



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO ASCÓRBICO E
ZINCO NA MORFOLOGIA TESTICULAR DE RATOS WISTAR
EXPOSTOS AO ARSENITO DE SÓDIO

LUCIANA SCHULTHAIS ALTOÉ

VITÓRIA
2016



Luciana Schulthais Altoé

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO ASCÓRBICO E
ZINCO NA MORFOLOGIA TESTICULAR DE RATOS WISTAR
EXPOSTOS AO ARSENITO DE SÓDIO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Espírito
Santo, como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas, do Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Castro Monteiro Pirovani

VITÓRIA

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

Altoé, Luciana Schulthais, 1990 -

A469a Influência da suplementação com ácido ascórbico e zinco na
 morfologia testicular de ratos Wistar expostos ao arsenito de sódio /
 Luciana Schulthais Altoé – 2016.

70 f. : il.

Orientador: Juliana Castro Monteiro Pirovani.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Metais Pesados. 2. Ação Antioxidante. I. Pirovani, Juliana
Castro Monteiro. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de
Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 615

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e realização do mestrado.

À Deus por guiar o meu caminho e me proporcionar conhecer tantas pessoas maravilhosas e de bom coração.

Aos meus pais, Lourdes e Paulo, com toda minha gratidão e carinho, pelo incentivo. Em especial à minha mãe, quem mais do que ninguém sonhou esse sonho junto comigo.

Ao bonde: Yasmim, Gregorye, Naizillah e Vinicius, pela amizade de sempre, por ouvirem meus desabafos e por muitas vezes acreditarem na minha capacidade, quando eu mesma duvidava que conseguiria. Amo demais vocês!

As professoras Paola Rocha Gonçalves e Valquíria de Bortoli por terem aceitado compor a banca de qualificação, pelas palavras doces de incentivo, pelos elogios, críticas e sugestões.

Ao professor Gustavo Rocha Leite pela orientação em relação à estatística do meu trabalho.

Ao professor Marcos de Lucca Moreira Gomes pelo incentivo, pelas sugestões valiosas e correções atribuídas a este trabalho.

À professora Mary Anne Heidi Dolder, por disponibilizar a estrutura do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Biologia da Reprodução da UNICAMP durante a realização de parte da metodologia deste trabalho. As alunas Celina e Cris pelos ensinamentos e paciência, à Bruna, Lívia e Ianny por dividirem seus espaços comigo durante o meu tempo em Campinas.

Aos alunos do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural do CEUNES: Ana Maria, Aline, Lorena, Andressa, Max e Niumaique pelo acolhimento, por tornarem o trabalho mais leve, com os momentos de descontração, pela companhia no almoço e cafezinho, por toda ajuda e paciência comigo. Como disse a Andressa, “não podemos perder o contato”.

À Ianny por estar sempre disposta a ajudar, por ter me recebido tão bem em Campinas, pela paciência, pela imensa contribuição durante o meu trabalho e pela amizade que construímos.

Aos professores da banca examinadora da dissertação, pela disponibilidade e pelas considerações que certamente contribuirão para a melhoria deste trabalho.

Por fim, agradeço a minha orientadora, Juliana Castro Monteiro Pirovani, pela pessoa que é, pela oportunidade de realizar esse projeto, pela competência, pelo apoio, pelos ensinamentos, pela amizade e pela confiança depositada em mim, que tornaram o trabalho prazeroso e fizeram apaixonar-me pela área. Meu muito obrigada e eterna admiração.

RESUMO

Pesquisas têm apontado que a exposição ao metal pesado arsênio, um contaminante ambiental, pode resultar em efeitos tóxicos, agudos ou crônicos, ocasionando diferentes patologias, inclusive podendo levar a danos na fertilidade masculina. Substâncias com potencial ação protetora vêm sendo investigadas. Entre elas estão o zinco e a vitamina C, ambas com conhecida ação antioxidante, sendo cofatores da divisão celular e exercendo importante papel na reprodução. O objetivo do presente estudo foi avaliar a função testicular de ratos expostos ao arsênio, na forma de arsenito de sódio, e o possível papel protetor da administração concomitante de zinco ou da vitamina C através da realização de análises seminais, biométricas e morfológicas (morfometria e estereologia) do testículo. Ratos Wistar (60 dias de idade) foram divididos em seis grupos, com seis animais cada: (1) controle (água destilada), (2) arsenito de sódio (5 mg/kg/dia), (3) vitamina C (100 mg/kg/dia), (4) cloreto de zinco (20 mg/kg/dia), (5) arsenito de sódio e vitamina C e (6) arsenito de sódio e cloreto de zinco. A administração das dosagens foi realizada diariamente por gavagem, durante 60 dias. Ao final do período de tratamento, os animais foram eutanasiados, os testículos e órgãos acessórios foram coletados e pesados e fragmentos do ducto deferente foram coletados para análises seminais. Em seguida, fragmentos de testículos foram processados para análise em microscopia de luz. Não foram observadas alterações significativas na biometria dos animais tratados, porém alterações nas células de Leydig e nos túbulos seminíferos foram notadas. O arsênio reduziu o diâmetro dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio germinativo, resultando em um menor número de espermatídes por grama de testículo. A vitamina C e o zinco foram capazes de proteger as células de Leydig e a proporção de espermatozoides normais dos efeitos do arsênio. Conclui-se que a exposição crônica ao arsenito de sódio altera o processo espermatogênico, reduzindo o número total de espermatozoides normais, o que pode levar redução da fertilidade em ratos e que a administração concomitante de zinco ou vitamina C mesmo não sendo capaz de neutralizar o dano numérico levou ao aumento da proporção de espermatozoides normais.

Palavras chave: metal pesado, sistema reprodutor masculino, antioxidante, morfometria.

ABSTRACT

Morphological evaluation of antioxidant supplementation of zinc and vitamin C on the testis Wistar male rat exposed to sodium arsenite

Several studies has shown that exposure to heavy metal arsenic, an environmental contaminant, may result in toxic effects, acute or chronic, causing different disorders, including potentially leading to damage to male fertility. Substances with potential protective action has been investigated. These include zinc and vitamin C, substances with known antioxidant action, are cofactors of cell division and playing an important role in reproduction. The aim of this study was to evaluate testicular function in rats exposed to arsenic in the form of sodium arsenite, and the possible protective role of co-administration of zinc or vitamin C by seminal, biometric and morphological (morphometry and stereology) analysis of the testis. Male Wistar rats (60 days old) were divided into six groups of six animals each: (1) control (distilled water), (2) sodium arsenite (5 mg/kg), (3) vitamin C (100 mg/kg) (4) zinc chloride (20 mg/kg), (5) sodium arsenite and vitamin C and (6) sodium arsenite and zinc chloride. The dosages were administered daily by gavage for 60 days. At the end of the treatment period, all animals were sacrificed and testis and accessory organs were removed and weighed. Testis fragments were processed for analysis by light microscopy and one centimeter of the deferens duct was removed for seminal analysis. There were no significant changes in the biometrics in any groups, but changes in the Leydig cells and in the seminiferous tubules were showed. Arsenic reduces the tubular diameter and the germinal epithelium height, resulting in a lower number of spermatids per testicle gram. Vitamin C and zinc were able to protect the Leydig cells and the proportion of normal spermatozoa of arsenic effects. It can be concluded that chronic exposure to sodium arsenite alter the spermatogenic process, reducing the total number of normal sperm, which can lead reduce fertility in male rats, and that co-administration of vitamin C or zinc although not able to neutralize the numerical damage can increase the proportion of normal spermatozoa.

Keywords: heavy metal, male reproductive system, antioxidant, morphometry.

SUMÁRIO

1. Introdução	8
1.1 Sistema reprodutor masculino.....	9
1.2 Estresse oxidativo e o sistema antioxidante.....	12
1.3 Arsênio	14
1.4 Vitamina c como um antioxidante	18
1.5 A ação do zinco no sistema antioxidante.....	19
2. Objetivos.....	22
2.1 Geral.....	22
2.2 Específicos	22
3. Material e métodos.....	23
3.1 Grupos experimentais	23
3.2 Coleta e processamento das amostras biológicas	24
3.3 Análises biométricas	24
3.4 Análises morfométricas e estereológicas	24
3.4.1 Proporções volumétricas (%) e volumes dos componentes do parênquima testicular	25
3.4.2 Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos.....	25
3.4.3 Volume e número de células de leydig por testículo	26
3.4.4 Contagens celulares no epitélio seminífero.....	26
3.4.5 Razões entre os números celulares.....	27
3.5 Contagem de espermátides, produção espermática diária e tempo de trânsito epididimal.....	27
3.6 Morfologia espermática.....	28
3.7 Análises estatísticas	28
4. Resultados	29
4.1 Parâmetros biométricos	29
4.2 Proporções volumétricas (%) e volumes dos componentes do parênquima testicular	29
4.3 Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos.....	32
4.4 Morfometria e estereologia das células de leydig.....	35
4.5 Contagem da população celular no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero.....	39
4.6 Razões entre os números celulares.....	39
4.7 Contagem de espermátides, produção diária espermática e tempo de trânsito epididimal.....	41

4.8 Morfologia dos espermatozoides	43
6. Conclusão	52
7. Referências bibliográficas	53

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da expansão industrial, do crescimento populacional e, por consequência, da maior demanda por bens de consumo, tem-se produzido quantidades relevantes de resíduos sólidos, sendo esta uma preocupação ambiental (LEITE *et al.*, 2004). Dentre estes resíduos, deve ser dada maior atenção aos metais, especialmente por serem elementos não degradáveis, podendo bioacumular e biomagnificar ao longo da cadeia trófica, causando uma série de distúrbios nos organismos expostos (MURUGESAN *et al.*, 2006; TCHOUNWOU *et al.*, 2012).

Quando absorvidos pelo organismo, os metais geralmente são captados por proteínas sanguíneas e levados até tecidos onde são estocados ou biotransformados (HEATH, 1995). O efeito tóxico se dá devido à formação de complexos com os grupos funcionais das enzimas e/ou pela ligação dos metais com as membranas celulares, dificultado transporte de moléculas essenciais (GOLDHABER, 2003).

Estudos têm revelado a possível relação da exposição aos poluentes com o aumento do número de casos de distúrbios reprodutivos (DALLINGA *et al.*, 2002; MEHTA & KUMAR, 2003; CARVALHO *et al.*, 2010; PREDES *et al.*, 2011; RZYMSKI *et al.*, 2015). Com relação à espermatogênese, de forma geral, os metais induzem disfunção testicular, podendo gerar distúrbios nas células de Sertoli, responsáveis pela sustentação das células germinativas, ou nas células de Leydig, especializados na produção de andrógenos (MONSEES *et al.*, 2000; BIZARRO *et al.*, 2003). Em roedores, a exposição ao arsenito de sódio leva ao acúmulo significativo dessa substância nos testículos, vesícula seminal e próstata ventral, com a ocorrência de dano nas células germinativas (PANT *et al.*, 2004; KHAN & HO, 2011; REDDY *et al.*, 2011) e diminuição da concentração de hormônios que regulam a espermatogênese (JANA *et al.*, 2006; MUTHU, & PRABU, 2012; ALI *et al.*, 2013).

Com a crescente contaminação ambiental por metais, busca-se com esta pesquisa verificar os efeitos da exposição crônica ao arsenito de sódio no sistema reprodutor masculino, uma substância que se encontra em abundância na natureza, em solos, rochas, água, no ar e em organismos vivos, proveniente não só de origem natural, mas também de fontes antropogênicas (KOSTAL *et al.*, 2004). Além disso, foi avaliada se a suplementação com zinco ou vitamina

C é capaz de prevenir os danos causados pelo arsênio sobre o sistema reprodutor masculino de ratos Wistar.

1.1 SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

O sistema reprodutor masculino dos mamíferos é composto por testículos (gônadas), epidídimos, ductos deferentes, glândulas sexuais e órgão copulador (Figura 1). Este sistema é responsável pela produção, transporte e eliminação dos gametas masculinos para o meio externo e também pela produção e secreção de testosterona, o hormônio sexual masculino (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

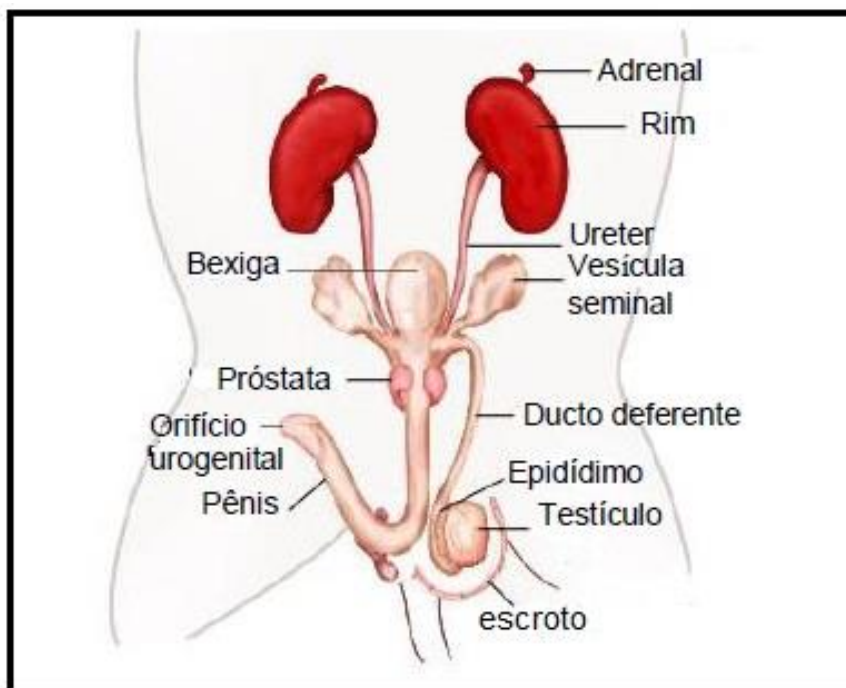


Figura 1. Desenho esquemático do sistema urogenital de rato (Adaptado de SANTOS, 2012).

Os testículos são órgãos pares, revestidos por tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea, da qual são emitidos septos para o interior dos testículos até o mediastino, o que divide este órgão em lóbulos (Figura 2). Estes órgãos produzem espermatozoides e hormônios andrógenos e são histologicamente e funcionalmente divididos em dois compartimentos: o tubular e o intertubular ou intersticial (RUSSELL *et al.*, 1990a; FRANÇA & GODINHO, 2003). O compartimento tubular é formado pelos túbulos seminíferos, constituídos por túnica própria, epitélio germinativo e lúmen. As células germinativas e de Sertoli estão presentes e formam o epitélio germinativo. Já o intertúbulo é

formado pelas células de Leydig que representam a porção endócrina dos testículos, e por células pertencentes ao tecido conjuntivo propriamente dito (macrófagos, mastócitos e fibroblastos), além de vasos sanguíneos e linfáticos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

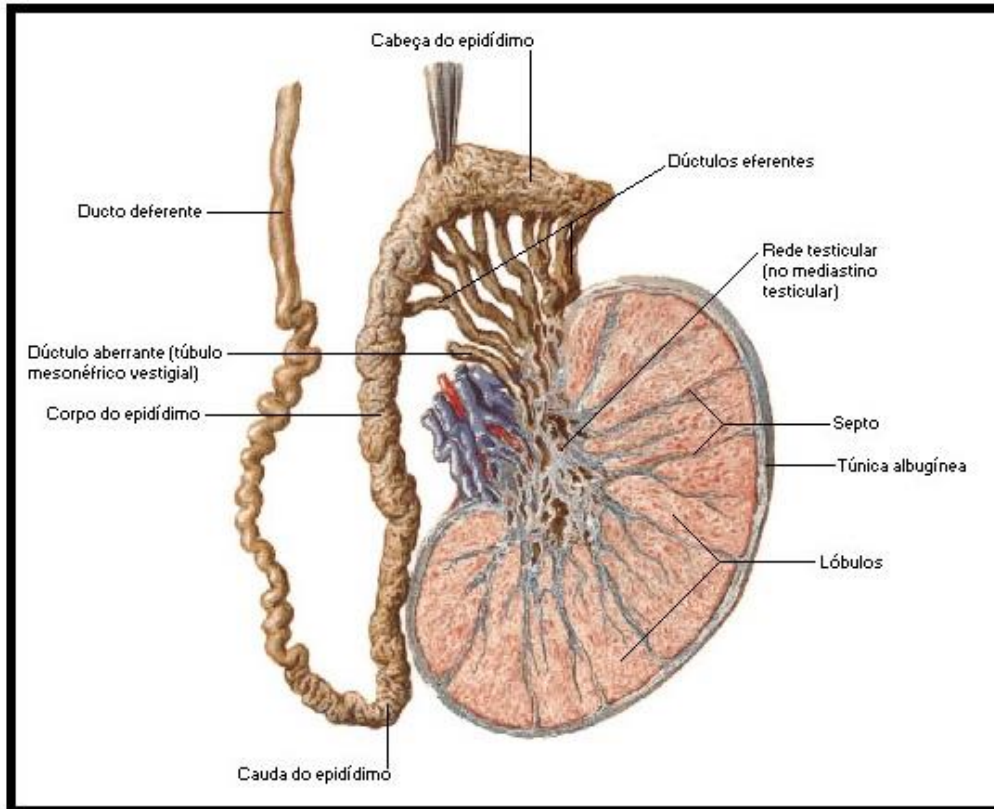


Figura 2. Estrutura anatômica do testículo humano (Adaptado de NETTER, 2000).

As células de Leydig são reguladas pelo eixo hipotálamo-hipófise-testículo e produzem a testosterona; um hormônio que possui ação parácrina ao se difundir para os túbulos seminíferos, atravessando com facilidade a barreira hematotesticular (WEINBAUER & WESSELS, 1999). A testosterona é essencial para o surgimento dos caracteres sexuais secundários na adolescência, para a manutenção do processo espermatogênico, para o controle da função de glândulas acessórias e para o comportamento sexual - a libido (HAIDER *et al.*, 2007).

As células de Sertoli dão suporte ao processo espermatogênico e sintetizam a proteína ligadora de andrógeno (ABP), que transporta a testosterona, através do ductos eferente, para o epidídimo (DADOUNE & DEMOULIN, 1993; STANBENFELD & EDQVIST, 1996). Essas células formam uma barreira gerando um ambiente protegido do sistema imune no epitélio seminífero. O citoplasma da célula de Sertoli estende-se em torno de células

germinativas, proporcionando apoio físico e criando um ambiente iônico (RUSSELL *et al.*, 1990b) e metabólico adequado para a ocorrência da espermatogênese (ALVES *et al.*, 2013). Além disso, as células de Sertoli são responsáveis pela nutrição das células germinativas, permitindo-as obter os nutrientes e outras moléculas essenciais para o seu desenvolvimento, através das junções comunicantes (SKINNER, 1991; CHENG & MRUK, 2002; DIAS *et al.*, 2014). Outras funções essenciais para o desenvolvimento das células germinativas são a mediação da ação do hormônio folículo estimulante (FSH) e da testosterona na espermatogênese, a liberação controlada de espermatozoides para o lúmen tubular, bem como a fagocitose dos corpos residuais e células germinativas que sofreram apoptose (GRISWOLD, 1995; HESS & FRANÇA, 2008).

As interações entre as células de Sertoli e as células germinativas são cruciais para a manutenção da produção espermática normal (GRISWOLD, 1995). Em razão da população de células de Sertoli ser estável após a puberdade e ao longo do ciclo do epitélio seminífero, esta célula serve como referência para se quantificar e avaliar funcionalmente o processo espermatogênico (RUSSELL & PETERSON, 1984; FRANÇA & RUSSELL, 1998).

