

ANA TERESA CÉSAR SILVA

**EFEITO DO ZINCO ISOLADO OU ASSOCIADO À VITAMINA E SOBRE
TESTICULOS DE RATOS WISTAR ADULTOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2011

ANA TERESA CÉSAR SILVA

**EFEITO DO ZINCO ISOLADO OU ASSOCIADO À VITAMINA E SOBRE
TESTICULOS DE RATOS WISTAR ADULTOS**

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

APROVADA: 28 de novembro de 2011.

Profa. Juliana Castro Monteiro

Prof. Marcos de Lucca Moreira Gomes

Profa. Maria do Carmo Gouveia Peluzio

Prof. João Bosco Gonçalves de Barros

Prof. Sérgio Luis P. da Matta
(Orientador)

Aos meus pais Alencar e Maria José.
Aos meus filhos Débora e Antônio José.

AGRADECIMENTOS

A Deus, única explicação pela força em todos os momentos.

Aos meus pais pelo exemplo de amor e dignidade e aos meus irmãos e cunhadas pela torcida.

Aos meus filhos Débora e Antônio José pela maturidade ao entenderem os momentos de ausência e por serem exatamente como são, razão pela qual me enchem de orgulho.

À UFV pela oportunidade de crescimento acadêmico e profissional através do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural.

À Diretora Irmã Christina Maria Pastore pelo apoio durante e após minha presença como profissional na FAFISM.

A todos os colegas do IF Sudeste MG que me apoiaram desde o início na busca pela qualificação. Com especial agradecimento à Diretora Geral Elizete Reis e a Diretora de Ensino Carla Patrícia Garcia pela força e pela flexibilidade dos horários que ajudaram muito na conclusão desse trabalho.

Ao meu orientador Sérgio Luis Pinto da Matta pela confiança e ajuda nos momentos de dúvida e pela oportunidade da convivência e dos ensinamentos, fazendo toda a diferença no meu crescimento profissional. Serei eternamente grata pela carinhosa acolhida nesta Instituição desde a primeira entrevista.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pelos ensinamentos adquiridos durante o curso.

Ao coorientador professor Juraci Alves de Oliveira por todos os ensinamentos, sabedoria e ajuda durante vários momentos do trabalho.

À professora Sirlene pelos conselhos durante e após a qualificação.

Aos professores convidados da banca de defesa João Bosco, Marcos, Juliana e Carminha pela disponibilidade.

Aos professores do laboratório: Juliana, Mariana, Izabel e Adilson pelo aprendizado e cordial convivência.

Aos técnicos do Biotério Central pelos animais do experimento, ao laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde pelo período de tratamento dos animais, aos laboratórios de Solos e ao professor Juraci Alves de Oliveira pelas análises do metal. Aos profissionais da Veterinária pelo uso do fotomicroscópio.

A todos os companheiros de Laboratório de Biologia Estrutural e da Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela convivência prazerosa.

À Bruna e Regiane pela ajuda nas análises bioquímicas.

A duas amigas em especial: Mônica, pela ajuda em quase todas as etapas experimentais, pela convivência e acolhida por inúmeras vezes, pessoa humana maravilhosa, eterna gratidão e à Ana Paula Matta pela qual já nutria uma grande admiração e respeito como aluna e que passei a admirar e respeitar como grande profissional que se tornou, obrigada pela ajuda em inúmeros momentos.

À Beth da Secretaria da Pós-Graduação da Biologia Celular e Estrutural pela educação e boa vontade nos momentos solicitados.

Às amigas de Muriaé pela amizade, paciência e conselhos nos momentos de cansaço, em especial a Aline, Emília, Ester e Maria do Carmo.

A todos os alunos que em algum momento me estimularam na busca pelo conhecimento.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABP	Proteína ligada a andrógenos
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4
CAT	Enzima catalase
CGT	Total de célula germinativa
CSE	Célula de sertoli
CT	Comprimento do túbulo
CRIP	Proteína intestinal rica em cisteína
DM	Diâmetro médio do túbulo seminífero
EAR	Espermátide arredondada
ECS	Eficiência de célula de Sertoli
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione reductase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
IGS	Índice gonadossomático
IME	Índice meiótico
IMIT	Índice de mitoses espermatogoniais
ITS	Índice tubulossomático
LH	Hormônio Luteinizante
PLP	Espermatócito em preleptóemo/leptóteno
NC	Número corrigido de células
PAQ	Paquíteno
PC	Peso corporal
PED	Produção espermática diária
PEDT	Produção espermática diária por testículo
PV	Proporção volumétrica
RGE	Rendimento geral da espermatogênese
RNP	Relação Nucleoplasmática
SCF	Supercoiling factor
SCF1	Supercoiling factor 1

SCS	Suporte de célula de Sertoli
SNK	Teste de Student Newman Keuls
SOD	Enzima superóxido dismutase
SPGA	Espermatogônia
α -Toc	α -tocoferol
α -TTP	Proteína de transferência hepática α -tocoferol
TS	Túbulo seminífero
UI	Unidade internacioanl
UL	Ingestão tolerável superior
VEIT	Volume dos elementos no intertúbulo
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VT	Volume do túbulo seminífero
Zip	Zrt- and Irt-like proteins
ZnT	Zinc Transporter

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	v
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1. REVIÃO DE LITERATURA.....	3
ANTIOXIDANTES: ZINCO E ALFA-TOCOFEROL NO TESTÍCULO.....	3
1. ESTRESSE OXIDATIVO	3
2. TERAPIA ANTIOXIDANTE.....	4
3. ZINCO.....	5
4. VITAMINA E (ALFA-TOCOFEROL).....	9
5. ZINCO E ALFA-TOCOFEROL.....	11
6. ORGANIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL DO TESTÍCULO.....	12
7. ESPERMATOGÊNESE.....	12
8. CÉLULAS DE SERTOLI.....	13
9. CÉLULAS DE LEYDIG.....	15
10. REFERÊNCIAS.....	16
2. ESTEREOLOGIA DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS A DOSES CRESCENTES DE ZINCO E ALFA- TOCOFEROL.....	23
RESUMO.....	23
1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1. Objetivos gerais.....	26
1.2. Objetivos específicos.....	26
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1. Animais e grupos experimentais.....	27
2.2. Coleta de amostras e Preparação Histológica	28
2.3. Coleta e análise do sêmen.....	28
2.4. Determinação da concentração do zinco.....	28
2.5. Análises microscópicas e estereológicas.....	29
2.6. Análises estatísticas.....	32
3. RESULTADOS.....	32
4. DISCUSSÃO.....	34
5. CONCLUSÕES.....	38
6. REFERÊNCIAS.....	39
TABELAS.....	44
3. ESTEREOLOGIA DO COMPARTIMENTO INTERTUBULAR DE TESTÍCULO DE RATOS WISTAR TRATADOS COM ZINCO ISOLADO OU ASSOCIADO A ALFA-TOCOFEROL.....	49
RESUMO.....	49
1. INTRODUÇÃO.....	50
1.1. Objetivos gerais.....	51
1.2. Objetivos específicos.....	52
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.1. Animais e grupos experimentais.....	52

2.2. Coleta do material e preparação histológica.....	53
2.3. Determinação da concentração do zinco nos órgãos.....	53
2.4. Análises microscópicas e estereológicas.....	54
2.4.1. Proporção volumétrica e volume dos elementos no intertúbulo.....	54
2.4.2. Estereologia das células de Leydig.....	54
2.5. Análises estatísticas.....	55
3. RESULTADOS.....	56
4. DISCUSSÃO.....	57
5. CONCLUSÕES.....	60
6. REFERÊNCIAS.....	60
TABELAS.....	64
CONCLUSÕES GERAIS.....	69

RESUMO

SILVA, Ana Teresa César, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2011. **Efeito do zinco isolado ou associado à vitamina E sobre testículos de ratos Wistar adultos.** Orientador: Sérgio Luis P. da Matta. Coorientador: Juraci Alves de Oliveira.

Antioxidantes são moléculas capazes de retardar ou prevenir a oxidação em outras substâncias. Já foram descritos efeitos de associações de diferentes micronutrientes que se potencializam em determinados tecidos ou órgãos, gerando benefícios à saúde. O zinco assim como a vitamina E (α -tocoferol) é considerado um antioxidante importante nas membranas celulares e ambos isoladamente apresentam benefícios na reprodução, vistos em estudos com sêmen. As ações precisas apenas do zinco ou do α -tocoferol, como antioxidantes sobre parâmetros da fertilidade, ainda não são claras e ambos ainda não foram avaliados quando associados no testículo. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do zinco isolado ou associado à α -tocoferol (α -Toc) sobre as características morfológicas de componentes testiculares de ratos Wistar adultos. Foram utilizados 56 ratos Wistar em idade reprodutiva, divididos em sete grupos de oito animais. Seis grupos receberam Zn, na água de beber. Três grupos receberam 5, 10 e 20 mg de Zn, enquanto outros três grupos receberam as mesmas dosagens de Zn associadas a 15 mg de α -Toc por gavagem, em três doses semanais. Um grupo controle de 8 animais recebeu somente água. O regime alimentar foi *ad libitum* durante os 56 dias de tratamento. Os três primeiros grupos e o controle receberam solução de NaCl 0,9% por gavagem, para homogeneizar os procedimentos entre os tratamentos. Análises morfológicas do compartimento tubular e intertubular foram realizadas utilizando o software Image Pro Plus. Foram comparadas as médias utilizando-se o teste SNK (Student Newman Keuls) com 5% de tolerância. No túbulo, o tratamento com 10mg de Zn aumentou os espermatócitos em preleptóteno/leptóteno, espermátides arredondadas e o número total de células germinativas. A associação de 20mg de Zn com α -Toc aumentou o índice mitótico. No intertúbulo, os ratos tratados com 5mg de Zn apresentaram aumento no número de células de Leydig e macrófagos e os ratos tratados com 10mg de Zn associado a α -Toc tiveram aumento do espaço linfático, do número de vasos sanguíneos e do espaço intertubular. Conclui-se que o Zn agiu isolado, preferencialmente nas células, tanto no túbulo, quanto no intertúbulo. A ação sinérgica dos dois antioxidantes (Zn+Toc) se manifestou com o aumento do espaço intertubular, linfático e vasos sanguíneos e também com o aumento do índice mitótico.

ABSTRACT

SILVA, Ana Teresa César, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2011. **Effects of the zinc alone or associated with vitamin E on the testis of adult Wistar rats.** Adviser: Sérgio Luis P. Da Matta. Co-Adviser: Juraci Alves de Oliveira.

Antioxidants are molecules that can slow or prevent the oxidation of other substances. Effects have been described associations of different micronutrients that leverage in certain tissues or organs, leading to health benefits. Zinc and vitamin E (α -tocopherol) is considered an important antioxidant in cell membranes, and both have benefits in reproductive isolation, seen in studies of semen. The precise actions of zinc only or α -tocopherol as antioxidants on parameters of fertility are still unclear and they have not been evaluated when associated in the testis. The objective of this study was to evaluate the effect of zinc alone or associated with α -tocopherol (α -Toc) on the characteristics of components stereological testicular adult Wistar rats. We used 56 Wistar rats of reproductive age, divided into seven groups of eight animals. Six groups received Zn in drinking water. Three groups received 5, 10 and 20 mg Zn, while three other groups received the same dosage of Zn associated with 15 mg of α -Toc by gavage in three weekly doses. A control group of eight animals received only water. The diet was ad libitum during the 56 days of treatment. The first three groups and the control received 0.9% NaCl solution by gavage to standardize the procedures among the treatments. Morphometric analysis of the tubular and intertubular compartment was carried out using Image Pro Plus software. The averages were compared using the SNK test (Student Newman Keuls) with 5% tolerance. In seminiferous tubule, the treatment with 10 mg Zn increased in spermatocytes preleptotene / leptotene, round spermatids and the total number of germ cells. The association of Zn with 20 mg of α -Toc increased mitotic index. In the intertubular, mice treated with 5 mg of Zn showed an increase in the number of Leydig cells and macrophages and mice treated com10mg Zn associated with α -Toc had increased lymphatic space, the number of blood vessels and intertubular space. It is concluded that Zn acted alone, preferably in the cells, both in the tubule, and in the intertubular. The synergistic action of two antioxidants (Zn + Toc) was shown by the increase in intertubular space, lymphatic and blood vessels and also with increased mitotic index.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A dieta pode ter um impacto significativo na fertilidade e o tipo de alimento pode interferir nos parâmetros reprodutivos de mamíferos, assim como a deficiência em qualquer um dos micronutrientes essenciais pode acarretar impacto em vários componentes da reprodução (Vilarta et al., 2007). Dessa forma, a suplementação com antioxidantes, como o zinco (Zn), por exemplo, pode ajudar a evitar danos à membrana plasmática e ao DNA do espermatozóide e, assim, melhorar parâmetros de fertilidade do sêmen (Wong et al., 2002).

No caso do zinco, a deficiência provoca a diminuição da libido e da qualidade do sêmen em mamíferos (Blomfield, 2010). Audet et al. (2009) observaram a influência da suplementação vitamínica no desempenho reprodutivo de javali (*Sus scrofa*). Em estudo que utilizou suplementação de micronutrientes específicos (zinco e folato) e vitaminas C, E e β -caroteno, em uma amostra de homens saudáveis não-fumantes e com ampla faixa etária, de jovens a idosos, observou-se maior número e motilidade de espermatozóides possibilitando-se atenuar o impacto da idade avançada sobre tais parâmetros. Esses resultados reforçam a teoria de que uma dieta saudável com o uso de suplementos pode ser uma maneira viável e segura para melhorar a qualidade do sêmen e a fertilidade (Eskenazi et al., 2005).

O testículo de mamífero adulto, depois da próstata, tem a maior concentração de Zn que todos os outros órgãos do corpo e está presente, principalmente, no líquido seminal (Merrells et al., 2009).

O papel do Zn na função testicular é tanto promover a maturação das células germinativas quanto prolongar a vida dos espermatozóides até o momento da ejaculação. Os níveis elevados de zinco são responsáveis pela estabilização das membranas plasmáticas nas células do epidídimo e pela manutenção do espermatozóide em um estado metabolicamente quiescente, durante o armazenamento e ejaculação (Bedwal e Bahuguna, 1994).

Os teores de zinco são, geralmente, mais baixos em homens inférteis, nos quais a contagem de espermatozóides diminui. Além disso, verifica-se que a adição de Zn na dieta de homens inférteis causa aumento na contagem e na motilidade dos espermatozóides (Cambiagh e Castellote, 2004).

Antioxidantes fornecidos na dieta, como vitaminas, minerais e ômega-3, reduzem o efeito negativo causado pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs). Vincula-se às vitaminas, como a vitamina E, a eliminação e a interrupção de reações em cadeia de EROs, e os minerais dietéticos, como o Zn, são essenciais para enzimas

antioxidantes, pois atuam como cofatores. Como a integridade da membrana é fundamental para o funcionamento normal das células germinativas, os antioxidantes da dieta também devem reduzir os efeitos prejudiciais que as EROs causam na membrana plasmática dessas células e, assim, melhorar os parâmetros de fertilidade (Tremellen, 2008).

Antioxidantes são encontrados em muitos sistemas do corpo e protegem as células controlando a produção excessiva de EROs, sendo essenciais não só para a fertilidade, mas para o crescimento, o desenvolvimento, cicatrização de tecidos, a imunidade e muitas outras funções biológicas (Blomfield, 2010). Os antioxidantes enzimáticos ou naturais incluem a superóxido dismutase (SOD); a catalase (CAT), as peroxirredoxinas (Prx), a glutathione (GSH), a glutathione redutase (GR) e a glutathione peroxidase (GPx) (Andrade et al., 2010). Os antioxidantes não enzimáticos ou sintéticos são ingeridos na dieta, como o ácido ascórbico, o tocoferol, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico, ácido α -lipoico, zinco, taurinas, hipotaurinas, glutathionas, betacaroteno e caroteno (Maia, 2006). Com exceção da vitamina E que atua essencialmente na membrana, os outros antioxidantes atuam, principalmente, no meio intracelular. Dentre os antioxidantes envolvidos diretamente na reprodução, merecem destaque o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E), o ácido α -lipoico e o Zn (Andrade et al., 2010).

Novos estudos são necessários para determinar como os antioxidantes podem ser utilizados no trato reprodutivo masculino e, em caso afirmativo, em que etapa do processo espermatogênico (Merrells et al., 2009).

É preciso avaliar, além do sêmen, outras características reprodutivas, como por exemplo, parâmetros histológicos e morfométricos do parênquima testicular em suplementação com diferentes antioxidantes associados (vitaminas e minerais). Ainda não foi descrita a relação da ação combinada de Zn e vitamina E com a espermatogênese e a produção espermática na avaliação de parâmetros reprodutivos masculinos.

1.1. OBJETIVOS

O presente trabalho objetivou analisar os efeitos do Zn, em três diferentes doses, isolado ou associado à vitamina E, em testículos de ratos Wistar adultos, avaliando quantitativamente o parênquima testicular, por meio de análises estereológicas e morfométricas.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. ESTRESSE OXIDATIVO

Os radicais livres são átomos, moléculas ou íons que apresentam um elétron desemparelhado e instável que, para alcançar a estabilidade, tendem a se ligar a outro elétron (Souza e Ferreira, 2007). O termo radical livre não é o mais adequado, pois nem todas as espécies reativas do oxigênio (EROs) são radicais livres e estes nem sempre são oxidantes (Maia, 2006).

Sob condições fisiológicas normais, as EROs e os antioxidantes encontram-se em situação de equilíbrio. Quando este equilíbrio é desfeito e uma quantidade excessiva de EROs é liberada, ocorre o estresse oxidativo. Este estado pode provocar efeitos deletérios na reprodução, gerando lesões nas membranas celulares e no DNA das células germinativas e, se o processo não for contido, a concepção pode não ocorrer ou os descendentes poderão apresentar malformações (Andrade et al., 2010). Para reverter o quadro de estresse oxidativo é preciso reduzir a produção de EROs ou aumentar a quantidade de antioxidantes (Tremellen, 2008; Andrade et al., 2010).

As altas taxas de multiplicação celular inerentes ao processo de espermatogênese dependem de grande consumo de oxigênio pelas mitocôndrias das células do epitélio seminífero. Neste processo, a alta demanda gera competição por esse elemento (Aitken e Roman, 2008). Apesar do baixo teor de oxigênio pelo seu alto consumo, que caracteriza o micro-ambiente testicular, esse tecido permanece vulnerável ao estresse oxidativo, devido à abundância de ácidos graxos insaturados nas membranas celulares e à presença de EROs, geradas nestes sistemas (Tremellen, 2008). Entretanto, os testículos possuem elaborado sistema de enzimas antioxidantes e interceptadores de radicais livres para assegurar que a espermatogênese e a esteroidogênese não sejam afetadas pelo estresse oxidativo (Vernet et al., 1996, 1997). Estes sistemas de defesa antioxidante são importantes porque os danos peroxidativos são considerados, atualmente, como uma das causas mais importantes da disfunção testicular (Andrade et al., 2010).

Embora o estresse oxidativo seja claramente uma característica dominante na etiologia da infertilidade masculina, os mecanismos causais continuam sendo estudados. O testículo é um órgão vulnerável por ser altamente dependente de oxigênio para conduzir a espermatogênese e ainda ser altamente suscetível aos efeitos tóxicos de metabólitos de oxigênio reativo (Aitken e Roman, 2008).

A superóxido dismutase (SOD) tem grande importância na estratégia de defesa antioxidante, de tal forma que os testículos possuem não apenas a SOD convencional citosólica (Cu/Zn) e a mitocondrial (Fe/Mn), mas também uma forma incomum de SOD extracelular (SOD Ex-), produzidas pelas células de Sertoli e células germinativas (Aitken e Roman, 2008).

Atualmente, busca-se identificar antioxidantes exógenos que possam complementar o organismo e suas próprias estratégias antioxidantes para proteger os testículos das consequências do ataque de EROs (Blomfield, 2010).

1.2. TERAPIA ANTIOXIDANTE

Diversos antioxidantes são avaliados pela sua capacidade de combater o estresse oxidativo nos testículos e, por isso, são fornecidos aos homens inférteis na esperança de reverter ou amenizar esta situação, principalmente com foco na qualidade do sêmen (Maneesh e Jayalekshmi, 2006). Em modelos animais já foram examinadas várias preparações antioxidantes e, destas, diversos compostos confirmaram a capacidade de atravessar a barreira sanguínea dos testículos e proteger o epitélio germinativo (Aitken e Roman, 2008).

Existem dois sistemas de defesa antioxidantes: os enzimáticos e os não enzimáticos. Os enzimáticos neutralizam as EROs excessivas e previnem danos da estrutura celular como alterações da fluidez da membrana e danos ao DNA. Incluem a superóxido dismutase (SOD); a catalase (CAT), as peroxirredoxinas (Prx), a glutathione redutase (GR) e a glutathione peroxidase (GPx). Os antioxidantes não enzimáticos são conhecidos como antioxidantes naturais ou suplementos da dieta, incluindo o ácido ascórbico, o tocoferol, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico, ácido α -lipoico (Nordberg e Arnér, 2001), zinco, taurinas, hipotaurinas, glutathionas, betacaroteno e caroteno. Esse sistema pode atuar na eliminação das EROs, antes que elas causem lesão, ou como reparador da lesão ocorrida (Maia, 2006). Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da

membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular (Ferreira e Matsubara, 1997).

1.3. ZINCO

O zinco é um dos mais importantes elementos-traço essenciais da nutrição humana e o segundo elemento de transição mais abundante do corpo de mamífero (Salgueiro et al., 2000; Yu et al., 2007). O Zn difere dos outros metais de transição, pois contém o orbital “d” completo e assim não participa de reações redox, mas age como ácido de Lewis para aceitar um par de elétrons, fazendo com que seja um íon estável. Em contraste com o ferro e o cobre, o Zn permite a sua utilização sem o risco de dano oxidativo (Hambidge, 2000). Esse elemento geralmente se complexa com aminoácidos, peptídeos e nucleotídeos e tem afinidade com grupos tióis e hidrogênio (McCall et al., 2000). O Zn é essencial no metabolismo subcelular, pois é um componente essencial do sítio catalítico de pelo menos uma enzima em cada uma das seis classificações enzimáticas: oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (Kieling, 2002). O Zn é relativamente não tóxico em mamífero, a julgar por sua tolerância em cargas alimentares superiores a 100 vezes o mínimo recomendado de requerimento diário para humanos (Choudhury et al., 2005). No entanto, a ingestão excessiva de Zn pode ter consequências drásticas e a toxicidade tem sido relatada em numerosas espécies animais e em humanos (Ferreira et al., 2010).

