

ANA CAROLINA NEVES

**EFEITOS DO AÇAÍ (*Euterpe edulis*) EM TESTÍCULO DE RATOS
EXPOSTOS AO ACETATO DE CHUMBO: ANÁLISE MORFOMÉTRICA E
ESTRUTURAL**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016**

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

T

Neves, Ana Carolina, 1987-
N511e Efeitos do açai (*Euterpe edulis*) em testículo de ratos
2016 expostos ao acetato de chumbo : análise morfométrica e
estrutural / Ana Carolina Neves. – Viçosa, MG, 2016.
viii, 49f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Testículos - Morfologia. 2. Testículos - Efeito do
chumbo. 3. Açai. 4. *Euterpe edulis*. 5. Toxicologia. 6. Rato
com animal de laboratório. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação
em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 599.352


ANA CAROLINA NEVES

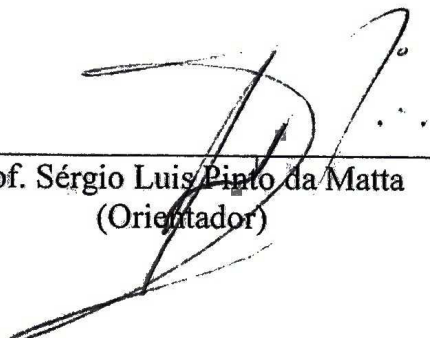
**EFEITOS DO AÇAÍ (*Euterpe edulis*) EM TESTÍCULO DE RATOS
EXPOSTOS AO ACETATO DE CHUMBO: ANÁLISE MORFOMÉTRICA E
ESTRUTURAL**

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

APROVADA: 23 de março de 2016.


João Bosco Gonçalves de Barros


Clóvis Andrade Neves


Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta
(Orientador)

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”

Cora Coralina

Ao meu primo Jonathas e toda
a minha família

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível sem a contribuição de muitas pessoas às quais expresso meu profundo agradecimento.

A Deus por iluminar e direcionar meus passos.

Aos meus pais, Maria dos Anjos e Cícero, pelo amor incondicional e pelo exemplo de persistência, carinho e dedicação.

A Eduardo, pela amizade, amor, paciência, compreensão e ajuda durante este período. Sem você, essa jornada seria muito mais difícil.

A minha irmã, Mônica, pelas conversas e por estar sempre acreditando e torcendo por mim.

A toda a minha família, pelo carinho e orações.

Aos que estão presentes na minha memória, por serem parte do que ainda me faz forte e por isso não permitir que eu desista. Obrigada por fazerem parte da minha história e do que eu sou hoje. Muitas saudades.

Ao orientador e amigo, Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta pela confiança e compreensão, por acreditar na minha capacidade, pelo exemplo de profissionalismo, pelos preciosos ensinamentos, pela orientação e por todas as contribuições ao longo do trabalho.

A Kyvia, por ter se mostrado sempre preocupada, solícita e prestativa todas as vezes que precisei e pela amizade e cuidado que teve comigo durante todo o trabalho.

A Jerusa e Neri que torceram por mim na época em que o mestrado era apenas um desejo. E vibraram comigo a cada conquista. Sou imensamente grata pelo apoio de vocês, meninas!

A minha amiga Elenize, pelas conversas e desabafos, pelo apoio nos momentos de dificuldade e pela nossa longa amizade.

Ao Dr. Evandro por me ajudar a encontrar o equilíbrio, importante pra que eu pudesse realizar meu trabalho.

A todos os amigos do mestrado em Biologia Celular e Estrutural, por compartilharmos conhecimento e esse momento importante de nossas vidas.

Aos amigos do curso de Ciências Biológicas da UFV, principalmente a Marina, Fred e Luan, pelas longas conversas motivadoras, os conselhos e por não me deixarem desistir.

Aos colegas de laboratório, pelas conversas e piadas nos momentos de descontração e desespero e pela ajuda ao longo do trabalho. E principalmente, por cada “Bom dia!” ou “Calma, vai dar tudo certo!” que traziam energia nova para que eu pudesse finalizar o trabalho.

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

Aos funcionários de pós-graduação de Biologia Celular e Estrutural e do Departamento de Biologia Geral, especialmente à Beth, pelo atendimento atencioso, pela competência e carinho.

Aos professores do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV, Adilson, Isabel, Juliana e Mariana, pela colaboração na análise do material histológico, no uso de equipamentos e materiais e pelo exemplo de profissionalismo.

Aos professores do Departamento de Biologia Geral da UFV, pelos ensinamentos e lições durante o curso.

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

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de pesquisa e pelo financiamento do projeto, imprescindíveis na realização deste trabalho.

Aos Professores João Bosco Gonçalves de Barros e Clóvis Andrade Neves por aceitarem participar da banca examinadora e pelas valiosas contribuições ao trabalho.

Aos animais utilizados neste estudo.

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

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Metais	3
2.1.1. Metais Pesados	3
2.1.2. Chumbo	4
2.1.3 Toxicocinética do chumbo	6
2.2. Açai (<i>Euterpe edulis</i> Martius)	8
2.3. Testículo	10
2.4. Efeitos do chumbo sobre o aparelho reprodutor masculino	11
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivo Geral	14
3.2. Objetivos Específicos	14
4. MATERIAS E MÉTODOS	15
4.1. Animais	15
4.2. Tratamentos	15
4.3. Estudos histológicos	15
4.3.1. Preparação do testículo para microscopia de luz	15
4.3.2. Análises morfométricas do compartimento tubular	16
4.3.3. Análises morfométricas dos componentes intertubulares	17
4.3.4. Análise histopatológica qualitativa e quantitativa	18
4.4. Análises estatísticas	19
5. RESULTADOS	20
5.1. Análise estrutural	20
5.2. Análises biométricas	24
5.3. Análises morfométricas do compartimento tubular	24
5.4. Análises morfométricas dos componentes intertubulares	27
5.5. Análise estereológica das células de Leydig	27
5.6. Análise histopatológica qualitativa e quantitativa	30
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÕES	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

RESUMO

NEVES, Ana Carolina, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2016. **Efeitos do açaí (*Euterpe edulis*) em testículo de ratos expostos ao acetato de chumbo: análise morfométrica e estrutural.** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.