O processo espermatogênico ou espermatogênese (Figura 3) é o processo de formação do gameta masculino – o espermatozoide. A espermatogênese engloba três etapas principais, de acordo as características morfológicas e funcionais das células germinativas: (i) fase proliferativa ou espermatogonial - na qual as espermatogônias sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas; (ii) a fase meiótica ou espermatocitogênica - cada espermatócito dará origem a quatro espermátides haploides; (iii) fase de diferenciação ou espermiogênica - onde cada espermátide arredondada passa por mudanças estruturais e bioquímicas diferenciando-se em espermatozoide, que será liberado no lúmen dos túbulos seminíferos (HESS & DE FRANÇA, 2008).

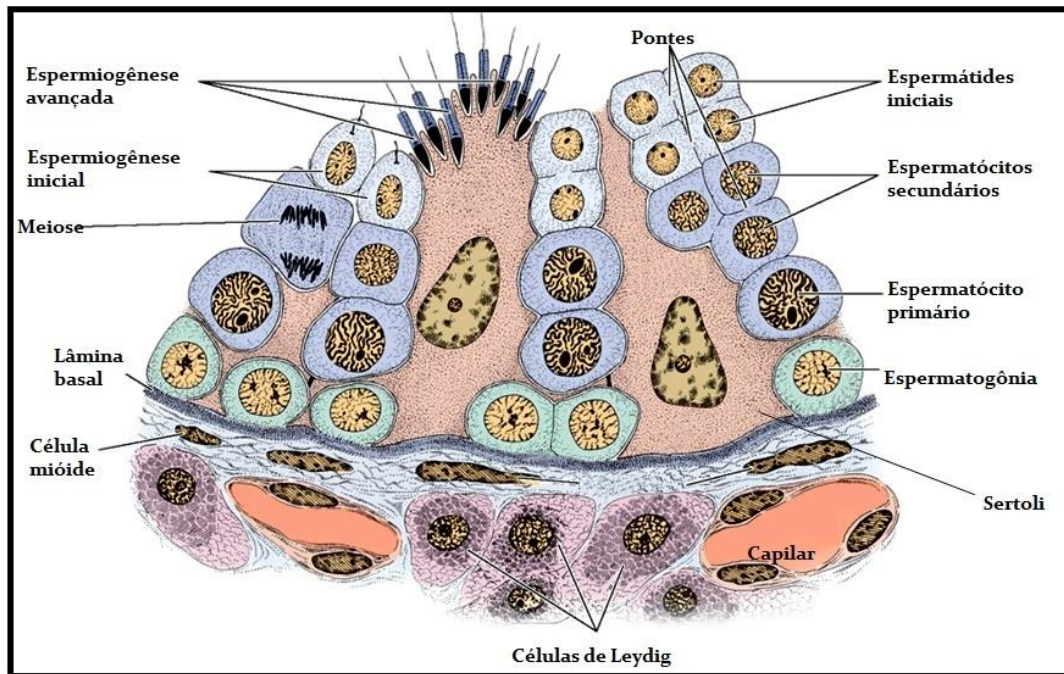


Figura 3. Desenho esquemático de uma porção de túbulo seminífero (Adaptado de JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E O SISTEMA ANTIOXIDANTE

O estresse oxidativo é caracterizado como um distúrbio no estado de equilíbrio dos sistemas pró-oxidantes/antioxidantes em células intactas. Durante a ocorrência de eventos oxidativos adicionais, os sistemas pró-oxidantes podem ser levados ao aumento em relação aos sistemas de defesa antioxidantes, resultando em danos oxidativos (SIES *et al.*, 2005). O estresse oxidativo no sistema reprodutor tem um impacto significativo sobre a espermatogênese, bem como na viabilidade dos espermatozoides. Níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (ERO) têm sido apontados como potencial causa de infertilidade masculina, sendo responsáveis por 30-80% dos casos infertilidade em homens (AGARWAL *et al.*, 2006; TREMELLEN, 2008; MAKKER *et al.*, 2009).

As ERO possuem pelo menos um elétron desemparelhado em sua órbita externa, fazendo com que o composto tenha alta instabilidade elétrica. Possuem meia vida curta, pois apresentam grande capacidade reativa (HENKEL, 2011), tendendo a ligar o elétron não pareado com outros presentes em moléculas orgânicas próximas de sua formação, o que possibilita a sua reação com as mais diversas classes de biomoléculas, sendo os lipídeos os mais susceptíveis. As principais ERO distribuem-se em dois grupos, os

radicais: superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^\cdot), peroxila (RO_2) e alcoxila (RO^\cdot); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

As ERO podem ser originadas tanto de forma exógena quanto endógena. As fontes exógenas são principalmente luz ultravioleta (UVA e UVB), radiações ionizantes e agentes químicos. Já as ERO formadas intracelularmente são originadas continuamente como consequência dos processos metabólicos, na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, nas vias da xantina oxidase, da síntese de prostaglandinas no retículo endoplasmático liso e no sistema citocromo P-450 redutase microsomal. Muitas vezes, são de extrema utilidade, como nas situações em que há necessidade de ativação do sistema imunológico como a utilização do peróxido de hidrogênio por macrófagos a fim de destruir bactérias e outros elementos estranhos (BERRA & MENCK, 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

Quando há um desequilíbrio no organismo em favor da produção excessiva de radicais livres ou devido à diminuição dos processos de remoção destes, ocorre o chamado estresse oxidativo, podendo levar a oxidação de substratos biológicos. Neste caso, a célula pode sofrer severos problemas metabólicos, estando envolvidos na causa e no desenvolvimento de inúmeras doenças (LUCESOLI & FRAGA, 1995).

No sistema reprodutor masculino, em quantidades fisiológicas, ERO são necessárias para que os espermatozoides adquiram capacidade de fertilização (AGARWAL *et al.*, 2008). No entanto, a produção excessiva de ERO e entrada em estresse oxidativo estão envolvidas na etiologia da infertilidade masculina (AITKEN & BAKER, 2006). Os espermatozoides são incapazes de reparar os danos provocados pelo estresse oxidativo, por serem desprovidos de enzimas citoplasmáticas necessárias para um sistema de reparo, o que os torna susceptíveis ao dano (SALEH & AGARWAL, 2002). As membranas celulares dos espermatozoides são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, tornando-os altamente susceptíveis a lesão induzida por oxidantes, levando a peroxidação lipídica. Com isso, uma rápida perda intracelular de adenosina trifosfato (ATP) a partir da peroxidação lipídica provoca danos axonemais, diminuindo a viabilidade e aumentando danos morfológicos do espermatozoide, alterações que contribuem para a diminuição da sua motilidade (BANSAL & BILASPURI, 2010; GHARAGOZLO & AITKEN, 2011).

Os componentes químicos presentes no ambiente são denominados xenobióticos e os seres vivos estão continuamente sendo expostos a eles. Estes compostos podem ter origem natural e/ou não-natural, podendo interagir de maneira prejudicial no organismo, levando ao estresse oxidativo (HUBER *et al.*, 2008). Devido aos efeitos maléficos do estresse oxidativo, mesmo sob condições fisiológicas normais, organismos aeróbios desenvolveram, então, um complexo sistema antioxidante de defesa (STYKAL *et al.*, 2012).

As substâncias antioxidantes, mesmo em baixas concentrações no organismo, são capazes de retardar e prevenir o processo de oxidação de substratos oxidáveis (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006) e podem ser classificadas como antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos, dependendo de sua estrutura.

As enzimas com ação antioxidante primária no organismo humano fornecem uma proteção intrínseca, sendo representadas principalmente pela superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutaciona peroxidase (GPx). Já entre os componentes de defesa antioxidantes não enzimáticos estão alguns minerais (cobre, manganês, zinco, selênio e o ferro), vitaminas (vitamina C, vitamina E, vitamina A e a riboflavina), carotenoides (beta-carotenoide, licopeno e luteína) e bioflavonoides (LEITE & SARNI, 2003; BANSAL & BILASPURI, 2010).

1.3 ARSÊNIO

O arsênio (As) é um elemento de origem natural, amplamente distribuído na atmosfera, hidrosfera e biosfera. O As ambiental está associado principalmente aos processos naturais, tais como intemperismo, atividade biológica e emissões vulcânicas; e às atividades humanas, como a mineração, processos industriais, fundição de metais, produção de pesticidas, conservantes de madeira e uso de combustíveis fósseis. Embora a mineralização natural e a ação microbiana aumentem a mobilização de As no ambiente, as atividades humanas agravam a contaminação do solo e da água de abastecimento (LAGE *et al.*, 2006; LITTER *et al.*, 2009).

Estima-se que dezenas de milhões de pessoas no mundo estão em risco de exposição a níveis excessivos de As em água contaminada, o que constitui

um importante problema de saúde pública (SMITH & SMITH, 2004; BAIG *et al.*, 2012; MAITY *et al.*, 2012). Na América Latina, a população estimada em risco de exposição ao As excede 14 milhões de pessoas, sendo os países mais afetados o México, o Chile e a Argentina. Já entre os países que apresentam riscos potenciais de contaminação para as populações estão, além do Brasil, a Guatemala, Nicarágua, Peru, Bolívia, Honduras, Cuba, El Salvador, Equador e Uruguai (LITTER *et al.*, 2009; BUNDSCHUH *et al.*, 2012).

No Brasil, em apenas três regiões foram realizados estudos sobre exposição humana ao arsênio: no Vale do Ribeira (São Paulo/Paraná) onde o arsênio é liberado como subproduto da mineração e refino de metais; na região de Santana, no Amapá, onde nos últimos 50 anos, a contaminação está associada à mineração do manganês; e no Quadrilátero Ferrífero, em Minas Gerais, onde há liberação de gases na atmosfera e drenagem para o solo, devido à mineração secular de ouro (FIGUEIREDO *et al.*, 2007; SAKUMA *et al.*, 2010).

A contaminação humana dá-se pela ingestão de água e alimentos contaminados pelo As, pela inalação de gases, contato dérmico e pela via parenteral (KHAN *et al.*, 2009), sendo mais frequente o meio de envenenamento através da ingestão de águas contaminadas (ALKORTA *et al.*, 2004). Diante dos riscos, os níveis máximos permitidos de contaminação em águas destinadas ao consumo foram estipulados em 1998, pela *Environmental Protection Agency* (EPA), como a concentração máxima permitida $10 \mu\text{g.L}^{-1}$. Assim, a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Diretiva da Comissão Europeia (European Commission Directive), em 2003, passaram a adotar esta concentração. O Brasil também adota esses valores, sendo que a concentração máxima permitida de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ foi estabelecida pela Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde e CONAMA 357/2005.

Quimicamente o As é classificado como um metaloide, isto é, um elemento com propriedades intermédias entre metais e não-metais (CSUROS & CSUROS, 2000), ocorrendo naturalmente no ambiente em diferentes estados de oxidação: -3, 0, +3, +5 (GUIMARÃES, 2006). Seu estado de oxidação determina o potencial de contaminação (JAIN & ALI 2000), e a ordem crescente de sua toxicidade é: compostos de As^{5+} orgânico < compostos de As^{3+} orgânico < compostos de As^{5+} inorgânico < compostos de As^{3+} inorgânico (USEPA, 2001; GHOSH *et al.*, 2008; FLORA, 2011). A absorção e o efeito

tóxico do As dependem do meio de exposição e do metabolismo particular de cada animal ou indivíduo, sendo que as formas inorgânicas solúveis possuem maiores taxas de absorção (40 a 100%) pelo trato gastrointestinal (PONTIUS *et al.*, 1994), o que pode justificar o fato de que as espécies inorgânicas de arsênio serem cerca de 100 vezes mais tóxicas se comparadas as formas orgânicas (THOMPSON, 1993).

O As é considerado metal pesado devido à sua toxicidade sobre o ambiente e os seres vivos (MITEVA, 2002). Também é considerado não essencial e poluente quando presente em quantidade superior à sua concentração normal no ambiente ou fora do seu local habitual, trazendo consequências negativas para os organismos, mesmo em baixas concentrações (VARENNE, 2003).

Industrialmente, o As é utilizado na fabricação de tintas, inseticidas, fungicidas, herbicidas, conservantes, semicondutores, diodos, lasers e transistores (monocristais de arsenito de gálio - GaAs). É empregado também na fabricação de rações por se tratar de um elemento essencial na dieta de alguns animais. Sem um sítio de ação específico comprovado, o arsênio é um elemento essencial para caprinos e aves, em concentrações menores que 25 µg/kg (RATNAIKE, 2003).

A ingestão de As pode ocorrer pelo consumo direto de cereais, vegetais ou frutos produzidos em solos contaminados ou pelo consumo de plantas regadas com águas que contenham arsênio em excesso. Além disso, a contaminação também se dá através do consumo de carne e leite, já que esse elemento pode concentrar-se na carne de bovinos nutridos por culturas de arroz e/ou água provenientes de áreas contaminadas (RAHMAN *et al.*, 2008; SMITH *et al.*, 2008). Estudos têm demonstrado a presença de arsênio em alguns produtos alimentícios como vinhos, podendo a contaminação ser originária do solo ou dos herbicidas e fungicidas utilizados na uva (JAGANATHAN, 2001; HERCE-PAGLIAI *et al.*, 2002); em hortaliças (AHIAMADJIE *et al.*, 2011); em grãos de arroz e de trigo cultivados em solos contaminados (WU *et al.*, 2011); e em peixes (USYDUS, *et al.*, 2008; TUZEN, 2009).

No organismo, o As acumula-se nos tecidos, produz espécies reativas de oxigênio e interfere na função de enzimas relacionadas com a metilação, uma das etapas do processo de metabolização e eliminação deste elemento, além de causar danos ao DNA (DING *et al.*, 2005; COOPER *et al.*, 2009;

CHOWDHURY *et al.*, 2010; SAMPAYO-REYES *et al.*, 2010). Liu e colaboradores (2011) demonstraram que arsenito de sódio (5 mM, por 5 h) induziu a angiogênese em células epiteliais do pulmão. Tais pesquisadores afirmaram que a produção de ERO é induzida de maneira dose-dependente e que quando ocorre supressão da geração de ERO pela catalase, a angiogênese é inibida, sugerindo que a produção de ERO é necessária para angiogênese induzida pelo arsênio.

A exposição ao arsênio está associada ao aparecimento de cânceres de pele, pulmão, bexiga e próstata, devido à indução da expressão do fator de crescimento vascular endotelial, um importante fator angiogênico (GAO *et al.*, 2004; HONG *et al.*, 2014). Alguns efeitos não carcinogênicos da exposição ao As também têm sido descritos. Wasserman (2004) demonstrou haver uma relação, proporcional à dose de exposição, a déficits de inteligência verbal e de memória de logo prazo. Em uma região do Taiwan foi relatado maior incidência nos casos de diabetes tipo 2, estando relacionado com a contaminação da água potável por As (TSENG *et al.*, 2002). Já em Bangladesh, a exposição ao arsênio por meio da água potável foi relacionada com a ocorrência de melanose e queratose (AHSAN *et al.*, 2000). Lee e colaboradores (2002) mostraram aumento na formação de trombos nas artérias de animais que receberam arsênio através da água de beber, podendo levar a doenças cardiovasculares. Em outro estudo realizado por Moon *et al.* (2013), foi observado que pessoas expostas ao As possuem maior incidência de doenças cardiovasculares. Li e colaboradores (2013) observaram que a exposição prolongada ao As pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de hipertensão arterial.

Estudos mostram que no sistema reprodutor esse metaloide compromete a atividade da célula de Leydig, reduzindo as concentrações séricas de testosterona, além de inibir a espermatogênese, reduzir a qualidade seminal e o peso dos órgãos sexuais acessórios, como o epidídimo (PANT *et al.*, 2001; AHMAD *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2012a; LI *et al.*, 2012b).

Ratos Wistar expostos aos metais cádmio, chumbo e arsênio apresentaram maiores danos no DNA de espermátócitos primários, comparados aos animais controle. Estas lesões no DNA de células germinativas podem causar redução da fertilidade, abortos espontâneos,

doenças hereditárias e maior incidência de câncer (NAVA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2009).

Os estudos que avaliam a ação tóxica do arsênio sobre o sistema reprodutor masculino têm dado enfoque à toxicidade do arsenito de sódio sobre as características histológicas e fisiológicas dos testículos (SAVABIEASFAHANI *et al.*, 1998; PANT *et al.*, 2004; AHMAD *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2011). Visando a necessidade de maior conhecimento sobre a influência dessa substância no sistema reprodutor masculino, busca-se com essa pesquisa, não somente avaliar as possíveis alterações quantitativas no processo espermato gênico e nas estruturas testiculares, como também avaliar a ação protetora de duas substâncias ditas antioxidantes, o zinco e a vitamina C em animais intoxicados com o As.

1.4 VITAMINA C COMO UM ANTIOXIDANTE

A vitamina C ou ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) é um termo genérico, empregado para descrever todos os compostos que apresentam a atividade biológica do ácido ascórbico. Ela se encontra na forma de ascorbato, que é a forma que atua como antioxidante, ao doar um átomo de hidrogênio para um radical livre. Tem característica hidrossolúvel e grande parte dos mamíferos e das plantas sintetizam a vitamina C endógena a partir da glicose e da galactose. Entretanto, o ser humano, os primatas e alguns roedores não possuem a capacidade de sintetizá-la por não possuírem a enzima L-gulonolactona-oxidase, que é um catalizador da conversão da L-gulonolactona em ácido ascórbico. Deste modo, necessita-se da ingestão do micronutriente na dieta, por meio do consumo de frutas cítricas e folhas de vegetais cruas, sendo abundante nos seguintes alimentos: laranja, limão, acerola, morango, brócolis, repolho e espinafre. Nas células, a vitamina C está presente no compartimento citosólico e no fluido extracelular, atuando em conjunto com a vitamina E (RODRIGUES, 2005; VALDÉS, 2006; SANTOS, 2007).

Como antioxidante, pode-se ressaltar sua capacidade de neutralização de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (JACKSON *et al.*, 1998). Em humanos a vitamina C desempenha papel essencial nos processos

metabólicos e fisiológicos, como na formação do colágeno, na síntese de epinefrina, corticosteroides e ácidos biliares. Além disso, age como cofator enzimático, participando dos processos de óxido-redução, propiciando a absorção gastrointestinal do ferro e também na transferência de ferro da transferrina plasmática para ferritina hepática (REN *et al.*, 2001; MARTÍNEZ *et al.*, 2003).

A vitamina C pode atuar como antioxidante e impedir ou atenuar a oxidação de lipídios, a agregação plaquetária e a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Porém, em presença de certas concentrações de metais de transição, pode atuar como pró-oxidante, reduzindo estes tais metais, que reagem com o peróxido de hidrogênio para formar o radical hidroxila (VASCONCELOS *et al.*, 2006; SANTOS 2007). A reação de Fenton, redução de peróxido de hidrogênio por Cu^{1+} ou Fe^{2+} a radical hidroxila, é favorecida na presença de vitamina C, capaz de reduzir os metais de transição, tornando-os aptos para esta reação. Isto pode induzir danos ao DNA dos espermatozoides, fazendo com que estas células apresentem uma redução na capacidade de fertilização, podendo ocasionar consequências desconhecidas na saúde da próxima geração (LEWIS & AGBAJE, 2008).