Mais de 95% do Zn total do corpo está ligado às proteínas, dentro das células e nas membranas celulares. O organismo humano adulto contém cerca de 1,5 a 3,0 g de Zn, tornando-o o segundo elemento em abundância, ao lado do ferro (Umeta, 2000). Segundo Salgueiro et al. (2000), o corpo humano contém cerca de 40 mg Zn/ Kg. As maiores concentrações foram encontradas na coróide do olho (274mg/g) e no líquido prostático (300 a 500mg/g de peso seco) (Mafra e Cozzolino, 2004).

Os produtos de origem animal são, geralmente, as fontes dietéticas mais importantes de Zn, quanto ao conteúdo e biodisponibilidade (Sena e Pedrosa, 2005). Fatores dietéticos, intraluminais e sistêmicos influenciam a absorção e o transporte celular de zinco (Antunes, 2010). Dentre esses fatores são citados a forma química do elemento na dieta, a interação

mineral-mineral, taninos, oxalatos, fitatos, catabolismo, hormônios, infecções e estresse (Marcos, 2008).

A absorção inicial do Zn ocorre no estômago onde, apesar de ser muito reduzida, ocorre de modo relativamente rápido, cerca de 15 minutos após a ingestão (Cousins e McMahon, 2000). O principal local de absorção é a segunda parte do duodeno, podendo ocorrer por difusão passiva, quando há grandes quantidades no lúmen ou por processos mediados por carreadores, quando há menor concentração. Uma vez no citosol, o Zn é complexado com metalotioneína citoplasmática possibilitando o seu uso pelo enterócito ou sua passagem para a circulação portal, sendo transportado pela albumina (Salgueiro et al., 2000; Cozzolino, 2005; Fisberg et al., 2008).

Em órgãos como o pâncreas, os rins e o baço, o Zn possui meia-vida de 12,5 dias, enquanto no cérebro e nos ossos a renovação é mais lenta, em torno de 300 dias. Dessa forma, acredita-se que o Zn não é bioacumulado em mamíferos (Cozzolino, 2005; Fisberg et al., 2008).

A solubilidade em água afeta de maneira positiva a biodisponibilidade de Zn. Quando o Zn é administrado na forma de sulfato de Zn, que é muito solúvel, a absorção intestinal é mais eficiente e, por isso, essa forma química é uma das mais utilizadas nas suplementações desse elemento na dieta (Choudhury et al., 2005). A administração de grandes quantidades de zinco não resulta em níveis teciduais elevados, pois o aumento do nível de Zn na dieta resulta em diminuição da absorção. Além disso, com a administração em excesso, a retenção de Zn diminui (Choudhury et al., 2005).

Em ratos, uma dieta com baixo teor de proteína está associada à redução na absorção de Zn, enquanto o inverso é observado em humanos. A homeostase do Zn em mamíferos é regulada pelo controle da absorção e da perda exógena do Zn no intestino, como também através da excreção pelo pâncreas e pelo fígado (Cozzolino, 2005). Entretanto em ratos, esse controle é feito via secreção de Zn a partir do intestino e não pela regulação da absorção de Zn (Elinder e Friberg, 1986). A excreção fecal é a via predominante de eliminação de zinco. Aproximadamente 70-80% da dose ingerida é excretada pelas fezes e somente 1-2% é excretada na urina (Wastney et al., 1986).

O transporte transmembrana do Zn requer, em alguns casos, a participação de mecanismos especializados, como as famílias de proteínas ZnT (Zinc Transporter) e Zip (Zrt- and Irt-like proteins) (Pattison e Cousins, 1986). Embora a albumina seja a principal transportadora de Zn no plasma, algumas proteínas do plasma e aminoácidos livres podem

influenciar na sua liberação para as células (Yu et al., 2007). A metalotioneína e a CRIP (proteína intestinal rica em cisteína) ligam-se ao Zn no intestino, na função de carreador intracelular, aumentando a velocidade de absorção (Valle e Falchuk, 1993).

Apesar das recomendações de ingestão de Zn estarem bem estabelecidas, ainda existem muitas dificuldades para a investigação do estado nutricional em humanos relativo ao Zn, pois não há um marcador bioquímico específico e sensível para esta avaliação (Fisberg et al., 2008). Os valores de exposição que foram considerados na determinação da dose de referência sugerem que existe o mínimo de Zn para manter a função fisiológica (5,5 mg/dia) e a dose que gera efeitos potencialmente negativos (60 mg/dia) (Cantilli et al., 1994).

Um dos eventos de maior sensibilidade ao excesso de Zn, por via oral, é o decréscimo da absorção de cobre (Cu), o que leva a uma redução do cobre sistêmico, ocasionando decréscimo na atividade da metaloenzima do Cu, alterações hematológicas, decréscimo nos níveis de colesterol, imunotoxicidade e efeitos gastrointestinais. A ingestão de 100 a 300 mg Zn/dia pode causar alterações na resposta imune e no perfil de lipídios no sangue. Há, também, demonstração de que o uso de suplementação com o Zn, em doses diárias de 15 a 100 mg em humanos, freqüentemente usadas neste tipo de suplementação oral, pode produzir efeitos adversos como queda no nível de cobre em humanos (Choudhury et al., 2005).

Segundo estimativas da *Food and Agriculture Organization* (FAO), citada por Maret e Sandstead (2006), a deficiência de Zn na população mundial está em torno de 40% e isso pode afetar a função gonadal diretamente, através do efeito sobre a esteroidogênese testicular e indiretamente, através do efeito sobre a função hipofisária.

A importância funcional do Zn nos testículos é demonstrada pelas graves consequências da sua deficiência no desenvolvimento testicular (Merrells et al., 2009). Segundo Mahomed et al. (1989) a deficiência severa de Zn em animais, está associada à redução da fertilidade, malformações fetais do sistema nervoso e retardo do crescimento, no início da gestação.

A suplementação de Zn pode apresentar melhora na saúde em diferentes situações. Porém, é necessário que haja padronização das doses utilizadas e da duração do tratamento. É importante conhecer o limite superior tolerável de ingestão (*Tolerable Upper Intake Level-UL*), para se desenvolver programas com suplementação de Zn. A melhor forma de suplementação deve considerar solubilidade, disponibilidade, paladar, os efeitos colaterais, o custo e a frequência da dose (Sena e Pedrosa, 2005).

De acordo com o seu papel antioxidante, o Zn tem um efeito determinante sobre o nível de estresse oxidativo que ocorre nos testículos. Assim, em ratos alimentados com uma dieta

deficiente em Zn observa-se diminuição no potencial antioxidante testicular e no aumento concomitante da peroxidação lipídica neste órgão (Aitken e Roman, 2008).

O Zn está envolvido na estabilização de membranas celulares e na proteção celular, prevenindo a peroxidação lipídica (Merrells et al., 2009). As propriedades antioxidantes do Zn são justificadas: pelo seu papel na regulação da síntese da metalotioneína, na estrutura da enzima superóxido dismutase e na proteção de grupamentos sulfidríla de proteínas de membranas celulares, onde promove a inibição da produção de espécies reativas de oxigênio por antagonismo com metais pró-oxidantes, como ferro e cobre (Powell, 2000; Koury e Donangelo, 2003).

O Zn é um elemento essencial para a fertilidade de machos de mamíferos (Merrells et al., 2009), com participação ativa na síntese do DNA, no metabolismo dos ácidos nucleicos e de proteínas. Segundo esses autores as células em rápido processo de divisão, crescimento ou síntese são particularmente afetadas pela deficiência deste elemento, como ocorre nos processos reprodutivos em mamíferos. Em humanos, o Zn é necessário para a formação e maturação de espermatozoides, na ovulação e para a fertilização.

Teores de Zn são, geralmente, mais baixos em homens inférteis, com redução na produção e qualidade dos espermatozoides (Cambiaghi e Castellotti, 2004). A deficiência de Zn compromete a atividade da primeira enzima conversora da angiotensina (ECA), o que leva à depleção de testosterona e à inibição da espermatogênese (Henriques et al., 2003). O decréscimo na área da secção transversal de túbulos seminíferos em ratos com deficiência de Zn pode indicar redução no número de células germinativas e de Sertoli (Ebisch et al., 2007).

Várias enzimas envolvidas na síntese de DNA são dependentes de Zn, sendo a etapa de duplicação do DNA importante para desenvolvimento das células germinativas, pois nas divisões celulares, tanto as mitóticas, na fase proliferativa, quanto as divisões meióticas, na etapa reducional e equacional dependem de uma duplicação prévia do DNA na interfase (Kerr et al., 2006). O zinco apresenta propriedades anti-apoptóticas, primeiramente inibindo as caspases e, depois, suprimindo o cálcio e o magnésio das endonucleases que causariam a fragmentação do DNA (Chimienti et al., 2003). O Zn pode, também, evitar a oxidação dos compostos ligando-se a grupos sulfidríl em proteínas e ocupando sítios de ligação de ferro e cobre em lipídios, proteínas e DNA (Zago e Oteiza, 2001). Deficiências em qualquer um dos micronutrientes essenciais tem impacto em todos os componentes da fertilidade. A deficiência de Zn promove a diminuição da libido e da qualidade do sêmen, enquanto a suplementação

evita danos à membrana plasmática do espermatozóide, melhorando assim os parâmetros de fertilidade do sêmen (Blomfield, 2010).

Segundo Ebisch et al. (2007), as funções do Zn na reprodução do macho incluem desenvolvimento testicular, consumo de oxigênio pelo espermatozóide (Eliasson et al., 1971), condensação e estabilização da cromatina do espermatozóide (Kvist, 1990), reação acrossômica (Riffo et al., 1992), atividade da acrosina (Steven et al., 1982), conversão de testosterona para 5 α -dihydrotestosterona (Netter et al., 1981), síntese de testosterona (Leake et al., 1984) e a esteroidogênese testicular (Favier, 1992).

1.4. VITAMINA E

Em alguns animais domésticos, deficiências graves de vitaminas A e E e de selênio têm sido associadas à redução da espermatogênese (Ebish et al., 2007). Porém, Hong et al. (2010), trabalhando com bodes (*Capra hircus*) não encontraram resultados significativos entre os animais controle e aqueles que tiveram suplementação com altos níveis de vitamina E. Assim, é possível que o corpo regule a absorção de minerais e vitaminas para evitar danos à espermatogênese, como resultado de altas concentrações de antioxidantes.

A vitamina E (α , β -, γ -e δ -tocoferóis e α , β -, γ -e δ -tocotrienol) é considerada o mais poderoso antioxidante lipossolúvel protetor da membrana (Castellini et al., 2006; Deichsel et al., 2008; Gliozzi et al., 2009). O α -tocoferol possui maior atividade biológica comparado aos demais compostos denominados de vitamina E, maior absorção intestinal e deposição nos tecidos, menor excreção fecal e é mais lentamente oxidado. Como antioxidante celular, a vitamina E intervém nos processos oxidativos estabilizando os ácidos graxos poliinsaturados da fração lipídica das membranas celulares. Assim, evita a formação de lipoperóxidos tóxicos impedindo a formação de lesões nos vasos sanguíneos e alteração na permeabilidade celular (Barreto, 1998).

No homem, a vitamina E é absorvida junto com subprodutos da dieta lipídica no íleo. Os tocoferóis são remontados juntamente com triacilgliceróis, colesterol, fosfolípidios e lipoproteínas, constituindo os quilomícrons. No decurso da lipólise dos quilomícrons, uma parte da vitamina E é distribuída para os tecidos periféricos e o restante é direcionado ao fígado (Bjorneboe et al., 1986),

A lipase lipoprotéica aumenta a transferência de tocoferol a partir de quilomícrons, para células do músculo esquelético. Apenas 35% do α -tocoferol ainda permanecem em

quilomícrons linfáticos, duas horas depois de ingerido (Zingg e Azzi, 2004). Após várias formas de tocoferol (α , β , γ , δ) serem absorvidas no intestino delgado, concentrações séricas de α -tocoferol aumentam e ocorre seu armazenamento no fígado (Zingg e Azzi, 2004).

O fígado utiliza preferencialmente α -tocoferol através da proteína de transferência de α -tocoferol (α -TTP), metabolizando e excretando a vitamina E (Mustacich et al., 2006). O α -TTP é expresso, principalmente, no fígado e em menor proporção no cérebro, retina, linfócitos e fibroblastos (Zingg e Azzi, 2004). A α -TTP desempenha, assim, papel importante na determinação do nível de vitamina E no plasma. A α -TTP atua no transporte intracelular, na retenção de α -tocoferol em hepatócitos, por triagem, e para incorporá-lo em VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade). Os tocoferóis, em conjunto com triacilgliceróis, fosfolípidios, colesterol e apolipoproteínas são reagrupados em quilomícrons no complexo de Golgi das células da mucosa intestinal (Brigelius-Flohe e Traber, 1999), estocados em pequenos grãos, e excretados por exocitose para o compartimento linfático, depois para a corrente sanguínea (Azzi e Stocker, 2000), e finalmente seguem para o fígado (Nakamura et al., 1998). Como a vitamina E é insolúvel em água, sua distribuição intracelular deve ocorrer tanto na membrana de vesículas, quanto vinculada à proteínas específicas de transporte (Zing e Azzi, 2004)

Concentrações mais elevadas de vitamina E têm sido descritas em organelas como complexo de Golgi, lisossomos e mitocôndrias. Maior quantidade de α -tocoferol está localizada nas frações mitocondriais e no retículo endoplasmático, enquanto uma menor quantidade localiza-se no citosol e peroxissomos. Na mitocôndria, o maior teor de α -tocoferol é encontrado na membrana interna (83,7%) comparado à membrana externa (14,3%) (Zimerer, 2007).

A vitamina E regula processos biológicos, como eliminação de EROs, sinalização celular, função imunológica, atividade de expressão gênica e apoptose (Castellini et al., 2006).

A adição de níveis baixos a moderados de vitamina E em dietas de bodes (*Capra hircus*) e de bovinos (*Bos taurus*) (Hong et al., 2010) resultou em aumento da atividade da SOD e a capacidade antioxidante. As vitaminas E e C, ou uma combinação das duas, na suplementação em água potável, podem reduzir a produção de EROs e aumentar os parâmetros da fertilidade em coelhos (Gliozzi et al., 2009).

Castellini et al., (2006) relacionaram a suplementação de vitamina E com qualidade do sêmen em carneiros (*Ovis aries*), porcos (*Sus domesticus*) e coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)

com o aumento do conteúdo dessa vitamina no soro, fígado, e testículo e com o aumento da capacidade antioxidante do testículo (Hong et al., 2010). Na alimentação, baixos níveis de vitamina E, juntamente com 100 UI/dia de vitamina A, tem demonstrado benefício na reprodução de éguas (*Equus caballus*) falhadas (NRC, 2007). Estudos indicaram que a suplementação de Vitamina E protege o testículo de danos por peroxidação, exercendo efeito protetor em esteroidogênese (Chen et al., 2005, Merrells et al., 2009, Blomfield, 2010).

Pesquisas envolvendo vários pacientes demonstraram as diferentes formas de respostas à vitamina E, a qual pode alcançar diferentes níveis plasmáticos após a suplementação. As concentrações dessa vitamina podem variar em diferentes indivíduos, como consequência do consumo excessivo ou por absorção e transporte deficientes no plasma e tecidos (Pfluger et al., 2004). Polimorfismos e níveis de expressão celular de proteínas de ligação a tocoferol, poderiam explicar a resposta individual na absorção de vitamina E e a suscetibilidade diferencial de doenças como aterosclerose, certos cânceres e doenças neurodegenerativas (Zingg e Azzi, 2004).

Relatos de efeitos adversos de suplementos de vitamina E em seres humanos são raros. A *Food and Nutrition Board* definiu o nível de tolerância superior para α -tocoferol em 1000 mg por dia, utilizando dados de estudos em ratos adultos alimentados com níveis elevados de vitamina E na dieta (Traber et al., 2007). No entanto, Miller et al. (2005) relataram alguns casos de mortalidade em ensaios com humanos, com doses suplementadas de 400 UI de vitamina E. Chen et al. (2005) utilizaram doses de 3,63 UI /Kg de vitamina E por longos períodos e relataram danos aos rins, em humanos.

As necessidades de vitamina E estão relacionadas com a quantidade de ácidos graxos polinsaturados consumidos na dieta, isto é, quanto mais elevada a quantidade de ácidos polinsaturados, maior a quantidade de vitamina E necessária (Schneider, 2005). A presença de outros antioxidantes, tais como a vitamina C e o beta-caroteno, auxiliam a ação antioxidante e protetora da vitamina E, o que vale também para o selênio (Pfluger et al., 2004). Até o presente momento não há estudos avaliando a ação antioxidante do Zn associado à vitamina E no organismo, muito menos em parâmetros reprodutivos de machos.

1.5. INTERAÇÃO ENTRE ZINCO E VITAMINA E

É provável que haja interação do Zn com a vitamina E, como antioxidantes, já que o status de vitamina E é prejudicado em mamíferos com deficiência de zinco (Kim et al., 1998;

Salgueiro et al., 2000). O antagonismo de vitaminas em relação ao Zn pode ocorrer, direta ou indiretamente. Como exemplo, as vitaminas E e B1, ao estimular a produção de hormônios anabolizantes pela adrenal, podem induzir a deficiência de Zn por aumentar sua exigência durante o anabolismo e as vitaminas A, B1, B3, B5, B6 e vitamina E são consideradas sinérgicas com o Zn (Watts, 1988). Dentro de uma faixa fisiológica, um nutriente pode agir como um agente sinérgico metabólico ao Zn, embora em maiores quantidades possam antagonizar as funções metabólicas e/ou absorção de Zn. Como exemplo, mesmo o Cu (cobre) sendo considerado um mineral antagônico ao Zn, ele também pode ser considerado sinérgico metabolicamente, já que ambos são necessários para a síntese normal de colágeno (Watts, 1988).

1.6. ORGANIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL DO TESTÍCULO

O testículo de mamíferos é dividido em dois compartimentos: o tubular e o intertubular. O primeiro é formado pelos túbulos seminíferos, constituídos por túnica própria, epitélio germinativo, composto por célula de Sertoli e células espermatogênicas e o lúmen. O segundo compartimento, o intertúbulo, é formado pelas células de Leydig que representam a porção endócrina dos testículos de mamífero, e por células do tecido conjuntivo (macrófagos, mastócitos e fibroblastos), além de vasos sanguíneos e linfáticos (Russell et al., 1990). Os roedores, em geral, apresentam um padrão de intertúbulo em que as células de Leydig e o tecido conjuntivo localizam-se em sua maior parte, em torno do espaço linfático (Fawcett et al., 1973).

1.7. ESPERMATOGÊNESE

A espermatogênese é um processo sincrônico, onde uma espermatogônia diplóide sofre várias divisões e ao final se diferencia gradativamente em uma célula haplóide, altamente especializada, o espermatozóide. Esse processo pode durar de 30 a 75 dias nos mamíferos (França et al., 2005). A espermatogênese pode ser dividida através de critérios morfológicos e funcionais em três fases: a fase proliferativa, a fase meiótica e a fase espermiogênica. Na primeira fase proliferativa ocorrem mitoses sucessivas nas espermatogônias, para aumentar o

número de células para em sequência, iniciar o processo de meiose. As divisões mitóticas são responsáveis pela manutenção do *pool* de espermatogônias (Kierszenbaum, 2008).

As espermatogônias são células diplóides localizadas no ambiente basal do epitélio seminífero, abaixo das junções de oclusão, entre as células de Sertoli, portanto, fora da barreira hematotesticular. Elas derivam de células-tronco e iniciam suas divisões mitóticas no início da puberdade. Há três tipos principais de espermatogônias: A, intermediária e B, que se diferenciam principalmente pela morfologia de seu núcleo (Russell et al., 1990; França et al., 2005).

As células tronco espermatogoniais têm implicações importantes na fertilidade masculina, pois têm a capacidade de repopular o testículo e gerar células germinativas comprometidas com a formação de espermatozóides (autorrenovação ou diferenciação). Situam-se em locais específicos (nichos) em camundongos, ratos e hamsteres (De Rooij, 2009; Nascimento et al., 2009).

As células de Sertoli secretam fatores de crescimento que ajudam na formação do nicho e regulam a autorrenovação das espermatogônias tronco, além de fatores que promovem a diferenciação, como a activina A, o gene BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4) e SCF (supercoiling factor). As células de Leydig contribuem também com a secreção do CSF1 (supercoiling factor 1) que pode ajudar na formação e manutenção do nicho (Chen et al., 2005; de Rooij, 2009; Lucas et al., 2009).

Após a primeira fase, conhecida como proliferativa ou mitótica, os espermatócitos primários se originam após as espermatogônias B passarem pelo período S interfásico e originarem os preleptótenos. Portanto, os espermatócitos possuem o DNA duplicado em relação à espermatogônia que o originou, além de ocorrer também a recombinação gênica, na primeira divisão meiótica. Na segunda divisão (meiose II) cada espermatócito secundário originará duas espermátides haplóides. A terceira fase é a espermiogênese, na qual as espermátides arredondadas sofrem profundas alterações morfológicas e bioquímicas formando células alongadas, apropriadas para a fecundação do ovócito, os espermatozóides (Sharpe, 1994).

O epitélio germinativo pode sofrer perdas, principalmente durante as fases mitótica e meiótica. Essas perdas são mais comuns no processo mitótico e ocorrem por apoptoses e degeneração (França et al., 2005).

As células germinativas encontram-se em associações celulares especiais, de forma cíclica, nos túbulos seminíferos de indivíduos sexualmente maduros, constituindo os estádios.

Em roedores, cada secção transversal do túbulo seminífero comporta um único estágio (Russell et al., 1990). Estes estágios podem ser classificados de acordo com o método da morfologia tubular que baseia-se na forma e localização do núcleo das espermatídes e ocorrência de divisões meióticas, obtendo-se oito estágios do ciclo (Berntson, 1977; França e Russell et al., 1990).

Ocorrem ao longo do tempo mudanças constantes e cíclicas das associações celulares, em uma determinada secção transversal do túbulo seminífero (França, 2005). O conhecimento desse ciclo é fundamental para o entendimento e aplicação de técnicas para quantificar a espermatogênese (Berndtson, 1977).

1.8. CÉLULA DE SERTOLI

A célula de Sertoli, também chamada célula de suporte, ramificada, *nurse cell* e célula de sustentação é o elemento chave do processo espermatogênico, além de ser considerada uma das mais complexas células animais do ponto de vista morfofisiológico (Carvalho e Buzato, 2005).

