentos e incentivos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro imprescindível durante todo meu período no mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVO GERAL	2
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
3.1 Testículo.....	2
3.2 Estresse oxidativo (Testículo)	3
3.3 Sangue.....	3
4. REVISÃO DE LITERATURA	3
4.1 Metais Pesados	3
4.2 Arsênio.....	4
4.3 Cádmio.....	5
4.4 Chumbo	6
4.5 Cromo	7
4.6 Níquel.....	8
4.7 Sistema Reprodutor Masculino: Testículo	9
4.8 Espermatozoides	10
4.9 Metais pesados no sistema reprodutor	11
4.10 Estresse oxidativo	13
5. MATERIAL E MÉTODOS	14
5.1 Animais.....	14
5.2 Tratamento.....	15
5.3 Coleta de amostras, biometria corporal e dos órgãos	15
5.4 Processamento do material histológico.....	16
5.5 Histomorfometria testicular	16
5.5.1 Proporção volumétrica, volume dos componentes testiculares e índices tubulossomático, epiteliossomático e Leydigossomático.....	16
5.5.2 Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e áreas de elementos tubulares.....	17
5.5.3 Comprimento total dos túbulos seminíferos e comprimento total de túbulo por grama de testículo.....	18
5.5.4 Contagem da população celular de túbulos no estágio I do ciclo do epitélio seminífero.....	18
5.5.5 Razões entre os números celulares.....	19
5.5.6 Número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo	19
5.5.7 Produção espermática diária por testículo e por grama de testículo	19

5.5.8	Diâmetro nuclear, volume nuclear, citoplasmático e de uma célula de Leydig e número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo.....	20
5.6	Determinação da concentração de testosterona plasmática	20
5.7	Determinação da concentração de metais pesados nos testículos.....	21
5.8	Histopatologia testicular	21
5.9	Viabilidade celular.....	21
5.10	Avaliação do estresse oxidativo	22
5.10.1	Quantificação das enzimas antioxidantes.....	22
5.10.2	Determinação do produto de estresse oxidativo – Malondialdeído (MDA).....	23
5.10.3	Oxido nítrico (ON).....	23
5.10.4	Proteína total	23
5.11	Avaliação espermática.....	23
5.11.1	Motilidade	24
5.11.2	Morfologia espermática.....	24
5.11.3	Integridade estrutural das membranas espermáticas	24
5.11.4	Produção diária de espermatozoides, número de espermatozoides e tempo de trânsito epididimário	24
5.12	Análises estatísticas	25
6.	RESULTADOS	26
6.1	Biometria corporal e dos órgãos que compõem o sistema reprodutor masculino	26
6.2	Histomorfometria testicular	26
6.3	Contagem de células do estágio I	26
6.4	Histomorfometria intertubular	27
6.5	Testosterona	27
6.6	Histopatologia	27
6.7	Viabilidade celular.....	27
6.8	Concentração de metais pesados nos testículos.....	28
6.9	Estresse oxidativo	28
6.10	Motilidade e morfologia espermática	28
6.11	Integridade de membrana espermática	28
6.12	Contagem das espermátides arredondadas no testículo e de espermatozoides na cabeça, corpo e cauda do epidídimo.....	29
7.	DISCUSSÕES	30
8.	CONCLUSÕES.....	38
9.	REFERÊNCIAS:.....	39
	ANEXO I – TABELAS	58

ANEXO II – FIGURAS.....	68
ANEXO III – RESUMO DOS RESULTADOS	75

RESUMO

LOZI, Amanda Alves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Toxicidade comparada dos metais pesados, arsênio, cádmio, chumbo, cromo e níquel, sobre parâmetros reprodutivos de camundongos machos adultos após exposição aguda.** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta. Coorientadores: Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo, Fernanda Carolina Ribeiro Dias e Juraci Alves de Oliveira.

Nas últimas décadas a exposição dos seres vivos a tóxicos ambientais, como os metais pesados, vem se tornando uma prática comum. Metais como o arsênio, cádmio, chumbo, cromo VI e níquel são elementos químicos instáveis que podem causar efeitos adversos ao organismo. Nos testículos a exposição a esses metais pode causar redução do peso testicular, estresse oxidativo, alterações histológicas e hormonais, degeneração dos túbulos seminíferos, apoptose e necrose testicular, além de desencadear perda da motilidade, viabilidade e morfologia espermática. Este estudo teve como objetivo avaliar a ação dos metais pesados arsenato, arsenito, cádmio, chumbo, cromo e níquel sobre parâmetros reprodutivos masculinos a fim de estabelecer uma ordem de toxicidade. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 7 grupos experimentais (n=10 animais/grupo), pesados e mantidos em gaiolas coletivas. Assim, o grupo 1 recebeu 0,7mL de solução salina 0,9% (controle), o grupo 2 recebeu arsenato, o grupo 3 arsenito, o grupo 4 cádmio, o grupo 5 chumbo, o grupo 6 cromo VI e o grupo 7 níquel, todos na dose de 1,5 mg/Kg de peso corporal. Os metais foram administrados por via intraperitoneal (IP), em dose única e os animais foram eutanasiados sete dias após a aplicação. Os animais tratados com níquel apresentaram maiores danos toxicológicos como histopatologias, dano celular inicial no túbulo seminífero e alterações espermáticas. O Cádmio induziu patologias leves, gerando dano inicial e morte celular no túbulo, além de alterações morfológicas e menor concentração de espermatozoides íntegros. O Cromo VI causou aumento da testosterona plasmática, redução da morfologia espermática normal e diminuição de espermatozoides com membrana íntegra, associado ao aumento de espermatozoides lesados. Os animais tratados com chumbo também apresentaram patologias leves e alterações nas células já diferenciadas ou em final de diferenciação. Adicionalmente, o arsenito também induziu redução no número de espermátides e de espermatozoides, alterações nas células de Leydig e diminuição na integridade de membrana espermática com maior intensidade que o arsenato, sendo assim considerado mais tóxico. As alterações funcionais, celulares e histológicas encontradas neste estudo, podem ser uma resposta inicial ao estresse oxidativo induzido pela intoxicação por metais pesados.

ABSTRACT

LOZI, Amanda Alves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Comparative toxicity of heavy metals, arsenic, cadmium, lead, chromium and nickel, on reproductive parameters of adult male mice after acute exposure.** Advisor: Sérgio Luis Pinto da Matta. Co-advisors: Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo, Fernanda Carolina Ribeiro Dias, and Juraci Alves de Oliveira.

In recent decades the exposure of living beings to environmental toxins, such as heavy metals, has become a common practice. Metals such as arsenic, cadmium, lead, chromium VI, and nickel are unstable chemicals that can cause adverse effects to the body. In the testis, the exposure to these metals can cause testicular weight reduction, oxidative stress, histological and hormonal changes, degeneration of seminiferous tubules, testicular apoptosis and necrosis, in addition to triggering loss of motility, viability and sperm morphology. This study aimed to evaluate the action of heavy metals arsenate, arsenite, cadmium, lead, chromium, and nickel on the male reproductive parameters for the purpose of establish an order of toxicity. The animals were randomly divided into 7 experimental groups (n = 10 animals/group), weighed and kept in collective cages. Group 1 received 0.7 ml of 0.9% saline solution (control), group 2 received arsenate, group 3 arsenite, group 4 cadmium, group 5 lead, group 6 chromium VI, and Group 7 nickel, all at the dose of 1.5 mg/Kg of body weight. The metals were administered intraperitoneally (*i.p.*), single dose, and the animals were euthanized seven days after application. Animals treated with nickel presented greater toxicological damages such as pathologies, initial cell damage in the seminiferous tubule and sperm changes. Cadmium induced pathologies, generating initial damage and cell death in the tubule, in addition to morphological changes and lower concentration of intact sperm. Chromium VI caused an increase in plasma testosterone, reduction in normal sperm morphology, and reduction of sperm with intact membrane, associated with an increase in damaged sperm. Animals treated with lead also showed slight pathologies and alterations in differentiated cells or at the end of differentiation. Additionally, arsenite also induced reduction in the number of spermatids and sperm, changes in Leydig cells and decrease in sperm membrane integrity with a higher intensity than arsenate, and it was considered more toxic. The functional, cellular and histological changes found in this study may be an initial response to oxidative stress induced by heavy metal poisoning.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas a exposição dos seres vivos a tóxicos ambientais, como os metais pesados, vem se tornando uma prática comum. Esse fato tem gerado uma série de estudos com o objetivo de identificar o surgimento de problemas resultantes dessa exposição (Traviño *et al.*, 2017). Os metais pesados são elementos químicos estáveis que, em contato com seres vivos, podem causar efeitos adversos ao organismo. São naturalmente encontrados em pequenas concentrações no meio ambiente e sua disponibilidade pode ser elevada por fontes antropogênicas (Lars, 2003; Angelis *et al.*, 2017). Em concentrações moderadas certos metais são essenciais para a manutenção das funções fisiológicas do organismo. No entanto, metais não essenciais, geralmente conhecidos como metais pesados, não possuem papel biológico estabelecido e, portanto, são tóxicos (Goldhaber, 2003; Jang e Hoffman, 2011).

O sistema reprodutor masculino é responsável pela contínua produção, nutrição e armazenamento dos espermatozoides por meio de um processo denominado espermatogênese, além de ser responsável também pela síntese e secreção de andrógenos (Russell *et al.*, 1990; Kierszenbaum, 2008). A eficiência desse processo depende da perfeita interação entre as células germinativas e os componentes somáticos do testículo (Skinner, 1991; França e Russell, 1998; Skinner e Griswold, 2005). Há estudos relatando a ação de metais pesados no sistema reprodutor masculino, os quais atuam prejudicando seu funcionamento tendo como consequência a redução na capacidade reprodutiva (Traviño *et al.*, 2017).

Os efeitos deletérios causados à saúde reprodutiva após exposição a esses metais pesados podem levar à redução do peso testicular e das glândulas acessórias, alterações histológicas e hormonais no sistema reprodutor, degeneração nos túbulos seminíferos, apoptose e necrose testicular (Lymberopoulos *et al.*, 2003; Ait Hamadouche *et al.*, 2009; Elgawish e Abdelrazek, 2014; Cupertino *et al.*, 2017B; Mouro *et al.*, 2017). A exposição aos metais também pode induzir estresse oxidativo testicular, desencadeando alterações como perda da motilidade e comprometimento das organelas dos espermatozoides causando infertilidade (Reddy *et al.*, 2011; Fallahi *et al.*, 2015).

A reprodução é um fator chave para a perpetuação e manutenção de uma espécie no ambiente (Sengupta *et al.*, 2017). Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a ação dos metais pesados arsenato, arsenito, cádmio, chumbo, cromo VI e níquel nos testículos de camundongos Swiss adultos, através de análises biométricas, morfométricas, estereológicas, espermáticas, patológicas e de estresse oxidativo

testicular, comparando a toxicidade entre estes metais, a fim de estabelecer uma ordem toxicológica.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação dos metais pesados arsenato, arsenito, cádmio, chumbo, cromo e níquel sobre os parâmetros reprodutivos masculinos a fim de estabelecer uma ordem de toxicidade desses metais e determinar a taxa de retenção desses metais no organismo.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1 Testículo

- Obter os valores biométricos corporais e dos órgãos reprodutores;
- Calcular os índices gonadossomático (IGS), parenquimossomático (IPS), tubulossomático (ITS), epiteliossomático (IES) e Leydigossomático (ILS);
- Mensurar o diâmetro dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio seminífero;
- Calcular o comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo;
- Obter a proporção volumétrica e volume dos componentes tubulares e intertubulares;
- Calcular a área tubular, luminal e do epitélio seminífero;
- Calcular o diâmetro, volume nuclear e número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo;
- Realizar a contagem da população celular de túbulos no estágio I do ciclo do epitélio seminífero e obter as razões entre os tipos celulares;
- Calcular o número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo, bem como a capacidade total de suporte dessas células;
- Calcular o rendimento geral da espermatogênese;
- Realizar avaliação histopatológica do testículo;
- Avaliar a viabilidade celular;
- Determinar a concentração de cada metal no testículo;
- Avaliar a motilidade e morfologia espermática;
- Avaliar a integridade estrutural das membranas espermáticas;
- Calcular a produção diária de espermatozoides, número de espermatozoides e tempo de trânsito epididimário.

3.2 Estresse oxidativo (Testículo)

- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST);
- Determinar a atividade do malondialdeído (MDA), um dos produtos da peroxidação lipídica;
- Mensurar atividade do óxido nítrico (NO).

3.3 Sangue

- Determinar a concentração da testosterona plasmática.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Metais Pesados

Os metais são elementos eletropositivos, condutores de calor e eletricidade e normalmente formam sais com metaloides. Embora isso inclua metais de transição como ferro e cobre, também inclui lantanídeos e actinídeos. A maioria dos organismos vivos exige quantidades variadas de certos metais como ferro, cromo III, cobre e zinco para a manutenção de funções biológicas (oligoelementos essenciais). Outros metais, conhecidos por metais pesados, como arsênio, cádmio, cromo VI, chumbo e níquel não têm papel biológico conhecido em humanos e, portanto, são tóxicos (Goldhaber, 2003; Jang e Hoffman, 2011).

Metais pesados são elementos químicos que podem causar toxicidade quando em contato com organismos vivos, possuem densidade específica maior que 5 g/cm³ e são encontrados de forma natural em pequenas quantidades no meio ambiente (Lars, 2003). Os metais pesados estão presentes na água, no solo e no ar, são quimicamente estáveis persistindo no ambiente e na cadeia alimentar por um longo período de tempo (Hu, 2000).

Fontes antropogênicas, como atividades industriais e mineração, têm aumentado sua disponibilidade levando os seres vivos a terem contato com maiores concentrações por diversas vias como oral, nasal e cutânea (Lars, 2003). A natureza e a severidade da toxicidade variam de acordo com o metal pesado envolvido, sua forma (iônica ou molecular), nível de exposição, estados químicos, tempo de exposição (agudo ou crônico) e características do indivíduo (Ibrahim *et al.*, 2006).

A exposição a metais pesados causa danos à saúde podendo prejudicar o funcionamento de diversos órgãos como fígado, cérebro, pulmão, rins e testículos. A exposição crônica pode ser degenerativa causando disfunções musculares, físicas e

neurológicas, favorecendo o desenvolvimento de câncer (Jaishankar *et al.*, 2014). Ao chegar na corrente sanguínea, os metais pesados geralmente são retidos por proteínas e então transportados até órgãos alvos (primários e secundários) onde podem ser estocados em seus tecidos ou biotransformados (Pizent *et al.*, 2012). A toxicidade causada por metais pesados pode ocorrer devido à sua conjugação com grupos funcionais de proteínas, causando desequilíbrio no estado oxidativo e danos às membranas celulares. Essa conjugação pode diminuir ou impossibilitar o transporte de elementos essenciais e o desequilíbrio induzir a formação de radicais livres em excesso, prejudicando assim a eficácia dos mecanismos de proteção antioxidante (Goldhaber, 2003).

Segundo Sengupta *et al.* (2017), existe um declínio global significativo na fertilidade masculina como consequência de um comprometimento progressivo dos testículos e da qualidade do sêmen, sendo a exposição a metais pesados um dos principais fatores que ocasionaram esse declínio. Estudar e entender os mecanismos de ação dos metais pesados no sistema reprodutor masculino, possibilita a redução dos efeitos negativos e sua disponibilidade no ambiente, uma vez que esses metais possuem meia vida longa e se acumulam nos tecidos (Sun *et al.*, 2016).

4.2 Arsênio

O arsênio (As) é um metaloide (semimetal) amplamente distribuído na natureza sendo encontrado em diferentes formas químicas (iônica ou molecular) e estados de oxidação (+3 arsenito e +5 arsenato), sob a forma de óxidos de arsênio ou sais desses óxidos (Barra *et al.*, 2000). A exposição dos seres humanos ocorre principalmente pelo ar, alimentação e água. Milhares de pessoas, em vários países, sofrem com os efeitos tóxicos do arsênio pela contaminação natural das águas subterrâneas, bem como pelos problemas causados por efluentes industriais e drenagem (Mandal e Suzuki, 2002).

A toxicidade desse metaloide é influenciada por suas formas (iônica ou molecular), fontes ambientais e farmacodinâmica, além das doses e dos períodos de exposição ao organismo, sendo o arsênio inorgânico, como o arsenito de sódio, causador de toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento (Kim e Kim, 2015). A exposição ao arsênio pode resultar em toxicidade crônica e aguda e alguns sintomas comuns após exposição aguda incluem náuseas, vômito, dor abdominal, encefalopatia e neuropatia (Reddy *et al.*, 2011). A exposição crônica pode ocasionar problemas no trato gastrointestinal, doenças cardíacas, neurais e favorecer o desenvolvimento de câncer em

diversos órgãos, afetando o funcionamento dos sistemas dos quais eles fazem parte (Reddy *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2018).

Estudos em animais, camundongos e ratos, indicam que a exposição pré-natal ao arsênio, por via intraperitoneal ou intravenosa, causa malformação fetal, enquanto que por via oral ou inalatória afeta o desenvolvimento fetal, o que inclui retardo mental e morte. A ingestão de água potável contaminada por arsênio causa disfunções da espermatogênese, reduções da testosterona, das gonadotrofinas e perturbações da esteroidogênese (Kim e Kim, 2015; Souza *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2018).

Existem vários mecanismos possíveis para a toxicidade gerada após exposição ao arsênio. Um deles é a ação inibitória direta sobre os testículos ou a alteração do eixo hipotálamo-hipófise que promove mudanças nas concentrações plasmáticas do Hormônio Luteinizante (LH) e Hormônio Folículo Estimulante (FSH) (Kuladip *et al.*, 2006). A redução do LH pode prejudicar a função das células de Leydig, levando à diminuição da produção de testosterona, enquanto a redução do FSH pode prejudicar a função testicular e a espermatogênese (Kuladip *et al.*, 2006), interferindo nas células de Sertoli. A toxicidade nas gônadas, causada por esse metal, pode alterar negativamente a realização dos processos essenciais para a formação de gametas masculinos viáveis, impossibilitando assim a manutenção da espécie no ambiente (Kreiger, 1982; Sarkar *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2018).

4.3 Cádmio

O cádmio (Cd) em sua forma pura é um metal branco-prateado que está presente na crosta terrestre em associação com vários metais. Assim, pode ser extraído como produto secundário durante o processamento de zinco (Zn), chumbo (Pb) ou cobre (Cu) (Angelis *et al.*, 2017). A presença de compostos de Cd no ambiente é uma sequência concomitante de dois processos, sendo o primeiro por fontes naturais que incluem atividade vulcânica, intemperismo de rochas, incêndios florestais, mobilização de solos e aterros sanitários (Angelis *et al.*, 2017). O segundo processo se dá por atividades antrópicas como derivados de baterias, pigmentos, estabilizadores plásticos, pesticidas e fertilizantes, processamento de borracha, processo de galvanização, combustão fóssil e incineração de resíduos (Angelis *et al.*, 2017).

A exposição dos seres humanos a esse metal pode ocorrer através da alimentação, da ingestão de água contaminada, por inalação e tabagismo. O envenenamento por Cd ganhou destaque nos anos 60 no Japão devido ao surgimento da doença itai-itai após o consumo de arroz contaminado (Waalkes, 2000). O cádmio tem

uma meia-vida biológica relativamente longa (20 anos) e em doses agudas pode afetar alguns órgãos alvos como os rins, fígado, testículos e intestino. A exposição crônica favorece o surgimento de câncer no fígado, rins, pulmão, sistema hematopoiético, reprodutor e outros (Waalkes, 2000; Sarkar *et al.*, 2013).

O cádmio consegue atingir o ambiente intracelular eucarioto ligando-se a proteínas transportadoras de zinco e, no caso dos testículos, em proteínas específicas presentes nas células do tecido que compõem esse órgão (Sarkar *et al.*, 2013). No organismo da maioria dos animais esse metal atinge a corrente sanguínea e se liga à albumina, sendo então transportado até o fígado, onde induz a síntese de metalotioneína. (Sarkar *et al.*, 2013).

O cádmio é um elemento com capacidade biocumulativa que pode competir com elementos essenciais, além de causar diversas alterações no organismo, como desregulação hormonal, estresse oxidativo e apoptose (Cupertino *et al.*, 2017B; Nan *et al.*, 2017). No sistema reprodutor masculino, o Cd pode prejudicar o funcionamento normal do sistema, gerando menor capacidade reprodutiva (Traviño *et al.*, 2017).

4.4 Chumbo

O chumbo (Pb) é um metal pesado com alta capacidade cumulativa, sendo considerado um dos poluentes ambientais mais perigosos encontrados no ambiente. Sua disponibilidade se dá por meio de fontes naturais e antrópicas (Hernberg, 2000; Patra *et al.*, 2011). Esse metal pode ser dividido em dois grupos principais: o chumbo inorgânico (sais de chumbo e chumbo metálico) e o chumbo orgânico (acetato de chumbo). Embora os dois grupos sejam compostos de chumbo, apresentam diferenças quanto à toxicidade (Sadao, 2002; Liu *et al.*, 2008).

Em seu estado inorgânico o Pb é consistentemente absorvido pela via respiratória e trato gastrointestinal, não sendo absorvido pela pele de forma eficiente. Porém, em seu estado orgânico, a intoxicação acontece com maior frequência pelo chumbo tetraetila e tetrametila (Liu *et al.*, 2008). Ao atingir a corrente sanguínea esse metal se distribui pelo organismo por duas formas: ligados aos eritrócitos (maior parte) e pelo plasma (Katzung *et al.*, 2014).

A exposição a este metal pode causar danos aos sistemas que compõem o organismo, como o hematopoiético, urinário, esquelético, nervoso e reprodutivo, através de alterações nas funções bioquímicas e fisiológicas (Assi *et al.*, 2016). O estresse oxidativo pode também ser induzido pelo Pb devido a sua interferência no balanço pró-oxidante/antioxidante dos tecidos, levando ao surgimento de problemas fisiológicos,

bioquímicos e comportamentais (Hsu e Guo, 2002). Outro dano causado por esse metal dá-se a partir da competição com elementos essenciais do organismo, processo que pode levar à substituição desses elementos em determinados tecidos, gerando alterações prejudiciais à saúde (Hsu e Guo, 2002; Flora *et al.*, 2011).

Vários estudos revelam a atuação toxicológica do chumbo no sistema reprodutor masculino. Quando ingerido ele se torna uma das principais causas das patologias encontradas nos órgãos e, em alguns casos, os danos são irreparáveis prejudicando a funcionalidade do sistema por completo (Jadhav *et al.*, 2007; Apostoli e Catalani, 2011). Os efeitos causados por esse metal no sistema reprodutor masculino incluem alterações nos padrões histológicos dos testículos, diminuição quantitativa e qualitativa dos espermatozoides, diminuição da concentração de hormônios essenciais para a espermatogênese e alterações celulares (Carlsen *et al.*, 1992; Elgawish e Abdelrazek, 2014; Assi *et al.*, 2016).

4.5 Cromo

O cromo (Cr) é o sétimo metal mais abundante encontrado no meio ambiente, estando disponível em diversos estados de oxidação, sendo os mais comuns +2, +3 e +6. No estado trivalente e hexavalente a estabilidade e a toxicidade são maiores (Silva e Pedrozo, 2001). Na forma elementar são encontrados na composição de óxidos, sulfatos, cromatos, dicromatos, sais básicos e recobrimo peças metálicas e plásticas nos processos de tratamento de superfície, fundições, curtumes, entre outras (Silva e Pedrozo, 2001).

Dentre as fontes naturais de contaminação ambiental estão os incêndios florestais e as erupções vulcânicas, enquanto nas antropogênicas se destacam a utilização do Cr pelas indústrias de fabricação de aço inoxidável e madeira tratada com pressão, fabricação de cimento e fertilizantes (Silva e Pedrozo, 2001; Zhitkovich, 2002; Salnikow e Khitkovich, 2008). O Cr III é considerado um micronutriente essencial para os seres vivos, porém a capacidade de uma substância se tornar tóxica ou não depende sempre de sua concentração. A maioria dos metais pesados, além de serem cumulativos, tornam-se venenos para o organismo quando ingeridos em concentrações elevadas (Guilherme *et al.*, 2005).

A exposição ao Cromo VI pode gerar efeitos agudos e crônicos incluindo hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, dermatotoxicidade e carcinogenicidade. No ambiente intracelular o Cr no estado hexavalente sofre reduções gerando espécies reativas de oxigênio, as quais favorecem o estresse oxidativo (Von Burg e Liu, 1993; Bagchi *et al.*,

2002). No sistema reprodutor masculino esse metal atua gerando apoptose nas células germinativas e estresse oxidativo (Marouani *et al.*, 2017), além da diminuição da motilidade e da viabilidade espermática (Li *et al.*, 2001).

Os danos causados pela ingestão de cromo nos diversos sistemas que compõem um organismo vêm sendo descritos em muitos estudos, onde os testículos são os principais órgãos alvos para o dano oxidativo induzido por esse metal. Porém, mais estudos são necessários para melhor compreender os mecanismos utilizados pelo cromo hexavalente para causar alterações no funcionamento desses órgãos (Acharya *et al.*, 2004; Marouani *et al.*, 2017).