A concentração e a localização intracelular da vitamina C pode ser um fator decisivo na atividade desta vitamina como oxidante ou antioxidante. A ingestão diária recomendada de vitamina C é de 65 mg/dia para mulheres e de 75 mg/dia para homens adultos e saudáveis (RODRIGUES, 2005). Quando presente no sistema reprodutor masculino, a vitamina C desempenha papel na defesa contra a peroxidação lipídica no plasma seminal, prevenindo danos oxidativos ao DNA do espermatozoide. O ácido ascórbico no plasma seminal humano está presente em altas concentrações, quando comparado com plasma sanguíneo (400 e $60\mu\text{M}$, respectivamente), refletindo a importância do seu papel fisiológico (FRAGA *et al.*, 1991). Salem e colaboradores (2001) demonstraram que a suplementação de ácido ascórbico teve efeitos benéficos sobre as características do sêmen e em níveis de testosterona em coelhos.

1.5 A AÇÃO DO ZINCO NO SISTEMA ANTIOXIDANTE

O zinco (Zn^{2+}) é um metal de transição que modula a função de diversas proteínas regulatórias associadas a uma variedade de atividades celulares

(EOM *et al.*, 2001). Trata-se de um elemento traço-essencial para o organismo humano, presente em mais de 300 enzimas e proteínas que participam do metabolismo de proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos, com função catalítica ou estrutural (WOOD, 2000). Dentre as enzimas estão a anidrase carbônica, fosfatase alcalina, carboxipeptidases, álcool desidrogenase, superóxido dismutase, proteína C quinase, ácido ribonucleico polimerase e transcriptase reversa (MCCALL *et al.*, 2000).

Os alimentos com maior teor deste mineral são carne bovina, peixe, aves, leite, queijo, frutos do mar, cereais de grãos integrais, gérmen de trigo, feijão, nozes, amêndoas, castanhas e semente de abóbora. O zinco pode interagir com outras substâncias, como oxalatos, fosfatos, fibras e alguns minerais e ter sua absorção prejudicada (DOMENE *et al.*, 2008). A ingestão diária recomendada do Zn é de 11mg/dia para os homens e 8mg/dia para mulheres. Entretanto, em algumas fases da vida são necessárias doses maiores, como na gestação, infância, puberdade e senilidade (HAMBIDGE *et al.*, 2008).

Em concentrações fisiológicas, o zinco é fundamental para processos biológicos, incluindo expressão gênica, síntese de DNA, sinalização celular e neurotransmissão. Por outro lado, quando em excesso nos tecidos do corpo, o Zn livre pode ser tóxico. Tanto o excesso quanto a deficiência do Zn no organismo podem levar ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, ativar ou inibir fatores de transcrição sensíveis à oxidação, podendo afetar a função, o crescimento e proliferação e sobrevivência celular (BOROWSKI, 2006).

O zinco é cofator da superóxido dismutase. Esta enzima participa no processo de destoxificação de radicais livres, transformando dois ânions radicais superóxido em um peróxido de hidrogênio, que é menos reativo. Também apresenta atividade quelante, estabiliza membranas celulares, inibe a peroxidação lipídica e induz a síntese de metalotioneínas (PEIXOTO & PEREIRA, 2007; PRASAD, 2008). O zinco também tem propriedades antiapoptóticas (CHIMIENTI *et al.*, 2003).

O Zn é um elemento fundamental para a fertilidade de mamíferos machos (MERRELLS *et al.*, 2009), uma vez que possui um papel essencial no desenvolvimento das células germinativas, com participação ativa na síntese do DNA, no metabolismo dos ácidos nucleicos e de proteínas (BEDWAL & BAHUGUNA, 1994). No ser humano, o Zn é necessário para a formação e maturação de espermatozoides, ovulação e fertilização. Sabe-se que o Zn em

baixas concentrações participa do processo da espermatogênese, ao ser incorporado no flagelo das espermátides alongadas, mantendo-se neste local também nos espermatozoides (FRANÇA *et al.*, 2005). Além disso, algumas proteínas formadas com a participação do zinco são necessárias para a expressão gênica dos receptores dos hormônios esteroides (FAVIER, 1992; FREEDMAN, 1992). Em homens inférteis com redução na produção e qualidade dos espermatozoides, o teor de Zn é mais baixo (CAMBIAGHI & CASTELLOTTI, 2004).

Portanto, devido à crescente contaminação ambiental por metais e considerando a toxicidade do arsênio, em especial do arsenito, e seu importante envolvimento em processos que induzem ao estresse oxidativo, o presente estudo trata da influência da ação antioxidante do ácido ascórbico e do zinco sobre parâmetros morfológicos e seminais do aparelho reprodutor masculino de ratos Wistar adultos, expostos cronicamente ao arsenito de sódio.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Analisar os efeitos do tratamento crônico com arsenito de sódio nos testículos e em parâmetros seminais de ratos Wistar e os possíveis efeitos protetores da suplementação com zinco ou vitamina C.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do tratamento crônico com arsenito de sódio nos parâmetros biométricos, seminais e na morfologia testicular de ratos Wistar;
- Avaliar o efeito protetor da suplementação de zinco nos testículos, em relação aos parâmetros morfológicos, seminais e biométricos de ratos intoxicados com arsenito de sódio;
- Avaliar se a vitamina C é capaz de proteger o sistema reprodutor masculino em relação aos parâmetros morfológicos, seminais e biométricos de ratos intoxicados ao arsenito de sódio.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) adultos (80 dias), provenientes do Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. O delineamento experimental foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da mesma universidade (protocolo: 041/2014 - anexo). Os animais foram divididos em seis grupos com seis indivíduos cada e são descritos a seguir:

- **Grupo I:** controle (água destilada);
- **Grupo II:** arsenito de sódio ($\text{NaAsO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (5 mg/Kg/dia);
- **Grupo III:** vitamina C (100 mg/kg/dia);
- **Grupo IV:** cloreto de zinco (20 mg/kg/dia);
- **Grupo V:** arsenito de sódio e vitamina C;
- **Grupo VI:** arsenito de sódio e cloreto de zinco.

As soluções foram preparadas no dia da administração. Para o preparo, as substâncias foram pesadas e diluídas em água destilada de forma que cada animal recebesse 0,5 mL da solução correspondente ao seu tratamento, sendo administrado por gavagem, diariamente. O tratamento foi realizado durante 60 dias consecutivos, período superior à duração de um ciclo espermático completo em ratos (56 dias) (RUSSELL *et al.*, 1990a). A alimentação (ração comercial) e água foram fornecidas *ad libitum*. Os animais foram acomodados no Laboratório de Bioexperimentação do Centro Universitário Norte do Espírito Santo, onde foram mantidos sob condições padronizadas de temperatura (25 ± 1 °C) e ciclo normal de 12 horas claro/escuro.

A dosagem de arsenito de sódio (Vetec, Lote: 1000282) foi determinada após realização de experimentos piloto (Silva, 2013) e se encontra abaixo da LD50 (dose letal para 50% de animais na população) que é de 20 mg/kg para ratos (PACEY & FORD, 1981).

O cloreto de zinco e a vitamina C foram adquiridos em farmácia de manipulação, sendo substâncias com grau farmacêutico de pureza. Foram armazenados em recipientes protegidos da luz e em geladeira. A determinação da dosagem de cloreto de zinco e vitamina C administrada nos animais foi

baseada em estudos anteriores com essas substâncias (PAKSY *et al.*, 1996; ALI *et al.*, 2002; OTUECHERE *et al.*, 2012; SHITTU *et al.*, 2012).

3.2 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Vinte e quatro horas após o término do tratamento, os animais foram pesados e receberam anestesia intramuscular no músculo quadríceps femoral esquerdo, com mistura de Xilazina e Ketamina (5 e 80 mg/kg, respectivamente). Em seguida, os animais foram eutanasiados e os testículos, epidídimos e próstata foram retirados e pesados. Além disso, fragmentos do ducto espermático foram coletados para obtenção de espermatozoides.

Os testículos direitos foram imersos em solução fixadora de Karnovsky por 24 horas (4°C). Fragmentos testiculares foram desidratados em concentrações crescentes de etanol e incluídos rotineiramente em resina glicol metacrilato. O material foi seccionado na espessura de 3 µm em micrótomo rotativo. As lâminas obtidas foram coradas com Eosina/Hematoxilina. Os testículos esquerdos foram dissecados e congelados (-20°C) para cálculo da produção espermática.

3.3 ANÁLISES BIOMÉTRICAS

Os animais foram pesados no início e ao final do tratamento e, assim, obtido o ganho de peso durante a exposição das substâncias estudadas: arsênio, zinco e vitamina C. O peso relativo de cada órgão foi obtido dividindo-se o peso do órgão pelo peso corporal e multiplicando o resultado por 100. Para os testículos, o peso relativo foi designado como Índice gonadossomático (IGS) que representa a proporção do peso corporal ocupada pelos testículos.

3.4 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS E ESTEREOLÓGICAS

As imagens digitais do parênquima testicular foram capturadas com câmera digital acoplada ao microscópio de luz e as análises morfométricas e

estereológicas foram feitas utilizando o software Image-Pro Plus (MediaCybernetics) segundo Monteiro *et al.* (2008) e Predes *et al.* (2011).

3.4.1 PROPORÇÕES VOLUMÉTRICAS (%) E VOLUMES DOS COMPONENTES DO PARÊNQUIMA TESTICULAR

As proporções volumétricas dos componentes do parênquima testicular foram estimadas a partir da contagem de 2040 pontos (por animal) projetados sobre imagens digitais capturadas em campos aleatórios, na objetiva de 40x. Os elementos quantificados foram: túbulo seminífero (túnica própria, epitélio germinativo e lúmen) e espaço intertubular (células de Leydig, vasos sanguíneos, espaço linfático, macrófagos e tecido conjuntivo). A seguinte fórmula foi utilizada para os cálculos das proporções:

Proporção volumétrica (%) = (número de pontos sobre cada elemento do parênquima × 100) / 2040 (pontos totais)

O volume de cada componente do parênquima testicular, expresso em mL, foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume total líquido do parênquima testicular. Para tal, utilizou-se a fórmula:

Volume = (% de cada elemento / 100) × volume do parênquima testicular.

A massa da túnica albugínea foi aferida e descontada da massa total testicular, sendo, assim, calculada a massa do parênquima testicular. Como a densidade volumétrica do testículo de mamíferos é em torno de 1 g/mL, a massa do testículo, em gramas, foi considerada igual ao seu volume em mL (JOHNSON & NEVES, 1981; FRANÇA, 1998; PAULA, *et al.* 2002; COSTA *et al.*, 2011).

3.4.2 DIÂMETRO TUBULAR, ALTURA DO EPITÉLIO SEMINÍFERO E COMPRIMENTO TOTAL DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS

O diâmetro tubular médio e a altura do epitélio seminífero de cada animal foram obtidos a partir da mensuração, ao acaso, de 30 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentaram contorno o mais circular possível.

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) por testículo foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal. Devido ao formato cilíndrico do túbulo seminífero, foi utilizado para o cálculo, a derivação da fórmula volumétrica do cilindro (ATTAL & COUROT, 1963; DORST & SAJONSKI, 1974):

$$CT = VTS/\pi R^2$$

Onde: VTS = volume total de túbulos seminíferos nos testículos;

πR^2 = área da secção transversal dos túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2).

3.4.3 VOLUME E NÚMERO DE CÉLULAS DE LEYDIG POR TESTÍCULO

Foram contados 1200 pontos sobre o citoplasma e o núcleo das células de Leydig com a finalidade de se determinar a proporção (%) entre núcleo e citoplasma deste tipo celular. Em outra etapa, foi medido o diâmetro nuclear de 30 células, por animal, em objetiva de 100x. A partir dos dados acima obtidos e aplicando-se as fórmulas seguintes, foram calculados:

- Volume nuclear = $4/3\pi R^3$ onde, R = raio nuclear;
- Volume do citoplasma = % citoplasma x volume nuclear / % núcleo;
- Volume de cada célula de Leydig = volume nuclear + volume citoplasmático;
- Número de células de Leydig por testículo = volume que as células de Leydig ocupam no testículo (mL) / volume de uma célula de Leydig (mL)
- Número de células de Leydig por grama de testículo = número de células de Leydig no testículo/peso testicular.

3.4.4 CONTAGENS CELULARES NO EPITÉLIO SEMINÍFERO

A estimativa das populações dos diferentes tipos celulares que compõem o epitélio seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero (AMANN & SCHANBACHER, 1983) foi feita a partir do reconhecimento e de contagens dos núcleos das células germinativas e de nucléolos das células de

Sertoli. Nestas contagens, foram utilizadas 8 secções transversais de túbulos seminíferos. Foram considerados os núcleos dos seguintes tipos celulares: Espermátogônias do tipo A (SPG A); Espermátocitos I, na fase de pré-leptóteno/ leptóteno (SPT I PL/L) e paquíteno (SPT I P); Espermátides arredondadas (SPD Ar).

As contagens obtidas foram corrigidas para o diâmetro nuclear/nucleolar e espessura do corte histológico, utilizando-se a seguinte fórmula (AMANN & ALMQUIST, 1962):

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

Onde: DM = diâmetro nuclear médio, que representa a média dos diâmetros de 20 núcleos do tipo celular estudado, para cada animal.

3.4.5 RAZÕES ENTRE OS NÚMEROS CELULARES

Com a finalidade de se avaliar a eficiência do processo espermatogênico e das células de Sertoli foram estimadas as razões entre os números corrigidos de células da linhagem espermatogênica e o número de células de Sertoli no estágio 1 do ciclo, através das seguintes fórmulas:

- Coeficiente de mitose espermatogonial = (SPT I PL/L) / (SPG A);
- Índice meiótico = (SPD Ar) / (SPT I P);
- Rendimento geral da espermatogênese = (SPD Ar) / (SPG A);
- Eficiência da célula de Sertoli = (SPD Ar) / células de Sertoli;
- Suporte total da célula de Sertoli = total de células germinativas / células de Sertoli.

3.5 CONTAGEM DE ESPERMÁTIDES, PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA E TEMPO DE TRÂNSITO EPIDIDIMAL

Espermátides resistentes à homogeneização (estágio 19 da espermiogênese) no testículo e espermatozoides das porções cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram contados em câmaras de Neubauer (4 campos por

animal), após homogeneização dos órgãos (homogeneizador Ultra-Turrax – Janke & Kunckel IkaWerk) em mistura de 0,9% de NaCl, 0,05% de triton x 100, segundo método descrito previamente (Robb *et al.*, 1978). Para determinação da produção diária de espermatozoides (PDE), o número de espermatozoides por testículo foi dividido por 6,1, que é o número de dias em que as espermátides maduras estão presentes no epitélio seminífero. Para o cálculo do tempo de trânsito espermático na cabeça/corpo ou cauda do epidídimo, foi dividido o número de espermatozoides, em cada porção, pela PDE (KEMPINAS *et al.*, 1998).

3.6 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

Um centímetro do ducto deferente, próximo ao epidídimo, foi removido, torcido com uma pinça e colocado em solução de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH=7,2) durante 15 minutos. Com os espermatozoides liberados na suspensão foram montadas lâminas histológicas para análises morfológicas (Seed *et al.*, 1996). Duzentos espermatozoides, por animal, foram observados em microscópio de luz (objetiva de 40x) e separados em duas categorias: normal e anormal (SEED *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2009; FAVARETO *et al.*, 2011).

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram analisados através do teste de Shapiro-Wilk para avaliação quanto a normalidade dos dados. Para os dados com distribuição normal foi utilizada ANOVA, seguido do teste de Tukey. Para dados que não apresentaram distribuição normal foi usado o teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado para o presente estudo foi de 5%.

4. RESULTADOS

4.1 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS

Os parâmetros biométricos analisados (ganho de peso corporal, peso testicular, pesos relativos do epidídimo e da próstata e IGS) foram apresentados na Tabela 1. Dentre os parâmetros avaliados, houve aumento significativo no peso relativo da próstata no grupo As + Zn quando comparado ao controle.

Tabela 1. Biometria corporal de ratos Wistar tratados com arsenito de sódio e suplementados com vitamina C ou zinco.

Grupo/ Parâmetro	Controle	As	Vit C	Zn	As + Vit C	As + Zn
Ganho de peso (g)	89,50 ± 51,52	78,11 ± 39,48	93,39 ± 22,90	80,80 ± 16,04	104,63 ± 9,87	99,67 ± 58,84
Testículo (g)	1,59 ± 0,13	1,70 ± 0,19	1,68 ± 0,17	1,64 ± 0,15	1,67 ± 0,10	1,66 ± 0,14
IGS (%)	0,34 ± 0,01	0,30 ± 0,05	0,33 ± 0,04	0,34 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,29 ± 0,06
Epidídimo (%)	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,02
Próstata (%)	0,21 ± 0,02*	0,27 ± 0,06	0,25 ± 0,04	0,25 ± 0,05	0,26 ± 0,06	0,25 ± 0,03*

IGS: índice gonadossomático. Valores são média ± desvio-padrão. * $p < 0,05$, segundo ANOVA seguido de teste de Tukey.

4.2 PROPORÇÕES VOLUMÉTRICAS (%) E VOLUMES DOS COMPONENTES DO PARÊNQUIMA TESTICULAR

Nos animais do grupo As + Zn houve aumento significativo na proporção volumétrica do compartimento intersticial, com conseqüente redução do compartimento tubular, quando comparados com os grupos controle e tratados somente com Zn (Figura 4). Essa redução de túbulos seminíferos se deu pela menor proporção de epitélio seminífero naqueles animais.

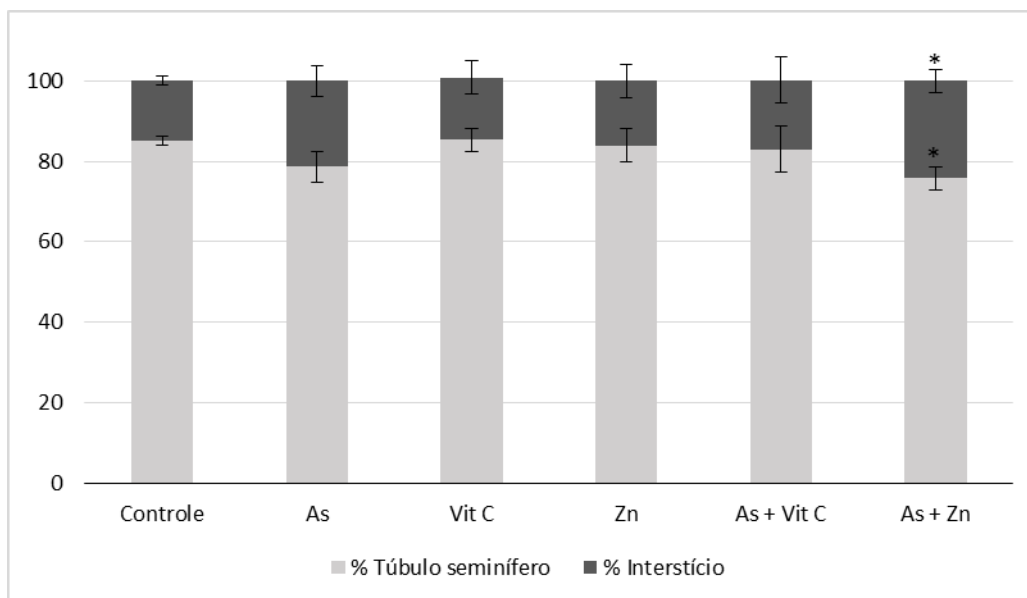


Figura 4: Proporção (%) volumétrica dos compartimentos tubular e intersticial de ratos Wistar tratados com arsenito de sódio e suplementados com vitamina C ou zinco (valores são média \pm desvio-padrão. * representa diferença estatística significativa em relação ao controle ($p < 0,05$), segundo ANOVA seguido de teste de Tukey).