A partir da puberdade, a célula de Sertoli não se divide mais, constituindo uma população estável no epitélio seminífero sendo raras as mortes dessas células por apoptose. Ocupam de 11 a 40% do volume do túbulo seminífero e apresentam um perfil irregularmente colunar (Carvalho e Buzato, 2005). Fazem contato com a membrana basal, com outras células de Sertoli nos locais da barreira hematotesticular (junções oclusivas que separam o ambiente basal do adluminal), além de contato com células germinativas arredondadas e espermatídes alongadas nas criptas. Na região basal as células de Sertoli possuem hemidesmossomos ancorados à membrana basal. O volume dessas células varia de 2000 a 8000 μm^3 e o seu volume nuclear é de 500 μm^3 , em ratos. Junto às espermatídes há especializações ectoplasmáticas que orientam, sustentam e movimentam as espermatídes, principalmente no seu processo de alongamento e migração (Russell et al., 1990; França e Russell, 1998).

A barreira hematotesticular possui inúmeras proteínas componentes do complexo juncional e, por esse fato, acredita-se que o epitélio seminífero seja o epitélio mais coeso do corpo do animal. As junções de oclusão dividem o epitélio seminífero em dois ambientes: basal e adluminal. O primeiro contém espermatogônias e espermatócitos e o segundo células mais avançadas como espermatócitos e espermatídes. A barreira cria um ambiente isolado do sistema imunitário impedindo que as células acima da barreira tenham contato com elementos

de defesa, protegendo os espermatócitos e espermátides de reações auto-imunes. As células acima da barreira são nutridas exclusivamente pela célula de Sertoli (Kierszenbaum, 2008).

No sobrenadante de culturas enriquecidas com células de Sertoli foram identificadas mais de 10 proteínas, cuja secreção é sensível entre outros, a estímulos hormonais (Pereira e Garcia e Costa, 2002). Uma dessas proteínas, a proteína ligada a andrógenos (ABP) se liga a testosterona e hidroxitesterona, sintetizadas pelas células de Leydig, um importante fator para a maturação das células germinativas (O'Donnell et al., 2006). Outra proteína importante é a transferrina testicular, sintetizada pelas células de Sertoli estimulada pelo contato com células da linhagem germinativa. Este estímulo varia com os estádios de desenvolvimento daquelas células. Este fato demonstra a sensibilidade das células de Sertoli a fatores provenientes das células da linha germinativa. A inibina, outra proteína sintetizada pela célula de Sertoli, faz um *feedback* negativo para o FSH na hipófise (Stocco & McPhaul, 2006).

As células de Sertoli fagocitam o citoplasma restante das espermátides, os corpos residuais e produzem fluidos em direção ao lume tubular. Uma das principais funções da célula de Sertoli é criar um ambiente apropriado para a proliferação de células germinativas e orientar sua maturação e ascensão até o lume (Russell et al., 1990; França & Russell, 1998; Sherwood, 2011). Alterações nas células de Sertoli podem resultar em perda de células germinativas e subsequente infertilidade (Boekelheide et al., 2000). A ação dos andrógenos na espermatogênese ocorre por meio da célula de Sertoli, pelo fato das células germinativas não possuírem receptores para os mesmos (Lyu e Handelsman, 2003).

1.9. CÉLULA DE LEYDIG

Os ratos possuem um pequeno número de células de Leydig que se localizam em torno do espaço linfático e de vasos sanguíneos (Fawcett et al., 1973; Foley, 2001). As células de Leydig são poliédricas, com 15 µm de diâmetro, têm um pequeno núcleo, mitocôndrias com cristas tubulares, abundante retículo endoplasmático liso e aparelho de Golgi bem desenvolvido, além de retículo rugoso e numerosas gotículas lipídicas (Carvalho e Buzzato, 2004).

Apesar de existir grande variação entre as diferentes espécies quanto à proporção volumétrica (%) dos diferentes componentes do compartimento intertubular, a célula de Leydig é o tipo predominante neste compartimento, sendo responsável pela produção de esteróides (Russell, 1996; Godinho, 1999). Além disso, a célula de Leydig é o elemento

constituente do compartimento intertubular que apresenta maior variação percentual entre as espécies já estudadas (Navarro et al., 2010). A quantidade de células de Leydig necessária para produção de hormônios por animal depende da quantidade de hormônio luteinizante (LH) disponível; do número de receptores de LH por célula; da quantidade de testosterona que a célula de Leydig é capaz de secretar em um dado tempo; da velocidade pela qual a testosterona deixa o testículo via vasos linfáticos, via vasos sanguíneos e fluido seminal; do volume sanguíneo do animal e da taxa de metabolismo da testosterona (Russell et al., 1994.; Russell, 1996).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitken, R.J., Roman, S.D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 636:154-171, 2008.
- Andrade, E.R., Melo-Streza, F.A., Seneda, M.M., Alfieri, A.A. Consequências das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 34:79-85, 2010.
- Antunes, M.F.R. Interação competitiva do zinco e do ferro após administração oral e venosa de zinco em crianças eutróficas. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). UFV, Viçosa, 2010. 66p.
- Audet, I., Berube, N., Bailey, J.L., Laforest, J.P., Quesnel, H., Matte, J.J. Effects of dietary vitamin supplementation and semen collection frequency on hormonal profile during ejaculation in the boar. *Theriogenology*, 71:334-341, 2009.
- Azzi, A., Stocker, A. Vitamin E: non-antioxidant roles. *Progress in Lipid Research*, Oxford, 39: 231-255, 2000.
- Barreto, S.L.T. Níveis de proteína e vitamina E para matrizes de frangos de corte na fase de produção. (Tese de Doutorado em Veterinária). UFMG. Belo Horizonte, 1998. 171p.

- Bedwal, R.S., Bahuguna, A. Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia*, 50:626–640, 1994.
- Berndtson, W.E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *Journal Animal Science*, 64:241-246, 1977.
- Bjorneboe, A., Bjorneboe, G.E., Bodd, E., Hagen, B.F., Kveseth, N., Drevon, C. A. Transport and distribution of alfatocopherol in lymph, serum and liver cells in rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, 889:310-315, 1986.
- Blomfield, J.A. Evaluation of dietary supplementation with antioxidants on fertility parameters in stallions. Thesis (Master of Science in Biological Science). The University Waikato, 2010. 176p.
- Boekelheide, K., Fleming, S.L., Johnson, K.J., Patel, S.R., Schoenfeld, H.A. Role of Sertoli cells injury, associated testicular germ cell apoptosis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 225:105-115, 2000.
- Brigelius-Flohe, R., Traber, M.G. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB Journal*, Bethesda, 13:1145-1155, 1999.
- Cambiaghi, A.S., Castellotti, D.S. Fertilidade Natural. De volta ao passado a caminho do futuro. São Paulo, La Vida Press, 33-40, 2004.
- Cantilli, R., Abernathy, C.O., Donohue, J. Derivation of the reference dose for zinc. In: Mertz, W., Abernathy, C.O., Olin, S. eds. Risk assessment of essential elements. Washington, DC: ILSI Press, 113-125, 1994.
- Carvalho, H.F., Buzato, C.B.C. Células-Uma abordagem multidisciplinar. *Manole*, Campinas, 302-323, 2005.
- Castellini, C., Cardinali, R., Dal Bosco, A., Minelli, A., Camici, O. Lipid composition of the main fractions of rabbit semen. *Theriogenology*, 65:703-712, 2006.
- Chen, H., Liu, J., Luo, L., Baig, M.U., Kim, J.M., Zirkin, B.R. Vitamin E aging and Leydig cell steroidogenesis. *Experimental Gerontology*, 40:728-736, 2005.
- Chimienti, F., Aouffen, M., Favier, A., Seve, M. Zinc homeostasis regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate. *Current Drug Targets*, 4:323-338, 2003.
- Choudhury, H., Stedeord, D., Donohue, J., Ingerman, L., Osier, M., Fransen, M., MacDonald, A.R. Toxicological Review of Zn and compounds In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS), EPA/635/R-05/002, 2005. 83p

- Cousins, R.J., McMahon, R.J. Zinc and Health: Current Status and Future Directions Integrative Aspects of Zinc Transporters. American Society for Nutritional Sciences, 1384-1387, 2000.
- Cozzolino, S.M.F. Biodisponibilidade de nutrientes. Barueri: Manole, 2005. 878p.
- Deichsel, K., Palm, F., Koblischke, P., Budik, S., Aurich, C. Effect of a dietary antioxidant supplementation on semen quality in pony stallions. *Theriogenology*, 69:940-945, 2008.
- De Rooij, D.G. The spermatogonial stem cell niche. *Microscopy Research Technique*, 72:580-585, 2009.
- Ebisch, I.M.W., Thomas, C.M.G., Peters, W.H.M., Braat, D.D.M., Steegers-Theunissen, R.P.M. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Human Reproduction Update*, 13:163-174, 2007.
- Elinder, C. G., Friberg, I. Cobalt. In: *Handbook on the toxicology of metals 2ed*. Amsterdam: Elsevier, 9:68-78, 1986.
- Eliasson, R., Johnsen, O., Lindholmer, C. Effect of zinc on human sperm respiration. *Life Sciences I*, 10:1317-1320, 1971.
- Eskenazi, B., Kidd, S.A., Marks, A.R., Slotter, E., Block, G., Wyroke, A.J. Antioxidants intake is associated with semen quality in healthy men. *Human Reproduction*, 20:1006-1012, 2005.
- Favier, A.E. The role of zinc in reproduction. Hormonal mechanisms. *Biological Trace Element Research*, 32:363-82, 1992.
- Fawcett, D. W., Neaves, W. B., Flores, M.N. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of Reproduction*, 9:500-532, 1973.
- Ferreira, A.L.A., Matsubara, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 43:1-16, 1997.
- Ferreira, A.P., Horta, M.A.P., Cunha, C.L.M. Avaliação das concentrações de metais pesados no sedimento, na água e nos órgãos de *Nycticorax nycticorax* (Garça-da-noite) na Baía de Sepetiba, RJ, Brasil. *Revista da Gestão Costeira Integrada*, 10:229-241, 2010.
- Fisberg, M., Barrero, M.J.L., Castillo-Duran, C., Martinez, F.E., Schwartzman, J.S., Braga, J.A.P., Martini, L.A., Albuquerque, M.P., Amâncio, O.M.S., Nannig, P.M., Tumas, R., Cozzolino, S.M.F. O papel dos nutrientes no crescimento e desenvolvimento infantil. São Paulo: Sarvier, 65-80, 2008. 186p.

- Foley, G.L. Overview of male reproductive pathology. *Toxicologic Pathology*, 29:49-63, 2001.
- França, L.R., Avelar, G.F., Almeida, F.F. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals, with emphasis on pigs. *Theriogenology*, 63:300-18, 2005.
- Gliozzi, T.M., Zaniboni, L., Maldjian, A., Luzi, F., Maertens, L., Cerolini, S. Quality and lipid composition of spermatozoa in habits fed DHA and vitamin E rich diets. *Theriogenology*, 71:910-919, 2009.
- Godinho, C.L. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). UFMG, Belo Horizonte, 1999. 74p.
- Hambidge, M. Human Zinc Deficiency. *Journal of Nutrition*, 130:1344-1349, 2000.
- Henriques, G. S., Hirata, M. H., Cozzolino, S. M.S. Aspectos recentes da absorção e biodisponibilidade do zinco e suas correlações com a fisiologia da isoforma testicular da Enzima Conversora de Angiotensina. *Revista de Nutrição*, 16:333-345, 2003.
- Hong, Z., Hailin, L., Hui, M., Guijie, Z., Leyan, Y., Dubing, Y. Effect of vitamin E supplement in diet on antioxidant ability of testis in boar goat. *Animal Reproduction Science*, 117:90-94, 2010.
- Kerr, J.B., Loveland, K.L., O'Bryan, M.K., Kretser, D.M. Cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms. In: Neill, J. D. (ed.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Third Edition, 827-947, 2006.
- Kieling, D.D. Enzimas-Aspectos Gerais. Centro Tecnológico-UFSC, 1-15, 2002.
- Kierszenbaum, A.L. *Histologia e Biologia Celular-Uma introdução à Patologia*. Mosby-Elsevier, 2 ed. Rio de Janeiro, 2008. 677p.
- Kim, E. S., Noh, S.K., Koo, S.I. Marginal zinc deficiency lowers the lymphatic absorption of α -tocopherol in rats. *Journal of Nutrition*, 128:265-270, 1998.
- Koury, J.C., Donangelo, C.M. Zinco, Estresse oxidativo e atividade física. *Revista de Nutrição*, 16:433-441, 2003.
- Kvist, U., Kjellberg, S., Bjorndahl, L., Soufir, J.C., Arver, S. Seminal fluid from men with agenesis of the Wolffian ducts: zinc-binding properties and effects on sperm chromatin stability. *International Journal of Andrology*, 13:245-252, 1990.
- Leake, A., Chisholm, G.D., Habib, F.K. The effect of zinc on the 5 α reduction of testosterone by the hyperplastic human prostate gland. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 20:651-655, 1984.

- Lucas, B., Fields, C., Hofmann, M.C. Signaling pathways in spermatogonial stem cells and their disruption by toxicants. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today Reviews*, 87:35-42, 2009.
- Lyu, P.Y., Handelsman, D.J. The present and future state of hormonal treatment for male infertility. *Human Reproduction Update*, 9:9-23, 2003.
- MacCall, K.A., Huang, C., Fierk, C.A. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *Journal of Nutrition*, 130:1437-1446, 2000.
- Mafra, D., Cozzolino, S. M. F. Importância do zinco na nutrição humana. *Revista de Nutrição*, 17:79-87, 2004.
- Mahomed, K., James, D.K., Golding, J. Zinc supplementation during pregnancy: a double blind randomized controlled trial. *British Medical Journal*, 299:826-830, 1989.
- Maia, M.S. Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ERO) no semen ovino, criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), Trolox-C e catalase. Tese (Doutorado em Veterinária e Zootecnia)- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.165p.
- Maneesh, M., Jayalekshmi, H. Role of reactive oxygens species and antioxidants of pathophysiology of male reproduction. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 21:80-89, 2006.
- Marcos, E.N.F. Estado nutricional e níveis plasmáticos de zinco de crianças com deficiência mental, de uma Instituição de Educação especial do Sul do Brasil. Dissertação (Mestrado em Nutrição). Universidade Federal de Santa Catarina, 2008. 132 p.
- Maret, W., Sandstead, H.H. Zinc requirements and risks and benefits of zinc supplementation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 20:3-18, 2006.
- Merrells, K. J., Blewett, H., Jamieson, J. A., Taylor C. G., Suh, M. Relationship between abnormal sperm morphology induced by dietary zinc deficiency and lipid composition in testes of growing rats. *British Journal of Nutrition*, 102:226-232, 2009.
- Miller, E.R., Pastor-Barriuso, R., Dalal, D., Riemersma, R.A., Appel, L.J., Guallar, E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Annals of Internal Medicine*, 142:37-46, 2005.
- Nakamura, T., Reicher, H., Sattler, W. Comparison of RRR- α - and all-rac- α -tocopherol uptake by permanent rat skeletal muscle myoblasts (L6 cells): effects of exogenous lipoprotein lipase. *Lipids*, 33:1001-1008, 1998.

- Nascimento, H.F., Drumond, A.L., França, L.R., Chiarini-Garcia, H. Spermatogonial morphology, kinetics and niches in hamsters exposed to short- and long-photoperiod. *International Journal of Andrology*, 32:486-97, 2009.
- Navarro, R.D., Matta, S.L.P., Ribeiro Filho, O.P., Ferreira, W.M., Miranda, D.C., Pereira, F.K.S. Morfometria e desenvolvimento gonadal em *Oreochromis niloticus* suplementada com vitamina E. *Archivo de Zootecnia*, 59:519-528, 2010.
- Netter, A, Hartoma, R., Nahoul, K. Effect of zinc administration on plasma testosterone, dihydrotestosterone, and sperm count. *Archives of Andrology*, 7:69-73, 1981.
- Nordberg, J., Årner, E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31:1287-1312, 2001.
- National Research Council. Nutrient Requirements of Horses. National Academic Press, Washington, DC, 2007.
- O'Donnell, L., Meachem, S.J., Stanton, P.G., McLachlan, R.I. 2006. Endocrine Regulation of Spermatogenesis. In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Jimmy Neill (Ed.), 3rd Ed., Chapter 21, Elsevier. p. 1017-1069.
- Pattinson, S.E., Cousins, R.J. Zinc uptake and metabolism by hepatocytes. *Federation Proceedings*, 45:2805-2809, 1986.
- Pereira, M.L., Garcia e Costa, F. O significado biológico da célula de Sertoli na espermatogênese. Ed. Clara Pinto Corrêa, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 1-09, 2002.
- Pfluger, P., Kluth, D., Landes, N., Bumke-Vogt, C., Brigélius-Flohe, R. Vitamin E: underestimated as an antioxidant. *Redox Report*, 9:249-254, 2004.
- Powell, S.R. The antioxidant properties of zinc. *Journal of Nutrition*, 130:1447-54, 2000.
- Riffo, M., Leiva, S., Astudillo, J. Effect of zinc on human sperm motility and the acrosome reaction. *International Journal of Andrology*, 15:229-237, 1992.
- Russell, L.D., Sinha-Hikim, A.P., Etlin, R.A., Clegg, E.D. Mammalian spermatogenesis. In: Russell, L.D. Etlin, R.A., Sinha Hikim, A.P., Clegg, E.D. (eds). *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Cache River Press, 1:1-40, 1990.
- Russell, L.D., Chandrashekar, V., Bartke, A., Sinha-Hikim, A.F. The hamsters Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. *International Journal of Andrology*, 17:93-106, 1994.
- Russell, L.D. Mammalian Leydig Cell Structure. In: Payne, A. H., Hardy, M. P., Russell, L. D. *The Leydig cell*. Vienna IL: Cache River Press, 43-96, 1996.

- Salgueiro, M.J., Zubillaga, M., Lysionek, A., Sarabia, M.I., Caro, R., De Paoli, T., Hager, A., Weill, R., Boccio, J. Zinc as essential micronutrient: a review. *Nutrition Research*, 20:737-755, 2000.
- Sena, K.C.M., Pedrosa, L.F.C. Efeitos da suplementação com zinco sobre o crescimento, sistema imunológico e diabetes. *Revista de Nutrição*, 18:251-259, 2005.
- Schneider, C. Review-Chemistry and biology of vitamin E. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49:7-30, 2005.
- Sherwood, L. *Fisiologia Humana: Das células aos sistemas*. Cengage Learning, 7ed, São Paulo, 2011. 46p.
- Sharpe, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E., Neil, J.D. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, 2ed, New York: 1363-1434, 1994.
- Souza, J.D.A.S., Ferreira, W.M. O papel da vitamina E na nutrição e reprodução animal-meios de defesa contra os radicais livres. *Revista Eletrônica Nutritime*, 4:456-461, 2007.
- Steven, F.S., Griffin, M.M, Chantler, E.N. Inhibition of human and bovine sperm acrosin by divalent metal ions. Possible role of zinc as a regulator of acrosin activity. *International Journal of Andrology*, 5:401-412, 1982.
- Stocco, D.M.; McPhaul, M.J. 2006. Physiology of Testicular Steroidogenesis. In: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. Jimmy Neill (Ed.), 3rd Ed., Chapter 20, Elsevier. p. 977-1016.
- Traber, M.G., Atkinson, J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, 43:4-15, 2007.
- Tremellen, K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Human Reproduction Update*, 14:243–258, 2008.
- Umeta, M. Zinc Nutrition: An Overview. *Food and Nutrition Society of Ethiopia*, 01-03, 2000.
- Vallee, B.L., Falchuk, K.H. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews*, 73:79-118, 1993.
- Vernet, P., Faure, J., Dufaure, J.P., Drevet, J.R. Tissue and developmental distribution, dependence upon testicular factors and attachment to spermatozoa of GPX5, a murine epididymis-specific glutathione peroxidase. *Molecular Reproduction & Development*, 47:87-98, 1997.
- Vernet, P., Rigaudiere, N., Ghyselinck, N., Dufaure, J.P., Drevet, J.R. In vitro expression of a mouse tissue-specific glutathione peroxidase protein lacking selenocysteine can protect

- stably transfected mammalian cells against oxidative damage. *Biochemistry and Cell Biology*, 74:125-131, 1996.
- Vilarta, R., Cerri A.S., Martins, A.C.A., Affonso, C.V., Modeneze, D.M., Mantovani, E.P., Boccaletto, E.M.A., Murer, E., Deloroso, F.T., Oliveira, G., Júnior, G.B.V., Oliveira, J.D.F. Sonati, J.G., Massola, R.M. Panizza, R.M. Vilarta, R. *Alimentação Saudável, Atividade Física e Qualidade de Vida*. Campinas, IPES Editorial, 2007. 229p.
- Wastney, M.E., Aamodt, R.L., Rumble, W.F., Henkin, R.I. Kinetic analysis of zinc metabolism and its regulation in normal humans. *American Journal Physiology*, 251:398-408, 1986.
- Watts, D.L. The nutritional relationships of zinc. *Journal of Orthomolecular Medicine*, 3:63-67, 1988.
- Wong, W.Y., Merkus, H.M., Thomas, C.M. Menkveld, R., Zielhuis, G.A., Steegers-Theunissen, R.P. Effects of acid folic and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind randomized, placebo-controlled trial. *Fertility and Sterility*, 77:491-498, 2002.
- Yu, Y.Y., Kirschke, C.P., Huang, L. Immunohistochemical analysis of ZnT1, 4, 5, 6, and 7 in the mouse gastrointestinal tract. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 55:223-234, 2007.
- Zago, M.P., Oteiza, P.I. The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radical Biology Medicine*, 31:266-274, 2001.
- Zimerer, G.V. Consumo de alimentos funcionais com ação antioxidante e exercícios orientados de baixa intensidade em adultos podem influenciar na qualidade de vida. (Monografia) FAESI, São Miguel do Iguaçu, 2007. 96p.
- Zingg, J.M., Azzi, A. Non-antioxidant activities of vitamin E. *Current Medicinal Chemistry*, 11:1113-1133, 2004.

Capítulo 2

Estereologia de túbulos seminíferos de ratos Wistar submetidos a doses crescentes de zinco isolado e associado à α -tocoferol.