4.6 Níquel

O níquel (Ni), um dos metais pesados mais comuns no solo, faz parte da composição do núcleo da Terra, dos meteoritos, vulcões, poeira do solo e dos incêndios florestais (fontes naturais). Sua disponibilidade por fontes antropogênicas ocorre na mineração, fundição e refinamento, derretimento do aço inoxidável, reciclagem de sucata, extração de ouro, entre outras diversas formas (Costa *et al.*, 2005; Berton *et al.*, 2006; Cameron *et al.*, 2011).

Como para a maioria dos metais conhecidos, a toxicidade do Ni também é dependente da via de exposição, dose, idade do organismo em contato e da solubilidade dos compostos, sendo seus efeitos incalculáveis para a saúde. Contudo, as principais formas de contaminação por níquel são pela água, alimentação, inalação, exposição industrial e cigarros (Coogan *et al.*, 1989; Das *et al.*, 2008; Cameron *et al.*, 2011). Uma forma bem comum de exposição humana é através de joias, relógio de pulso, moedas e botões metálicos, e por isso foram adotados limites para o uso desse metal na fabricação de tais objetos que estão diretamente em contato com a pele (Ali *et al.*, 1987; Rana, 2006; Brandão *et al.*, 2010).

O níquel é conhecido por causar toxicidade no fígado, pulmão, rins, testículos, sistemas imunológico e neural, além de induzir o estresse oxidativo (Das *et al.*, 2008). Estudos realizados com trabalhadores de refinaria indicam alta incidência de câncer nas vias respiratórias, induzido pela exposição a esse metal (Pedersen *et al.*, 1973). Um aspecto preocupante da toxicidade gerada pelo Ni é sua capacidade de conseguir atravessar a barreira hematotesticular e a barreira placentária, que são importantes para fertilidade masculina e o desenvolvimento adequado dos embriões, respectivamente (Adjroud, 2013).

No sistema reprodutor masculino o Ni pode atuar causando degeneração do epitélio germinativo, apoptose, redução da testosterona sérica e da fertilidade (Massanyi *et al.*, 2007; Krocková *et al.*, 2011). O sucesso reprodutivo é um fator crucial para a sobrevivência de todas as espécies (Li *et al.*, 2010). No entanto, a exposição ao níquel pode alterar o desenvolvimento normal do organismo, reduzir a aptidão e influenciar na dinâmica populacional, ao afetar a fertilização, o desenvolvimento embrionário e a subsequente sobrevivência da prole (Au *et al.*, 2001).

4.7 Sistema Reprodutor Masculino: Testículo

O sistema reprodutor masculino é responsável pela contínua produção, nutrição e armazenamento dos espermatozoides, bem como síntese e secreção de andrógenos. É constituído pelos testículos, epidídimos, ductos deferentes e ejaculatórios, uretra, glândulas acessórias e o pênis. O epidídimo é constituído por um longo ducto enovelado e contorcido, que recebe espermatozoides do túbulo através dos ductos eferentes (Sullivan, 2004), sendo dividido anatomicamente em quatro regiões principais: segmento inicial, cabeça, corpo e cauda (Herme e Robaire, 2002; Cornwall, 2009). Cada região desse órgão apresenta funções específicas, como absorção de fluidos vindos do testículo e capacitação espermática promovendo a fecundação (Robaire e Viger, 1995; Cornwall, 2009).

Os testículos geralmente se localizam no escroto, fora da cavidade abdominal, sendo um órgão com funções endócrinas e exócrinas, e são envolvidos por uma espessa cápsula (túnica) de tecido conjuntivo, a albugínea testicular. Essa túnica emite septos para o interior do órgão até a região do mediastino testicular, fazendo a divisão do testículo em lóbulos. Os testículos de mamíferos podem ser divididos funcionalmente em dois compartimentos principais: o intertubular e o tubular (Russell *et al.*, 1990). O compartimento intertubular é constituído pelas células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável constituída principalmente por fibroblastos, macrófagos e até mastócitos (Russell *et al.*, 1990; Setchell, 1991). As células de Leydig são as mais abundantes neste compartimento, tendo como função a produção de testosterona, hormônio essencial para o funcionamento da espermatogênese e expressão das características sexuais secundárias masculinas (Russell e Griswold, 1993).

A maior parte do testículo é ocupada pelo compartimento tubular, o que corresponde de 70 a 90% do parênquima testicular na maioria dos mamíferos estudados (França e Russell, 1998). Os túbulos seminíferos são constituídos por túnica própria,

epitélio seminífero e lume. A túnica própria envolve o túbulo externamente, é composta por células mioides, fibras colágenas e membrana basal, sendo responsável pela movimentação de fluido e propulsão de espermatozoides através do lume (Russell *et al.*, 1990). O epitélio seminífero contém basicamente dois tipos celulares: as células germinativas e as células de Sertoli. A célula de Sertoli é responsável pela manutenção da integridade do epitélio seminífero, secreta fluido para formar o lume, participa do processo de espermição, realiza fagocitose, permite a movimentação de células no epitélio, secreta proteínas e regula o ciclo espermatogênico através das suas junções com as demais células (Skinner e Griswold, 2005). As células de Sertoli, através das junções de oclusão, dividem o compartimento tubular em dois ambientes: o basal e o adluminal. Essa divisão isola as células haploides evitando seu contato com o sistema imune do animal (Morais *et al.*, 2016).

De acordo com França e Russell (1998), a espermatogênese é um processo complexo e muito bem organizado, responsável pela produção espermática que ocorre nos túbulos seminíferos, com duração de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos, em camundongos a espermatogênese tem duração de 42 dias. Esse processo pode ser dividido de acordo com suas funções em três fases: a fase proliferativa, na qual as células germinativas sofrem sucessivas divisões mitóticas; a fase meiótica, na qual o material genético é recombinado, segregado e cada espermatócito primário dá origem a 4 espermátides arredondadas; e a fase de diferenciação (espermição), na qual as espermátides alongadas se transformam em espermatozoides (Russell *et al.*, 1990).

A interação entre as células germinativas com os componentes somáticos do testículo é imprescindível, principalmente com as células de Sertoli e as células de Leydig. As células de Leydig são produtoras de testosterona e a espermatogênese necessita de altas concentrações desse hormônio, principalmente no processo de meiose. A atuação dos hormônios acontece via células de Sertoli, já que as células germinativas não possuem receptores para andrógenos. Essa interação torna o processo espermatogênico eficiente e bem sucedido (Skinner, 1991; França e Russell, 1998; Skinner e Griswold, 2005; França *et al.*, 2016).

4.8 Espermatozoides

Os espermatozoides são células haploides com especializações que favorecem sua função de fertilização do ovócito. Morfologicamente são compostos por cabeça e cauda, sendo ambas recobertas por membrana. Na cabeça encontram-se o núcleo contendo os cromossomos haploides em seu estado máximo de condensação e o

acrossoma, uma estrutura situada entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo, que possui enzimas bem peculiares que facilitam a fecundação. A cauda é formada por um flagelo que proporciona motilidade ao espermatozoide, sendo dividida em três peças: a intermediária, local onde existe um grande número de mitocôndrias com função de gerar energia para a movimentação espermática, a peça principal e a peça terminal (Jonge e Barratt, 2006). O axonema é uma estrutura contrátil do flagelo, formado por nove pares de microtúbulos periféricos e um par central, além de proteínas especializadas na utilização da adenosina trifosfato (ATP), produzida pelas mitocôndrias, para proporcionar a motilidade espermática. Essa estrutura tem início na peça intermediária e se mantém ao longo de toda a cauda (Jonge e Barratt, 2006; Alberts *et al.*, 2015).

Os espermatozoides são produzidos ao fim de um ciclo completo da espermatogênese, que visa manter a produção diária dessas células permitindo sua total diferenciação e eficiência na fecundação (Jonge e Barratt, 2006). Os espermatozoides saem dos testículos imóveis e incapacitados, na passagem pelo ducto epididimário eles recebem motilidade e capacidade fecundante (Shum *et al.*, 2009). O perfeito condicionamento dos espermatozoides é essencial para a fertilização, visto que é a partir das análises de motilidade, integridade, morfologia e concentração que se determina o potencial reprodutivo masculino (Verstegen *et al.*, 2002). Estudos indicam um declínio significativo na fertilidade masculina em consequência de um comprometimento progressivo da qualidade do sêmen (Carlsen *et al.*, 1992).

Segundo Menon *et al.* (2011), são classificadas diversas anormalidades morfológicas nos espermatozoides como defeito na cabeça, na peça intermediária e na cauda. A maioria das irregularidades encontradas são gotas citoplasmáticas localizadas na peça intermediária, sendo um processo normal durante a formação espermática e que desaparece caso não se encontrem defeitos na cauda. Outras alterações que também aparecem em menores proporções incluem cabeças destacadas e gota citoplasmática distal (Menon *et al.*, 2011). Existe grande variedade de causas e de agentes determinantes destas disfunções espermatogênicas. Dentre elas encontram-se os metais pesados, que são considerados os principais desencadeadores da diminuição da concentração espermática (Sengupta *et al.*, 2017).

4.9 Metais pesados no sistema reprodutor

Existe um declínio significativo na fertilidade humana mundial descrito na literatura nas últimas décadas. Os metais pesados são descritos como os principais

agentes causadores dessa diminuição (Sengupta *et al.*, 2017). Os efeitos deletérios causados à saúde reprodutiva, após exposição a esses tóxicos ambientais, tornaram-se questão de séria preocupação global. Muitos estudos com buscam elucidar os mecanismos de toxicidade dessas substâncias, a fim de desenvolver uma abordagem eficiente para mitigar seus efeitos tóxicos (Bae *et al.*, 2001; Phillips *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2014; Mruk e Cheng, 2015).

O organismo naturalmente necessita de concentrações moderadas de alguns tipos de metais essenciais, porém outros não essenciais, geralmente classificados como metais pesados, que em altas concentrações são tóxicos para o organismo, estão disponíveis no meio ambiente e em contato diário com os seres vivos (Goldhaber, 2003; Jang e Hoffman, 2011). A espermatogênese é composta por uma série de eventos com a finalidade de produzir os gametas masculinos (Jeng *et al.*, 2015; Zeng *et al.*, 2015). Há estudos indicando que a ação de metais pesados pode influenciar negativamente este processo, gerando diminuição no número de espermatozoides com morfologia normal e até mesmo danos ao DNA das células germinativas, com consequente declínio na qualidade espermática (Jeng *et al.*, 2015; Zeng *et al.*, 2015).

No sistema reprodutor masculino, a exposição a metais pesados como o arsênio, cádmio, chumbo, cromo e níquel pode gerar diminuição do peso testicular e das glândulas acessórias, alteração hormonal, redução no diâmetro tubular, degeneração nos túbulos seminíferos, apoptose e necrose nas células de Sertoli, edema e necrose em grande parte dos espermatócitos primários e secundários (Lymberopoulos *et al.*, 2003; Ait Hamadouche *et al.*, 2009). Os efeitos desses agentes tóxicos nos padrões histológicos dos órgãos reprodutivos podem gerar diversas disfunções, afetando negativamente, desde a fertilização até o desenvolvimento embrionário (Au *et al.*, 2001; Elgawish e Abdelrazek, 2014).

Existem controles biológicos nos testículos que evitam a atuação desses metais, como por exemplo a barreira de célula de Sertoli que age impedindo a migração de metais presentes na corrente sanguínea para o ápice do epitélio seminífero (Mruk e Cheng, 2015). O arsênio pode causar danos adversos no sistema reprodutor, após exposição em altas e baixas doses, como alterações espermáticas, na morfometria epididimária e no controle antioxidante, além de prejudicar diretamente a funcionalidade da barreira formada pelas células de Sertoli (Souza *et al.*, 2016; Renu *et al.*, 2018). O cádmio pode atuar como desregulador endócrino, induzir estresse oxidativo, apoptose, danos morfológicos e funcionais nos espermatozoides e nos

testículos (Angelis *et al.*, 2017; Cupertino *et al.*, 2017B; Medina *et al.*, 2017; Nan *et al.*, 2017).

A exposição crônica e aguda ao chumbo pode originar alterações estruturais nas junções intercelulares de células epiteliais (Navarro-Moreno *et al.*, 2009), além de alterar os padrões histológicos dos testículos, interferir quantitativa e qualitativamente nos espermatozoides, diminuir a concentração de hormônios essenciais para a espermatogênese e causar alterações citológicas (Carlsen *et al.*, 1992; Elgawish e Abdelrazek, 2014; Assi *et al.*, 2016). A exposição ao cromo VI provoca estresse oxidativo e fragmentação do DNA em células germinativas resultando em apoptose (Marouani *et al.*, 2017). O níquel pode causar, nos órgãos reprodutores, a redução da motilidade espermática, dos níveis de FSH e testosterona, além de patologias como desprendimento das células epiteliais do túbulo seminífero, arranjo celular desordenado e apoptose (Kong *et al.*, 2014; Aijie *et al.*, 2018;).

4.10 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (ERO ou ERN) excedem a capacidade de defesa antioxidante celular que atua na remoção desses tóxicos em excesso no organismo (Schieber e Chandel, 2014). A menos que sejam desintoxicadas, as EROs como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-) e hidroxila (OH^\cdot), podem atacar macromoléculas celulares incluindo DNA, proteínas e lipídios, gerando uma série de patologias (Sharma *et al.*, 2014). Essas EROs são geradas durante processos como transporte de elétrons mitocondriais, irradiação UV, inflamação e metabolismo de xenobióticos pelo sistema CYP450 (Sharma *et al.*, 2014). No entanto, esses radicais livres em níveis controlados também podem atuar como moléculas sinalizadoras fazendo a manutenção das funções fisiológicas, um processo chamado reação redox (Persson *et al.*, 2014; Schieber e Chandel, 2014).

Os radicais livres são moléculas altamente reativas com oxigênio (O_2) e nitrogênio, gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do oxigênio. Em situações não-fisiológicas, são gerados pela exposição a xenobióticos, como os metais pesados, ocasionando a redução incompleta do O_2 (Godic *et al.*, 2014). No organismo existe um sistema de proteção antioxidante muito eficiente, onde enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) trabalham em conjunto para devolver o controle intracelular,

minimizando os efeitos deletérios para a célula (Sies, 1997; Navarro-Yepes et al., 2014;).

A SOD catalisa a remoção do radical superóxido (O_2^-) gerando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como produto final da dismutação e a CAT converte o H_2O_2 , gerado pela SOD, em água e oxigênio. A GST atua como segunda linha de defesa, sendo responsável pela detoxificação celular, através da redução da glutatona (GSH) pela conjugação a xenobióticos, como os metais pesados e metabólitos (Lauterburg *et al.*, 1984; Deneke e Fanburg, 1989; Halliwell e Gutteridge, 1999; Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009). A oxidação lipídica gera produtos como o malondialdeído (MDA), que é um importante marcador de estresse oxidativo e sua determinação é necessária para a quantificação da peroxidação lipídica no tecido (Janero, 1990). O óxido nítrico (NO) é uma molécula importante para a realização de diversos eventos fisiológicos. Nos testículos sua função é essencial, pois atua no controle da dinâmica dos complexos juncionais da barreira de célula de Sertoli (Gilio *et al.*, 2008).

Há indicações que a exposição a metais pesados gera espécies reativas de oxigênio, diminui a atividade das enzimas antioxidantes e aumenta a peroxidação lipídica, causando estresse oxidativo nos testículos de animais experimentais (Reddy *et al.*, 2011; Fallahi *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2018). O estresse oxidativo no sistema reprodutor masculino pode desencadear diversas disfunções que causam infertilidade (Reddy *et al.*, 2011). Nos espermatozoides, concentrações desejáveis dessas espécies reativas são necessárias para a capacitação, motilidade e fertilidade. No entanto, em altas concentrações gera perda da motilidade e disfunção das organelas (Fallahi *et al.*, 2015).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados 70 camundongos Swiss machos em idade reprodutiva (70 dias), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral (DBG), sob as mesmas condições quanto à dieta (água e ração *ad libitum*), luminosidade (12h/12h – claro/escuro), umidade (60-70%) e temperatura (21-22°C). Todos os procedimentos experimentais seguiram os padrões determinados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal

de Viçosa (protocolo 07/2018). Os animais permaneceram em período de adaptação no Biotério Setorial por duas semanas. Para definir o tamanho da amostra foi utilizado o programa WinPepi com nível de significância de 5% e um grau de certeza de 10%, conferindo ao teste um poder de 90%.

5.2 Tratamento

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 7 grupos experimentais (n=10 animais/grupo), pesados e mantidos em gaiolas coletivas de prolipropileno. A dosagem escolhida foi baseada em relatos na literatura por intoxicação com metais pesados (Adhikari *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2016; Cupertino *et al.*, 2017A), sendo o mesmo valor usado para todos os metais, uma vez que se objetivou comparar a toxicidade entre eles. A administração foi realizada em dose única, por via intraperitoneal (IP), e os animais foram eutanasiados sete dias após a aplicação. Assim, o grupo 1 recebeu 0,7mL de solução salina 0,9% (controle), o grupo 2 recebeu 1,5 mg/Kg de $\text{HAsNa}_2\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (arsenato de sódio dibásico Heptahidratado), o grupo 3 recebeu 1,5 mg/Kg de AsNaO_2 (arsenito de sódio), o grupo 4 recebeu 1,5 mg/Kg de CdCl_2 (cloreto de cádmio), o grupo 5 recebeu 1,5 mg/Kg de $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (acetato de chumbo Neutro P.A. Trihidratado), o grupo 6 recebeu 1,5 mg/Kg de CrO_3 (trióxido de cromo VI) e o grupo 7 recebeu 1,5 mg/Kg de $\text{Cl}_2\text{Ni} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (cloreto de níquel (II) hexahidratado). Todos os metais foram diluídos em um volume de 0,7mL de água.

O intervalo de 7 dias foi escolhido para observar alterações por exposição aguda, antes que um possível processo de recuperação pudesse alterar o grau de dano causado pelos metais (Predes *et al.*, 2010).

5.3 Coleta de amostras, biometria corporal e dos órgãos

Ao final do tratamento os animais foram anestesiados com tiopental 30mg/kg por via intraperitoneal e pesados em balança de precisão 0,01g (AS500, Marte). Posteriormente a anestesia foi aprofundada seguida da coleta do sangue por meio de punção cardíaca sendo os animais eutanasiados por exsanguinação. O sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos a 4°C para obtenção do soro, o qual foi armazenado em eppendorf e congelado a -20°C para análise da testosterona sérica. Em seguida, foi feita a abertura da cavidade abdominal a partir de incisão na linha alba para dissecação e obtenção dos órgãos. Os testículos foram devidamente coletados, pesados e dissecados, sendo o testículo direito destinado ao processamento histológico e digestão, para a quantificação

do metal no órgão, e o testículo esquerdo congelado para a análise de estresse oxidativo e trânsito. Foram também coletados e pesados outros órgãos como o epidídimo, próstata ventral e vesícula seminal para análises histomorfométricas posteriores. O peso relativo dos órgãos foi calculado a partir da divisão do peso do órgão (PO) pelo peso corporal (PC) e multiplicado por 100 ($PO / PC \times 100$).

Para determinar o peso do parênquima testicular, a albugínea foi retirada do testículo fixado e pesada, descontando-se seu peso daquele obtido para o testículo inteiro. Baseado nos pesos corporal e testicular foi calculado o índice gonadossomático (IGS) a partir da equação: $IGS (\%) = PG / PC \times 100$, onde PG = Peso total das gônadas e PC = Peso corporal. Baseado nos pesos do parênquima testicular e corporal foi calculado o índice parenquimossomático (IPS) a partir da equação: $IPS (\%) = PPT / PC \times 100$, onde PPT = Peso do parênquima dos testículos e PC = Peso corporal.

5.4 Processamento do material histológico

Fragmentos do testículo destinado ao estudo em microscopia de luz foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica), seccionados em micrótomo rotativo na espessura de 3µm mantendo-se um intervalo de 13 cortes entre secções, e corados com azul de toluidina-borato de sódio 1%. As preparações foram montadas com Entellan® (Merck, Frankfurt, Alemanha). Imagens histológicas do parênquima foram obtidas em microscópio Olympus AX-70 e analisadas utilizando-se o software Image J.

5.5 Histomorfometria testicular

5.5.1 Proporção volumétrica, volume dos componentes testiculares e índices tubulossomático, epiteliossomático e Leydigossomático.

A proporção volumétrica dos elementos que compõem o parênquima testicular foi estimada a partir da contagem de 5.320 pontos por animal, utilizando-se retículo com 266 intersecções (pontos), em aumento de 400x. Foi realizada a contagem de 20 campos aleatoriamente distribuídos nas preparações histológicas do testículo de cada animal. Foram anotados pontos sobre as estruturas do parênquima testicular como túbulo seminífero, especificando-se aqueles sobre a túnica própria, epitélio seminífero e lume, e sobre o compartimento intertubular. A proporção volumétrica desses componentes foi calculada utilizando-se a seguinte equação: $Proporção\ volumétrica (\%)$

= $(NT / NTT) \times 100$, onde NT = Registro do número de pontos contados sobre o componente e NTT = Número de pontos totais contados sobre o parênquima testicular.

A proporção volumétrica entre os elementos que compõem o intertúbulo foi estimada a partir da contagem de 1.000 pontos por animal, utilizando-se retículo com 540 intersecções (pontos), em aumento de 400X, realizando-se a contagem de campos aleatoriamente distribuídos nas preparações histológicas do testículo de cada animal. Foram contados pontos sobre as células de Leydig, tanto núcleo como citoplasma, vasos sanguíneos, espaço linfático, macrófago e tecido conjuntivo, obtendo-se as proporções volumétricas entre estes por meio da equação: $\text{Proporção volumétrica (\%)} = (\%IT \times \%PVI) / 100$, onde %IT = Proporção volumétrica de intertúbulo no testículo e %PVI = Proporção volumétrica do componente no intertúbulo.

Para o cálculo dos volumes dos elementos que compõem o túbulo e intertúbulo foi utilizada a equação: $\text{Volume} = \% \text{ do elemento} \times \text{PPT} / 100$, onde PPT = Peso do parênquima de 2 testículos.

Baseado no volume de túbulos seminíferos e no peso corporal foi calculado o índice tubulossomático (ITS) a partir da equação: $\text{ITS} = \text{VTS} / \text{PC} \times 100$, onde VTS = Volume de túbulo seminífero dos testículos e PC = Peso corporal. Baseado no volume de epitélio seminífero e no peso corporal foi calculado o índice epiteliossomático (IES) a partir da equação: $\text{IES} = \text{VES} / \text{PC} \times 100$, onde VES = Volume de epitélio seminífero dos testículos e PC = Peso corporal. Baseado no volume de células de Leydig e no peso corporal foi calculado o índice Leydigossomático a partir da equação: $\text{ILS} = (\text{VCL} / \text{PC}) \times 100$, onde VCL = Volume de células de Leydig nos testículos e PC = Peso corporal. O volume do testículo foi considerado igual ao peso uma vez que a densidade testicular está próxima de 1 em mamíferos (Johnson *et al.*, 1981).

5.5.2 *Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e áreas de elementos tubulares*

O diâmetro tubular médio (μm) por animal foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 20 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno mais circular possível, sem considerar o estágio em que se encontravam. Nas mesmas secções utilizadas para medir o diâmetro tubular foi mensurada a altura do epitélio seminífero (μm) a partir da túnica própria até o lume tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio, em cada túbulo, representou a média de duas medidas diametralmente opostas.

Para os cálculos das áreas tubular (ArT), luminal (ArL) e epitelial (ArE) foram utilizadas as seguintes equações: $ArT = \pi.RT^2$, onde RT = raio tubular; $ArL = \pi.RL^2$, onde RL = raio luminal; $ArE = ArT - ArL$ e a Relação T/E = ArT/ArE .

5.5.3 Comprimento total dos túbulos seminíferos e comprimento total de túbulo por grama de testículo

O comprimento total dos túbulos seminíferos, em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos mesmos nos testículos e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal, empregando-se a seguinte equação: $CTT = VTS/\pi R^2$, onde VTS = Volume total de túbulos seminíferos dos testículos, πR^2 = Área da secção transversal dos túbulos seminíferos e R = diâmetro tubular/2.

O comprimento total de túbulo por grama de testículo foi calculado a partir da equação: $CTT/g = CTT / PG$, onde CTT = Comprimento total de túbulos seminíferos e PG= Peso das gônadas.

5.5.4 Contagem da população celular de túbulos no estágio I do ciclo do epitélio seminífero

A estimativa dos diferentes tipos celulares que compõem o epitélio germinativo no estágio I do ciclo do epitélio seminífero, classificado de acordo com o método da morfologia tubular (Roosen-Runge e Giesel, 1950; Roosen-Runge, 1955; Swierstra, 1968; Berndtson, 1977), foi feita a partir da contagem dos núcleos das células germinativas e de nucléolos das células de Sertoli. Foram contados núcleos de espermatogônias, espermatócitos I na fase de preleptóteno/leptóteno, espermatócitos I na fase de paquíteno, espermátides arredondadas e nucléolos evidentes de células de Sertoli em 20 secções transversais de túbulos para cada animal.