Os valores médios referentes à proporção volumétrica (%) e ao volume (mL) dos componentes do espaço intertubular (vasos sanguíneos, espaço linfático, células de Leydig, tecido conjuntivo e macrófagos) e tubular (lúmen, epitélio germinativo e túnica própria) foram apresentados na Tabela 2.

Observou-se aumento significativo na proporção volumétrica do espaço linfático no grupo As + Zn comparado ao controle e aos animais tratados com Zn. As células de Leydig se mostram presente em maior quantidade ($p < 0,05$) nos grupos As + Zn e As + Vit C quando comparados ao controle. Em relação ao epitélio germinativo os animais tratados com a associação arsenito de sódio e zinco tiveram uma menor proporção de epitélio germinativo ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos controle, As e Zn. Os animais do grupo As + Vit C também apresentaram uma menor proporção volumétrica de epitélio germinativo quando comprado aos tratamentos controle e Vit C. Em relação ao lúmen tubular, o grupo arsenito de sódio apresentou uma menor proporção volumétrica em comparação ao grupo que recebeu As e vitamina C concomitantemente.

Tabela 2: Volume (mL) e proporção volumétrica (% , entre parênteses) dos componentes do espaço intertubular e tubular de ratos Wistar tratados com arsenito de sódio e suplementados com vitamina C ou zinco.

Grupo/ Parâmetro	Controle	As	Vit C	Zn	As + Vit C	As + Zn
Interstício	0,23 ± 0,02^a (14,83 ± 1,08^a)	0,36 ± 0,09 ^{ab} (21,41 ± 3,88 ^{ab})	0,26 ± 0,07 ^{ab} (15,45 ± 4,06 ^{ab})	0,26 ± 0,07 ^{ab} (16,07 ± 4,15 ^a)	0,28 ± 0,09 ^{ab} (17,22 ± 5,74 ^{ab})	0,40 ± 0,05^b (24,26 ± 2,86^b)
Linfático	0,20 ± 0,02^a (12,51 ± 1,33^a)	0,31 ± 0,08 ^{ab} (18,32 ± 3,49 ^{ab})	0,21 ± 0,07 ^{ab} (12,90 ± 3,74 ^{ab})	0,22 ± 0,07 ^{ab} (13,40 ± 3,68 ^a)	0,23 ± 0,06 ^{ab} (13,83 ± 4,20 ^{ab})	0,33 ± 0,05^b (20,33 ± 2,81^b)
Leydig	0,01 ± 0,00^a (0,75 ± 0,25^a)	0,02 ± 0,00 ^{ab} (1,39 ± 0,32 ^{ab})	0,02 ± 0,00 ^{ab} (0,98 ± 0,19 ^{ab})	0,01 ± 0,01 ^{ab} (1,15 ± 0,38 ^{ab})	0,02 ± 0,01^b (1,68 ± 0,91^b)	0,03 ± 0,00^b (1,77 ± 0,34^b)
Conjuntivo	0,01 ± 0,00 (0,92 ± 0,32)	0,01 ± 0,00 (1,00 ± 0,43)	0,02 ± 0,00 (1,09 ± 0,21)	0,02 ± 0,00 (1,07 ± 0,35)	0,02 ± 0,01 (1,04 ± 0,49)	0,02 ± 0,00 (1,25 ± 0,24)
Macrófago	0,003 ± 0,001 (0,20 ± 0,07)	0,001 ± 0,002 (0,10 ± 0,11)	0,002 ± 0,001 (0,14 ± 0,07)	0,002 ± 0,001 (0,11 ± 0,07)	0,002 ± 0,003 (0,16 ± 0,19)	0,002 ± 0,002 (0,16 ± 0,11)
Vaso	0,007 ± 0,002 (0,44 ± 0,12)	0,01 ± 0,006 (0,60 ± 0,34)	0,006 ± 0,003 (0,33 ± 0,18)	0,005 ± 0,002 (0,34 ± 0,13)	0,01 ± 0,01 (0,51 ± 0,16)	0,01 ± 0,005 (0,75 ± 0,27)
Compartimento tubular	1,35 ± 0,11 (85,17 ± 1,08^a)	1,33 ± 0,13 (78,59 ± 3,88 ^{ab})	1,43 ± 0,14 (85,37 ± 2,88 ^{ab})	1,37 ± 0,12 (83,93 ± 4,15^a)	1,38 ± 0,14 (82,96 ± 5,74 ^{ab})	1,25 ± 0,12 (75,74 ± 2,86^b)
Túnica própria	0,04 ± 0,02 ^{ab} (2,70 ± 0,90)	0,05 ± 0,01 ^{ab} (2,95 ± 0,38)	0,05 ± 0,01 ^{ab} (3,01 ± 0,43)	0,04 ± 0,01^a (2,57 ± 0,37)	0,05 ± 0,05 ^{ab} (3,09 ± 0,56)	0,05 ± 0,01^b (3,21 ± 0,31)
Epitélio germinativo	0,98 ± 0,08^a (62,16 ± 3,38^{ac})	0,97 ± 0,05^{ab} (58,01 ± 3,58^{acd})	0,99 ± 0,13^{ab} (59,08 ± 3,21^{abc})	0,99 ± 0,08^a (60,05 ± 1,46^{acd})	0,88 ± 0,87^{ab} (52,80 ± 2,35^{abd})	0,84 ± 0,02^b (50,60 ± 4,29^{bcd})
Lúmen	0,32 ± 0,06 ^{ab} (20,31 ± 2,97 ^{ab})	0,30 ± 0,08^a (17,63 ± 3,79^a)	0,39 ± 0,06 ^{ab} (23,28 ± 3,55 ^{ab})	0,35 ± 0,07 ^{ab} (21,32 ± 3,95 ^{ab})	0,45 ± 0,43^b (27,07 ± 4,77^b)	0,37 ± 0,11 ^{ab} (21,93 ± 4,29 ^{ab})

Valores são média ± desvio-padrão. Letras diferentes na mesma linha p<0,05, segundo ANOVA seguido de teste de Tukey.

A histologia do parênquima testicular dos grupos experimentais foi representada na Figura 5.

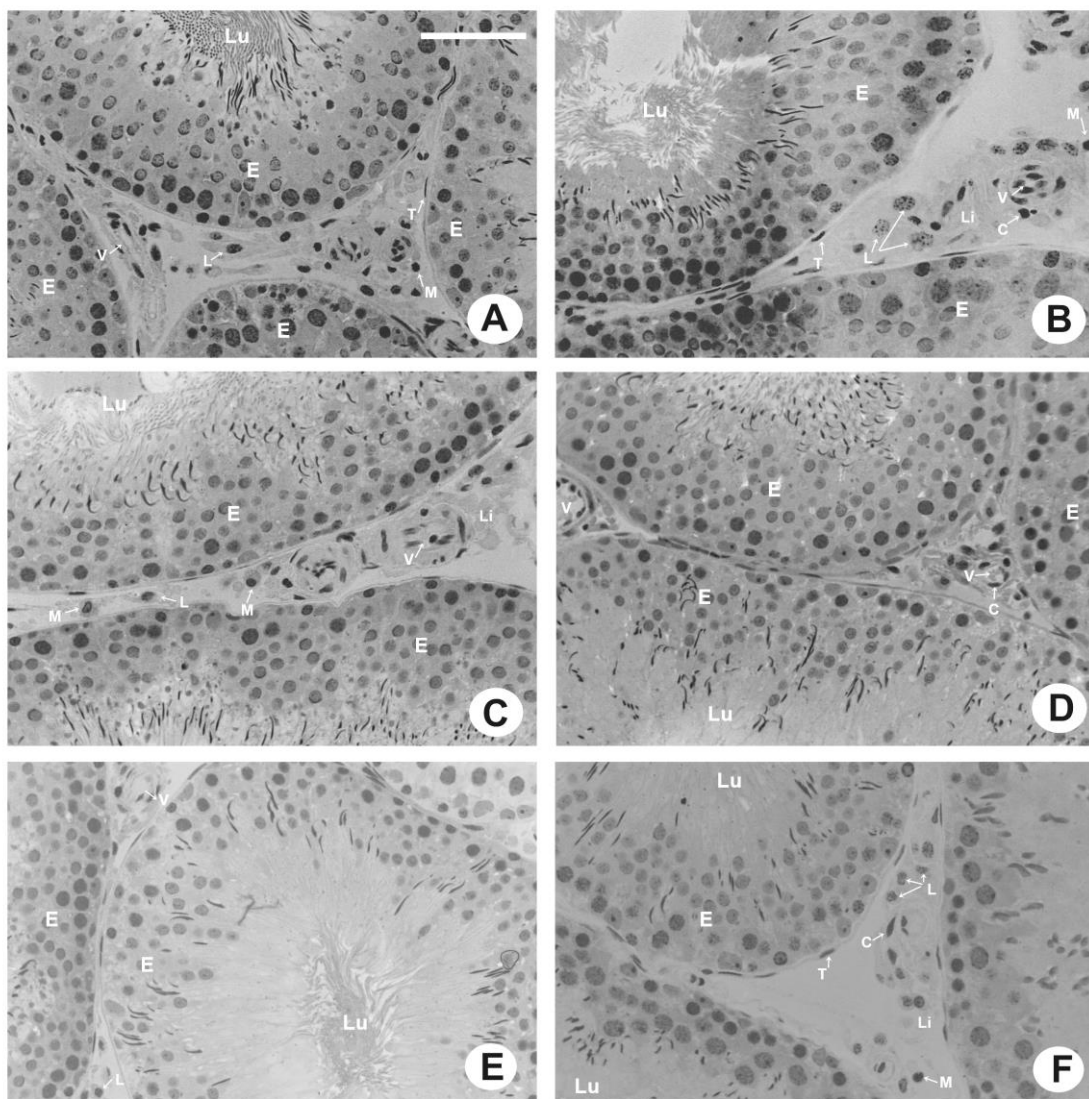


Figura 5. Visão geral do parênquima testicular de ratos Wistar tratados com arsenito de sódio e suplementados com vitamina C ou zinco. A – grupo controle; B – grupo Arsenito de sódio; C – grupo vitamina C; D – grupo zinco; E – grupo arsenito de sódio em associado a vitamina C; F – grupo arsenito de sódio em associação ao cloreto de zinco. Lu: lúmen tubular; E: epitélio germinativo; T: túnica própria; M: macrófago; L: célula de Leydig; Li: espaço linfático; C: tecido conjuntivo; V: vaso sanguíneo. Coloração HE. Barra: 42 µm.

4.3 DIÂMETRO TUBULAR, ALTURA DO EPITÉLIO SEMINÍFERO E COMPRIMENTO TOTAL DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS

As medidas de diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero, comprimento total de túbulos seminíferos e comprimento por grama de testículo

dos animais dos grupos controle e tratados com arsenito de sódio, zinco e vitamina C foram representadas na Figura 6.

O diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero reduziram de forma significativa em todos os grupos tratados com arsênio (As, As + Vit C, As + Zn) quando comparados com o grupo controle. Os animais que receberam vitamina C associada ao arsenito de sódio apresentaram redução ($p < 0,05$) nos mesmos parâmetros quando comparado aos animais do grupo Vit C. O comprimento de túbulos seminíferos total (resultado não mostrado) e por grama de testículo aumentou significativamente nos grupos As e As + Vit C quando comparados ao grupo controle. O grupo As + Vit C também apresentou aumento significativo nos mesmos dois parâmetros (comprimento de túbulos seminíferos total e por grama de testículo) em relação ao grupo que recebeu apenas vitamina C.

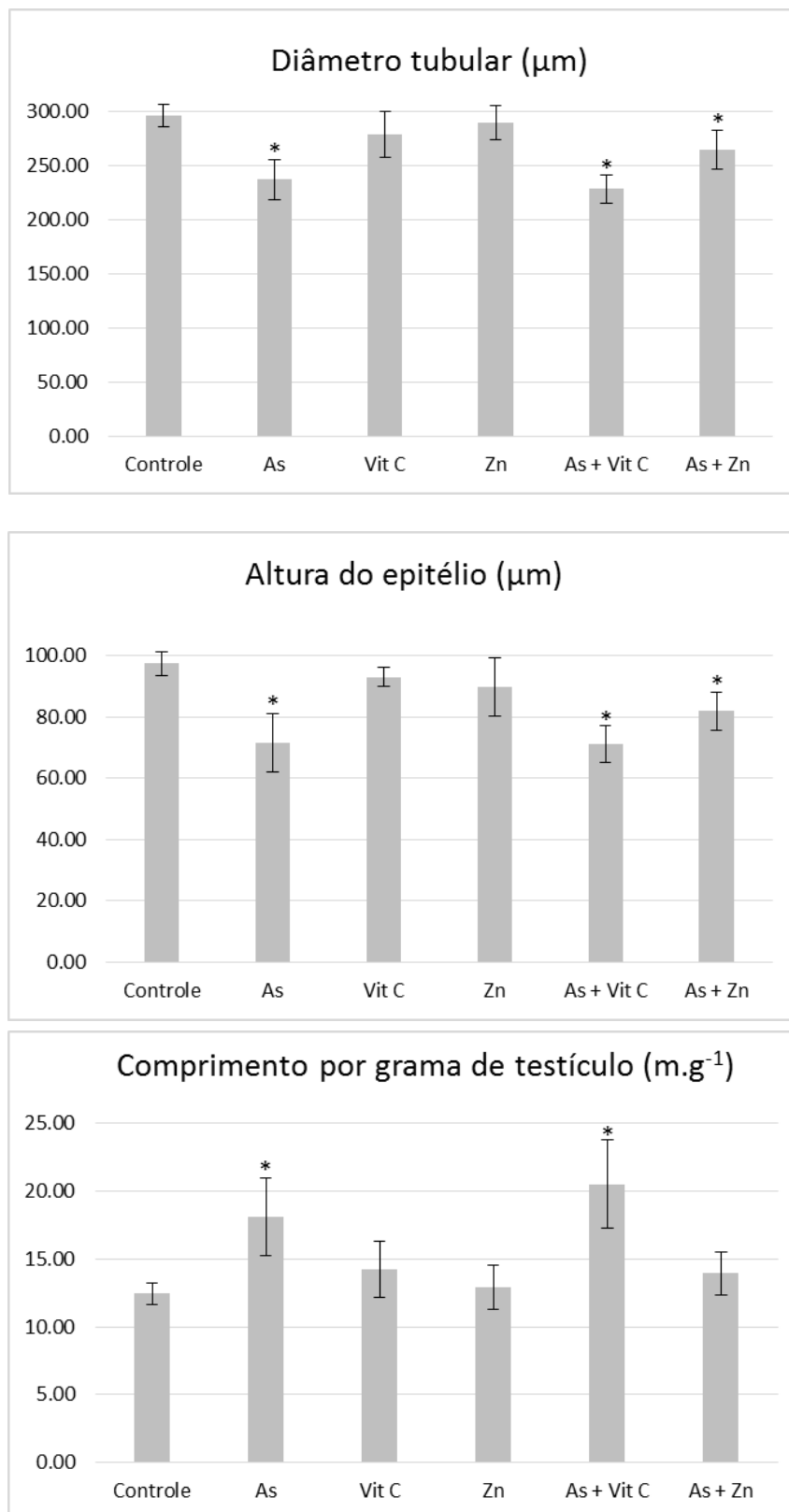


Figura 6. Diâmetro tubular (μm), altura do epitélio seminífero (μm) e comprimento por grama de testículo (m.g^{-1}) de túbulos seminíferos de ratos Wistar tratados com arsenito de sódio e suplementados com vitamina C ou zinco (valores são média \pm desvio-padrão. * representa diferença estatística significativa em relação ao controle ($p < 0,05$), segundo ANOVA seguido de teste de Tukey).

4.4 MORFOMETRIA E ESTEREOLOGIA DAS CÉLULAS DE LEYDIG

A proporção volumétrica (%) de citoplasma das células de Leydig (CL) dos animais tratados com vitamina C aumentou significativamente com consequente redução da proporção de núcleo celular, comparado com controle. Já as CL do grupo As + Vit C apresentaram redução na proporção de citoplasma e aumento na proporção de núcleo quando comparado ao grupo Vit C (Figura 7).

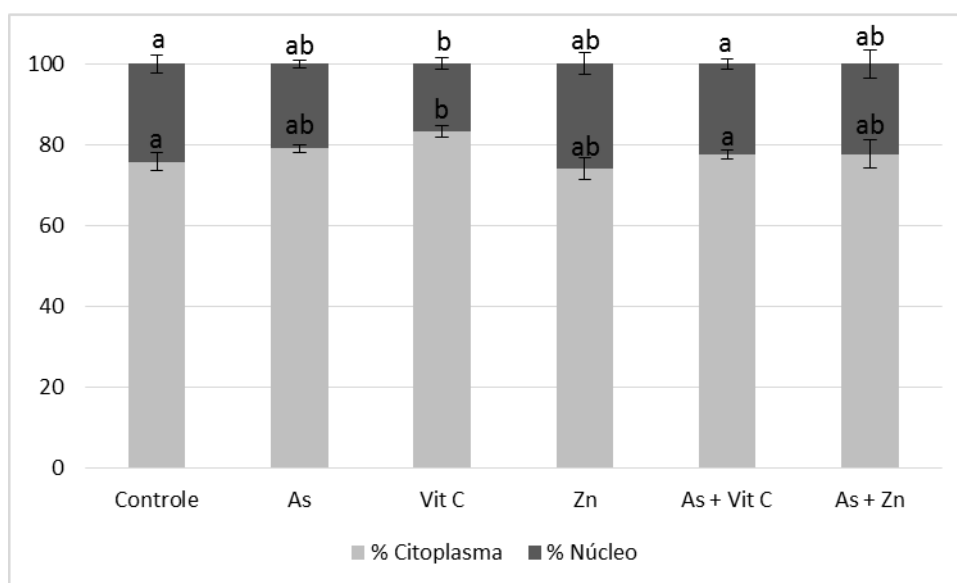


Figura 7: Relação nucleoplasmática das células de Leydig de ratos Wistar tratados com arsenito de sódio e suplementados com vitamina C ou zinco (valores são média \pm desvio-padrão. $p < 0,05$, segundo ANOVA seguido de teste de Tukey).

Os demais parâmetros estereológicos e morfométricos das células de Leydig foram representados na Tabela 3. O diâmetro nuclear e o volume individual da CL aumentaram de forma significativa no grupo As, comparado ao grupo controle. Entretanto, o volume individual dessas células nos grupos que receberam Zn ou vitamina C associados ao arsênio foi significativamente menor que o volume encontrado para os animais que receberam somente o As. Essa redução do volume individual das células foi devido à redução significativa dos volumes nuclear e citoplasmático das CL desses grupos, comparados ao grupo que recebeu somente arsênio. O número de células de Leydig por testículo aumentou nos grupos suplementados (As + vit C e As +

Zn) em relação ao controle. No grupo As + Vit C o número de CL/testículo também aumentou, comparado ao grupo onde a vitamina C foi administrada de forma isolada. Já em relação ao número de CL por grama de órgão houve aumento significativo no grupos As + Vit C quando comparado ao controle e ao Vit C. As células de Leydig observadas nos diferentes tratamentos foram representadas na Figura 8.

Tabela 3: Parâmetros estereológicos e morfométricos das células de Leydig de ratos Wistar tratados com arsenito de sódio e suplementados com vitamina C ou zinco.

