

ANA CLÁUDIA FERREIRA SOUZA

**COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DA INGESTÃO CRÔNICA DE ARSENITO E
ARSENATO DE SÓDIO SOBRE PARÂMETROS TESTICULARES E
EPIDIDIMÁRIOS EM RATOS WISTAR**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013**

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

T

S729c
2013

Souza, Ana Cláudia Ferreira, 1988-

Comparação dos efeitos da ingestão crônica de arsenito e arsenato de sódio sobre parâmetros testiculares e epididimários em ratos Wistar / Ana Cláudia Ferreira Souza. – Viçosa, MG, 2013.

viii, 65 f. : il. ; 29cm.

Orientador: Mariana Machado Neves.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Rato - Reprodução. 2. Rato - Histologia. 3. Rato - Espermatozoides. 4. Toxicologia experimental. 5. Arsênio.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 599.352

ANA CLÁUDIA FERREIRA SOUZA

**COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DA INGESTÃO CRÔNICA DE ARSENITO E
ARSENATO DE SÓDIO SOBRE PARÂMETROS TESTICULARES E
EPIDIDIMÁRIOS EM RATOS WISTAR**

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

APROVADA: 15 de julho de 2013.

Clóvis Andrade Neves

Marcos de Lucca Moreira Gomes

Mariana Machado Neves
(Orientadora)

Dedico esta dissertação aos meus amados
pais, Geraldo e Maria de Lourdes e ao
meu querido irmão Júlio.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar presente em minha vida, iluminar e direcionar meus passos.

Aos meus queridos pais, Geraldo e Maria de Lourdes, pelo amor incondicional, pelo exemplo de vida, humildade e caráter. Amo vocês! Obrigada por tudo!

Ao meu irmão, pelo amor, apoio e por me encorajar a seguir em frente sempre.

A toda minha família pelo amor que nunca deixaram faltar e pela confiança.

Ao Marcinho que, durante todo o mestrado, me deu constante apoio. Pelo carinho, compreensão e ajuda durante este período. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos e influenciar meu aprendizado. Você é muito especial!

A minha querida orientadora Mariana Machado Neves, pela orientação, acolhimento, confiança, pelos ensinamentos, por acreditar na minha capacidade de vencer e por todas as contribuições ao longo deste trabalho. Muito Obrigada!

Aos meus co-orientadores, José Lino Neto e Juraci Alves de Oliveira, por todo empenho e tempo dispensado para que este trabalho se concretizasse.

A Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela oportunidade de realização do curso, crescimento profissional e pessoal.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de pesquisa imprescindível na realização deste trabalho.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Biologia Celular e estrutural, pelos ensinamentos adquiridos durante o curso.

A secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Beth, pela atenção e disposição em ajudar.

A coordenação do Biotério Central da UFV, por disponibilizar os animais necessários para a realização do experimento.

A coordenação e aos integrantes do Laboratório de Biologia do Exercício, por disponibilizarem a estrutura do laboratório durante a realização do experimento e pelos momentos de descontração.

A Graziela, Tatiana, Viviane, Mariana, Stéphanie, Camila, Nayara, Felipe, Júlio e Bruno pelo auxílio durante o tratamento dos animais.

Aos professores do Laboratório de Biologia Estrutural, pela colaboração na análise do material histológico, no uso de equipamentos e materiais e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao técnico do Laboratório de Biologia Estrutural, Matheus, pelo auxílio com soluções, reagentes e equipamentos.

As professoras Maria do Carmo Gouveia Pelúzio e Mariella Bontempo Duca de Freitas, por disponibilizarem a estrutura dos seus laboratórios durante a realização das análises enzimáticas e a aluna Jerusa, pelo auxílio e tempo dispensado durante a realização das mesmas.

Ao professor Jorge Dergan, por disponibilizar o fotomicroscópio para a aquisição das imagens deste trabalho.

Ao professor Sérgio da Matta, pelo auxílio durante toda a realização deste trabalho, pelo exemplo de profissionalismo e por todos os ensinamentos.

A Sarah e ao Rafael, pela valiosa ajuda durante todas as fases deste trabalho, pela amizade e carinho.

Aos professores Clóvis Andrade Neves e Marcos de Lucca Moreira Gomes por participarem da banca examinadora, por todas as sugestões e críticas fundamentais à complementação deste trabalho.

Aos queridos amigos do Laboratório de Biologia Estrutural, pela amizade, colaboração, carinho e por me proporcionarem momentos tão agradáveis de aprendizado e descontração.

A todos os amigos do mestrado, por compartilharmos esse momento tão importante de nossas vidas.

As “flores”, Glenda, Helen, Marta e Thaís, pela amizade, carinho e por estarem sempre presentes. A vida em Viçosa não seria a mesma sem vocês!

As amigas de república, Dani, Milena e Paula, pela convivência constante e por serem a minha família em Viçosa!

Aos amigos de Divinópolis que sempre torceram por mim.

Agradeço ainda, a todos com que tive a oportunidade de conviver nestes últimos anos e que muito contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui. Muito obrigada por tudo!

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Metais pesados.....	2
2.2 Arsênio.....	3
2.3 Efeitos da exposição ao arsênio.....	5
2.4 Testículo.....	6
2.5 Epidídimo.....	8
2.6 Espermatozoides.....	10
3. REFERÊNCIAS.....	11
ARTIGO 1. EFFECTS OF SODIUM ARSENATE AND ARSENITE ON MALE REPRODUCTIVE FUNCTIONS IN RATS	
Abstract.....	19
1. Introduction.....	20
2. Material and methods.....	21
2.1 Animals.....	21
2.2 Experimental groups.....	21
2.3 Euthanasia, body weight and reproductive organ weights.....	22
2.4 Histological processing for histomorphometry.....	22
2.5 Determination of serum testosterone.....	23
2.6 Sperm evaluation.....	23
2.6.1 Total motility, progressive motility and sperm vigor.....	23
2.6.2 Sperm morphology.....	23
2.7 Daily sperm production per testis, sperm number and transit time in the epididymis.....	24
2.8 Statistical analysis.....	24
3. Results.....	24
3.1 Body weight and organ weights.....	24

3.2 Epididymal histomorphometry.....	26
3.3 Serum testosterone.....	29
3.4 Sperm evaluation.....	30
3.5 Daily sperm production per testis, sperm number and transit time in the epididymis.....	31
4. Discussion.....	33
Acknowledgments.....	36
References.....	36
ARTIGO 2. EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ARSÊNIO NA HISTOMORFOMETRIA TESTICULAR E NAS CONCENTRAÇÕES DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES	
Resumo.....	42
1. Introdução.....	43
2.0 Material e Métodos.....	44
2.1 Animais.....	44
2.2 Delineamento Experimental.....	44
2.3 Processamento histológico do testículo para microscopia de luz.....	45
2.4 Morfometria testicular.....	45
2.5 Determinação da concentração sérica de testosterona.....	47
2.6 Análises enzimáticas.....	47
2.7 Análises estatísticas.....	48
3. Resultados.....	48
3.1. Biometria corporal e testicular.....	48
3.2 Avaliação histológica do parênquima testicular.....	49
3.3 Morfometria testicular.....	51
3.4 Concentração sérica de testosterona.....	55
3.5 Parâmetros enzimáticos.....	55
4. Discussão.....	56
Agradecimentos.....	60
Referências.....	60
CONCLUSÕES GERAIS.....	65

RESUMO

SOUZA, Ana Cláudia Ferreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Comparação dos efeitos da ingestão crônica de arsenito e arsenato de sódio sobre parâmetros testiculares e epididimários em ratos Wistar.** Orientadora: Mariana Machado Neves. Co-orientadores: José Lino Neto e Juraci Alves de Oliveira.

O arsênio é um metal pesado amplamente encontrado na natureza nas formas de arsenito e arsenato, sendo a primeira forma mais tóxica, uma vez que a mesma reage fortemente com grupos tiois endógenos. A intoxicação por arsênio pode ocasionar diferentes patologias, dentre elas aquelas que afetam o sistema reprodutor masculino. Portanto, o objetivo deste trabalho foi comparar os efeitos da exposição crônica ao arsenato e arsenito de sódio sobre órgãos reprodutivos masculinos, avaliando parâmetros histomorfométricos, enzimáticos e funcionais. Foram utilizados 30 ratos Wistar adultos randomicamente divididos em cinco grupos experimentais. Os animais controle beberam solução salina, enquanto os animais tratados foram oralmente expostos ao arsenato e arsenito de sódio, testando-se para cada forma química as concentrações de 0,01 mg/L e 10 mg/L. Foram fornecidos 30 mL das soluções diariamente por 56 dias. O arsenito de sódio nas duas concentrações avaliadas e o arsenato a 10 mg/L causaram redução na produção espermática diária, no número de espermátides no testículo e de espermatozoides nas regiões da cabeça/corpo do epidídimo. Alterações na histomorfometria epididimária ocorreram de forma variável e região específica. Em relação ao testículo, os animais tratados com arsênio, principalmente com arsenito de sódio, apresentaram redução no percentual de epitélio seminífero e na proporção e volume das células de Leydig e tecido conjuntivo. Além disso, observou-se aumento nas proporções de túnica própria, lúmen, espaço linfático, vasos sanguíneos e macrófagos. Adicionalmente, o arsenato e o arsenito de sódio administrados na maior concentração, causaram vacuolização na base do epitélio seminífero em alguns túbulos. Com relação às enzimas antioxidantes, a atividade da superóxido dismutase não se alterou frente à exposição ao arsênio. No entanto, a atividade da catalase reduziu em animais tratados. Esses resultados mostram o poder tóxico do arsênio, principalmente na forma de arsenito de sódio, para parâmetros morfofuncionais reprodutivos e para o sistema de defesa antioxidante testicular, mostrando seu potencial prejuízo à fertilidade masculina em ratos Wistar.

ABSTRACT

SOUZA, Ana Cláudia Ferreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Comparison of the effects of chronic ingestion of sodium arsenite and arsenate on testicular and epididymal parameters in Wistar rats.** Adviser: Mariana Machado Neves. Co-advisers: José Lino Neto and Juraci Alves de Oliveira.

Arsenic is a heavy metal widely found in nature in the form of arsenite and arsenate, being the first form the most toxic, once it reacts strongly with endogenous thiols groups. The intoxication by arsenic can cause different pathologies, among them those that affect the male reproductive system. Therefore, the aim of this study was to compare the effects of chronic exposure to sodium arsenite and arsenate on male reproductive organs, evaluating histomorphometric, enzymatic and functional parameters. Were used 30 adult Wistar rats randomly divided into five experimental groups. The control animals received saline, while the treated animals were exposed orally to sodium arsenate and arsenite, testing for each chemical form with concentrations of 0.01 mg/L and 10 mg/L. Were provided 30 mL of solutions daily for 56 days. Sodium arsenite at the two concentrations and arsenate at 10 mg/L caused a reduction in daily sperm production, the number of spermatids in the testis, and sperm in the epididymal caput/corpus regions. Changes in epididymal histomorphometry were variable and region-specific. In relation to testis, the animals treated with arsenic, mainly sodium arsenite, showed a reduced percentage of seminiferous epithelium and the proportion and volume of Leydig cells and connective tissue. In addition, there was an increase in the proportions of tunica propria, lumen, lymphatic space, blood vessels and macrophages. Additionally, sodium arsenite and arsenate, administered at the highest concentration, caused vacuolization at the base of the seminiferous epithelium in some tubules. Regarding the antioxidant enzymes, superoxide dismutase activity did not change upon exposure to arsenic. However, catalase activity decreased in treated animals. Those results show the toxic powers of arsenic, mainly in the form of sodium arsenite, to reproductive morphofunctional parameters and for testicular antioxidant defense system, showing their harm potential to male fertility in Wistar rats.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A ação química dos metais pesados tem despertado grande interesse ambiental, principalmente pelo fato de não possuírem caráter de biodegradabilidade. Isso faz com que permaneçam em ciclos biogeoquímicos globais, sendo o das águas naturais o seu principal meio de condução, podendo haver acumulação na biota aquática em níveis significativamente elevados (Silva, 2002).

Uma vez absorvidos, os metais pesados podem se ligar a proteínas e serem transportados pelo sangue até os tecidos onde se depositam ou são biotransformados (Goldhaber, 2003). Os efeitos tóxicos podem ser letais ou subletais, sendo que o grau de intoxicação depende da forma química em que o metal se apresenta, da concentração, do tempo e da via de exposição. Este último fator está relacionado com a capacidade de absorção do metal pelas células e a susceptibilidade dos órgãos afetados (Waalkes et al., 1992).

O arsênio é um metal pesado encontrado amplamente na natureza nas formas de arsenito (As^{3+}) ou arsenato (As^{5+}) (Ferreira et al., 2012), sendo a primeira forma mais tóxica, uma vez que a mesma reage altamente com grupos tiois endógenos (Neves et al., 2004). Exposições agudas a este metal podem causar desordens no aparelho digestório, enquanto exposições crônicas podem causar mudanças degenerativas, inflamatórias e neoplásicas no aparelho respiratório, hematopoiético, cardiovascular e nervoso (Jana et al., 2006).

Estudos recentes mostraram que a exposição ao arsênio também está associada com toxicidade reprodutiva em machos. Intoxicações com arsenito de sódio levaram a espermatoxicidade (Pant et al., 2004), inibição da androgênese testicular e redução no peso dos testículos e órgãos sexuais acessórios em animais experimentais (Sarkar et al., 2003). Além disso, houve redução dose-dependente no diâmetro dos túbulos seminíferos (Sanghamitra et al., 2008) e no número de espermatozoides na cauda do epidídimo (Jana et al., 2006). Em animais tratados com arsenato de sódio encontrou-se uma redução no peso do testículo, no seu diâmetro tubular, na altura do epitélio seminífero e nas concentrações de testosterona sérica (Carvalho, 2009; Mata, 2009).

Portanto, está bem documentado que altas concentrações de arsenito e arsenato causam diversos danos no testículo e em parâmetros espermáticos. No entanto, não foram encontrados trabalhos comparando a toxicidade dos mesmos no aparelho reprodutor masculino, principalmente no epidídimo. Com base no presente exposto, formulou-se a hipótese de que a exposição crônica ao arsenito causa mais danos que o

arsenato a parâmetros testiculares e epididimários em ratos Wistar adultos. Para testá-la, foram elaborados os seguintes objetivos:

- Comparar o efeito crônico da administração de arsenito e arsenato nos epidídimos de ratos adultos, analisando características histológicas do órgão em microscopia de luz, além de análises morfométricas como altura do epitélio epididimário nas diferentes regiões do órgão, diâmetros tubular e luminal e proporção volumétrica dos componentes do ducto epididimário;

- Comparar o efeito crônico da ingestão de arsenito e arsenato sobre parâmetros histomorfométricos testiculares, analisando aspectos histológicos qualitativos, em microscopia de luz, e morfométricos, ao calcular índices gonadossomático, leydigossomático e tubulossomático, diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos, além da proporção volumétrica tubular e intertubular e volumetria das células de Leydig;

- Avaliar a concentração sérica de testosterona após 56 dias de exposição;

- Avaliar a dosagem bioquímica de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, como superóxido dismutase e catalase;

- Avaliar os parâmetros espermáticos e a influência do arsênio no tempo de trânsito dos espermatozoides no epidídimo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Metais pesados

A presença de altas concentrações de metais pesados no ambiente constitui hoje um problema global, devido à dimensão dos lançamentos de origem antrópica e o seu contínuo aumento nos diferentes ecossistemas, atribuído em grande parte à industrialização e ao desenvolvimento urbano (Beveridge et al., 1997).

O termo metal pesado, embora não bem definido, é amplamente reconhecido e utilizado para um grupo de metais que estão associados à poluição e toxicidade, tais como, chumbo, cádmio, mercúrio, arsênio e urânio. Metal pesado não implica necessariamente em metal tóxico. Muitos deles são considerados nutrientes indispensáveis às plantas e seres vivos, desde que em baixas concentrações (Silva, 2002).

Os metais pesados possuem grande densidade específica e geram toxicidade em muitas funções biológicas, sendo o metabolismo enzimático potencialmente sensível a estes elementos. Além disso, eles podem competir pelos locais de ligação de elementos essenciais ao organismo, havendo, por isso, diferença de efeito em cada local e repostas diferentes de toxicidade entre espécies (Perottone, 2006).

Uma vez absorvidos, os metais pesados são geralmente retidos por proteínas e transportados pelo sangue até os tecidos, onde podem ser estocados ou biotransformados. A toxicidade causada por estes metais se deve à ocorrência de dois principais mecanismos de ação, a formação de complexos com os grupos funcionais das enzimas, o que prejudica o perfeito funcionamento do organismo, e a combinação com as membranas celulares, o que altera ou impede completamente o transporte de substâncias (Goldhaber, 2003). Os efeitos tóxicos causados pelos metais podem ser determinados pelo tempo de exposição e pela quantidade de metais ou compostos que se convertem em uma forma biodisponível, causando alterações no crescimento, desenvolvimento, respostas farmacocinéticas, patológicas, bioquímicas, fisiológicas, comportamentais e na reprodução (Goyer, 1996; Muniz e Oliveira-Filho, 2006).

2.2 Arsênio

O arsênio (As) é um contaminante ambiental amplamente encontrado na natureza. Ele é um elemento químico classificado formalmente como metaloide, pois apresenta algumas propriedades dos metais e não metais, mas também é referido como metal e, no contexto da toxicologia, como um metal pesado (Jomova et al., 2011). Este elemento não possui odor nem sabor e seus números de oxidação mais comuns são +5, +3 e -3, nos quais ele é capaz de formar compostos inorgânicos e orgânicos no ambiente ou dentro do corpo humano (Orloff et al., 2009).

O efeito tóxico das espécies de arsênio depende principalmente de sua fórmula química. O arsenito (As^{3+}) e o arsenato (As^{5+}) são formas naturalmente encontradas na natureza (Ferreira et al., 2012). A toxicidade das diversas espécies de arsênio decresce na seguinte ordem: compostos de arsenito inorgânico > compostos de arsenato inorgânico > compostos de arsenito orgânico > compostos de arsenato orgânico (USEPA, 2000a, b). Os compostos inorgânicos são 100 vezes mais tóxicos do que as espécies orgânicas (Barra et al., 2000). O arsenito é 60 vezes mais tóxico do que a forma oxidada, arsenato, uma vez que ele reage altamente com grupos tiois endógenos, especificamente dítiois (Neves et al., 2004).