O açaí, fruto da palmeira juçara (*Euterpe edulis*), é tradicionalmente consumido no Brasil, mas ganhou popularidade no exterior como um alimento funcional. Apesar do seu grande potencial antioxidante já ser conhecido, ainda existe pouca informação sobre o seu efeito sobre a saúde em geral. O chumbo é um metal pesado conhecido pelo aumento dos radicais livres, resultando assim em danos oxidativos celulares. Nesse sentido, este estudo foi desenhado para avaliar se *Euterpe edulis* é capaz de reduzir danos morfológicos induzidos pelo chumbo em testículo de ratos Wistar. Foram utilizados 34 ratos Wistar machos adultos, com 100 dias de idade, divididos em seis grupos: o grupo controle (I) recebeu água destilada, o grupo controle açaí (II) recebeu extrato de açaí na dose de 400 mg/kg, os grupos controle chumbo (III e IV) receberam solução de acetato de chumbo nas doses de 32 e 128 mg/kg, respectivamente, enquanto os grupos tratados (V e VI) receberam extrato de açaí (400 mg/kg) e acetato de chumbo (32 e 128 mg/kg, respectivamente), por gavagem, durante 58 dias consecutivos. Após o período de tratamento, os animais foram eutanasiados e as amostras testiculares foram retiradas e incluídas em resina, coradas e submetidas a análises histológicas e morfométricas. O peso do parênquima testicular e a porcentagem e a altura do epitélio seminífero mostraram aumento significativo nos animais tratados com chumbo e açaí. O percentual de tecido conjuntivo no intertúbulo aumentou em todos os grupos que receberam chumbo, independente do açaí. O açaí promoveu recuperação e aumento de parâmetros tubulares em animais que receberam diferentes dosagens de chumbo.

ABSTRACT

NEVES, Ana Carolina, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2016. **Effects of açai (*Euterpe edulis*) in rats testis exposed to lead acetate: morphometric and structural analysis.** Adviser: Sérgio Luis Pinto da Matta.

The açai, also known as palm-juçara (*Euterpe edulis*), is traditionally consumed in Brazil but has gained popularity abroad as a functional food. Despite its known antioxidant potential, there is little information about its effect on health in general. The lead is a heavy metal known to increase free radicals, leading to oxidative cell damage. In this sense, this study was performed to evaluate whether *E. edulis* can reduce testicular morphological damage induced by chronic exposure to lead in rats. Thirty-four adult male Wistar rats, 100 days of age, were used and divided into six groups: control group (I) received distilled water, açai control group (II) received açai extract at a dose of 400 mg/kg, the lead control groups (III and IV) received lead acetate solution at doses of 32 and 128 mg/kg, respectively, while the treated groups (V and VI) received açai extract at a dose of 400 mg/kg and lead acetate in doses of 32 and 128 mg/kg, respectively, by gavage for 58 consecutive days. After the treatment period, the animals were euthanized and testicular samples were removed, weighed and embedded in historesin, stained and subjected to histological and morphometric analyzes. The weight of testicular parenchyma, and the percentage and height of the seminiferous epithelium showed significantly increased in animals treated with lead and açai. The intertubular percentage of connective tissue increased in all groups receiving lead, regardless of the açai. Açai promoted the recovery and increase of tubular parameters in animals that received different dosages of lead.

1. Introdução

Atualmente, uma das grandes preocupações ambientais está relacionada aos resíduos sólidos gerados pela sociedade moderna e consumista (Guerrero et al, 2013). A exposição da população a uma variedade de metais tóxicos encontrados no ambiente é um problema de saúde pública (Liu et al., 2008). Com o rápido desenvolvimento das indústrias tais como, mineradoras, indústrias de fertilizantes, baterias, indústrias de papel e pesticidas, os metais pesados são direta ou indiretamente descarregados no ambiente, especialmente em países em desenvolvimento (Belgaied, 2003; Duruibe et al., 2007; Fu & Wang, 2011). Dentre os metais pesados de maior preocupação estão o chumbo, o mercúrio e o cádmio (Liu et al., 2008)

Os metais pesados como o chumbo são desprovidos de função biológica conhecida, ou seja, naturalmente estes elementos não participam das reações bioquímicas necessárias à manutenção da vida (Lasat, 2002). Além disso, uma vez introduzidos no organismo são capazes de bioacumular-se e promover uma série de disfunções nos diversos órgãos, inclusive nos testículos (Kakkar & Jaffery, 2005). A disfunção testicular induzida por metais pode levar a distúrbios nas células de Sertoli, que sustentam as células germinativas, ou nas células de Leydig, que são responsáveis pela produção de andrógenos, sob controle do eixo hipotálamo-hipófise-testículo (Bizarro et al., 2003; Cheng et al., 2011). Os efeitos tóxicos dos metais pesados e dos compostos de metais são determinados pela taxa com que eles se convertem em uma forma biodisponível. (Muniz & Oliveira- Filho, 2006; Fu & Wang, 2011).