Grupo/ Parâmetro	Controle	As	Vit C	Zn	As + Vit C	As + Zn
Diâmetro nuclear (μm)	7,19 ± 0,33^a	8,06 ± 0,40^b	6,9 ± 0,54 ^{ab}	7,57 ± 0,50 ^{ab}	7,19 ± 0,13^a	7,39 ± 0,28 ^{ab}
Volume nuclear (μm^3)	195.5 ± 26.6^a	275.3 ± 39.7^b	179.5 ± 41.5 ^{ab}	229.3 ± 45.1 ^{ab}	194.7 ± 10.43^a	211.8 ± 24.16^a
Volume citoplasmático (μm^3)	616.3 ± 131.1^{acd}	1042.8 ± 146.0^{bd}	887.8 ± 195.8^{bd}	670.4 ± 195.0 ^{abcd}	675.4 ± 26.86^{abc}	757.74 ± 199.34 ^{abcd}
Volume individual CL (μm^3)	811.9 ± 153.8^a	1318.2 ± 183.1^b	1067.4 ± 234.2 ^{ab}	899.7 ± 235.6 ^{ab}	870.10 ± 28.17^b	969.54 ± 216.29^b
Nº de CL por testículo ($\times 10^6$)	14,9 ± 4,56^{acd}	18,1 ± 4,65 ^{abcd}	15,8 ± 3,87^{abc}	22,3 ± 8,59 ^{abcd}	31,92 ± 17,18^{bd}	30,64 ± 4,32^{bcd}
Nº de CL/g de testículo ($\times 10^6$)	9,50 ± 3,42^a	10,7 ± 3,05 ^{ab}	9,43 ± 2,21^a	13,6 ± 5,52 ^{ab}	19,17 ± 10,24^b	18,65 ± 3,82 ^{ab}

CL: célula de Leydig. Valores são média ± desvio-padrão. Letras diferentes na mesma linha $p < 0,05$; segundo ANOVA seguido de teste de Tukey.

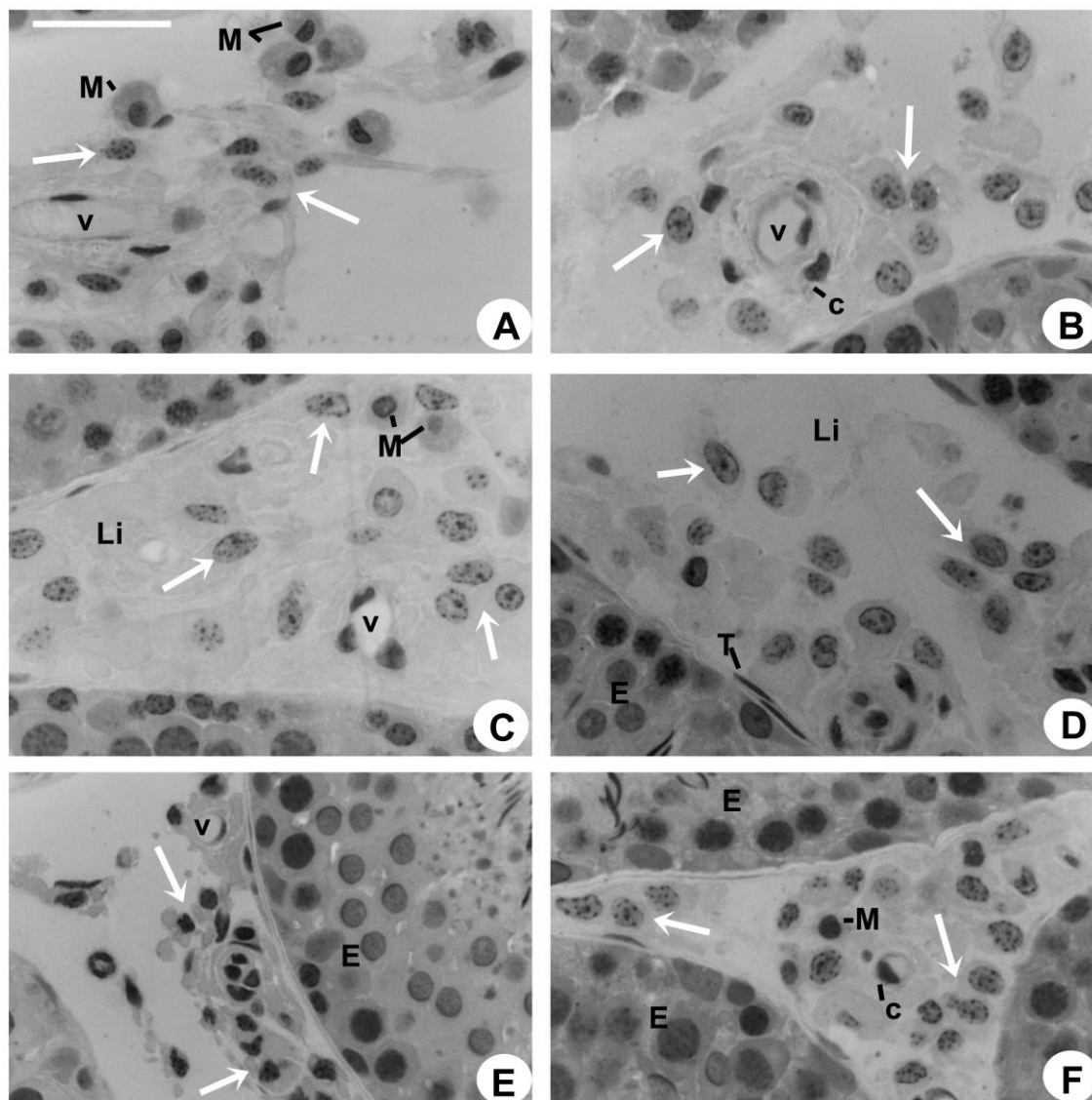


Figura 8. Compartimento intersticial evidenciando as células de Leydig (seta) de ratos Wistar tratados com arsenito de sódio e suplementados com vitamina C ou zinco. A –controle; B – arsenito de sódio; C –vitamina C; D –zinco; E –arsenito de sódio associado a vitamina C; F – arsenito de sódio em associação ao cloreto de zinco. Lu: lúmen tubular; E: epitélio germinativo; T: túnica própria; M: macrófago; L: célula de Leydig; Li: espaço linfático; C: tecido conjuntivo; V: vaso sanguíneo. Coloração HE. Barra: 20 μ m.

4.5 CONTAGEM DA POPULAÇÃO CELULAR NO ESTÁDIO 1 DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO

Os dados de população celular do túbulo seminífero encontram-se na Tabela 4. Foi verificada redução no número de espermátócitos I na fase de pré-leptóteno/leptóteno quando se comparou os animais que receberam a vitamina C associada ao arsenito de sódio ao grupo que recebeu apenas vitamina C ($p < 0,05$). Também houve redução no número de espermátides arredondadas nos grupos tratados com arsenito de forma isolada ou em associação quando comparados ao grupo controle.

Tabela 4. Número corrigido de células espermátogênicas e células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar tratados com arsenito de sódio e suplementados com vitamina C ou zinco.

Grupo/ Parâmetro	Controle	As	Vit C	Zn	As + Vit C	As + Zn
SPG A	2,01 ± 0,57	2,07 ± 0,55	2,04 ± 0,18	2,56 ± 0,33	2,60 ± 0,29	2,08 ± 0,59
SPT I PL/L	27,85 ± 1,76 ^{ab}	24,93 ± 5,72 ^{ab}	29,08 ± 3,01^a	25,62 ± 2,69 ^{ab}	20,77 ± 2,97^b	25,25 ± 4,41 ^{ab}
SPT I P	24,33 ± 2,48	22,43 ± 1,45	24,12 ± 2,02	24,72 ± 1,78	22,25 ± 1,75	22,26 ± 2,00
SPD Ar	92,25 ± 3,03^a	78,12 ± 2,75^b	85,81 ± 4,45 ^{ab}	88,93 ± 8,22 ^{ab}	83,22 ± 1,41^b	81,11 ± 3,88^b
Sertoli	4,50 ± 0,34	4,20 ± 0,33	4,86 ± 0,15	4,59 ± 1,19	4,35 ± 0,55	4,12 ± 0,76

SPG A: espermátogônias do tipo A; SPT I PL/L: espermátócitos I em pré-leptóteno/ leptóteno; SPT I P: espermátócitos I em paquíteno; SPD Ar: espermátides arredondadas. Valores são média ± desvio-padrão. Letras diferentes na mesma linha $p < 0,05$; segundo ANOVA seguido de teste de Tukey.

4.6 RAZÕES ENTRE OS NÚMEROS CELULARES

As razões entre os números celulares para avaliação do processo espermátogênico e das células de Sertoli encontram-se na Tabela 5. O número total de células germinativas foi reduzido nos grupos As e As + Vit C em comparação ao controle. Foi observada redução ($p < 0,05$) para o coeficiente de mitose espermátogonial no grupo As + Vit C comparado com os grupos

controle e Vit C. Os animais do grupo tratado com vitamina C apresentaram redução significativa no suporte total da célula de Sertoli em comparação ao grupo controle.

Os resultados relativos ao número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo encontram-se representados na Figura 9, apresentando variação significativa entre os tratamentos controle e As + Vit C.

Tabela 5. Razões entre os números celulares de ratos Wistar tratados com arsenito de sódio e suplementados com vitamina C ou zinco.

Grupo/ Parâmetro	Controle	As	Vit C	Zn	As + Vit C	As + Zn
Número total de células germinativas	146,45 ± 5,16 ^a	127,55 ± 9,66 ^b	141,05 ± 8,02 ^{ab}	141,83 ± 11,81 ^{ab}	128,85 ± 3,83 ^b	130,70 ± 9,63 ^{ab}
Coefficiente de mitose espermatogonial	14,71 ± 4,08 ^a	12,35 ± 2,76 ^{ab}	14,26 ± 1,08 ^a	10,10 ± 1,26 ^{ab}	8,14 ± 1,77 ^b	13,07 ± 4,75 ^{ab}
Rendimento geral da espermatogênese	48,69 ± 12,73	39,54 ± 9,18	42,22 ± 3,28	35,29 ± 6,10	32,34 ± 3,73	41,70 ± 12,20
Índice meiótico	3,82 ± 0,33	3,49 ± 0,15	3,57 ± 0,29	3,60 ± 0,17	3,76 ± 0,28	3,66 ± 0,23
Eficiência da célula de Sertoli	20,53 ± 0,95	18,63 ± 0,84	17,65 ± 0,55	20,53 ± 5,96	19,36 ± 2,41	20,14 ± 3,21
Suporte total da célula de Sertoli	32,59 ± 1,49 ^a	30,34 ± 0,40 ^{ab}	29,01 ± 1,10 ^b	32,66 ± 9,14 ^{ab}	30,00 ± 4,08 ^{ab}	32,32 ± 4,39 ^{ab}

Valores são média ± desvio-padrão, Letras diferentes na mesma linha p<0,05, segundo ANOVA seguido de teste de Tukey.

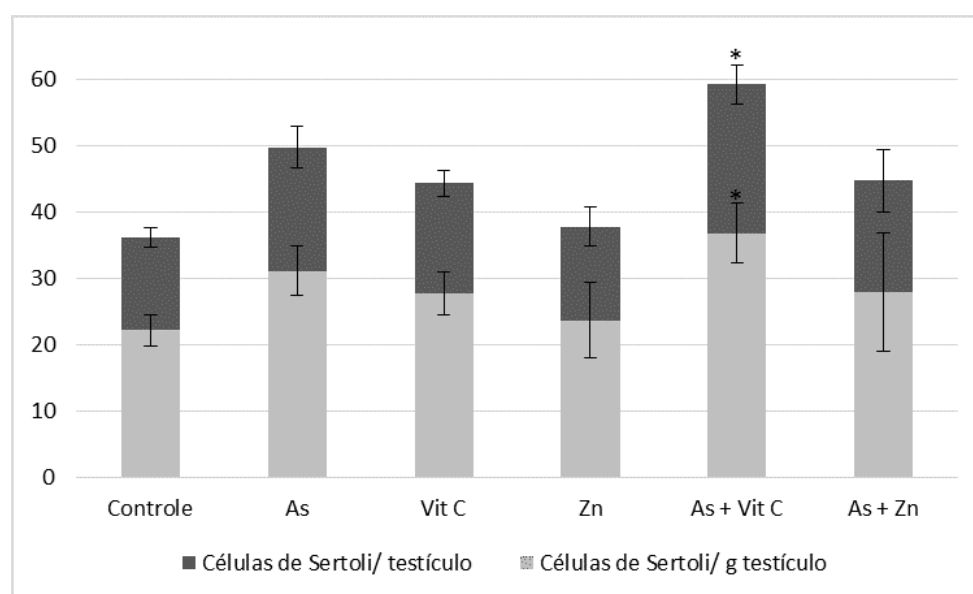


Fig. 9. Número de células de Sertoli ($\times 10^6$) por testículo e por grama de testículo de ratos Wistar tratados com arsenito de sódio e suplementados com vitamina C ou zinco (valores são média ± desvio-padrão. * p<0,05 comparado com controle; segundo ANOVA seguido de teste de Tukey).

4.7 CONTAGEM DE ESPERMÁTIDES, PRODUÇÃO DIÁRIA ESPERMÁTICA E TEMPO DE TRÂNSITO EPIDIDIMAL

O número de espermátides maduras no testículo e a produção espermática diária neste órgão foram reduzidos nos animais tratados com o arsenito de sódio isolado e em associação a vitamina C, em comparação com os animais do grupo controle. O número de espermátides por grama de testículo foi reduzido em todos tratamentos em que os animais receberam o metaloide, quando comparados ao grupo controle. O número de espermatozoides por grama na região da cauda do epidídimo dos animais pertencentes ao grupo As + Vit C foi significativamente menor do que o do grupo de controle (Tabela 6). Não houve diferença entre os grupos em relação ao número de espermatozoides presentes nas regiões cabeça/corpo do epidídimo e no tempo de trânsito espermático nas regiões do epidídimo entre os grupos experimentais (Tabela 6).

Tabela 6. Contagem de espermátides no testículo e espermatozoides das porções cabeça/corpo e cauda do epidídimo, produção espermática diária e tempo de trânsito epididimal de ratos Wistar tratados com arsenito de sódio e suplementados com vitamina C ou zinco.

Grupo/ Parâmetro	Controle	As	Vit C	Zn	As + Vit C	As + Zn
Nº de espermátides (x 10 ⁶ /testículo)	125,90 ± 9,40 ^a	79,79 ± 21,15 ^b	100,39 ± 28,58 ^{ab}	102,43 ± 15,65 ^{ab}	83,20 ± 14,81 ^b	96,48 ± 23,87 ^{ab}
Nº de espermátides (x 10 ⁶ /g testículo)	164,88 ± 24,77 ^a	97,19 ± 19,71 ^b	134,38 ± 21,74 ^{ab}	123,24 ± 24,64 ^{ab}	108,80 ± 14,78 ^b	123,12 ± 25,40 ^b
PDE (x 10 ⁶ /testículo/dia)	20,64 ± 1,54 ^a	13,08 ± 3,47 ^b	16,46 ± 4,69 ^{ab}	16,79 ± 2,57 ^{ab}	13,64 ± 2,43 ^b	15,82 ± 4,00 ^{ab}
Nº de sptz na cabeça/corpo do epidídimo (x 10 ⁶ /g órgão)	850 ± 177,80	677,5 ± 58,39	858,75 ± 97,78	777,5 ± 52,41	714,375 ± 46,16	741 ± 69,68
Tempo de trânsito espermático na cabeça/corpo do epidídimo (dias)	12,54 ± 3,46	16,19 ± 4,77	17,47 ± 5,33	16,13 ± 1,49	15,89 ± 5,96	14,90 ± 4,65
Nº de sptz na cauda do epidídimo (x 10 ⁶ /g órgão)	971,25 ± 76,09 ^a	777,5 ± 143,43 ^{ab}	826,25 ± 59,32 ^{ab}	924 ± 136,86 ^{ab}	766,875 ± 81,86 ^b	895 ± 88,39 ^{ab}
Tempo de trânsito espermático na cauda do epidídimo (dias)	12,28 ± 1,47	19,26 ± 6,86	17,32 ± 5,47	15,56 ± 2,33	16,96 ± 4,15	16,09 ± 3,08

PDE: produção diária espermática; sptz: espermatozoide. Valores são média ± desvio-padrão. Letras diferentes na mesma linha p<0,05, segundo ANOVA seguido de teste de Tukey.

4.8 MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES

Os animais do grupo arsenito de sódio apresentaram maior proporção de espermatozoides anormais em relação aos animais controle ($p < 0,05$). A administração de zinco e vitamina C associada ao arsênio levou a um maior número de espermatozoides normais em relação ao grupo que recebeu somente As (Figura 10).

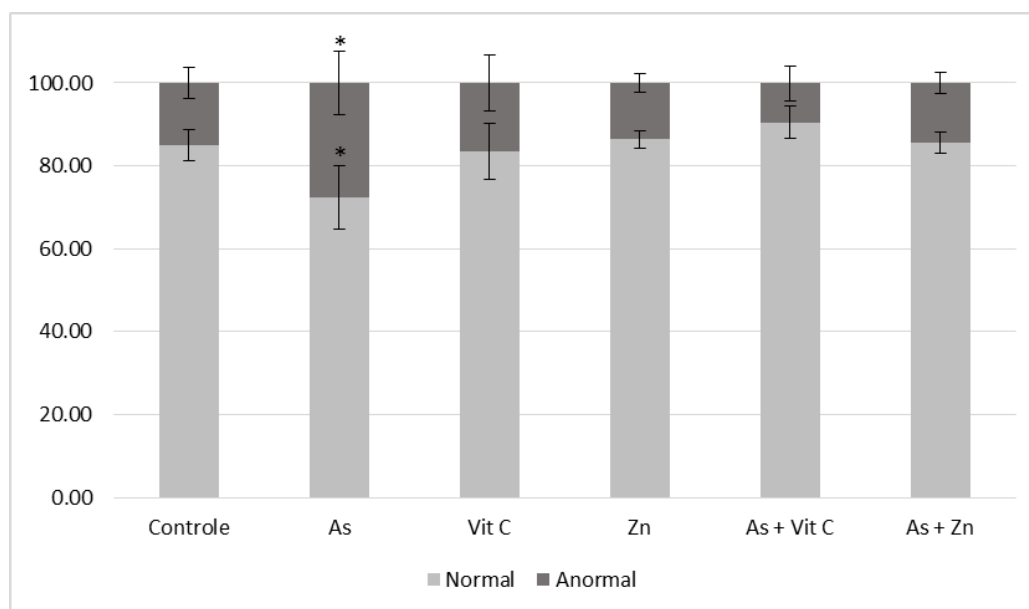


Figura 10. Proporção de espermatozoides normais e anormais (%) presentes no ducto deferente de ratos Wistar tratados com arsenito de sódio e suplementados com vitamina C ou zinco (valores são média \pm desvio-padrão. * $p < 0,05$; segundo ANOVA seguido de teste de Tukey).

Os espermatozoides anormais foram subdivididos em categorias, como mostrado na Tabela 7. As anormalidades observadas foram: espermatozoide com cabeça normal separada do flagelo; gancho em diferente ângulo; flagelo enrolado; e cabeça amorfa e flagelo normal (Figura 11). Os animais do grupo que recebeu somente arsenito de sódio apresentou uma maior proporção de espermatozoides com cabeças normais separadas do flagelo em relação aos grupos controle, As + Vit C e As + Zn. Na categoria flagelo enrolado e gancho em diferente ângulo, o grupo As apresentou aumento significativo quando comparado aos grupos As + Vit C e As + Zn. Apenas os grupos controle e As + Zn não apresentaram espermatozoides com a anormalidade duas cabeças. A anormalidade cabeça amorfa com flagelo normal foi significativamente maior no grupo As quando comparados ao controle e As + Zn.