O arsênio é um resíduo das indústrias de fundição e manufatura de vidros, esmaltes, tintas, tecido e couro, tendo sido muito usado em produtos agrícolas como inseticidas, formicidas, herbicidas e preservativos de madeira (Gontijo e Bittencourt, 2005). Os humanos são expostos ao arsênio principalmente através das rotas oral e inalatória. A exposição oral ocorre via consumo de água e comida contaminadas. E a inalação ocorre devido a exposição ocupacional nas fundições, indústrias de fabricação de vidro e semicondutores (Jana et al., 2006). A exposição a grandes quantidades de arsênio, principalmente a partir de água contaminada, é considerada uma das principais ameaças à saúde em todo o mundo (Li et al., 2012).

Segundo Figueiredo et al. (2007), estudos integrados do ambiente e exposição humana ao arsênio foram realizados em algumas áreas do Brasil, como o Quadrilátero Ferrífero – Minas Gerais, Vale do Ribeira – Paraná/São Paulo e Santana – Amapá, onde constatou-se grande quantidade deste elemento químico liberada para o ambiente devido a mineração de ouro, refino de metais, intemperismo de rochas e associação deste composto ao minério de manganês lavrado.

O Ministério da Saúde no Brasil considera o arsênio um elemento químico que apresenta potenciais riscos à saúde humana, sugerindo sua concentração máxima tolerada em águas potáveis de 0,01 mg/L (Ministério da Saúde, 2006), em conformidade com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011).

A maioria dos mamíferos metaboliza o arsênio inorgânico absorvido via metilação para ácido metilarsônico (MMA) e dimetilarsínico (DMA). A metilação ocorre pela redução do arsênio pentavalente para trivalente e adição do grupo metil (Vahter, 2002; Naranmandura et al., 2007; Xu et al., 2012). Estudos indicam que o fígado é um importante sítio de metilação do arsênio, especialmente após a ingestão, quando o mesmo passa pela circulação hepática. Porém, a atividade de metilação tem sido identificada também em outros tecidos de camundongos machos, como nos testículos, rins e pulmão (Vahter, 2002). A metilação torna as formas de arsênio inorgânicas menos reativas aos tecidos, facilitando o processo de eliminação por excreção renal (Barra et al., 2000). No entanto, alguns metabólitos do arsênio podem ser depositados no pulmão, fígado, rim, unhas e cabelos (Celik et al., 2008).

Em humanos adultos a dose letal de arsênio inorgânico é estimada entre 1-3 mg As/kg de peso corporal (PC). Os valores de DL₅₀ de diversos compostos de arsênio variam em camundongos entre 26-48 mg As/kg/PC para trióxido de arsênio via exposição oral, 8 mg As/kg/PC para compostos de arsenito e 22 mg As/kg/PC para compostos de arsenato, ambos via injeção intramuscular (Hughes, 2002).

2.3 Efeitos da exposição ao arsênio

Exposições agudas e crônicas ao arsênio causam diversos problemas à saúde humana. Efeitos da exposição aguda incluem náusea, vômito, dor abdominal, encefalopatia e neuropatia. Já a exposição crônica pode levar ao surgimento de câncer, tais como o de pele, pulmão, bexiga e fígado, além de distúrbios metabólicos como diabetes, problemas no aparelho digestório, doenças cardíacas e problemas neuronais (Reddy et al., 2011).

Alguns estudos sugerem que a toxicidade resultante da exposição crônica ao arsênio está associada com o aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e estresse oxidativo (Neves et al., 2004; Chang et al., 2007). O arsênio induz mudanças morfológicas na integridade mitocondrial e um rápido declínio do potencial de membrana da mitocôndria. Estas alterações são consideradas o sítio primário de formação de radicais superóxido (Jomova et al., 2011). Em geral, para superar o ataque das EROs, as células animais são equipadas com um sistema de defesa antioxidante intrínseco, sendo a catalase, a superóxido dismutase e a glutatona as principais enzimas envolvidas neste processo. Assim, uma falha no sistema de neutralização contra EROs prejudica os órgãos e organelas onde são geradas, podendo acarretar variadas patologias (Reddy et al., 2011). Em espermatozoides humanos, as injúrias de EROs em fosfolipídeos da membrana celular induzem a geração de peróxidos de ácidos graxos, que estão associados com o comprometimento da função espermática (Aitken e West, 1990).

Estudos recentes com modelos animais demonstraram que a exposição ao arsênio afetou o aparelho reprodutor masculino, gerando diminuição da capacidade reprodutiva, inibição da espermatogênese, redução da esteroidogênese (Pant et al., 2001) e alterações atróficas do testículo (Ahmad et al., 2008). Ratos tratados com arsênio exibiram redução gradual, dose-dependente, no diâmetro dos túbulos seminíferos e na população de células gametogênicas. Além disso, foi observado aumento na atrofia das células de Leydig (Sanghamitra et al., 2008). Outro estudo recente também sugeriu que a exposição de machos ao arsênio afeta o peso dos testículos e órgãos sexuais acessórios e diminui a concentração sérica de andrógenos (Morakinyo et al., 2010). Pant et al. (2004) também encontraram um significativo acúmulo de arsênio nos testículos e órgãos sexuais acessórios, além de diminuição na motilidade espermática e contagem de espermatozoides epididimais em camundongos tratados com arsenito de sódio. Já Jana et al. (2006) observaram que o arsênio interfere

no eixo hipotálamo-hipófise-testículo em ratos adultos. Assim, fica evidente que o arsênio afeta os compartimentos e a fisiologia do aparelho reprodutor masculino. No entanto, o mecanismo molecular sobre como a exposição ao arsênio induz disfunções reprodutivas masculinas ainda é desconhecido.

2.4 Testículo

O testículo é um importante órgão que tem a dupla função de espermatogênese e esteroidogênese. Ele é revestido por uma espessa cápsula conjuntiva, a albugínea, a qual envia septos para o interior do órgão, dividindo o mesmo em lóbulos e formando o mediastino testicular. Nos ratos e camundongos há uma pequena quantidade de tecido conjuntivo que se estende internamente, chamado de tecido conjuntivo intertubular. O parênquima testicular consiste na parte funcional do testículo e apresenta dois compartimentos: o tubular, formado pelos túbulos seminíferos onde se dá o processo de espermatogênese e o intersticial ou intertubular, formado por tecido intertubular contendo tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e células de Leydig (Russell et al., 1990).

Os túbulos seminíferos são alças contorcidas que possuem extremidades conectadas à *rete testis* pelos túbulos retos. Eles são delimitados por endotélio linfático em algumas espécies, células mioídes e elementos acelulares. As células mioídes são contráteis e acredita-se que forneçam a principal força para o movimento do fluido testicular. Juntamente com a lâmina basal, as células mioídes fornecem suporte estrutural no qual as células de Sertoli e as células do compartimento basal do epitélio seminífero se apoiam (Russell et al., 1990).

As células de Sertoli são células altas, de formato colunar e estrelado, e com a base aderida à membrana basal. Sua região apical alcança o lúmen tubular e apresenta numerosos prolongamentos laterais e apicais, os quais se estendem ao redor de todas as células germinativas. Elas possuem núcleo bem característico, de forma alongada, com cromatina finamente dispersa e nucléolo bem distinto. São responsáveis, por exemplo, pela sustentação e manutenção das gerações de células germinativas em diferenciação localizadas no compartimento adluminal do epitélio seminífero (Russell e Griswold, 1993). Além disso, possuem a capacidade de degradar células em degeneração dentro de um ou dois dias dos primeiros sinais histológicos (Russell et al., 1990).

Células de Sertoli adjacentes se unem por junções oclusivas formando uma barreira para macromoléculas conhecida como barreira hematotesticular (Monsees et

al., 2000). Isto resulta na formação de dois compartimentos no epitélio seminífero, o basal, que contém espermatogônias e espermatócitos primários iniciais, e o adluminal, que contém espermatócitos mais tardios e espermátides em várias etapas da espermiogênese. Provavelmente, a presença desta barreira faz com que as células de Sertoli estejam envolvidas no transporte de substâncias, do compartimento basal para as células germinativas no compartimento adluminal (Russell e Griswold, 1993).

O compartimento intertubular do testículo é constituído de vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células e fibras do tecido conjuntivo, macrófagos, mastócitos e células de Leydig (Bardin, 1996). Em ratos e camundongos, os vasos linfáticos são canais irregulares ou sinusoides, limitados por células endoteliais, denominados espaços linfáticos, os quais se estendem entre as células do interstício e os túbulos seminíferos. Já as células de Leydig possuem forma arredondada ou poligonal, núcleo central e citoplasma repleto de inúmeras gotículas de gordura. Além disso, apresentam características de células secretoras de esteroides, dos quais a testosterona é o principal, com retículo endoplasmático liso bem desenvolvido e numerosas mitocôndrias (Russell et al., 1990; Payne et al., 1996).

Apesar de existir grande variação entre as espécies quanto à proporção volumétrica dos diferentes componentes do compartimento intertubular, a célula de Leydig é usualmente o tipo celular mais frequente (França & Russel, 1998). Como elas são responsáveis pela produção de testosterona (Kim e Yang, 1999), alterações nas proporções e diâmetros destas células servem como indicativo de como se encontra a produção deste andrógeno. Já as mensurações do diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero fornecem dados relevantes para a avaliação da eficiência espermatogênica. O comprimento tubular depende do volume dos testículos, da proporção volumétrica dos túbulos seminíferos e do diâmetro tubular. A quantificação métrica do túbulo seminífero por unidade de massa testicular, diferente da quantificação total, é um parâmetro produtivo que permite a comparação entre animais de diferentes portes (França e Russell, 1998).

Para avaliação completa da atividade de órgãos reprodutores masculinos, é importante determinar também a produção e a qualidade espermática. Para isso, pontos-chaves de avaliação não histopatológica devem ser associados à adequada avaliação histopatológica testicular e epididimária, como peso testicular, peso e número de espermatozoides na cauda epididimária que podem fornecer um padrão razoável da habilidade do animal de produzir sêmen normal (Russell et al., 1990).

2.5 Epidídimo

Os espermatozoides produzidos pelos testículos são imaturos e não podem fertilizar o ovócito. Eles só adquirem sua motilidade e capacidade de fertilização durante sua passagem pelo lúmen do epidídimo (Shum et al., 2009).

O epidídimo deriva do ducto mesonéfrico primitivo do embrião, o ducto de Wolf (Brooks, 1983). Ele é formado por um ducto único e altamente enovelado (Oliva et al., 2009), cuja extensão varia de maneira espécie-específica, atingindo cerca de 2 m no rato e 6 m no homem (Brooks, 1983). Este órgão é morfológicamente dividido em cabeça, corpo e cauda (França et al., 2005), sendo que a cabeça possui uma região inicial conhecida como segmento inicial, onde os ductos eferentes entram e cuja histologia é diferente de outras regiões (Glover, 1982). Entretanto, dependendo da espécie, estas regiões podem ser subdivididas em diversos segmentos (França et al., 2005). Há ainda uma camada de músculo liso que envolve esse órgão, apresentando-se mais fina na região da cabeça e corpo e mais espessa na cauda. Essa camada muscular recebe a inervação de fibras adrenérgicas do sistema nervoso simpático (Setchell, 2002).

A divisão do epidídimo em regiões baseia-se no estudo da altura do epitélio, do diâmetro tubular e da variação na frequência dos diferentes tipos celulares. O epitélio pseudoestratificado com estereocílios do epidídimo possui seis tipos celulares: células principais, basais, apicais, halo, estreitas e claras (Herme e Robaire, 2002; Oliva et al., 2009).

O principal tipo celular no epidídimo de todos os mamíferos é a célula principal. Estas células aparecem ao longo de todo o ducto, mas apresentam diferenças estruturais em cada região (Robaire et al., 2006). A função secretora e de reabsorção destas células, juntamente com as junções oclusivas entre elas, garantem a manutenção do microambiente intraluminal onde ocorre a maturação dos espermatozoides (França et al., 2005).

As células basais aparecem em maior frequência nas regiões do corpo e da cauda. Elas estão localizadas próximas à base do epitélio e não alcançam o lúmen. Contribuem para a formação da barreira entre os vasos sanguíneos e o lúmen epididimário, apresentando função protetora (Oliva et al., 2009).

As células apicais são encontradas principalmente no epitélio do segmento inicial. Elas apresentam núcleo esférico apical e não estabelecem contato com a membrana basal. Pouco se sabe sobre as funções destas células, além de sua habilidade na endocitose de substâncias do lúmen (Robaire et al., 2006).

Apesar de serem distribuídas em todos os níveis do epitélio epididimário, as células halo são mais frequentes no epitélio da porção da cabeça. Estas células fazem parte do sistema imune e foram exibidas tanto como monócitos ou linfócitos (Robaire e Hermo, 1988).

As células estreitas, que são exclusivamente observadas no segmento inicial, apresentam citoplasma mais acidófilo, núcleo alongado e localizado na metade superior da célula. Estas células estão relacionadas à manutenção da quiescência do espermatozoide ao modificar o pH do lúmen pela produção de enzimas da família da anidrase carbônica (Oliva et al., 2009).

Por outro lado, as células claras são encontradas nas porções da cabeça, do corpo e, especialmente, da cauda e são caracterizadas, principalmente, pela presença de vesículas apicais. Estas células apresentam função endocítica (Robaire et al., 2006) e também são responsáveis pela acidificação do lúmen (Breton et al., 1996).

A regionalização do epidídimo correlaciona suas características morfológicas com propriedades funcionais, sendo que o segmento inicial está relacionado com a absorção de fluidos vindos do testículo, as regiões da cabeça e corpo estão envolvidas com os processos iniciais e tardios de maturação espermática, como a aquisição da motilidade progressiva e da capacidade de reconhecimento e fertilização do ovócito, enquanto a região da cauda está associada com o armazenamento espermático e com a remoção de espermatozoides anormais (Serre, 1998; Oliva et al., 2009).

A maturação dos espermatozoides envolve a interação dos mesmos com proteínas que são produzidas e secretadas pelo epitélio epididimário, sendo a presença delas região-dependente (Cornwall, 2009). Além disso, o fluido luminal do ducto epididimário contém proteínas relacionadas ao sistema antioxidante como as enzimas gamaglutamiltransferase e a oxido nítrico-sintetase. A produção de espécies reativas de oxigênio em espermatozoides está associada à função fisiológica normal, mas o descontrole e o excesso de tais espécies representam um dos maiores fatores relacionados com a infertilidade, comprometendo a motilidade do espermatozoide e a sua viabilidade em promover fertilização (Oliva et al., 2009).

Já o transporte dos espermatozoides através do epidídimo deve-se provavelmente à atividade contrátil da parede do ducto, a qual é controlada pelo sistema nervoso autônomo e por andrógenos. O tempo da passagem dos gametas pelo ducto epididimário é espécie-específico, variando de 3 a 15 dias (Cosentino e Cockett, 1986). No rato, o tempo de trânsito é de 8 dias (Robb et al., 1978; França et al., 2005) e uma alteração nesse tempo pode alterar o processo de maturação espermática. Dados da

literatura mostram que o atraso no tempo de trânsito pelo epidídimo não altera a capacidade fértil dos gametas, mas quando ele é acelerado a fertilidade fica comprometida (Klinefelter e Suarez, 1997; Kempinas et al., 1998 a, b). Esse prejuízo na fertilidade dos gametas ocorre porque o tempo disponível dos processos requeridos para a aquisição da capacidade fértil fica diminuído. Uma alteração no tempo de trânsito espermático também altera a quantidade de espermatozoides disponíveis para a ejaculação (Klinefelter, 2002).

2.6 Espermatozoides

Os espermatozoides são células altamente especializadas cuja função é fertilizar o ovócito ovulado. Estas células são morfológicamente divididas em cabeça, peça intermediária e cauda. A cabeça contém o núcleo haploide, com cromatina altamente condensada, e o acrossoma, o qual é derivado do complexo de Golgi e contém enzimas capazes de digerir proteínas e açúcares complexos. Já a cauda é formada por um longo flagelo que é composto pela peça intermediária, principal e terminal. A principal parte do flagelo é o axonema, formado por microtúbulos que derivam do centrosomo na base do núcleo e considerado a maior porção motora do flagelo. Na peça intermediária há um grande número de mitocôndrias que se encontram dispostas em hélice, possuindo a função de produzir a energia necessária para a propulsão do espermatozoide (Hafez, 1970; Gilbert, 2003).

As análises espermáticas *in vitro* permitem avaliar parâmetros morfofuncionais de espermatozoides, que podem ser correlacionados com a fertilidade. A motilidade, morfologia e a concentração espermática são os parâmetros tradicionais mais simples de serem avaliados (Barth e Oko, 1989). Apesar da motilidade ser apenas um dos atributos de um espermatozoide fértil, este parâmetro continua sendo o primeiro a ser utilizado como indicador da função espermática. Ele é a manifestação da competência estrutural e funcional do espermatozoide, estando positivamente correlacionado com a integridade de membrana e morfologia normal (Peña Martínez, 2004).

As anormalidades no espermatozoide têm sido tradicionalmente classificadas por localização do defeito (cabeça, peça intermediária e cauda), ou de acordo com seu efeito na fertilidade. Os maiores defeitos incluem a maioria das anormalidades na cabeça e peça intermediária, gota citoplasmática proximal e alterações individuais presentes numa porcentagem elevada. Já os efeitos menores incluem cabeças de espermatozoides destacadas e gota citoplasmática distal (Menon et al., 2011).

Estudos toxicológicos feitos através dos anos classificaram numerosos compostos químicos como agentes tóxicos ao epidídimo, baseados em alterações no número de espermatozoides e/ou alterações qualitativas, tais como a motilidade e morfologia dos espermatozoides do epidídimo (Klinefelter, 2002).

Ferreira et al. (2012) ao tratarem camundongos com 7,5 mg/kg/PC de arsenito de sódio obtiveram diminuição na motilidade espermática e aumento de espermatozoides com anormalidades na cabeça, peça intermediária e cauda. Estudos feitos por Li et al. (2012) também verificaram redução na motilidade espermática e aumento na mal formação dos espermatozoides em camundongos tratados com 1, 2 e 4 mg/L de trióxido de arsênio. Já Jana et al. (2006) observaram diminuição no número de espermatozoides da cauda epididimal em ratos tratados com 5 mg/kg/PC de arsenito de sódio.

Portanto, o arsênio apresenta seus efeitos sobre os parâmetros espermáticos podendo levar a um declínio na qualidade do sêmen. Uma vez que o testículo desempenha função de produção dos espermatozoides e o epidídimo no processo de maturação destes, qualquer patologia que contribua para alterar a arquitetura dos mesmos pode resultar no processo de alteração na produção e maturação espermática, influenciando na fertilidade. Com as análises morfométricas nos cortes histológicos tanto do testículo como epidídimo, em animais tratados com o arsênio, é possível obter algumas respostas sobre o possível efeito do mesmo nestes órgãos.