Devido a sua ocorrência natural e sua ampla utilização industrial, o chumbo permanece associado a diversas patologias sendo por isso, considerado um poluente com séria ameaça à saúde humana (Liu et al., 2008; Flora et al., 2012). Vários estudos têm indicado o aumento de diversas anormalidades no sistema reprodutor de animais e humanos expostos a esse metal (Apostoli et al., 1998; Landrigan et al., 2000; Pizent et al., 2012). Alterações histológicas nos testículos de ratos tratados com chumbo mostraram danos testiculares, tais como desorganização do epitélio germinativo, vacuolização epitelial e perda celular (Batra et al., 1998; El-Neweshy & El-Sayed, 2010; El-Sayed & El-Neweshy, 2010; El-Shafai et al., 2011). O chumbo também pode afetar diretamente as células de Leydig e reduzir sua capacidade

esteroidogênica (Thoreux-Manlay et al., 1995; Hsu et al., 1998; Biswas & Ghosh, 2004; Haw et al., 2012; Hamadouche et al., 2013).

A prevenção ainda é a melhor maneira de se evitar intoxicação por chumbo. Estratégias de medicina preventiva e de saúde pública devem, portanto, serem consideradas. A nutrição desempenha um papel importante na prevenção da toxicidade induzida pelo chumbo (Guidotti & Ragain, 2007). Tem sido demonstrado que a absorção de certos nutrientes, como elementos minerais (Batra et al., 1998), vitaminas (Acharya et al., 2003) e flavonoides pode proporcionar proteção contra a ação de metais pesados no organismo, de forma preventiva ou curativa (Flora et al., 2003; Yousef & Salama, 2009). Embora o mecanismo pelo qual estes nutrientes restauram o equilíbrio entre enzimas pró-oxidantes e agentes oxidantes ainda não seja claro, os dados sugerem um papel protetor dos nutrientes contra o envenenamento por chumbo (Hsu & Guo, 2002). Havendo intoxicação por chumbo, o tratamento consiste em tentar reverter a toxicidade através de intervenção individual e a maneira convencional é o uso de agentes quelantes, que são capazes de aumentar a excreção desse metal. Porém, a maioria dos quelantes provocam efeitos colaterais e não são totalmente eficientes (Gurer & Ercal, 2000; Flora et al., 2008).

O declínio da capacidade reprodutiva masculina é uma das principais manifestações da toxicidade do chumbo (Kakkar & Jaffery, 2005; Anjum et al., 2011). Portanto, entender os mecanismos que levam às alterações no testículo é de extrema importância para a busca de alternativas na prevenção ou tratamento para tais danos (Vigeh et al., 2011). Embora seja bem conhecido que o chumbo exerce efeitos tóxicos sobre os testículos, poucos estudos têm quantificado e qualificado, ao mesmo tempo, as alterações morfológicas no parênquima testicular após exposição ao metal. Dentro desse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial do extrato de açaí na proteção de células espermatogênicas contra danos induzidos pelo chumbo.

2. Revisão de literatura

2.1. Metais

2.1.1. Metais pesados

Os metais pesados são definidos como elementos químicos que apresentam densidade maior que 5 g/cm^3 (Järup, 2003). A presença de altas concentrações de metais pesados no ambiente constitui hoje um problema global devido à dimensão dos lançamentos de origem antropogênica e o seu contínuo aumento nos diferentes ecossistemas, atribuído em grande parte à industrialização e ao desenvolvimento urbano. Vários metais pesados, como o cobre (Cu), o zinco (Zn) e o manganês (Mn) participam do metabolismo em várias vias de sinalização. Outros metais como Cádmio (Cd) e Chumbo (Pb), não possuem funções biológicas conhecidas e geralmente prejudicam os organismos por formarem complexos estáveis com as biomoléculas (Lasat, 2002). Todos os tipos de metais são considerados potencialmente tóxicos e capazes, portanto, de provocar efeitos biológicos adversos quando presentes em concentrações elevadas. O fator-chave é o grau de exposição que afeta o organismo. A toxicidade do metal está relacionada à dose, ao tempo de exposição, à forma física e química do elemento, a via de absorção e o organismo envolvido (Apostoli, 2002; Plum et al., 2010).

Um dos principais problemas ambientais está relacionado ao fato dos metais pesados serem altamente reativos e bioacumuláveis, ou seja, os organismos são incapazes de eliminá-los quimicamente (Schmitt-Jansen et al., 2008). Uma vez absorvidos, os metais pesados são geralmente retidos por proteínas e então transportados pelo sangue até tecidos onde podem ser estocados ou biotransformados (Liu et al., 2008). A toxicidade causada por esses metais se deve à ocorrência de dois principais mecanismos de ação: formação de complexos com os grupos funcionais das enzimas, o que prejudica o perfeito funcionamento do organismo, e danos às membranas celulares através do aumento da formação de radicais livres e destruição das defesas antioxidantes endógenas, levando a alterações ou impedindo o transporte de substâncias essenciais (Goldhaber, 2003). Os efeitos tóxicos podem incluir efeitos letais e subletais como, alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, respostas farmacocinéticas, patológicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais (Duruibe et al., 2007; Liu et al., 2008).

Os efeitos adversos dos metais pesados sobre a fertilidade masculina ocorrem nos órgãos genitais e/ou no sistema endócrino. Podem incluir alterações no

comportamento sexual, na fertilidade, na fecundação, ou modificações em outras funções dependentes da integridade do aparelho reprodutor masculino (Liu et al., 2008).