As contagens obtidas foram corrigidas para o diâmetro nuclear (DM) na espessura do corte histológico, utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946) modificada por Amann e Almquist (1962), sendo NCEI= número corrigido de células do estágio 1:

$$NCEI = \text{Contagem obtida} \times \frac{\text{Espessura do Corte}}{\text{Espessura do Corte} + \sqrt{\left[\frac{DM}{2}\right]^2 - \left[\frac{DM}{4}\right]^2}}$$

Foram medidos os diâmetros de 30 núcleos dos tipos celulares estudados, para cada animal, em aumento de 400x. Para a espermatogônia que apresenta núcleo ovoide, o valor utilizado foi aquele obtido pela média entre o diâmetro nuclear maior e menor.

Como o núcleo da célula de Sertoli é irregular, foi medido o seu nucléolo. O número de células de Sertoli foi corrigido para o diâmetro nucleolar e espessura do corte histológico. Assim, contabilizou-se exclusivamente células de Sertoli com nucléolo visível, o que proporciona aplicação da mesma fórmula citada anteriormente.

5.5.5 *Razões entre os números celulares*

Para a avaliação da eficiência do processo espermatogênico e das células de Sertoli, 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 estágio I do ciclo do epitélio seminífero. As seguintes razões foram utilizadas:

- ▶ Espermatócitos primários (em preleptóteno/leptóteno) / espermatogônias, obtendo-se o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais;
- ▶ Espermátides arredondadas / espermatogônias, obtendo-se o rendimento geral da espermatogênese;
- ▶ Espermátides arredondadas / espermatócitos 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.

5.5.6 *Número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo*

A estimativa do número de células de Sertoli por testículo (CST) foi realizada a partir do número corrigido de nucléolos de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio I e do comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, de acordo com a equação: $CST = (CTT/T \times SER) / EC$, onde CTT/T = Comprimento total de túbulo por testículo, SER = Número corrigido de nucléolos de Sertoli por secção transversal e EC = Espessura do corte. O número de células de Sertoli por grama de testículo (CS/gT) foi calculado a partir da equação: $CST/gT = CST / PT$, onde PT = Peso testicular.

5.5.7 *Produção espermática diária por testículo e por grama de testículo*

A produção espermática diária (PED) por testículo foi estimada de acordo com a equação desenvolvida por Amann (1970): $PED = (VTS \times EAR) / (DC \times AST \times EC)$, onde: VTS = Volume total de túbulos seminíferos (μm^3), EAR = Número corrigido de

espermátides arredondadas, DC = Duração do ciclo do epitélio seminífero (dias), AST = Área da secção transversal do túbulo seminífero (μm^2) e EC = Espessura do corte histológico (μm). A produção espermática diária por grama de testículo (PED/g) foi obtida a partir da fórmula: $\text{PED/gT} = \text{PED} / \text{PT}$, onde PT = peso testicular. A duração do ciclo do epitélio seminífero em camundongos é de nove dias (Russell *et al.*, 1990), sendo uma constante biológica espécie-específica.

5.5.8 *Diâmetro nuclear, volume nuclear, citoplasmático e de uma célula de Leydig e número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo*

Foi medido o diâmetro nuclear médio (μm) das células de Leydig em aumento de 400x, totalizando 30 núcleos para cada animal. Os núcleos medidos foram aqueles que se apresentaram esféricos, com cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. A partir das fórmulas abaixo, foram calculados o volume nuclear (VNL), citoplasmático (VCL) e, conseqüentemente, o volume de cada célula de Leydig (VL), em μm^3 : $\text{VNL} = 4/3 \pi R^3$, onde R = Raio nuclear; $\text{VCL} = \% \text{CL} \times \text{VNL} / \% \text{NL}$, onde %CL = Proporção volumétrica de citoplasma de Leydig no intertúbulo e %NL = Proporção volumétrica de núcleo de Leydig no intertúbulo; $\text{VL} = \text{VNL} + \text{VCL}$.

O volume que a célula de Leydig ocupa nos testículos (VLT), em μL , foi calculado a partir da fórmula: $\text{VLT} = (\% \text{Ley} \times \text{PPT}) / 100$, onde % Ley = Proporção volumétrica da célula de Leydig no parênquima testicular e PPT= Peso do parênquima dos testículos. O volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo (VL/gT), em μL , foi calculado a partir da fórmula: $\text{VL/gT} = \text{VLT} / \text{PT}$, onde VLT = Volume que a célula de Leydig ocupa nos testículos, e PT= peso dos testículos.

De posse do volume individual da célula de Leydig e do volume total ocupado por estas células nos testículos, foram calculados o número de células de Leydig nos testículos (NL) e por grama de testículo (NLg/T), por meio da seguinte equação: $\text{NL} = \text{VLT} / \text{VL}$, onde: VLT = Volume de Leydig nos testículos e VL = Volume de uma célula de Leydig; $\text{NLg/T} = \text{NL} / \text{PT}$, onde PT = Peso dos testículos.

5.6 Determinação da concentração de testosterona plasmática

No momento da eutanásia o sangue foi coletado e centrifugado, o plasma obtido foi congelado (-20 °C) e posteriormente processado para quantificação da testosterona total. A quantificação da testosterona sérica foi determinada por ensaio de quimioluminescência usando o kit de reagente de testosterona do Access, adequado para o Sistema de Imunoensaio Access III (Beckman Coulter, Brea, CA).

5.7 Determinação da concentração de metais pesados nos testículos

Amostras do testículo direito foram pesadas em balança digital analítica (precisão 0.0001g – BEL Mark 210A) e, posteriormente, secas em estufa a 70°C até atingirem peso seco constante. As amostras secas foram colocadas em Erlenmeyers de 25 mL juntamente com 1,5 mL de ácido nítrico (HNO₃) concentrado e 0,5 mL de ácido perclórico (HClO₄) (70%) e transferidas para chapa aquecedora. A temperatura foi aumentada gradualmente até 90°C de modo que a digestão do material fosse completa. A seguir, as amostras foram diluídas em água deionizada e filtradas em papel de filtro. A determinação das concentrações dos metais pesados arsênio, cádmio, chumbo, cromo e níquel foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica (SpectrAA 220FS Varian). Todas as amostras foram testadas para cada tipo de metal, incluindo controle e branco. Os dados foram expressos em mg/g de massa seca (MS).

5.8 Histopatologia testicular

Para a avaliação histopatológica do testículo foram contados 200 túbulos aleatórios por animal. De acordo com Johnsen (1970), existem 10 níveis de alterações que são expressos em números. No presente trabalho foi utilizado o escore de Johnsen modificado para 8 níveis: Nível 1- túbulos íntegros, com células germinativas dispostas no seu sítio de localização normal e poucos vacúolos; Nível 2- espaços vacuolares na base do epitélio; Nível 3- espaços vacuolares no ápice do epitélio; Nível 4- espaços vacuolares na base e no ápice do epitélio; Nível 5- células espermatogênicas no interior do lume e presença de células em processo de degeneração visível ; Nível 6- túbulos apenas com células basais; Nível 7- túbulos apenas com células de Sertoli; Nível 8- túbulos seminíferos desprovidos de células de Sertoli ou germinativas, caracterizando um estado irreversível de degeneração. Estes níveis foram agrupados em normal (nível 1), patologias leves (Níveis 2 e 3), moderadas (Níveis 4 e 5) e severas (Níveis 6, 7 e 8).

5.9 Viabilidade celular

Secções testiculares semisseriadas de 1 µm foram obtidas em micrótomo rotativo (RM 2255, Leica Biosystems, Nussloch, Germany) para avaliação da viabilidade celular utilizando os marcadores laranja de acridina e iodeto de propídio. As lâminas foram imersas em banho de ácido acético 1% por 3 minutos, seguido de água destilada por 1 minuto, marcadas com a solução de 0,02 % de laranja de acridina e 1% de iodeto de

propídio em tampão fosfato por 1 minuto. Posteriormente as lâminas foram lavadas com tampão fosfato por 3 minutos e em seguida imersas em solução de cloreto de cálcio 0,1 M por 1 minuto e novamente em tampão fosfato. As lâminas foram montadas com glicerina e observadas em microscópio de fluorescência EVOS fl (Life Technologies). Células viáveis foram marcadas em verde pelo laranja de acridina, observadas com o filtro GFP, células em processo de morte celular foram marcadas em vermelho e células com danos iniciais no DNA foram marcadas em amarelo pelo iodeto de propídio, observadas com o filtro RFP (Perl e Little, 1980).

5.10 Avaliação do estresse oxidativo

O testículo foi homogeneizado em tampão fosfato (pH 7,4), na proporção de 100 mg de órgão para 1000 μ L. A suspensão foi centrifugada (12000 rpm a 4°C por 10 minutos) e o sobrenadante foi utilizado nas análises de determinação da atividade de enzimas antioxidantes, concentração de óxido nítrico, malondialdeído e proteína total.

5.10.1 Quantificação das enzimas antioxidantes

A atividade enzimática da Catalase (CAT) foi mensurada segundo Aebi *et al.* (1984) pela taxa de queda da absorbância em 60 segundos do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (10 mM) em tampão fosfato de potássio 0,2 M (pH 7,0) e homogenato de tecido em espectrofotômetro ($\lambda = 240\text{nm}$). Foi utilizado o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio e $240 = 36 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ e os resultados foram expressos em U CAT/mg proteína.

A atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) foi determinada em leitor de Elisa em 570 nm baseada na capacidade dessa enzima em catalisar a reação do superóxido O₂⁻ e H₂O₂ e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol (Dieterich *et al.*, 2000). Os resultados foram expressos em U SOD/mg proteína.

A atividade enzimática da Glutathione S-Transferase (GST) foi mensurada de acordo com Habig *et al.* (1974), através da formação do conjugado glutathione-2, 4-dinitrobenzeno (CDNB). A atividade da enzima foi estimada em uma mistura contendo CDNB 1 mM em etanol, Glutathione Redutase (GSH) 1 mM, fosfato de potássio (pH 7,0) 100 mM e homogenato de tecido pelo aumento da absorbância ($\lambda = 340 \text{ nm}$) por 90 segundos. O coeficiente de extinção molar do CDNB e $340 = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi utilizado para os cálculos e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/min/g}$.

5.10.2 *Determinação do produto de estresse oxidativo – Malondialdeído (MDA)*

Ao homogenato foi adicionado solução TBARS (ácido tricloroacético 15%, 0,375% de ácido tiobarbitúrico e ácido clorídrico 0,25 M), pois as substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico são, em sua maioria, produtos da peroxidação lipídica, sendo o MDA importante marcador para monitorar a taxa de lipoperoxidação. Posteriormente foi aquecido em água fervente por 40 minutos a 90°C, resfriado, adicionado álcool butílico (600mL), agitado em vortex e centrifugado a 6000 rpm. A fase superior foi utilizada para quantificar a concentração de MDA em leitor de microplacas ($\lambda = 532\text{nm}$). A concentração de MDA foi determinada por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1, 1, 3,3-tetramethoxypropane (TMPO). Os resultados foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína (Buege e Aust, 1978).

5.10.3 *Oxido nítrico (ON)*

O nitrito usado como indicador da síntese de óxido nítrico é detectado pelo Reativo de Griess, composto por 1% de sulfanilamida e 0,1% naftil-etileno-diamina em ácido fosfórico (H_3PO_4) a 2,5%. Desta forma, 50 μL do sobrenadante das amostras foi adicionado em microplacas com igual volume do Reativo de Griess e incubado em temperatura ambiente por 15 minutos, e em seguida foi realizada a leitura em leitor de microplacas ($\lambda = 540 \text{ nm}$). A concentração do óxido nítrico das amostras foi determinada utilizando curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio e expressa em μM (Droge, 2002; Ricart-Jané *et al.*, 2002).

5.10.4 *Proteína total*

A proteína total dos sobrenadantes de SOD, CAT e MDA foi mensurada (Lowry *et al.*, 1951) utilizando-se albumina de soro bovino como padrão, e foi utilizada para a homogeneização dos dados do estresse oxidativo.

5.11 Avaliação espermática

A cauda do epidídimo esquerdo foi seccionada várias vezes em placa de Petri com auxílio de lâmina de inox para se obter o fluido rico em espermatozoides. Este fluido foi diluído em 500 μL de diluidor Tris-citrato-frutose a 37°C, sendo retiradas alíquotas para análises de motilidade e morfologia espermáticas e avaliação da integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal.

5.11.1 *Motilidade*

A motilidade espermática foi analisada em microscópio de campo claro em aumento de 400X. Os espermatozoides foram classificados como móveis ou imóveis e a motilidade total foi expressa em porcentagem.

5.11.2 *Morfologia espermática*

Uma alíquota de 50 µL do fluido foi fixada em 100 µL de paraformaldeído 4% com tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 7,4, sendo mantido refrigerado a -20°C. Foram analisados 100 espermatozoides em preparação úmida utilizando microscópio de contraste de fase em aumento de 400X (Bioval L-1000B, Brasil). A morfologia foi classificada quanto a defeitos de cabeça (núcleo e acrossoma), peça intermediária (quebrada, fracamente dobrada e fortemente dobrada) e peça principal (fracamente enrolada e fortemente enrolada), além de ausência ou presença de gota citoplasmática. Os resultados foram expressos em porcentagem.

5.11.3 *Integridade estrutural das membranas espermáticas*

A integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal dos espermatozoides foi avaliada pela técnica de fluorescência utilizando-se dois fluorocromos: o diacetato de carboxifluoresceína (DACF) e o iodeto de propídio (IP), segundo o protocolo proposto por Harrison e Vickers (1990) e modificado por Zúccari (1998). Os espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência (Olympus AX 70 TRF, Tokyo, Japan) em aumento de 400x. Foram avaliados 200 espermatozoides por animal considerando-se três categorias: íntegros (membrana plasmática e acrossomal íntegras; DACT+/IP-), lesados (membrana plasmática e acrossomal lesadas; DACT-/IP+) e semilesados (membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal lesada; DACT+/IP+). O resultado foi expresso em porcentagem.

5.11.4 *Produção diária de espermatozoides, número de espermatozoides e tempo de trânsito epididimário*

As espermátides testiculares resistentes à homogeneização (estágio 19 da espermatogênese) e o espermatozoide da cabeça /corpo e da cauda do epidídimo foram contados como descrito por Robb *et al.* (1978) e modificado por Fernandes *et al.* (2007). Para isto o testículo congelado foi descapsulado, pesado e homogeneizado em 5 mL de NaCl 0,9% (Triton X-100 0,05%) por 3 minutos. Em seguida foi diluído 5 vezes (1:5) na mesma solução e transferido para a câmara de Neubauer, onde foi contabilizado o número de espermátides resistentes à homogeneização.

Para determinar a produção espermiática diária de espermatozoides, o número de espermátides por testículo foi dividido por 4,84, que é o número de dias em que as espermátides maduras estão presentes no epitélio seminífero de camundongos (Robb *et al.*, 1978, Fernandes *et al.*, 2007). Da mesma forma, a cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram utilizados, sendo que 200 mg de tecido da cabeça/corpo e 100 mg de cauda foram homogeneizados em 1 mL de solução NaCl 0,9% (Triton X-100 0,05%) por 3 minutos. Em seguida, o homogenato da cabeça/corpo foi diluído 2 vezes (1:2), enquanto o da cauda foi diluído 1 vez (1:1). Para o cálculo do tempo de trânsito em cada região epididimária, em dias, o número total de espermatozoide de cada segmento foi dividido pela produção espermiática diária (Robb *et al.*, 1978; Fernandes *et al.*, 2007).

5.12 Análises estatísticas

Os parâmetros foram submetidos à avaliação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, foi feita análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls (SNK). Foi utilizado o software STATISTICA, sendo o nível de significância considerado de $p \leq 0,05$. Todos os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão.

6. RESULTADOS

6.1 Biometria corporal e dos órgãos que compõem o sistema reprodutor masculino

Os parâmetros biométricos analisados encontram-se na Figura 1 e nas Tabelas 1 e 2. Não foram observadas diferenças nos parâmetros biométricos corporal e testicular, como peso corporal (PC), peso testicular (PT), peso da albugínea (PA) e o peso do parênquima (PP) dos grupos tratados em relação ao controle (Tabela 1). A biometria dos órgãos testosterona dependentes, como peso do epidídimo, da próstata ventral e da vesícula seminal, em todos os grupos experimentais, não sofreram alterações em relação ao grupo controle (Tabela 2).

6.2 Histomorfometria testicular

Os elementos observados na análise da microestrutura testicular como lume (L), epitélio (Ep) e intertúbulo (I) permaneceram íntegros em todos os grupos experimentais (Figura 1).

Os parâmetros morfométricos testiculares não apresentaram variações significativas nos grupos experimentais quando comparados ao grupo controle (Tabela 3).

O percentual e volume dos componentes tubulares estão dispostos na Tabela 4. Os percentuais de túbulo seminífero e de lume não apresentaram quaisquer modificações significativas nos grupos tratados em relação ao controle. O percentual de epitélio seminífero, percentual e volume de túnica própria, aumentaram nos grupos tratados com cádmio, chumbo, cromo VI e níquel quando comparados ao controle.

O percentual dos índices gonadossomático (IGS), parenquimossomático (IPS), tubulossomático (ITS) e epiteliossomático (IES) estão representados na Figura 2. Não foram observadas alterações significativas em relação ao grupo controle.

6.3 Contagem de células do estágio I

Os dados referentes às análises feitas nos túbulos seminíferos no estágio I estão representados na Tabela 5. O número corrigido das células germinativas do ciclo do epitélio seminífero, os índices espermáticos, o número de células de Sertoli e a produção espermática diária permaneceram inalterados em todos os grupos experimentais em relação ao grupo controle.

6.4 Histomorfometria intertubular

Os percentuais e volumetria dos componentes intertubulares estão descritos nas Tabelas 6 e 7. Não houve alterações significativas referentes ao percentual e volume dos componentes analisados entre os grupos controle e tratados.

Os parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig estão representados na Tabela 8. Os animais tratados com arsenato e cádmio não sofreram alterações significativas nesses parâmetros quando comparados ao grupo controle. Nos grupos tratados com chumbo, cromo VI e níquel observou-se aumento no diâmetro nuclear de Leydig e no volume do núcleo de Leydig em relação ao controle. Por outro lado, o grupo tratado com arsenito apresentou redução do diâmetro nuclear de Leydig, volume do núcleo de Leydig, volume de citoplasma de Leydig e no volume da célula de Leydig em relação ao grupo controle. A administração deste mesmo metal promoveu aumento do número de células de Leydig no testículo e por grama de testículo em relação ao controle, apesar de não ter havido alterações na volumetria destas células nos testículos. O índice Leydigossomático não apresentou variações significativas nos grupos experimentais em relação ao grupo controle.

6.5 Testosterona

Os dados referentes às análises de testosterona plasmática estão ilustrados na Figura 3. Houve aumento significativo na concentração plasmática de testosterona nos animais tratados com cromo VI em relação ao grupo controle.

6.6 Histopatologia

Os dados obtidos pela análise histopatológica estão representados na Figura 4. Foi observado aumento significativo de patologias leves, como vacúolos nos ambientes, basal e adluminal dos túbulos seminíferos, nos grupos que receberam cádmio, chumbo e níquel (Figura 4A). As patologias encontradas estão ilustradas na Figura 4B.

6.7 Viabilidade celular

Os animais tratados com cádmio e níquel apresentaram dano inicial nas células do epitélio germinativo (Figura 5). Apenas os animais tratados com cádmio tiveram presença de células mortas, os demais grupos não sofreram alterações significativas (Figura 5).

6.8 Concentração de metais pesados nos testículos

Nenhum dos metais testados foram encontrados em concentrações significativas nos testículos. A análise de bioacúmulo do Pb não foi realizada.

6.9 Estresse oxidativo

Os dados referentes ao estresse oxidativo encontram-se na Figura 6. A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) aumentou no grupo tratado com arsenato em relação ao grupo controle. A atividade da enzima catalase (CAT) não sofreu alteração significativa nos grupos experimentais em relação ao controle. A Glutathione-S-Transferase (GST) sofreu redução nos animais tratados com arsenito, cádmio, chumbo, cromo VI e níquel em relação ao controle. O malondialdeído (MDA) sofreu redução em todos os grupos experimentais. O óxido nítrico (ON) não apresentou alterações significativas quando comparados ao controle.

6.10 Motilidade e morfologia espermática

Os dados referentes a motilidade e morfologia espermática estão descritos na Tabela 9. Os animais que receberam níquel tiveram redução significativa na motilidade espermática quando comparados ao controle (Tabela 9). Foi observada redução do percentual de espermatozoides com morfologia normal e consequente aumento no percentual de espermatozoides com morfologia anormal nos animais tratados com Cr VI e Ni em relação ao grupo controle. Os animais tratados com cádmio exibiram aumento do percentual de espermatozoides com morfologia anormal, quando comparados ao controle, porém mantiveram o percentual de espermatozoides com morfologia normal dentro do padrão.

6.11 Integridade de membrana espermática

A integridade da membrana espermática reduziu em todos os grupos experimentais em relação ao controle (Figura 7). O grupo tratado com Cr VI também apresentou aumento significativo do percentual de espermatozoides com membrana lesada (Figura 7).

6.12 Contagem das espermátides arredondadas no testículo e de espermatozoides na cabeça, corpo e cauda do epidídimo

Os dados referentes à contagem espermática no testículo e epidídimo estão descritos na Tabela 10. O número de espermátides alongadas no testículo e por grama de testículo, bem como a produção espermática diária por testículo e por grama de testículo, diminuíram em todos os grupos experimentais em relação ao controle (Tabela 10). Em consequência, houve redução no número de espermatozoides na cabeça/corpo e cauda do epidídimo, em todos os grupos, e no número de espermatozoides na cabeça/corpo por grama de epidídimo nos animais que receberam Cd, Pb, Cr VI e Ni. O tempo de trânsito na cabeça/corpo do epidídimo apresentou aumento significativo em todos os grupos tratados, sendo que na cauda o aumento desse tempo ocorreu apenas nos animais tratados com Cr VI e Ni comparados ao controle.

7. DISCUSSÕES

Neste estudo foram apresentadas pela primeira vez a toxicidade dos metais pesados arsenato (As^{+5}), arsenito (As^{+3}), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo VI (Cr VI) e níquel (Ni) de forma comparativa, nos testículos de camundongos Swiss após exposição aguda, por via intraperitoneal (IP). Observaram-se alterações em parâmetros tubulares, intertubulares, hormonais e espermáticos. Verificou-se também redução do número de espermátides nos testículos e redução da produção de espermatozoides em todos os grupos, além de um aumento do tempo de trânsito nos animais intoxicados por As^{+5} , As^{+3} , Pb, Cr VI e Ni, podendo acarretar alterações funcionais.

Os dados biométricos, corporal e testicular, de peso absoluto e relativo do epidídimo, próstata ventral e vesícula seminal não sofreram mudanças pelo tratamento nos grupos experimentais, mantendo assim a maioria dos índices testiculares. Tais resultados mostram que o tempo de exposição foi insuficiente para gerar grandes alterações nos órgãos, visto que os principais efeitos negativos foram em células já diferenciadas ou em final de diferenciação. A análise do peso corporal fornece informações importantes sobre a toxicidade geral de um composto e possíveis implicações para a saúde (Fernandez *et al.*, 2008). O peso testicular ou o tamanho do testículo podem ser utilizados como indicadores da produção espermática, uma vez que o principal componente testicular é o túbulo seminífero (França e Russell, 1998). Resultados similares aos deste estudo também foram observados por Lima *et al.* (2018) com arsênio inorgânico, assim como nos trabalhos realizados com acetato de chumbo (Marchlewicz *et al.*, 2004; Allouche *et al.*, 2009; El-Sayed e El-Neweshy, 2010), cromo VI (Chandra *et al.*, 2010) e níquel (Massanyi *et al.*, 2007).

A organização tecidual testicular manteve-se íntegra, não havendo alterações notáveis nos parâmetros morfométricos tubulares, assim como no comprimento total de túbulos seminíferos, na área e na relação túbulo/epitélio. O comprimento de túbulos seminíferos, por testículo e por grama de testículo em todos os grupos experimentais, permaneceu dentro da média descrita para os mamíferos (França e Russell, 1998). O tempo de exposição e a concentração do metal podem ter grande influência no surgimento de alterações nesses parâmetros, dado que ratos tratados com Cd (50 mg/kg) em 15, 30 e 60 dias, tiveram diminuição do diâmetro de túbulo (DT) e altura de epitélio (AE) à medida que o tratamento aumentava sua duração (Abarikwu *et al.*, 2018). Do mesmo modo, Chandra *et al.* (2010) relataram que animais expostos a concentrações menores ao Cr VI, porém em período maior, apresentaram diminuição no DT. Em contrapartida, Massanyi *et al.* (2007) observaram que animais expostos a maiores

concentrações de Ni em menor tempo de exposição, apresentaram redução no DT e AE, além de aumento no diâmetro de lume (DL). Porém, resultados similares aos deste estudo também foram observados por Lima *et al.* (2018) em ratos intoxicados por As⁵⁺ e As³⁺ (0,01 e 10 mg/L por 56 dias), por Oliveira *et al.* (2010) com Ni (0,67 e 1,34 g/L por 60 dias) e por Li *et al.* (2016) e Predes *et al.* (2016) com Cd (0,2 mg/L por 24 horas e 1,2 mg/kg por 7 e 56 dias, respectivamente).