Resumo

A reprodução, como as outras funções metabólicas, é afetada pela carência nutricional de um ou mais elementos essenciais. Têm sido testadas várias associações de vitaminas e minerais na suplementação de dietas, com respostas importantes para a saúde de humanos e

animais. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação de zinco, associado ou não à α -tocoferol (α -Toc), sobre os parâmetros estereológicos de túbulos seminíferos de ratos Wistar adultos. Para tanto, 48 ratos com 90 dias de idade e peso vivo médio de 300 gramas foram utilizados no estudo. Os animais foram divididos em 7 grupos, sendo um controle e seis experimentais, e submetidos a seis tipos de tratamento, com duração de 56 dias. Os grupos I, II e III receberam Zn, na forma de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, nas doses de 5, 10 e 20 mg/dia, respectivamente. Os grupos IV, V e VI receberam as mesmas doses anteriores de Zn na água de beber, acrescidas de 15 mg de α -Toc, por gavagem, divididos em três doses semanais. O grupo controle (VII) recebeu somente água. Para padronizar os procedimentos foi realizada gavagem, com solução salina, nos grupos que não receberam (α -Toc). Análises estereológicas do compartimento tubular foram realizadas utilizando o programa Image Pro Plus. Foram comparadas as médias utilizando-se o teste SNK (Student Newman Keuls) com 5% de significância. Houve redução na proporção de túbulos seminíferos e de epitélio seminífero e aumento no número de espermatogônias e de espermatócito na fase de paquíteno nos ratos tratados com 10mg de Zn associado a α -Toc. Houve aumento na altura do epitélio nos ratos tratados com 5mg de Zn+ α -Toc, de células em preleptóteno/leptóteno nos ratos tratados com 10mg de Zn e 20mg de Zn, em paquíteno no grupo tratado com 5mg de Zn, de espermatídes arredondadas e no total de células germinativas no grupo 10mg de Zn. O índice mitótico aumentou nos ratos tratados com 20mg de Zn + α -Toc em relação a todos outros grupos. Dois grupos apresentaram melhor resposta aos tratamentos: o grupo de 10mg de Zn, no qual houve aumento das células em preleptóteno e de espermatídes arredondadas, e o grupo com 20mg de Zn + α -Toc, no qual foram observados aumentos no índice mitótico, importante no início do processo espermatogênico.

Palavras chave: espermatogênese, α -tocoferol, produção espermática, estereologia testicular.

1. Introdução

O processo reprodutivo, como outras funções do organismo, sofre efeitos da carência nutricional de um ou mais elementos essenciais, tais como vitaminas e minerais. Um dos graves problemas relacionados à reprodução é a infertilidade, que se caracteriza como um processo de desordem multifatorial (Carvalho et al., 2002) e que tem preocupado vários pesquisadores de diferentes centros de reprodução (Toppari et al., 2002; Habert et al., 2006; Bonde, 2010; Yiee e Baskin, 2010). Assim, fatores ambientais e nutricionais, como estilo de

vida, tipos de dietas, resíduos de pesticidas, metais pesados e estrógenos exógenos devem ser avaliados quando há distúrbios reprodutivos vinculados à espermatogênese (Sinclair, 2000).

A espermatogênese é um processo que ocorre nos túbulos seminíferos, pelo qual uma espermatogônia tronco, após sucessivas divisões e diferenciação, origina espermatozóides. Este processo envolve as células de Sertoli e as três classes de células germinativas: as espermatogônias, os espermatócitos e as espermátides (Sharpe, 1994). As espermatogônias sofrem divisões mitóticas incompletas, pois permanecem interligadas por pontes citoplasmáticas (Costa e Paula, 2006). Os espermatócitos sofrem meiose, que causa redução do seu número cromossômico, e as espermátides sofrem diferenciação em espermatozóides. A espermatogênese é regulada, intrinsecamente, pelas células de Leydig e Sertoli e, extrinsecamente, pelo eixo hipotálamo-hipofisário (Roser, 2000).

A espermatogênese é um processo que, além de demandar energia, necessita da ingestão de produtos como vitaminas, minerais e macronutrientes (Sinclair, 2000), que podem agir como antioxidantes. A qualidade do sêmen tem piorado nos últimos 50 anos, concomitante ao aumento da quantidade de produtos químicos e hormônios sintéticos introduzidos no ambiente e em alimentos (Multigner e Oliva, 2002). Desregulação ambiental e/ou desequilíbrio nutricional podem levar a redução da fertilidade masculina, podendo ser esta um indicador da alteração provocada por fatores ambientais ou pela dieta (Sinclair, 2000).

O zinco (Zn) é um dos mais importantes elementos-traço essenciais da nutrição humana e o segundo elemento de transição mais abundante no corpo de mamíferos, sendo importante para a síntese do DNA, para o metabolismo dos ácidos nucleicos e proteínas (Salgueiro et al., 2000). Desse modo, todos os sistemas do organismo são afetados pela deficiência de Zn, particularmente quando as células estão em acelerado processo de divisão, crescimento ou síntese (Merrells et al., 2009), como ocorre no processo de reprodução dos animais. O Zn é o único metal encontrado em grande quantidade no sêmen e tem sido mostrado que pode melhorar a qualidade do sêmen principalmente quando associado a outros antioxidantes, como vitaminas C, E e β -caroteno (Eskenazi et al., 2005). Em humanos, o Zn é necessário para a formação e maturação de espermatozóides, para a ovulação e para a fertilização (Merrells et al., 2009). Underwood (1977) demonstrou que a espermatogênese e o desenvolvimento primário e secundário dos órgãos sexuais em machos poderiam ser afetados negativamente pela deficiência de Zn. Adicionalmente, os efeitos da deficiência de Zn na dieta levam à maior suscetibilidade às infecções, retardo do crescimento e da função reprodutiva, diminuição da tiroxina plasmática em humanos, animais de experimentação e em

alguns animais domésticos (Prasad, 1984), indução da atrofia testicular, perda de espermátócitos e aumento de apoptoses em células espermatozóides, além de significativo decréscimo no diâmetro de túbulos seminíferos no homem (Woo et al., 1988).

Diversos estudos têm demonstrado que pacientes com infertilidade idiopática apresentam elevados níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos testículos, sugerindo um efeito causal para esse problema (Aitken e Roman, 2008). O Zn inibe as reações de propagação de radicais livres, atuando como antioxidante por induzir a síntese de metalotioneína, que armazena metais tóxicos numa forma não tóxica (Salgueiro et al., 2000). A metalotioneína tem ação antioxidante em condições como exposição a radiações, drogas e metais pesados, inibindo a propagação de radicais livres através de ligações seletivas de íons de metais pró-oxidantes como ferro e cobre, e dos potencialmente tóxicos como mercúrio e cádmio. Além disso, em situações de estresse oxidativo, a metalotioneína libera o zinco ligado à sua molécula e este inibe a peroxidação na membrana plasmática das células (Koury e Donangelo, 2003; Tapieiro e Tew, 2003; Mafra e Cozzolino, 2004).

O Zn é essencial para a integridade e funcionalidade das membranas celulares onde a sua concentração pode ser bastante elevada, dependendo do tipo celular e do estado nutricional. A redução ou falta de Zn pode afetar a função da membrana plasmática, alterando sua fluidez, o funcionamento dos canais de transporte de sódio e de cálcio, bem como o balanço hídrico e osmótico da célula (Koury e Donangelo, 2003).

Considerando-se a essencialidade do Zn, os suplementos dietéticos poderiam apresentar-se como uma estratégia para melhorar o cuidado à saúde em grupos populacionais susceptíveis à deficiência desse mineral. Conforme relataram Bettger e O'Dell (1993), ocorre a perda do mineral da membrana, mas não do Zn intracelular em eritrócitos de ratos deficientes em Zn. Estes pesquisadores sugerem que a perda de Zn pela membrana plasmática é um dos primeiros sinais de depleção deste mineral no organismo. A suplementação com vitaminas C e E, em ratos com deficiência de Zn, reduz a fragilidade dos eritrócitos mostrando atividade antioxidante (Moura, 2009).

Embora possam ocorrer processos de toxicidade do Zn na reprodução e no desenvolvimento testicular, em animais de laboratório que receberam doses orais (>25 mg/kg/dia) como observado por Saxena et al. (1989) e Evenson et al. (1993), a maioria dos estudos envolvendo o teor de Zn nos alimentos e capacidade reprodutiva de mamíferos estão relacionados à deficiência de Zn (Fosmire, 1976; Hurley et al., 1983; Bunk et al., 1989; Gilibert, et al., 1996; Kechrid et al., 2007).

A participação do Zn no processo reprodutivo pode envolver inúmeros aspectos como a fertilidade e a motilidade do espermatozóide, o crescimento testicular, a espessura do epitélio tubular, os teores de Zn no testículo e glândulas acessórias e a atuação desse mineral nos hormônios sexuais, o que reveste de complexidade o seu papel no sistema reprodutor masculino (Hidioglou e Knipfel, 1984).

Não foi encontrada na literatura investigação sobre a ação sinérgica do Zn e da vitamina E nos túbulos seminíferos. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação de diferentes doses de Zn, associadas ou não à vitamina E, na reprodução de machos adultos de ratos Wistar, através de análises morfométricas do compartimento tubular do testículo.

1.1. Objetivos Gerais

O presente trabalho objetivou analisar o efeito do zinco isolado ou em associação com o α -Tocoferol por meio da estereologia e morfometria de túbulos seminíferos de ratos Wistar adultos.

1.2. Objetivos Específicos

O estudo teve como objetivos analisar:

- peso corporal e peso gonadal;
- proporção volumétrica e volume de túbulo seminífero e intertúbulo;
- índice leidigossomático, índice tubulossomático e índice gonadossomático;
- diâmetro tubular, comprimento dos túbulos e altura do epitélio;
- número corrigido de célula germinativa por secção de túbulo no estágio um (1);
- índice mitótico, rendimento geral da espermatogênese e produção espermática diária (PED), índice meiótico, índice e suporte da célula de Sertoli;
- número total de células de Sertoli/testículo e por g/testículo;
- motilidade e vigor dos espermatozoides.

2. Material e métodos

2.1. Animais e grupos experimentais

Os procedimentos experimentais seguiram estritamente os indicados pelas normas para o uso de animais em ensino, pesquisa e extensão da Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Viçosa (Protocolo 001/11). Foram utilizados 56 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), em idade reprodutiva (90 dias), pesando entre 276 e 302 gramas, e provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram divididos em 7 grupos e mantidos em ambiente com temperatura controlada de 22°C e fotoperíodo de 12/12 horas, claro e escuro.

Os tratamentos foram administrados de duas maneiras: para os animais dos grupos I, II e III o Zn ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) foi fornecido na água de beber, nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/dia e para os animais dos grupos IV, V e VI, além das mesmas concentrações de Zn, foi ofertado 15 mg de α -Tocoferol (α -Toc) por gavagem, divididos em três doses semanais, usando como veículo o óleo de milho. A dose de α -Toc foi baseada em Sahinturk et al., 2007 e Batista et al., 2007 e as doses de Zn por Dreosti (1990) e Cantilli et al. (1994). Os animais do grupo VII não receberam qualquer tratamento e constituíram o grupo controle. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, forradas com serragem, sendo alimentados diariamente, pela manhã, com 30 g de ração comercial, da marca Labcil (SOCIL) peletizada, para animais de laboratório. O tratamento teve a duração de 56 dias.

Para manter o mesmo procedimento, os 24 animais tratados apenas com Zn e o grupo controle também foram submetidos à gavagem com solução salina, três vezes por semana pela manhã.

2.2. Coleta de amostras e preparação histológica

Os animais foram pesados e eutanasiados por CO_2 , seguindo-se a remoção dos testículos, próstata, vesícula seminal e epidídimo que foram pesados em balança de precisão (0,0001g) (Bel, Mark 210A).

A próstata foi retirada inteira, assim como a vesícula seminal e o epidídimo. O ducto deferente foi retirado inteiro com cuidado especial no trecho abaixo da próstata para não se fragmentar. A albugínea foi separada do testículo. A gordura foi afastada do epidídimo com uso de lâmina e pesada em separado.

Fragmentos do material coletado foram fixados e destinados às análises histológicas e fragmentos do testículo, epidídimo, próstata, vesícula seminal foram secos em estufa para determinação da concentração de Zn.

Os testículos foram fixados por imersão em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) e armazenados em etanol 70% para serem posteriormente processados. Fragmentos de um dos testículos foram submetidos à desidratação em concentrações crescentes de etanol, sendo posteriormente incluídos em metacrilato (Historesin[®]-Leica). Secções histológicas semi-seriadas de 3µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (Reichert-Jung, Alemanha), equipado com navalha de vidro, respeitando-se um intervalo de 40µm entre elas para obter diferentes túbulos e áreas do epitélio seminífero. As preparações foram coradas, rotineiramente, com azul de toluidina-borato de sódio 1%, montadas com Entellan[®] (Merck) e analisadas em microscópio de luz (Olympus BX-50). A morfometria das imagens capturadas em fotomicroscópio, com aumento de 100x foi realizada utilizando-se o programa Image Pro Plus[®].

2.3. Coleta e análise do sêmen

O sêmen contém alta concentração de Zn (Merrells et al., 2009) e antioxidantes (Ebisch et al., 2006) e é um parâmetro importante para avaliação da fertilidade sendo, por este motivo, também analisado no presente estudo.

O sêmen foi coletado diretamente da cauda do epidídimo, através de micropunção, para sua observação a fresco e na lâmina para avaliação do vigor e da motilidade. Cerca de 20 µL de sêmen foi colocado em lâmina de vidro e coberto com lamínula para avaliação em microscópio de contraste de fase com aumento de 200 vezes. Esses valores são avaliados subjetivamente, tanto para vigor (determinando-se um índice de 0 a 5) quanto para motilidade (porcentagem de espermatozoides móveis de 0 a 100) (Morais et al., 2002).

2.4. Determinação da concentração do Zn nos órgãos

Amostras de fragmento de próstata, testículo, vesícula seminal e epidídimo foram pesadas (peso fresco) e transferidas para estufa, a 70°C (24h), até que atingissem peso seco constante. As amostras pré-secas foram acondicionadas em Erlenmeyer de 25 mL, adicionando-se então 1,5 mL de ácido nítrico (HNO₃) na capela por 24h concentrado, 0,5 mL de ácido perclórico (HClO₄) 70%, 2 gotas de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30% e 1 gota de querosene para reduzir a formação de espuma. As amostras foram colocadas em bloco digestor cuja temperatura foi aumentada gradualmente até atingir 90°C, de forma a

proporcionar a digestão completa do material, sendo então completado o volume até 10 mL com água deionizada.

A determinação da concentração de Zn foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica (SpectrAA 220FS Varian). Após a diluição do material digerido, este foi aspirado pelo espectrofotômetro e exposto a uma chama de 1000°C para evaporação do líquido e exposição do metal. Este material foi em seguida exposto a uma lâmpada de Zn. Os elétrons foram então absorvidos e os não absorvidos foram detectados por um sensor que calculou a diferença. Estes valores foram depois comparados aos padrões de concentração previamente calculados. A leitura dá o valor da absorvância. Esse valor é multiplicado por 10 e depois dividido pela diferença do peso seco menos o peso do frasco para obter a quantidade do metal por grama de tecido.

2.5. Análises microscópicas e estereológicas

2.5.1. Proporções volumétricas e volume do parênquima

As proporções volumétricas do parênquima testicular, isto é as proporções de todo o testículo menos a albugínea, foram estimadas por contagem de 2.660 pontos por animal, projetados sobre imagens capturadas, em dez campos aleatoriamente distribuídos em diferentes cortes histológicos do testículo. Para isso, utilizou-se um retículo de 266 interseções (pontos) e imagens com aumento de 100 vezes. A proporção volumétrica de túbulo e intertúbulo foi então estimada por meio do percentual ocupado por estes componentes no parênquima testicular.

O volume do parênquima foi considerado como peso total do testículo menos o peso da respectiva albugínea. O peso testicular foi considerado como volume, devido ao fato da densidade volumétrica do testículo, em mamíferos, ser em torno de 1 (um) (Johnson et al., 1981; Costa et al., 2011).

2.5.2. Morfometria dos túbulos seminíferos

Foi obtido o diâmetro tubular médio por animal a partir da mensuração, ao acaso, de 20 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno o mais circular

possível. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi mensurada a altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada da túnica própria até o lúmen tubular.

Com base nesses resultados foi ainda calculado o comprimento total de túbulos seminíferos, por testículo e por grama de testículo. O comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo (metros) foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos mesmos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal, empregando-se a fórmula (Attal e Courot, 1963; Dorst e Sajonski, 1974): $CT = VTS/\pi R^2$, onde VTS = volume total de túbulos seminíferos; πR^2 = área da secção transversal dos túbulos seminíferos; R = diâmetro tubular/2.

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

2.5.3. Estereologia dos túbulos seminíferos e índice tubulossomático

Para cálculo dos volumes de epitélio seminífero, túbulo e intertúbulo utilizou-se a fórmula: $\text{Volume} = \% \text{ de epitélio, \% túbulo ou intertúbulo}/100 \times \text{peso parênquima de 1 testículo}$.

Baseado nos volumes de túbulos seminíferos e nos pesos corporais foi calculado o índice tubulossomático (ITS) a partir da fórmula $ITS = VT/PC \times 100$, onde VT = volume de túbulo seminífero e PC = peso (massa) corporal. Foi calculado também o IGS através do peso gonadal (PG) dividido pelo peso corporal (PC), indicando quanto da massa corporal está alocada nos testículos.

2.5.4. Populações celulares e diâmetro nuclear e nucleolar

Utilizando-se dez secções transversais de túbulos seminíferos de cada animal, no estágio um (1) do ciclo do epitélio seminífero (Berndtson, 1977), foram quantificadas as seguintes células: espermatogônia A (SPGA), espermatócito primário em pré-leptóteno/leptóteno (PLP), espermatócito primário em paquíteno (PAQ), espermatídes arredondadas (EAR) e células de Sertoli (CSE). Para corrigir as variações nos tamanhos destes tipos celulares, considerando-se a espessura do corte e o diâmetro nuclear ou nucleolar, no caso de célula de Sertoli, foi utilizada a seguinte fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann e Almquist (1962), sendo que NC=número corrigido e DM=diâmetro médio.

$$NC = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{Espessura do corte}}{\text{Espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{DM}{2}\right)^2 - \left(\frac{DM}{4}\right)^2}}$$

O diâmetro nuclear médio (DM) representa a média dos diâmetros dos 30 núcleos do tipo celular estudado, para cada animal. Os diâmetros nucleares foram medidos utilizando-se o programa de análise de imagens Image Pro Plus associado a microscópio Olympus BX-40, em aumento de 400 X. No caso das espermatogônias do tipo A, que apresenta núcleos ovóides, o valor utilizado foi aquele obtido pela média entre o diâmetro nuclear maior e menor. Os números de células de Sertoli foram corrigidos para o diâmetro nucleolar e espessura do corte histológico. Em virtude disso, contabilizou-se exclusivamente células de Sertoli com núcleo visível, o que proporcionou aplicação da mesma fórmula citada anteriormente (Amann e Almquist, 1962).

2.5.5. Razões celulares presentes no estágio 1 do túbulo seminífero

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

Foram calculados:

O coeficiente de mitoses espermatogoniais = PLP (nº de pré-leptóteno/leptóteno)/EAR (nº de espermátide arredondada); o índice meiótico = SPGA (nº de espermatogônia A)/PAQ (nº de paquíteno); o rendimento geral da espermatogênese = EAR (nº de espermátide arredondada)/ SPGA (nº de espermatogônia A); a eficiência da célula de Sertoli = EAR (espermátide arredondada)/ CSE (célula de Sertoli); a capacidade de suporte da célula de Sertoli = CGT (Total de célula germinativa)/ CSE (célula de Sertoli).

2.5.6. Morfometria de células de Sertoli

Foi calculado o número de células de Sertoli a partir do número corrigido de seus nucléolos por secção transversal de túbulo seminífero no estágio I e comprimento total de

túbulos seminíferos por testículo, segundo fórmula de Hochereau-de-Reviere e Lincoln (1978):

$$\text{N}^\circ \text{ de célula de Sertoli por testículo} = \frac{\text{Comprimento total de túbulos seminíferos por testículo } (\mu\text{m}) \times \text{N}^\circ \text{ corrigido de nucléolo de célula de Sertoli por secção transversal}}{\text{Espessura do corte}}$$

A partir deste cálculo, foi estimado o número de células de Sertoli por grama de testículo, utilizando-se a fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de célula de Sertoli/g de testículo} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de célula de Sertoli/testículo}}{\text{Peso bruto de 1 testículo}}$$

2.5.7. Cálculo da produção espermática diária por testículo e por grama de testículo

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

$$\text{PED} = \frac{\text{Volume total do túbulo seminífero } (\mu\text{m}^3) \times \text{N}^\circ \text{ corrigido de espermátides arredondadas}}{\text{Duração do ciclo do epitélio seminífero (dias)} \times \text{Área da secção transversal do túbulo seminífero no estágio 1 } (\mu\text{m}^2) \times \text{Espessura do corte histológico}}$$

Para se obter a produção espermática diária por grama de testículo, a produção espermática diária total foi dividida pelo peso bruto do testículo. A duração do ciclo do epitélio seminífero em ratos é de aproximadamente 12,4 dias (Russell et al., 1990; Van Haaster e De Rooij, 1993), sendo uma constante biológica espécie-específica.

2.6. Análises estatísticas

Após testes de normalidade (Lilliefors) e homocedasticidade (Cochran) foi realizada análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Student Newman Keuls (SNK) (5% de significância). Todos os resultados foram expressos em média±desvio padrão.

3. Resultados

Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais com o fornecimento de Zn isolado e em associação com α -Toc, nos valores de massa dos órgãos e estruturas do aparelho reprodutor: próstata, vesícula seminal, epidídimo, ducto deferente, da gordura epididimária, testículo, albugínea e parênquima testicular, assim como no índice gonadossomático (IGS) (Tabela 1).

A proporção volumétrica de epitélio seminífero apresentou-se reduzida nos ratos tratados com 10mg de Zn+ α -Toc, se comparado aos ratos tratados apenas com 10mg de Zn e ao grupo controle. A altura do epitélio seminífero aumentou nos animais tratados com 5mg de Zn + α -Toc, comparado ao controle. Não houve diferença nas proporções volumétricas de túbulo, de lume e da túnica própria, como também para os outros parâmetros analisados como diâmetro tubular, comprimento total de túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo, volume tubular e índice tubulossomático (ITS), comparando-se os grupos de tratamento (vide Tabela 2).