2.1.2. Chumbo

O chumbo (do latim *plumbum*) é um elemento químico de símbolo Pb, número atômico 82, com massa atômica igual a 207,2 e densidade de 11,3 g/cm³ (WHO, 1995; Apostoli, 2002). Este metal foi um dos primeiros a ser manipulado pelo homem por possuir características como baixo ponto de fusão, durabilidade, ductibilidade e facilidade em formar ligas metálicas (Sheets, 1998). O chumbo tem sido usado há pelo menos 5000 anos e suas aplicações iniciais incluíam materiais de construção, pigmentos para cerâmica, vidros e tubos para transporte de água (Järup, 2003). Nos tempos antigos, o chumbo metálico foi produzido provavelmente como um subproduto na mineração da prata e na fundição. Os antigos egípcios utilizavam o chumbo na fabricação de adornos, utensílios e pigmentos de chumbo para esmaltes, tintas e cosméticos (Lessler, 1988). Os antigos romanos usavam compostos de chumbo para fabricar vidros e cerâmica e o chumbo metálico para utensílios e encanamentos. (Hernberg, 2000). Além disso, desde o império greco-romano se fazia a correção da acidez do vinho, através da adição de acetato de chumbo, que conferia à bebida um sabor mais adocicado. Como consequência, o envenenamento por chumbo parece ter causado muitos óbitos, deformidades e danos cerebrais (Lessler, 1988; Hernberg, 2000; Järup, 2003; Reddy & Braun, 2010).

O chumbo é encontrado na natureza tanto no estado livre como em associação com outros elementos químicos. A galena (sulfeto de chumbo) é a mais importante fonte primária de chumbo e a principal fonte comercial (Paoliello & Chasin, 2001; ATSDR, 2007). As maiores fontes naturais de chumbo são emissões vulcânicas, intemperismo geoquímico e névoas aquáticas (WHO, 1995). Entre as fontes antropogênicas encontram-se as fábricas de baterias de automóveis, as ligas metálicas, os pigmentos de tinta, a munição, a mineração, a fundição e a gasolina (Fisher et al., 2006; Muniz & Oliveira-Filho, 2006; Duruibe et al., 2007; Fu & Wang, 2011; Flora et al., 2012; Haig et al., 2014). Além disso, os sais de chumbo podem aparecer como constituintes de vitrificados, esmaltes e vidros (Belgaied, 2003; ATSDR, 2007).

Embora os processos naturais e antropogênicos sejam responsáveis pela liberação de chumbo no ambiente, a contaminação antropogênica é predominante e a

emissão de gases pelos automóveis é a principal delas (WHO, 1995; ATSDR, 2007). O chumbo, na forma de chumbo tetraetila, começou a ser misturado à gasolina a partir de 1922 com o objetivo de melhorar o desempenho dos motores (Landrigan, 2002). No Brasil, esse composto não é mais adicionado à gasolina desde a década de 90, sendo completamente substituído por etanol (Pantaroto et al., 2007). Da mesma forma, a quantidade de chumbo acrescida a determinados produtos como tintas, tem sido reduzida nos últimos anos com objetivo de minimizar a exposição (ATSDR, 2007). O chumbo pode ser encontrado no ar, nos rios, lagos e oceanos, na poeira, no solo e na cadeia alimentar. Portanto a exposição ambiental ao metal pode ocorrer pela ingestão de comida ou água contaminada. A exposição ao chumbo também pode ocorrer durante atividades como a demolição e restauração de construções velhas, cujas tintas contenham o metal em sua composição, e exposição ocupacional em minas e fundições (ATSDR, 2007).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece o chumbo como um dos elementos químicos mais perigosos à saúde humana (WHO, 2000). O chumbo também foi classificado como o segundo elemento dentre as substâncias mais tóxicas listadas pela Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (ATSDR, 2015). O valor limite estabelecido pela U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) para o chumbo no ar é de $1,5\mu\text{g}/\text{m}^3$. No Brasil, não são conhecidos parâmetros que limitem a concentração do chumbo no ar, assim como não existem normas específicas para o seu controle na atmosfera (Vanz et al., 2003). No caso de contaminação dos solos ou água subterrânea, são definidos valores de intervenção a ser utilizados na gestão de áreas contaminadas, que são definidos separadamente para solos agrícolas, residenciais e industriais (200, 350 e 1200 mg/kg, respectivamente). O nível proposto de intervenção no caso de contaminação de águas subterrâneas é de 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ ou 0,01 mg/L e foi baseado em uma regulamentação nacional (Portaria nº 1.469, de 29/12/2000 do Ministério da Saúde). O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA - resolução nº 20, de 18/06/1986) estabeleceu o teor máximo de chumbo permitido na água para beber de 0,03 mg/L e a água salobra e salina usadas para recreação podem ter um teor máximo de chumbo de 0,01 mg/L. O Ministério da Saúde do Brasil, através de um ato normativo (Portaria nº 685, de 27/08/1998) estabeleceu os limites máximos permitidos de contaminantes em alimentos, incluindo os compostos inorgânicos e elementos metálicos que constituem riscos para a saúde humana. (Paoliello & De Capitani, 2005). A legislação brasileira,

por meio da Norma Regulamentadora NR-7 (Portaria nº 24, de 29/12/94), estabelece que a concentração máxima de chumbo no sangue (Pb-S) não deve ultrapassar 40µg/dl (valor de referência de normalidade) e o limite de tolerância biológica (índice biológico máximo permitido) é de 60µg/m³ (Cordeiro et al, 1996; Jacob et al., 2002).