3. REFERÊNCIAS

Ahmad I, Akthar KM, Waalkes M. Inorganic arsenic and human prostate cancer. *Environ Health Perspect* 2008; 116: 158-64.

Aitken RJ, West KM. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leukocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int J Androl* 1990; 13: 433-51.

Bardin CW. Androgens: early attempts to evaluated Leydig cell functions in man. In: Payne AH, Hardy MP, Russell LD, editors. *The Leydig cell*, Vienna: Cache River Press; 1996, p. 31-42.

Barra CM, Santelli RE, Abraão JJ, Guardia M de la. Especificação de Arsênio-Uma revisão. *Química Nova* 2000; 23: 58-70.

Barth AD, Oko RJ. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames, IA: Iowa University Press;1989.

Beveridge TJ, Hugles MN, Lee H, Leung KT, Poole RK, Savivaidis I, et al. Metal microbe interactions: contemporary approaches. *Adv Microb Physiol* 1997; 38: 177-43.

Breton S, Smith PJ, Lui B, Brown D. Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H⁺)-ATPase. *Nat Med* 1996; 2: 470–2.

Brooks DE. Epididymal functions and their hormonal regulation. *Aust J Biol Sci* 1983; 36: 205-21.

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

Celik I, Gallicchio L, Boyd K, Lam TK, Matanoski G, Tao X, et al. Arsenic in drinking water and lung cancer: A systematic review. *Environ Health* 2008; 108: 48-5.

Chang SI, Jin B, Youn P, Park C, Park JD, Ryu DY. Arsenic-induced toxicity and protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 218: 196-03.

Cosentino MJ, Cokett AT. Structure and function of the epididymis. *Urol Res* 1986; 14: 229-40.

Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 2009; 15: 213–27.

Ferreira M, Matos RC, Oliveira H, Nunes B, Pereira ML. Impairment of mice spermatogenesis by sodium arsenite. *Hum Exp Toxicol* 2012; 31: 290-02.

Figueiredo BR, Borba RT, Angelica RS. Arsenic occurrence in Brazil and human exposure. *Environ Geochem Health* 2007; 29: 109-18.

França LR, Russell LD. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia F, Regadera J, editors. Male reproduction – multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Communications; 1998, p. 197-219.

França LR, Avelar GF, Almeida FFL. Spermatogenesis and transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 2005; 63: 300-18, 2005.

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

Glover TD. The epididymis. In: Chisholm GD, Williams DI, editors. *Scientific Foundations of Urology*, London: William Heinemann Medical Books Ltd; 1982, p. 544-555.

Goldhaber SB. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regul Toxicol Pharmacol* 2003; 38: 232–42.

Gontijo B, Bittencourt F. Arsênio – Uma revisão histórica. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 2005; 80: 91-5.

Goyer RA. Toxic effects of metals. In: Klaassen CD, editors. *Casarett & Doull's toxicology: The basic science of poisons*. New York: McGraw Hill; 1996, p. 691-736.

Hafez ESE. *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals*. Detroit: Lea & Febiger; 1970.

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

Hughes MF. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett* 2002; 133: 1-16.

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

Jomova K, Jenisova Z, Feszterova M, Baros S, Liska J, Hudecova D, et al. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J Appl Toxicol* 2011; 31: 95-07.

Kempinas WG, Suarez JD, Roberts NL, Strader L, Ferrell J, Goldman JM, et al. Rat epididymal sperm quantity, quality, and transit after guanethidine - induced sympathectomy. *Biol Reprod* 1998; 59: 890-6 a.

Kempinas WG, Suarez JD, Roberts NL, Strader L, Ferrell J, Goldman JM, et al. Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy. *Biol Reprod*; 59: 897-04 b.

Kim I, Yang H. Morphometric study of the testicular interstitium of the rat during postnatal development. *Korean J Anatomy* 1999; 32: 849-58.

Klinefelter GR, Suarez JD. Toxicant-induced acceleration of epididymal sperm transit: androgen-dependent proteins may be involved. *Reprod Toxicol* 1997; 11: 511-9.

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

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. *Toxicol sci* 2012; 128: 482-9.

Mata WS. Toxicidade do arsenato e efeito protetor do guaraná e da vitamina E no aparelho reprodutor de camundongos machos adultos. 2009. Tese (doutorado em biologia celular e estrutural) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Menon AG, Barkema HW, Wilde R, Kastelic JP, Thundathil JC. Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 2011; 75: 241–7.

Ministério da Saúde. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília; 2011. 212p.

Monsees TK, Franz M, Gebhardt S, Winterstein U, Schill WB, Hayatpour J. Sertoli cell as a target for reproductive hazards. *Andrologia* 2000; 32: 239-46.

Morakinyo AO, Achema PU, Adegoke OA. Effect of *Zingiber officinale* (ginger) on sodium arsenite-induced reproductive toxicity in male rats. *AJBR* 2010; 13: 39-5.

Muniz DHF, Oliveira-Filho EC. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. *Universitas: Ciências da Saúde* 2006; 4: 83-100.

Naranmandura H, Suzuki N, Iwata K, Hirano S, Suzuki KT. Arsenic metabolism and thioarsenicals in hamsters and rats. *Chem Res Toxicol* 2007; 20: 616-24.

Neves RNP, Carvalho F, Carvalho M, Fernandes E, Soares E, Bastos ML, et al. Protective activity of hesperidin and lipoic acid against sodium arsenite acute toxicity in mice. *Toxicol Pathol* 2004; 32: 527-35.

Oliva SU, Rinaldo PA, Stumpp T. Biologia epididimária: maturação espermática e expressão gênica. *O mundo da Saúde* 2009; 33: 419-25.

Orloff K, Mistry K, Metcalf S. Biomonitoring for environmental exposures to arsenic. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2009; 12: 509-24.

Pant N, Kumar R, Murthy RC, Srivastava SP. Male reproductive effect of arsenic in mice. *Biometals* 2001; 14: 113-17.

Pant N, Murthy RC, Srivastava SP. Male reproductive toxicity of sodium arsenite in mice. *Hum Exp Toxicol* 2004; 32: 399-03.

- Payne AH, Hardy MP, Russell LD. The Leydig cell. Vienna: Cache River Press; 1996.
- Peña Martínez AI. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83: 209-24.
- Perottone J. Avaliação dos efeitos promovidos pelo chumbo, selênio e/ou sacarose em parâmetros oxidativos em roedores. 2006. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.
- Reddy PS, Rani GP, Sainath SB, Meena R, Supriya CH. Protective effects of N-acetylcysteine against arsenic-induced oxidative stress and reprotoxicity in male mice. *J Trace Elem Med Biol* 2011; 4: 247-53.
- Robaire B, Hermo L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens structure, functions, and their regulation. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The Physiology of Reproduction*; 1988, p. 999–1080.
- Robaire B, Hinton BT, Orgebin-Crist MC. The Epididymis. In: Neill JD, editor. *Physiology of Reproduction*. USA: Elsevier Inc; 2006, p.1071-1148.
- Robb GW, Amman RP, Killian GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil* 1978; 54: 103-7.
- Russell LD, Griswold MD. *The Sertoli Cell*. Clearwater: Cache River Press; 1993.
- Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. Mammalian spermatogenesis. In: Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED, editors. *Histological and histopathological evaluation of the testis*, Florida: Cache River Press; 1990, p. 1-40.
- Sanghamitra S, Hazra J, Upadhyay SN, Amal RC. Arsenic induced toxicity on testicular tissue of mice. *Indian J Physiol Pharmacol* 2008; 52: 84-0.
- Sarkar M, Chaudhuri GR, Chattopadhyay A, Biswas NM. Effect of sodium arsenite on spermatogenesis, plasma gonadotrophins and testosterone in rats. *Asian J Androl* 2003; 5: 27-1.

Serre V, Robaire B. Segment-specific morphological changes in aging brown norway rat epididymis. *Biol Reprod* 1998; 58: 497–13.

Shum WWC, Silva N, Brown D, Breton S. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *The Journal of Experimental Biology* 2009; 212: 1753-61.

Silva MRC. Estudos de sedimentos da bacia hidrográfica do Mogi-Guaçu com ênfase na determinação de metais. 2002. (Dissertação, Mestrado). Universidade de São Carlos, São Paulo.

Setchell BP. Innervation and vasculature of the excurrent duct system. In: Robaire B, Hinton BT, editors. *The Epididymis – from molecules to clinical practice*, New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher; 2002, p. 35-48.

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

United State Environmental Protection Agency - USEPA b. Technologies and Costs for Removal of Arsenic from Drinking Water. EPA 815-R-00-028.

Vahter M. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicol* 2002; 18: 211-17.

Waalkes MP, Coogan TP, Barter RA. Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphases on cadmium. *Crit Rev Toxicol* 1992; 22: 175-201.

World Health Organization - Who. *Guidelines for drinking water quality*. 4th ed. Geneva; 2011. p. 315-18.

Xu W, Bao H, Liu F, Liu L, Zhu YG, She J, et al. Environmental exposure to arsenic may reduce human semen quality: associations derived from a Chinese cross-sectional study. *Environ Health* 2012.

Effects of sodium arsenate and arsenite on male reproductive functions in rats

Ana Cláudia Ferreira Souza^a, Sarah Cozzer Marchesi^a, Graziela Domingues de Almeida Lima^a, Rafael Penha Ferraz^a, Juraci Alves de Oliveira^a, Mariana Machado Neves^{a*}

^aLaboratory of Structural Biology, Department of General Biology, Federal University of Viçosa, UFV – Viçosa/ MG, Brazil

*Corresponding author at: Laboratory of Structural Biology, Department of General Biology, Federal University of Viçosa, Av. P.H. Rolfs, s/n, Campus Universitário, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. Phone: + 55 31 3899 3360; Fax: + 55 31 3899 2549. E-mail address: mariana.mneves@ufv.br (M. M. Neves)

Abstract

International organizations tolerate the presence of low concentrations of arsenic (up to 0.01 mg/L) in water used for human consumption. The aim of this study was to evaluate the impact of this element on reproductive parameters with oral exposure to two inorganic compounds. Rats received 0.01 mg/L and 10 mg/L of arsenic, as sodium arsenate and arsenite, daily in drinking water for 56 days. Sodium arsenite at the two concentrations and arsenate at 10 mg/L caused a reduction in daily sperm production, the number of spermatids in the testis, and sperm in the epididymal caput/corpus regions. Changes in epididymal histomorphometry were variable and region-specific. These results show the toxic powers of sodium arsenate and arsenite in reproductive morphofunctional parameters, showing their potential harm to male fertility.

Keywords: Arsenic, epididymis, epididymal transit, sperm, reproductive toxicity, rat

1. Introduction

Arsenic is a heavy metal found in water, soil, and air from anthropogenic and natural sources (Hughes, 2002). Both in the environment and in animals, arsenic may be present in oxidized form and form organic and inorganic compounds (Orloff et al., 2009). Among those inorganic compounds, the arsenic forms best known are arsenate (As^{5+}) and arsenite (As^{3+}), combined with other elements like oxygen and sodium (Hughes, 2002; Jomova et al., 2011). Sodium arsenite is considered to be the most toxic since it reacts strongly with endogenous thiol groups, especially dithiols (Neves et al., 2004). However, once absorbed, both arsenite and arsenate are biotransformed in various methylated metabolites less toxic with rapid excretion (Vahter, 2002; Naranmandura et al., 2007; Celik et al., 2008).

Exposure to high concentrations of arsenic, particularly in contaminated drinking water, is considered a major threat to human health worldwide (Simeonova and Luster, 2004; Hong et al., 2009; Bloom et al., 2010). Acute exposure to this element can cause nausea, vomiting, abdominal pain, encephalopathy, and neuropathy, whereas chronic exposure induces the formation of various types of cancer, neuronal and metabolic disorders (Reddy et al., 2011). Furthermore, recent studies have shown that exposure to arsenic is also associated with reproductive toxicity in males (Pant et al., 2001; Pant et al., 2004).

Studies to assess the effects of arsenic on reproduction have been focused primarily on testicular parameters, administering various concentrations through different routes and times of exposure, with little information about its effects on the epididymis and sperm. Sodium arsenite administered at high concentrations results in a spermatotoxic effect (Pant et al., 2004), inhibition of testicular androgenesis, and a reduction in the weight of testis and accessory sex organs in experimental animals (Sarkar et al., 2003). In addition, there are reports of an increase in the percentage of sperm with abnormalities in the head, midpiece, and tail (Ferreira et al., 2012), as well as a dose-dependent reduction in the number of sperm in the epididymal cauda (Jana et al., 2006; Chang et al., 2007), without changes in the tissue architecture of this organ (Ferreira et al., 2012).

Few studies have evaluated the effects of low concentrations of sodium arsenite on the epididymis, an organ responsible for sperm maturation (Robaire et al., 2006). During transit through the epididymis, the sperm acquire motility and fertilizing capacity when exposed to substances present in the luminal fluid, produced in specific

regions such as the initial segment, caput, and corpus, and finally are stored in the cauda region (Cornwall, 2009). Furthermore, there are no studies evaluating the effects of sodium arsenate on male reproductive organs.

Once Brazilian and international organizations determined that 0.01 mg/L of arsenic is the maximum concentration tolerable to be found in freshwater (BRASIL, 2005; WHO, 2011), the aim of this study was to compare the effects of chronic exposure to sodium arsenate and arsenite on male reproductive organs, with emphasis on the epididymis, evaluating histomorphometric and functional parameters.

2. Material and methods

2.1 Animals

Adult male Wistar rats (n = 30, 70 days old, 210-265 g) were used and were provided by the Central Animal Facility of the Center of the Biological and Health Sciences of the Federal University of Viçosa (UFV). Animals were housed individually in polypropylene cages, under controlled photoperiod (12-12h light/dark) and temperature (21 °C). The provision of feed was controlled, being 25 g of balanced rat chow (Nuvilab) per day, whereas drinking water was used as an administration route for treatment. Experimental procedures were in accordance with the ethical principles in animal research adopted by the Animal Ethics Committees (CEUA protocol no.: 19/2011).

2.2 Experimental groups

The animals were weighed (0.01 g, AS500C, Marte[®]) and randomly divided into five groups (n = 6 animals/group). The control animals (C) received saline (0.9% NaCl), while the treated animals were exposed orally to arsenic in the form of sodium arsenate ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) and arsenite (AsNaO_2 ; Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO), testing for each chemical form with concentrations of 0.01 mg/L and 10 mg/L. The animals were provided 30 mL of solutions daily for 56 days, comprising a cycle of the seminiferous epithelium.

2.3 Euthanasia, body weight and reproductive organ weights

The animals were weighed, sedated with xylazine hydrochloride (10 mg/kg/intraperitoneal), anesthetized with ketamine hydrochloride (150 mg/kg/intraperitoneal), and euthanized after 57 days of treatment. The testis, epididymis, ventral prostate, and seminal vesicle (without the coagulating gland) were removed, dissected, and weighed. The mean body weight gain for each group was calculated from the final weight minus the initial weight of the animals.

2.4 Histological processing for histomorphometry

The right epididymis was immersed in Karnovsky fixative for 24 hours and subsequently segmented into initial segment, caput, corpus, and cauda. Then, the specimens were dehydrated in increasing concentrations of ethanol (70%, 80%, 90%, absolute) with changes every 30 minutes. After dehydration, preinclusion and inclusion in 2-hydroxyethyl methacrylate (Historesin[®], Leica) were performed. Histological semiserial sections with a thickness of 3 μm were obtained using a rotary microtome (RM 2255, Leica), and sections stained with toluidine blue-sodium borate 1%, and qualitatively analyzed in an Olympus CX40 light microscope at magnifications of 100x, 200x, and 400x.

For morphometric analysis, 10 histological fields of the four epididymal regions were photographed using an Olympus BX53 light microscope at a magnification of 10x. Then, the tubular and luminal diameters, epithelium heights, and volumetric proportions were measured. The tubular diameter per region per animal was obtained from the measurement at random of twenty cross sections of round epididymal duct. In the same sections, the luminal diameter and epithelial height were measured. The value found for the epithelium height in each tubule represents the average of four measurements taken from a opposed diametrically. These measurements were performed using image-analysis software Image-Pro Plus 4 (Media Cybernetics).

The volumetric proportion was determined in the four regions of the epididymis using a grid containing 266 points projected onto 10 histological fields at a magnification of 10x, totaling 2,660 points per animal. Matching points were recorded on tubular components, epithelium, lamina propria, with or without luminal sperm, and intertubular components including blood vessels, connective tissue, and smooth muscle. Then, the percentage of points on each evaluated parameter was calculated.

2.5 Determination of serum testosterone

During anesthesia, blood was collected via cardiac puncture, centrifuged at 419 xg for 15 minutes to obtain serum, stored in microtubes and frozen at -20°C . Quantification of serum testosterone was determined by chemiluminescence using the Access Testosterone (REF 33560) kit, suitable for the Access 2 equipment. The results were expressed in ng/mL.

2.6 Sperm evaluation

Immediately after euthanasia, the cauda region of the left epididymis from same animals was cut several times in a petri dish to obtain sperm-rich fluid. This fluid was diluted into 500 μl of Tris-citric-fructose (Tris 3.025 g, citric acid 1.7 g, fructose 1.25 g, distilled water 100 ml) heated to 34°C . Aliquots of fluid were collected for the evaluation of motility and sperm morphology.

2.6.1 Total motility, progressive motility and sperm vigor

For the assessment of total and progressive motility and sperm vigor, 10 μl of epididymal cauda fluid was placed between the slide and coverslip, previously heated to 37°C , and examined under an optical microscope (Bioval) at increasing magnifications of 100x and 400x. Motility was expressed as a percentage (0-100) and spermatoc vigor at a scale of 0 (not mobility) to 5 (rapid motility) (CBRA, 1998).

2.6.2 Sperm morphology

For the analysis of sperm morphology, 50 μl of epididymal cauda fluid was fixed in 100 μl of 4% buffered formaldehyde. This preparation was examined in a phase contrast microscope (Bioval) at a magnification of 1000x, and 200 cells were evaluated. The sperm abnormalities observed were classified as defects of the head, midpiece, and tail. The results were expressed as percentages.