Não houve alteração no número de células de Sertoli (CSE). O número das espermatogônias A aumentou significativamente nos ratos tratados com 10mg de Zn+ α -Toc, enquanto que o número de espermátocitos em preleptóteno (PLP) foi maior nos animais tratados com 10 mg/Zn/dia e 20 mg/Zn/dia comparado ao controle. O número de espermátocitos em paquíteno (PAQ) apresentou aumento significativo nos ratos tratados com 10mg de Zn+ α -Toc e o número de espermátides arredondadas (EAR) foi maior nos animais tratados apenas com 10mg/Zndia. Houve aumento significativo do número total de células germinativas (CGT) nos animais tratados com 10mgZn/dia (vide Tabela 3) comparado ao controle.

Quanto às razões celulares, houve aumento significativo do índice mitótico (PLP/SPGA) no grupo VI (20mg Zn+ α -Toc) e redução no grupo I, que recebeu somente Zn (5mg). Houve redução no rendimento geral da espermatogênese (EAR/SPGA) nos grupos I e IV, 5mgZn/dia e 5mgZn+ α -Toc, respectivamente, enquanto o índice meiótico (EAR/PAQ) diminuiu no grupo I e V (5mg de Zn e 10mg de Zn+ α -Toc). A eficiência de célula de Sertoli (EAR/CSE), a capacidade de suporte das células de Sertoli (CGT/CSE), além da produção espermática diária (PED) apresentaram diferença entre os grupos, mas não em relação ao controle (vide Tabela 4).

A motilidade e o vigor dos espermatozóides não apresentaram diferença entre os grupos e o controle, mas houve diferença entre os grupos (vide Tabela 5).

Os órgãos que mais acumularam o Zn nos ratos tratados foram a próstata e o epidídimo, seguidos da vesícula seminal e do testículo que apresentaram quantidade de Zn semelhante (vide Tabela 6). Os dados obtidos não tiveram distribuição homogênea e por este fato não passaram por estatística.

4. Discussão

As massas corporais dos ratos tratados isoladamente com zinco (Zn) e com Zn associado a α -Toc não mostraram diferença entre os grupos, o que demonstrou a não interferência dessas substâncias na massa corporal dos animais. Saxena et al. (1989), ofertando 20 mg de zinco suplementar/kg/dia para ratos adultos machos, por três semanas, e 28 mg de zinco suplementar/kg/dia, por seis semanas, também não observaram alteração da massa corporal nos animais, ainda que essas dosagens pudessem ser tóxicas. Mesmo doses maiores, de até 60 mg de Zn inorgânico/Kg, envolvendo outras espécies animais, não têm causado alteração em suas massas (Oliveira et al., 2007). Dessa forma, considera-se que no presente experimento não houve efeito deletério nos testículos devido às dosagens de Zn fornecidas aos animais considerando as massas corporais avaliadas.

A massa dos testículos e dos órgãos sexuais acessórios também não apresentou diferença entre os tratamentos. O mesmo foi observado para a albugínea, o parênquima testicular e o IGS. Por consequência, índices associados à massa testicular, como a produção espermática diária (PED) por testículo e por grama de testículo, não sofreram variação. Segundo França e Russell (1998), a massa testicular pode ser utilizada como indicador quantitativo da produção espermática, pois é constituído principalmente de túbulos seminíferos. O tamanho do testículo e a produção espermática são influenciados por alterações no número de células de Sertoli (Carvalho e Buzato, 2005), e nenhum desses valores foi alterado neste trabalho.

A suplementação com doses de 25-35 mg Zn/dia, semelhantes aos utilizados no presente estudo (5-20mg), tem apresentado basicamente as mesmas respostas, conforme descrito por Smith (1984) sem influência na massa dos órgãos reprodutores. A suplementação de 20 e 28 mg Zn/kg/dia para ratos adultos machos, por três e seis semanas, respectivamente, não provocou alterações nas massas dos testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata (Saxena et al., 1989), mesmo as doses sendo três vezes maiores que no presente estudo.

Entretanto, o excesso de Zn pode causar severos danos ao sistema reprodutor, conforme verificado por USPHS (1987), em que ratos que ingeriram grandes quantidades de zinco, com doses até 1000 vezes recomendada (5 mg/dia), por um mês tornaram-se inférteis. Observa-se que, para o Zn, há grande amplitude entre os valores nutricionais necessários e os níveis tóxicos para mamíferos (Ansari, 1975). Os valores de exposição considerados na determinação da dose de referência (RFD), para humanos, sugerem que o mínimo para manter a função fisiológica é de 5,5 mg/dia, e o limiar para o surgimento de efeitos potencialmente negativos é de 60 mg/dia (Cantilli et al., 1994).

Segundo Gilabert et al. (1996), em ratos com deficiência de Zn (1,25 mg de Zn/Kg), o peso testicular decresce e surgem alterações morfológicas nos túbulos seminíferos. No presente estudo, não foi observado alterações na massa testicular.

As dosagens não indicaram toxicidade e nem causaram hipertrofia do testículo, sem risco para a saúde dos ratos. Em mamíferos, acredita-se não haver bioacumulação do Zn, em decorrência de ajustes homeostáticos entre absorção e perdas. Poucos são os dados quantitativos da biodisponibilidade de Zn, em decorrência da falta de um instrumento eficaz de avaliação de biodisponibilidade nesta classe de animais.

A obtenção da proporção volumétrica (%) entre os diversos componentes do testículo e do epitélio seminífero fornecem importantes resultados para a avaliação da função testicular (Russell et al.,1990a). A proporção volumétrica dos túbulos ficou entre 86,4% (grupo V) e 91,3% no grupo II, sem variação entre os tratamentos e nos limites considerados dentro do padrão para ratos (Russell et al.,1990a; Russell e França, 1995).

A proporção volumétrica da túnica própria do túbulo, do lume, do diâmetro tubular, do comprimento tubular total, do comprimento tubular por grama de testículo, do volume tubular e do índice tubulossomático (ITS) não apresentou diferença entre os tratamentos. A proporção de túbulos não apresentou diferença significativa dos grupos tratados em relação ao grupo controle. Estes parâmetros quantitativos relacionados aos túbulos seminíferos influenciam diretamente a massa testicular, e esta não apresentou diferença entre os grupos justificando esses resultados.

Não houve variação do volume do testículo, do túbulo seminífero e do intertúbulo entre os animais do controle e os tratados adicionalmente com vitamina E. Mehranjani et al. (2009), tratando ratos Wistar com vitamina E, observaram aumento significativo do diâmetro dos túbulos seminíferos e da espessura da membrana basal, aumento na altura do epitélio

germinativo, bem como do número de espermatogônias tipo B e espermátides em comparação com o grupo controle.

Com relação ao diâmetro dos túbulos nossos resultados não mostraram diferença significativa. Porém, os ratos tratados com 5mg de Zn+ α -Toc apresentaram aumento na altura do epitélio germinativo em relação ao grupo controle. Este resultado corrobora os dados obtidos por Mehranjani et al. (2009) quanto à vitamina E, podendo-se inferir que houve uma do α -Toc e o Zn na altura do epitélio. Segundo Andriguetto et al. (1983), o α -Toc possui fator antiesterilizante, essencial para a manutenção testicular, protegendo o epitélio germinativo. Diversos fatores contribuem para a altura do epitélio seminífero, o tamanho e a população das células de Sertoli e das células germinativas e a secreção de fluido pelas células de Sertoli (Morais et al., 2009). Não foi observado aumento significativo em nenhum tipo celular que justificasse o aumento do epitélio no tratamento IV.

A redução na proporção volumétrica do epitélio do tubo seminífero no tratamento V em relação ao grupo II pode ser consequência da redução da meiose verificada neste tratamento. Em experimentos com ratos com deficiência de Zn, Hidiroglou e Knipfel (1984) observaram acentuada atrofia do epitélio tubular. Porém nos nossos resultados a diminuição no grupo V não chega a caracterizar atrofia como visto no estudo histológico e a redução tubular, pode ter ocorrido pela compensação do aumento do compartimento intertubular, como citado para parâmetros intertubulares (Capítulo 3).

O número de células germinativas em pré-leptóteno foi maior no grupo II e III em relação a I. Este resultado mostrou a influência de uma maior dose de zinco isolada. Houve aumento de células em pré-leptóteno nos ratos do grupo II em relação a V o que mostrou o efeito não sinérgico do α -Toc com o zinco nessas células.

O número de células em paquíteno aumentou nos ratos tratados com 5 mg de Zn (Grupo I) em relação aos grupos II (10mg) e III (20mg), indicando que a população de paquíteno foi sensível à menor dose de Zn e diferente do preleptóteno que respondeu às maiores dosagens do mineral. O número de células em paquíteno foi maior no grupo de 10mg de Zn associado à α -Toc (V) que no grupo tratado com a mesma dose, porém sem α -Toc (II). Segundo Koury e Donangelo (2003), a sinergia do zinco com α -Toc ocorre na membrana das células dependendo das doses. A ação conjunta dos dois (Zn+ α -Toc) foi maior na dosagem de 10mg, sendo mesmo verificado com relação às espermatogônias. Os resultados deste trabalho nos permitem inferir que as melhores suplementações para características quantitativas de células em paquíteno são aquelas dos tratamentos I (5 mg Zn) e V (10mg+ α -Toc).

O número de espermátides arredondadas aumentou nos grupos tratados só com Zn diferente do resultado obtido por Mehranjani et al. (2009) nos tratamentos com apenas vitamina E, que segundo esses autores influenciou neste aumento. A explicação pode ser a diferença na idade dos animais que no estudo de Mehranjani et al. (2009) eram mais jovens. O aumento do número de espermatogônias do tipo B obtido por Mehranjani et al. (2009) em grupos tratados apenas com vitamina E confirma o obtido com espermatogônias tipo A no grupo V (10mg de Zn+ α -Toc).

O índice mitótico dos animais do grupo I foi menor que o dos grupos II e III, sendo diretamente proporcional ao aumento da dosagem de Zn até 20 mg. O índice mitótico aumentou também em animais tratados com 20mg Zn+ α -Toc. Comparando o grupo VI ao grupo III observa-se que a dosagem maior de Zn (20mg) associada à α -Toc possibilitou o sinergismo desses dois elementos na proliferação celular mitótica.

O índice mitótico, importante parâmetro de indicação da qualidade da espermatogênese, demonstrou ser influenciado pela administração conjunta de Zn e α -Toc, com resultados positivos em termos de proliferação celular, no compartimento basal do epitélio. Devido à complexidade da espermatogênese, é difícil determinar onde antioxidantes são mais eficazes. É provável que os antioxidantes sejam importantes na proteção das membranas, uma vez que possuem maior concentração de ácidos graxos poliinsaturados (Maneesh e Jayalekshmi, 2006).

O índice meiótico diminuiu nos grupos I e V refletindo na proporção volumétrica do epitélio germinativo. Saxena et al. (1989), fornecendo dieta com suplementação de 20 mg de zinco/kg/dia para ratos adultos machos por três semanas e 28 mg de zinco/kg/dia, por seis semanas, observaram em exame histológico testicular, a interrupção da meiose no estágio de espermatócito primário, degeneração dos espermatócitos secundários e acúmulo de fluido dentro dos túbulos seminíferos. Após seis semanas, os animais que haviam recebido 28mg de Zn, apresentavam interrupção da espermatogênese. O epitélio germinativo continha apenas espermatogônias, uma camada de espermatócitos primários, e uns poucos espermatócitos secundários picnóticos, mas nenhum espermatozóide maduro estava presente na cauda do epidídimo. Esses autores justificaram seus achados pelo Zn ter afetado significativamente as atividades enzimáticas do sistema reprodutor masculino. Entretanto efeitos tóxicos tem sido relatada somente quando são usadas doses acima de 50mg de Zn/dia (Ansari et al., 1975; Cantilli et al., 1994; Kumar et al., 2006), como já foi observado em ratos, humanos e touros. Não foi observado qualquer dano aos túbulos seminíferos no presente trabalho.

Os órgãos que mais acumularam Zn foram a próstata e o epidídimo, seguidos pela vesícula seminal e pelo testículo, sendo esse o padrão normal de distribuição de Zn no organismo de mamíferos (Bertrand e Vladesco, 1921; Marreiro et al., 1998).

A motilidade e o vigor apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. No vigor houve diferença entre os grupos III e IV e na motilidade entre os grupos III e IV/V. Nos dois parâmetros houve aumento nos grupos com Zn associado a α -Toc. Porém em relação ao controle não houve diferença significativa. Dados da literatura indicam que a presença de 300 a 500 mg Zn/g (peso seco) nos líquidos prostáticos podem influenciar a motilidade, viabilidade e morfologia dos espermatozóides (Mafra, 2004).

A administração do Zn em associação com a α -Toc não influenciou a quantidade do metal nos órgãos, embora alguns dados de literatura indiquem que possa ocorrer maior concentração de Zn no plasma em ratos suplementados com vitamina E (Hurley et al., 1983). Segundo Hurley et al. (1983) e Bunk et al. (1989), o Zn e a vitamina E interagem sinergicamente afetando o transporte através das membranas biológicas. Essa interação, provavelmente, se dá pela ação antioxidante, conforme observado por Kim et al. (1998) e Salgueiro et al. (2000), em que o *status* de vitamina E é prejudicado em animais com deficiência de Zn.

Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro relato dos efeitos da associação de zinco e α -Toc sobre túbulos seminíferos. Apesar de Sartorius e Handelsman (2010) terem relatado que parece haver influência do Zn na espermatogênese, até hoje não houve trabalhos conclusivos a esse respeito. Além disso, não há descrição da ação precisa de α -Toc nos testículos e sua interação com o zinco necessita ainda de pesquisas mais detalhadas e aprofundadas (Sahinturk et al., 2007). A estereologia e morfometria dos túbulos seminíferos visaram preencher essa lacuna auxiliando a estabelecer quais níveis de Zn seriam importantes para influenciar o processo espermatogênico e ainda, verificar a interação entre o Zn e α -Toc na produção de espermatozóides.

5. Conclusões

Houve interferência do zinco isoladamente ou combinado com α -Toc em vários parâmetros do compartimento tubular do testículo, destacando o grupo que recebeu 10mg de zinco e o que recebeu 20mg de zinco associado à α -Toc.

A ação isolada do Zn se manifestou nas células em pré-leptóteno, em paquíteno, em espermatídes arredondadas e no número total de células germinativas

A ação sinergia Zn+ α -Toc se manifestou na altura do epitélio germinativo; no número de espermatogônia A e no índice mitótico.

O índice mitótico foi diretamente proporcional à dosagem do Zn.

Apesar da interferência dos tratamentos em diversos parâmetros não houve alteração em PED e RGE.

6. Referências Bibliográficas

Abercrombie, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anatomical Record*, 94:239-247, 1946.

Amann, R.P., Almquist, J.O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *Journal of Dairy Science*, 45:774-781, 1962.

Amann, R.P. Sperm production rates. In: Johnson, A.D., Gomes, W.R., Vandemark, N.L. (Ed). *The Testis*. New York: Academic, 1:433-482, 1970.

Andriguetto, J.M., Perly, L., Minardi, I., Gemael, A., Flemming, J.S., De Souza, G.A., Filho, A.B., *Nutrição Animal*. 2.ed. Sao Paulo: Editora Livraria Nobel, 244-247, 1983.

Ansari, M.S., Miller, W.J., Lassiter, J.W., Neathery, M.W., Gentry, R.P. Effects of high but nontoxic dietary zinc on zinc metabolism adaptations in rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 150:534-536, 1975.

Attal J., Courot, M. Développement testiculaire et établissement de la spermatogenèse chez le taureau. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, 3:219-241, 1963.

Batista, S.E., Costa, A.G.V., Pinheiro-Sant'ana, H.M. Adding vitamin E to foods: implications for the foods and for human health. *Revista de Nutrição*, 20:525-535, 2007.

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

Bertrand, G., Vladesco, M.R. Intervention problabe du zinc dans les phénomènes de fécondation ches les animaux vertèbres. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l Academie des Sciences*, 173:176-179, 1921.

- Bettger, W.J., O'Dell, B.L. Physiological roles of zinc in the plasma membrane of mammalian cells. *Journal of Nutritional and Biochemistry*, 4:194-207, 1993.
- Bonde, J.P. Male reproductive organs are at risk from environmental hazards. *Asian Journal of Andrology*, 12:152-156, 2010.
- Bunk, M.J., Dnistrian, A.M., Schwartz, M.K., Rivlin, R.S. Dietary zinc deficiency decreases plasma concentrations of vitamin E. *Proceedings of Society of Experimental Biology and Medicine*, 190:379-384, 1989.
- Cantilli, R., Abernathy, C.O., Donohue, J.M. In: Mertz, W., Abernathy, C. O., Olin, S. S. Risk assessment of essential elements. Derivation of the reference dose for zinc. Washington, DC: ILSI Press, 113-126, 1994.
- Carvalho, H.F., Buzato, C.B.C. Células - Uma abordagem multidisciplinar. *Manole*, 302-323, 2005.
- Carvalho, O.F., Ferreira, J.D.J., Silveira, N.A., Freneau, G.E. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade do macho. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 38:33-38, 2002.
- Costa, D.S., Paula, T.A.R. Cinética da espermatogênese de catetos (*Tayassu tajacu*). *Ceres*, 53:515-522, 2006.
- Costa, K.L.C., Matta, S.L.P., Gomes, M.L.M., Paula, T.A.R., Freitas, K.M., Carvalho, F.A.R., Silveira, J.A., Dolder, H., Mendis-Handagama S.L.M.C. Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Animal Reproduction Sciences*, 127:202-212, 2011.
- Dorst, V.J., Sajonski, H. Morphometrische untersuchunhen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. *Monatsh Veterinarmed*, 29:650-652, 1974.
- Dreosti, I.E. Zinc In Truswell AS (ed) *Recommended Nutrient Intakes Australian Papers*. Australian Professional Publications, Sydney, 1990. 322p.
- Ebisch, L.M.W., Thomas, C.M.G., Peters, W.H.M., Braat, D.D.M. Steegers-Theunissen, R.P.M. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Human Reproduction Update*, 13:163-174, 2007.
- Eskenazi, B., Kidd, S.A., Marks, A.R., Slotter, E., Block, G., Wyrokeb, A.J. Antioxidants intake is associated with semen quality in healthy men. *Human Reproduction*, 20:1006-1012, 2005.

- Evenson, D.P., Emerick, R.J.; Jost, L.K., Kayongo-Male, H., Stewart, S.R. Zinc-silicon interactions influencing sperm chromatin integrity and testicular cell development in the rat as measured by flow cytometry. *Journal of Animal Science*, 71:955-962, 1993.
- Fosmire, G.J., Fosmire, M.A., Sandstead, H.H. Zinc deficiency in the weanling rat: effects of liver composition and polysomal profile. *Journal of Nutrition*, 106:1152-1158, 1976.
- França, L.R., Russell, L.D. The testis of domestic mammals. In: F. Martinez-Garcia e J. Regadera (Eds), *Male reproduction. A multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Communications, 198-219, 1998.
- Gilabert, E.R., Ruiz, E., Osorio, C., Ortega, E. Effect of dietary zinc deficiency on reproductive function in male rats: Biochemical and morphometric parameters. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7:403-407, 1996.
- Habert, R., Delbes, G., Duquenne, C., Livera, G., Levacher, C. Effects of estrogens on the development of the testis during fetal and neonatal life. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 34:970-977, 2006.
- Hidiroglou, M., Knipfel, J.E. Zinc in mammalian sperm: A review. *Journal of Dairy Science*, 67:1147-1156, 1984.
- Hochereau-de Reviers, M.T., Lincoln, G.A. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. *Journal of Reproduction & Fertility*, 54:209-213, 1978.
- Hurley, L.S., Dungan, D.D., Keen, C.L., Lonnerdal, B. The effect of vitamin E on zinc deficiency teratogenesis in rats. *Journal of Nutrition*, 113:1875-1877, 1983.
- Johnson, L., Petty, C.S., Neaves, W.B. A new approach to qualification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, 25:217-226, 1981.
- Karnovsky, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cellular Biology*, 27:137-138, 1965.
- Kechrid, Z., Derai, E.H., Layachi, N. The beneficial effect of vitamin E supplementation on zinc status, carbohydrate metabolism, transaminases and alkaline phosphatase activities in alloxan-diabetic rats fed on zinc deficiency diet. *International Journal of Diabetes & Metabolism*, 15:46-50, 2007.
- Kierszenbaum, A.L. *Histologia e Biologia Celular - Uma introdução à Patologia*. Mosby-Elsevier, 2 ed. Rio de Janeiro, 2008. 677p.
- Kim, E.S., Noh, S.K., Koo, S.I. Marginal zinc deficiency lowers the lymphatic absorption of α -tocopherol in rats. *Journal of Nutrition*, 128:265-270, 1998.

- Koury, J.C., Donangelo, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Revista de Nutrição*, 16:433-441, 2003.
- Kumar, N., Verma, R.P., Singh, L.P., Varshney, V.P. Dass, R.S. Effect of different levels and sources of zinc supplementation on quantitative and qualitative semen attributes and serum testosterone level in crossbred cattle (*Bos indicus* × *Bos taurus*) bulls. *Reproduction Nutrition Development*, 46:663-675, 2006.
- Mafra, D., Cozzolino, S.M.F. Importância do Zn na nutrição humana. *Revista de Nutrição*, 17:79-87, 2004.
- Maneesh, M., Jayalekshmi, H. Role of reactive oxygens species and antioxidants of pathophysiology of male reproduction. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 21:80-89, 2006.
- Marreiro, D.N., Fisberg, M., Cozzolino, S.M.F. Considerações sobre o estado nutricional relativo ao Zn na obesidade. *Cadernos de Nutrição*, 16:31-40, 1998.
- Merrells, K.J., Blewett, H., Jamieson, J.A., Taylor, G.C., Suh, M. Relationship between abnormal sperm morphology induced by dietary zinc deficiency and lipid composition in testes of growing rats. *British Journal of Nutrition*, 102:226-232, 2009.
- Morais, R.N., Mucciolo, R.G., Gomes, M.L.F., Lacerda, O., Morais, W., Moreira, N., Grahan, L.H., Swanson, W.F., Brown, J.L. Season analysis of sêmen characteristics serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardo pardalis*), margay (*L. wiedii*) e tigrina (*L. tigrinus*). *Theriogenology*, 57:2027-2041, 2002.
- Morais, A.C.T., Barbosa, L.P., Neves, M.M., Matta, S.L.P., Morais, D.B., Melo, B.E.S. Parâmetros morfofisiológicos testiculares de camundongos (*Mus musculus*) suplementados com geléia real. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61:110-118, 2009.
- Moura, J. G. P. Nutrientes e Terapêutica. Farmácia Natura Editora, Pelotas, 2009. 340p.
- Multigner, L., Oliva, A. Secular variations in sperm quality: fact or science fiction? *Cadernos de Saúde Pública*, 18:403-412, 2002.
- Oliveira, A.R., Morais, M.G., Moraes, S.S., Fernandes, C.E., Ítavo, L.C.V., Abreu, U.G.P. Efeito de diferentes fontes e concentrações de Zn na mistura mineral sobre desempenho e características seminais de touros criados em campo. *Ciência Animal Brasileira*, 8:465-477, 2007.
- Prasad, A.S. Discovery and importance of zinc in human nutrition. *Federation Proceedings*, 43:2829-2834, 1984.