2.1.3 Toxicocinética do chumbo

Existem dois grupos principais de compostos de chumbo e que apresentam diferenças quanto à toxicidade: o chumbo inorgânico (sais de chumbo e chumbo metálico) e o chumbo orgânico. A intoxicação por chumbo inorgânico ocorre predominantemente através da via respiratória e pelo trato gastrointestinal (Sadao, 2002). No organismo humano o chumbo inorgânico não sofre metabolização, mas é diretamente absorvido, complexado com macromoléculas, distribuído e excretado (Tsalev & Zapriav, 1985). Com relação ao chumbo orgânico, a intoxicação é mais frequente através do chumbo tetraetila e tetrametila. Por serem muito lipossolúveis, são facilmente absorvidos pela pele, pelo trato gastrointestinal e pelos pulmões (Klasseen, 1991; Sadao, 2002). Ao contrário do chumbo inorgânico, o chumbo orgânico é metabolizado pelo fígado a chumbo trietil e chumbo inorgânico, os quais são responsáveis pelos efeitos tóxicos no organismo (Kosnett, 2013).

A absorção do chumbo é determinada por sua espécie química, suas características físico-químicas, pela dose, a frequência, a duração e a via da exposição, podendo ser influenciadas por fatores como idade, sexo, estilo de vida, estado fisiológico e nutricional e ainda pela susceptibilidade individual do organismo exposto (Alexander et al., 1996; Wang et al., 2008). Uma baixa ingestão de cálcio, ferro, fósforo, selênio ou zinco podem provocar um aumento na absorção do chumbo (WHO, 1995). Diferenças na absorção intestinal, metabolismo ósseo e o rápido desenvolvimento do sistema nervoso central, predispõem uma absorção do chumbo cinco vezes maior nas crianças em relação aos adultos (Lockitch, 1993). Adultos podem absorver 3-10% de uma dose oral de chumbo solúvel em água, enquanto crianças absorvem 40-50% (WHO, 1995; ASTDR, 2007).

Uma vez absorvido, o chumbo distribui-se no compartimento sanguíneo de duas formas: uma não difusível ligada aos eritrócitos e outra difusível no plasma. Aproximadamente 95% do metal encontram-se associado aos eritrócitos, seja na superfície externa de suas membranas ou no meio intracelular ligado a proteínas, como a ácido δ-aminolevulínico desidratase (ALA-D) e a hemoglobina (Simons,

1993; Telišman et al., 2001). Os demais 5% de chumbo podem ser encontrados no plasma, de forma livre ou associado à albumina, à γ -globulina e a outros compostos de baixo peso molecular contendo sulfidrilas (SH) (cisteína, hemocisteína e cisteamina), constituindo a fração potencialmente tóxica do metal, que é capaz de alcançar os órgãos e tecidos alvos (Al-Modhefer et al., 1991). O tempo de meia vida para o chumbo no sangue é em torno de 36 dias (Paoliello & Chasin, 2001; Kosnett, 2013).

Do sangue o chumbo distribui-se para os tecidos moles como cérebro, fígado, e rins onde permanece, predominantemente, ligado a proteínas. Complexos formados pelo chumbo e proteínas ácidas denominados corpos de inclusão intranucleares podem ser observados em células do túbulo renal proximal de indivíduos que apresentam neuropatia induzida pelo metal (Gonick, 2008). O tempo de meia vida do chumbo nos tecidos moles é em torno de 40 dias (Paoliello & Chasin, 2002; Kosnett, 2013).

Finalmente o chumbo deposita-se nos ossos onde substitui o cálcio, já que os íons Pb^{2+} e Ca^{2+} são similares em tamanho (Baird, 2002). Em adultos, os ossos contêm cerca de 90% a 95% do conteúdo corpóreo total de chumbo, enquanto que 80% a 95% são encontrados em crianças (Hu, 1998). O tecido ósseo constitui o principal sítio de estocagem de longo prazo, de onde o metal pode ser mobilizado, levando o organismo a uma exposição sistêmica continuada (Smith et al., 1995). Existem evidências de que a mobilização de chumbo dos ossos para o sangue é intensificada durante os períodos de maior liberação óssea tais como crescimento rápido na infância, gravidez, lactação, menopausa e desequilíbrios hormonais (Smith et al., 1996). O tempo de meia vida do chumbo nos ossos é em torno de 20 a 30 anos (Paoliello & Chasin, 2002; Kosnett, 2013).

Independente da via de absorção, o chumbo é eliminado principalmente pelas fezes (15%) e urina (75-80%), e por outras vias de menor eliminação, como saliva, suor, cabelo e unhas (menos de 8%) (WHO, 1995; ATSDR, 2007). Uma via especial de excreção do chumbo endógeno é através do leite materno (Skerfving, 1993). O chumbo possui a capacidade de atravessar a barreira transplacentária, podendo passar do organismo materno para o fetal. Portanto, a exposição da criança pode ter início ainda na vida intrauterina (Ong et al., 1993).

O chumbo pode afetar uma série de sistemas nos organismos vivos cujos efeitos serão dependentes do nível e da duração da exposição (WHO, 1995). Este

metal é extremamente tóxico para os sistemas nervoso central e periférico, renal, hematopoiético e trato gastrintestinal. Pode afetar também o sistema cardiovascular, causar alterações endócrinas, imunológicas, danos reprodutivos e causar efeitos carcinogênicos e mutagênicos (Skerfving et al., 1993; WHO, 1995). A diversidade de sistemas afetados gera vários sintomas que, juntos, levam a um estado patológico denominado saturnismo. Os sintomas mais comuns são: dor abdominal, fadiga, sonolência, dores articulares, irritabilidade, impotência sexual, depressão, anorexia, mialgia, tremores, alterações do ritmo intestinal, hipertensão arterial sistêmica e perda de peso (WHO, 1995).