Tabela 7. Anormalidades encontradas nos espermatozoides de ratos Wistar tratados com arsenito de sódio e suplementados com zinco e/ou vitamina C.

Anormalidade (%)	Controle	As	Vit C	Zn	As + Vit C	As + Zn
Cabeça normal separada do flagelo	10,40 ± 3,13 ^b	18,75 ± 5,43 ^a	14,33 ± 6,47 ^{ab}	9,00 ± 2,90 ^b	6,88 ± 3,77 ^b	11,70 ± 3,27 ^{ab}
Gancho em diferente ângulo	3,40 ± 2,70 ^{ab}	4,25 ± 2,46 ^a	0,83 ± 0,61 ^b	1,92 ± 0,97 ^b	1,00 ± 0,41 ^b	1,60 ± 0,96 ^b
Flagelo enrolado	1,00 ± 1,27 ^{ab}	2,92 ± 1,36 ^a	0,58 ± 0,38 ^b	1,67 ± 1,72 ^{ab}	0,75 ± 0,87 ^b	0,70 ± 0,84 ^b
Duas cabeças	0,00 ± 0,00 ^b	0,08 ± 0,20 ^a	0,08 ± 0,20 ^a	0,08 ± 0,20 ^a	0,13 ± 0,25 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
Cabeça amorfa com flagelo normal	0,20 ± 0,27 ^b	1,67 ± 0,93 ^a	0,75 ± 0,69 ^{ab}	0,92 ± 0,58 ^{ab}	0,63 ± 0,63 ^{ab}	0,40 ± 0,42 ^b

Valores são média ± desvio-padrão. Letras diferentes na mesma linha p<0,05; segundo ANOVA seguido de teste de Tukey.

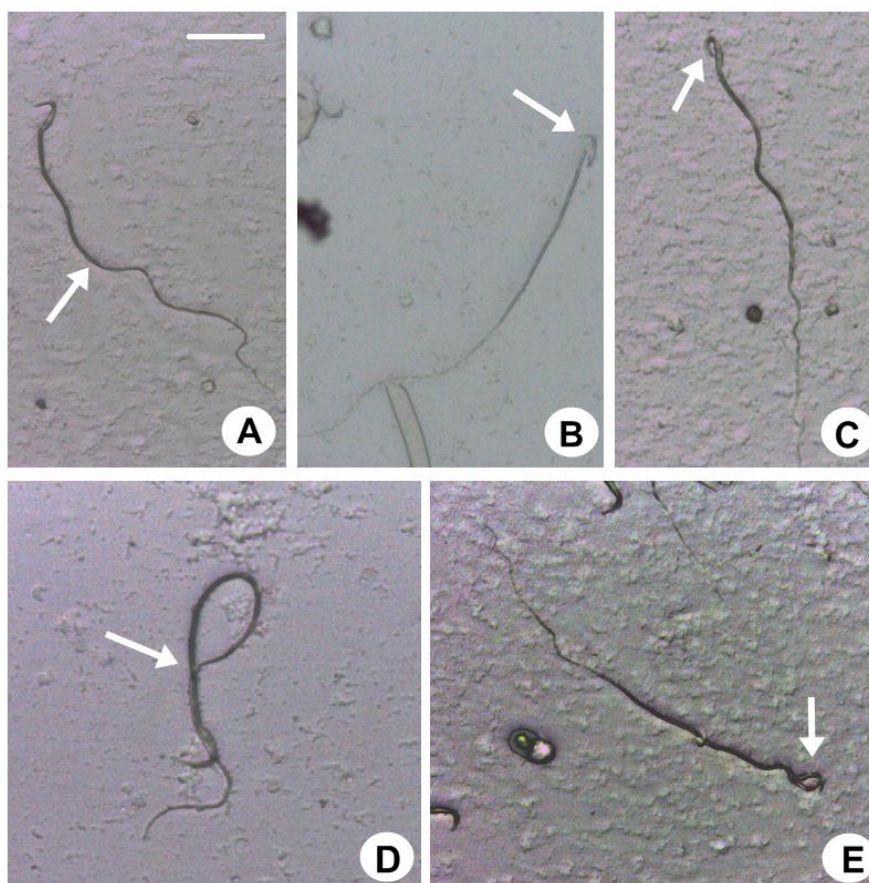


Figura 11. Morfologia dos espermatozoides anormais presentes no ducto deferente de ratos Wistar tratados com arsenito de sódio. A – espermatozoide normal; B – espermatozoide com cabeça normal separada do flagelo; C – espermatozoide com gancho em diferente ângulo; D – espermatozoide com flagelo enrolado; E – espermatozoide com cabeça amorfa e flagelo normal. Barra: 50µm.

5. DISCUSSÃO

Este estudo examinou o efeito tóxico do arsenito de sódio no sistema reprodutor masculino de ratos Wistar adultos. Além disso, avaliou se o zinco ou a vitamina C, quando administrados em associação ao arsenito de sódio, são capazes de reverter o efeito tóxico deste metaloide nos parâmetros estudados. A morfometria tem sido frequentemente utilizada para ajudar na comparação entre os grupos experimentais, adicionando, assim, mais confiabilidade ao diagnóstico final. O presente estudo utilizou ferramentas morfométricas e estereológicas para descrever as possíveis alterações na estrutura testicular dos animais tratados.

Mudanças no peso dos órgãos reprodutores são bons indicativos da influência de algum agente exógeno sobre o sistema reprodutor masculino (ZENICK *et al.*, 1994). Entretanto, os efeitos tóxicos produzidos por substâncias químicas em sistemas biológicos só se manifestam se o agente tóxico ou um produto de sua biotransformação alcançar locais específicos do organismo, em concentração e tempo suficientes para produzi-los (OGA *et al.*, 2008).

Nesse estudo não foi observada diferença significativa no ganho de peso corporal e nos pesos testicular, epididimal e das glândulas acessórias (exceto a próstata) em ratos expostos ao arsenito de sódio. Os resultados encontrados estão de acordo com achados anteriores sobre o efeito do arsenito de sódio no peso dos testículos e glândulas acessórias. Pant *et al.* (2001) não observaram variação no peso dos órgãos reprodutores e acessórios após administração de arsenito de sódio durante 35 dias. Carvalho (2009) detectou aumento significativo do peso corporal de camundongos tratados com arsenato de sódio na concentração de 1,0 mg/L fornecida durante 42 e 84 dias. No mesmo trabalho, o peso da gônada, IGS, peso da albugínea e do parênquima testicular não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos analisados. Ferreira *et al.* (2012) observaram que após 35 dias de exposição, a 7,5 mg/kg de arsenito de sódio, o peso corporal, peso do epidídimo e testículo não foram estatisticamente diferentes do controle.

Resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa mostraram que o tratamento com arsenito de sódio durante 7 dias, na dosagem de 5 mg/kg/dia, levou ao aumento no peso corporal e redução no peso testicular, sem alterar o IGS (SILVA, 2013). Já a mesma dose administrada por 21 dias consecutivos

não culminou na variação significativa do IGS e dos pesos corporal, testicular e dos órgãos reprodutivos acessórios (dados não publicados), o que também foi observado após 60 dias de exposição.

A próstata aumentou de peso somente nos animais do grupo As + Zn em relação ao grupo controle. Alterações no peso da próstata e demais órgãos sexuais acessórios são os primeiros indicadores de possíveis alterações no estado androgênico dos animais, já que as funções secretórias desses órgãos são andrógeno-dependentes e variam sensivelmente com as concentrações circulantes de testosterona (CREASY, 2001). Como os demais órgãos não apresentaram diferenças no peso após os tratamentos, acredita-se que não houveram alterações dos níveis de testosterona nos animais tratados. Estudos da morfologia prostática estão em andamento para avaliar o efeito do arsenito de sódio e sua associação com zinco e a vitamina C nesse órgão.

Parâmetros quantitativos relacionados ao túbulo seminífero, como o diâmetro tubular, a altura do epitélio seminífero e o comprimento tubular total apresentam correlação direta com a atividade espermatogênica (PAULA, 2002; HOLSTEIN *et al.*, 2003). A medida do diâmetro tubular é um parâmetro que pode ser considerado um indicador da atividade espermatogênica em estudos sobre o desenvolvimento testicular, efeitos da idade avançada, estudos experimentais e toxicológicos e influência sazonal sob a espermatogênese (ASSIS NETO *et al.*, 2003), enquanto a altura do epitélio pode ser mais precisa para avaliar a produção espermática (WING & CHRISTENSEN, 1982). O aumento do diâmetro do túbulo seminífero é indicativo de retenção de fluidos, resultante da redução do esvaziamento através dos ductos deferentes, ao passo que a diminuição do diâmetro tubular pode indicar perda de células germinativas (MOFFIT *et al.*, 2007).

O tratamento com arsenito de sódio reduziu o diâmetro dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio seminífero, com conseqüente redução na proporção volumétrica de túbulos seminíferos em todos os grupos em que foi administrado, corroborando os resultados de Sanghamitra *et al.* (2008) e Reddy *et al.* (2011). Ferreira *et al.* (2012) observaram que animais expostos a 7,5 mg/kg de arsenito de sódio, durante 35 dias, apresentaram redução significativa no diâmetro dos túbulos seminíferos. Já entre os animais expostos à mesma quantidade de arsenito seguida por exposição à água destilada

durante 70 dias observou-se recuperação das alterações causadas pelo As no diâmetro tubular, quando comparados com o grupo de controle.

No presente estudo a proporção volumétrica de túbulos seminíferos não variou entre os grupos experimentais (exceto entre o grupo As + Zn quando comparado aos grupos controle e Zn), porém os danos observados no epitélio seminífero evidenciaram a ação negativa do metal sobre o ambiente tubular. A redução do compartimento tubular ocorreu devido à diminuição no percentual de epitélio no grupo As + Zn e o aumento na proporção volumétrica do compartimento intersticial está relacionado ao aumento do espaço linfático e de células de Leydig. Sabe-se que a proporção volumétrica dos elementos do parênquima testicular, em especial dos túbulos seminíferos em mamíferos, é muito variável, sendo um dos principais fatores responsáveis pela diferença observada na eficiência da produção espermática nas diversas espécies (RUSSELL *et al.*, 1990b; FRANÇA & RUSSELL, 1998).

Para a avaliação da espermatogênese são observados três índices: o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais, que quantifica o grau de perdas celulares na espermatogênese; o rendimento meiótico, que avalia a eficiência das duas divisões meióticas; e o rendimento geral da espermatogênese, que avalia a eficiência do processo espermatogênico (PAULA, 2002). O rendimento intrínseco da espermatogênese não é 100%. Há perdas celulares devido a fatores como altas temperaturas ou distúrbios hormonais (RODRIGUES *et al.*, 2012), sendo este um mecanismo regulador da proporção de células germinativas por célula de Sertoli. As perdas celulares são mais acentuadas na fase mitótica e, em menor proporção, na fase meiótica (HESS & FRANÇA, 2008).

Neste estudo, não houve diferença estatística entre os grupos em relação ao rendimento meiótico e ao rendimento geral da espermatogênese. O grupo As + Vit C apresentou redução no coeficiente de eficiência de mitoses em relação ao grupo controle e ao Vit C. Apesar dos três índices citados para a avaliação da espermatogênese não terem sido alterados significativamente nos animais tratados somente com o metaloide, o número total de células germinativas e a produção diária de espermatozoides (PDE) foram reduzidos de forma significativa nos animais dos grupos que receberam As em relação ao controle, exceto no grupo As + Zn. A redução do número total de células

germinativas se deu pelo menor número de espermatócitos em pré-leptóteno/leptóteno e/ou espermátides arredondadas. Portanto, o tratamento crônico com arsenito de sódio afetou a atividade espermatogênica e mesmo com a administração dos antioxidantes zinco e vitamina C, o número de células germinativas foi afetado, com conseqüente redução do diâmetro tubular. Entretanto o zinco se mostrou mais eficiente, já que a PDE e o número de células germinativas não foram reduzidas no grupo As + Zn, apesar da redução do diâmetro tubular.

A administração oral de arsenito de sódio, mesmo com tratamento concomitante dos antioxidantes zinco e vitamina C, causou redução significativa do número de espermátides arredondadas no epitélio seminífero. Durante a fase da espermiogênese as perdas celulares não são significativas (RUSSELL & CLERMONT, 1977), portanto o número de espermátides arredondadas observadas é considerado como a população de espermatozoides. Corroborando com a redução do número de espermátides arredondadas no epitélio seminífero dos animais tardados com As, o número de espermátides resistentes à homogeneização por testículo, assim como a PDE foi reduzido nos animais dos grupos As e As + Vit C. Souza (2013) obteve resultados semelhantes ao tratar ratos Wistar com 0,01 mg/L e 10 mg/L de arsenito de sódio. Em seu experimento, também houve redução na PDE e no número de espermátides, assim como não houve diferença no tempo de trânsito espermático nas regiões da cauda e cabeça/corpo do epidídimo em relação ao controle em ambos os estudos.

As células de Sertoli formam uma barreira capaz de isolar as células que se encontram nas fases meióticas e pós-meiótica do ciclo espermatogênico, garantindo um ambiente protegido do sistema imune e propício para o desenvolvimento dos gametas (PELLETIER, 2011). As alterações observadas em relação a proporção de epitélio germinativo dos animais tratados com o metaloide poderiam estar associadas ao rompimento da barreira das células de Sertoli, conseqüentemente comprometendo o processo espermatogênico normal por afetar diretamente as células germinativas, que foram reduzidas nos animais que receberam arsenito de sódio e As + Zn. Porém, não foi notada redução significativa na capacidade suporte das células de Sertoli e no número dessas células nos animais que receberam o metaloide. Análises em

microscopia eletrônica de transmissão se tornam necessárias para avaliar a ultraestrutura da população celular do túbulo seminífero.

As células animais produzem ERO quando expostas a agentes estressores ambientais. Se uma grande quantidade de ERO for gerada, pode haver inibição da capacidade de neutralização celular, levando a alterações em componentes celulares como lipídeos e proteínas, resultando no comprometimento da estrutura e função celular (CHANG *et al.*, 2007, BAASTRUP *et al.*, 2008). Chang e colaboradores (2007) observaram alterações no sistema endógeno de defesa antioxidante após a exposição ao arsênio.

Os animais tratados com o arsenito de sódio mostraram aumento significativo de espermatozoides morfológicamente anormais em todas as categorias analisadas. Em estudos anteriores, o tratamento com arsênio foi associado à diminuição do número e motilidade de espermatozoides e ao aumento de espermatozoides com morfologia anormal (SARKAR *et al.*, 2003; JANA *et al.*, 2006; MOMENI & ESKANDARI, 2012). É provável que as ERO produzidas pelo arsenito de sódio tenham sido responsáveis pelas anormalidades morfológicas encontradas nos espermatozoides de ratos tratados com arsenito. A compensação destas anormalidades pela administração de vitamina C e zinco pode ser atribuída às propriedades antioxidantes dessas substâncias e, portanto, reforçam a hipótese de que o estresse oxidativo mediado por arsenito de sódio causa anomalias morfológicas no espermatozoide de ratos Wistar, já que os antioxidantes protegeram as células germinativas masculinas contra danos oxidativos (FRAGA *et al.*, 1991).

Eskenazi e colaboradores (2005) observaram que o consumo de antioxidante na dieta está associado com o aumento do número e motilidade de espermatozoides de homens saudáveis de uma ampla faixa etária. Momeni & Eskandari (2012) observaram que ratos tratados com arsenito de sódio apresentaram aumento significativo de espermatozoides anormais e que quando a vitamina E foi associada ao arsenito houve redução significativa das anomalias morfológicas. Estudos mostram que a vitamina C presente no sêmen está relacionada com a porcentagem de espermatozoides com morfologia normal (THIELE *et al.*, 1995), que pode proteger os

espermatozoides dos danos oxidativos e melhorar a qualidade do sêmem em fumantes (FRAGA *et al.*, 1991; DAWSON *et al.*, 1992). Já o zinco participa da formação de enzimas destoxicantes, como a superóxido dismutase e também da proteção do grupo sulfidril de proteínas, além de impedir a peroxidação lipídica (BRAY & BETTGER, 1990).

As células de Leydig (CL) são responsáveis pela secreção de hormônios andrógenos, principalmente a testosterona, fundamental para o desenvolvimento e a função reprodutiva no sistema reprodutor de machos (Russell *et al.*, 1990c). As espécies reativas de oxigênio parecem atuar sobre mitocôndrias presentes nas CL resultando na inibição da expressão da proteína regulatória esteroidogênica aguda (StAR) responsável pela produção dos esteroides (HALES, 2002). Fatores ambientais, como a exposição a metais pesados, podem levar a interrupção da biossíntese de testosterona e causar disfunção sexual e infertilidade (PAPADOPOULOS, 2007).

Nesse estudo foi observado aumento do diâmetro nuclear e do volume individual das CL nos animais tratados com arsenito de sódio. Os grupos que tiveram vitamina C ou zinco associados ao arsenito apresentaram comportamento similar aos tratamentos controle (controle, Vit C e Zn). A não alteração dos mesmos parâmetros nas CL dos grupos que receberam os antioxidantes associados ao tratamento com o metaloide indica atividade protetora dessas substâncias nas células de Leydig. Entretanto, os grupos As + Zn e As + Vit C apresentaram maior número de CL por testículo e um aumento significativo na proporção volumétrica (%) e volume de CL presente no parênquima testicular em relação aos animais do grupo controle. Possivelmente, essas células aumentaram significativamente em número nos tratamentos com antioxidante para compensar a presença do agente tóxico sobre a função celular.

As alterações encontradas nas CL dos animais que receberam somente arsenito de sódio estão condizentes com o estudo realizado por Garcia *et al.* (2014), em que a administração de prata, outro tipo de metal pesado, também revelou disfunções nas células de Leydig em ratos expostos.

As alterações observadas nas células de Leydig podem ter ocorrido pelo fato destas encontrarem-se próximas aos vasos sanguíneos e serem as primeiras a entrarem em contato com o arsenito. Tal fato também explicaria a

razão pela qual os animais suplementados não apresentaram alterações de diâmetro e volume individual como apresentados pelo grupo As, já que a proximidade com os vasos sanguíneos possivelmente propicia o contato com o antioxidante administrado. Análises ultraestruturais são necessárias para avaliar se as alterações observadas nas CL são decorrentes de algum tipo de lesão celular, além de dosagens hormonais para confirmar se o arsenito de sódio alterou a produção de andrógenos testiculares, uma vez que os órgãos reprodutores acessórios, que são andrógeno-dependentes, não tiveram os seus pesos alterados.

Trabalhos anteriores do grupo de pesquisa mostram que a administração da mesma dose de arsenito de sódio (5 mg/kg/dia) a ratos Wistar, porém com tempo de exposição diferentes (7 e 21 dias), apresentam resultados diferentes para os mesmos parâmetros analisados após 60 dias de tratamento. Com 7 dias, observou-se redução no peso testicular e aumento da túnica própria, o que pode ter sido resultado da tentativa primária do organismo ao tentar se defender do agente agressor (SILVA, 2013). Já com 21 dias de exposição, o As levou a redução da proporção volumétrica e do número de CL no testículo e por grama de órgão (dados não publicados). Entretanto, com 60 dias de tratamento, observou-se aumento do volume das células de Leydig dos animais expostos ao As. Este aumento foi acentuado nos tratamentos com administração concomitante de um dos antioxidantes, sendo que nesses grupos também houve aumento do número CL por testículo. Este aumento celular pode estar relacionado a um mecanismo compensatório de uma provável desregulação da produção de andrógenos causada pelo agente agressor. Outras alterações foram observadas após a administração de As por 60 dias: redução no diâmetro tubular e altura do epitélio; redução no número de células germinativas, com conseqüente redução da produção diária de espermatozoides (PDE); e aumento no número de espermatozoides com morfologia anormal.