Em relação ao percentual e volume dos componentes tubulares, houve aumento de túnica própria (%) que refletiu no aumento do seu volume (mL) nos grupos intoxicados por Cd, Pb, Cr VI e Ni, podendo ser indícios da toxicidade inicial destes metais. A túnica própria (TP) é uma estrutura que envolve o túbulo seminífero, sendo composta por células mioides e membrana basal com fibras colágenas (Kierszenbaum, 2008). Ainda não se sabe a relação do aumento da TP com os danos na espermatogênese, porém estudos indicam que tal aumento seja resultado da elevada produção de fibras colágenas, provavelmente estimulada por uma proteoglicana (decorina) envolvida na fibrilogênese em testículos inférteis (Bhide *et al.* 2005; Orgel *et al.* 2009; Adam *et al.* 2011). Em adição, Kampfer *et al.* (2012) observaram em amostras testiculares de homens inférteis que as células peritubulares aumentaram a produção de catalase (enzima antioxidante) como resposta adaptativa ao aumento de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Nascimento (2017) também relatou aumento de TP nos grupos expostos ao Cd, podendo ser ocasionado pelo estresse oxidativo, o qual induziu tais modificações.

O epitélio seminífero (%) aumentou nos grupos expostos ao Cd, Pb, Cr VI e Ni, sem haver, contudo, outras alterações aparentes. Dados semelhantes foram observados por Neves (2016) com Pb, Saxena *et al.* (1990) com cromo, Mouro (2018) com Cd e por Toman *et al.* (2012) com Ni, em concentrações mais elevadas e em diferentes períodos de exposição. Neste estudo os animais expostos ao As⁵⁺ e As³⁺ não sofreram alterações nesses parâmetros, diferente do que foi encontrado por Souza *et al.* (2016) e Lima *et al.* (2018), que observaram diversas alterações em ratos intoxicados por esses metais em um período de 56 dias.

Nenhum dos parâmetros avaliados com relação à célula de Sertoli, índices, mitótico e meiótico, e rendimento espermático sofreram alterações significativas, indicando que o processo espermatogênico dos camundongos não foi afetado pelos metais pesados durante o período de exposição de 7 dias. Experimento realizado por Li *et al.* (2012), com dose semelhante de arsênio, obteve os mesmos resultados. No entanto, Corpas *et al.* (2002) e Nava-Hernández *et al.* (2009) relatam que a exposição

por um período maior ao Pb induz reduções significativas nas populações celulares do epitélio seminífero. Do mesmo modo, Bu *et al.* (2011), em animais intoxicados por Cd, Kakela *et al.* (1998), Kong *et al.* (2014) e Kong *et al.* (2018) com Ni, relataram alterações nas populações celulares do epitélio seminífero de animais intoxicados por esses metais. Em altas doses, o Cd pode induzir edema intersticial, hemorragia e necrose, acompanhados de danos aos túbulos seminíferos, afetando os espermatozoides e seus precursores (Niewenhuis e Prozialeck, 1987; El-Ashmawy e Youssef, 1999), enquanto o Cr VI pode afetar severamente a prófase meiótica gerando distúrbios na espermatogênese (Geoffroy-Siraudin *et al.*, 2010).

O componente testicular mais sensível a exposição por agentes externos é o intertúbulo (Blanco *et al.*, 2007), porém neste estudo o percentual e volume do intertúbulo e de seus componentes não sofreram alterações com os diferentes metais testados. Resultados semelhantes foram encontrados por Cupertino *et al.* (2017B) em ratos expostos a diferentes concentrações de Cd, também por 7 dias, e por Massanyi *et al.* (2007) utilizando Pb por 48 horas. Provavelmente o tempo de exposição pode ter sido insuficiente para o surgimento de alterações nesses parâmetros, uma vez que Souza *et al.* (2015) relataram mudanças nesses componentes em animais expostos ao As^{5+} e As^{3+} por 56 dias, assim como Saxena *et al.* (1990) com Cr VI por 90 dias. Segundo Oliveira (2010), a exposição crônica ao Ni pode causar redução nas proporções volumétricas de macrófagos acompanhada da redução na proporção volumétrica de célula de Leydig (CL), podendo indicar prejuízo fisiológico sobre a androgênese.

O diâmetro nuclear e volume de CL sofreram redução nos animais expostos ao As^{3+} e, em contrapartida, como compensação o número de CL nos testículos aumentou nesses animais. Estas alterações podem ter acontecido em resposta à intoxicação pelo metal. Dados similares foram encontrados por Souza *et al.* (2015), em um período de exposição maior, sendo a ação das EROs uma possível causa de tais alterações. Nos animais expostos ao Cd e As^{5+} esses parâmetros permaneceram inalterados, enquanto a exposição ao Pb, Cr VI e Ni induziu aumento do diâmetro e volume do núcleo de Leydig, sem outras modificações aparentes. Assim como Souza *et al.* (2015) com As^{5+} , Oliveira (2010) e Toman *et al.* (2012) com Ni, e Costa (2013) com Pb, relataram alterações nos parâmetros morfométricos de CL após exposição dos animais a diversas concentrações desses metais por maiores períodos, comprovando que quanto maior o período de exposição, mais mudanças visíveis ocorrem nos testículos.

O nível de testosterona aumentou nos animais expostos ao Cr VI, permanecendo inalterado nos outros grupos. A testosterona desempenha papel crucial no sistema

reprodutor masculino (Tremblay, 2015), com função de promover o crescimento, o desenvolvimento e a atividade secretora dos órgãos sexuais (Hafez, 1970). Entendemos que o tempo de exposição possa ter influenciado, pois Abarikwu *et al.* (2018) relataram diminuição da testosterona somente após 15, 30 e 60 dias de exposição semanal ao Cd (50 mg/kg), por gavagem. Segundo Castro *et al.* (2002), não há correlação entre altas concentrações de testosterona e aumento do processo espermatogênico. Como alterações tubulares não foram notáveis e as intertubulares mostraram-se apenas no aumento do diâmetro e volume do núcleo de Leydig, podemos inferir que a elevação da testosterona nos animais expostos ao Cr VI não gerou grandes prejuízos à espermatogênese. Estudos relatam que a diminuição da testosterona plasmática e aumento do nível de FSH e em alguns casos com diminuição da contagem espermática, estão associados a alterações fisiológicas testiculares induzidas pela exposição ao Cr, que envolve alterações enzimáticas e patológicas (Earnst, 1990; Saxena *et al.*, 1990; Mamina e Sheiko, 2001).

Neste estudo foram observadas patologias leves nos túbulos seminíferos, como vacúolos no ápice e na base, em animais intoxicados por Cd, Pb e Ni, condizentes com o dano celular inicial encontrado nos grupos que receberam Cd e Ni. Alterações funcionais também foram identificadas e, ainda que em pequenas proporções, alterações na morfologia tecidual, sendo estas análises, segundo Hinton *et al.* (1992), importantes para demonstrar a toxicidade desses metais. Outros autores também encontraram alterações na histologia testicular em animais intoxicados pelo Cd por 7 dias, como obstrução tubular e vacuolização das células germinativas em ratos que receberam 1,4 mg/Kg (Cupertino *et al.*, 2017B) e desorganização dos túbulos seminíferos nos animais que receberam 1,2 mg/Kg do metal (Predes *et al.*, 2010; Predes *et al.*, 2016). Adicionalmente, Kong *et al.* (2014) com Ni e Costa (2013) com Pb relataram que animais intoxicados por esses metais também apresentaram patologias no túbulo seminífero associadas a danos celulares. No que se refere aos animais intoxicados por As^{5+} , As^{3+} e Cr VI, nenhuma patologia foi encontrada. Porém, estudos em animais expostos a esses metais por um período maior que 7 dias relatam surgimento de patologias no epitélio seminífero (Sarkar *et al.*, 2008; Momeni *et al.*, 2012; Marouani *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2018).

Em relação às análises de viabilidade celular, observamos dano inicial e morte celular nos túbulos seminíferos de animais intoxicados por Cd, estando essas alterações associadas a patologias leves encontradas nesses animais, além do estresse oxidativo. Embora dano inicial e morte celular tenham sido observadas, esses animais não

apresentaram qualquer alteração na morfometria das células que compõem o epitélio germinativo. Entende-se que o tempo de exposição e a dose foram insuficientes para gerar maiores danos, porém algumas alterações morfológicas e funcionais começaram se tornar aparentes. Sabe-se que muitos metais promovem alterações celulares que levam à morte celular (Kasahara *et al.*, 2002). Em experimentos com ratos (1 mg/kg Cd por 15 dias) e camundongos intoxicados por Cd (2, 4 e 8 mg/kg Cd por 24 horas), foi possível observar a capacidade do metal em perturbar o equilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose, aumentando assim o processo apoptótico (Bu *et al.*, 2011; Eleawa *et al.*, 2015). Tanto a via mitocondrial como a do retículo endoplasmático estão envolvidas na apoptose de células germinativas induzidas por Cd em camundongos (Ji *et al.*, 2011).

Foram observados também danos iniciais nas células do túbulo seminífero de animais intoxicados por Ni, assim como patologias leves, porém o diâmetro celular nessa região não sofreu alterações. Dados similares foram encontrados por Kong *et al.*, (2014) em experimento com ratos expostos ao Ni em concentrações mais elevadas que 1,5 mg/kg e, assim como Alarifi *et al.* (2014), relatam que a citotoxicidade do Ni foi dependente da concentração e do tempo em cultura de células epiteliais.

Os animais intoxicados por As⁵⁺, As³⁺, Pb e Cr VI não sofreram quaisquer modificações na viabilidade celular do túbulo seminífero, sendo mais um indício de que o tempo de exposição foi um fator-chave para o surgimento das alterações, uma vez que animais expostos ao As⁵⁺ e As³⁺ por 56 dias (Lima *et al.*, 2018), ao Pb por 40 dias (Sudjarwo *et al.*, 2017) e ao Cr VI por 15 dias consecutivos (Marouani *et al.*, 2017) apresentaram danos celulares no túbulo seminífero, bem como patologias leves.

O fato de não ter ocorrido acúmulo significativo dos metais testados deve-se possivelmente ao tempo de exposição, ao número de vezes em que foi exposto ao metal e a forma de eliminação pelo organismo. Lima *et al.* (2018), em estudo com As⁵⁺ e As³⁺, observaram aumento na concentração desses metais nos testículos de ratos após 56 dias de exposição, período muito maior que o testado neste estudo. Sobre o Cd, há estudos indicando que as defesas naturais das gônadas contra o acúmulo do metal possam ser eficientes por até 30 dias, e assim os efeitos tóxicos do Cd parecem ser limitados devido à dificuldade em causar danos quando ligados a proteína protetora metalotioneína (Prozialeck *et al.*, 2007; Predes *et al.*, 2010; Abarikwu *et al.*, 2018). Blanco *et al.* (2007) relataram que animais intoxicados por Cd (1,5 g/L) diariamente, durante 3, 6 e 12 meses, apresentaram aumento do metal nos testículos, porém a retirada

da exposição 3 e 6 meses antes da eutanásia causou estabilidade e até mesmo diminuição do metal no órgão.

Apesar da análise da concentração do chumbo no testículo não ter sido realizada no presente estudo, Adhikari *et al.* (2001) relataram que ratos intoxicados por Pb (5, 10 e 20 mg/kg por duas semanas) apresentaram metal no testículo nas doses mais altas. No que se refere ao Ni, Zemanová *et al.* (2007) encontraram altas concentrações do metal no sêmen de animais expostos diariamente, correlacionando esses níveis a malformações espermáticas. Os dados permitem afirmar que o Ni pode ter conseguido invadir o órgão e atravessar a barreira de defesa.

O desbalanço redox é a primeira alteração que ocorre quando um organismo é intoxicado por metal pesado, reflexo de um desequilíbrio corpóreo denominado estresse oxidativo, resultando em vários efeitos colaterais. O testículo possui um mecanismo de defesa antioxidante muito eficiente, constituído por enzimas como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), que eliminam e/ou inibem a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Vernet *et al.*, 2004). A SOD faz parte da primeira linha de defesa da célula contra os efeitos deletérios causados pelos radicais livres, catalisa a dismutação dos radicais ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que rapidamente é degradado pela CAT em água e oxigênio (Inal *et al.*, 2001; El-Demerdash *et al.*, 2009). O aumento na atividade da SOD nos animais intoxicados por As^{5+} pode ter ocorrido devido ao aumento da produção do O_2^- , sem alterar a atividade da CAT ou da glutathione-S-transferase (GST). Em associação ao aumento da SOD, houve diminuição do malondialdeído (MDA) nesses mesmos animais, indicando que a primeira linha de defesa está sendo eficiente na eliminação dos efeitos deletérios causados por este metal, na concentração e tempo de exposição utilizados. Estes resultados estão de acordo com os dados relatados por Lima *et al.* (2018), em que ratos intoxicados por As^{5+} (0,01 e 10 mg/L por 56 dias) também apresentaram eficiência da primeira linha de defesa antioxidante nos testículos.

Os animais intoxicados por As^{3+} , Cd, Pb, Cr VI e Ni apresentaram diminuição na atividade da GST, associada à diminuição do MDA. Entende-se que as enzimas SOD e CAT estão atuando dentro da normalidade no combate aos efeitos deletérios induzidos após exposição a metais pesados, onde a diminuição na atividade da GST pode estar associada ao processo de eliminação de metais pelo organismo e a detoxificação. Assim a GST, na tentativa de restabelecer o equilíbrio no estado oxidativo, pode ter aumentado sua atividade ao máximo, levando à diminuição na capacidade de dismutação do H_2O_2 e na sua atividade (Aitken e Roman, 2008). Outra via que também justifica a diminuição

da GST é o processo de eliminação de metais do organismo. A diminuição do MDA, um dos produtos da peroxidação lipídica, pode indicar eficiência na atividade da GST. Sabe-se que as enzimas antioxidantes podem sofrer oscilações no decorrer de um período após intoxicação por metais pesados, como observado em outros trabalhos com As (Bashandy *et al.*, 2016), Cd (Abarikwu *et al.*, 2018), Pb (Elgawish e Abdelrazek, 2014), Cr (Acharya *et al.*, 2004) e Ni (Doreswamy *et al.*, 2004). Resultados semelhantes foram observados por Bashandy *et al.* (2016), mostrando que a exposição ao arsênio reduziu o nível de atividade da glutathiona reduzida (GSH) e da CAT nos testículos de ratos. A depleção da GSH, cofator da GST, pode ser também atribuída à ligação dos metais pesados com grupos sulfidrilas e subsequentemente eliminação (Flora *et al.*, 2007). De forma geral, o metabolismo dos metais pesados é conhecido por biotransformação, processo pelo qual o metal se torna mais solúvel em água e facilmente excretado pelo organismo (Yu e Tsunoda, 2004).

Sabe-se que alterações das enzimas antioxidantes podem prejudicar a arquitetura testicular, os parâmetros funcionais e gerar redução quantitativa e qualitativa dos espermatozoides (Guvvala *et al.*, 2017), além de causar efeitos deletérios nas células, como danos ao DNA, modificação proteicas e lipídicas (Sawicka *et al.*, 2008). O aumento da peroxidação lipídica durante a espermatogênese pode gerar dano tecidual (Mylonas e Kouretas, 1999) e funcional, diminuindo a fluidez, alterando a estrutura, integridade e inativando várias enzimas da membrana celular (Gutteridge e Halliwell, 2000).

Neste estudo foram observadas diminuição na motilidade espermática no grupo intoxicado por Ni, da morfologia espermática normal dos animais intoxicados por Cr VI e Ni, em associação com o aumento no percentual de espermatozoides anormais nos grupos expostos ao Cd, Cr VI e Ni. Estes prejuízos podem estar associados ao aumento do tempo de trânsito, uma vez que a permanência dos espermatozoides no epidídimo por um período maior pode ocasionar alterações por diversas vias, como a do estresse oxidativo (Cummins *et al.*, 1994). A motilidade, assim como a morfologia espermática, são características importantes para a fecundação, e distúrbios nestas funções, podem causar danos à fertilidade (De Jonge e Barratt, 2006).

O percentual de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal, estruturalmente íntegras, diminuiu em todos os grupos experimentais, e o percentual de espermatozoides com membranas lesadas aumentou no grupo intoxicado por Cr VI. Tais alterações podem estar relacionadas ao estresse oxidativo induzido pelos metais, onde o aumento no tempo de trânsito pode ter favorecido ainda mais o surgimento de

danos nesses parâmetros, pois a permanência dos espermatozoides no epidídimo por um período maior pode torna-los mais susceptíveis a alterações, tanto pelo estresse oxidativo, como por agentes externos. Os metais podem atuar sobre os fosfolipídios e proteínas presentes na membrana plasmática das células em geral e nos espermatozoides (Minassian e Turner, 1966; Flora *et al.*, 2011). Isso acontece porque muitos dos fosfolipídios são compostos por ácidos graxos poli-insaturados altamente susceptíveis à peroxidação lipídica quando expostos a metais pesados. Esta reação química pode resultar na perda de fosfolipídios por degradação, causando desestabilização e lesão de membranas (Griveau e Le Lannou, 1997; Lamirande *et al.*, 1997; Carpenter *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2007; Flora *et al.*, 2011; Reddy *et al.*, 2011). O estresse oxidativo, uma outra possível causa para os danos espermáticos encontrados, pode induzir a apoptose e reduzir a qualidade dos espermatozoides, gerando danos à reprodução (Tremellen, 2008; Sedha *et al.*, 2015).

Antes de ocorrerem mudanças estruturais em um tecido, os metais pesados podem causar danos funcionais (Dias, 2018). Desta forma, a redução na produção espermática diária e no número de espermátides em todos os grupos pode ser reflexo de danos encontrados nas células que compõem o epitélio germinativo, em associação com o estresse oxidativo. Esses parâmetros testiculares são importantes indicadores da fertilidade masculina, pois o número de espermátides maduras está diretamente relacionado à produção diária de espermatozoides (França e Russell, 1998; Fernandez *et al.*, 2008). Working *et al.* (1985) citam que essa redução indica que houve depleção ou degeneração de células da linhagem germinativa em estádios anteriores à fase de espermátide. Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura, como observado por Souza *et al.* (2016), para arsênio, Jana *et al.* (2006) para arsenito, Wang *et al.* (2011) para o cádmio, Elgawish e Abdelrazek (2014) para chumbo, Geoffroy-Siraudin *et al.* (2010) para cromo e D' Antò *et al.* (2012) para o níquel. Todos esses estudos mostram redução na produção diária de espermatozoide e redução no número de células germinativas, tendo assim efeito negativo na espermatogênese.

A redução no número de espermatozoides na cabeça/corpo e na cauda do epidídimo nos grupos intoxicados por As^{3+} , Cd, Pb, Cr VI e Ni pode ter ocorrido em consequência da diminuição da produção espermática diária e do número de espermátides no testículo. Alterações histopatológicas, danos e morte celular também podem ser responsáveis por esse declínio. Nossos dados são consistentes com o estudos anteriores em que a exposição ao As^{5+} e As^{3+} reduziu a produção de espermatozoides em ratos (Momeni *et al.*, 2012; Souza *et al.*; 2016). A diminuição da concentração

espermática, bem como sua produção, também foram relatadas por El-Demerdash *et al.* (2004) em ratos intoxicados por CdCl₂ (5 mg/kg por 30 dias) e por Elgawish e Abdelrazek (2014) em ratos intoxicados por Pb (30mg/kg por 30 dias), além dos contaminados por Ni (Obone et al, 1999; Pandey et al, 1999).

O aumento no tempo de trânsito observado nos animais expostos ao As⁵⁺, As³⁺, Pb, Cr VI e Ni culminou com a diminuição dos espermatozoides com membrana íntegra, e também com alterações na motilidade dos espermatozoides no grupo intoxicado por Ni. Embora a maioria dos autores apontem que a redução do tempo de trânsito seja a causadora de defeitos aos espermatozoides (Klinefelter, 2002; Garcia *et al.*, 2012), seu aumento também pode causar danos devido à permanência dos espermatozoides no epidídimo por um período prolongado, tornando-os susceptíveis a alterações, como pelo estresse oxidativo ou por agentes externos (Cummins *et al.*, 1994).

Assim, entendemos que as alterações funcionais, celulares e histológicas encontradas neste estudo, podem ser uma resposta inicial ao estresse oxidativo induzido pela intoxicação a metais pesados. O tempo de exposição, a concentração e o tipo de metal são fatores-chave para o nível de alterações induzidas no sistema reprodutor masculino. Portanto, após exposição aguda a metais pesados (1,5 mg/kg IP) por 7 dias, o Ni se mostrou mais tóxico, causando danos patológicos (leves) e funcionais em maiores proporções, além de dano celular inicial no túbulo seminífero. O sucesso reprodutivo pode ser prejudicado quando danos à morfologia, integridade de membrana e motilidade espermática são encontrados. O Cd induziu patologias leves, dano inicial e morte celular no túbulo, além das alterações funcionais. O Cr VI causou aumento da testosterona plasmática, alterações na morfologia espermática normal e diminuição de espermatozoides com membrana íntegra, associado ao aumento de espermatozoides lesados. Os animais intoxicados por Pb também apresentaram patologias leves e alterações nas células já diferenciadas ou em final de diferenciação. O As³⁺ causou redução no número de espermátides e de espermatozoides, alterações nas células de Leydig e diminuição na integridade de membrana espermática com maior intensidade que o As⁵⁺, sendo considerado mais tóxico que este.

8. CONCLUSÕES

A exposição aguda ao arsenato, arsenito, cádmio, chumbo, cromo VI e níquel promove estresse oxidativo testicular, induzindo alterações quantitativas e qualitativas nos espermatozoides. A ordem de toxicidade entre os metais testados, estabelecida por

análise comparativa de danos nas células em processo de diferenciação e diferenciadas, assim como danos funcionais e histopatológicos, segue a seguinte ordem Ni > Cd = Cr VI > Pb > As⁺³ > As⁺⁵. Nos grupos que apresentaram maior toxicidade, como níquel e cádmio, observou-se, além de alterações funcionais, alterações na microestrutura testicular e morte celular. Assim como as células germinativas, as células de Leydig exibiram perfis divergentes de resistência para cada metal. Podemos concluir que a severidade da toxicidade mediada por estes metais pesados após exposição aguda, está associada a danos morfológicos e funcionais nos testículos, onde o níquel foi considerado o metal mais tóxico.

9. REFERÊNCIAS:

ABARIKWU, S. O.; ORUITEMEKA, S.; UWADILEKE, I. A.; OMEODU, S. I.; OKOYE, N. F.; MGBUDOM-OKAH, C. J.; OHANADOR, R. Oral administration of cadmium depletes intratesticular and epididymal iron levels and inhibits lipid peroxidation in the testis and epididymis of adult rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 48:213–223, 2018.

ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *The Anatomical Record*, 239-247, 1946.

ACHARYA, U. R.; MISHRA, M.; MISHRA, I.; TRIPATHY, R. R. Potential role of vitamins in chromium induced spermatogenesis in Swiss mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 15:53–59, 2004.

ADAM, M.; SCHWARZER, J. U.; KÖHN, F. M.; STRAUSS, L.; POUTANEN, M.; MAYERHOFER, A. Mast cell tryptase stimulates production of decorin by human testicular peritubular cells: Possible role of decorin in male infertility by interfering with growth factor signaling. *Human Reproduction*, 26:2613-2625, 2011.

ADHIKARI, N; SINHA, N; NARAYAN, R; SAXENA, D. K. Lead-induced cell death in testes of young rats. *Journal of Applied Toxicology*, 21(4):275–277, 2001.

ADJROUD, O. The toxic effects of nickel chloride on liver, erythropoiesis, and development in Wistar albino preimplanted rats can be reversed with selenium pretreatment. *Environmental Toxicology*, 28(5):290-298, 2013.

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymology*. 105:121-126, 1984.

AIJIE, H.; LINGYUE, Z.; XIAOQIN, G.; YU, L.; FANGFANG, L.; XUHONG, C.; XIAOTIAN, Z.; MINMIN, T.; SHENG, L.; LI, S.; YINGBIAO, S. ROS generation

and MAPKs activation contribute to the Ni-induced testosterone synthesis disturbance in rat Leydig cells. *Toxicology Letters*, 290:36-45, 2018.

AIT HAMADOUCHE, N.; SLIMANI, M.; MERAD-BOUDIA, B.; ZAOUI, C. Reproductive toxicity of lead acetate in adult male rats. *American Journal of Scientific Research*, 3:38-50, 2009.