2.2. Açaí (*Euterpe edulis* Martius)

A espécie *Euterpe edulis* Martius é uma palmeira pertencente à família Arecaceae, do gênero *Euterpe*, cujos frutos são pequenos, arredondados e de coloração roxo-escuro, em função da presença de pigmentos naturais denominados antocianinas. É conhecida popularmente por palmeira juçara, jiçara ou açaí da Mata Atlântica (Lin, 1988). Esta palmeira é encontrada principalmente em áreas remanescentes de Mata Atlântica do Brasil, desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul (Reis et al., 2000).

A *E. edulis* é uma das espécies mais exploradas na Mata Atlântica. A exploração ilegal e acelerada contribui para a degradação do meio ambiente e tornou-se um fator de preocupação para a preservação da espécie, uma vez que não há rebrota após o corte para extração de palmito (Conte et al., 2003). Outro produto pouco explorado e estudado do *E. edulis* pode ser obtido do seu fruto. O fruto do palmitreiro pode ser consumido de diversas formas, como suco, sorvete, açaí na tigela, sobremesas, *shakes* e em preparações salgadas (Borges et al., 2011). Para a coleta deste fruto, ao contrário do palmito, não é necessário o corte da palmeira, porém também é interessante que seja realizado um programa de manejo sustentável para sua exploração (Reis et al., 2000; Conte et al., 2003).

O consumo de frutas ricas em antioxidantes tem aumentado cada vez mais no Brasil. O açaí é um alimento altamente energético e nutritivo e vem tendo seu interesse internacional aumentado devido aos benefícios proporcionados à saúde e a sua elevada atividade antioxidante, em especial pela presença das antocianinas (Pacheco-Palencia et al., 2008; Lima et al., 2012). Tanto os produtos do açaí consumidos no Brasil quanto os exportados são quase inteiramente obtidos da *Euterpe oleracea* (De Brito et al., 2007). A *Euterpe oleracea* Martius, conhecida

como açazeiro, também pertence à família *Arecaceae*, do gênero *Euterpe*, porém é nativa da região Amazônica (Reis et al., 2000).

Estudos indicam que os frutos de *E. edulis* possuem um teor de antocianina maior do que os de *E. oleracea* (Ribeiro et al., 2011; Inácio et al., 2013). De Brito et al. (2007), analisaram o conteúdo de antocianinas de alguns frutos tropicais, como acerola (*Malpighia emarginata*), juçara (*Euterpe edulis*), jambolão (*Syzygium cumini*) e guajiri (*Chrysobalanus icaco*) e observaram que a maior quantidade de antocianina encontrada estava presente na juçara (290 mg/100 g de peso fresco). Neste trabalho, também foram analisados os tipos de antocianinas mais significativos da juçara, que foram a cianidina-3-glicosídeo (1358 mg/100 g de peso seco) e a cianidina-3-rutinosídeo (1565 mg/100 g de peso seco). Além das antocianinas, os frutos de *E. edulis* possuem considerável quantidade de vitamina C, minerais, flavonoides, carotenoides e ácidos fenólicos (Rufino et al., 2010; Borges et al., 2011; Inada et al., 2015). Entretanto, o conteúdo desses compostos bioativos encontrado no açaí difere consideravelmente entre as referências sobre o assunto em função da variabilidade intrínseca entre as amostras, da forma de processamento do material e da metodologia utilizada (Ribeiro et al., 2011).

Ribeiro e Seravalli (2012) definem que as antocianinas são antocianidinas ligadas a açúcares. Entre as vinte antocianidinas conhecidas, que ocorrem naturalmente, apenas seis são mais frequentes: pelargonidina, cianidina, delphinidina, malvidina, peonidina e petunidina. As antocianinas pertencem à ampla classe de compostos fenólicos naturais, coletivamente nomeados como flavonoides. Além de suas funções como corantes naturais, as antocianinas têm apresentado grande potencial farmacológico, que inclui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Mertens-Talcott et al., 2008), como agente antibacteriano (Kong et al., 2003) e na diminuição dos riscos de doenças cardiovasculares (Ghiselli et al., 1998) e de câncer (Kamei et al., 1998).

Autoridades sanitárias brasileiras têm sido alertadas para a ocorrência de transmissão da doença de Chagas por via oral, ocorrendo na forma de surtos, através da ingestão de alimentos contaminados com o vetor (Roque et al., 2008; Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012; Coura & Junqueira, 2015). No caso do açaí, a contaminação pode ser causada pelas fezes do barbeiro, vetor do *Trypanosoma cruzi*, diretamente sobre os frutos ou pelo esmagamento acidental do inseto durante o processamento. (Nóbrega et al., 2009; Valente et al., 2009; Pereira et al., 2010).

Entretanto, o açaí corretamente higienizado e pasteurizado está livre desta contaminação devido aos procedimentos rigorosos na fabricação (Pereira et al., 2010).

2.3. Testículo

O testículo é um órgão com função endócrina e exócrina revestido por uma espessa cápsula conjuntiva, a albugínea, que envia septos para o interior do órgão formando o mediastino testicular. O parênquima testicular consiste na parte funcional dos testículos e apresenta dois compartimentos: o tubular e o intersticial ou intertubular (Russell et al., 1990). O compartimento tubular constitui a maior parte do testículo, ocupando, na maioria dos mamíferos, de 70% a 90% do parênquima testicular (França & Russell, 1998). Neste compartimento, responsável pela produção dos espermatozoides, encontram-se os túbulos seminíferos, que se conectam através das duas extremidades à rede testicular, localizada no mediastino de onde o conteúdo tubular é direcionado para os ductos eferentes e, na sequência, para o epidídimo (França & Russell, 1998).