- Roser, J.F. Reproductive endocrinology of the stallion. In: Samper, J.C (Ed), Equine Breeding Management and artificial insemination. Saunders Company, Philadelphia, 123-132, 2000.
- Russell, L.D., França, L.R. Building a testis. *Tissue and Cell*, 272:129-147, 1995.
- Russell, L. D.; Sinha-Hikim, A. P.; Etlin, R. A.; Clegg, E. D. Histological and histopathological evaluation of the testis. *Bolesta*: Cache River Press, 1990.
- Salgueiro, M.J., Zubillaga, M., Lysionek, A., Sarabia, M.I., Caro, R., De Paoli, T., Hager, A., Weill, R., Boccio, J. Zinc as an essential micronutrient: a review. *Nutrition Research*, 20:737-755, 2000.
- Sahinturk, V., Guclu, C., Baycu, C. Protective effects of vitamin E on ethane dimethane sulfonate-induced testicular toxicity in rats. *Asian Journal of Andrology*, 9:117-124, 2007.
- Sartorius, G.A., Handelsman, D.J. Testicular dysfunction in systemic diseases. In: *Andrology—Male Reproductive Health and Dysfunction*; Nieschlag, E., Behre, H.M., Nieschlag, S. 3ed. Springer, Heilderberg, 339-364, 2010.
- Saxena, R., Bedwal, R.S., Mathur, R.S. Zinc toxicity and male reproduction in rats: a histological and biochemical study. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 6:119-133, 1989.
- Sinclair, S.N.D. Male Infertility: Nutritional and environmental considerations. *Alternative Medicine-Review*, 5:28-38, 2000.
- Smith, J.C.J. Comparison of reference dose with recommended dietary allowances for zinc: methodologies and levels. In *Risk Assessment of Essential Elements*, (Merts, W., Abernathy, C.O & Olin, S.S. Ed.) ILSI Press, Washington, DC, 127-143, 1984.
- Tapieiro, H., Tew, K.D. Trace elements un human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57: 399-411, 2003.
- Toppari, J., Haavisto, A.M., Alanen, M. Changes in male reproductive health and effects of endocrine disruptors in Scandinavian countries. *Cadernos de Saúde Pública*, 18:413-420, 2002.
- Underwood, E. J. Trace elements in human and animal nutrition. 4. ed. New York: Academic Press, 1977. 447p.
- USPHS (United States Public Health Service). Toxicological profile for zinc. CD-ROM. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Public Health Service, 1997.
- Van-Haaster, L.H., de Rooij, D.G. Spermatogenesis is accelerated in the immature Djungarian and Chinese hamster and rat. *Biology of Reproduction*, 49:1229-1235, 1993.

- Yiee, J.H., Baskin, L.S. Environmental factors in genitourinary development. *Journal of Urology* 184:34-41, 2010.
- Woo, Y.T., Lai, D.Y., Arcos, J.C., Argus, M.F. Natural, metal, fiber and macromolecular carcinogens. In: *Chemical induction of cancer: structural bases and biological mechanisms*. IIC. CA: Academic Press, 3:488-489, 1988.

Tabela 1- Peso (g) de órgãos do aparelho reprodutor e índice gonadosossomático (IGS) de ratos Wistar machos tratados com diferentes doses de zinco, associado ou não com α -Toc.

Grupos	I (5 Zn)	II (10 Zn)	III (20 Zn)	IV (5 Zn+ α -Toc)	V (10 Zn+ α -Toc)	VI (20 Zn+ α -Toc)	VII (controle)
Peso							
Corporal	356,8±10,5 ^a	359,5±31,2 ^a	377,9±23,2 ^a	365,6±14,1 ^a	365,6±13,2 ^a	363,3±21,7 ^a	387,0±22,5 ^a
Próstata Total	0,69±0,09 ^a	0,80±0,11 ^a	0,86±0,20 ^a	0,79±0,09 ^a	0,87±0,12 ^a	0,84±0,13 ^a	0,77±0,13 ^a
Vesícula							
Seminal s/ coagulação	0,98±0,09 ^a	1,03±0,32 ^a	0,95±0,35 ^a	0,99±0,15 ^a	0,89±0,27 ^a	0,96±0,16 ^a	0,98±0,13 ^a
Epidídimo	0,57±0,07 ^a	0,58±0,08 ^a	0,61±0,12 ^a	0,64±0,05 ^a	0,61±0,05 ^a	0,61±0,02 ^a	0,64±0,03 ^a
Gordura							
Epididimária	2,94±0,98 ^b	1,66±0,63 ^a	2,00±0,55 ^a	1,49±0,50 ^a	1,54±0,49 ^a	1,38±0,49 ^a	2,30±0,82 ^{ab}
Ducto							
Deferente	0,20±0,04 ^a	0,22±0,05 ^a	0,24±0,05 ^a	0,20±0,02 ^a	0,23±0,04 ^a	0,21±0,05 ^a	0,20±0,04 ^a
Testículo (2)	3,12±0,22 ^a	2,90±0,36 ^a	3,17±0,30 ^a	3,17±0,14 ^a	3,16±0,32 ^a	3,27±0,32 ^a	3,24±0,18 ^a
Albugínea	0,15±0,04 ^a	0,13±0,04 ^a	0,19±0,05 ^a	0,15±0,05 ^a	0,15±0,06 ^a	0,12±0,42 ^a	0,10±0,02 ^a
Parênquima							
Testicular	2,97±0,22 ^a	2,77±0,35 ^a	2,98±0,29 ^a	3,01±0,13 ^a	3,01±0,31 ^a	3,15±0,33 ^a	3,14±0,17 ^a
IGS (%)	0,87±0,06 ^a	0,81±0,12 ^a	0,84±0,11 ^a	0,86±0,04 ^a	0,86±0,09 ^a	0,90±0,08 ^a	0,84±0,05 ^a

Médias seguidas por letras iguais nas linhas, não diferem significativamente ($p>0,05$). Dados expressos em média \pm dp. Grupos: I- 5mg Zn; II- 10mg Zn; III- 20mg Zn; IV 5mg Zn + α -Toc; V- 10mg Zn + α -Toc ; VI- 20mg Zn + α -Toc ; VII- controle.

Tabela 2. Morfometria tubular e índice tubulossomático (ITS) em testículos de ratos Wistar tratados com diferentes doses de zinco, associado ou não com α -Toc .

Grupos	I (5 Zn)	II (10 Zn)	III (20 Zn)	IV (5Zn+ α -Toc)	V (10 Zn+ α -Toc)	VI (20 Zn+ α -Toc)	VII (controle)
Túbulo (%)	88,1 \pm 3,2 ^{ab}	91,3 \pm 1,0 ^b	88,4 \pm 1,9 ^{ab}	88,7 \pm 3,8 ^{ab}	86,4 \pm 3,7 ^a	90,2 \pm 2,6 ^{ab}	90,9 \pm 2,5 ^{ab}
Túnica Própria (%)	4,7 \pm 1,8 ^a	4,3 \pm 1,6 ^a	4,2 \pm 2,4 ^a	5,4 \pm 2,7 ^a	4,9 \pm 2,1 ^a	3,9 \pm 1,1 ^a	4,3 \pm 2,5 ^a
Lume (%)	6,5 \pm 1,8 ^a	6,9 \pm 0,2 ^a	6,8 \pm 0,4 ^a	6,8 \pm 0,7 ^a	7,5 \pm 0,9 ^a	7,1 \pm 1,0 ^a	6,6 \pm 0,9 ^a
Epitélio (%)	76,8 \pm 3,4 ^{4ab}	80,0 \pm 2,20 ^b	77,4 \pm 2,83 ^{ab}	76,5 \pm 4,55 ^{ab}	74,1 \pm 3,99 ^a	79,3 \pm 2,74 ^b	80,0 \pm 2,21 ^b
Diâmetro Tubular (μ m)	308,9 \pm 29,1 ^a	309,1 \pm 36,1 ^a	315,1 \pm 19,2 ^a	312,8 \pm 28,5 ^a	335,8 \pm 19,1 ^a	315,3 \pm 19,3 ^a	309,8 \pm 17,2 ^a
Altura do Epitélio (μ m)	111,1 \pm 20,5 ^{ab}	111,3 \pm 20,2 ^{ab}	108,9 \pm 8,8 ^{ab}	127,3 \pm 15,8 ^b	108,5 \pm 12,5 ^{ab}	104,9 \pm 19,5 ^{ab}	96,3 \pm 14,8 ^a
Comprimento Tubular Total (m)	36,1 \pm 7,6 ^a	33,6 \pm 11,01 ^a	23,1 \pm 6,7 ^a	36,5 \pm 7,1 ^a	31,4 \pm 3,9 ^a	35,3 \pm 5,7 ^a	39,0 \pm 4,9 ^a
Comprimento Tubular/g testículo (m)	11,4 \pm 2,1 ^a	11,3 \pm 3,5 ^a	10,7 \pm 1,2 ^a	11,9 \pm 2,1 ^a	9,4 \pm 1,1 ^a	11,2 \pm 1,7 ^a	11,8 \pm 1,1 ^a
Volume Tubular (mL)	2,61 \pm 0,2 ^a	2,52 \pm 0,4 ^a	2,62 \pm 0,3 ^a	2,60 \pm 0,3 ^a	2,77 \pm 0,3 ^a	2,72 \pm 0,2 ^a	2,85 \pm 0,2 ^a
ITS (%)	0,73 \pm 0,06 ^a	0,71 \pm 0,13 ^a	0,69 \pm 0,07 ^a	0,71 \pm 0,08 ^a	0,75 \pm 0,05 ^a	0,75 \pm 0,06 ^a	0,74 \pm 0,06 ^a

Médias seguidas por letras iguais nas linhas, não diferem significativamente ($p>0,05$). Dados expressos em média \pm dp. Grupos: I- 5mg Zn; II- 10mg Zn; III- 20mg Zn; IV 5mg Zn + α -Toc ; V- 10mg Zn + α -Toc ; VI- 20mg Zn + α -Toc ; VII- controle.

Tabela 3- Números corrigidos de células espermato gênicas e de células de Sertoli em túbulos seminíferos no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, em ratos Wistar tratados com zinco, associado ou não com α -Toc.

Grupos	I (5 Zn)	II (10 Zn)	III (20 Zn)	IV (5 Zn+α-Toc)	V (10Zn+α-Toc)	VI (20Zn+α-Toc)	VII (controle)
CSE	15,1 \pm 3,2 ^a	14, 8 \pm 2,5 ^a	14,05 \pm 2,3 ^a	16,6 \pm 3,0 ^a	17,4 \pm 2,2 ^a	14,4 \pm 3,2 ^a	14,0 \pm 2,77 ^a
SPGA	11,8 \pm 1,9 ^b	9,8 \pm 2,6 ^{ab}	7,5 \pm 1,1 ^{ab}	8,1 \pm 1,5 ^{ab}	14,4 \pm 2,9 ^b	4,9 \pm 0,8 ^a	5,7 \pm 0,84 ^a
PLP	73,6 \pm 11,5 ^a	101,1 \pm 17,2 ^b	103,1 \pm 19,5 ^b	87,6 \pm 15,4 ^{ab}	78,0 \pm 2,9 ^a	87,3 \pm 10,0 ^{ab}	78,3 \pm 8,51 ^a
PAQ	48,6 \pm 6,5 ^b	35,3 \pm 7,2 ^a	28,4 \pm 6,9 ^a	31,2 \pm 6,4 ^a	43,6 \pm 9,1 ^b	29,6 \pm 6,2 ^a	33,0 \pm 6,75 ^a
EAR	145,6 \pm 12,4 ^{ab}	150,4 \pm 15,4 ^b	134,4 \pm 17,0 ^{ab}	129,6 \pm 18,4 ^a	130,0 \pm 10,8 ^a	126,2 \pm 8,1 ^a	128,4 \pm 5,46 ^a
TCG	279,6 \pm 24,2 ^{ab}	296,7 \pm 29,2 ^b	273,4 \pm 32,5 ^{ab}	256,6 \pm 28,6 ^{ab}	266,0 \pm 23,3 ^{ab}	248,2 \pm 22,3 ^a	245,5 \pm 17,24 ^a

Médias seguidas por letras iguais nas linhas, não diferem significativamente ($p > 0,05$). Dados expressos em média \pm dp. CSE= célula de Sertoli; SPGA= espermato gônia tipo A; PLP= preleptóteno/leptóteno; PAQ= paquíteno; EAR= espermátide arredondada; TCG= total de células germinativas. Grupos: I- 5mg Zn; II- 10mg Zn; III- 20mg Zn; IV 5mg Zn + α -Toc ; V- 10mg Zn + α -Toc ; VI- 20mg Zn + α -Toc ; VII- controle.

Tabela 4. Razões celulares entre células germinativas quantificadas no estágio I e células de Sertoli, em ratos Wistar tratados com zinco, associado ou não com α -Toc.

Grupos	I (5 Zn)	II (10 Zn)	III (20 Zn)	IV (5 Zn α-Toc)	V (10 Zn+ α-Toc)	VI (20 Zn+ α-Toc)	VII (controle)
Índice Mitótico	6,55±2,07 ^a	10,89±2,98 ^b	14,13±3,37 ^b	11,26±2,93 ^b	11,46±4,19 ^b	17,89±3,36 ^c	13,87±2,21 ^b
RGE	12,84±3,09 ^a	16,29±4,52 ^a	18,23±2,97 ^b	16,62±3,94 ^a	19,35±7,25 ^b	25,84±3,93 ^c	22,81±3,01 ^{bc}
Índice Meiótico	3,03±0,36 ^a	4,37±0,71 ^b	4,98±1,23 ^b	4,28±0,93 ^b	3,08±0,56 ^a	4,40±0,68 ^b	4,01±0,67 ^b
ECS	9,90±1,45 ^b	10,32±1,16 ^b	9,69±0,97 ^{ab}	7,98±1,42 ^a	7,52±0,87 ^a	9,24±2,13 ^{ab}	9,48±1,62 ^{ab}
SCS	19,04±2,96 ^{ab}	20,39±2,54 ^b	19,75±2,26 ^b	15,85±2,58 ^a	15,36±1,64 ^a	18,05±3,74 ^{ab}	18,01±2,65 ^{ab}
PED/T	3,35 ± 7,63 ^a	3,56 ± 8,60 ^a	3,17 ± 6,66 ^a	2,97 ± 7,62 ^a	3,46 ± 5,63 ^a	3,23 ± 4,71 ^a	3,13 ± 4,41 ^a
PED/GT	2,26 ± 5,33 ^a	2,59 ± 5,84 ^a	2,12 ± 3,53 ^a	1,96 ± 4,71 ^a	2,30 ± 3,10 ^a	2,08 ± 3,3 ^a	1,99 ± 2,14 ^a

Médias seguidas por letras iguais nas linhas, não diferem significativamente ($p>0,05$). Dados expressos em média \pm dp. RGE rendimento geral da espermatogênese; ECS= eficiência da célula de Sertoli; SCS= capacidade de suporte da célula de Sertoli; PED/T= produção espermiática diária por testículo ($\times 108$) \pm ($\times 107$); PED/GT= produção espermiática diária por grama de testículo ($\times 108$) \pm ($\times 107$).

Tabela 5-Análise do sêmen, quanto ao vigor e a motilidade, de ratos Wistar tratados com zinco, associado ou não com α -Toc.

Grupos	I (5 Zn)	II (10Zn)	III (20 Zn)	IV (5 Zn + α Toc)	V (10 Zn + α -Toc)	VI (20 Zn α - +Toc)	VII controle
Vigor	3,1 \pm 1,4 ^{ab}	2,6 \pm 0,8 ^{ab}	2,2 \pm 0,8 ^a	3,6 \pm 0,7 ^b	3,2 \pm 0,5 ^{ab}	2,9 \pm 0,2 ^{ab}	2,6 \pm 0,5 ^{ab}
Motilidade %	65 \pm 12 ^b	39 \pm 23 ^{ab}	29 \pm 25 ^a	64 \pm 11 ^b	60 \pm 16 ^b	43 \pm 8 ^{ab}	53 \pm 16 ^{ab}

Médias seguidas por letras iguais nas linhas, não diferem significativamente ($p>0,05$). Dados expressos em média \pm dp. Grupos: I- 5mg Zn; II- 10mg Zn; III- 20mg Zn; IV 5mg Zn + α -Toc; V- 10mg Zn + α -Toc ; VI- 20mg Zn + α -Toc ; VII- controle.

Tabela 6. Quantificação de Zn (mg/g de tecido seco) em órgãos do aparelho reprodutor de ratos Wistar tratados com zinco, associado ou não com α -Toc .

Grupos	I (5 Zn)	II (10 Zn)	III (20 Zn)	IV (5 Zn + α -Toc)	V (10Zn + α -Toc)	VI (20 Zn + α -Toc)	VII (controle)
Próstata	28,3 \pm 19,7	23,2 \pm 9,5	22,6 \pm 15,8	19,9 \pm 10,4	24,4 \pm 16,6	25,7 \pm 12,1	13,5 \pm 9,4
Vesicular Seminal s/ coagulação	9,8 \pm 3,3	6,8 \pm 3,2	7,9 \pm 5,5	13,7 \pm 6,9	9,9 \pm 4,4	11,9 \pm 5,3	11,7 \pm 3,8
Epidídimo	19,6 \pm 11,1	27,1 \pm 15,2	25,2 \pm 9,1	15,0 \pm 4,2	14,1 \pm 9,4	24,2 \pm 10,7	6,1 \pm 2,9
Testículo	13,2 \pm 5,4	10,2 \pm 7,7	6,9 \pm 3,7	7,9 \pm 2,9	5,5 \pm 2,1	10,4 \pm 6,4	4,2 \pm 0,8

Dados expressos em médias \pm dp. Grupos: I- 5mg Zn; II- 10mg Zn; III- 20mg Zn; IV- 5mg Zn + α -Toc ; V- 10mg Zn + α -Toc ; VI- 20mg Zn + α -Toc ; VII- controle.

Capítulo 3

Estereologia do compartimento intertubular de ratos Wistar tratados com zinco isolado ou associado à α -tocoferol.

RESUMO

A suplementação com zinco (Zn) já mostrou benefício contra a esterilidade masculina, com aumento na contagem e na motilidade dos espermatozoides em humanos. O objetivo deste estudo foi obter dados sobre os efeitos da ação do Zn em três diferentes doses, isolado ou associado à α -tocoferol (α -Toc) no ambiente intertubular do parênquima testicular de ratos da raça Wistar. Para tanto, 48 ratos com 90 dias de idade e peso vivo médio de 300 gramas foram utilizados no estudo. Os animais foram divididos em 7 grupos, sendo um controle e seis experimentais, e submetidos a seis tipos de tratamento, com duração de 56 dias. Os grupos I, II e III receberam Zn, na forma de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, nas doses de 5, 10 e 20 mg/dia, respectivamente. Os grupos IV, V e VI receberam as mesmas doses anteriores de Zn na água de beber, acrescidas de 15 mg de α -Toc (α -Tocoferol), por gavagem, divididos em três doses semanais. O grupo controle (VII) recebeu somente água. Para padronizar os procedimentos foi realizada gavagem, com solução salina, nos grupos que não receberam α -Toc. Foram avaliados as proporções volumétricas e volume dos componentes do intertúbulo, a relação nucleoplasmática, o volume nuclear, citoplasmático e total da célula de Leydig, além do número dessas células por testículo e por grama de testículo. Foi calculado também o índice Leydigossomático (ILS). As médias foram comparadas utilizando-se o teste de Student Newman Keuls (SNK) com significância de 5%. Houve aumento da proporção volumétrica, volume e número de células de Leydig e de macrófagos no grupo I, e aumento do espaço intertubular, linfático e de vasos sanguíneos no tratamento V. A ação do Zn na dose de 5 mg/dia e de 10 mg/dia associada à α -Toc interferiram em componentes do intertúbulo, de forma isolada e sinérgica, respectivamente.

Palavras chave: zinco, α -tocoferol, intertúbulo, estereologia testicular, células de Leydig.

1. Introdução

O testículo é um órgão único em relação à quantidade e diversidade de eventos morfológicos e bioquímicos. As divisões mitóticas e meióticas, a recombinação genética, a formação flagelar e acrossomal, a condensação nuclear, a determinação morfológica do espermatozóide, a eliminação citoplasmática, a produção de hormônios e de substâncias sinalizadoras são apenas alguns dos processos especiais locais que ocorrem durante a espermatogênese (Kierszenbaum, 2008). Tipos celulares distintos morfológicamente estão presentes nos compartimentos testiculares refletindo as mudanças locais no desenvolvimento de células germinativas. Numerosas substâncias, reguladas pela ação hipofisária, atuam nas células de Leydig e nas células de Sertoli influenciando e interferindo, direta ou indiretamente, nas células germinativas (Russell et al., 1990).

O testículo é dividido em dois compartimentos: o tubular e o intertubular. O primeiro compartimento é formado pelos túbulos seminíferos, constituídos por túnica própria, epitélio germinativo e lume. O segundo compartimento é formado por células do tecido conjuntivo (macrófagos, mastócitos e fibroblastos), nervos, vasos sanguíneos e linfáticos e pelas células de Leydig, que representam a porção endócrina testicular, onde ocorre a produção do principal hormônio masculino, a testosterona (Russell et al., 1995).

Em ratos, as células de Leydig estão intimamente associadas aos vasos sanguíneos, presentes no espaço intertubular e cercadas pelo espaço linfático (Fawcett et al., 1973). Há grande variação da proporção volumétrica dos componentes do intertúbulo entre espécies (Fawcett et al., 1973; França e Russell, 1998; Godinho, 1999), sendo a célula de Leydig o tipo celular mais frequente neste compartimento.