2.7 Daily sperm production per testis, sperm number and transit time in the epididymis

Homogenization-resistant testicular spermatids (stage 19 of spermiogenesis) as well as sperm in the caput/corpus epididymis and cauda epididymis were counted as described previously by Robb et al. (1978), with adaptations described as follows: the left testis was decapsulated and weighed soon after collection, and homogenized in 5 mL of 0.9% NaCl containing 0.05% Triton X-100. After a tenfold dilution, a sample was transferred to Neubauer chambers (four fields per animal), and the number of mature spermatids counted. To calculate daily sperm production (DSP), the number of spermatids at stage 19 was divided by 6.1, which is the number of days spermatids are present in the seminiferous epithelium. In the same manner, caput/corpus and cauda epididymis portions were cut into small fragments with scissors and homogenized, and sperm were counted as described for the testis. The transit time of sperm through the epididymis was determined by dividing the number of sperm in each portion by the DSP.

2.8 Statistical analysis

The results obtained from the quantitative assessments were analyzed by analysis of variance (ANOVA), and the means were compared using the Student-Newman-Keuls method or through the nonparametric Kruskal-Wallis test comparing the means by Dunn's test, according to the characteristic of each variable. Differences were considered significant when $P < 0.05$. Results were expressed as mean \pm standard error mean.

3. Results

3.1 Body weight and organ weights

Averages for body weight, weight gain, and absolute and relative weights of the reproductive organs (Table 1) did not differ significantly between animals of the control group and those that received orally two concentrations of sodium arsenate and arsenite.

Table 1

Body weight, weight gain and absolute and relative weights of reproductive organs of Wistar rats chronically exposed to different concentrations of sodium arsenate and arsenite.

Parameters	Control	0.01 mg/L arsenate	10 mg/L arsenate	0.01 mg/L arsenite	10 mg/L arsenite
Initial body weight (g)	241.60 ± 7.72	245.20 ± 8.28	242.80 ± 6.79	239.20 ± 8.58	241.60 ± 8.38
Final body weight (g)	398.20 ± 10.96	411.58 ± 13.34	396.58 ± 8.59	409.85 ± 9.21	403.60 ± 10.00
Body weight gain (g)	156.60 ± 4.72	166.38 ± 10.86	153.78 ± 7.77	170.65 ± 4.37	162.00 ± 2.43
Testis (g)	1.75 ± 0.05	1.95 ± 0.02	1.85 ± 0.05	1.89 ± 0.06	1.72 ± 0.19
Testis (g/100g)	0.44 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.47 ± 0.02	0.46 ± 0.02	0.42 ± 0.04
Epididymis (mg)	682.00 ± 33.97	702.00 ± 24.37	684.00 ± 25.42	620.00 ± 35.64	664.00 ± 84.89
Epididymis (mg/100g)	171.60 ± 8.91	170.72 ± 4.08	172.64 ± 6.26	151.69 ± 9.81	163.49 ± 18.30
Seminal vesicle (g)	0.86 ± 0.07	0.86 ± 0.07	0.86 ± 0.12	0.73 ± 0.06	0.80 ± 0.06
Seminal vesicle (g/100g)	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.03	0.18 ± 0.01	0.20 ± 0.01
Ventral prostate (mg)	310.80 ± 30.12	355.60 ± 42.10	309.40 ± 49.26	343.00 ± 30.67	327.40 ± 21.84
Ventral prostate (mg/100g)	77.58 ± 5.80	85.92 ± 8.73	77.70 ± 11.85	83.77 ± 7.29	81.16 ± 5.11

Mean ± SEM. P > 0.05.

3.2 Epididymal histomorphometry

Epididymal sections of animals from control groups and those treated with arsenate and arsenite showed normal tubule arrangement, a pseudostratified columnar epithelium with stereocilia, and sperm in the lumen in all regions (Fig. 1A - F). In addition, there was normal cell distribution and frequency in the epididymis of all animals in the regions analyzed.

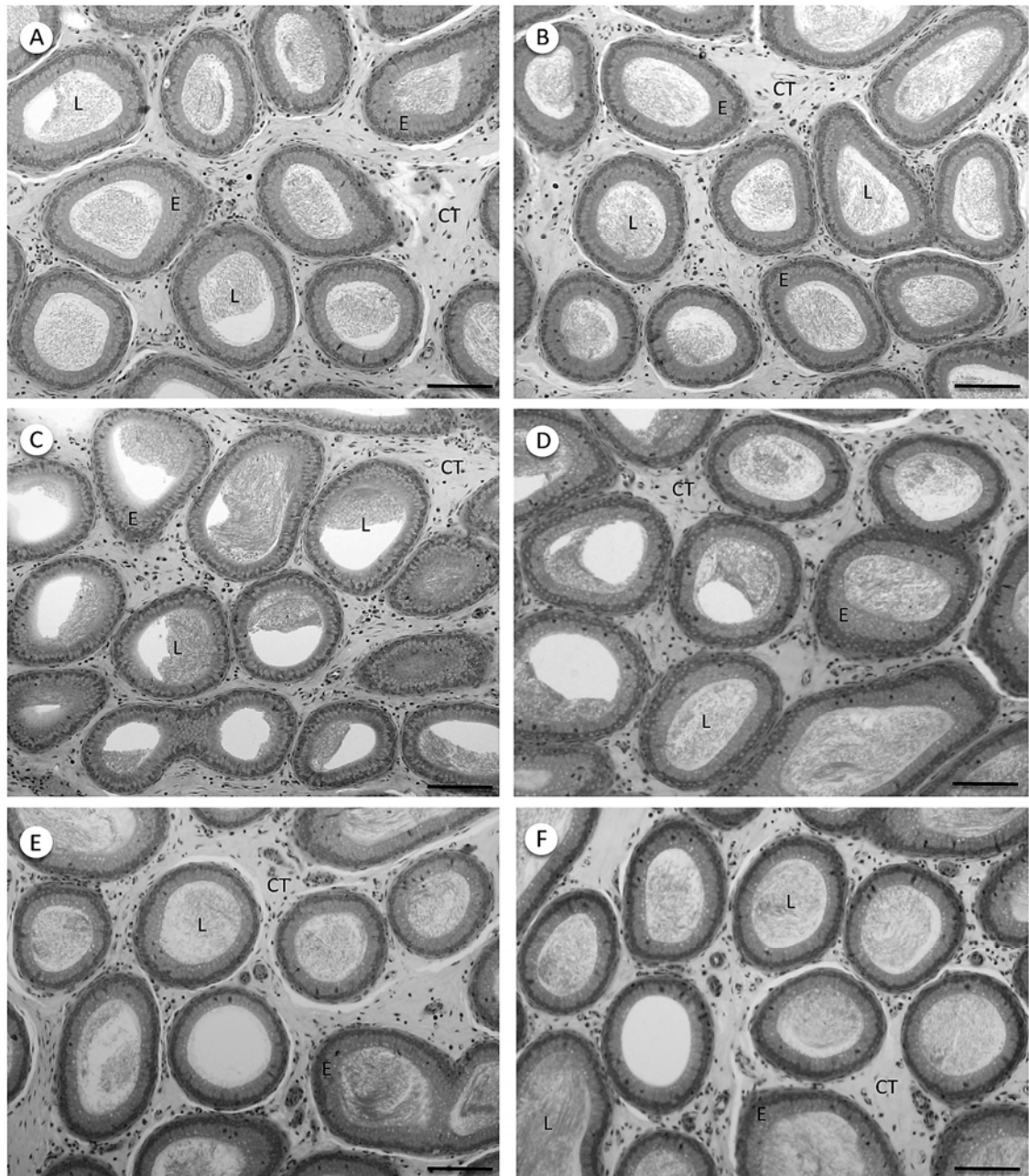


Fig. 1. Histological sections of epididymal initial segment of Wistar rats treated with different concentrations of sodium arsenate and arsenite. A and B: control, C: 0.01 mg/L of sodium arsenate, D: 10 mg/L of sodium arsenate, E: 0.01 mg/L of sodium arsenite and F: 10 mg/L sodium arsenite. E = epithelium, L = lumen, CT = connective tissue. Toluidine blue. Scale bar = 100 μ m.

Analysis of the morphometry of the initial segment showed no differences in the mean tubular diameter between experimental groups ($P > 0.05$). Animals receiving 10 mg/L of sodium arsenate and 0.01 mg/L of sodium arsenite showed a higher mean luminal diameter compared to the control group ($P < 0.05$, Table 2). All treated animals, regardless of concentrations and solutions, showed a reduction in the epithelium height when compared with the control group ($P < 0.05$). The analysis of the volumetric proportion of this segment showed that there was a decrease in the percentage of the lamina propria in animals treated with 0.01 mg/L of sodium arsenite compared with control animals and those treated with 0.01 mg/L of sodium arsenate ($P < 0.05$). In the interstitium, the average percentage of blood vessels in animals treated with 0.01 mg/L of sodium arsenate and 10 mg/L of sodium arsenite was lower than that observed for the control group ($P < 0.05$). The percentage of epithelium, lumen with and without sperm, connective tissue, and smooth muscle did not differ between experimental groups ($P > 0.05$).

Table 2

Tubular and luminal diameters (μm), epithelium height (μm) and volumetric proportion (%) of epididymal initial segment region of Wistar rats chronically exposed to different concentrations of sodium arsenate and arsenite.

	Control	0.01 mg/L arsenate	10 mg/L arsenate	0.01 mg/L arsenite	10 mg/L arsenite
¹ Tubular diameter	203.04 \pm 8.04	203.62 \pm 7.18	211.25 \pm 7.52	216.88 \pm 1.50	197.92 \pm 1.16
¹ Luminal diameter	111.90 \pm 4.76 ^a	126.85 \pm 8.64 ^{ab}	139.22 \pm 6.84 ^b	142.85 \pm 2.10 ^b	132.00 \pm 5.63 ^{ab}
¹ Epithelium height	48.53 \pm 5.72 ^a	38.34 \pm 1.62 ^b	35.31 \pm 1.04 ^b	38.92 \pm 1.00 ^b	35.23 \pm 1.16 ^b
¹ Epithelium	44.68 \pm 2.72	45.63 \pm 1.67	42.57 \pm 2.62	44.07 \pm 1.02	42.08 \pm 0.68
¹ Lamina propria	6.64 \pm 0.58 ^a	6.53 \pm 0.21 ^a	5.40 \pm 0.17 ^{ab}	5.00 \pm 0.28 ^b	5.79 \pm 0.22 ^{ab}
¹ Blood vessel	0.31 \pm 0.08 ^a	0.11 \pm 0.04 ^b	0.28 \pm 0.03 ^{ab}	0.18 \pm 0.05 ^{ab}	0.12 \pm 0.02 ^b
¹ Lumen with sperm	15.69 \pm 2.81	14.75 \pm 2.06	21.19 \pm 1.00	20.21 \pm 0.70	21.79 \pm 1.28
² Lumen without sperm	1.89 \pm 0.50	6.27 \pm 2.87	5.40 \pm 1.07	2.72 \pm 0.66	1.76 \pm 0.44
¹ Conective tissue	30.29 \pm 1.88	26.10 \pm 1.65	24.39 \pm 2.02	26.85 \pm 1.83	27.66 \pm 0.95
¹ Smooth muscle	0.50 \pm 0.10	0.61 \pm 0.12	0.77 \pm 0.13	0.97 \pm 0.26	0.80 \pm 0.07

Mean \pm SEM. ^{a,b}Different letters in the same row are different among them ($P < 0.05$). ¹ANOVA with *post hoc* Student Newman Keuls test. ²Kruskal Wallis with *post hoc* Dunn test.

There was no difference between groups for the mean values of the tubular and luminal diameters and the epithelium height in the caput region ($P > 0.05$). In relation to volume ratio, the average percentage of epithelium was greater in animals treated with

both concentrations of sodium arsenite than the animals in the group treated with 0.01 mg/L of sodium arsenate ($P < 0.05$). There was also decrease in the percentage of lamina propria of animals treated with 10 mg/L of arsenate and two concentrations of sodium arsenite compared to the control group. This reduction was higher in animals treated with arsenite (Table 3).

Table 3

Tubular and luminal diameters (μm), epithelium height (μm) and volumetric proportion (%) of epididymal caput region of Wistar rats chronically exposed to different concentrations of sodium arsenate and arsenite.

	Control	0.01 mg/L arsenate	10 mg/L arsenate	0.01 mg/L arsenite	10 mg/L arsenite
¹ Tubular diameter	387.24 \pm 24.55	430.93 \pm 15.08	379.30 \pm 18.95	398.29 \pm 8.82	389.51 \pm 13.35
¹ Luminal diameter	313.23 \pm 20.65	359.26 \pm 16.00	311.54 \pm 16.51	324.14 \pm 10.52	313.71 \pm 11.01
¹ Epithelium height	33.68 \pm 2.42	32.70 \pm 1.53	32.96 \pm 1.97	34.26 \pm 1.75	32.68 \pm 1.88
¹ Epithelium	30.62 \pm 1.26 ^{ab}	28.15 \pm 0.83 ^b	30.70 \pm 0.86 ^{ab}	33.16 \pm 1.45 ^a	33.88 \pm 1.03 ^a
¹ Lamina propria	5.76 \pm 0.37 ^a	5.15 \pm 0.14 ^{ab}	4.69 \pm 0.36 ^b	3.40 \pm 0.26 ^c	3.34 \pm 0.27 ^c
² Blood vessel	0.17 \pm 0.07	0.09 \pm 0.02	0.19 \pm 0.05	0.10 \pm 0.03	0.19 \pm 0.08
¹ Lumen with sperm	42.91 \pm 4.78	33.86 \pm 5.50	38.11 \pm 3.48	34.15 \pm 5.03	39.94 \pm 3.47
¹ Lumen without sperm	10.38 \pm 3.81	25.12 \pm 5.36	17.14 \pm 3.66	18.45 \pm 5.18	11.06 \pm 2.82
¹ Conective tissue	9.91 \pm 1.42	7.26 \pm 0.87	8.77 \pm 0.54	10.23 \pm 1.42	11.11 \pm 1.43
¹ Smooth muscle	0.25 \pm 0.06	0.37 \pm 0.09	0.40 \pm 0.08	0.51 \pm 0.08	0.48 \pm 0.05

Mean \pm SEM. ^{a,b}Different letters in the same row are different among them ($P < 0.05$). ¹ANOVA with *post hoc* Student Newman Keuls test. ²Kruskal Wallis with *post hoc* Dunn test.

In relation to the corpus region, a difference was observed ($P < 0.05$) in the percentage of lumen without spermatozoa in animals treated with 10 mg/L of arsenate ($0.76 \pm 0.23\%$) when compared with those treated with arsenite at the same concentration ($0.07 \pm 0.06\%$).

The cauda region of the epididymis of animals that received 10 mg/L of sodium arsenate showed reduced tubular diameter compared with control animals, whereas animals treated with 0.01 mg/L of sodium arsenite showed reduction in lumen diameter ($P < 0.05$). In relation to the average epithelium height, the animals treated with 10 mg/L of arsenite showed a greater average in comparison with that of control animals, whereas the average score for the treatment in question was larger than the value obtained from epididymal epithelium of animals treated with 10 mg/L of arsenate ($P < 0.05$). In assessing the volumetric proportion, differences were observed between

groups only for the percentage of lamina propria, with the highest average in animals treated with 0.01 mg/L of arsenate compared with animals that received the highest concentration of this chemical form (Table 4).

Table 4

Tubular and luminal diameters (μm), epithelium height (μm) and volumetric proportion (%) of epididymal cauda region of Wistar rats chronically exposed to different concentrations of sodium arsenate and arsenite.

	Control	0.01 mg/L arsenate	10 mg/L arsenate	0.01 mg/L arsenite	10 mg/L arsenite
¹ Tubular diameter	490.13 \pm 23.28 ^a	472.30 \pm 20.63 ^{ab}	405.18 \pm 16.16 ^b	417.44 \pm 17.22 ^{ab}	448.81 \pm 18.38 ^{ab}
¹ Luminal diameter	449.35 \pm 25.56 ^a	423.15 \pm 23.59 ^{ab}	358.83 \pm 18.34 ^{ab}	362.17 \pm 18.52 ^b	393.90 \pm 20.34 ^{ab}
¹ Epithelium height	30.74 \pm 1.53 ^{ab}	29.94 \pm 1.56 ^{ab}	25.94 \pm 1.75 ^b	31.92 \pm 1.91 ^{ab}	33.65 \pm 2.21 ^a
¹ Epithelium	32.09 \pm 4.23	21.26 \pm 2.64	23.08 \pm 1.48	29.02 \pm 1.77	25.39 \pm 2.52
² Lamina propria	2.66 \pm 0.61 ^{ab}	3.97 \pm 0.76 ^a	0.73 \pm 0.05 ^b	2.67 \pm 0.24 ^{ab}	2.68 \pm 0.40 ^{ab}
¹ Blood vessel	0.19 \pm 0.01	0.20 \pm 0.06	0.17 \pm 0.08	0.09 \pm 0.03	0.11 \pm 0.03
² Lumen with sperm	51.26 \pm 4.46	59.63 \pm 2.19	61.43 \pm 2.62	59.15 \pm 2.24	57.77 \pm 2.29
¹ Lumen without sperm	0.13 \pm 0.05	0.31 \pm 0.13	2.29 \pm 1.30	1.45 \pm 0.93	1.20 \pm 0.28
¹ Conective tissue	12.07 \pm 1.34	11.12 \pm 0.96	8.95 \pm 0.79	7.28 \pm 1.21	9.94 \pm 1.90
² Smooth muscle	1.60 \pm 1.19	3.51 \pm 1.73	3.35 \pm 0.18	0.34 \pm 0.06	2.91 \pm 2.04

Mean \pm SEM. ^{a,b}Different letters in the same row are different among them ($P < 0.05$). ¹ANOVA with *post hoc* Student Newman Keuls test. ²Kruskal Wallis with *post hoc* Dunn test.

3.3 Serum testosterone

Chronic exposure to sodium arsenate and arsenite did not cause a significant variation in testosterone concentration in treated animals compared with control animals (Fig. 2).