Os túbulos seminíferos são constituídos, de sua porção externa para a interna, de túnica própria, epitélio seminífero e lume. Na túnica própria são observadas as células mióides ou peritubulares, a membrana basal e fibras colágenas (Russell et al., 1990). Dois tipos celulares estão presentes no epitélio seminífero: as células de Sertoli e as células germinativas ou espermatogênicas. Juntamente com as células mióides, as células de Sertoli elaboram a membrana basal que serve de suporte estrutural para a própria célula de Sertoli e para as células germinativas que se encontram na porção basal do epitélio seminífero. As células de Sertoli, através de junções de oclusão, dividem o epitélio seminífero em dois ambientes: o basal onde se localizam as espermatogônias e os espermatócitos primários na fase inicial da prófase meiótica (preleptótenos e leptótenos), e o adluminal, no qual se encontram os espermatócitos primários a partir da fase de zigóteno, espermatócitos secundários e espermátides. Desta forma, o ambiente adluminal está totalmente sob o controle das células de Sertoli, propiciando um microambiente isolado do sistema imunitário, o que é essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (Russell et al., 1990; Sharpe, 1994). As junções entre as células de Sertoli modificam-se de modo a permitir a passagem dos espermatócitos em preleptóteno do ambiente basal para o adluminal, quando estes iniciam a meiose, o que significa que existe uma dinâmica das junções que permite que as células envolvidas no processo espermatogênico

progridam no sentido da luz do túbulo, sem a ruptura da barreira (Liu et al., 2008). No lume tubular são encontrados o fluido secretado pelas células de Sertoli e os espermatozóides recém espermiados (Russell et al., 1990).

O compartimento intertubular é constituído de vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, fibras e células do tecido conjuntivo como, macrófagos e poucos mastócitos, além das células de Leydig. Estas células são bastante conhecidas por sua marcante produção de andrógenos, os quais são sintetizados a partir de uma molécula base, o colesterol, e responsáveis pelo aparecimento de caracteres sexuais secundários e na manutenção da espermatogênese em animais sexualmente maduros (Bardin, 1996). Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies quanto à proporção volumétrica dos diferentes componentes do compartimento intertubular, a célula de Leydig é usualmente o tipo celular mais frequente neste compartimento (França & Russell, 1998). De modo geral, os roedores apresentam o padrão intertubular do tipo I, onde pequena quantidade de células de Leydig e vasos sanguíneos encontram-se separados dos túbulos seminíferos por um espaço linfático bem desenvolvido. Este espaço linfático é revestido pela camada endotelial visceral, a qual envolve as células de Leydig e os vasos sanguíneos, e pela camada parietal que se encontra em contato com a túnica própria dos túbulos seminíferos (Fawcett et al., 1973).

Há uma relação direta entre o peso testicular e a produção espermiática (Amann, 1970; França & Russell, 1998): quanto maior o testículo, maior a produção de espermatozóides. Porém a quantidade de espermatozóides produzidos é sempre maior que o número necessário para a fecundação e não necessariamente, o tamanho do testículo acompanha proporcionalmente o tamanho corporal, uma vez que os animais de grande porte produziram um enorme excedente (França & Russell, 1998; Paula et al, 2002). Porém, entende-se que seja mais importante para avaliar a produção espermiática as análises do volume do epitélio seminífero (Wing & Christensen, 1982) e o índice tubulossomático (ITS), que leva em consideração o percentual de massa corporal investido em túbulo seminífero (Morais et al., 2014).

2.4. Efeitos do chumbo sobre o aparelho reprodutor masculino

Estudos com humanos e outros animais têm demonstrado que a exposição ao chumbo promove uma série de alterações sobre o sistema reprodutor, especialmente nos testículos (Apostoli et al., 1998). A severidade da toxicidade do chumbo parece ser dependente de fatores tais como idade do animal, duração e frequência da exposição, rota de entrada, espécies animais utilizadas no experimento e dose

administrada (Ronis et al., 1996; Wang et al., 2008). Alterações macroscópicas nos órgãos acessórios sexuais tais como, diminuição do peso testicular, vesícula seminal, epidídimo e próstata ventral têm sido relatadas em estudos usando animais experimentais expostos ao chumbo (Sokol, 1990; Thoreux-Manlay et al. 1995; Ronis et al., 1996; Wadi & Ahamad, 1999; Biswas & Ghosh, 2004; Haouas et al., 2015).

O chumbo apresenta atividade gonadotóxica, o que pode induzir diferentes graus de alterações histopatológicas no parênquima testicular (El-Sayed & El-Neweshy, 2010; El-Shafai et al., 2011). A exposição ao chumbo está associada com a diminuição do número de espermatozóides, diminuição da motilidade e aumento de anormalidades morfológicas espermáticas em animais (Sokol & Berman, 1991) e seres humanos (Alexander et al., 1996). O chumbo pode afetar diretamente as células de Leydig e reduzir sua capacidade esteroidogênica. Vários trabalhos têm demonstrado redução nos níveis séricos de testosterona em ratos após exposição ao chumbo (Thoreux-Manlay et al., 1995; Hsu et al., 1998; Biswas & Ghosh, 2004; Haw et al., 2012).

Animais expostos ao chumbo mostraram alterações no processo espermatogênico e grande diminuição da capacidade de fertilidade quando comparados a animais não expostos (Lancranjan et al., 1975). Hsu et al. (1997), trabalhando com ratos, também observaram que a baixa exposição ao chumbo afetou negativamente a função espermática devido a ativação de uma das vias de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estudos com trabalhadores expostos ao chumbo mostraram alterações na função das células de Sertoli (Gustafson, 1989). O chumbo também pode reduzir a quantidade de esteroides sulfatados excretados na urina e causar uma redução nos níveis de testosterona (Apostoli et al., 1989). Donovan et al. (1980), mostraram que o chumbo pode inibir a ligação da diidrotestosterona a receptores específicos na próstata e vesícula seminal em camundongos.