A reprodução é dependente de hormônios, nutrientes e minerais, sendo o zinco (Zn) o único metal encontrado em grande quantidade no sêmen (Merrells et al., 2009). A suplementação com Zn já mostrou benefício contra a esterilidade masculina, com aumento na contagem e na motilidade dos espermatozoides em humanos (Favier, 1992; Cambiaghi e Castellotti, 2004). A presença do Zn contribui para manter a testosterona normal, pois níveis inadequados de zinco inibem a liberação de hormônios luteinizante (LH) e folículo

estimulante (FSH) pela hipófise, os quais estimulam, respectivamente, a produção de testosterona pela célula de Leydig e a função das células de Sertoli (Gilabert et al., 1996).

Sob condições adversas ou em consequência do próprio metabolismo oxidativo pode ocorrer aumento na produção de radicais livres e, dessa forma, provocar danos à reprodução, afetando a fertilidade (Finkel e Holbrook, 2000; Drew e Leeuwenburgh, 2002). As espécies reativas de oxigênio (EROs) têm mostrado efeitos prejudiciais em componentes críticos da rota esteroidogênica em células produtoras de andrógenos, como as células de Leydig (Quinn e Payne, 1984; 1985; Georgiou et al., 1987; Diemer et al., 2003).

O Zn está envolvido na estabilização das membranas plasmáticas e na proteção celular, prevenindo a peroxidação lipídica. As propriedades antioxidantes desse mineral são explicadas pelo seu papel na regulação da síntese da metalotioneína, na estrutura da enzima superóxido dismutase e na proteção de grupamentos sulfidrila de proteínas de membranas celulares, onde promove a inibição da produção de EROs, por antagonismo com metais pró-oxidantes como ferro e cobre (Powell, 2000; Koury e Donangelo, 2003). A capacidade do Zn em retardar processos oxidativos tem sido reconhecida nos últimos anos e, embora as evidências para as propriedades antioxidantes do Zn sejam convincentes, os seus mecanismos de ação ainda são desconhecidos (Power, 2000).

A vitamina E é o maior antioxidante não-enzimático presente na estrutura lipídica das células (Burton et al., 1983) exercendo seu efeito por eliminação ou estabilização dos radicais livres do conteúdo de ácidos graxos polinsaturados das membranas (Burton, 1994). A vitamina E reage com os radicais peroxil nas membranas biológicas, inativando-os e interrompendo a reação em cadeia da peroxidação lipídica (Moura, 2009), e/ou diminuindo a regulação da geração da superóxido dismutase mitocondrial (Chow, 2004). Estudos *in vivo* têm sugerido que a administração de vitamina E confere proteção contra danos teciduais gerados por oxidação (Chow, 1991; Ibrahim et al. 1997). A suplementação de vitamina E na dieta pode aumentar o seu conteúdo no soro, fígado e testículo e ainda aumentar capacidades antioxidantes do testículo (Hong et al., 2010).

Não há na literatura uma avaliação dos efeitos do Zn no espaço intertubular do parênquima testicular, bem como da associação desse metal à vitamina E, seja de forma sinérgica ou antagônica. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação de diferentes doses de Zn, isoladamente ou associadas à vitamina E, no compartimento intertubular do testículo de ratos Wistar adultos.

1.1. Objetivos Gerais

O presente trabalho objetivou analisar o efeito do zinco isolado ou em associação com o α -Tocoferol por meio da estereologia e morfometria do intertúbulo do parênquima testicular de ratos Wistar adultos.

1.2. Objetivos Específicos

O trabalho teve como objetivos analisar:

- proporção volumétrica e volume do intertúbulo;
- proporção volumétrica e volume dos elementos do intertúbulo (espaço linfático, núcleo de célula de Leydig, citoplasma de célula de Leydig, célula de Leydig total, vasos sanguíneos, macrófagos e tecido conjuntivo).
- diâmetro nuclear das células de Leydig;
- número total de células de Leydig por testículo e por g/testículo;
- calcular o ILS (índice Leydigossomático).

2. Material e métodos

2.1. Animais e grupos experimentais

Os procedimentos experimentais seguiram estritamente os indicados pelas normas para o uso de animais em ensino, pesquisa e extensão da Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Viçosa (Protocolo 001/11). Foram utilizados 56 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), em idade reprodutiva (90 dias), pesando entre 276 e 302 gramas, e provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram divididos em 7 grupos e mantidos em ambiente com temperatura controlada de 22°C e fotoperíodo de 12/12 horas, claro e escuro. Os tratamentos foram administrados de duas maneiras: 1. Para os animais dos grupos I, II e III o Zn ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foi fornecido na água de beber, nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/dia. Para os animais dos grupos IV, V e VI, além das mesmas concentrações de Zn, foi ofertado 15 mg de α -Tocoferol (α -Toc) por gavagem, divididos em três doses semanais, usando como veículo o óleo de milho. A dose de α -Toc foram baseadas em Sahinturk et al., 2007 e Batista

et al., 2007 e as doses de Zn por Dreosti (1990) e Cantilli et al. (1994). Os animais do grupo VII não receberam qualquer tratamento e constituíram o grupo controle. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, forradas com serragem, sendo alimentados diariamente, pela manhã, com 30 g de ração comercial, da marca Labcil (SOCIL) peletizada, para animais de laboratório. O tratamento teve a duração de 56 dias.

Para manter o mesmo procedimento, os 24 animais tratados apenas com Zn e o grupo controle também foram submetidos à gavagem com solução salina, três vezes por semana pela manhã.

2.2. Coleta do material e preparação histológica

Os animais foram pesados e eutanasiados por inalação de CO₂, de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética. Após esse procedimento foram removidos os testículos e glândulas acessórias que foram pesados em balança de precisão (0,0001g) (Bel, Mark 210A).

Os testículos foram fixados por imersão em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) e armazenados em etanol 70% para serem submetidos à posterior dissecação. Fragmentos de um dos testículos foram submetidos à desidratação, em concentrações crescentes de etanol, sendo posteriormente incluídos em resina glicol metacrilato (Historesin®-Leica). Secções histológicas semi-seriadas, de 3µm de espessura, foram obtidas em micrótomo rotativo (Reichert-Jung, Alemanha), equipado com navalha de vidro. As preparações foram coradas com azul de toluidina-borato de sódio 1%, montadas com Entellan® (Merck) e analisadas em microscópio de luz (Olympus BX-50). As análises morfométricas dos elementos intertubulares foram realizadas sobre imagens digitais capturadas por câmara acoplada ao fotomicroscópio (AX-70, Olympus) utilizando-se o programa Image Pro Plus® (Media Cybernetics).

2.3. Determinação da concentração do Zn nos órgãos

Amostras de próstata, testículo, vesícula seminal e epidídimo, após a pesagem, foram mantidas em estufa a 70°C, até alcançarem peso seco constante. As amostras pré-secas foram acondicionadas em Erlenmeyer de 25 mL, adicionando-se então 1,5 mL de HNO₃ concentrado, 0,5 mL de HClO₄ 70%, 2 gotas de água oxigenada 30% e 1 gota de querosene

para reduzir a formação de espuma. A temperatura do bloco digestor foi aumentada gradualmente até atingir 90°C, de forma a proporcionar a digestão completa. Ao material foi acrescentada água deionizada até o volume de 10 mL. A determinação da concentração de Zn foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica (SpectrAA 220FS Varian) e os valores expressos em µg/g de massa seca.

2.4. Análises microscópicas e estereológicas

As proporções volumétricas dos componentes do parênquima testicular foram obtidas pela contagem de um total de 2.660 pontos projetados sobre as imagens capturadas, em dez campos aleatoriamente distribuídos nos diferentes cortes histológicos do testículo. Para isso utilizou-se um retículo de 266 intersecções (pontos), em imagens capturadas com aumento de 100X. O volume do compartimento intertubular foi estimado por meio do percentual ocupado por este componente no testículo. O volume do parênquima testicular foi considerado como massa total do testículo, menos a massa da sua albugínea. A massa dos componentes testiculares foi considerada como volume, pois a densidade volumétrica do testículo em mamíferos é aproximadamente 1 (Johnson et al., 1981).

2.4.1. Proporção volumétrica e volume dos elementos no intertúbulo

Foram registradas as proporções volumétricas dos constituintes intertubulares anotando-se pontos sobre células de Leydig, células e fibras do tecido conjuntivo, macrófagos, vasos sanguíneos e linfáticos. Foram registrados 2660 pontos por animal, projetados sobre imagens capturadas da região do intertúbulo, utilizando aumento de 400X, em diferentes cortes histológicos do testículo.

A proporção volumétrica (PV) e o volume (V) dos elementos do intertúbulo foram calculados, por meio das seguintes fórmulas: $PV_i = (\text{pontos sobre intertúbulo} / n^\circ \text{ total de pontos}) * 100$;

A proporção volumétrica dos elementos do intertúbulo no testículo foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula: $PV_e = (\% \text{ intertúbulo} * \% \text{ do elemento}) / 100$;

O volume dos elementos do intertúbulo por testículo (VEIT) foi calculado da seguinte maneira: $VEIT \text{ (mL)} = (\% \text{ do elemento por testículo} * \text{peso do parênquima}) / 100$;

O volume dos elementos do intertúbulo por grama de testículo (VEIT/G) foi calculado utilizando-se a fórmula: $VEIT/G \text{ (mL)} = VEIT / \text{peso bruto testicular}$.

2.4.2. Estereologia da Célula de Leydig

O diâmetro nuclear da célula de Leydig foi medido com objetiva de 40X escolhendo-se os núcleos mais esféricos, com cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. Foram medidos trinta núcleos por animal utilizando o programa de análise de imagens Image-Pro Plus 4 (Média Cybernetics).

O volume nuclear das células de Leydig foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula:

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

O volume citoplasmático (VCT) e o volume de uma célula de Leydig (VCL) foram calculados usando as fórmulas: $VCT = \% \text{ citoplasma} * \text{volume nuclear} / \% \text{ núcleo}$; $VC = \text{volume nuclear} + \text{volume citoplasmático}$.

Foram calculados também o volume e o número de células de Leydig, por testículo e por grama de testículo, utilizando-se, respectivamente, as seguintes fórmulas:

Volume de célula de Leydig por testículo = $\% \text{ de célula de Leydig no parênquima} * \text{peso do parênquima} / 100$;

Volume de célula de Leydig por g de testículo = $\text{volume de Leydig por testículo} / \text{peso bruto testicular}$

Nº de célula de Leydig por testículo = $\text{volume de célula de Leydig} (\mu\text{m}^3) \text{ no testículo} / \text{volume de uma célula de Leydig}$

Nº de células de Leydig por g de testículo = $\text{volume de Leydig/g testículo} / \text{volume de uma célula de Leydig}$

Foi calculado ainda o índice Leydigossomático (ILS) da seguinte maneira: $ILS = \text{volume das células de Leydig nos testículos} / \text{peso corporal} * 100$

2.5. Análises estatísticas

Após testes de normalidade (Lilliefors) e homocedasticidade (Cochran) foi realizada análise de variância, seguida de teste de Student Newman Keuls (SNK) (com nível de significância de 5%) para avaliar variações dos parâmetros estudados nos grupos tratados em relação ao grupo controle.

3. Resultados

Houve aumento do espaço linfático no intertúbulo dos animais do grupo IV em relação ao controle. As proporções de citoplasma da célula de Leydig, de macrófagos e o volume total de células de Leydig no intertúbulo foram maiores no grupo I. Houve aumento da proporção de vasos sanguíneos no grupo V (Tabela 1).

As proporções volumétricas dos elementos intertubulares em relação ao testículo encontram-se na Tabela 2. O espaço linfático aumentou no grupo IV em relação ao controle. A proporção dos núcleos de célula de Leydig não foi diferente entre os grupos de tratamentos e grupo controle, mas foi maior no grupo I em relação ao grupo VI. A proporção de macrófagos, do citoplasma das células de Leydig bem como o percentual destas células foram maiores no grupo I em comparação com o grupo controle, IV, V e VI. A proporção volumétrica de vasos sanguíneos nos testículos aumentou no grupo V, comparada ao grupo controle. O tecido conjuntivo não apresentou diferença entre os tratamentos.

O volume do intertúbulo aumentou nos ratos do tratamento V em relação ao controle e ao grupo II (Tabela 3). O volume do espaço linfático aumentou nos grupos IV em relação ao controle e do grupo V em relação aos grupos II e controle. Houve aumento do volume de núcleos e do citoplasma das células de Leydig, assim como do volume de macrófagos no grupo I em relação ao controle. O volume de vasos sanguíneos por testículo aumentou no grupo V e reduziu no grupo II. O volume de tecido conjuntivo por testículo não apresentou diferença entre os grupos (Tabela 3).

Os resultados do volume dos elementos do intertúbulo por grama de testículo apresentaram significativas diferenças em decorrência dos tratamentos aplicados (Tabela 4). O espaço linfático aumentou no grupo IV, mas não ocorreu alteração nos demais tratamentos. O volume do núcleo e do citoplasma da célula de Leydig, por grama de testículo, aumentou

no grupo I, assim como o volume das células de Leydig e o volume de macrófagos se comparados ao grupo controle. O volume de vasos sanguíneos por testículo aumentou no grupo V em relação ao controle e aos demais tratamentos. O volume do tecido conjuntivo por grama de testículo não apresentou diferença entre os grupos.

O volume nuclear da célula de Leydig foi maior no grupo I enquanto o volume do citoplasma aumentou no grupos I e II, assim como o volume da célula de Leydig e o índice Leydigossomático (ILS) em relação ao controle (Tabela 5). Os volumes de célula de Leydig por testículo e por grama de testículo foram maiores nos tratamento I, II e III quando comparados ao controle. A relação nucleoplasmática (RNP) das células de Leydig apresentou aumento nos animais do grupo V em comparação a todos os tratamentos e ao grupo controle (Tabela 5).

4. Discussão

A ação combinada do zinco (Zn) com α -Toc no compartimento intertubular do testículo ainda não tem sido estudada. Essa associação reveste-se de importância, uma vez que o compartimento intertubular tem uma grande importância na reprodução masculina, pois é nele que se realiza o controle endócrino do testículo. Segundo Skinner (1991), a célula de Leydig é a principal componente intertubular e responsável pela produção da testosterona, as quais mantém relações com as outras células presentes no intertúbulo (Skinner, 1991).

O aumento na proporção do espaço linfático observado no grupo IV (5,205%) em relação ao controle (2,392%) revelou a associação sinérgica da menor dose de Zn com a vitamina E. Segundo Fawcett et al. (1973) o aumento do espaço linfático pode estar relacionado com a capacidade deste de excluir materiais do testículo para manter o equilíbrio das concentrações de andrógenos no testículo e nos vasos sanguíneos.

Os animais que receberam Zn na dose 5mg/dia apresentaram aumento na proporção volumétrica do citoplasma das células de Leydig e do total das células de Leydig. Os demais parâmetros avaliados, como a proporção de células de Leydig no intertúbulo e nos testículos, o número e o volume de células de Leydig por testículo e por grama de testículo, apresentaram os melhores resultados também na dose de 5 mg/dia de Zn, sem que a associação com α -Toc tivesse ação sinérgica ou antagônica. Geralmente, a absorção de Zn diminui com o aumento da dose ofertada (Choudhury, 2005) e isso pode ter sido a causa

provável dos resultados mais significativos para as células de Leydig ter ocorrido na menor dose utilizada nos tratamentos.

A porcentagem de células de Leydig no intertúbulo pode variar nas espécies. Estas células aparecem numa porcentagem de 2% no testículo de rato (França e Russell, 1998) e nas capivaras (*Hydrochoerus hydrochoeris*) numa porcentagem de 60% (Paula, 1999). No presente estudo, os animais do grupo de 5mg de Zn apresentaram a maior proporção de células de Leydig por testículo (3,68%) e o menor foi o grupo 10mg de Zn associado a α -Toc (1,97%). Estudos sobre a função e estrutura das células de Leydig, em diferentes espécies de mamíferos relataram que variações na função da célula de Leydig resultam mais da sua capacidade individual em secretar hormônios do que das diferenças de volume total das mesmas no testículo (Ewing et al., 1979).

A proporção de vasos sanguíneos no intertúbulo, por testículo e o seu volume por testículo (mL) e por grama de testículo apresentaram aumento no tratamento com 10 mg/dia Zn associado a α -Toc (grupo V) em relação ao tratamento sem α -Toc (grupo II). Pode ter ocorrido efeito sinérgico de α -Toc com o Zn, favorecendo o aumento da proporção de vasos sanguíneos, o que poderia causar aumento da irrigação sanguínea do intertúbulo. Porém essa conclusão precisa ser confirmada após avaliação desse parâmetro num estudo posterior com tratamento apenas com α -Toc em ratos. Mehranjani et al. (2009) nos tratamentos com apenas vitamina E, não avaliou este parâmetro. A irrigação sanguínea é um fator importante, pois a velocidade com que a testosterona sai do testículo depende dessa irrigação, e a quantidade necessária de células de Leydig por animal e o metabolismo destas células ficam na dependência dos nutrientes transportados pelos vasos sanguíneos (Russell et al., 1994; Russell, 1996). O aumento da proporção de vasos sanguíneos foi semelhante aos resultados obtidos para volume e proporção volumétrica do espaço intertubular, revelando que o tratamento de 10mg de Zn associado à α -Toc (foi o mais influente sobre o intertúbulo e sobre sua irrigação). O aumento na proporção de vasos sanguíneos no intertúbulo pode caracterizar também maior fluxo de hormônio veiculado por ele. Além disso, as células de Leydig em ratos estão intimamente associadas aos vasos sanguíneos, presentes no espaço intertubular (Fawcett et al., 1973).

A proporção volumétrica de macrófagos no intertúbulo e nos testículos, e o volume celular por mL e por grama de testículo, aumentaram nos ratos do tratamento I (5 mg/dia Zn) em relação aos tratamentos IV e controle. Essa diferença demonstrou que o resultado do Zn isoladamente foi mais efetivo sobre a população de macrófagos. O resultado referente aos

macrófagos foi o mesmo encontrado em relação às células de Leydig, ambos respondendo melhor ao tratamento apenas com a menor dose de Zn, reforçando a relação existente entre esses dois tipos celulares (Hales, 2002).

Os macrófagos são células que possuem íntima associação com as células de Leydig, pois fatores secretados pelo macrófago controlam de modo parácrino a atividade esteroidogênica e o desenvolvimento das células de Leydig (Hales, 2002). Citocinas e fatores de crescimento secretados pelos macrófagos estimulam a proliferação e diferenciação de células de Leydig imaturas, contribuindo para o desenvolvimento normal destas células (Hales, 2002). Nos testículos de ratos adultos, além da interdependência funcional entre células de Leydig e macrófagos existe, também, o acoplamento estrutural entre essas células. Este acoplamento consiste de projeções citoplasmáticas das células de Leydig localizadas dentro de invaginações citoplasmáticas dos macrófagos. Estas estruturas variam de simples projeções tubulares a complexas estruturas ramificadas, sugerindo que a interdigitação é mais do que simples invaginações das microvilosidades em vesículas revestidas (Hutson, 1992).

Apesar de pouco documentado, podem ocorrer mitoses de células de Leydig em animais adultos (Russell et al., 1996) e, segundo Hales (1996), o número de macrófagos intertubulares também pode aumentar no adulto e a sua taxa de proliferação está sob controle indireto da hipófise. Os macrófagos secretam um fator lipofílico que estimula a produção de testosterona pela célula de Leydig (Hutson et al., 1996). As células de Leydig produzem um fator proliferativo, regulado pelo hormônio luteinizante (LH), que estimula a proliferação de macrófagos vizinhos. Nos animais do grupo I, onde houve aumento de células de Leydig, o que pode ter contribuído para o aumento de macrófagos e estes, por sua vez, contribuíram para a proliferação das células de Leydig.

Animais tratados com 5 e 10 mg de Zn apresentaram maior proporção de massa corporal alocado em células de Leydig (ILS). Esse dado reflete os resultados já observados para células de Leydig, com influência do Zn e ausência da ação sinérgica da α -Toc.

Os valores das células e fibras do tecido conjuntivo (exceto macrófagos), vasos sanguíneos e linfáticos foram maiores nos grupos V e VI (11,62% e 9,28%, respectivamente) revelando a sinergia do Zn + α -Toc sobre esses parâmetros.

O volume citoplasmático de células de Leydig bem como o volume da célula de Leydig aumentou nos grupos I e II, enquanto o grupo I apresentou também, aumento do volume nuclear da célula de Leydig. O aumento na proporção volumétrica das células de Leydig no intertúbulo evidencia efeito estimulante do tratamento do Zn neste tipo celular. Embasado

nesses resultados quantitativos pode-se deduzir que dos três tratamentos de Zn, as menores doses (5 e 10 mg) foram as que mais influenciaram o desempenho desses elementos celulares no intertúbulo.

A proporção e o volume do espaço intertubular e a proporção e o volume de vasos sanguíneos responderam positivamente a uma dosagem maior de Zn (10mg) em associação com α -Toc ocorrendo, portanto, sinergismo do Zn com α -Toc. O volume intertubular observado nos animais desse grupo foi maior que o padrão de 10% citado por Russell e França (1995) e por Rocha et al. (1999).

Todos os resultados quantitativos relativos à volumetria de células de Leydig, bem como o número dessas células por testículo e por grama de testículo, apresentaram aumento em resposta ao tratamento com zinco na dose de 5mg.

5. Conclusões

Dois tratamentos se destacaram quanto aos elementos do compartimento intertubular do parênquima testicular: o tratamento com 5mg de Zn, que apresentou efeito positivo em relação à morfometria e volumetria das células de Leydig e de macrófagos, e o tratamento com 10mg de Zn associado a α -Toc, que estimulou o aumento da proporção e do volume intertubular e de vasos sanguíneos.

Com exceção do grupo de 5mg de Zn associado a α -Toc no aumento do espaço linfático, houve uma tendência a dose de 5 mg de Zn agir isoladamente e a dose de 10mg agir sinergicamente com α -Toc.

6. Referências

- Barbosa, F.F.S. Influência dos antioxidantes na qualidade do sêmen de homens e tratamento de fertilidade. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente). Universidade de Lisboa. Lisboa, 2009. 70p.
- Barreto, S.L.T. Níveis de proteína e vitamina E para matrizes de frangos de corte na fase de produção. (Tese de Doutorado). Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 1998. 171p.