Com esses resultados, pode-se concluir que o arsenito de sódio causa inúmeras alterações no parênquima testicular, de acordo com o tempo de administração, e que a associação de substâncias antioxidantes com As foi capaz de proteger o testículo em muitos parâmetros analisados.

6. CONCLUSÃO

Os resultados da influência da exposição crônica do arsenito de sódio administrado isoladamente ou em associação com o zinco ou vitamina C, durante 60 dias, sobre os testículos de ratos Wistar adultos permitiram as seguintes conclusões:

- O arsenito de sódio na dose de 5 mg/kg provocou redução no diâmetro dos túbulos e na altura de epitélio seminífero, porém o comprimento do túbulo aumentou de forma a não alterar os parâmetros biométricos do órgão. Apesar de não ter levado a alterações biométricas, o As causou diversas alterações na morfologia testicular e espermática;
- Perdas durante a espermatogênese levaram à redução no número de espermátides maduras no testículo e conseqüente redução na produção diária de espermatozoides dos animais tratados com As. Porém, a associação com vitamina C e zinco foi capaz de proteger os espermatozoides. Assim, pode-se concluir que esta suplementação aumenta a viabilidade espermática, sendo o zinco mais eficiente que a vitamina C, já que a PDE também foi reduzida nos animais que receberam As + Vit C.
- O tratamento com As resultou no aumento de diâmetro nuclear e volume individual (nuclear e citoplasmático) das células de Leydig, não observado nos demais grupos.
- A administração de zinco e vitamina C na dosagem utilizada (20 mg/kg/dia e 100 mg/kg/dia, respectivamente) apesar de reduzir os danos no epitélio seminífero não protegeu de todos os prejuízos causados pelo arsenito de sódio. O melhor resultado da associação foi em relação à morfologia espermática, onde os grupos suplementados apresentaram resultados similares ao controle. A associação com o zinco apresentou melhores resultados, o que pode ser justificado pelo fato da vitamina C ser uma substância instável, facilmente oxidável e/ou por, em determinadas condições, participar de reações de oxidação, sendo um potente indutor de radicais livres, agindo como um pró-oxidante.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A.; SAID, T.M.; BEDAIWY, M.A.; BANERJEE, J.; ALVAREZ J.G. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. **Fertility and Sterility**, v. 86, p. 503–12, 2006.

AGARWAL, A.; MAKKER, K.; SHARMA, R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.59, p. 2-11, 2008.

AHMAD, I.; AKTHAR, K.M.; HUSSAIN, T. Arsenic induced microscopic changes in rat testis. **Professional Medical Journal**, v. 15, p. 287-91, 2008.

AHSAN, H.; PERRIN, M.; RAHMAN, A.; PARVEZ, F.; STUTE, M.; ZHENG, Y.; MILTON, A.H.; BRANDT-RAUF P.; GEEN, A.; GRAZIANO, J. Associations between drinking water and urinary arsenic levels and skin lesions in Bangladesh. **Journal Occupational and Environmental Medicine**, v. 42, n.12, p.1195-1201, 2000.

AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Molecular Cellular Endocrinology**,v. 250,p. 66-69, 2006.

AHIAMADJIE, H.; AHIAMADJIE, H.; SERFOR-ARMAH, Y.; TANDOH J.B.; GYAMPO, O.; DAMPARE, S.B.; NYARKO B.J.B. Elemental composition of vegetables cultivated in illegal mining towns in Ghana using neutron activation analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Lousanne, v. 289, n. 1, p. 1-6, 2011.

ALI, M.; KHAN, S. A.; DUBEY, P.; NATH, A.; SINGH, J.K.; KUMAR, R.; KUMAR, A. Impact of Arsenic on Testosterone Synthesis Pathway and Sperm Production in Mice. **Innovative Journal of Medical and Health Science**, v.3, n. 4, p. 185–189, 2013.

ALI, M.M.; FREI, E.; STRAUB, J.; BREUER, A.; WIESSLER, M. Induction of metallothionein by zinc protects from daunorubicin toxicity in rats. **Toxicology**, v. 179, n. 1–2, p. 85–9330, 2002,

ALKORTA, I.; HERNÁNDEZ-ALLICA, J.; BECERRIL, J.M.; AMEZAGA, I.; ALBIZU, I.; GARBISU, C. Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic. **Reviews in Environmental Science and BioTechnology**, v.3, p. 71-90, 2004.

ALVES, M.G.; RATO, L.; CARVALHO, R.A.; MOREIRA, P.I.; SOCORRO, S.; OLIVEIRA, P.F. Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, p. 777–793, 2013.

AMANN, R.P.; ALMQUIST, J.O. Reproductive capacity of dairy bulls - VI effect of unilateral vasectomy and ejaculation frequency on sperm reserves; aspects of epididymal physiology. **The Journal of the Society for Reproduction and Fertility**, v. 3, p. 260-268, 1962.

AMANN, R.P.; SCHANBACHER, B.D. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 2, p. 380-403, 1983.

ASSIS NETO, A.C.; CARVALHO, M.A.M; MELO, M.I.V.; MIGLINO, M.A.; OLIVEIRA, M.F.; MARIANA, A.N.B. Fases do desenvolvimento e diferenciação testicular em cutias (*Dasyprocta aguti*) criadas em cativeiros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 71-79, (suppl.1), 2003.

ATTAL, J.; COUROT M. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, 3:219-241, 1963.

BAASTRUP, R.; SORENSEN, M.; BALSTROM, T.; FREDERIKSEN, K.; LARSEN, C.L.; TJONNELAND, A.; OVERVAD, K.; RAASCHOU-NIELSEN, O. Arsenic in drinking-water and risk for cancer in Denmark. **Environ Health Perspect**, v.116, p. 231-237, 2008.

BAIG, J.A.; KAZI, T.G.; SHAH, A.Q.; KANDHRO, G.A.; AFRIDI, H.I.; KHAN, S.; KOLACHI, N. F.; WADHWA, S. K. Arsenic speciation and other parameters of surface and ground water samples of Jamshoro, Pakistan. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, New York, v. 92, n. 1, p. 28-42, 2012.

BANSAL, A.K.; BILASPURI, G.S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p. 1-7, 2010.

BEDWAL, R.S.; BAHUGUNA, A. Zinc, copper and selenium in reproduction. **Experientia**, v. 50, n. 7, p. 626-640, 1994.

BERRA, C.M.; MENCK, C.F.M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

BIZARRO, P.; ACEVEDO, S.; NIÑO-CABRERA, G.; MUSSALI-GALANTE, P.; PASSOS, F.; VALILA-COSTA, M.R.; FORTOUL, T.I. Ultrastructural modifications in the mitochondrion of mouse Sertoli cells after inhalation of lead, cádmium or lead-cadmium mixture. **Reproductive Toxicology**, v. 17, n. 5, p. 561-566, 2003.

BOROWSKI, C.F. **Papel do zinco no sistema nervoso central: defesas antioxidantes e sinalização celular**. 2006. 99 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

BRAY, T.M.; BETTGER, W.J. The physiological role of zinc as an antioxidant. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 8, n. 3, p. 281–291, 1990.

BUNDSCHUH, J.; LITTER, M.I.; PARVEZ, F.; ROMÁN-ROSS, G.; NICOLLI, H.B.; JEAN, J.S.; LIU, C.W.; LÓPEZ D.; ARMIENTA, M.A.; GUILHERME, L.R.; CUEVAS, A.G.; CORNEJO, L.; CUMBAL, L.; TOUJAGUEZ, R. One century of arsenic exposure in Latin America: a review of history and occurrence from 14 countries. **Science of The Total Environment**, v. 429, p. 2-35, 2012.

CAMBIAGHI, A.S.; CASTELLOTTI, D.S. Fertilidade Natural. De volta ao passado a caminho do futuro. **LaVidaPress**, SP, p. 33-40, 2004.

CARVALHO, F.A.R. **Morfologia e morfometria testicular de camundongos adultos submetidos à exposição crônica de arsenato**. Dissertação (Mestrado em biologia celular e estrutural), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

CARVALHO, M.J.; FALCÃO, F.; CABRITA, A.; TORGAL, I.; FREIRE-DE-OLIVEIRA, C. Poluição química e função ovárica. **Acta Obstetrica e Ginecologica Portuguesa**, v. 4, n. 1, p. 36–43, 2010.

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

CHEN, B.; ARNOLD, L.L.; COHEN, S.M.; THOMAS, D.J.; LE, X.C. Mouse arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase genotype affects metabolism and tissue dosimetry of arsenicals after arsenite administration in drinking water. **Toxicological Sciences**, v. 124, n. 2, p. 320-26, 2011.

CHENG C.Y.; MRUK D.D. Cell junction dynamics in the testis: Sertoligerm cell interactions and male contraceptive development. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 825–874, 2002.

CHIMIANTI, F.; AOUFFEN, M.; FAVIER, A.; SEVE, M. Zinc homeostasis-regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate. **Current Drug Targets**, v.4, n. 4, p.323-338, 2003.

CHOWDHURY, R.; CHATTERJEE, R.; GIRI, A.K.; MANDAL, C.; CHAUDHURI, K. Arsenic- induced cell proliferation is associated with enhanced ROS generation, Erk signaling and CyclinA expression. **Toxicol Lett**, v. 198, p. 263–271, 2010.

Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, 2005. Resolução no 357 de 17 de março de 2005. **Classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de água superficiais, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, 18 de Março de 2005.

COOPER, K.L.; LIU, K.J.; HUDSON, L.G. Enhanced ROS production and redox signaling with combined arsenite and UVA exposure: contribution of NADPH oxidase. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 381–388, 2009.

COSTA, K.L.C.; MATTA, S.L.P.; GOMES M.L.M.; PAULA, T.A.R.; FREITAS, K.M.F.; CARVALHO, F.A.R.; SILVEIRA, J.A.; DOLDER, H.; MENDIS-HANDAGAMA, S.M.L.C. Histomorphometric evaluation of the neotropical Brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. **Animal Reproduction Science**, v. 127, p. 202-212, 2011.

CREASY, D.M. Pathogenesis of male reproductive toxicity. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 29, p. 64-76, 2001.

CSUROS, M.; CSUROS, C. Environmental sampling and analysis for metals. **Lewis Publishers**, USA, p. 372, 2000.

DADOUNE, J; DEMOULIN, A. Structure and functions of testis. In: Thibault, C.; Levasseur, M. C. Hunter, R. H. F. Reproduction in mammals and man. Paris: **Ellipses**. cap. 13, p. 227- 255, 1993.

DALLINGA, J.W.; MOONEN, E.J.C.; DUMOULIN, J.C.M.; EVERS, J.L.H.; GERAEDTS, J.P.M.; KLEINJANS, J.C.S. Decrease human semen quality and organochlorine compounds in blood. **Human Reproduction**, v. 17, n. 8, p. 1973-1979, 2002.

DAWSON, E.B.; HARRIS, W.A.; TETER, M.C.; POWELL, L.C. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality smokers. **Fertility and Sterility**, v. 58, n. 5, p. 1034–1039, 1992.

DIAS, T.R.; ALVES, M.G.; SILVA, B.M.; OLIVEIRA, P.F. Sperm glucose transport and metabolism in diabetic individuals. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 396, p. 37–45, 2014.

DING, W.; HUDSON, L.G.; LIU, K.J. Inorganic arsenic compounds cause oxidative damage to DNA and protein by inducing ROS and RNS generation in human keratinocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 279, p. 105–112, 2005.

DOMENE, S.M.A.; PEREIRA, T.C.; ARRIVILLAGRA, R.K. Estimativa da disponibilidade de zinco em refeições com preparações padronizadas da alimentação escolar do município de Campinas. **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 161-167, 2008.

DORST, V.J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchunhen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. **Monatshefte fur Veterinärmedizin**, v. 29, p. 650-652, 1974.

EOM, S.J.; KIM, E.Y.; LEE, J.E.; KANG, H.J.; SHIM, J.; KIM, S. U.; GWAG, B.J.; CHOI, E.J. Zn(2+) induces stimulation of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway through phosphoinositide 3-Kinase. **Molecular Pharmacology**, v. 59, n. 5, p. 981-986, 2001.

EPA (Environmental Protection Agency). Technologies and costs for removal of arsenic from drinking water. **International Consultants**, 2000.

ESKENAZI, B.; KIDD, S.A.; MARKS, A.R.; SLOTER, E.; BLOCK, G.; WYROBEK, A.J. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. **Human Reproduction**, v. 20, n.4, p. 1006–12, 2005.

European Commission Directive. 98/83/EC, related with drinking water quality intended for human consumption. **European commission Directive Brussels**, Belgium, 1998.

FAVARETO, A.P.A.; FERNANDEZ, C.D.B.; DA SILVA, D.A.F.; ANSELMOFRANCO, J.A.; KEMPINAS, W.G. Persistent impairment of testicular histology and sperm motility in adult rats treated with cisplatin at peripuberty. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 109, p. 85-96, 2011.

FAVIER, A.E. The role of zinc in reproduction. Hormonal mechanisms. **Biological Trace Element Research**, v. 32, p. 363-382, 1992.

FERREIRA, M.; MATOS, R.C.; OLIVEIRA, H.; NUNES, B.; PEREIRA, M.D.L. Impairment of mice spermatogenesis by sodium arsenite. **Human & Experimental Toxicology**, v. 31, n. 3, p. 290–302, 2012.

FIGUEIREDO, B.R.; BORBA, R.P.; ANGÉLICA R.C. Arsenic occurrence in Brazil and human exposure. **Environ Geochem Health**, v. 29, n. 2, p. 109-18, 2007.

FLORA, S.J.S. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 257-281, 2011.

FRAGA, C.G.; MOTCHNIK, P.A.; SHIGENAGA, M.K.; HELBOCK, R.A., AMES, B.N. Ascorbic acid protects against oxidative DNA damage in human sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 11003-11006, 1991.

FRANÇA, L.R.; GODINHO, C.L. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). **Biology of Reproduction**, v. 68, p.1554-1561, 2003.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: Male reproduction: a multidisciplinary overview. Madrid: **Churchill Communications**, p.198-219, 1998.

FRANÇA, L.R.; AVELAR, G.F.; ALMEIDA, F.F.L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v. 63, p. 300-318, 2005.

FREEDMAN, L.P. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. **Endocrine Reviews**, v.13, p.129-145, 1992.

GAO, N.; SHEN, L.; ZHANG, Z.; LEONARD, S.S.; HE, H.; ZHANG, X.G.; SHI, X; JIANG, B.H. Arsenic induces HIF-1 α and VEGF through PI3K, Akt and reactive oxygen species in DU145 human prostate carcinoma cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 255, p. 33–45, 2004.

GARCIA, T.X.; COSTA, G.M.; FRANÇA, L.R.; HOFMANN, M.C. Sub-acute intravenous administration of silver nanoparticles in male mice alters Leydig cell function and testosterone levels, **Reproductive Toxicology**, v. 45, p. 59–70, 2014.

GHARAGOZLOO, P.; AITKEN R.J. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. **Human Reproduction**, v. 26, p. 1628-40, 2011.

GHOSH, P.; BANERJEE, M.; GIRI, A.K.; RAY, K. Toxicogenomics of arsenic: Classical ideas and recent advances. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 659, p. 293-301, 2008.

GOLDHABER, S.B. Trace elemento risk assessment: essentiality vs. toxicity. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 38, n.2, p. 323-242, 2003.

GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 12^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

GRISWOLD, M.D. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 211–216, 1995.

GUIMARÃES, F.P. **Potencial de macrófitas para remoção de arsênio e atrazine em solução aquosa**. Dissertação (Programa de pós-graduação em Botânica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

HAIDER, S.G.; SERVOS, G.; TRAN, N. Structural and histological analysis of Leydig cell steroidogenic function. In: Payne, A.H.; Hardy, M.P. (Eds). *Contemporary Endocrinology. The Leydig cell in the health and disease*. New Jersey: **Humana Press**, p. 33-45, 2007.

HALES, D.B. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 57, p. 3-18, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. ed. 4. Oxford: Clarendon Press, 2006.

HAMBIDGE, K.M.; MILLER, V.L.; WESTCOTT, J.E.; KREBS, N.F. Dietary Reference Intakes for Zinc May Require Adjustment for Phytate Intake Based upon Model Predictions. **Journal of Nutrition**, v. 138, n.12, p. 2363-2366, 2008.

HEATH, A. G. Water pollution and fish physiology. Florida, **Lewis Publishers**, p.359, 1995.

HENKEL R.R. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, p. 43-52, 2011.

HERCE-PAGLIAI, C.; MORENO, I.; GONZÁLEZ, G.; REPETTO, M.; CAMEÁN, A.M. Determination of total arsenic, inorganic and organic arsenic species in wine. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 19, n. 6, p. 542-546, 2002.

HESS, R.A.; FRANÇA, L.R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 636, p.1-15, 2008.

HOLSTEIN, A.F.; SCHULZE, W.; DAVIDOFF, M. Review - Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 107, p. 1-16, 2003.

HONG, Y.S.; SONG, K.H.; CHUNG, J.Y. Health Effects of Chronic Arsenic Exposure. **Journal of Preventive Medicine and Public Health**, v.47, n. 5, p. 245–252, 2014.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FATIMA, A.; Glutaciona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

JACKSON, T.S.; XU, A.M.; VITA, J.A. JR.; KEANEY, J.F. Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations. **Circulation research**. v. 83, p. 916–922, 1998.

JAIN, C.K.; ALI, I. Arsenic: Occurrence, toxicity and speciation techniques. **Water Research** v. 34, p. 4304-4312, 2000.

JAGANATHAN, J.A. Random testing of table wines for arsenic using electrothermal atomic absorption spectrometry. **Atomic Spectroscopy**, Norwalk, v. 22, n. 2, p. 280-283, 2001.

JANA, K.; JANA, S.; SAMANTA, P.K. Effect of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamopituitary- testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, p. 91-96, 2006.

JOHNSON, L.; NEVES, W.B. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. **Biology of Reproduction**, v. 24, p. 703-712, 1981.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica** – texto e atlas. 12^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KEMPINAS, W.; SUAREZ, J.; ROBERTS, N.; STRADER, L.; FERRELL, J.; GOLDMAN, J.; KLINEFELTER, G. Rat Epididymal Sperm Quantity, Quality, and Transit Time after Guanethidine-Induced Sympathectomy 1. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 890-896, 1998.

KHAN, M.A.; HO, Y.S. Arsenic in drinking water: A review on toxicological effects, mechanism of accumulation and remediation. **Asian Journal of Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 1889-1901, 2011.

KHAN, N.I.; OWENS, G.; BRUCE, D.; NAIDU, R. Human arsenic exposure and risk assessment at the landscape level: a review. **Environmental Geochemistry Health**, v. 1, p. 143-66, 2009.

KOSTAL J.; YANG R.; NU C.H.; MULCHANDANI A.; CHEN W. Enhanced arsenic accumulation in engineered bacterial cells expressing ArsR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4582–4587, 2004.