AITKEN, R. J.; ROMAN, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1(1):15–24, 2008.

ALARIFI, S.; ALI, D.; ALAKHTANI, S.; SUHAIBANI, E. S. A.; AL-QAHTANI, A. A. Reactive oxygen species-mediated DNA damage and apoptosis in human skin epidermal cells after exposure to nickel nanoparticles. *Biological Trace Element Research*, 157(1):84-93, 2014.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of The Cell*. Published by Garland Science, Taylor and Francis Group, 6:1-1342, 2015.

ALI, S. A.; GROTTI, A.; RISCALA, C. M. O níquel e suas ações sobre o organismo humano. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 62:85-96, 1987.

ALLOUCHE, L.; HAMADOUCHE, M.; TOUABTI, A. Chronic effects of low lead levels on sperm quality, gonadotropins and testosterone in albino rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61:503-510, 2009.

AMANN, R. P.; ALMQUIST, J. O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *Journal of Dairy Science*, 45(6):774-781, 1962.

AMANN, R. P. The Male Rabbit. IV. Quantitative Testicular Histology and Comparisons Between Daily Sperm Production as Determined Histologically and Daily Sperm Output. *Fertility and Sterility*. 21(9):662–672, 1970.

ANGELIS, C. D.; GALDIERO, M.; PIVONELLO, C.; SALZANO, C.; GIANFRILLI, D.; PISCITELLI, P.; LENZI, A.; COLAO, A.; PIVONELLO, R. The environment and male reproduction: The effect of cadmium exposure on reproductive function and its implication in fertility. *Reproductive Toxicology*, 73:105-127, 2017.

APOSTOLI, P.; CATALANI, S. Metal ions affecting reproduction and development. *Metal Ions in Toxicology: Effects, Interactions, Interdependencies*. 263-303, 2011.

ASSI, M. A.; HEZMEE, M. N. M.; HARON, A. W.; SABRI, M. Y. M.; RAJION, M. A. The detrimental effects of lead on human and animal health. *Veterinary World*, 9, 2016.

AU, D. W. T.; LEE, C. Y.; CHAN, K. L.; WU, R. S. S. Reproductive impairment of sea urchins upon chronic exposure to cadmium. Part I: effects on gamete quantity. *Environmental Pollution*, 111:1-9, 2001.

BAE, D. S.; GENNINGS, C.; CARTER, W. H.; YANG, R. S. H.; CAMPAIN, J. A. Toxicological interactions among arsenic, cadmium, chromium, and lead in human keratinocytes. *Toxicological Sciences*, 63(1):32–142, 2001.

BAGCHI, D.; STOHS, S. J.; DOWNS, B. W.; BAGCHI, M.; PREUSS, H. G. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology*, 180(1):5-22, 2002.

BARRA, C. M.; SANTELLI, R.E.; ABRAÃO, J.J.; GUARDIA, M. Especificação de arsênio uma revisão. *Química Nova*, 23:58-70, 2000.

BASHANDY, S. A. E.; EL AWDAN, S. A; EBAID, H.; ALHAZZA, I. M. Antioxidant potential of *Spirulina platensis* mitigates oxidative stress and reprotoxicity induced by sodium arsenite in male rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-8, 2016.

BERNDTSON, W. E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *Journal of Animal Science*, 44(5):818-833. 1977.

BERTON, R. S.; PIRES, A. M. M.; ANDRADE, S. A. L.; ABREU, C. A.; AMBROSANO, E. J.; SILVEIRA, A. P. D. Toxicidade do níquel em plantas de feijão e efeitos sobre a microbiota do solo. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, 41(8):1305-1312, 2006.

BHIDE, V. M.; LASCHINGER, C. A.; ARORA, P. D.; LEE, W.; HAKKINEN, L.; LARJAVA, H.; SODEK, J.; MCCULLOCH, C. A. Collagen Phagocytosis by Fibroblasts Is Regulated by Decorin. *Journal of Biological Chemistry*, 280:3103-23113, 2005.

BLANCO, A.; MOYANO, R.; VIVO, J.; FLORES-ACUÑA, R.; MOLINA, A.; BLANCO, C.; AGÜERA, E.; MONTERDE, J. Quantitative changes in the testicular structure in mice exposed to low doses of cadmium. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23:96-101, 2007.

BRANDÃO, M. H. T.; GONTIJO, B.; GIRUNDI, M. A.; CASTRO, M. C. M. Ear piercing as a risk factor for contact allergy to nickel. *Jornal de Pediatria*, 86(2):149-154, 2010.

BU, T.; MI, Y.; ZENG, W.; ZHANG, C. Protective effect of quercetin on cadmium-induced oxidative toxicity on germ cells in male mice. *The Anatomical Record*. 294(3):520–526, 2011.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation methods. *Methods in Enzymology*, 2:302-310, 1978.

CAMERON, K. S.; BUCHNER, V.; TCHOUNWOU, P. B. Exploring the Molecular Mechanisms of Nickel-Induced Genotoxicity and Carcinogenicity: A Literature Review. *Reviews on Environmental Health*, 26(2):81–92, 2011.

CARLSEN, E.; GIWERCMAN, A.; KEIDING, N.; SKAKKEBAEK, N. E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ Journals*, 305. 609–613, 1992.

CARPENTER, D. O.; ARCARO, K.; SPINK, D. C. Understanding the human health effects of chemical mixtures. *Environmental Health Perspectives*, 110(1):25-42, 2002.

CASTRO, A. C. S.; BERNDTSON, W. E.; CARDOSO, F. M. Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35(4):493-498, 2002.

CHANDRA, AMAR K.; CHATTERJEE, A.; GHOSH, R.; SKAR, M. Vitamin E-supplementation protect chromium (VI)-induced spermatogenic and steroidogenic disorders in testicular tissues of rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(3):972–979, 2010.

CHANG, S. I.; JIN, B.; YOUN, P.; PARK, C.; PARK, J. D.; RYU, D. Y. Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 218(2):196-203, 2007.

CORNWALL, G.A. New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update*. 15:21-27, 2009.

CORPAS, I.; CASTILLO, M.; MARQUINA, D.; BENITO, M. Lead intoxication in gestational and lactational periods alters the development of male reproductive organs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53:259-266, 2002.

COSTA, K. L. C. Danos Testiculares em ratos submetidos a diferentes doses de chumbo: avaliação histomorfométrica, ultraestrutural e bioquímica. Tese - doutorado. Viçosa – UFV, 1-101. 2013.

COSTA, M.; DAVIDSON, T. L.; CHEN, H.; KE, Q.; ZHANG, P.; YAN, Y.; HUANG, C.; KLUZ, T. Nickel carcinogenesis: epigenetics and hypoxia signaling. *Mutation Research*, 592(1–2):79–88, 2005.

COOGAN, T. P.; LATTA, D. M.; SNOW, E. T.; COSTA, M. Toxicity and carcinogenicity of nickel compounds. In: McClellan RO, editor. Critical reviews in toxicology, Boca Raton, 19:341-84, 1989.

CUMMINS, J. M.; JEQUIER, A. M.; KANI, R. Molecular Biology of Human Male Infertility: Links With Aging, Mitochondrial Genetics, and Oxidative Stress? Molecular Reproduction and Development, 362:345–362, 1994.

CUPERTINO, M. C., NOVAES, R. D., SANTOS, E. C., BASTOS, D. S. S., MARQUES DOS SANTOS, D. C., DO CARMO QUEIROZ FIALHO, M., MATTA, S. L. P. Cadmium-induced testicular damage is associated with mineral imbalance, increased antioxidant enzymes activity and protein oxidation in rats. Life Sciences, 175:23–30, 2017A.

CUPERTINO, M. C.; NOVAES, R. D.; SANTOS, E. C.; NEVES, A. C.; SILVA, E.; OLIVEIRA, J. A.; MATTA, S. L. P. Differential Susceptibility of Germ and Leydig Cells to Cadmium-Mediated Toxicity: Impact on Testis Structure, Adiponectin Levels, and Steroidogenesis. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 1–11, 2017B.

D'ANTÒ, V. Effect of Nickel Chloride on Cell Proliferation. The Open Dentistry Journal, 6(1):177-181, 2012.

DAS, K. K.; DAS, S. N.; DHUNDASI, S. A. Nickel, its adverse health effects and oxidative stress. Indian Journal of Medical Research, 128:412-425, 2008.

DE JONGE, C. J.; BARRATT, C. R. L. The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization e Regeneration. Cambridge University Press, 1-359, 2006.

DENEKE, S. M.; FANBURG, B. L. Regulation of cellular glutathione. American Journal of Physiology, 257:163–173, 1989.

DIAS, F. C. R. Extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) PEDERSEN interfere em parâmetros reprodutivos e fertilidade de camundongos machos adultos. Tese - Doutorado. Viçosa - UFV. 1-143. 2018.

DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K.; HASENFUSS, G.; PRESTLE, J. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. Journal of the American Heart Association, 101:33-39, 2000.

DORESWAMY, K.; SHRILATHA, B.; RAJESHKUMAR, T.; MURALIDHARA. Nickel-induced oxidative stress in testis of mice: evidence of DNA damage and genotoxic effects. Journal of Andrology, 25(6):996–1003, 2004.

DROGE, W. Free radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 87:47-95, 2002.

EL-ASHMAWY, I. M.; YOUSSEF, S. A. The antagonistic effect of chlorpromazine on cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 161:34–9, 1999.

EL-DEMERDASH, F. M.; YOUSEF, M. I.; KEDWANY, F. S.; BAGHDADI, H. H. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and beta-carotene. *Food and Chemical Toxicology*, 42:1563–71, 2004.

EL-DEMERDASH, F. M.; YOUSEF, M. I.; RADWAN, F. M. Ameliorating effect of curcumin on sodium arsenite induced oxidative damage and lipid peroxidation in different rat organs. *Food and Chemical Toxicology*, 47:249–254, 2009.

EL-SAYED, Y. S.; EL-NEWESHY, M. S. Impact of lead toxicity on male rat reproduction at “hormonal and histopathological levels”. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 92:765-774, 2010.

ELEAWA, M.; ALKHATEEB, M. A.; ALHASHEM, F. H.; BIN- JALIAH, I.; SAKR, H. F.; ELREFAEY, H. M.; ELKARIB, A. O.; ALESSA, R. M.; HAIDARA, M. A.; SHATOOR, A. S.; KHALIL, M. A. Resveratrol reverses cadmium chloride-induced testicular damage and subfertility by downregulating p53 and Bax and upregulating gonadotropins and Bcl-2 gene expression. *Journal of Reproduction and Development*, 60(2):115–127, 2015.

ELGAWISH, R.A.R.; ABDELRAZEK, H.M. Effects of lead acetate on testicular function and caspase-3 expression with respect to the protective effect of cinnamon in albino rats. *Toxicology Reports*, 1:795-801, 2014.

EARNST, E. Testicular toxicity following short-term exposure to tri- and hexavalent chromium: an experimental study in the rat. *Toxicology Letters*, 51(3):269–275, 1990.

FALLAHI, S.; RAJAEI, M.; MALEKZADEH, K.; KALANTAR, S. M. Would *Phoenix Dactyflera* Pollen (palm seed) be considered as a treatment agent against males infertility? A systematic review. 7(8):1590-1596, 2015.

FERNANDES, G. S. A.; ARENA, A. C.; FERNANDEZ, C. D. B.; MERCADANTE, A.; BARBISAN, L. F.; KEMPINAS, W. G. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reproductive Toxicology*, 23:106–112, 2007.

FERNANDEZ, C. D. B.; PORTO, E. M.; ARENA, A. C.; KEMPINAS, W. G. Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. *International Journal of Andrology*, 31:427-437, 2008.

FLORA, S. J. S.; BHADOURIA, S.; KANNAN, G. M.; SINGH, N. Arsenic induced oxidative stress and the role of antioxidant supplementation during chelation: a review. *Journal of Environmental Biology*, 28(2):333–347, 2007.

FLORA, S. J. S.; PACHAURI, V.; SAXENA, G. Arsenic, cadmium and lead. In: Gupta, R. C. (Ed.). *Reproductive and developmental toxicology*. Academic Press, 416-438, 2011.

FRANÇA, L.R.; HESS, R. A.; DUFOUR, J. M.; HOFMANN, M. C.; GRISWOLD, M. D. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology*, 4:189–212, 2016.

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

GARCIA, P. V.; BARBIERI, M. F.; PEROBELLI, J. E.; CONSONNI, S. R.; MESQUITA, S. F.; KEMPINAS, W. G.; PEREIRA, L. A. Morphometric-stereological and functional epididymal alterations and a decrease in fertility in rats treated with finasteride and after a 30-day post-treatment recovery period. *Fertility and Sterility*, 97(6):14-51, 2012.

GEOFFROY-SIRAUDIN, C.; PERRARD, M. H.; CHASPOUL, F.; LANTEAUME, A.; GALLICE, P.; DURAND, P.; GUICHAOUA, M.R. Validation of a rat seminiferous tubule culture model as a suitable system for studying toxicant impact on meiosis effect of hexavalente chromium. *Toxicological Sciences*, 116:286–296, 2010.

GILIO, J. M.; BORELLA, M. I.; CAMARGO, A. C. M.; SILVA, C. A. A variação dos níveis de óxido nítrico relacionada ao controle da dinâmica dos complexos juncionais no epitélio seminífero de camundongos. *ConScientiae Saúde*, 7(1):69-76, 2008.

GODIC, A.; POLJŠAK, B.; ADAMIC, M.; DAHMANE, R. The Role of Antioxidants in Skin Cancer Prevention and Treatment. Hindawi Publishing Corporation *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-6, 2014.

GOLDHABER, S. B. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 38:232-242. 2003.

GRIVEAU, J. F.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *International Journal of Andrology*, 20:61–69, 1997.

GUILHERME, L. R. G.; MARQUES, J.J.; PIERANGELI, M. A. P.; ZULIANI, D. Q.; CAMPOS, M. L.; MARCHI, G. Elementos-traço em solos e sistemas aquáticos. *Tópicos em Ciências do Solo*, 4:345-390, 2005.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899:136–147, 2000.

GUVVALA, P. R.; RAVINDRA, J. P. A.; RAJANI, C. V.; SIVARAM, M.; SELVARAJU, S. Protective role of epigallocatechin-3-gallate on arsenic induced testicular toxicity in Swiss albino mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 96(7):685-694, 2017.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22):7130-7139, 1974.

HAFEZ, E. S. E. *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*. Philadelphia: Lea and Febiger, 273-298, 1970.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York, 105–245, 1999.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility*, 88:343-352, 1990.

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

HERNBERG, S. Lead poisoning in a historical perspective. *American Journal of Industrial Medicine*, 38:244-254, 2000.

HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELANO, R. A.; OKIHIRO, M. S. Histopathological biomarkers. In: HUGGETT, R. J.; KIMERLE, R. A.; MEHRLE, P. M.; JR BERGMAN, H. L.; (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis, USA, 55-196, 1992.

HSU, P. C.; GUO, Y. L. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology*, 180:33-44, 2002.

HU, H. Exposure to metals. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 27:983-996. 2000.

IBRAHIM, D.; Froberg, B., Wolf, A., Rusyniak, D. E. Heavy Metal Poisoning: Clinical Presentations and Pathophysiology. *Clinics in Laboratory Medicine*, 26:67-97. 2006.

INAL, M. E.; KANBAK, G.; SUNAL, E. Antioxidant enzymes activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clinica Chimica Acta*, 305:75– 80, 2001.

JADHAV, S.H.; SARKAR, S.N.; PATIL, R.D.; TRIPATHI, H.C. Effects of subchronic exposure via drinking water to a mixture of eight water contaminating metals: A biochemical and histopathological study in male rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53(4): 667-677, 2007.

JAISHANKAR, M., TSETEN, T., ANBALAGAN, N., MATHEW, B.B., AND BEEREGOWDA, K.N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*, 7:60–72, 2014.

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

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology & Medicine*, 9:515-540, 1990.

JANG, D. H.; HOFFMAN, R. S. Heavy metal chelation in neurotoxic exposures. *Neurologic Clinics*, 29:607-622, 2011.

JENG, H.A.; HUANG, Y.L.; PAN, C.H.; DIAWARA, N. Role of low exposure to metals as male reproductive toxicants. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 25:405–417, 2015.

JI, Y. L.; WANG, H.; ZHAO, X. F.; WANG, Q.; ZHANG, C.; ZHANG, Y.; ZHAO, M.; CHEN, Y. H.; MENG, X. H.; XU, D. X. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mitochondrial pathway mediates cadmium-induced germ cell apoptosis in testes. *Toxicological Sciences*, 124(2):446–459, 2011.

JOHNSON, S. G. *Hormones*. 1:2-25, 1970.

JOHNSON, L.; PETTY, C. S.; NEAVES W. B. A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermiogenesis. *Biology of Reproduction*, 25:217-226, 1981.

JONGE, C. J.; BARRATT, C. *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge University Press, 372(1):1-24, 2006.

KAKELA, R.; KÄKELÄ, A.; HYVÄRINEN, H. Effects of nickel chloride on reproduction of the rat and possible antagonistic role of selenium. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, 123(1):27–37, 1998.

KAMPFER, C.; SPILLNER, S.; SPINNLER, K.; SCHWARZER, J. U.; TERRADAS, C.; PONZIO, R.; PUIGDOMENECH, E.; LEVALLE, O.; KOHN, F. M.; MATZKIN, M. E.; CALANDRA, R. S.; FRUNGIERI, M. B.; MAYERHOFER, A. Evidence for an adaptation in ROS scavenging systems in human testicular peritubular cells from infertility patients. *International Journal of Andrology*, 35:793-801, 2012.

KASAHARA, E.; SATO, E. F.; MIYOSHI, M.; KONAKA, R.; HIRAMOTO, K.; SASAKI, J.; TOKUDA, M.; NAKANO, Y.; INOUE, M. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di(2-ethylhexyl) phthalate. *Biochemical Journal*, 365:849–856, 2002.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. Intoxicação por metais pesados e quelantes. In: Katzung, B. G. *Farmacologia e clínica*, (12):1013-1023, 2014.

KIERSZENBAUM, A. L. *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia* / Abraham L. Kierszenbaum; revisão científica Marcelo Sampaio Narciso; tradução Adriana Paulino do Nascimento. - Rio de Janeiro: Elsevier, 1-677, 2008.

KIM, Y. J., KIM, J. M. Arsenic Toxicity in Male Reproduction and Development. *Development and reproduction*, 19(4):167-180, 2015.

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

KONG, L., TANG, M., ZHANG, T., WANG, D., HU, K., LU, W., WEI, C., LIANG, G., PU, Y. Nickel nanoparticles exposure and reproductive toxicity in healthy adult rats. *International journal of molecular sciences*, 15(11):21253- 21269, 2014.

KONG, L.; HU, W.; LU, C.; CHENG, K.; TANG, M. Mechanisms underlying nickel nanoparticle induced reproductive toxicity and chemo-protective effects of vitamin C in male rats. *Chemosphere*, 218:259-265, 2018.

KREIGER, D.T.; PORLOW, M.J.; GIBSON, M.J.; DAVIS, T.F. Brain grafts reverse hypogonadism of gonadotropin releasing hormone deficiency. *Nature*, 298:468-471, 1982.

KROCKOVÁ, J. Z.; MASSÁNYIA, P.; SIROTKIN, A. V.; PIVKOB, J.; MAKAREVICH, A. V.; LUKÁČA, N.; CAPCAROVÁ, M.; TOMANA, R.;

POLÁKOVÁ, S. Nickel induced structural and functional alterations in mouse Leydig cells in vitro. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 25:14–18, 2011.

KULADIP, J.; SUBARNA, J.; KUMAR, P.S. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: Possible an estrogenic mode of action. *Reproduction Biology Endocrinology*, 16:4-9, 2006.

LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction*, 2:48–54, 1997.

LARS, J. Hazarda of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68:167-182, 2003.

LAUTERBURG, B. H.; ADAMS, J. D.; MITCHELL, J. R. Hepatic glutathione homeostasis in the rat: efflux accounts for glutathione turnover. *Hepatology*, (4):586–590, 1984.

LI, H.; CHEN, Q.; LI, S.; YAO, W.; LI, L.; SHI, X.; WANG, L.; CASTRANOVA, V.; VALLYATHAN, V.; ERNEST, E.; CHEN, C. Effect of CrVI exposure on sperm quality: human and animal studies. *Annals of Occupational Hygiene*, 45:505–511, 2001.

LI, R.; LUO, X.; LI, L.; PENG, O.; YANG, Y.; ZHAO, L.; MA, M.; HOU, Z. The protective effects of melatonin against oxidative stress and inflammation induced by acute cadmium exposure in mice testis. *Biological Trace Element Research*, 170(1):152-164, 2016.

LI, Y.; WANG, M.; PIAO, F.; WANG, X. Subchronic Exposure to Arsenic Inhibits Spermatogenesis and Downregulates the Expression of Ddx3y in Testis and Epididymis of Mice. *Toxicological Sciences*, 128(2):482–489, 2012.

LI, Z. H.; LI, P.; RODINA, M.; RANDAK, T. Effects of human pharmaceutical Carbamazepine on the quality parameters and oxidation stress in common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa. *Chemosphere*, 80:530-534, 2010.

LIMA G. D. A.; SERTORIO, M. N.; SOUZA, A. C. F.; MENEZES, T. P.; MOURO, V. G. S.; ALVES, N. M. G.; OLIVEIRA, J. M.; HENRY, M.; NEVES, M. M. Fertility in male rats: Disentangling adverse effects of arsenic compounds. *Reproductive Toxicology*, 78:130-140, 2018.

LIMÓN-PACHECO, L.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*, 674:137–14, 2009.

LIU, J.; GOYER, R. A.; WAALKES, M. P. Toxic effects of metals. In: Klaassen, C.D. (Ed.). Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. New York: McGraw Hill, (7):931-979, 2008.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. L. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193:265-275, 1951.

LYMBEROPOULOS, A. G.; KOTSAKI-KOVATSI, V. P.; PAPAIOANNOU, N.; TAYLOR, A.; BRIKAS, P.; BELIBASAKI, S. Effects of cadmium chloride administration on the testicular growth and plasma testosterone secretion of Chios ram-lambs. *Small Ruminant Research*, 49(1):51–60, 2003.

MAMINA, V. P.; SHEIKO, L. D. Effects of ionizing radiation and xenobiotics on the spermatogenic epithelium of laboratory animals. *Gigiena i Sanitariia*, 6:24-27, 2001.

MANDAL, B. K.; SUZUKI, K. T. Arsenic round the world: a review. *Talanta*, 58:201-35, 2002.

MARCHLEWICZ, M.; MICHALSKA, T.; WISZNIEWSKA, B. Detection of lead-induced oxidative stress in the rat epididymis by chemiluminescence. *Chemosphere*, 57:1553-1562, 2004.

MAROUANI, N.; OLFA TEBOURBI, O.; HALLÈGUE, D.; MONCEF MOKNI, M.; YACOUBI, M. T.; SAKLY, O.; BENKHALIFA, M.; RHOUMA, K. B. Mechanisms of chromium hexavalent-induced apoptosis in rat testes. *Toxicology and Industrial Health*, 33(2):97–106, 2017.

MASSANYI, P.; LUKAC, N.; ZEMANOVA, J.; MAKAREVICH, A. V.; CHRENEK, P.; CIGANKOVA, V.; FLESAROVA, S.; TOMAN, R.; FORGACS, Z.; SOMOZY, Z.; LAZOR, P. Effect of nickel administration in vivo in the testicular structure in male mice. *Acta Veterinaria Brunensis*, 76:223–9, 2007.

MASSANYI, P.; LUKAC, N.; MAKAREVICH, A. V.; CHRENEK, P.; FORGACS, Z.; ZAKRZEWSKI, M.; STAWARZ, R.; TOMAN, R.; LAZOR, P.; FLESAROVA, S. Lead-induced alterations in rat kidneys and testes in vivo. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 41:671-676, 2007.

MEDINA, M.F.; ARRIETA, M.C.; VILLAFANE, M.N.; KLYVER, S.M.R.; ODSTRCIL, I.M.A.; GONZÁLEZ, M.E. Early signs of toxicity in testes and sperm of rats exposed to low cadmium doses. *Toxicology and Industrial Health*, 33(7):576-587, 2017.

MENON, A. G.; BARKEMA, H. W.; WILDE, R.; KASTELIC, J. P.; THUNDATHIL, J. C. Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 75:241–7, 2011.

MINASSIAN, E. S.; TERNER, C. Biosynthesis of lipids by human and fish spermatozoa. *American Journal of Physiology*, 210:615-618, 1966.

MOMENI, H. R.; ORYAN, S.; ESKANDARI, N. Effect of vitamin E on sperm number and testis histopathology of sodium arsenite-treated rats. *Reproductive Biology*, 12:171:181, 2012.

MORAIS, A. C. T.; BALARINI, M. K. B.; MENEZES, T. P.; FERRAZ, F. S.; GOMES, M. L.; MORAIS, D. B.; PAULA, T. A. R.; MATTA, S. L. P. Germ cells and the seminiferous epithelium cycle in the wild rodent *Oxymycterus rufus* (Rodentia: Cricetidae). *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 11(4):61-71, 2016.