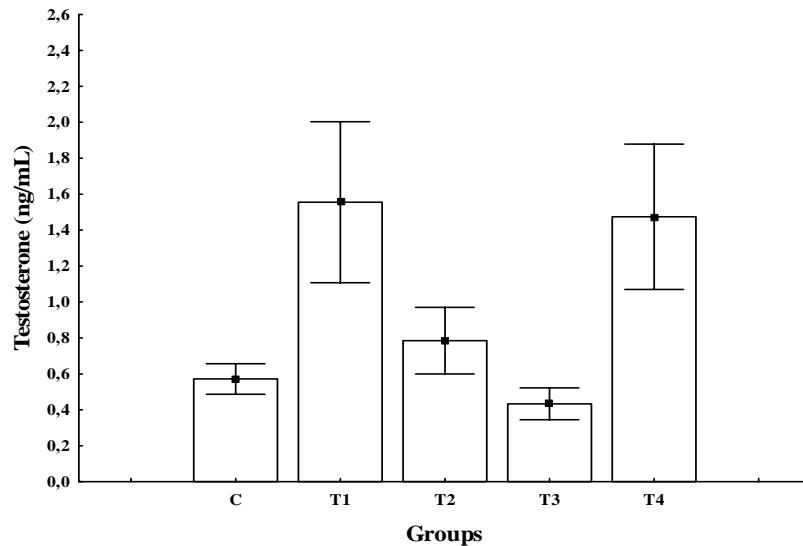


Fig. 2. Serum testosterone levels in Wistar rats exposed to different concentrations of sodium arsenate and arsenite. Group C: control, T1: 0.01 mg/L of sodium arsenate; T2: 10 mg/L of sodium arsenate; T3: 0.01 mg/L of sodium arsenite and T4: 10 mg/L arsenite sodium. Mean \pm SEM. $P > 0.05$.

3.4 Sperm evaluation

Analyses of total and progressive sperm motility, vigor and sperm morphology did not differ between the control group and the groups receiving different concentrations of sodium arsenate and arsenite ($P > 0.05$, Table 5). The percentage of normal sperm and those with pathologies in the head, midpiece, and tail were similar between groups ($P > 0.05$).

Table 5

Sperm parameters of Wistar rats chronically exposed to different concentrations of sodium arsenate and arsenite.

	Control	0.01 mg/L arsenate	10 mg/L arsenate	0.01 mg/L arsenite	10 mg/L arsenite
² Total motility (%)	67.50 \pm 9.24	76.25 \pm 2.39	67.50 \pm 3.23	68.75 \pm 1.25	63.75 \pm 2.39
² Progressive motility (%)	50.00 \pm 7.36	55.00 \pm 2.04	51.25 \pm 1.25	50.00 \pm 0	51.25 \pm 3.15
² Vigor (0-5)	2.75 \pm 0.25	3.25 \pm 0.25	3.00 \pm 0	3.00 \pm 0.41	3.75 \pm 0.25
¹ Abnormal head	5.75 \pm 0.85	6.50 \pm 1.55	7.00 \pm 1.08	10.50 \pm 2.06	4.67 \pm 1.86
² Abnormal mid piece	0.50 \pm 0.29	1.50 \pm 1.19	1.25 \pm 0.25	0.25 \pm 0.25	0.67 \pm 0.33
¹ Abnormal tail	6.75 \pm 1.60	12.00 \pm 3.34	6.00 \pm 2.08	13.50 \pm 3.57	10.00 \pm 2.52
¹ Normal	87.00 \pm 1.58	80.00 \pm 3.49	85.75 \pm 2.59	75.75 \pm 2.29	84.67 \pm 3.53

Mean \pm SEM. ¹ANOVA with *post hoc* Student Newman Keuls test. ²Kruskal Wallis with *post hoc* Dunn test.

3.5 Daily sperm production per testis, sperm number and transit time in the epididymis

The daily sperm production, the number of mature spermatids in the testis and per gram of testis were reduced in animals treated with arsenite at both concentrations, and 10 mg/L of sodium arsenate compared with those of control animals. With these same parameters, animals that received 10 mg/L of arsenite had lower values than animals treated with 0.01 mg/L of arsenate, although both values are below that of the control group ($P < 0.05$, Table 6).

The number of sperm in the caput/corpus regions of the epididymis in animals treated with two concentrations of sodium arsenite and 10 mg/L of arsenate was lower than those of the control group and the group receiving 0.01 mg/L of arsenate. When this same parameter per gram of epididymis was analyzed, all treatments had fewer sperm in the two regions than the control group ($P < 0.05$, Table 6).

In other analyzed parameters, there was no difference in the number of sperm in the epididymal cauda and transit time of sperm in the caput/corpus and cauda regions between the experimental groups ($P > 0.05$, Table 6).

Table 6

Sperm count parameters in the testis and epididymis of Wistar rats chronically exposed to different concentrations of sodium arsenate and arsenite.

Parameters	Control	0.01 mg/L arsenate	10 mg/L arsenate	0.01 mg/L arsenite	10 mg/L arsenite
Spermatid number (x 10 ⁶ /testis)	273.31 ± 28.43 ^a	237.80 ± 2.33 ^{ab}	168.40 ± 14.70 ^{bc}	191.00 ± 17.78 ^{bc}	170.77 ± 10.97 ^c
Spermatid number (x 10 ⁶ /g testis)	184.32 ± 10.76 ^a	137.64 ± 7.48 ^b	105.46 ± 6.54 ^c	114.13 ± 4.91 ^c	107.81 ± 2.10 ^c
Daily sperm production (x 10 ⁶ /testis/day)	44.80 ± 4.67 ^a	38.98 ± 0.38 ^{ab}	27.61 ± 2.41 ^{bc}	31.31 ± 2.91 ^{bc}	27.99 ± 1.80 ^c
Caput/corpus epididymis sperm number (x 10 ⁶ /organ)	133.22 ± 4.47 ^a	133.21 ± 0.70 ^a	100.80 ± 2.13 ^b	106.88 ± 10.58 ^b	91.61 ± 7.78 ^b
Caput/corpus epididymis sperm number (x 10 ⁶ /g organ)	420.83 ± 29.59 ^a	359.58 ± 6.71 ^b	305.08 ± 26.80 ^{bc}	306.25 ± 14.22 ^{bc}	257.92 ± 5.42 ^c
Sperm transit time in the caput/corpus epididymis (days)	3.02 ± 0.20	3.42 ± 0.02	3.71 ± 0.36	3.43 ± 0.26	3.26 ± 0.08
Cauda epididymis sperm number (x 10 ⁶ /organ)	186.17 ± 27.41	215.13 ± 18.82	184.78 ± 18.27	174.83 ± 16.53	175.89 ± 12.71
Cauda epididymis sperm number (x 10 ⁶ /g organ)	707.89 ± 25.90	765.83 ± 16.60	725.83 ± 19.70	678.33 ± 54.34	617.50 ± 31.66
Sperm transit time in the cauda epididymis (days)	4.15 ± 0.47	5.51 ± 0.43	6.75 ± 0.64	5.72 ± 0.88	6.30 ± 0.37

Mean ± SEM. ^{a,b,c}Different letters in the same row are different among them (P < 0.05) by Student Newman Keuls test

4. Discussion

The results of this study showed that animals chronically treated with sodium arsenate and arsenite altered testicular parameters and epididymal histomorphometry. It was observed that sodium arsenite both at concentrations of 0.01 mg/L and 10 mg/L and arsenate at a concentration of 10 mg/L caused a reduction in the number of spermatids in the testis and per gram of organ as well as a reduction in daily sperm production. These two parameters are important indicators of the male fertility potential because spermatids are the spermatogenic lineage cells that differentiate into sperm, being directly related to daily sperm production (França and Russell, 1998; Fernandez et al., 2008).

The testicular changes contributed to the reduction in the number of sperm present in the epididymal caput/corpus regions obtained in animals treated with arsenite, in two concentrations, and 10 mg/L of arsenate. When sperm are released into the lumen of the seminiferous tubule, they are transported through the efferent ducts (which are responsible for the reabsorption of most of the testicular fluid) and begin their journey through the epididymis (Hansen et al., 2004). These cells pass through the initial segment and the regions of the caput and corpus (which are highly involved with the acquisition of motility and the ability of recognition and fertilization of the oocyte) until they are stored in the cauda (Gatti et al., 2004; Cornwall, 2009).

The time necessary for the sperm to pass through these regions and undergo the action of substances produced by the epididymal epithelium is similar between the segments (Robaire et al., 2006). In this study, treatment with arsenite and arsenate did not affect the transit time of sperm in the caput/corpus and cauda regions. Epididymal sperm transit time in rats is about eight days (Robb et al., 1978; França et al., 2005) and can be influenced by factors such as hydrostatic pressure gradient, fluid characteristics, and muscle contraction. It is known that factors such as the viscosity of the luminal fluid and the contractility of the epididymal duct are controlled by the action of androgens (Sujarit e Pholpramool, 1985). Studies have shown that various toxic compounds accelerate the transit time of sperm in the epididymis, and this was associated with low concentrations of testosterone (Klinefelter and Suarez, 1997; Goyal et al., 2001; Fernandez et al., 2008). In the present study, the mean concentration of serum testosterone was not different between treated and control animals, which may have contributed to the maintenance of transit time. The unchanged concentration of testosterone also influenced the results obtained for the weights of reproductive organs

in treated and control animals considering that they are dependent on androgens (Dohle et al., 2003).

One of the results of maintaining the transit time in the epididymis of animals treated with arsenic was that there was no change in the number of sperm present in the cauda region. This fact suggests that the testicular changes probably occurred early on and that there was insufficient time for the small number of sperm produced in the testis and directed to the caput/corpus of the epididymis to arrive in the cauda. Furthermore, it is important to consider that the cauda has the characteristic of storing sperm from several cycles of the seminiferous epithelium (Sullivan et al., 2005), which may influence the result of sperm counts.

Moreover, the maintaining of the transit time contributed to the satisfactory percentage of sperm with normal morphology (CBRA, 1998) and obtaining similar results for sperm motility parameters between experimental groups. A significant reduction in the percentage of sperm motility and normal sperm morphology have been reported in mice exposed to 35 days of sodium arsenite concentrations greater than those tested in this study (Chang et al., 2007; Ferreira et al., 2012) or in a prolonged time using 4 mg/L (Pant et al., 2004). There were no studies testing sodium arsenate for those parameters. In relation to the sperm pathologies observed in animals treated with arsenic in this study, the presence of proximal or distal cytoplasmic droplets, serving as an indication that the transit time was not affected, was not observed.

The tissue organization of tubular and intertubular components did not change with the administration of the two chemical forms of arsenic, independent of concentration, for 56 days. Ferreira et al. (2012) did not find disorders in the epididymis of mice treated with 7.5 mg/kg body weight sodium arsenite. However, some histomorphometric parameters changed with the treatment with sodium arsenate and arsenite in a variable form and was observed to be region-specific. The initial segment of animals treated with 10 mg/L of sodium arsenate and 0.01 mg/L of sodium arsenite showed an increase in luminal diameter, which was compensated by a decrease in epithelial height, maintaining a normal tubular diameter compared to the control group. There was a reduction in the epithelium height in the initial segment in all treated animals, but that was not reflected in the percentage of epithelium. It is known that epithelial height may reflect the epithelial absorptive and secretory activity of the cells as a result of the functional activity of the organelles (Hermo and Robaire, 2002). The cauda region also showed morphological changes under the influence of 0.01 mg/L of sodium arsenite, which negatively influenced the luminal diameter in this region, and of

10 mg/L of sodium arsenate, which caused a reduction of the tubular diameter and epithelial height, when compared with control animals. This reduction in tubular diameter, however, did not increase the percentage of connective tissue, thus contributing to the maintenance of tissue architecture in the epididymal cauda.

The absence of changes in the volumes of tissue components supports most of the qualitative histological findings of epididymal parenchyma. The percentage of epithelium was altered in the caput in different ways by arsenite and arsenate, but the results did not influence the values obtained for the epithelium height. The percentage of lamina propria in all regions, except the corpus, decreased depending on the concentration and the arsenic compound. In the corpus region, only the percentage of sperm without lumen in animals exposed to 10 mg/L of sodium arsenate was increased when compared with arsenite at the same concentration. It is possible that this finding is related to the decrease in the number of sperm in the caput/corpus regions.

The findings of this study show that 10 mg/L of arsenic, regardless of its form, influenced testicular and epididymal parameters when administered orally for 56 days. Furthermore, it appears that arsenite is more toxic since the concentration of 0.01 mg/L caused changes similar to those observed for a concentration that is 1,000 times higher. Regarding sodium arsenate, experimental studies have shown that most of it is rapidly reduced to arsenite in the blood. This reaction of biotransformation functions as the bioactivation route of arsenate (Vahter, 2002). Therefore, the toxicity of arsenate is probably due to its conversion to arsenite, which is then methylated in the liver (Jomova et al., 2011).

Studies evaluating the effects of sodium arsenate on reproductive parameters are scarce, mainly for the analysis of the epididymis. It is important to note that animals treated with sodium arsenate at 0.01 mg/L showed a reduced number of spermatids and sperm in the caput/corpus regions when those parameters were evaluated per gram of testis and epididymis, respectively. The average absolute weight of the organs in these animals was greater than that observed for the other experimental groups and probably influenced the calculation of these parameters per gram of organ. This result may indicate that functional alterations in the testis, such as a higher production of testicular fluid, which consequently increases in volume in the epididymis, influences its weight. The result of this increased fluid production is the highest dilution of spermatids in the testis and sperm in the caput/corpus of the epididymis, causing a reduction in the number of these cells. We suggest further studies to evaluate the effects of the oral administration of 0.01 mg/L of arsenate on testicular parameters and to extend the time

period of treatment to diagnose possible complications for spermatogenesis and fertility. Most importantly, both inorganic arsenic compounds tested here are found in drinking water from various countries (Tian et al., 2001; Frisbie et al., 2002), causing bioaccumulation in various organs in low concentrations (Cui and Okayasu, 2008). Therefore, this study draws attention to the potential harm of those compounds at low concentrations to male fertility, without causing toxicity to the animal.

In conclusion, it is suggested that sodium arsenite causes damage to reproductive parameters, such as epididymal histomorphometry, daily sperm production and the number of testicular spermatids and sperm in the caput/corpus of the epididymis, when animals are exposed to arsenic in drinking water for 56 days. Sodium arsenate also exerts a negative effect on those parameters at a concentration of 10 mg/L, and its damage is not evident when administered for 56 days at a concentration of 0.01 mg/L. Therefore, the presence of arsenic as a contaminant in water used for human consumption shows a potential causative agent for male subfertility in Wistar rats, exposed during one cycle of the seminiferous epithelium.

Acknowledgments

Authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado Minas Gerais (FAPEMIG) for their financial support.

References

Bloom MS, Fitzgerald EF, Kim K, Neamtii I, Gurzau ES. Spontaneous pregnancy loss in humans and exposure to arsenic in drinking water. *Int J Hyg Environ Health* 2010; 213: 401-13.

Brazil. Resolution No. 357, of March 17, 2005. Provides for the classification and environmental guidelines for the classification of bodies of surface water, as well as establishes the conditions and standards for effluent discharge. Published in the Official Gazette (May 18, 2005).

Celik I, Gallicchio L, Boyd K, Lam TK, Matanoski G, Tao X, et al. Arsenic in drinking water and lung cancer: A systematic review. *Environ Health* 2008; 108: 48-5.

Chang SI, Jin B, Youn P, Park C, Park JD, Ryu DY. Arsenic-induced toxicity and protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 218: 196-03.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2 ed. Belo Horizonte: CBRA; 1998.

Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 2009; 15: 213–27.

Cui X, Okayasu R. Arsenic accumulation, elimination, and interaction with copper, zinc and manganese in liver and kidney of rats. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 3646-50.

Dohle GR, Smith M, Weber RFA. Androgens and male infertility. *World J Urol* 2003; 21: 341–5.

Fernandez CDB, Porto EM, Arena AC, Kempinas WG. Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. *Int J Androl* 2008; 31: 427–37.

Ferreira M, Matos RC, Oliveira H, Nunes B, Pereira ML. Impairment of mice spermatogenesis by sodium arsenite. *Hum Exp Toxicol* 2012; 31: 290-02.

França LR, Russell LD. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia F, Regadera J, editors. *Male reproduction – multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Communications; 1998, p. 197-219.

França LR, Avelar GF, Almeida FFL. Spermatogenesis and transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 2005; 63: 300-18, 2005.

Frisbie SH, Ortega R, Maynard DM, Sarkar B. The concentrations of arsenic and others elements in Bangladesh’s drinking water. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 1147-53.

Gatti JL, Castella S, Dacheux F, Ecruyd H, Métayer S, Thimon V, et al. Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83: 321-39.

Goyal HO, Braden TD, Mansour M, Willians CS, Kamaledin A, Srivastava KK. Diethylstilbestrol-treated adult rats with altered epididymal sperm numbers and sperm motility parameters, but without alterations in sperm production and sperm morphology. *Biol Reprod* 2001; 64: 927–34.

Hansen LA, Dacheux F, Man SY, Clulow J, Jones RC. Fluid reabsorption by the ductuli efferents testis of the rats is dependent on both sodium and chlorine. *Biol Reprod* 2004; 71: 410-6.

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

Hong Y, Piao FY, Zhao YF, Li S, Wang YY, Liu P. Subchronic exposure to arsenic decrease *Sdha* expression in the brain of mice. *Neurotoxicology* 2009; 30: 538-43.

Hughes MF. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett* 2002; 133: 1-16.

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

Jomova K, Jenisova Z, Feszterova M, Baros S, Liska J, Hudecova D, et al. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J Appl Toxicol* 2011; 31: 95-07.

Klinefelter GR, Suarez JD. Toxicant-induced acceleration of epididymal sperm transit: androgen-dependent proteins may be involved. *Reprod Toxicol* 1997; 11: 511–9.

Naranmandura H, Suzuki N, Iwata K, Hirano S, Suzuki KT. Arsenic metabolism and thioarsenicals in hamsters and rats. *Chem Res Toxicol* 2007; 20: 616-24.

Neves RNP, Carvalho F, Carvalho M, Fernandes E, Soares E, Bastos ML, et al. Protective activity of hesperidin and lipoic acid against sodium arsenite acute toxicity in mice. *Toxicol Pathol* 2004; 32: 527-35.

Orloff K, Mistry K, Metcalf S. Biomonitoring for environmental exposures to arsenic. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2009; 12: 509-524.

Pant N, Kumar R, Murthy RC, Srivastava SP. Male reproductive effect of arsenic in mice. *Biometals* 2001; 14: 113-17.

Pant N, Murthy RC, Srivastava SP. Male reproductive toxicity of sodium arsenite in mice. *Hum Exp Toxicol* 2004; 32: 399-03.

Reddy PS, Rani GP, Sainath SB, Meena R, Supriya CH. Protective effects of N-acetylcysteine against arsenic-induced oxidative stress and reprotoxicity in male mice. *J Trace Elem Med Biol* 2011; 4: 247-53.

Robaire B, Hinton BT, Orgebin-Crist MC. The Epididymis. In: Neill JD, editor. *Physiology of Reproduction*. USA: Elsevier Inc; 2006, p.1071-1148.