LAGE, C.R.; NAYAK, A.; KIM, C. Arsenic ecotoxicology and innate immunity. **Integrative and Comparative Biology**, v. 46, n. 6, p. 1040-1054, 2006.

LEE, M.Y.; BAE, O.N.; CHUNG, S.M.; KANG, K.T.; LEE, J.Y.; CHUNG, J.H. Enhancement of platelet aggregation and thrombus formation by arsenic in drinking water: a contributing factor to cardiovascular disease. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 179, n. 2, p. 83-88, 2002.

LEITE, H.P.; SARNI, R.S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 18, n. 2, p. 60-65, 2003.

LEITE, S.P.; HEREDIA, B.; MEDEIROS, L.; PALMEIRA, M.E CINTRÃO, R. Impactos dos assentamentos: um estudo sobre o meio rural brasileiro. São Paulo: **Ed. UNESP**, 2004.

LEWIS, S.E.M.; AGBAJE, I.M. Using the alkaline comet assay in prognostics tests for male infertility and assisted reproductive technology outcomes. **Mutagenesis**, v. 23, p. 163-170, 2008.

LI, P.; ZHONG, Y.; JIANG, X.; WANG, C.; ZUO, Z.; SHA, A. Seminal plasma metals concentration with respect to semen quality. **Biological Trace Element Research**, v. 148, n. 1, p. 1-6, 2012a.

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**, v. 128, n.2, p. 482-89, 2012b.

LI, X.; LI, B., XI, S., ZHENG, Q.; LV, X.; SUN, G. Prolonged environmental exposure of arsenic through drinking water on the risk of hypertension and type 2 diabetes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 11, p. 8151-8161, 2013.

LITTER, M.; ARMIENTA, A.; FARÍAS, S. **Metodologías analíticas para la determinación y especiación de Arsénico en aguas y suelos**. CYTED, Buenos Aires, Spanish, 2009.

LIU, L.Z.; JIANG, Y.; CARPENTER, R.L.; JING, Y.; PEIPER, S.C.; JIANG, B.H. Role and mechanism of arsenic in regulating angiogenesis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, e20858, 2011.

LUCESOLI, F.; FRAGA, C. Evaluación del estrés oxidativo. **Antioxid Calid Vida**, v. 1, n. 4, p. 8-13, 1995.

MAITY J.P.; NATH B.; KAR S.; CHEN C.Y.; BANERJEE S.; JEAN J.S.; LIU M.Y.; CENTENO J.A.; BHATTACHARYA P.; CHANG C.L.; SANTRA S.C. Arsenic-induced health crisis in peri-urban Moyna and Ardebok villages, West Bengal, India: an exposure assessment study. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 34, n. 5, p. 563-574, 2012.

MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. Oxidative stress and male infertility. **Indian Journal of Medical Research**, v. 129, p. 357-66, 2009.

MARTÍNEZ, B.; RINCÓN, F.; IBÁÑEZ, M.V. Effects of ascorbic acid and ferrous sulfate on trace element extractability by dialyzation of weaning foods. **Food Chemistry**, v. 86, p. 369-376, 2003.

MCCALL, K.A.; HUANG, C.; FIERKE, C.A. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1437-46, 2000.

MEHTA, R.; KUMAR, T. Traffic pollutants affecting male fertility. **Human Reproduction**, v.18, n. 9, p. 1981-1982, 2003.

MERRELLS, K.J.; BLEWETT, H.; JAMIESON, J.A.; TAYLOR G.C.; SUH, M. Relationship between abnormal sperm morphology induced by dietary zinc deficiency and lipid composition in testes of growing rats. **British Journal of Nutrition**, v. 102, p. 226-232, 2009.

MITEVA, E. Accumulation and effect of arsenic on tomatoes. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 33, p. 1917-1926, 2002.

MOFFIT, J.S.; BRYANT, B.H.; SALÃO, S.J.; SALÃO, S.J. Os efeitos dose-dependentes de células de Sertoli tóxicos 2, 5-hexanodiona, carbendazim, e mono (2-etilhexil) ftalato em testículo de ratos adultos. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 5, p. 719-727, 2007.

MOMENI, H. R.; ESKANDARI, N. Effect of vitamin E on sperm parameters and DNA integrity in sodium arsenite-treated rats. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 10, n. 3, p. 249-256, 2012.

MONSEES, T. K.; FRANZ, M.; GEBHARDT, S.; WINTERSTEIN, U.; SCHILL, W.B.; HAYATPOUR, J. Sertoli cells as a target for reproductive hazards. **Andrologia**, v. 32, n.4-5, 239–246, 2000.

MONTEIRO, J.C.; PREDES, F.S.; MATTA, S.L.P.; DOLDER, H. *Heteropterys aphrodisiaca* infusion reduces the collateral effects of Cyclosporine A on the testis. **Anatomical record (Hoboken)**, v. 291, n. 7, p. 809-817, 2008.

MOON, K.A.; GUALLAR, E.; UMANS J.G.; DEVEREUX, R.B.; BEST, L.G.; FRANCESCONI, K.A.; GOESSLER, W.; POLLAK, J.; SILBERGELD E.K.; HOWARD, B.V.; NAVAS-ACIEN, A. Association Between Exposure to Low to Moderate Arsenic Levels and Incident Cardiovascular Disease: A Prospective Cohort Study. **Annals of Internal Medicine**, v. 159, p. 649-659, 2013.

MURUGESAN, G. S.; SATHISHKUMAR, M.; SWAMINATHAN,K. Arsenic removal from groundwater by pretreated waste tea fungal biomass. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 483-487, 2006.

MUTHU, M.; PRABU, S.M. Silibinin ameliorates oxidative stress mediated testicular damage by arsenic in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, p. 1-7, 2012.

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 Cell Biol**, v. 28, n. 5, p. 241-8, 2009.

NETTER, F.H. **Atlas de Anatomia Humana**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de toxicologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

OLIVEIRA, H.; SPANÒ, M.; SANTOS, C.; PEREIRA, M. L. Adverse effects of cadmium exposure on mouse sperm. **Reproductive Toxicology**, v. 28, p. 550–555, 2009.

Organização Mundial de Saúde (OMS). **Guidelines for Drinking Water Quality**. 2ª ed., vol. 1, n.2, Geneva, 1996. [http://doi.org/10.1016/S1462-0758\(00\)00006-6](http://doi.org/10.1016/S1462-0758(00)00006-6).

OTUECHERE, C.A.; ABARIKWU, S.O.; RUFAL, M.A.; OHIOZOJE, A.E.; MARTINS, E.; FAROMBI, E.O. Protective effects of vitamin C against propanil-induced hepatotoxicity in wistar rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, p. 212–217, 2012.

PACEY, G.E.; FORD, J.O. Arsenic speciation by ion-exchange separation and graphite-furnace atomic-absorption spectrophotometry. **Talanta**, v. 28, n. 12, p. 935-8, 1981.

PAKSY, K.; VARGA, B.; LAZAR, P. Zinc protection against cadmium-induced infertility in female rats. Effect of zinc and cadmium on the progesterone production of cultured granulosa cells. **BioMetals**, v. 10, p. 27-35, 1996.

PANT, N.; KUMAR, R.; MURTHY, R. C.; SRIVASTAVA, S. P. Male reproductive effect of arsenic in mice. **Biometals : An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine**, v. 14, n. 2, p. 113–7, 2001.

PANT, N.; MURTHY, R.; SRIVASTAVA, S. Male reproductive toxicity of sodium arsenite in mice. **Human & Experimental Toxicology**, v. 23, n.8, p. 399–403, 2004.

PAPADOPOULOS, V. Environmental factors that disrupt Leydig cell steroidogenesis. In: Payne, A.H., Hardy, M.P. (Eds). **Contemporary Endocrinology. The Leydig cell in the health and disease**. New Jersey: Humana Press. p. 393-413, 2007.

PAULA, T.A.R.; COSTA, D.S.; MATTA, S.L.P. Avaliação histológica quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas. **Bioscience Journal**, v. 18, p. 121-136, 2002.

PEIXOTO, N. C.; PEREIRA, M. E. Effectiveness of ZnCl₂ in protecting against nephrotoxicity induced by HgCl₂ in newborn rats. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, n. 3, p. 441-446, 2007.

PELLETIER, R. M. The blood-testis barrier: the junctional permeability, the proteins and the lipids. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 46, p. 49-127, 2011.

PONTIUS, F.W.; BROWN K.G.; CHEN C.J. Health implications of arsenic in drinking water. **Journal American Water Works Association**, v. 86, p. 52-63, 1994.

PRASAD, A.S. Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. **Experimental Gerontology**, v. 43, p. 370-377, 2008.

PREDES, F.S.; MONTEIRO, J.C.; MATTA, S.L.P.; DOLDER, M.A.H. Testicular Histomorphometry and Ultrastructure of Rats Treated with Cadmium and Ginkgo biloba. **Biological Trace Element Research**, v.140, p. 330-341, 2011.

RAHMAN, M.A.; HASEGAWA, H.; RAHMAN, M.M.; ISLAM, M.N.; MIAH, M.A.M.; TASMIN A. Arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.): Human exposure through food chain. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, p. 317-324, 2008.

RATNAIKE, R.N. Acute and chronic arsenic toxicity. **Postgraduate Medical Journal**, v. 933, p. 391-6, 2003.

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: Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)**, v. 25, n. 4, p. 247-53, 2011.

REN J.; ZHANG H.; REN, QIULEI.; XIA, C.; WAN, J.; QIN, Z. Study of the catalytic electro-oxidation of ascorbic acid on an electrode modified by macrocyclic compounds of Fe(III), Mn(III), Ni(II), and Co(II) with TBP. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 504, p. 59-63, 2001.

ROBB, G.W.; AMANN, R.P.; KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **The Journal of the Society for Reproduction and Fertility**, v. 54, n. 1, p. 103-107, 1978.

RODRIGUES, E.L. **O efeito da suplementação de vitaminas antioxidantes no equilíbrio pró e antioxidante de ratos submetidos ao treinamento de natação a 80% da carga máxima**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2005.

RODRIGUES, M.H.; COSTA, D.S.; FONSECA, F.A. Proliferation of seminiferous epithelium cells during the postnatal development in goats. **Animal Reproduction Science**, v. 135, p. 25-30, 2012.

RUSSELL, L.D.; CLERMONT, Y. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. **Anatomical Record**, v. 187, p. 347-366, 1977.

RUSSELL, L.D.; PETERSON, R.N. Determination of the alongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. **Journal of Reproduction & Infertility**, v. 70, p. 635-641, 1984.

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

RUSSELL, L.D.; REN, H.P.; SINHA-HIKIM, I.; SCHULZE, W.; SINHAHIKIM, A.P. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components emphasizing those related the Sertoli cell. **American Journal of Anatomy**, v. 188, p. 21-30, 1990b.

RZYMSKI, P.; TOMCZYK, K.; RZYMSKI, P.; PONIEDZIAŁEK, B.; OPALA, T.; WILCZAK, M. Impact of heavy metals on the female reproductive system. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine : AAEM**, v. 22, n. 2, p. 259–64, 2015.

SALEH, R.A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 6, p. 737-752, 2002.

SALEM, M.H.; KAMEL, K.I.; YOUSEF, M.I.; HASSAN, G.A.; EL-NOUTY, F.D. Protective role of ascorbic acid to enhance semen quality of rabbits treated with sublethal doses of aflatoxin B1. **Toxicology**, v. 162, p. 209-218, 2001.

SAMPAYO-REYES, A.; HERNANDEZ, A.; EL YAMANI, N.; LOPEZ-CAMPOS, C.; MAYET- MACHADO, E.; RINCÓN-CASTAÑEDA, C.B.; LIMONES-AGUILAR, MDE L.; LÓPEZ-CAMPOS, J.E.; DE LEÓN, M.B.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, S.; HINOJOSA-GARZA, D.; MARCOS, R. Arsenic induces DNA damage in environmentally exposed Mexican children and adults. Influence of GSTO1 and AS3MT polymorphisms. **Toxicological Sciences**, v. 117, p. 63–71, 2010.

SANGHAMITRA, S.; HAZRA, J.; UPADHYAY, S.N.; SINGH, R.K.; AMAL, R.C. Arsenic induced toxicity on testicular tissue of mice. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 52, p. 84-90, 2008.

SAKUMA, A.M.; DE CAPITANI, E.M.; FIGUEIREDO, B.R.; MAIO, F.D.; PAOLIELLO, M.M.; DA CUNHA, F.G.; DURAN, M.C. Arsenic exposure assessment of children living in a lead mining area in Southeastern Brazil. **Caderno Saúde Pública**, v. 26, n. 2, p. 391-398, 2010.

SANTOS E.C.S. **Avaliação do potencial tóxico do extrato hidroalcoólico de *pradosia huberi ducke* sobre o sistema reprodutor masculino e órgãos vitais de ratos e sua prole**. 2012. 122 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

SANTOS, M.P. **O papel das vitaminas antioxidantes na prevenção do envelhecimento cutâneo**. 2007. 16 f. Trabalho de Conclusão de Curso

(Graduação em Nutrição) - Faculdade de Nutrição, Universidade do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Unijuí, 2007.

SARKAR, M.; CHAUDHURI, G.R.; CHATTOPADHYAY, A.; BISWAS, N.M. Effect of sodium arsenite on spermatogenesis, plasma gonadotrophins and testosterone in rats. **Asian Journal of Andrology**, v. 1, p. 27-31, 2003.

SAVABIEASFAHANI, M.; LOCHMILLER, R.L.; RAFFERTY, D.P.; SINCLAIR, J.A. Sensitivity of wild cotton rats (*Sigmodon hispidus*) to the immunotoxic effects of low-level arsenic exposure. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 34, n. 3, p. 289-96, 1998.

SEED, J.; CHAPIN, R. E.; CLEGG, E. D.; DOSTAL, L. A.; FOOTE, R. H.; HURTT, M. E.; KLINEFELTER, G. R.; MAKRIS, S. L.; PERREAULT, S. D.; SCHRADER, S.; SEYLER, D.; SPRANDO, R.; TREINEN, K. A.; VEERAMACHANENI, D. N. R.; WISE, L. D. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. **Reproductive Toxicology**, v. 10, p. 237-244, 1996.

SIES, H.; STAHL, W.; SEVANIAN, A. Nutritional, dietary and prostrandial oxidative stress, **Journal of Nutrition**, v.135, n. 5, p. 969-972, 2005.

SILVA, F.J.T.N.P. **Efeito agudo do arsenito de sódio na morfologia testicular de ratos wistar**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2013.

SHITTU, M.; AYO, J.O.; AMBALI, S.F.; FATIHU, M.Y.; ONYEANUSI, B.I.; KAWU, M. U. Chronic chlorpyrifos-induced oxidative changes in the testes and pituitary gland of Wistar rats: Ameliorative effects of vitamin C. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 102, n. 1, p. 79.-85. 2012.

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

SMITH, A.; SMITH, M. Arsenic drinking water regulations in developing countries with extensive exposure. **Toxicology**, v. 198, p. 39-44, 2004.

SMITH, E.; JUHASZ, A.L.; NAIDU, R. Arsenic uptake and speciation in rice plants grown under greenhouse conditions with arsenic contaminated irrigation water. **Science of the Total Environment**, v. 392, p. 277-283, 2008.

SOUZA, F.A.C. **Comparação dos efeitos da ingestão crônica de arsenito e arsenato de sódio sobre parâmetros testiculares e epididimários em ratos**

Wistar. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

STABENFELDT, G.H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. In: SWENSON M.J.; REECE, W.O. DUKES. **Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan S. A. Cap. 35, p. 603-614, 1996.

STYKAL, J.; REMMEN, H. V.; RICHARDSON, A.; SALMON, A.B. Oxidative stress and diabetes: What can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, p. 46-58, 2012.

TCHOUNWOU, P.B.; YEDJOU, C.G.; PATLOLLA, A.K.; SUTTON, D.J. Heavy Metal Toxicity and the Environment. **EXS**, v. 101, p. 133-164, 2012.

THIELE, J.J.; FREISLEBEN, H.J.; FUCHS, J.; OCHSENDORF, F. R. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. **Human Reproduction**, v. 10, n.1, p. 110-11, 1995.

THOMPSON, D.J. A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals. **Chem Biol Interact**, v. 88, n. 2-3, p. 89-14, 1993.

TREMELLEN K. Oxidative stress and male infertility: a clinical perspective. **Human Reproduction Update**, v. 14, p. 243-58, 2008.

TSENG, C.H.; TSENG, C.P.; CHIOU, H.Y.; HSUEH, Y.M.; CHONG, C.K.; CHEN, C.J. Epidemiologic evidence of diabetogenic effect of arsenic. **Toxicol Lett**, v. 133, n. 1, p. 69-76, 2002.

TUZEN, M. Toxic and essential trace elemental contents in fish species from the Black Sea, Turkey. **Food Chem Toxicol**, Oxford, v. 47, n. 8, p. 1785-1790, 2009.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. National Primary Drinking Water Regulations; **Arsenic and Classifications to Compliance and New Source Contaminants Monitoring**; Final Rule. Federal Register 66:6976-7066, 2001.

USYDUS, Z.; SZLINDER-RICHERT, J.; POLAK-JUSZCZAK, L.; KANDERSKA, J.; ADAMCZYK, M.; MALESA-CIECWIERZ, M.; RUCZYNSKA, W. Food of marine origin: Between benefits and potential risks. Part 1. Canned fish on the Polish market. **Food Chemistry**, Barking, v. 111, n. 3, p. 556-563, 2008.

VALDÉS F. Vitamina C. **Actas Dermosifiliogr**, v. 97, n. 9, p. 557-68, 2006.

VARENNE, A. **Produtividade dos solos e ambiente**. Lisboa: Escolar Editora, 2003.

VASCONCELOS, S.M.L.; SILVA, M.A.M.; GOULART, M.O.F. Low molecular weight pro-antioxidants and antioxidants from diet: structure and function. **Nutrire: revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 95-118, 2006.

WASSERMAN, G.A.; LIU, X.; PARVEZ, F.; AHSAN, H.; FACTOR-LITVAK, P.; VAN GEEN, A.; SLAVKOVICH, V.; LOLACONO, N.J.; CHENG, Z.; HUSSAIN, I.; MOMOTAJ H.; GRAZIANO J.H. Water arsenic exposure and children's intellectual function in Arai hazar, Bangladesh. **Environ Health Perspect**, v.112, n. 13, p. 1329-1333, 2004.

WEINBAUER, G.F.; WESSELS, J. "Paracrine" control of spermatogenesis. **Andrology** v. 31, p. 249-62, 1999.

WING, T.Y.; CHRISTENSEN, A.K. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. **American Journal of Anatomy**, v. 165, p. 13-25, 1982.

WOOD, R.J. Assessment of marginal zinc status in humans. **Journal of Nutrition**, v.130, p.1350 -1354, 2000.

WU, C.; YE, Z.; SHU, W.; ZHU Y.; WONG, M. Arsenic accumulation and speciation in rice are affected by root aeration and variation of genotypes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 3, p. 1-10, 2011.

ZENICK, H.; CLEGG, E.D.; PERREAULT, S.D.; KLINEFELTER, G.R.; GRAY, L.E. Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach. In: **Principles and methods of toxicology**. 3. ed. New York: Raven, p. 937-988, 1994.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. **041/2014**, relativo ao projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação morfológica do potencial antioxidante da suplementação do zinco e vitamina C frente ao estresse oxidativo causado pela intoxicação por arsenito de sódio em testículo de ratos wistar."** que tem como responsável o (a) docente **Juliana Castro Monteiro**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 05/09/14.

Vitória (ES), 05 de setembro de 2014.