MOURO, V. G. S. Ação Antioxidante do Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Frente ao Estresse Oxidativo Induzido pelo Cádmio no Testículo de Camundongos Adultos. Tese - Doutorado. Viçosa - UFV. 1-120. 2018.

MOURO, V. G. S.; MENEZES, T. P.; LIMA, G.D.A.; DOMINGUES, R.R.; SOUZA, A.C.F.; OLIVEIRA, J.A.; MATTA, S.L.P.; MACHADO-NEVES, M. How Bad Is Aluminum Exposure to Reproductive Parameters in Rats? *Biological Trace Element Research*, 1-11, 2017.

MRUK, D.D.; CHENG, C.Y. The mammalian blood-testis barrier: its biology and regulation. *Endocrine Reviews*, 36:564–591, 2015.

MYLONAS, C.; KOURETAS, D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13(3):295–309, 1999.

NAN, V. U.; UJAH, G. A.; MOHAMED, ETIM, M.; K. B.; IGBA, B. O.; AUGUSTINE, E. R.; OSIM, E. E. Cadmium chloride–induced testicular toxicity in male wistar rats; prophylactic effect of quercetin, and assessment of testicular recovery following cadmium chloride withdrawal. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 94:109-123, 2017.

NASCIMENTO, L. S. Efeito do extrato hidroalcoólico da polpa de juçara (*Euterpe edulis* Martius) sobre a morfologia testicular de ratos adultos saudáveis e expostos ao cádmio. Tese – Doutorado. Universidade Federal de Viçosa – UVF. Viçosa – MG, 2017.

NAVA-HERNÁNDEZ, M. P.; HAUAD-MARROQUÍN, L. A.; BASSOL-MAYAGOITIA, S.; GARCÍA-ARENAS, G.; MERCADO-HERNÁNDEZ, R.;

ECHÁVARRI-GUZMÁN, M. A.; CERDA-FLORES, R. M. Lead, cadmium, and arsenic-induced DNA damage in rat germinal cells. *DNA and Cell Biology*, 28:241-248, 2009.

NAVARRO-MORENO, L.G.; QUINTANAR-ESCORZA, M.A.; GONZÁLEZ, S.; MONDRAGÓN, R.; CERBÓN-SOLORZÁNO, J.; VALDES, J.; CALDERÓN-SALINAS, J. V. Effects of lead intoxication on intercellular junctions and biochemical alterations of the renal proximal tubule cells. *Toxicology in Vitro*, 23:1298–1304, 2009.

NAVARRO-YEPES, J.; BURNS, M.; ANANDHAN, A.; KHALIMONCHUK, O.; RAZO, L. M. D.; QUINTANILLA-VEGA, B.; PAPPAS, A.; PANAYIOTIDIS, M. I.; FRANCO, R. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Autophagy: Cell Death Versus Survival. *Antioxidants and Redox Signaling*, 21(1):66-85, 2014.

NEVES, A. C. Efeitos do açaí (*Euterpe edulis*) em testículo de ratos expostos ao acetato de chumbo: análise morfométrica e estrutural. Dissertação - Mestrado. Viçosa - UFV. 1-49, 2016.

NIEWENHUIS, R. J.; PROZIALECK, W. C. Calmodulin inhibitors protect against cadmium induced testicular damage in mice. *Biology of Reproduction*, 37:127-33, 1987.

OBONE, E.; CHAKRABARTI, S. K.; BAI, C.; MALICK, M. A.; LAMONTAGNE, L.; SUBRAMANIAN, K. S. Toxicity and bioaccumulation of nickel sulfate in Sprague-Dawley rats following 13 weeks of subchronic exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 57:379-401, 1999.

OLIVEIRA, M. F. Efeito da exposição crônica ao níquel nos testículos de ratos wistar adultos. Dissertação de mestrado. Viçosa – UFV, 1-67, 2010.

ORGEL, J. P. R. O.; EID, A.; ANTIPOVA, O.; BELLA, J.; SCOTT, J. E. Decorin pore protein (Decoron) Shape Complements Collagen Fibril Surface Structure and Mediates its Binding. *PLoS ONE*, 4(9):e7028, 2009.

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

PATRA, R.C.; RAUTRAY, A.K.; SWARUP, D. Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1-9, 2011.

PEDERSEN, E.; K. MAGNUS, HOGETVEIT, A. C.; ANDERSEN, A. Cancer of respiratory organs among workers at a nickel refinery in Norway. *International Journal of Cancer*, 30(6):681-685, 1973.

PERL, D. P.; LITTLE, B. N. Acridine orange - nucleic acid fluorescence, its use in routine diagnostic muscle biopsies. *Archives of Neurology*, 37:641-644, 1980.

PERSSON, T.; POPESCU, B. O. CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-11, 2014.

PIZENT, A.; TARIBA, B.; ŽIVKOVIĆ, T. Reproductive Toxicity of Metals in Men. *Arh Hig Rada Toksikol, Supplement*, 1:35-46, 2012.

PHILLIPS, C.; GYORI, Z.; KOVÁCS, B. The effect of adding cadmium and lead alone or in combination to the diet of pigs on their growth, carcass composition and reproduction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(13):1357–1365, 2003.

PREDES, F.S.; DIAMANTE, M. A. S.; DOLDER, M. A. H. Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. *International Journal of Experimental Pathology*, 91:125-131, 2010.

PREDES, F. S.; DIAMANTE, M. A. S.; FOGGIO, M. A.; DOLDER, H. Effects of *Arctium lappa* on cadmium-induced damage to the testis and epididymis of adult Wistar rats. *Biological Trace Element Research*, 173(2):362-371, 2016.

PROZIALECK, W. C.; VAIDYA, V. S.; LIU, J.; WAALKES, M. P.; EDWARD, J. R.; LAMAR, P. C.; BERNARD, A. M.; DUMONT, X.; BONVENTRE, J. V. Kidney injury molecule-1 is an early biomarker of cadmium nephrotoxicity, *Kidney International*, 72:985-993, 2007.

RANA, S. V. S. Environmental pollutions: health and toxicology. *Alpha Science. International*, 1-269, 2006.

REDDY, P.S.; RANI, G.P.; SAINATH, S.B.; MEENA, R.; SUPRIYA, C. Protective effects of N-acetylcysteine against arsenic-induced oxidative stress and reprotoxicity in male mice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 25:247-53, 2011.

REDDY, P.S.; RANI, G.P.; SAINATH, S.B.; MEENA, R.; SUPRIYA, C. Protective effects of N-acetylcysteine against arsenic-induced oxidative stress and reprotoxicity in male mice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 25:247-53, 2011.

RENU, K.; MADHYASTHA, H.; MADHYASTHA, R.; MARUYAMA, M.; VINAYAGAM, S.; GOPALAKRISHNAN, A. V. Review on molecular and biochemical insights of arsenic-mediated male reproductive toxicity. *Life Sciences*, 212:37-58, 2018.

RICART-JANÉ, D.; LLOBERA, M.; LÓPEZ-TEJERO, D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the griess method. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 6(2):178-185, 2002.

ROBB, G.W.; AMMAN, R.P.; KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *Journal of Reproduction Fertility*, 54:103-107, 1978.

ROBAIRE, B.; VIGER, R.S. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biology of Reproduction* 52(2):226-36, 1995.

ROOSEN-RUNGE, E. C.; GIESEL, L. O. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *The American Journal of Anatomy*, 87(1):1-30, 1950.

ROOSEN-RUNGE, E. C. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *The Anatomical Record*, 123(4):385-398, 1955.

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

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

SADAO, M. Intoxicação por chumbo. *Revista de Oxidologia*, 37-42, 2002.

SALNIKOW, K.; ZHITKOVICH, A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. *Chemical Research in Toxicology*, 21:28-44, 2008.

SARKAR, A.; RAVINDRAN, G.; KRISHNAMURTHY, V. A brief review on the effect of cadmium toxicity: from cellular to organ level. *International Journal of Bio-Technology and Research*, 3:17–36, 2013.

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

SARKAR, S.; HAZRA, J.; UPADHYAY, S. N.; SINGH, R. K.; CHOWDHURY, A. R. Arsenic induced toxicity on testicular tissue of mice. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 52(52):84–90, 2008.

SAXENA, D. K.; MURTHY, R. C.; LAL, B.; SRIVASTAVA, R. S.; CHANDRA, S. V. Effect of hexavalent chromium on testicular maturation in rat. *Reproductive Toxicology*, 4(3):223-228, 1990.

SAWICKA, E. S.; REDNICKA, D.; DŁUGOSZ, A. *Scutellaria baicalensis* inhibits lipid peroxidation caused by chromium in human erythrocytes. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 17:539-544, 2008.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. Review. *Current Biology*, 24:453-462, 2014.

SEDHA, S.; KUMAR, S.; SHUKLA, S. Role of Oxidative Stress in Male Reproductive Dysfunctions with. Reference to Phthalate Compounds. *Journal of Urology*, 12(5):2304-2316, 2015.

SENGUPTA, P.; DUTTA, S.; KRAJEWSKA-KULAK, E. The Disappearing Sperms: Analysis of Reports Published Between 1980 and 2015. *American Journal of Men's Health*, 11:1279-304, 2017.

SETCHELL, B. P. Male reproductive organs and semen. *In*: Cupps, P. T. (Ed): *Reproduction in domestic animals*, San Diego: Academic, 6(4):221-250, 1991.

SHARMA, T.; BANERJEE, B.D.; YADAV, C.S.; GUPTA, P.; SHARMA, S. Heavy metal levels in adolescent and maternal blood: association with risk of hypospadias. *ISRN Pediatrics*, 1-5, 2014.

SHUM, W.W.; DA SILVA, N.; BROWN, D.; BRETON S. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *Journal of Experimental Biology*. 212:53-61, 2009.

SIES, H. *Oxidative stress*. London, Academic Press, 1-507, 1997.

SILVA, C.S.; PEDROZO, M.F.M. *Ecotoxicologia do cromo e seus compostos*. Série de cadernos de referência ambiental. Salvador, 5:1-55, 2001.

SKINNER, M. Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Reviews*, 12:45-77, 1991.

SKINNER, M. K.; GRISWOLD, M. D. *Sertoli Cell Biology*. Elsevier Academic Press. 1-494, 2005.

SOUZA, A. C. F.; BASTOS, D. S. S.; SANTOS, F. C.; SERTORIO, M. N.; ERVILHA, L. O. G.; GONÇALVES, R. V.; MACHADO-NEVES, M. Arsenic aggravates oxidative stress causing hepatic alterations and inflammation in diabetic rats. *Life Sciences*, 209:472-480, 2018.

SOUZA, A. C. F.; MARCHESI, S. C.; FERRAZ, R. P.; LIMA, G. D. A.; FERRAZ, R. P.; SANTOS, F. C.; DA MATTA, S. L. P.; NEVES, M. M. Effects of Sodium Arsenite and Arsenate in Testicular Histomorphometry and Antioxidants Enzymes Activities in Rats. *Biological Trace Element Research*, 1-10, 2015.

SOUZA, A. C. F.; MARCHESI, S. M.; FERRAZ, R. P.; LIMA, G. D. D.; OLIVEIRA, J. A.; NEVES, M. M. Effects of Sodium Arsenate and Arsenite on Male Reproductive Functions in Wistar Rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 1-13, 2016.

SUDJARWO, S. A.; SUDJARWO, G. W.; KOERNIASARI. Protective Effect of Curcumin Against Carbofuran-Induced Toxicity in Wistar Rats. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 36(1):73-86, 2017.

SULLIVAN R. Male fertility markers, myth or reality. *Animal Reproduction Science*. 82-83: 341-7, 2004.

SUN, HONG-JIE; XIANG, P.; LUO, J.; HONG, H.; LIN, H.; LI, HONG-BO; MA, L. Q. Mechanisms of arsenic disruption on gonadal, adrenal and thyroid endocrine systems in humans: a review. *Environment International*, 95:61-68, 2016.

SWIERSTRA, E. E. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis. *The Anatomical Record*, 161:171-186, 1968.

TOMAN, R.; MASSÁNYI, P.; ADAMKOVICOVA, M.; LUCKA, N.; CABAJ, M.; MARTINIAKOVA, M. Quantitative histological analysis of the mouse testis after the long-term administration of nickel in feed. *Journal of Environmental Science and Health - Part A. Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 47(9):1272-1279, 2012.

TRAVIÑO, J. R.; BASSOL-MAYAGOITIA, S.; HERNANDEZ-IBARRA, J. A.; RUIZ-FLORES, P.; NAVA-HERNANDEZ, M. P. Toxic Effect of Cadmium, Lead, and Arsenic on the Sertoli Cell: Mechanisms of Damage Involved. *Dna and Cell Biology*. 00(00):1-9, 2017.

TREMBLAY, J. J. Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells. *Steroids*, 103:3-10, 2015.

TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective. *Human Reproduction Update*, 14(3):243-258, 2008.

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 216:31-9, 2004.

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

VON BURG, R.; LIU, D. Chromium and hexavalent chromium. *Journal of Applied Toxicology*, 13:225-230, 1993.

WAALKES, M. P. Cadmium carcinogenesis in review. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 79:240–244, 2000.

WANG, L.; XU, T.; LEI, W.; LIU, D.; LI, Y.; XUAN, R.; MA, J. Cadmium-induced oxidative stress and apoptotic changes in the testes of freshwater Crab, *Sinopotamon henanense*. *PLoS ONE* 6, 1-8, 2011.

WORKING, P. K.; BUS, J.S.; HAMM, T.E. Reproductive effects of inhaled methyl chloride in the male Fischer rat spermatogonial toxicity and sperm quality. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 77:144-157, 1985.

YU, M. H.; TSUNODA, H., *Environmental toxicology: biological and health effects of pollutants*. CRC Press, 2:339, 2004.

ZEMANOVÁ, J.; LUKAC, N.; MASSANYI, P.; TRANDZIK, J.; BUROCZIOVA, M.; NAD, P.; CAPCAROVA, M.; STAWARZ, R.; SKALICKA, M.; TOMAN, R.; KORĚNEKOVA, B.; JAKABOVA, D. Nickel seminal concentrations in various animals and correlation to spermatozoa quality. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*, 54(6):281–286, 2007.

ZENG, Q.; FENG, W.; ZHOU, B.; WANG, Y.X.; HE, X.S.; YANG, P.; YOU, L.; YUE, J.; LI, Y. F.; LU, W. Q. Urinary metal concentrations in relation to sêmen quality: a cross-sectional study in China. *Environmental Science and Technology*, 49:5052–5059, 2015.

ZHITKOVICH, A. Chromium: exposure, toxicity and biomonitoring approaches. In: WILSON, SH.; SUK, WA. editors. *Biomarkers of Environmentally Associated Disease: Technologies, Concepts, and Perspectives*. CRC Press LLC; New York, 269-287, 2002.

ZÚCCARI, C. E. S. N. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNES), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, 1-121, 1998.

ANEXO I – TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros biométricos corporal e testicular de camundongos Swiss machos após exposição aguda de 1,5mg/kg de Arsenato, Arsenito, Cádmio, Chumbo, Cromo VI e Níquel.

	Controle	Arsenato	Arsenito	Cádmio	Chumbo	Cromo VI	Níquel
PC (g)	39,09 ± 2,81 ^a	39,54 ± 2,31 ^a	38,07 ± 3,20 ^a	36,84 ± 2,15 ^a	37,45 ± 2,32 ^a	38,36 ± 1,62 ^a	35,84 ± 2,89 ^a
PT (g)	0,21 ± 0,03 ^a	0,22 ± 0,02 ^a	0,22 ± 0,02 ^a	0,23 ± 0,02 ^a	0,22 ± 0,02 ^a	0,21 ± 0,02 ^a	0,21 ± 0,02 ^a
PA (g)	0,02 ± 0,01 ^a	0,01 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,01 ^a	0,01 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,01 ^a	0,02 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,01 ^a
PP (g)	0,19 ± 0,02 ^a	0,21 ± 0,02 ^a	0,19 ± 0,02 ^a	0,22 ± 0,02 ^a	0,19 ± 0,02 ^a	0,19 ± 0,02 ^a	0,18 ± 0,02 ^a

PC – peso corporal, PT – Peso testicular; PA – Peso da albugínea, PP - Peso do parênquima. Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Tabela 2 - Parâmetros biométricos dos órgãos que compõem o sistema reprodutor de camundongos Swiss machos após exposição aguda de 1,5mg/kg de Arsenato, Arsenito, Cádmio, Chumbo, Cromo VI e Níquel.

Pesos	Controle	Arsenato	Arsenito	Cádmio	Chumbo	Cromo VI	Níquel
Epidídimo	0,05 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,00 ^a	0,04 ± 0,00 ^a	0,05 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,00 ^a	0,04 ± 0,00 ^a
Relativo epidídimo	0,12 ± 0,02 ^a	0,10 ± 0,01 ^a	0,11 ± 0,01 ^a	0,13 ± 0,02 ^a	0,13 ± 0,03 ^a	0,11 ± 0,01 ^a	0,11 ± 0,02 ^a
Próstata ventral	0,14 ± 0,01 ^a	0,13 ± 0,01 ^a	0,17 ± 0,03 ^a	0,15 ± 0,02 ^a	0,17 ± 0,03 ^a	0,17 ± 0,03 ^a	0,14 ± 0,02 ^a
Relativo próstata ventral	0,35 ± 0,05 ^a	0,34 ± 0,03 ^a	0,45 ± 0,09 ^a	0,40 ± 0,03 ^a	0,45 ± 0,10 ^a	0,45 ± 0,07 ^a	0,39 ± 0,03 ^a
Vesícula seminal	0,36 ± 0,04 ^a	0,32 ± 0,06 ^a	0,29 ± 0,06 ^a	0,36 ± 0,05 ^a	0,33 ± 0,06 ^a	0,35 ± 0,07 ^a	0,36 ± 0,04 ^a
Relativo vesícula seminal	0,92 ± 0,09 ^a	0,81 ± 0,17 ^a	0,74 ± 0,09 ^a	0,97 ± 0,14 ^a	0,88 ± 0,16 ^a	0,92 ± 0,20 ^a	1,02 ± 0,18 ^a

Dados expressos com média ± DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Tabela 3 - Parâmetros morfométricos testiculares de camundongos Swiss após exposição aguda de 1,5mg/kg de Arsenato, Arsenito, Cádmio, Chumbo, Cromo VI e Níquel.

	Controle	Arsenato	Arsenito	Cádmio	Chumbo	Cromo VI	Níquel
DT (µm)	197,52 ± 8,60 ^a	198,31 ± 7,96 ^a	203,39 ± 5,46 ^a	200,66 ± 9,23 ^a	200,79 ± 13,15 ^a	194,19 ± 6,93 ^a	196,52 ± 7,32 ^a
AE(µm)	79,01 ± 3,79 ^a	78,96 ± 4,09 ^a	78,47 ± 5,01 ^a	79,82 ± 4,07 ^a	80,19 ± 3,29 ^a	79,65 ± 2,44 ^a	78,55 ± 2,83 ^a
DL(µm)	39,51 ± 8,53 ^a	40,38 ± 6,4 ^a	46,45 ± 9,33 ^a	41,02 ± 13,06 ^a	40,40 ± 8,45 ^a	34,88 ± 5,60 ^a	39,42 ± 11,34 ^a
CTS/t (m)	5,66 ± 1,02 ^a	6,26 ± 1,05 ^a	5,46 ± 0,52 ^a	6,42 ± 0,84 ^a	5,57 ± 0,62 ^a	5,80 ± 1,04 ^a	5,38 ± 0,93 ^a
CTS/gt (m/g)	27,33 ± 2,84 ^a	28,71 ± 2,76 ^a	24,36 ± 1,18 ^a	28,14 ± 3,00 ^a	25,61 ± 3,94 ^a	27,64 ± 3,11 ^a	29,18 ± 3,31 ^a
ArT (µm²x10⁴)	3,07 ± 0,27 ^a	3,09 ± 0,25 ^a	3,25 ± 0,17 ^a	3,17 ± 0,28 ^a	3,18 ± 0,40 ^a	2,96 ± 0,21 ^a	3,04 ± 0,23 ^a
ArL (µm²x10⁴)	0,13 ± 0,05 ^a	0,13 ± 0,04 ^a	0,18 ± 0,07 ^a	0,14 ± 0,09 ^a	0,13 ± 0,05 ^a	0,10 ± 0,03 ^a	0,13 ± 0,08 ^a
ArE (µm²x10⁴)	2,94 ± 0,24 ^a	2,96 ± 0,23 ^a	3,07 ± 0,18 ^a	3,02 ± 0,23 ^a	3,04 ± 0,36 ^a	2,87 ± 0,19 ^a	2,90 ± 0,16 ^a
RTE	1,04 ± 0,02 ^a	1,04 ± 0,01 ^a	1,06 ± 0,02 ^a	1,05 ± 0,03 ^a	1,04 ± 0,01 ^a	1,03 ± 0,01 ^a	1,04 ± 0,03 ^a

DT – Diâmetro de túbulo, AE - altura do Epitélio, DL - Diâmetro de Lume, CTS/t - Comprimento total de túbulo seminífero no testículo, CTS/gt - Comprimento total de túbulo seminífero por grama de testículo, ArT – área de túbulo, ArL – Área de Lume, ArE – Área de epitélio e RET – Relação túbulo/Epitélio. Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle (p ≤ 0,05) (Student Newman Keuls).

Tabela 4 – Percentual e volume dos componentes tubulares dos testículos de camundongos Swiss após exposição aguda de 1,5mg/kg de Arsenato, Arsenito, Cádmio, Chumbo, Cromo VI e Níquel.

	Controle	Arsenato	Arsenito	Cádmio	Chumbo	Cromo VI	Níquel
T (%)	91,76 ± 1,37 ^a	91,07 ± 1,20 ^a	91,38 ± 1,49 ^a	91,09 ± 1,75 ^a	91,44 ± 1,23 ^a	90,44 ± 1,74 ^a	90,96 ± 1,88 ^a
E (%)	79,12 ± 0,25 ^a	79,60 ± 1,53 ^a	76,58 ± 1,42 ^a	76,13 ± 1,81 ^b	75,01 ± 1,48 ^b	75,26 ± 2,18 ^b	75,21 ± 2,02 ^b
TP (%)	4,87 ± 0,67 ^a	5,23 ± 0,25 ^a	5,82 ± 1,06 ^a	7,58 ± 0,55 ^b	7,57 ± 0,92 ^b	7,68 ± 0,55 ^b	7,58 ± 0,45 ^b
L (%)	7,77 ± 1,99 ^a	7,24 ± 1,50 ^a	8,98 ± 2,00 ^a	7,38 ± 1,13 ^a	8,85 ± 1,42 ^a	7,50 ± 1,37 ^a	8,18 ± 1,77 ^a
VT (mL)	0,172 ± 0,02 ^a	0,192 ± 0,02 ^a	0,177 ± 0,02 ^a	0,202 ± 0,03 ^a	0,175 ± 0,02 ^a	0,170 ± 0,02 ^a	0,162 ± 0,02 ^a
VE (mL)	0,148 ± 0,02 ^a	0,165 ± 0,02 ^a	0,149 ± 0,01 ^a	0,169 ± 0,02 ^a	0,144 ± 0,01 ^a	0,142 ± 0,02 ^a	0,134 ± 0,02 ^a
VTP (mL)	0,009 ± 0,00 ^a	0,011 ± 0,00 ^a	0,011 ± 0,00 ^a	0,017 ± 0,00 ^b	0,014 ± 0,00 ^b	0,014 ± 0,00 ^b	0,014 ± 0,00 ^b
VL (mL)	0,014 ± 0,00 ^a	0,015 ± 0,00 ^a	0,018 ± 0,01 ^a	0,016 ± 0,00 ^a	0,017 ± 0,00 ^a	0,014 ± 0,00 ^a	0,014 ± 0,00 ^a

T– percentual de Túbulo seminífero, E - percentual de epitélio seminífero, TP – Percentual de Túnica Própria, L - Percentual de Lume, VT – Volume de Túbulo seminífero, VE – Volume de epitélio seminífero, VTP – Volume de Túnica Própria, VL - Volume de Lume. Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Tabela 5 - Número corrigido de células no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, razões entre os tipos celulares, número de células de Sertoli e produção espermática diária de camundongos Swiss após exposição aguda de 1,5mg/kg de Arsenato, Arsenito, Cádmio, Chumbo, Cromo VI e Níquel.