Robb GW, Amman RP, Killian GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil* 1978; 54: 103-7.

Sarkar M, Chaudhuri GR, Chattopadhyay A, Biswas NM. Effect of sodium arsenite on spermatogenesis, plasma gonadotrophins and testosterone in rats. *Asian J Androl* 2003; 5: 27-1.

Simeonova PP, Luster MI. Arsenic and atherosclerosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 198: 444-49.

Sujarit S, Pholpramool C. Enhancement of sperm transport through the rat epididymis after castration. *J Reprod Fertil* 1985; 74: 497–502.

Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis* 2005; 35: 1-10.

Tian D, Ma H, Feng Z, Xia Y, Le XC, Ni z, et al. Micronuclei analysis in human exfoliated epithelia from the residents chronically exposed to arsenic via drinking water in Inner Mongolia China. J Toxicol Environ Health A 2001; 64: 473-84.

Vahter M. Mechanisms of arsenic biotransformation. Toxicol 2002; 18: 211-17.

World Health Organization - Who. Guidelines for drinking water quality. 4th ed. Geneva; 2011. p. 315-18.

Efeitos de diferentes concentrações de arsênio na histomorfometria testicular e nas concentrações de enzimas antioxidantes

Ana Cláudia Ferreira Souza^a, Sarah Cozzer Marchesi^a, Graziela Domingues de Almeida Lima^a, Rafael Penha Ferraz^a, Sérgio Luis Pinto da Matta^a, Mariana Machado Neves^{a*}

^aLaboratório de Biologia Estrutural, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, UFV – Viçosa/MG, Brasil

*Autor correspondente: Laboratório de Biologia Estrutural, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, s/n, Campus Universitário, 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Tel.: + 55 31 3899 3360; Fax: + 55 31 3899 2549. E-mail: mariana.mneves@ufv.br (M. M. Neves).

Resumo

A exposição ao arsênio na água de beber tem sido documentada em muitos países do mundo e é considerada uma significativa ameaça para a saúde das pessoas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto deste elemento em parâmetros enzimáticos e histomorfométricos testiculares, pela exposição oral a diferentes concentrações de dois compostos inorgânicos. Ratos Wistar machos receberam 0,01 mg/L e 10 mg/L de arsênio, como arsenato e arsenito de sódio, diariamente na água de beber por 56 dias. Os animais tratados com arsênio, principalmente com arsenito de sódio, apresentaram redução no percentual de epitélio seminífero e na proporção e volume das células de Leydig. Além disso, observou-se aumento nas proporções de túnica própria, lúmen, espaço linfático, vasos sanguíneos e macrófagos. A atividade de SOD não sofreu alteração frente à exposição ao arsênio. No entanto, a atividade CAT reduziu em animais tratados. Adicionalmente, o arsenato e o arsenito de sódio administrados na maior concentração, causaram vacuolização na base do epitélio seminífero em alguns túbulos. Em conclusão, a exposição ao arsênio causou alteração no sistema de defesa antioxidante testicular e mudanças iniciais no epitélio seminífero, que podem causar danos ao testículo e a fertilidade em ratos Wistar.

Palavras-chave: Arsenato, arsenito, testículo, morfometria, estresse oxidativo, microscopia de luz.

1. Introdução

Metais pesados, tais como o arsênio, são uma importante ameaça para a saúde das pessoas (Rudy, 2009). A exposição ao arsenato pentavalente e ao arsenito trivalente inorgânicos, via água de beber, tem sido reportada em muitos países do mundo, incluindo Bangladesh, China, Chile, Índia, México, Estados Unidos e Brasil (Tian et al., 2001; Frisbie et al., 2002; Hughes, 2002; Jana et al., 2006; Figueiredo et al. 2007). Os dois compostos são solúveis em água e facilmente absorvidos nas porções gastrointestinais do aparelho digestório. No organismo, eles são biotransformados em metabólitos, como o ácido monometilarsônico e o dimetilarsínico, que são, em sua maioria, eliminados pelas fezes e urina (Cui et al., 2004; Chen et al., 2011). No entanto, uma parte destes compostos pode se acumular em vários órgãos, tais como pulmão, rins, fígado, baço e cérebro (Vahter, 2002), mesmo quando presentes em baixas concentrações na água de beber usada para consumo humano (Cui e Okayasu, 2008).

Estudos mostram que exposições agudas ao arsênio podem causar náusea, vômito, dor abdominal, encefalopatia e neuropatia, enquanto que exposições crônicas induzem a diversos tipos de neoplasias e desordens metabólicas, como diabetes (Ratnaike, 2003; Reddy et al., 2011). Recentemente, alguns trabalhos sinalizaram que a exposição ao arsênio também pode estar associada com a toxicidade reprodutiva em machos (Pant et al., 2004; Xu et al., 2012).

Os compostos de arsênio mais tóxicos são aqueles em estado de oxidação trivalente (arsenito), por reagirem com compostos contendo enxofre, ou seja, grupos sulfidrilas de moléculas orgânicas (Hughes et al., 2011). Ferreira et al. (2012), avaliando os efeitos deste composto inorgânico sobre o aparelho reprodutor masculino, observaram redução no diâmetro dos túbulos seminíferos e alterações histopatológicas, como despreendimento de células germinativas imaturas, em camundongos expostos a 7,5 mg/kg/PC de arsenito de sódio na água de beber por 35 dias. Pant et al. (2001) também observaram acúmulo significativo de arsênio nos testículos e órgãos sexuais acessórios em camundongos tratados oralmente com diferentes concentrações de arsenito de sódio pelo mesmo período. Em estudos sobre os efeitos do arsenato de sódio em machos, Carvalho (2009) e Mata (2009) observaram redução no peso testicular, no diâmetro tubular, na altura do epitélio seminífero e nas concentrações séricas de testosterona após exposição crônica.

Embora seja bem conhecido que o arsênio em altas concentrações na água de beber está associado a efeitos deletérios testiculares e redução da fertilidade, poucos estudos têm quantificado alterações histológicas causadas pela exposição ao arsenito e arsenato de sódio. Sabe-se que a concentração máxima tolerada de arsênio presente na água de beber é de 0,01 mg/L (WHO, 2011), porém ainda não foi avaliado seu efeito sobre órgãos reprodutivos masculinos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi comparar os efeitos da exposição crônica ao arsênio, nas formas químicas de arsenato e arsenito de sódio, sobre parâmetros histomorfométricos e enzimáticos testiculares.

2. Material e Métodos

2.1 Animais

Ratos machos adultos (n = 30, 70 dias de idade, 210 - 265 g) da variedade Wistar, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV), foram pesados em balança de precisão (0,01 g, AS500C, Marte[®]) e colocados em gaiolas individuais sob fotoperíodo (12-12h claro/escuro) e temperatura (21°C) controlados. A oferta de ração foi controlada, sendo fornecido 25 g/ dia de ração comercial para ratos (Nuvilab), enquanto a água de beber foi utilizada como via de administração para os tratamentos. Todos os procedimentos executados foram previamente aprovados na Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFV sob o número de protocolo 19/2011.

2.2 Delineamento experimental

Os ratos foram randomicamente divididos em cinco grupos experimentais (n = 6 animais/grupo). Os animais controle beberam solução salina (NaCl 0,9%), enquanto os animais tratados foram oralmente expostos ao arsênio nas formas químicas de arsenato ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Sigma Aldrich Co., St Louis, MO) e arsenito de sódio (AsNaO_2 ; Sigma Aldrich Co., St Louis, MO). Testou-se, para cada forma química, as concentrações de 0,01 mg/L e 10 mg/L fornecidas em volume diário de 30 mL por 56 dias, tempo que contempla um ciclo do epitélio seminífero (Russell et al., 1990).

Ao final do tratamento, os animais foram pesados e eutanasiados, sendo primeiramente sedados com cloridrato de xilazina (10 mg/kg/intraperitoneal) e logo

após anestesiados com cloridrato de quetamina (150 mg/kg/intraperitoneal). Os testículos foram removidos, dissecados e pesados, sendo os testículos direitos utilizados para processamento histológico, enquanto os esquerdos congelados para realização de análises enzimáticas.

2.3 Processamento histológico do testículo para microscopia de luz

Os testículos foram fixados em solução Karnovsky por 24 horas, sendo posteriormente retirada a albugínea para pesagem e obtenção do peso do parênquima testicular, a partir da subtração entre o peso testicular e o peso da albugínea. O testículo foi então cortado, sendo seus fragmentos desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, absoluto), com trocas a cada 30 minutos, e incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin[®], Leica). Foram obtidos cortes histológicos semi seriados de 3µm de espessura em micrótomo rotativo (RM 2255, Leica), utilizando navalha de vidro, que foram corados com azul de toluidina-borato de sódio 1%. A avaliação histológica qualitativa da arquitetura tecidual foi feita em microscópio óptico Olympus CX 40 nos aumentos de 100, 200 e 400x.

2.4 Morfometria testicular

Com base nos pesos corporais e testiculares, foi obtido o índice gonadossomático (IGS), que é a proporção do peso corporal representado pelos testículos, calculado a partir da seguinte fórmula: $IGS = (\text{peso total das gônadas} / \text{peso corporal}) \times 100$ (Amann, 1970).

Para a avaliação morfométrica, imagens digitais do parênquima testicular foram obtidas em fotomicroscópio Olympus BX-53 e analisadas com o auxílio do software Image-Pro Plus[®] (v. 4.0 – Media Cybernetics). As densidades volumétricas dos compartimentos testiculares, tubular e intertubular, foram obtidas utilizando-se uma grade contendo 266 pontos projetados sobre imagens digitalizadas (100x) do parênquima testicular, totalizando 2660 pontos por animal. Foram registrados pontos coincidentes sobre túbulo seminífero (túnica própria, epitélio e lúmen) e intertúbulo e, em seguida, calculado o percentual de pontos sobre cada componente utilizando-se a fórmula: $\text{Proporção volumétrica (\%)} = (\text{número de pontos encontrados para o túbulo ou intertúbulo} / 2660 \text{ pontos totais}) \times 100$. O volume de cada componente testicular, expresso em mL, foi estimado multiplicando a proporção volumétrica de cada

componente pelo volume do parênquima de 1 testículo, dividido por 100. 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 mililitros (Johnson e Neaves, 1981; Tae et al., 2005).

Com base nos volumes de túbulos seminíferos e nos pesos corporais, foi calculado o índice tubulossomático (ITS), que é a proporção do peso corporal alocado em túbulos seminíferos, a partir da fórmula: $ITS = (\text{volume de túbulo seminífero} / \text{massa corporal}) \times 100$ (Amann, 1970).

O diâmetro tubular médio de cada animal foi obtido a partir da medida, ao acaso, de 30 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível, não levando em consideração o estágio do ciclo do epitélio seminífero. As mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foram usadas na mensuração do diâmetro luminal e da altura do epitélio seminífero, compreendida da túnica própria ao lúmen tubular. O valor encontrado para altura do epitélio, em cada túbulo, representa a média de duas medidas diametralmente opostas.

O comprimento total dos túbulos seminíferos, expresso em metros, foi obtido dividindo-se o volume total dos túbulos seminíferos pelo raio ao quadrado do túbulo multiplicado pelo valor de π (Attal e Courat, 1963). Este valor foi expresso por testículo e por grama de testículo.

A proporção volumétrica entre os componentes intertubulares foi obtida a partir da contagem de 1000 pontos projetados sobre imagens da região do intertúbulo, ao acaso, nos diferentes cortes histológicos do testículo de cada animal. As imagens foram adquiridas com aumento de 400X e foram considerados os seguintes elementos do intertúbulo: núcleo e citoplasma de Leydig, vasos sanguíneos, espaço linfático, macrófago e tecido conjuntivo. Para cálculo desta proporção utilizou-se a seguinte fórmula: $\text{Proporção volumétrica do elemento no intertúbulo} = \text{número de pontos do componente do intertúbulo} \times 100 / 1000 \text{ pontos totais}$. Para calcular a relação nucleoplasmática das células de Leydig, dividiu-se o percentual ocupado pelo núcleo pelo percentual ocupado por citoplasma. O volume (mL) de cada componente do intertúbulo por testículo foi calculado a partir da proporção do elemento no testículo / $(100 \times \text{massa do parênquima de um testículo})$.

O diâmetro nuclear médio das células de Leydig foi mensurado utilizando imagens capturadas com objetiva de 40X. Trinta núcleos de células de Leydig foram medidos em cada animal, utilizando-se o programa de análise de imagens (Image-Pro

Plus[®], v. 4.0), escolhendo-se os núcleos que apresentavam contorno esférico, cromatina perinuclear e nucléolos evidentes.

Foram calculados os volumes nuclear, citoplasmático e de cada célula de Leydig por animal aplicando-se as fórmulas abaixo:

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

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

Volume celular = volume nuclear + volume citoplasmático.

Obtido o volume individual da célula de Leydig, foi calculado o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo de cada animal conforme as fórmulas seguintes:

- Número de células de Leydig por testículo = volume que as células de Leydig ocupam por testículo (μm^3) / volume de uma célula de Leydig (μm^3).

- Número de células de Leydig por grama de testículo = volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo (μm^3) / volume de uma célula de Leydig (μm^3). Onde:

- Volume que a célula de Leydig ocupa por testículo = (proporção da célula de Leydig no testículo x massa do parênquima de um testículo) / 100.

- Volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo = volume que a célula de Leydig ocupa por testículo / massa bruta de um testículo.

Para se quantificar a proporção de células de Leydig, em relação à massa corporal, foi calculado o índice Leydigossomático (ILS), conforme a fórmula: ILS = volume que a célula de Leydig ocupa nos testículos / peso corporal x 100.

2.5 Determinação da concentração sérica de testosterona

Durante a anestesia, realizou-se a coleta do sangue por meio de punção cardíaca. O sangue foi centrifugado a 419 x g por 15 minutos para a obtenção do soro, que foi armazenado em microtubos e congelado a -20 °C. A quantificação da testosterona sérica foi feita pelo método da quimioluminescência utilizando kit Access Testosterone REF 33560, próprio para o equipamento Access 2. Os resultados foram expressos em ng/mL.

2.6 Análises enzimáticas

Para a análise das atividades da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), amostras de 100 mg de testículo foram homogeneizadas (homogeneizador Tissue

Master 125, OMNI) em tampão fosfato. Posteriormente, adicionou-se Triton x100 nas amostras nas quais a atividade da CAT seria analisada. As amostras homogeneizadas foram então centrifugadas (centrífuga Heraeus Fresco 17, Thermo Scientific) a 5000 rpm a 4°C por 10 minutos, sendo o sobrenadante utilizado para análise da SOD e CAT. A atividade da SOD foi avaliada segundo metodologia de Dieterich et al. (2000) e da CAT avaliada pelo método de Cohen et al. (1970), pela mensuração da taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Os resultados foram expressos em nmol g⁻¹.

2.7 Análises estatísticas

Os resultados obtidos a partir das avaliações quantitativas foram submetidos a análise de variância (ANOVA), sendo suas médias comparadas pelo teste de Student Newman Keuls. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão.

3. Resultados

3.1 Biometria corporal e testicular

Parâmetros referentes ao peso corporal, biometria testicular e IGS (Tabela 1) não apresentaram diferenças entre os animais do grupo controle e aqueles que receberam oralmente arsenato e arsenito de sódio, nas duas concentrações ($P > 0,05$).

Tabela 1

Parâmetros biométricos de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de arsenato e arsenito de sódio.

	Controle	0,01 mg/L arsenato	10 mg/L arsenato	0,01 mg/L arsenito	10 mg/L arsenito
Peso corporal (g)	398,30 \pm 10,96	411,58 \pm 13,34	396,58 \pm 8,59	409,85 \pm 9,21	403,60 \pm 10,00
Peso testículo (g)	1,75 \pm 0,05	1,95 \pm 0,02	1,85 \pm 0,05	1,89 \pm 0,06	1,72 \pm 0,19
Peso albugínea (g)	0,07 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,08 \pm 0,03	0,08 \pm 0,01
Peso parênquima (g)	1,68 \pm 0,04	1,88 \pm 0,02	1,77 \pm 0,06	1,81 \pm 0,07	1,64 \pm 0,18
IGS (%)	0,88 \pm 0,03	0,95 \pm 0,03	0,93 \pm 0,04	0,92 \pm 0,04	0,85 \pm 0,08

Média \pm erro padrão. $P > 0,05$. IGS: índice gonadossomático.

3.2 Avaliação histológica do parênquima testicular

As secções testiculares dos animais controle e tratados com arsênio apresentaram túbulos seminíferos contendo epitélio composto por células de Sertoli, células germinativas em diferentes estádios de desenvolvimento (espermatogônias, espermatócitos, espermátides arredondadas e alongadas) e lúmen repleto de espermatozoides (Fig. 1 A-F). Os animais que receberam 10 mg/L de arsenato e arsenito de sódio apresentaram vacuolizações na base do epitélio em alguns túbulos seminíferos (Fig. 2 A-B), sendo as vacuolizações dos animais que receberam 10 mg/L de arsenito mais proeminentes. No entanto, independente do grupo experimental, os animais não apresentaram desprendimento de células germinativas imaturas, células aberrantes multinucleadas ou áreas de necrose no epitélio seminífero.