- Batista, S.E., Costa, A.G.V., Pinheiro-Sant'ana, H.M. Adding vitamin E to foods: implications for the foods and for human health. *Revista de Nutrição*, 20:525-535, 2007.
- Burton, G.W., Joyce, A., Ingold, K.U. Is vitamin E the only lipid soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 221:281–290, 1983.
- Burton, G.W. Vitamin E: molecular and biological function. *Proceedings of the Nutrition Society*, 53:251–262, 1994.
- Cantilli, R., Abernathy, C.O., Donohue, J.M. Derivation of the reference dose for zinc. In: *Risk assessment of essential elements*, Mertz, W.; Abernathy, C. O., Olin, S. S. eds. Washington, DC: ILSI Press, 113-126, 1994.
- Choudhury, H., Stedeford, T., Osier, M., Fransen, M., Macdonald, A.R. Toxicological Review of Zn and compounds: In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS), 83, 2005.
- Cruz, J.B.F., Soares, H.F. Uma revisão sobre o zinco. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas Agrárias e da Saúde*, 15:207-222, 2011.
- De Kretser, D.M., Kerr, J.B. The cytology of the testis. In: Knobil, E.; Neill, J. D. (Ed.). *The Physiology of Reproduction*. 2 ed. New York: Raven, 1177-1290, 1994.
- Diemer, T., Allen, J.A., Hales, K.H., Hales, D.B. Reactive oxygen disrupts mitochondria in MA-10 tumor Leydig cells and inhibits steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and steroidogenesis. *Endocrinology*, 144:2882-2891, 2003.
- Dreosti, I.E. Zinc. In Truswell AS (ed) *Recommended Nutrient Intakes Australian Papers*. Australian Professional Publications, Sydney, 1990. 322p.
- Drew, B., Leeuwenburgh, C. Aging and the role of reactive nitrogen species. *New York Academy of Sciences*, 959:66-81, 2002.
- Ewing, L.L., Zirkin, B.R., Cochran, R.C., Kromann, N., Peters, C., Ruiz-Bravo, N. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. *Endocrinology*, 105:1135-1142, 1979.
- Favier, A. E. The role of zinc in reproduction. Hormonal mechanisms. *Biological Trace Element Research*, 32:363-82, 1992.
- Fawcett, D.W., Neaves, W.B., Flores, M.N. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of Reproduction*, 9:500-532, 1973.

- Finkel, T., Holbrook, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408:239-247, 2000.
- Ford, W., Whittington, K. Debate: Is antioxidant therapy a promising strategy to improve human reproduction? Antioxidant treatment for male subfertility: a promise that remains unfulfilled. *Human Reproduction*, 13:1416-1419, 1998.
- França, L.R., Russell, L.D. The testis of domestic mammals. In: F. Martinez-Garcia e J. Regadera (Eds), *Male reproduction. A multidisciplinary overview*. Madri: Churchill Communications, 198-219, 1998.
- Ferreira, A.L.A., Matsubara, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 43:61-68, 1997.
- Georgiou, M., Perkins, L.M., Payne, A.H. Steroid synthesis dependent, oxygen-mediated damage of mitochondrial and microsomal cytochrome P-450 enzymes in rat Leydig cell cultures. *Endocrinology*, 121:1390-1399, 1987.
- Gilabert, E.R., Ruiz. E., Osorio, C., Ortega, E. Effect of dietary zinc deficiency on reproductive function in male rats: Biochemical and morphometric parameters. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7:403-407, 1996.
- Godinho, C.L. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros. Tese (Mestrado em Biologia Celular). UFMG, Belo Horizonte, 1999. 74p.
- Hales, D.B. Leydig cell-macrophage interactions: an overview. In: Payne A, H.; Hardy, M. P., Russell, L. D. (eds) *The Leydig Cell*. Vienna: Cache River Press, 451-465, 1996.
- Hales, D.B. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *Journal of Reproductive Immunology*, 573-18, 2002.
- Hong, Z., Hailin, L., Hui, M., Guijie, Z., Leyan, Y., Dubing, Y. Effect of vitamin E supplement in diet on antioxidant ability of testis in boar goat. *Animal Reproduction Science*, 117:90-94, 2010.
- Hutson, J.C. Development of cytoplasmic digitations between Leydig cells and testicular macrophages of the rat. *Cell and Tissue Research*, 267:385-389, 1992.
- Hutson, J.C., Garner, C.W., Doris, P.A. Purification and characterization of a lipophilic factor from testicular macrophages that stimulates testosterone secretion. *Journal of Andrology*, 17:502-508, 1996.

- Johnson, L., Petty, C.S., Neaves, W.B. A new approach to qualification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, 25:217-226, 1981.
- Korniluk, K., Gabryszuk, M., Kowalczyk, J., Czauderna, M. Effect of diet supplementation with selenium, zinc and α -tocopherol on fatty acid composition in the liver and loin muscle of lambs. *Animal Science Papers and Reports*, 26:59-70, 2008.
- Karnovsky, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cellular Biology*, 27:137-138, 1965.
- Koury, J.C., Donangelo, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Revista de Nutrição*, 16:433-441, 2003.
- Merrells, K.J., Blewett, H., Jamieson, J.A., Taylor G.C., Suh, M. Relationship between abnormal sperm morphology induced by dietary zinc deficiency and lipid composition in testes of growing rats. *British Journal of Nutrition*, 102:226-232, 2009.
- Moura, J. G. P. Nutrientes e Terapêutica. Farmácia Natura Editora, Pelotas, 2009. 340p
- Paula, T.A.R. Avaliação histológica e funcional de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Tese (Doutorado em Morfologia). UFMG, Belo Horizonte, 1999. 84p.
- Powell, S.R. The antioxidant properties of zinc. *Journal of Nutrition*, 130:1447-1454, 2000.
- Quinn, P.G., Payne, A.H. Oxygen-mediated damage of microsomal cytochrome P-450 enzymes in cultured Leydig cells. Role in steroidogenic desensitization. *Journal of Biology Chemistry*, 259:4130-4135, 1984.
- Quinn, P.G., Payne, A.H. Steroid product-induced, oxygen-mediated damage of microsomal cytochrome P-450 enzymes in Leydig cell cultures: relationship to desensitization. *Journal of Biological Chemistry*, 260:2092-2099, 1985.
- Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha Hikim, A.P., Clegg, E.D. Histological and histopathological evaluation of the testis. *Bolesta: Cache River Press*, 1:1-40, 1990.
- Russell, L.D., Chandrashekar, V., Bartke, A., Sinha-Hikim, A.P. The hamsters Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. *International Journal of Andrology*, 12:93-106, 1994.
- Russell, L.D., França, L.R. Building a testis. *Tissue and Cell*, 272:129-147, 1995.
- Russell, L.D. Mammalian Leydig Cell structure. In Payne. A. H. Hardy, M.P., Russell, L.D. (Ed). *The Leydig cell*. Vienna: Cache River, 43-96, 1996.
- Sankako, M.K. Função testicular de ratos expostos a fumaça do cigarro e possível papel protetor do zinco - análises seminais, morfológicas e moleculares. Dissertação (Mestrado

em Ciências Biológicas-Farmacologia) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Botucatu, 2011. 85p.

Sahinturk, V., Guclu, C., Baycu, C. Protective effects of vitamin E on ethane dimethane sulfonate-induced testicular toxicity in rats. *Asian Journal of Andrology*, 9:117-124, 2007.

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

Stabenfeldt, G.H., Edqvist, L. Processos reprodutivos do macho. In: Swenson, M.J., Reece, W.O. Dukes- fisiologia dos animais domésticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A, 35:603-614, 1996.

Tabela 1. Proporção volumétrica (PV) do intertúbulo e de seus elementos constituintes.

Grupos	I (5 Zn)	II (10 Zn)	III (20 Zn)	IV (5 Zn+ α-Toc)	V (10 Zn+ α-Toc)	VI (20 Zn+ A-Toc)	VII (controle)
PVIT	12,03±3,09 ^a	8,73±1,64 ^a	11,60±1,99 ^a	11,33±3,83 ^a	13,60±3,73 ^a	9,76±2,60 ^a	9,08±2,4 ^a
PVLI	35,88±6,36 ^{ab}	28,35±12,85 ^{ab}	30,26±11,72 ^{ab}	43,36±13,42 ^b	35,54±14,10 ^{ab}	29,10±14,06 ^{ab}	27,25±8,98 ^a
PVNC	8,46±1,89 ^a	8,04±3,09 ^a	6,28±2,65 ^a	5,95±2,89 ^a	4,73±2,22 ^a	6,19±3,02 ^a	7,16±2,21 ^a
PVCT	22,96±5,20 ^b	22,33±8,71 ^{ab}	16,21±7,08 ^{ab}	13,60±7,90 ^a	10,94±7,51 ^a	15,56±8,73 ^a	16,44±4,80 ^a
PVLY	31,42±6,34 ^c	30,36±11,06 ^b	22,48±9,72 ^{ab}	16,76±10,45 ^{ab}	15,66±9,05 ^a	18,00±8,34 ^{ab}	24,42±6,27 ^{ab}
PVVS	18,25±6,45 ^a	22,24±6,90 ^a	26,93±6,55 ^a	23,05±5,47 ^a	43,99±8,84 ^b	33,29±5,19 ^a	32,81±0,27 ^a
PVMC	3,03±1,18 ^b	2,85±0,69 ^{ab}	2,33±0,93 ^{ab}	1,61±0,74 ^a	1,26±0,40 ^a	1,91±0,72 ^a	2,09±1,04 ^a
PVTC	11,73±1,99 ^a	16,03±5,75 ^{ab}	18,00±6,17 ^b	12,43±3,36 ^a	12,55±5,61 ^a	11,95±2,54 ^a	14,25±3,10 ^{ab}

Médias seguidas por letras iguais nas linhas não diferem significativamente ($p>0,05$). Dados percentuais, expressos em média±dp. Grupos: I- 5mg Zn; II- 10mg Zn; III- 20mg Zn; IV- 5mg Zn+α-Toc; V- 10mg Zn+α-Toc; VI- 20mg Zn+α-Toc; VII- controle. Intertúbulo (PVIT); espaço linfático (PVL); núcleo da célula de Leydig (PVNC); citoplasma da célula de Leydig (PVCT); célula de Leydig (PVLY); vasos sanguíneos (PVVS); macrófagos (PVMC); tecido conjuntivo (PVTC).

Tabela 2. Proporção volumétrica (PV) dos elementos intertubulares no testículo.

Grupos	I (5 Zn)	II (10 Zn)	II (20 Zn)	IV (5 Zn+ α-Toc)	V (10 Zn+ α-Toc)	VI (20 Zn +α-Toc)	VII (controle)
PVLI	4,390±1,74 ^{ab}	2,552±1,19 ^a	3,621±1,59 ^{ab}	5,205±3,15 ^b	5,057±2,93 ^{ab}	3,135±1,69 ^{ab}	2,392±0,69 ^a
PVNU	0,980±0,16 ^b	0,685±0,302 ^{ab}	0,709±0,26 ^{ab}	0,624±0,271 ^{ab}	0,599±0,231 ^{ab}	0,584±0,239 ^a	0,646±0,21 ^{ab}
PVCT	2,704±0,69 ^b	1,912±0,807 ^{ab}	1,831±0,737 ^{ab}	1,413±0,761 ^a	1,369±0,89 ^a	1,529±0,84 ^a	1,482±0,47 ^a
PVLY	3,68±0,80 ^b	2,60±1,10 ^{ab}	2,54±1,00 ^{ab}	2,04±1,02 ^a	1,97±1,12 ^a	2,11±1,07 ^a	2,13±0,67 ^a
PVVS	2,213±0,96 ^a	1,931±0,715 ^a	3,132±0,86 ^a	2,482±0,590 ^a	4,702±1,406 ^b	3,177±0,689 ^a	3,044±1,25 ^a
PVMC	0,330±0,11 ^b	0,258±0,09 ^{ab}	0,260±0,08 ^{ab}	0,164±0,04 ^a	0,171±0,06 ^a	0,189±0,09 ^a	0,187±0,08 ^a
PVTC	1,412±0,43 ^a	1,393±0,559 ^a	1,907±0,66 ^a	1,442±0,65 ^a	1,706±0,97 ^a	1,151±0,34 ^a	1,338±0,58 ^a

Médias seguidas por letras iguais nas linhas não diferem significativamente ($p>0,05$). Dados percentuais, expressos em média ± dp. Grupos: I- 5mg Zn; II- 10mg Zn; III- 20mg Zn; IV- 5mg Zn+α-Toc; V- 10mg Zn+α-Toc; VI- 20mg Zn+α-Toc; VII- controle. Proporção volumétrica do espaço linfático (PVL); do núcleo da célula de Leydig (PVNU); do citoplasma da célula de Leydig (PVCT); de Leydig total; de vasos sanguíneos; de macrófagos e de tecido conjuntivo.

Tabela 3-Volume (V) do intertúbulo e de seus elementos constituintes, por testículo (mL).

Grupos	I (5 Zn)	II (10 Zn)	III (20 Zn)	IV (5 Zn+ α-Toc)	V (10 Zn+ α-Toc)	VI (20 Zn+ α-Toc)	VII (controle)
VIT	0,35±0,08 ^{ab}	0,28±0,11 ^a	0,38±0,11 ^a	0,31±0,007 ^{ab}	0,40 ±0,10 ^b	0,29±0,10 ^{ab}	0,26±0,06 ^a
VLI	0,064±0,023 ^{ab}	0,034±0,015 ^a	0,054±0,024 ^{ab}	0,080±0,05 ^b	0,074±0,040 ^{ab}	0,050±0,029 ^{ab}	0,037±0,010 ^a
VNU	0,014±0,002 ^b	0,010±0,004 ^a	0,011±0,004 ^a	0,009±0,004 ^a	0,009±0,004 ^a	0,009±0,004 ^a	0,010±0,003 ^a
VCT	0,04±0,011 ^b	0,027±0,012 ^a	0,028±0,012 ^{ab}	0,021±0,011 ^a	0,021±0,015 ^a	0,025±0,015 ^a	0,023±0,007 ^a
VCL	0,054±0,012 ^b	0,037±0,016 ^a	0,039±0,017 ^a	0,030±0,015 ^a	0,030±0,020 ^a	0,034±0,020 ^a	0,033±0,010 ^a
VVS	0,033±0,016 ^{ab}	0,026±0,006 ^a	0,046±0,013 ^b	0,038±0,010 ^{ab}	0,070±0,019 ^c	0,050±0,012 ^b	0,048±0,018 ^b
VMC	0,005±0,002 ^b	0,004±0,001 ^{ab}	0,004±0,001 ^{ab}	0,002±0,001 ^a	0,003±0,001 ^a	0,003±0,001 ^a	0,003±0,001 ^a
VTC	0,021±0,007 ^a	0,019±0,008 ^a	0,030±0,009 ^a	0,022±0,010 ^a	0,026±0,015 ^a	0,019±0,008 ^a	0,021±0,008 ^a

Médias seguidas por letras iguais nas linhas não diferem significativamente ($p>0,05$). Dados expressos em média±dp.
 Grupos: I- 5mg Zn; II- 10mg Zn; III- 20mg Zn; IV- 5mg Zn+α-Toc; V- 10mg Zn+α-Toc; VI- 20mg+α-Toc; VII- controle.
 Volume do intertúbulo (VIT); do espaço linfático (VLI), do núcleo da célula de Leydig (VNU); do citoplasma da célula de Leydig (VCT); da célula de Leydig (VCL); de vaso sanguíneo (VVS); de macrófago (VMC); do tecido conjuntivo (VTC).

Tabela 4. Volume (V) dos elementos do intertúbulo (mL) por grama de testículo.

Grupos	I (5 Zn)	II (10 Zn)	III (20 Zn)	IV (5 Zn+ α-Toc)	V (10 Zn+ α-Toc)	VI (20 Zn+ α-Toc)	VII (controle)
VLI	0,041±0,014 ^a	0,022±0,00 ^a	0,03±0,015 ^a	0,046±0,028 ^b	0,044±0,023 ^a	0,029±0,016 ^a	0,023±0,006 ^a
VNU	0,0092±0,002 ^b	0,0061±0,003 ^a	0,0063±0,002 ^a	0,0055±0,002 ^a	0,0054±0,002 ^a	0,0053±0,002 ^a	0,0061±0,002 ^a
VCT	0,025±0,006 ^b	0,017±0,007 ^{ab}	0,016±0,006 ^{ab}	0,013±0,007 ^a	0,013±0,009 ^a	0,014±0,008 ^a	0,014±0,004 ^a
VLY	0,034±0,007 ^b	0,023±0,010 ^a	0,022±0,009 ^a	0,018±0,009 ^a	0,018±0,011 ^a	0,019±0,010 ^a	0,020±0,006 ^a
VVS	0,021±0,009 ^a	0,016±0,004 ^a	0,028±0,008 ^a	0,022±0,005 ^a	0,042±0,013 ^b	0,029±0,006 ^a	0,029±0,012 ^a
VMC	0,003±0,001 ^b	0,002±0,001 ^{ab}	0,002±0,001 ^{ab}	0,0014±0,000 ^a	0,0015±0,001 ^a	0,0017±0,001 ^a	0,0017±0,001 ^a
VTC	0,013±0,004 ^a	0,012±0,005 ^a	0,018±0,006 ^a	0,013±0,006 ^a	0,015±0,009 ^a	0,011±0,003 ^a	0,013±0,005 ^a

Médias seguidas por letras iguais nas linhas não diferem significativamente α-Tocte ($p > 0,05$). Dados expressos em média±dp. Grupos: I- 5mg Zn; II- 10mg Zn; III- 20mg Zn; IV- 5mg Zn+α-Toc; V- 10mg Zn+; VI- 20mg Zn+α-Toc; VII- controle. Volume do espaço linfático (VLI); do núcleo da célula de Leydig (VNU); do citoplasma da célula de Leydig (VCT); da célula de Leydig (VLY); de vaso sanguíneo (VVS); de macrófago (VMC); de tecido conjuntivo (VTC).

Tabela 5-Morfometria das células de Leydig.

Grupos	I (5 Zn)	II (10 Zn)	III (20 Zn)	IV (5 Zn+ α-Toc)	V (10 Zn+ α-Toc)	VI (20 Zn+ α-Toc)	VII (controle)
VNU (μm^3)	190,94±27,29 ^c	172,52±22,31 ^b	121,93±27,25 ^a	144,62±32,84 ^{ab}	153,85±27,56 ^{ab}	131,33±33,50 ^{ab}	135,10±21,76 ^{ab}
VCT (μm^3)	517,45±169,69 ^b	489,20±102,18 ^b	311,68±90,54 ^a	306,57±130,27 ^a	300,08±73,01 ^a	264,34±69,72 ^a	303,71±58,41 ^a
VLY (μm^3)	708,39±190,31 ^b	666,25±106,16 ^b	430,94±87,07 ^a	445,41±111,78 ^a	467,00±53,14 ^a	397,33±87,04 ^a	439,11±57,88 ^a
VLY/T (mL)	0,46±0,11 ^a	0,43±0,16 ^{ab}	0,340±0,16 ^{ab}	0,250±0,14 ^{bc}	0,24±0,14 ^{abc}	0,28±0,14 ^{abc}	0,12±0,12 ^c
VLY/gT (mL)	0,290±0,06 ^c	0,290±0,10 ^c	0,210±0,08 ^{bc}	0,159±0,10 ^{ab}	0,149±0,08 ^{ab}	0,172±0,0 ^{ab}	0,070±0,07 ^a
NLY/T ($\times 10^{15}$)	8,53±2,33 ^b	6,41±2,31 ^b	7,8±3,23 ^b	5,32±2,21 ^b	4,99±2,86 ^b	7,24±2,93 ^b	1,64±3,28 ^a
NLY/GT ($\times 10^{15}$)	4,51±1,41 ^b	4,33±1,53 ^b	4,81±1,63 ^b	3,38±1,51 ^b	3,08±1,68 ^b	4,37±1,57 ^b	1,01±2,06 ^a
ILS (%)	0,13±0,03 ^b	0,12±0,05 ^{ab}	0,09±0,04 ^{abc}	0,06±0,04 ^{ac}	0,06±0,04 ^{ac}	0,07±0,03 ^{abc}	0,03±0,03 ^c

Médias seguidas por letras iguais nas linhas não diferem significativamente ($p>0,05$). Dados expressos em média±dp. Grupos: I- 5mg Zn; II- 10mg Zn; III- 20mg Zn; IV- 5mg Zn+VE; V- 10mg Zn+VE; VI - 20mg Zn+VE; VII - controle. Volume nuclear (VNU); volume citoplasmático (VCT); volume celular (VLY); volume de células de Leydig/Testículo (VLY/T), volume de células de Leydig/grama de testículo (VLY/gT); número de células de Leydig/testículo (NLY/T); número de células de Leydig/grama de testículo (NLY/GT); índice Leydigssomático (ILS).

CONCLUSÕES GERAIS

Os tratamentos com zinco, isolados ou associados à vitamina E, em ratos Wistar adultos revelaram interferências sobre as características morfométricas e componentes testiculares em vários parâmetros do compartimento tubular e intertubular do testículo.

1- No compartimento tubular os melhores resultados foram alcançados utilizando-se a dosagem de Zn de 10mg isoladamente e de 20mg em sinergia com a VE.

2- O grupo de ratos que recebeu 10mg de zinco apresentou aumento no número de células em preleptóteno/leptóteno, espermátides arredondadas e no total de células germinativas.

3- O grupo de ratos que recebeu 20mg de zinco associado à vitamina E apresentou aumento no índice mitótico.

4- Os animais tratados com 10mg de zinco associado à VE apresentaram redução no percentual de epitélio seminífero, provavelmente pela redução do índice meiótico, e apresentaram também aumento no número de espermatogônias A e do número de espermátócitos em paquíteno.

5- Houve redução no rendimento geral da espermatogênese nos grupos de 5mg de Zn e 5mg+VE, este segundo grupo de ratos também apresentou aumento na altura do epitélio seminífero.

6- Os órgãos que mais acumularam Zn foram a próstata e o epidídimo, seguidos da glândula vesicular e do testículo, ambos quantitativamente iguais.

7- No compartimento intertubular os melhores resultados foram alcançados utilizando-se a dosagem de Zn de 5mg isoladamente e de 10mg em sinergia com a VE.

8- Os ratos tratados com 5mg de Zn apresentaram efeito positivo em relação à morfometria e volumetria das células de Leydig e de macrófagos.

9- Os animais tratados com 10mg Zn+VE apresentaram aumento na proporção e no volume do compartimento intertubular e de vasos sanguíneos.

10- O Zn isoladamente mostrou-se mais eficiente atuando sobre as células, tanto de túbulo quanto de intertúbulo, enquanto que o Zn associado à vitamina E exerceu sua ação mais efetiva sobre os espaços vasculares e linfáticos, assim como interferiu no aumento do intertúbulo e no índice mitótico.