	Controle	Arsenato	Arsenito	Cádmio	Chumbo	Cromo VI	Níquel
Espermatogônia	2,02 ± 0,54 ^a	2,02 ± 0,54 ^a	1,86 ± 0,49 ^a	2,46 ± 0,40 ^a	1,96 ± 0,19 ^a	1,84 ± 0,29 ^a	1,82 ± 0,54 ^a
Preleptóteno/ Leptóteno	52,24 ± 4,76 ^a	53,10 ± 3,71 ^a	56,26 ± 5,03 ^a	55,32 ± 2,64 ^a	55,28 ± 5,15 ^a	52,04 ± 2,90 ^a	56,90 ± 5,83 ^a
Paquíteno	65,94 ± 6,03 ^a	82,00 ± 34,00 ^a	74,36 ± 9,50 ^a	83,76 ± 32,15 ^a	73,88 ± 7,04 ^a	70,84 ± 3,05 ^a	71,04 ± 5,26 ^a
Espermátide arredondada	126,10 ± 11,16 ^a	118,36 ± 10,50 ^a	129,72 ± 6,66 ^a	122,30 ± 5,92 ^a	120,20 ± 9,47 ^a	113,70 ± 6,46 ^a	115,30 ± 6,59 ^a
Célula de Sertoli	6,36 ± 3,71 ^a	7,96 ± 0,94 ^a	10,36 ± 4,03 ^a	8,62 ± 1,17 ^a	8,22 ± 1,23 ^a	8,64 ± 0,59 ^a	8,06 ± 1,07 ^a
Índice mitótico	28,96 ± 9,12 ^a	29,94 ± 8,39 ^a	33,31 ± 7,62 ^a	24,02 ± 3,27 ^a	29,42 ± 3,95 ^a	30,11 ± 4,41 ^a	35,81 ± 11,63 ^a
Índice meiótico	2,44 ± 0,14 ^a	2,01 ± 0,52 ^a	2,22 ± 0,19 ^a	2,02 ± 0,52 ^a	2,07 ± 0,15 ^a	2,03 ± 0,20 ^a	2,06 ± 0,14 ^a
Índice de Célula de Sertoli	13,10 ± 4,98 ^a	11,25 ± 2,23 ^a	10,17 ± 2,66 ^a	10,64 ± 1,28 ^a	10,85 ± 1,54 ^a	9,45 ± 0,14 ^a	10,29 ± 0,89 ^a
SER/Ts (x10⁻⁵)	0,88 ± 0,50 ^a	1,35 ± 0,35 ^a	1,49 ± 0,67 ^a	1,47 ± 0,34 ^a	1,15 ± 0,16 ^a	1,35 ± 0,20 ^a	1,15 ± 0,18 ^a
SER/gt (x10⁻⁵)	4,38 ± 2,56 ^a	6,07 ± 1,28 ^a	6,47 ± 2,31 ^a	6,43 ± 0,98 ^a	5,46 ± 0,82 ^a	6,42 ± 0,56 ^a	5,70 ± 0,70 ^a
CSS	23,75 ± 8,91 ^a	21,95 ± 3,74 ^a	18,88 ± 5,01 ^a	20,77 ± 1,94 ^a	20,76 ± 3,01 ^a	18,18 ± 0,76 ^a	20,06 ± 1,84 ^a
RGE	66,38 ± 10,58 ^a	74,21 ± 24,40 ^a	86,40 ± 22,32 ^a	58,44 ± 6,20 ^a	71,52 ± 9,28 ^a	73,01 ± 12,47 ^a	80,50 ± 27,95 ^a
PED/t (x10⁶)	15,41 ± 3,47 ^a	16,52 ± 3,33 ^a	15,26 ± 1,21 ^a	17,17 ± 2,70 ^a	13,69 ± 0,80 ^a	14,19 ± 2,49 ^a	13,12 ± 2,04 ^a
PED/gt (x10⁶)	72,86 ± 8,03 ^a	74,05 ± 10,11 ^a	67,85 ± 3,16 ^a	75,46 ± 10,58 ^a	65,10 ± 8,56 ^a	67,42 ± 6,82 ^a	64,91 ± 7,54 ^a

SER/Ts – Número de célula de Sertoli no testículo, SER/gt – Número de célula de Sertoli por grama de testículo, CSS – Capacidade de suporte de Sertoli, RGE – Rendimento geral da espermatogênese, PED/t – Produção espermática diária por testículo, PED/gt – Produção espermática diária por grama de testículo. Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Tabela 6 – Percentual dos componentes do intertúbulo testicular de camundongos Swiss após exposição aguda de 1,5mg/kg de Arsenato, Arsenito, Cádmio, Chumbo, Cromo VI e Níquel.

%	Controle	Arsenato	Arsenito	Cádmio	Chumbo	Cromo VI	Níquel
Intertúbulo	8,24 ± 1,37 ^a	8,93 ± 1,20 ^a	8,62 ± 1,49 ^a	8,91 ± 1,80 ^a	9,56 ± 1,74 ^a	8,56 ± 1,23 ^a	9,04 ± 1,88 ^a
Vaso sanguíneo	0,43 ± 0,22 ^a	0,49 ± 0,20 ^a	0,57 ± 0,12 ^a	0,63 ± 0,23 ^a	0,67 ± 0,20 ^a	0,58 ± 0,22 ^a	0,47 ± 0,20 ^a
Espaço Linfático	1,22 ± 0,79 ^a	1,34 ± 0,99 ^a	0,64 ± 0,26 ^a	0,95 ± 0,88 ^a	1,12 ± 0,77 ^a	0,73 ± 0,85 ^a	0,88 ± 0,64 ^a
Núcleo de Leydig	0,95 ± 0,27 ^a	1,21 ± 0,21 ^a	1,37 ± 0,34 ^a	1,15 ± 0,21 ^a	1,46 ± 0,48 ^a	1,20 ± 0,21 ^a	1,44 ± 0,43 ^a
Citoplasma de Leydig	5,44 ± 0,97 ^a	5,67 ± 0,69 ^a	5,77 ± 1,14 ^a	6,04 ± 1,59 ^a	6,20 ± 1,25 ^a	5,91 ± 1,05 ^a	6,03 ± 1,62 ^a
Leydig	6,39 ± 1,19 ^a	6,88 ± 0,84 ^a	7,14 ± 1,39 ^a	7,19 ± 1,77 ^a	7,66 ± 1,67 ^a	7,11 ± 1,23 ^a	7,47 ± 2,02 ^a
Tecido Conjuntivo	0,19 ± 0,13 ^a	0,22 ± 0,09 ^a	0,27 ± 0,20 ^a	0,13 ± 0,03 ^a	0,11 ± 0,05 ^a	0,14 ± 0,06 ^a	0,22 ± 0,11 ^a
Macrófago	0,00 ± 0,01 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a

Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Tabela 7 - Volume dos componentes do intertúbulo de camundongos Swiss após exposição aguda de 1,5mg/kg de Arsenato, Arsenito, Cádmio, Chumbo, Cromo VI e Níquel.

	Controle	Arsenato	Arsenito	Cádmio	Chumbo	Cromo VI	Níquel
Intertúbulo (mL)	0,015 ± 0,00 ^a	0,018 ± 0,00 ^a	0,016 ± 0,00 ^a	0,019 ± 0,00 ^a	0,017 ± 0,00 ^a	0,016 ± 0,00 ^a	0,015 ± 0,00 ^a
Vaso sanguíneo (mL)	0,007 ± 0,00 ^a	0,001 ± 0,00 ^a	0,001 ± 0,00 ^a	0,001 ± 0,00 ^a	0,001 ± 0,00 ^a	0,001 ± 0,00 ^a	0,001 ± 0,00 ^a
Espaço Linfático (mL)	0,002 ± 0,00 ^a	0,002 ± 0,00 ^a	0,001 ± 0,00 ^a	0,002 ± 0,00 ^a	0,002 ± 0,00 ^a	0,001 ± 0,00 ^a	0,001 ± 0,00 ^a
Núcleo de Leydig (mL)	0,001 ± 0,00 ^a	0,002 ± 0,00 ^a	0,002 ± 0,00 ^a	0,002 ± 0,00 ^a	0,002 ± 0,00 ^a	0,002 ± 0,00 ^a	0,002 ± 0,00 ^a
Citoplasma de Leydig (mL)	0,010 ± 0,00 ^a	0,011 ± 0,00 ^a	0,011 ± 0,00 ^a	0,013 ± 0,00 ^a	0,011 ± 0,00 ^a	0,011 ± 0,00 ^a	0,010 ± 0,00 ^a
Leydig (mL)	0,011 ± 0,00 ^a	0,014 ± 0,00 ^a	0,013 ± 0,00 ^a	0,015 ± 0,00 ^a	0,014 ± 0,00 ^a	0,013 ± 0,00 ^a	0,013 ± 0,00 ^a
Tecido Conjuntivo (mL)	0,000 ± 0,00 ^a	0,000 ± 0,00 ^a	0,000 ± 0,00 ^a	0,000 ± 0,00 ^a	0,000 ± 0,00 ^a	0,000 ± 0,00 ^a	0,000 ± 0,00 ^a
Macrófago (mL)	0,000 ± 0,00 ^a	0,000 ± 0,00 ^a	0,000 ± 0,00 ^a	0,000 ± 0,00 ^a	0,000 ± 0,00 ^a	0,000 ± 0,00 ^a	0,000 ± 0,00 ^a

Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Tabela 8 - Parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig de camundongos Swiss após exposição aguda de 1,5mg/kg de Arsenato, Arsenito, Cádmio, Chumbo, Cromo VI e Níquel.

	Controle	Arsenato	Arsenito	Cádmio	Chumbo	Cromo VI	Níquel
DNL (μm^3)	7,35 \pm 0,36 ^a	7,48 \pm 0,041 ^a	6,78 \pm 0,28 ^b	7,48 \pm 0,31 ^a	8,30 \pm 0,39 ^b	8,09 \pm 0,24 ^b	8,21 \pm 0,28 ^b
VNL (μm^3)	209,48 \pm 30,99 ^a	220,85 \pm 36,47 ^a	164,11 \pm 20,25 ^b	220,03 \pm 27,75 ^a	300,71 \pm 45,11 ^b	277,50 \pm 24,19 ^b	290,50 \pm 30,28 ^b
Vol. Cito. L (μm^3) x10²	12,40 \pm 2,82 ^a	10,46 \pm 1,76 ^a	7,07 \pm 1,63 ^b	11,47 \pm 2,17 ^a	13,38 \pm 3,34 ^a	13,74 \pm 1,63 ^a	12,38 \pm 2,27 ^a
VCL (μm^3) x10²	14,48 \pm 2,95 ^a	12,67 \pm 1,99 ^a	8,71 \pm 1,75 ^b	13,67 \pm 2,67 ^a	16,39 \pm 3,53 ^a	16,51 \pm 1,72 ^a	15,28 \pm 2,51 ^a
VL /t (μm^3) x10⁹	11,88 \pm 2,10 ^a	14,40 \pm 1,55 ^a	13,73 \pm 2,19 ^a	11,88 \pm 2,10 ^a	14,23 \pm 2,54 ^a	13,61 \pm 2,53 ^a	13,24 \pm 3,68 ^a
VL / gt (μm^3) x10⁹	58,03 \pm 11,30 ^a	66,59 \pm 7,88 ^a	61,75 \pm 11,81 ^a	69,69 \pm 16,50 ^a	68,76 \pm 14,23 ^a	62,25 \pm 10,53 ^a	64,05 \pm 13,96 ^a
Nº de CL / t x10⁶	8,47 \pm 2,17 ^a	11,63 \pm 2,36 ^a	16,22 \pm 3,69 ^b	11,66 \pm 22,26 ^a	8,95 \pm 2,37 ^a	8,21 \pm 0,94 ^a	8,80 \pm 2,56 ^a
Nº de CL / gt x10⁶	42,03 \pm 13,50 ^a	53,38 \pm 8,21 ^a	72,74 \pm 17,27 ^b	51,14 \pm 9,22 ^a	43,63 \pm 13,74 ^a	37,66 \pm 4,65 ^a	42,63 \pm 10,33 ^a
ILS (%)	0,03 \pm 0,01 ^a	0,04 \pm 0,00 ^a	0,04 \pm 0,00 ^a	0,04 \pm 0,01 ^a	0,04 \pm 0,01 ^a	0,04 \pm 0,01 ^a	0,04 \pm 0,01 ^a

DNL - Diâmetro Nuclear de Leydig, VNL - Volume do Núcleo de Leydig, Vol. Cito. L - Volume do Citoplasma de Leydig, VCL - Volume da Célula de Leydig, VL / t - Volume de Leydig no testículo, VL / gt - Volume de Leydig por grama de testículo, Nº de CL / t - Número de célula de Leydig no testículo, Nº de CL / gt - Número de célula de Leydig por grama de testículo, ILS - Índice Leydigossomático. Dados expressos como média \pm DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Tabela 9 – Motilidade e morfologia espermática de camundongos Swiss após exposição aguda de 1,5mg/kg de Arsenato, Arsenito, Cádmio, Chumbo, Cromo VI e Níquel.

	Controle	Arsenato	Arsenito	Cádmio	Chumbo	Cromo VI	Níquel
Motilidade (%)	71,25 ± 8,54 ^a	88,75 ± 6,29 ^a	52,5 ± 6,45 ^a	86,25 ± 4,79 ^a	73,75 ± 24,96 ^a	61,25 ± 10,31 ^a	43,75 ± 9,46 ^b
EMN (%)	35,67 ± 8,38 ^a	21,50 ± 7,55 ^a	23,25 ± 4,92 ^a	17,25 ± 7,97 ^a	20,00 ± 14,09 ^a	15,25 ± 7,80 ^b	14,00 ± 8,12 ^b
EMA (%)	64,17 ± 8,39 ^a	78,50 ± 7,55 ^a	76,75 ± 4,92 ^a	82,75 ± 7,97 ^b	80,00 ± 14,09 ^a	84,75 ± 7,80 ^b	86,00 ± 8,12 ^b
DPI (%)	0,00 ± 0,00 ^a	1,75 ± 1,71 ^a	2,00 ± 2,83 ^a	2,50 ± 1,29 ^a	10,00 ± 13,76 ^a	1,00 ± 0,82 ^a	2,75 ± 2,36 ^a
DC (%)	0,50 ± 1,00 ^a	4,75 ± 4,79 ^a	4,00 ± 1,83 ^a	6,75 ± 2,36 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	5,75 ± 5,74 ^a	4,75 ± 0,96 ^a
GC (%)	63,00 ± 9,63 ^a	65,75 ± 12,97 ^a	68,75 ± 6,80 ^a	72,00 ± 7,79 ^a	63,25 ± 18,17 ^a	76,50 ± 12,87 ^a	77,50 ± 11,00 ^a

EMN – Espermatozoide com morfologia normal, EMA – Espermatozoide com morfologia anormal, DPI – Defeito na peça intermediária, DC – Defeito de cauda, GC – Gota citoplasmática. Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Tabela 10 - Parâmetros de contagem espermática no testículo e epidídimo de camundongos Swiss após exposição aguda de 1,5mg/kg de Arsenato, Arsenito, Cádmio, Chumbo, Cromo VI e Níquel.

	Controle	Arsenato	Arsenito	Cádmio	Chumbo	Cromo VI	Níquel
Nº de espermátide /t	10,74 ± 0,62 ^a	4,31 ± 0,28 ^b	4,13 ± 0,65 ^b	4,87 ± 1,20 ^b	3,64 ± 0,87 ^b	3,60 ± 0,44 ^b	3,41 ± 0,55 ^b
Nº de espermátide /gt	164,41 ± 19,74 ^a	75,65 ± 15,40 ^b	48,75 ± 12,03 ^b	52,23 ± 10,66 ^b	35,36 ± 12,51 ^b	12,59 ± 16,19 ^b	28,55 ± 16,22 ^b
Prod. espermática diária /t	2,22 ± 0,13 ^a	0,89 ± 0,06 ^b	0,85 ± 0,13 ^b	1,01 ± 0,25 ^b	0,75 ± 0,18 ^b	0,74 ± 0,09 ^b	0,70 ± 0,11 ^b
Prod. espermática diária /gt	25,13 ± 2,58 ^a	9,54 ± 1,60 ^b	7,99 ± 1,54 ^b	9,78 ± 1,85 ^b	7,39 ± 1,81 ^b	6,82 ± 1,07 ^b	6,75 ± 1,14 ^b
Nº de espermatozoide CC/Org	269,69 ± 101,31 ^a	167,92 ± 21,22 ^a	184,69 ± 61,32 ^b	118,75 ± 20,16 ^b	133,44 ± 15,85 ^b	87,31 ± 43,77 ^b	123,44 ± 10,66 ^b
Nº de espermatozoide CC/g Org	6,37 ± 2,67 ^a	4,60 ± 0,51 ^a	4,47 ± 0,69 ^a	3,47 ± 0,47 ^a	3,65 ± 0,44 ^b	3,59 ± 0,23 ^b	3,57 ± 0,51 ^a
Tempo de trânsito CC (dias)	2,82 ± 1,00 ^a	5,16 ± 0,34 ^b	5,26 ± 0,47 ^b	3,39 ± 0,91 ^a	5,06 ± 1,02 ^b	4,87 ± 0,53 ^b	5,10 ± 0,48 ^b
Nº de espermatozoide C/Org	293,44 ± 74,15 ^a	207,50 ± 23,44 ^b	218,44 ± 29,70 ^b	188,44 ± 24,44 ^b	162,17 ± 15,17 ^b	191,25 ± 22,55 ^b	216,67 ± 8,58 ^b
Nº de espermatozoide C/g Org	3,32 ± 1,21 ^a	2,50 ± 0,93 ^a	2,91 ± 0,39 ^a	2,64 ± 0,46 ^a	2,12 ± 0,25 ^a	3,09 ± 0,29 ^a	3,16 ± 0,33 ^a
Tempo de trânsito C (dias)	1,51 ± 0,58 ^a	2,79 ± 0,94 ^a	3,53 ± 0,84 ^a	2,72 ± 0,65 ^a	2,98 ± 0,81 ^a	4,26 ± 0,89 ^b	4,64 ± 1,11 ^b

Prod. – Produção, t – testículo, gt – grama de testículo, CC – Cabeça/corpo, C – Cauda, Org – Órgão (epidídimo). Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

ANEXO II – FIGURAS

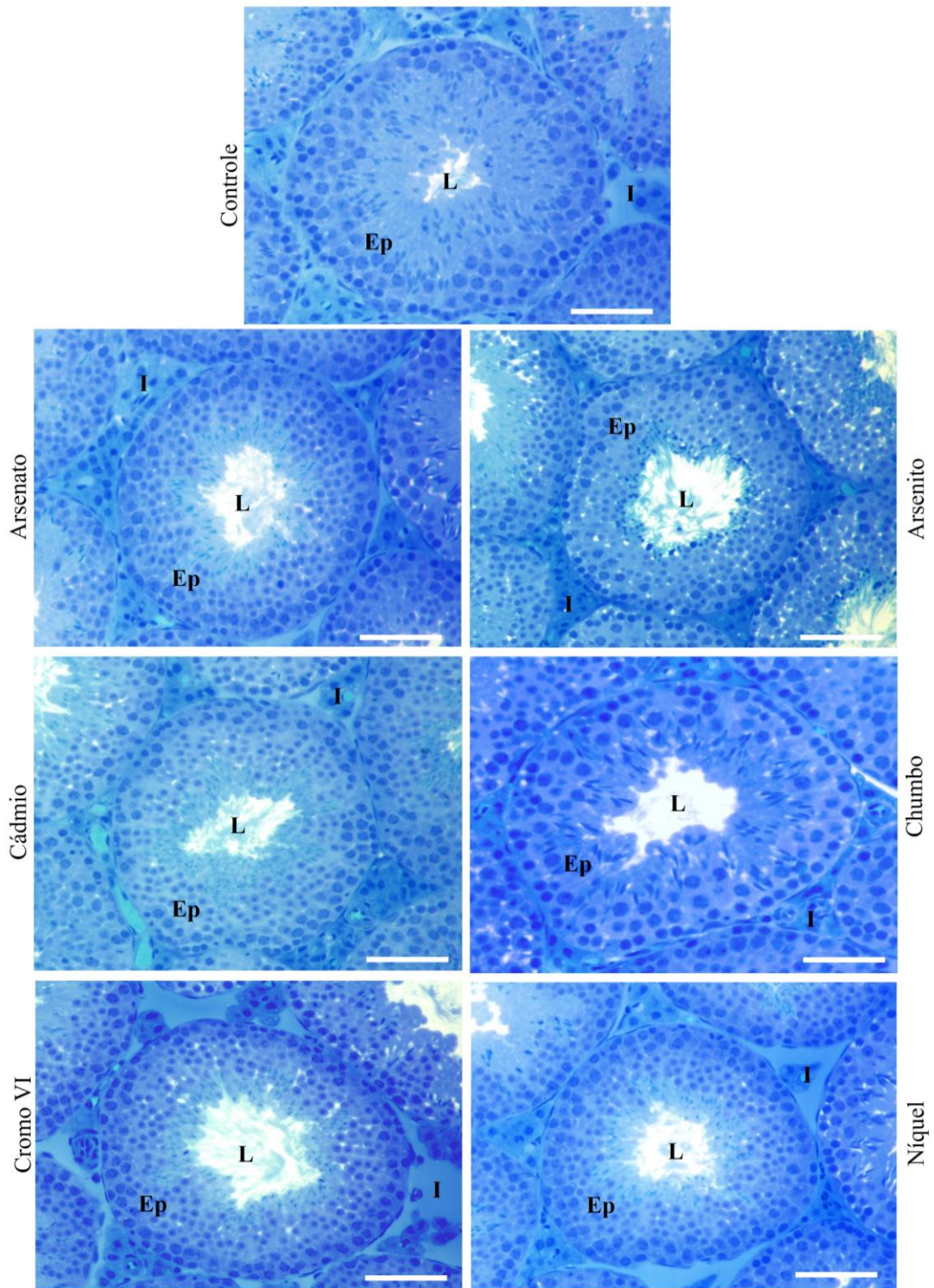


Figura 1: Fotomicrografia testicular de camundongos Swiss machos após exposição aguda de 1,5mg/kg de Arsenato, Arsenito, Cádmio, Chumbo, Cromo VI e Níquel. L – Lume, Ep - Epitélio seminífero, I – Intertúbulo. Corte de 3 µm corado com azul de toluidina Barra = 20µm.