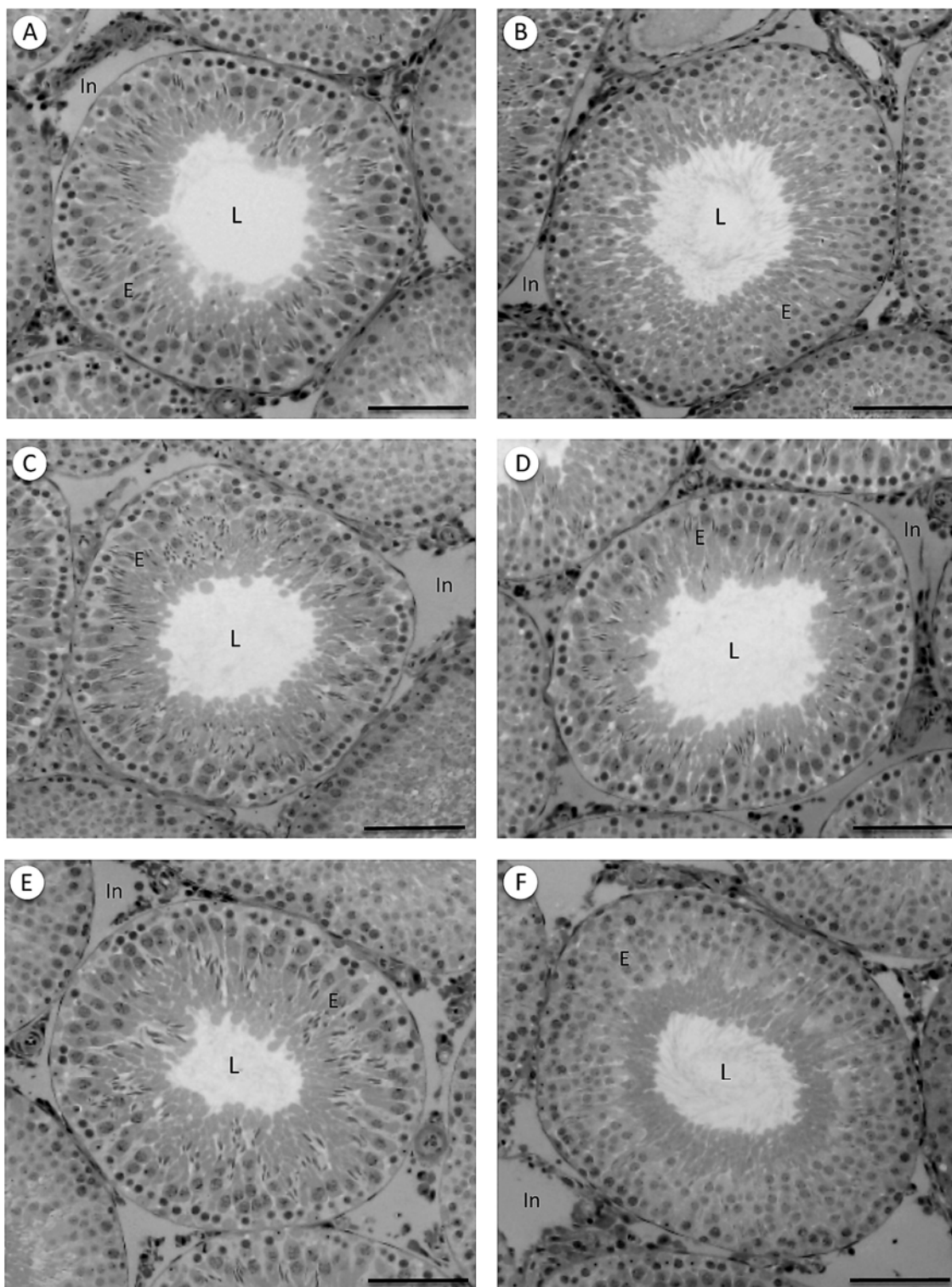


Fig. 1. Secções histológicas do testículo de ratos Wistar tratados com diferentes concentrações de arsenato e arsenito de sódio. A e B: controle; C: 0,01 mg/L de arsenato de sódio; D: 10 mg/L de arsenato de sódio; E: 0,01 mg/L de arsenito de sódio e F: 10 mg/L de arsenito de sódio. E = Epitélio, L = Lúmen, In = Intertúbulo. Azul de Toluidina. Barra = 100 µm.

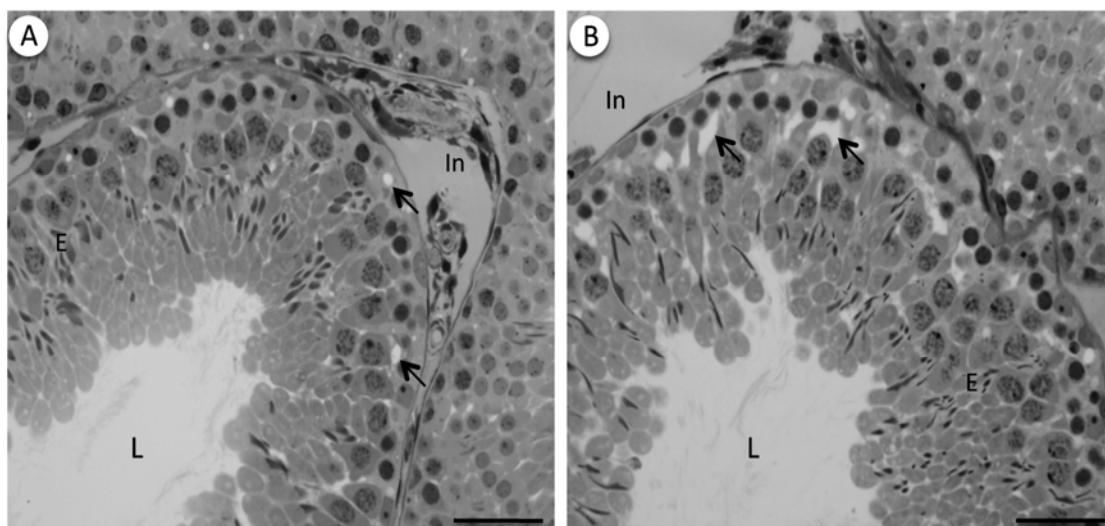


Fig. 2. Secções histológicas do testículo de ratos Wistar tratados com 10 mg/L de arsenato e arsenito de sódio. A: arsenato de sódio; B: arsenito de sódio. E = Epitélio, L = Lúmen, In = Intertúbulo, seta = vacúolos. Azul de Toluidina. Barra = 40 μ m.

3.3 Morfometria testicular

O percentual de epitélio seminífero apresentou-se reduzido em animais tratados com 10 mg/L de arsenito de sódio, quando comparados aos animais controle (Tabela 2). A administração oral de 10 mg/L de arsenito de sódio aumentou o percentual de túnica própria, assim como em animais que receberam 0,01 mg/L de arsenato, quando comparados aos animais que receberam 10 mg/L de arsenato de sódio ($P < 0,05$). Animais tratados com arsenito de sódio, nas duas concentrações, apresentaram maior proporção de lúmen que animais controle e tratados com 0,01 mg/L de arsenato de sódio ($P < 0,05$). A proporção de túbulos seminíferos e intertúbulo não foram alteradas, assim como os volumes tubulares e intertubulares e o índice tubulossomático ($P > 0,05$).

Tabela 2

Proporção volumétrica e volume dos compartimentos tubular e intertubular, e índice tubulossomático (ITS) de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de arsenato e arsenito de sódio.

	Controle	0,01 mg/L arsenato	10 mg/L arsenato	0,01 mg/L arsenito	10 mg/L arsenito
Epitélio (%)	65,49 ± 1,50 ^a	62,57 ± 2,00 ^{ab}	61,07 ± 0,96 ^{ab}	61,97 ± 1,18 ^{ab}	58,86 ± 1,14 ^b
Túnica própria (%)	3,93 ± 0,19 ^{ab}	4,26 ± 0,15 ^a	3,47 ± 0,10 ^b	3,71 ± 0,07 ^{ab}	4,28 ± 0,26 ^a
Lúmen (%)	20,75 ± 1,24 ^a	20,05 ± 0,36 ^a	23,79 ± 1,37 ^{ab}	25,91 ± 1,43 ^b	27,02 ± 0,86 ^b
Túbulo (%)	90,17 ± 0,74	86,88 ± 2,08	88,33 ± 0,93	91,59 ± 0,83	90,16 ± 1,44
Intertúbulo (%)	9,83 ± 0,74	13,12 ± 2,08	11,67 ± 0,93	8,41 ± 0,83	9,84 ± 1,44
Volume tubular (mL)	3,03 ± 0,08	3,27 ± 0,08	3,12 ± 0,08	3,31 ± 0,14	2,97 ± 0,35
Volume intertubular (mL)	0,33 ± 0,03	0,50 ± 0,08	0,42 ± 0,04	0,30 ± 0,03	0,31 ± 0,04
ITS (%)	0,76 ± 0,03	0,80 ± 0,03	0,79 ± 0,03	0,81 ± 0,03	0,73 ± 0,08

Média ± erro padrão. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha são diferentes entre si (p < 0,05) pelo teste de Student Newman Keuls.

Os diâmetros tubulares e luminais, assim como o comprimento total do túbulo seminífero e o comprimento total dos túbulo seminíferos por grama de testículo, não se alteraram entre os grupos experimentais. No entanto, a altura do epitélio dos animais que receberam 0,01 mg/L de arsenato foi significativamente maior que aqueles do grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3

Morfometria tubular, comprimento total dos túbulo seminíferos (CTT) e comprimento total dos túbulo seminíferos por grama de testículo (CTT/g) em ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de arsenato e arsenito de sódio.

	Controle	0,01 mg/L arsenato	10 mg/L arsenato	0,01 mg/L arsenito	10 mg/L arsenito
Diâmetro tubular (µm)	314,59 ± 3,49	314,82 ± 14,24	318,51 ± 4,87	324,68 ± 7,86	321,21 ± 4,87
Altura do epitélio (µm)	96,36 ± 3,62 ^a	107,34 ± 2,82 ^b	103,48 ± 2,96 ^{ab}	107,45 ± 1,98 ^{ab}	102,81 ± 1,15 ^{ab}
Diâmetro luminal (µm)	121,86 ± 5,13	100,14 ± 12,41	111,55 ± 7,53	109,77 ± 4,38	115,59 ± 4,56
CTT (m)	39,11 ± 1,65	43,13 ± 4,23	39,30 ± 1,34	39,98 ± 0,74	37,11 ± 5,10
CTT/g (m/g)	11,15 ± 0,22	11,06 ± 1,08	10,66 ± 0,31	10,64 ± 0,47	10,65 ± 0,48

Média ± erro padrão. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha são diferentes entre si (p < 0,05) pelo teste de Student Newman Keuls.

No intertúbulo, o percentual de espaço linfático foi maior nos animais tratados com as duas concentrações de arsenito e com 10 mg/L de arsenato de sódio, quando comparado aos animais controle e aqueles que receberam 0,01 mg/L de arsenato (P <

0,05). Aumento também foi encontrado para o percentual de macrófagos nos animais que receberam arsenato, nas duas concentrações, e 10 mg/L de arsenito em relação aos animais controle ($P < 0,05$). Animais do grupo tratado com 0,01 mg/L de arsenito apresentaram maior percentual de vasos sanguíneos que os do controle e menor percentual de tecido conjuntivo em relação ao grupo que recebeu a mesma concentração de arsenato ($P < 0,05$). Em relação as células de Leydig, houve redução na sua proporção em todos os animais que receberam arsênio, sendo esta redução mais significativa nos animais tratados com arsenito e 10 mg/L de arsenato de sódio ($P < 0,05$; Tabela 4).

Tabela 4

Proporção volumétrica (%) dos elementos no intertúbulo de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de arsenato e arsenito de sódio.

	Controle	0,01 mg/L arsenato	10 mg/L arsenato	0,01 mg/L arsenito	10 mg/L arsenito
Tecido conjuntivo	4,02 ± 0,25 ^{ab}	4,28 ± 0,24 ^a	3,72 ± 0,36 ^{ab}	2,84 ± 0,36 ^b	3,16 ± 0,27 ^{ab}
Espaço linfático	55,28 ± 1,09 ^a	56,18 ± 0,72 ^a	61,72 ± 0,92 ^b	61,46 ± 1,45 ^b	60,70 ± 1,13 ^b
Vaso sanguíneo	8,94 ± 0,32 ^a	11,64 ± 1,02 ^{ab}	10,64 ± 0,72 ^{ab}	13,36 ± 0,75 ^b	11,40 ± 0,66 ^{ab}
Macrófago	1,28 ± 0,09 ^a	1,92 ± 0,22 ^{bc}	2,42 ± 0,19 ^{cd}	1,52 ± 0,06 ^{ab}	2,34 ± 0,06 ^d
Célula de Leydig	30,48 ± 0,91 ^a	25,98 ± 0,89 ^b	21,50 ± 0,77 ^c	20,84 ± 1,32 ^c	22,40 ± 0,93 ^c

Média ± erro padrão. ^{a,b,c,d} Letras diferentes na mesma linha são diferentes entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Student Newman Keuls.

O volume dos componentes do intertúbulo também se alterou frente ao tratamento com arsênio (Tabela 5). Observou-se aumento no volume do tecido conjuntivo em animais que receberam 0,01 mg/L de arsenato, em relação aos animais dos demais grupos analisados, bem como aumento no volume de vasos sanguíneos em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). O volume de macrófagos também aumentou nos animais expostos ao arsenato de sódio em relação ao controle ($P < 0,05$). Já o volume das células de Leydig sofreu redução nos animais tratados com arsenito nas duas concentrações, quando comparado aos animais tratados com 0,01 mg/L de arsenato ($P < 0,05$). Os demais componentes avaliados não apresentaram diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$).

Tabela 5

Volume (mL) dos elementos do intertúbulo por testículo de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de arsenato e arsenito de sódio.

	Controle	0,01 mg/L arsenato	10 mg/L arsenato	0,01 mg/L arsenito	10 mg/L arsenito
Tecido conjuntivo	0,013 ± 0,001 ^a	0,021 ± 0,004 ^b	0,015 ± 0,001 ^a	0,009 ± 0,002 ^a	0,010 ± 0,002 ^a
Espaço linfático	0,184 ± 0,018	0,276 ± 0,042	0,258 ± 0,031	0,185 ± 0,015	0,190 ± 0,028
Vaso sanguíneo	0,029 ± 0,002 ^a	0,059 ± 0,014 ^b	0,043 ± 0,003 ^{ab}	0,041 ± 0,005 ^{ab}	0,035 ± 0,004 ^{ab}
Macrófago	0,004 ± 0,000 ^a	0,010 ± 0,002 ^b	0,010 ± 0,001 ^b	0,005 ± 0,001 ^a	0,007 ± 0,001 ^{ab}
Célula de Leydig	0,101 ± 0,009 ^{ab}	0,128 ± 0,021 ^a	0,090 ± 0,010 ^{ab}	0,064 ± 0,009 ^b	0,070 ± 0,010 ^b

Média ± erro padrão. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha são diferentes entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Student Newman Keuls.

Nas análises morfométricas das células de Leydig observou-se diminuição no percentual de citoplasma em todos os animais expostos ao arsênio, sendo aqueles tratados com arsenito e 10 mg/L de arsenato de sódio os que apresentaram as maiores reduções ($P < 0,05$). Redução também foi encontrada no volume do citoplasma de Leydig nos animais tratados com arsenito, nas duas concentrações, e com 10 mg/L de arsenato, comparados aos animais controle ($P < 0,05$). No entanto, o volume da célula de Leydig diminuiu apenas no grupo que recebeu 10 mg/L de arsenito, comparado ao controle ($P < 0,05$). O ILS também apresentou redução nos grupos que receberam arsenito, em relação ao grupo tratado com 0,01 mg/L de arsenato ($P < 0,05$). Já a relação nucleoplasmática mostrou-se aumentada em todos os animais tratados em relação ao controle ($P < 0,05$). Os outros parâmetros analisados não se alteraram frente aos tratamentos com arsenato e arsenito de sódio, independente da concentração ($P > 0,05$; Tabela 6).

Tabela 6

Morfometria das células de Leydig de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de arsenato e arsenito de sódio.

	Controle	0,01 mg/L arsenato	10 mg/L arsenato	0,01 mg/L arsenito	10 mg/L arsenito
Diâmetro nuclear (μm)	6,81 \pm 0,15	7,10 \pm 0,24	6,83 \pm 0,07	6,62 \pm 0,24	6,53 \pm 0,09
Núcleo de Leydig (%)	8,38 \pm 0,42	8,94 \pm 0,37	8,04 \pm 0,24	7,74 \pm 0,72	8,10 \pm 0,44
Citoplasma de Leydig (%)	22,10 \pm 0,98 ^a	17,04 \pm 0,85 ^b	13,46 \pm 0,67 ^c	13,10 \pm 0,89 ^c	14,30 \pm 0,62 ^c
RNP (%)	38,35 \pm 2,94 ^a	53,06 \pm 3,72 ^b	60,26 \pm 3,10 ^b	59,53 \pm 5,37 ^b	56,80 \pm 2,69 ^b
ILS (%)	0,025 \pm 0,002 ^{ab}	0,031 \pm 0,005 ^a	0,023 \pm 0,002 ^{ab}	0,016 \pm 0,002 ^b	0,017 \pm 0,002 ^b
Volume nuclear (μm^3)	166,54 \pm 10,99	190,03 \pm 19,14	167,01 \pm 5,39	154,14 \pm 16,41	146,08 \pm 6,16
Volume citoplasmático (μm^3)	442,89 \pm 38,43 ^a	374,90 \pm 61,36 ^{ab}	279,65 \pm 14,84 ^b	268,40 \pm 38,42 ^b	257,89 \pm 7,51 ^b
Volume celular (μm^3)	609,43 \pm 44,48 ^a	564,93 \pm 80,43 ^{ab}	446,66 \pm 17,15 ^{ab}	422,54 \pm 52,37 ^{ab}	403,97 \pm 10,25 ^b
Nº de células/testículo ($\times 10^6$)	84,34 \pm 9,34	130,94 \pm 35,92	101,30 \pm 13,39	80,92 \pm 12,90	86,62 \pm 12,50
Nº de células/g testículo ($\times 10^6$)	48,11 \pm 5,24	66,98 \pm 17,95	54,40 \pm 5,80	42,67 \pm 6,48	51,09 \pm 6,00

Média \pm erro padrão. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha são diferentes entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Student Newman Keuls. RNP = relação nucleoplasmática. ILS = índice leydigossomático.

3.4 Concentração sérica de testosterona

A exposição crônica ao arsenato e arsenito de sódio não causou alteração na concentração sérica de testosterona dos animais tratados com 0,01 e 10 mg/L, respectivamente, de arsenato (1,56 \pm 0,45; 0,79 \pm 0,19 ng/mL) e arsenito (0,43 \pm 0,09; 1,47 \pm 0,40 ng/mL), quando comparados aos animais do grupo controle (0,57 \pm 0,08 ng/mL).

3.5 Parâmetros enzimáticos

A atividade da superóxido dismutase no testículo não sofreu alteração nos animais dos grupos tratados com arsênio, quando comparados aos animais do grupo controle (Fig. 3A). Em relação à catalase, sua atividade no testículo de animais que receberam 0,01 mg/L de arsenato e 10 mg/L de arsenito foi menor do que em animais do grupo controle. Além disso, os grupos que receberam 10 mg/L de arsenato e arsenito de sódio foram diferentes entre si ($P < 0,05$; Fig. 3B).

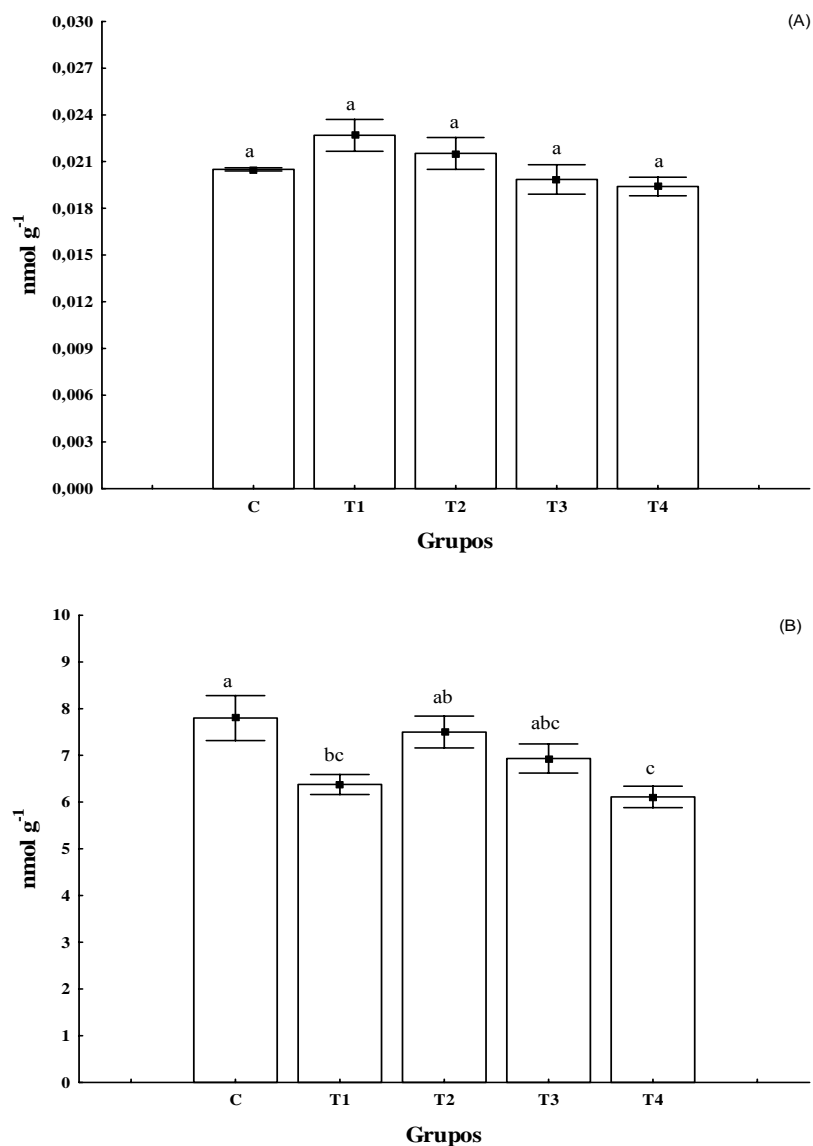


Fig. 3. Atividade de enzimas antioxidantes em testículos de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de arsenato e arsenito de sódio. (A) superóxido dismutase; (B) catalase. Grupos C: controle; T1: 0,01 mg/L de arsenato de sódio; T2: 10 mg/L de arsenato de sódio; T3: 0,01 mg/L de arsenito de sódio e T4: 10 mg/L de arsenito de sódio. ^{a,b,c}Letras diferentes são diferentes entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Student Newman Keuls. Média \pm erro padrão.

4. Discussão

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que animais tratados cronicamente com arsênio apresentaram alterações na atividade de apenas uma enzima pertencente ao sistema de defesa antioxidante e em poucos parâmetros histomorfométricos testiculares. As formas químicas testadas influenciaram esses resultados de maneira variada, dependendo da concentração em questão.

Nos testículos existe um poderoso sistema de defesa antioxidante envolvendo as enzimas superóxido dismutase e catalase, a fim de anular os efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio (Vernet et al., 2004). A diminuição da atividade da catalase observada nos testículos dos animais expostos ao arsênio, nas duas formas químicas testadas, foi também observada por Reddy et al. (2011), ao avaliar testículos de camundongos tratados com 4 mg/L de arsenito de sódio por 35 dias, e por Araújo (2011), avaliando camundongos expostos a 0,05 e 1,0 mg/L de arsenato de sódio por 42 dias. A redução encontrada nesta enzima pode ter sido devido à redução da síntese ou a sobreutilização da mesma em decorrência do persistente estresse causado pelo arsênio no órgão. Em contrapartida, a superóxido dismutase não apresentou alteração em sua atividade no parênquima testicular dos animais expostos ao arsênio do presente trabalho. Em geral, esta enzima é considerada a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo e desempenha importante papel na dismutação de ânions superóxido à peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é então degradado pela catalase (Inal et al., 2001).

Sabe-se que o arsênio tem o potencial de favorecer o aumento da síntese de superóxido dismutase e catalase, ativando o complexo proteico NF- κ B que está envolvido em respostas celulares a estímulos como o estresse e radicais livres (Bartoz, 1990). Segundo De Vizcaya-Ruiz et al. (2009), quando a exposição ao arsênio persiste por longos períodos, dependendo da dose e da via de administração, podem ocorrer alterações em fatores de transcrição, como inibição de NF- κ B, o que leva a formação excessiva de radicais livres a ponto de gerar estresse oxidativo, diminuindo assim as defesas antioxidantes enzimáticas da célula.

As concentrações de arsênio administradas nas formas de arsenito e arsenato de sódio causaram alterações em parâmetros morfométricos das células de Leydig, mas que não alteraram a produção de testosterona. Os animais tratados com arsênio, principalmente como arsenito de sódio, apresentaram redução na proporção e volume das células de Leydig, bem como redução no seu percentual de citoplasma. Essa redução citoplasmática, no entanto, não foi acompanhada por redução no percentual de núcleo desta célula. Este fato pode ter induzido o aumento encontrado na relação nucleoplasmática em todos os animais que receberam arsênio. O arsenito de sódio também foi o composto que provocou as maiores reduções nos volumes celular e citoplasmático das células de Leydig nos animais analisados. Estes resultados foram similares ao observado por Carvalho (2009), ao tratar camundongos com 1,0 mg/L de arsenato de sódio por 84 dias. Sabe-se que o volume nuclear da célula de Leydig está altamente relacionado com a concentração de testosterona testicular e plasmática

(Castro et al., 2002). Portanto, a não alteração nos valores da testosterona plasmática encontrada no presente trabalho pode ter sido causada pela manutenção da atividade nuclear das células de Leydig. Juntamente com o volume nuclear das células de Leydig no parênquima testicular, o número destas células no testículo e o peso corporal não variaram nos animais expostos ao arsênio, corroborando com Araújo (2011) ao tratar camundongos com 0,05 e 1,0 mg/L de arsenato de sódio por 42 dias. Apesar destes parâmetros não terem sofrido alteração, o arsenito de sódio, em ambas as concentrações, provocou redução no índice leydigossomático, um parâmetro que visa quantificar o investimento da massa corporal na produção de células de Leydig (Russell, 1996).

Segundo Blanco et al. (2007) o compartimento intertubular é a região mais sensível a alterações no testículo. No presente trabalho, os animais tratados com arsênio, principalmente na forma de arsenito de sódio, apresentaram redução na proporção do tecido conjuntivo, com aumento nas proporções de espaço linfático, vasos sanguíneos e macrófagos. Resultado semelhante foi encontrado por Mata (2009) ao tratar camundongos com 100 mg/L de arsenato de sódio por 42 dias. Pode-se inferir a partir destes resultados que o espaço deixado pela redução das células de Leydig e tecido conjuntivo tenha sido ocupado por outros elementos do intertúbulo, particularmente espaço linfático. Segundo Fawcett et al. (1973) as implicações fisiológicas da alteração na proporção de espaço linfático estão, provavelmente, relacionadas com a habilidade dos linfáticos de mover para fora do testículo materiais vascularmente secretados e manter as concentrações adequadas de andrógenos no testículo e nos vasos sanguíneos.

Por outro lado, o aumento observado no número de macrófagos pode ter sido influenciado pelos intermediários reativos de oxigênio gerados pela exposição ao arsênio. Estas substâncias influenciam a liberação de fatores pró-inflamatórios pelos macrófagos e, dependendo da intensidade do estresse, podem levar a redução na proporção de células de Leydig (Papadopoulos, 2007), redução esta observada de forma significativa neste trabalho.

Com relação ao compartimento tubular, a microscopia de luz mostrou que o arsênio foi capaz de provocar mudanças histopatológicas no epitélio seminífero apenas quando em 10 mg/L. As duas formas químicas, nesta concentração, causaram vacuolização na base do epitélio após 56 dias de tratamento, sendo as vacuolizações mais evidentes causadas principalmente pelo arsenito. Resultados similares foram encontrados por Sanghamitra et al. (2008) ao tratarem camundongos com 30 e 40 mg/L de arsenito de sódio por 30, 45 e 60 dias. De acordo com Creasy (2001), a vacuolização é a resposta morfológica mais comum das células de Sertoli em resposta a diversas

lesões, seguida de degeneração das células germinativas e desorganização ou esfoliação destas células. Portanto, as mudanças histológicas encontradas neste trabalho são uma resposta inicial ao tratamento com arsênio e podem levar a desestruturação do epitélio e consequente alteração da produção espermática.

Apesar das alterações histopatológicas, as análises morfométricas indicaram que houve manutenção da proporção do compartimento tubular e intertubular e dos diâmetros, tubular e luminal. O diâmetro tubular é considerado um indicador da atividade espermatogênica (França e Russell, 1998), enquanto que a medida da altura do epitélio pode ser mais precisa para a avaliação da produção espermática (Wing e Christensen, 1982). No presente trabalho, apenas os animais que receberam 0,01 mg/L de arsenato apresentaram aumento da altura do epitélio quando comparados aos animais controle. No entanto, este aumento não se refletiu na proporção de epitélio nos animais deste grupo.

O percentual de túnica própria nos animais tratados com arsenito a 10 mg/L foi significativamente maior que o do grupo que recebeu a mesma concentração de arsenato. Isto indica que, nas mesmas concentrações, o arsenito de sódio mostrou-se mais danoso que o arsenato. O espessamento da túnica própria encontrado neste trabalho pode ser uma resposta fisiológica de proteção do tecido à presença do elemento tóxico no compartimento intertubular (Russell et al., 1990).

Há uma forte correlação entre a massa do testículo e o volume ocupado pelos túbulos seminíferos, o que reflete na produção espermática (França e Russell, 1998). Neste trabalho, a massa do testículo não apresentou diferença entre os tratamentos, assim como os volumes tubulares e intertubulares, o IGS e o ITS, o que pode indicar produção espermática regular.

Em conclusão nossos resultados mostraram que as concentrações de arsênio utilizadas neste trabalho não foram capazes de causar grandes danos ao testículo, mas que a maior parte das alterações encontradas foram causadas pelo arsenito de sódio. Entretanto, apesar dos resultados do presente trabalho não indicarem que as concentrações avaliadas resultaram em grandes danos ao testículo, eles mostraram que iniciou-se uma alteração histopatológica no tecido e que a exposição a longo prazo ao arsênio, pode acarretar danos a este órgão e, conseqüentemente, à fertilidade em ratos Wistar.

Agradecimentos

Os autores são gratos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do trabalho.

Referências

Amann RP. Sperm production rates. In: Johnson AD, Gomes WR, editors. The testis. New York: Academic Press; 1970, p. 433-482.

Attal J, Courot M. Développement testiculaire et établissement de la spermatogenesis chez le taureau. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*. 1963; 3: 219-41.

Araújo JOC. Efeitos da ingestão subcrônica de arsênio sobre os testículos de camundongos adultos. 2011. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Bartoz G. Erythrocytes membrane changes during ageing in vitro. In: Hariss JR editor. *Blood cell Biochemistry Erythroid cells*. New York: Plenum press; 1990, p. 81-120.

Blanco A, Moyano R, Vivo J, Flores-Acunã R, Molina A, Blanco C, et al. Quantitative changes in the testicular structure in mice exposed to low doses of cadmium. *Environ Toxicol Pharmacol* 2007; 23: 93-01.

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

Castro ACS, Berndtson WE, Cardoso FM. Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits. *Braz J Med Biol Res*.2002; 35: 493-8.

Chen B, Arnold LL, Cohen SM, Thomas DJ, Li XC. Mouse arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase genotype affects metabolism and tissue dosimetry of arsenicals after arsenite administration in drinking water. *Toxicol Sci* 2011; 124: 320-6.

Cohen G, Dembiec D, Marcus J. 1. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal Biochem* 1970; 34: 30-8.

Creasy DM. Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicol Pathol* 2011; 29: 64-6.

Cui X, Kobayashi Y, Hayakawa T, Hirano S. Arsenic speciation in bile and urine following oral and intravenous exposure to inorganic and organic arsenics in rats. *Toxicol Sci* 2004; 82: 478–87.

Cui X, Okayasu R. Arsenic accumulation, elimination, and interaction with copper, zinc and manganese in liver and kidney of rats. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 3646-50.

De Vizcaya-Ruiz A, Barbier O, Ruiz-Ramos R, Cebrian ME. Biomarkers of oxidative stress and damage in human populations exposed to arsenic. *Mutat Res* 2009; 674: 85-2.

Dieterich S, Bieligg U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increase expression of catalase en the end-stage failing heart. *Circulation* 2000;101: 33-9.

Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod* 1973; 9: 500-32.

Ferreira M, Matos RC, Oliveira H, Nunes B, Pereira ML. Impairment of mice spermatogenesis by sodium arsenite. *Hum Exp Toxicol* 2012; 31: 290-02.

Figueiredo BR, Borba RT, Angelica RS. Arsenic occurrence in Brazil and human exposure. *Environ. Geochem Health* 2007; 29: 109-18.

França LR, Russell LD. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia F, Regadera J, editors. Male reproduction – multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Communications; 1998, p. 197-219.

Frisbie SH, Ortega R, Maynard DM, Sarkar B. The concentrations of arsenic and others elements in Bangladesh's drinking water. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 1147-53.

Hughes MF. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett* 2002; 133: 1-16.

Hughes MF, Beck BD, Chen Y, Lewis AS, Thomas DJ. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicol Sci* 2011; 123: 305-32.

Inal ME, Kanbak G, Sunal E. Antioxidant enzymes activities and malonaldehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta* 2001; 305: 75-80.

Jana K, Jana S, Samanta PK. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. *Reprod Biol Endocrinol* 2006; 4: 1-13.

Johnson L, Neaves WB. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. *Biol Reprod* 1981; 24: 703-12.

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

Pant N, Kumar R, Murthy RC, Srivastava SP. Male reproductive effect of arsenic in mice. *Biometals* 2001; 14: 113-7.

Pant N, Murthy RC, Srivastava SP. Male reproductive toxicity of sodium arsenite in mice. *Hum Exp Toxicol* 2004; 23: 399-03.

Papadopoulos V. Environmental factors that disrupt Leydig cell steroidogenesis. In: Payne AH, Hardy MP editors. Contemporary Endocrinology: The Leydig cell in health and disease. New Jersey: Humana Press; 2007, p. 393-413.

Ratnaik RN. Acute and chronic arsenic toxicity. Postgrad Med J 2003; 79: 391-6.

Reddy PS, Rani GP, Sainath SB, Meena R, Supriya CH. Protective effects of N-acetylcysteine against arsenic-induced oxidative stress and reprotoxicity in male mice. J Trace Elem Med Biol 2011; 25: 247-53.

Rudy M. The analysis of correlations between the age and the level of bioaccumulation of heavy metals in tissues and the chemical composition of sheep meat from the region in SE Poland. Food Chem Toxicol 2009; 47: 1117-22.

Russell LD, Ettlin RA, Sinha-Hikim AP, Clegg ED. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River Press; 1990.

Russell LD. Mammalian Leydig cell structure. In: Payne AH, Hardy MP, Russel LD editors. The Leydig cell. Viena: Cache River Press; 1996, p. 43-96.

Sanghamitra S, Hazra J, Upadhyay SN, Amal RC. Arsenic induced toxicity on testicular tissue of mice. Indian J Physiol Pharmacol 2008; 52: 84-0.

Tae HJ, Jang BG, Ahn DC, Choi EY, Kang HS, Lee JH, et al. Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus karpowi*) during the breeding and non-breeding seasons. Vet Res Commun 2005; 29: 629-43.

Tian D, Ma H, Feng Z, Xia Y, Le XC, Ni Z, et al. Micronuclei analysis in human exfoliated epithelia from the residents chronically exposed to arsenic via drinking water in Inner Mongolia China. J. Toxicol. Environ. Health A 2001; 64: 473-84.

Vahter M. Mechanisms of arsenic biotransformation. Toxicol 2002; 18: 211-17.

Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR. Antioxidant strategies in the epididymis. Mol Cell Endocrinol 2004; 216: 31-9.

Wing TY, Christensen AK. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am J Anat* 1982; 165: 13-25.

World Health Organization - Who. Guidelines for drinking water quality. 4th ed. Geneva, 315-318.

Xu W, Bao H, Liu F, Liu L, Zhu YG, She J, et al. Environmental exposure to arsenic may reduce human semen quality: associations derived from a Chinese cross-sectional study. *Environ Health* 2012.

CONCLUSÕES GERAIS

- O arsenito e o arsenato de sódio, nas concentrações e tempo utilizados neste trabalho, não provocaram alteração no peso dos animais e dos órgãos do aparelho reprodutor analisados.
- A estrutura tecidual de todas as regiões do epidídimo não se alterou frente ao tratamento com arsênio.
- Alterações nas características morfométricas testiculares e epididimárias ocorreram nos animais expostos ao arsenito e arsenato de sódio, nas duas concentrações analisadas.
- O arsenito de sódio, em ambas as concentrações utilizadas, e o arsenato de sódio a 10 mg/L causaram redução na produção espermática diária, no número de espermátides no testículo e de espermatozoides nas regiões da cabeça/corpo do epidídimo.
- A concentração sérica de testosterona e os parâmetros espermáticos não se alteraram quando os animais foram expostos ao arsenato e arsenito de sódio.
- O arsênio provocou mudanças histopatológicas no epitélio seminífero apenas quando em 10 mg/L, sendo as maiores alterações causadas pelo arsenito de sódio.
- A atividade de SOD no testículo não sofreu alteração frente à exposição ao arsênio. No entanto, a atividade CAT reduziu em animais tratados, indicando sobreutilização da mesma em decorrência do persistente estresse causado pelo arsênio no órgão.
- Este trabalho confirmou que o arsenito de sódio causa mais danos que o arsenato a parâmetros testiculares e epididimários.