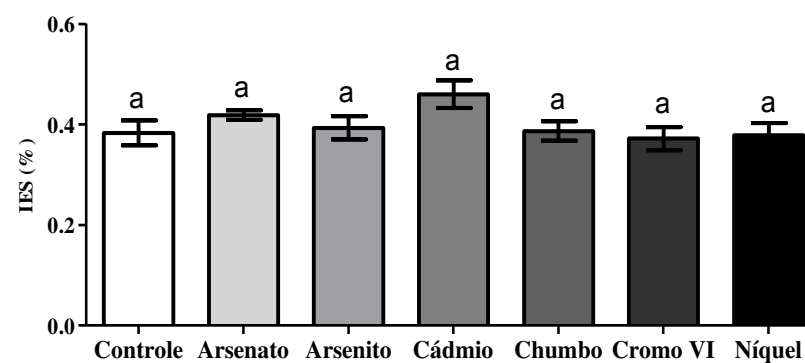
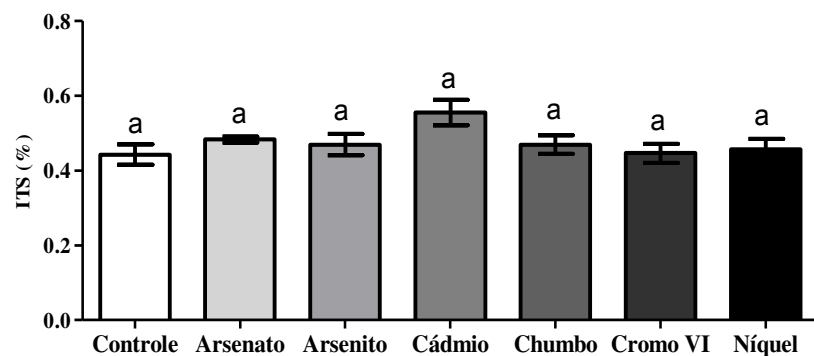
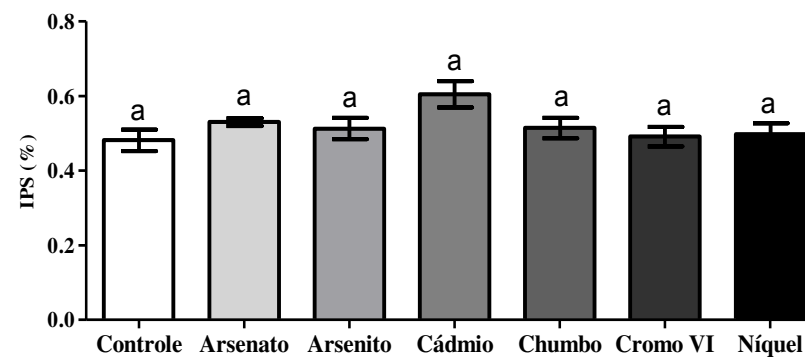
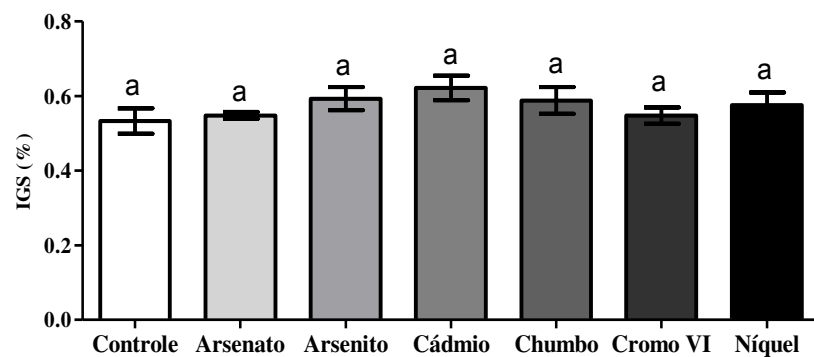


Figura 2: Percentual dos índices gonadosomático (IGS), parenquimossomático (IPS), tubulossomático (ITS) e epiteliossomático (IES) de camundongos Swiss machos após exposição aguda de 1,5mg/kg de Arsenato, Arsenito, Cádmio, Chumbo, Cromo VI e Níquel. Dados expressos como média \pm DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

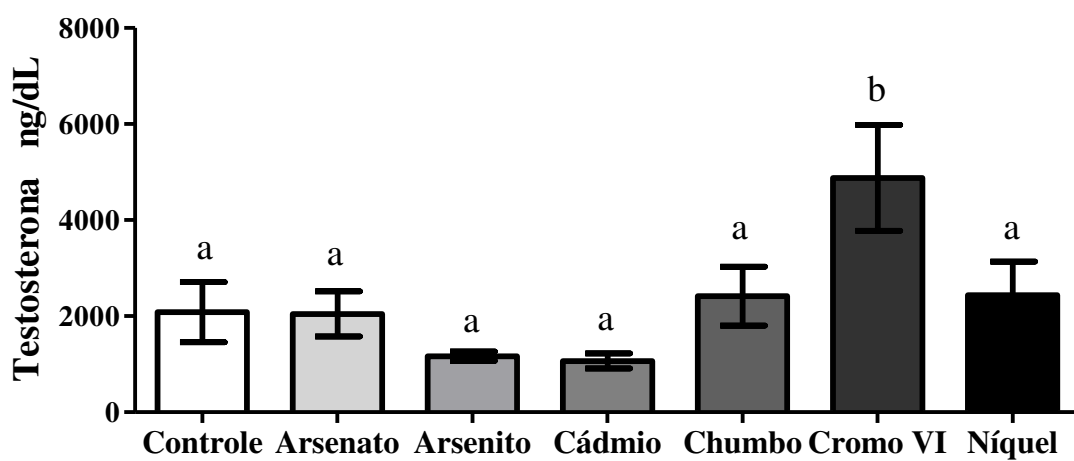


Figura 3: Concentração de testosterona plasmática total de camundongos Swiss machos após exposição aguda de 1,5mg/kg de Arsenato, Arsenito, Cádmio, Chumbo, Cromo VI e Níquel. Dados expressos como média \pm DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

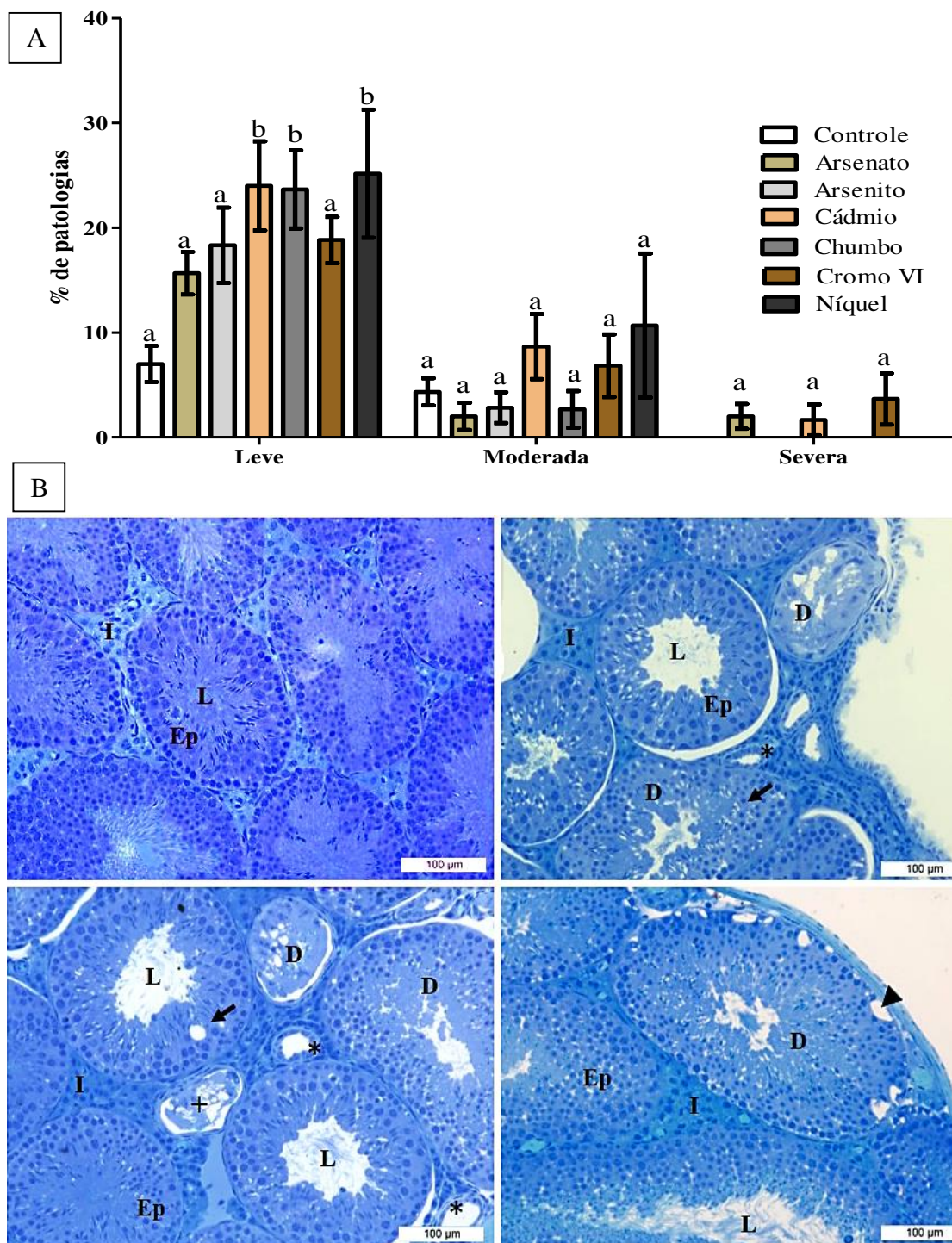


Figura 4: A – Proporção dos túbulos com patologias nos testículos de camundongos Swiss após exposição aguda de 1,5mg/kg de Arsenato, Arsenito, Cádmio, Chumbo, Cromo VI e Níquel. Dados expressos como média \pm DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls). B – Secções histológicas dos testículos, evidenciando patologias. Ep – Epitélio seminífero, L – Lume, I - Intertúbulo, Seta – vacúolos no ápice, Ponta da seta – vacúolos na base, * - Túbulo seminífero apenas com células de Sertoli, D – Descamação, + - Túbulo seminífero desprovido de células germinativas. Corte de 1 μ m corado com azul de toluidina.

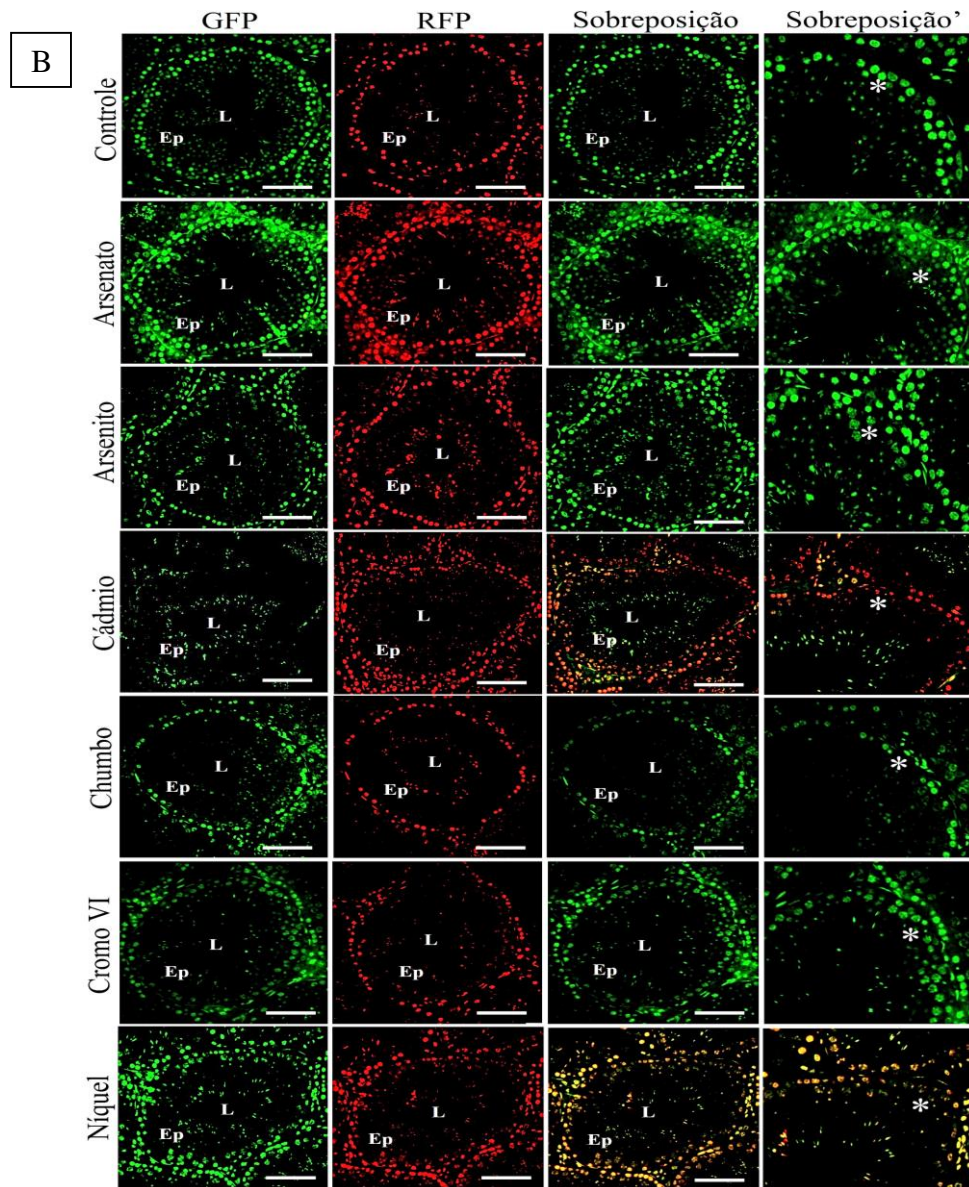
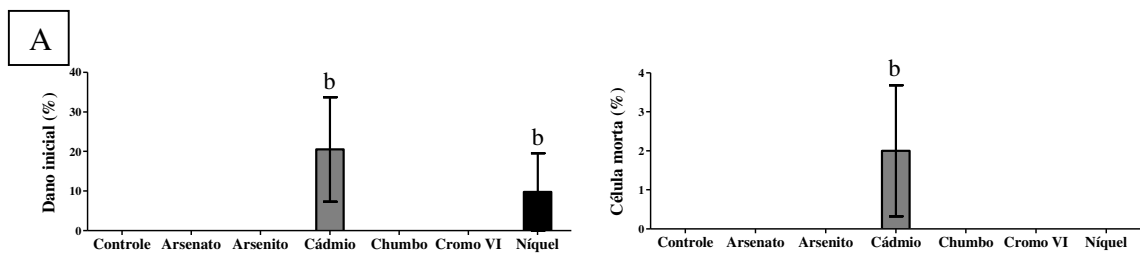


Figura 5: A - Percentual de células com dano inicial e de células mortas, B - Secções histológicas de testículo de camundongos Swiss após exposição aguda de 1,5mg/kg de Arsenato, Arsenito, Cádmió, Chumbo, Cromo VI e Níquel. Laranja de acridina e Iodeto de propídio, dupla marcação para detecção de morte celular. Filtro GFP (50nm), Filtro RFP (580nm), Sobreposição' – ampliação. Ep – Epitélio seminífero, L – Lume, * - células germinativas. Núcleos verdes – células viáveis, Núcleos amarelos – células com processo inicial de morte e Núcleos vermelhos – células mortas. Dados expressos como média \pm DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls). Barra = 50 μ m.

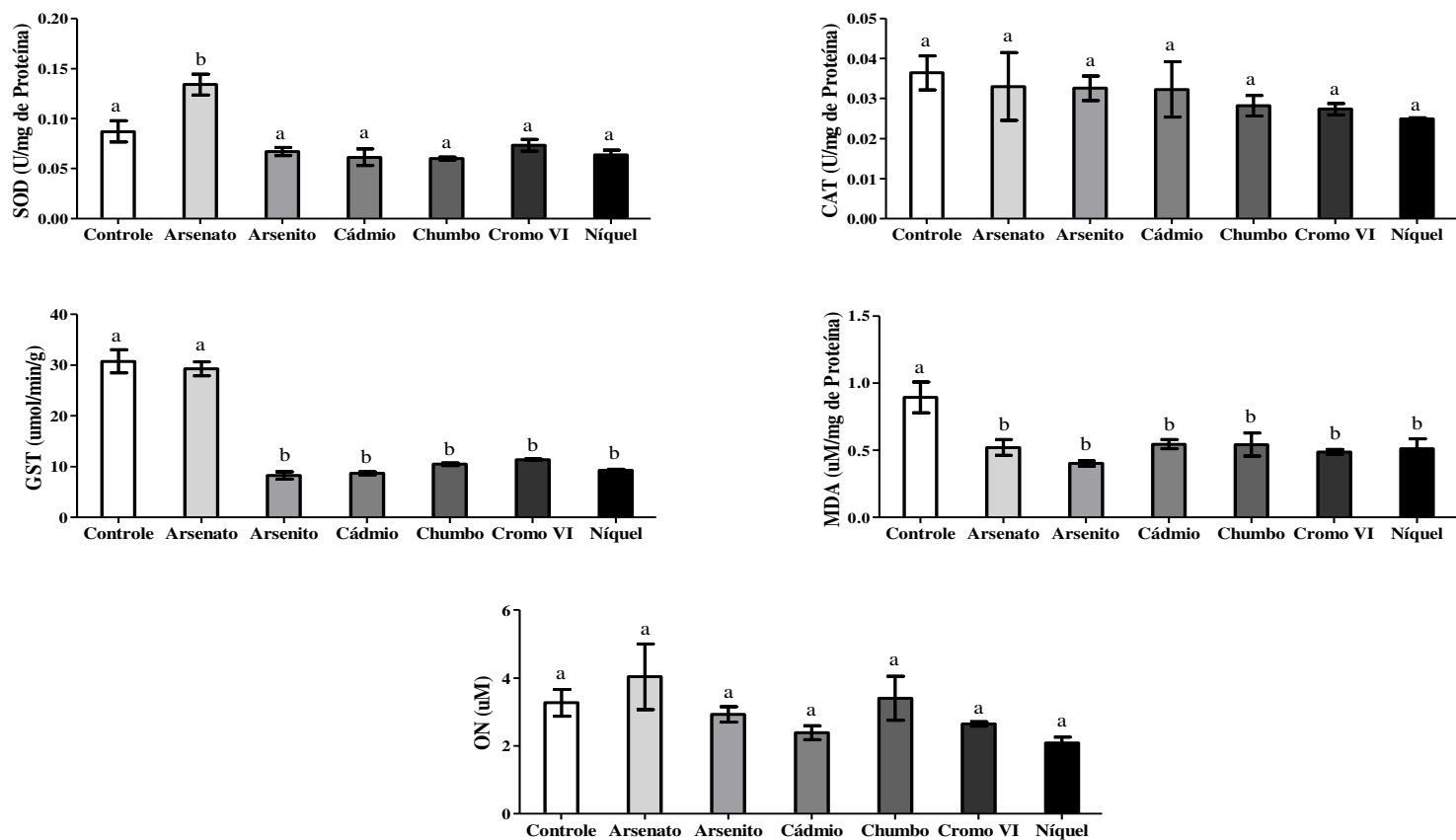
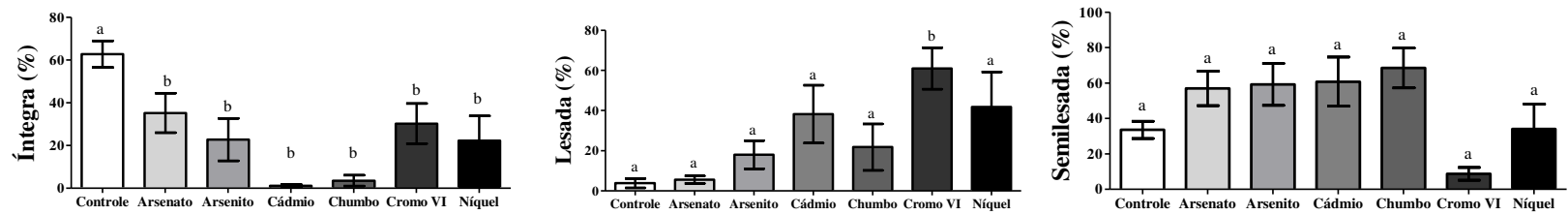


Figura 6: Atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GST) e metabólitos de peroxidação lipídica (MDA) e estresse nitroso (ON) do testículo de camundongos Swiss após exposição aguda de 1,5mg/kg de Arsenato, Arsenito, Cádmio, Chumbo, Cromo VI e Níquel. SOD: Superóxido dismutase, CAT: Catalase, GST: Glutiona-S-transferase, MDA: Malondialdeído e ON: Óxido Nítrico. Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

A



B

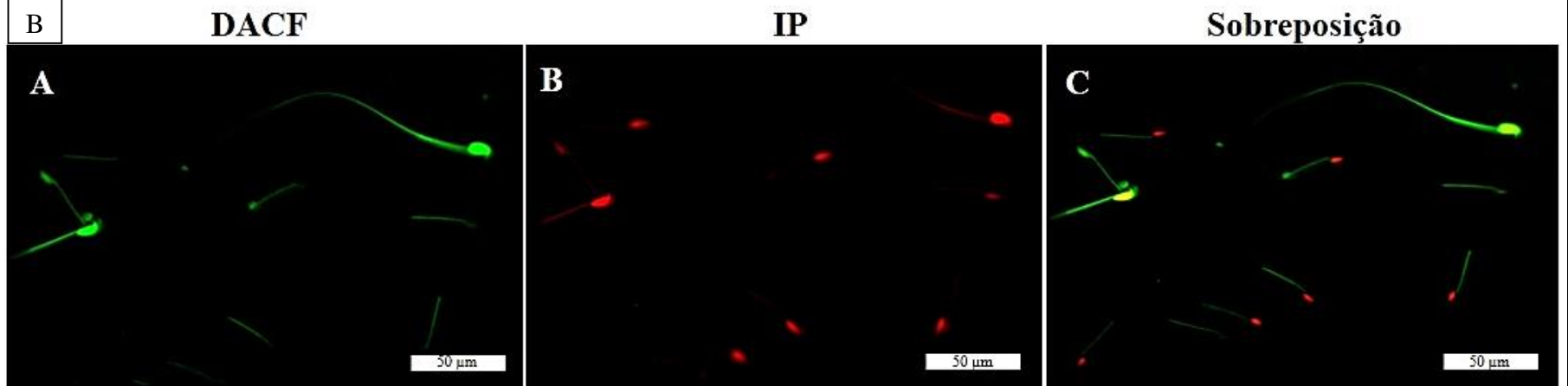


Figura 7: A - Percentual de espermatozoides íntegros, lesados e semilesados de camundongos Swiss após exposição aguda de 1,5mg/kg de Arsenato, Arsenito, Cádmio, Chumbo, Cromo VI e Níquel, marcados com diacetato de carboxifluoresceína (DACF) e Iodeto de Propídio (IP). B - Representação da marcação dos espermatozoides com DACF, IP e sobreposição das imagens Núcleos verdes – espermatozoides com membrana íntegra, Núcleos amarelos – espermatozoides com membrana semilesada e Núcleos vermelhos – espermatozoides com membrana lesada. Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

ANEXO III – RESUMO DOS RESULTADOS

Tabela 1 – Parâmetros biométricos e tubulares

Parâmetros	Arsenato	Arsenito	Cádmio	Chumbo	Cromo VI	Níquel
Biometria corporal e dos órgãos do sistema reprod.	-	-	-	-	-	-
Índice gonadossomático	-	-	-	-	-	-
Índice parenquimossomático	-	-	-	-	-	-
Índice tubulossomático	-	-	-	-	-	-
Índice epiteliossomático	-	-	-	-	-	-
Diâmetro de Túbulo	-	-	-	-	-	-
Altura de Epitélio	-	-	-	-	-	-
Diâmetro de Lúmen	-	-	-	-	-	-
Comprimento do Túbulo Seminífero /t	-	-	-	-	-	-
Comprimento do Túbulo Seminífero /gt	-	-	-	-	-	-
Área de Túbulo	-	-	-	-	-	-
Área de Lume	-	-	-	-	-	-
Área de Epitélio	-	-	-	-	-	-
Relação Túbulo/Epitélio	-	-	-	-	-	-
% Túbulo	-	-	-	-	-	-
% Epitélio	-	-	↑	↑	↑	↑
% Túnica própria	-	-	↑	↑	↑	↑
% Lume	-	-	-	-	-	-
Volume de túbulo e epitélio	-	-	-	-	-	-
Volume de túnica própria	-	-	↑	↑	↑	↑
Volume de lume	-	-	-	-	-	-
Nº corrigido de células no estágio 1	-	-	-	-	-	-
Razões entre os tipos celulares	-	-	-	-	-	-
Nº de células de Sertoli	-	-	-	-	-	-
Produção espermática diária	-	-	-	-	-	-
Células tubulares com dano inicial	-	-	↑	-	-	↑
Células tubulares mortas	-	-	↑	-	-	-
Histopatologias tubulares leves	-	-	↑	↑	-	↑
Histopatologias tubulares moderadas e severas	-	-	-	-	-	-

↑ - aumento, t – testículo e gt – grama de testículo.

Tabela 2 – Parâmetros intertubulares e da testosterona

Parâmetros	Arsenato	Arsenito	Cádmio	Chumbo	Cromo VI	Níquel
% dos componentes do intertúbulo	-	-	-	-	-	-
Vol. dos componentes do intertúbulo	-	-	-	-	-	-
Diâmetro nuclear de Leydig	-	↓	-	↑	↑	↑
Volume do núcleo de Leydig	-	↓	-	↑	↑	↑
Volume do citoplasma de Leydig	-	↓	-	-	-	-
Volume de célula de Leydig	-	↓	-	-	-	-
Volume de Leydig /t	-	-	-	-	-	-
Volume de Leydig /gt	-	-	-	-	-	-
Nº de célula de Leydig /t	-	↑	-	-	-	-
Nº de célula de Leydig /gt	-	↑	-	-	-	-
Índice Leydigossomático (%)	-	-	-	-	-	-
Testosterona	-	-	-	-	↑	-

↑ - aumento, ↓ - redução, t – testículo e gt – grama de testículo.

Tabela 3 – Estresse oxidativo testicular

Parâmetros	Arsenato	Arsenito	Cádmio	Chumbo	Cromo VI	Níquel
Superóxido Dismutase	↑	-	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-	-	-
Glutathiona-S-Transferase	-	↓	↓	↓	↓	↓
Malondialdeído	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Óxido Nítrico	-	-	-	-	-	-

↑ - aumento e ↓ - redução.

Tabela 4 – Parâmetros espermáticos e epididimários

Parâmetros	Arsenato	Arsenito	Cádmio	Chumbo	Cromo VI	Níquel
Motilidade	-	-	-	-	-	↓
Espermatozoide com morfologia normal	-	-	-	-	↓	↓
Espermatozoide com morfologia anormal	-	-	↑	-	↑	↑
Defeitos de peça intermediária	-	-	-	-	-	-
Defeitos de cauda	-	-	-	-	-	-
Gota citoplasmática	-	-	-	-	-	-
Nº de espermatozoides /t	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Nº de espermatozoides /gt	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Produção espermática diária /t	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Produção espermática diária /gt	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Nº de espermatozoides CC/Org	-	↓	↓	↓	↓	↓
Nº de espermatozoides CC/g Org	-	-	-	-	-	-
Tempo de trânsito CC (dias)	↑	↑	-	↑	↑	↑
Nº de espermatozoides C /Org	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Nº de espermatozoides C /g Org	-	-	-	-	-	-
Tempo de trânsito C (dias)	-	-	-	-	↑	↑
Espermatozoide com membrana íntegra	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Espermatozoide com membrana lesada	-	-	-	-	↑	-
Espermatozoide com membrana semilesada	-	-	-	-	-	-

↑ - aumento, ↓ - redução, CC – cabeça e corpo do epidídimo, C – cauda do epidídimo, t – testículo e gt – grama de testículo.