Disfunções reprodutivas têm sido descritas em homens expostos ao chumbo no local de trabalho, incluindo oligozoospermia e astenozoospermia (Lancranjan et al., 1975; Telisman et al., 2000; Naha et al., 2005). Assennato et al. (1986) verificaram uma diminuição significativa na contagem de espermatozóides em trabalhadores expostos ao chumbo quando comparados com os controles, mas como não foram encontradas diferenças nas concentrações hormonais, sugeriram um efeito tóxico direto do chumbo na produção de espermatozóides. Rodamilans et al. (1988)

demonstraram os efeitos tóxicos do chumbo diretamente sob o testículo, seguido por distúrbio do hipotálamo ou hipófise, após um longo período de exposição ao metal. Gustafson et al. (1989) realizaram um estudo na Suécia com um grupo de trabalhadores na fundição do chumbo. Esse estudo mostrou um complexo efeito da moderada exposição ao chumbo sobre o sistema endócrino, possivelmente mediado por mudanças no eixo hipotálamo-hipófise. Outros autores também relataram hipogonadismo e diminuição nos níveis de testosterona sérica em trabalhadores na fundição do chumbo (Cullen et al., 1983; Cullen et al., 1984). Amostras de sangue e sêmen foram analisadas em trabalhadores de fábricas de baterias, mostrando uma inversa associação entre níveis de chumbo no plasma, volume e concentração de espermatozoides (Telisman et al., 2000). Outros autores também relataram diminuição da libido e aumento de anomalias no sêmen de trabalhadores expostos ao chumbo (Ellis & Desjardins, 1982).

3. Objetivos

3.1. Objetivos Gerais

Avaliar o potencial do extrato de açai (*Euterpe edulis*) em atenuar os danos testiculares em ratos Wistar adultos expostos ao acetato de chumbo.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos das doses de acetato de chumbo no testículo em níveis histológicos e fisiológicos;
- Avaliar qualitativa e quantitativamente possíveis alterações nos túbulos seminíferos;
- Avaliar qualitativa e quantitativamente possíveis alterações no compartimento intertubular;
- Avaliar qualitativa e quantitativamente possíveis interferências do chumbo nas células de Leydig;
- Avaliar qualitativa e quantitativamente o potencial do extrato de açai em atenuar os danos provocados pelo chumbo nos túbulos seminíferos.

4. Material e Métodos

4.1. Animais

Foram utilizados 34 ratos Wistar machos, com 100 dias de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB), da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. Os animais receberam ração e água *ad libitum* e foram mantidos sob condições de temperatura controlada (21-23°C) e 12 horas de luz diárias. O experimento foi conduzido de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovado pelo CEUA/UFV (Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, Brasil), cujo protocolo de aprovação é 69/2010.

4.2. Tratamentos

Os animais foram colocados em gaiolas individuais e distribuídos em 6 grupos experimentais sendo os grupos I e II com 5 animais e os grupos III, IV, V e VI com 6 animais. O grupo controle (I) recebeu 0,5 mL de água destilada, o grupo controle açaí (II) recebeu 1,5 mL de extrato de açaí na dose de 400 mg/kg, os grupos controle chumbo (III e IV) receberam 0,5 mL de chumbo nas doses de 32 e 128 mg/kg, respectivamente, na forma de acetato de chumbo $[(C_2H_3O_2)_2Pb \cdot 3H_2O]$ (Sigma-Aldrich), enquanto os grupos tratados V e VI receberam 1,5mL de extrato de açaí na dose de 400 mg/kg e 0,5mL de chumbo nas doses de 32 e 128 mg/kg, respectivamente. Os tratamentos foram administrados uma vez ao dia, pelo método de “gavagem”, durante 58 dias consecutivos. Nos grupos tratados (V e VI) o extrato de açaí foi fornecido 30 minutos antes da exposição ao acetato de chumbo. Os grupos I, II, III e IV foram submetidos a uma segunda gavagem com 0,5 mL de solução salina, para padronização dos procedimentos.

Para impedir a precipitação do acetato de chumbo, foi adicionado 1 mL de HCl 5N para cada litro de água destilada usada para dissolver o chumbo (Allouche et al., 2009). Ao final do período experimental os animais foram pesados e submetidos a eutanásia por inalação de CO₂. Para cálculo da variação de peso corporal (PC) os animais foram pesados no início e no final do experimento.

4.3. Estudos histológicos

4.3.1. Preparação do testículo para microscopia de luz

Os testículos foram removidos, dissecados, pesados e imersos em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas. Posteriormente foram transferidos para álcool 70%, desidratados em série etanólica crescente e incluídos em glicol

metacrílico (Historesin®, Leica). Secções de 3 µm de espessura foram obtidas em micrótopo rotativo (Reichert-Jung, Alemanha) usando navalhas de vidro. As secções foram coradas com azul de toluidina/borato de sódio 1%, montadas com Entellan (Merck) e utilizadas para análises morfométricas e histopatológicas. Para evitar a repetição das análises da mesma região, foram realizados cortes semisseriados, respeitando-se intervalos de 40 µm entre as secções. Imagens do parênquima testicular (10 e 40x) foram obtidas utilizando-se microscópio Olympus AX-70 e analisadas com o auxílio do software Image-Pro Plus 4.5® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

4.3.2. Análises morfométricas do compartimento tubular

Para cálculo da massa do parênquima testicular subtraiu-se a massa ocupada pela albugínea do peso total dos testículos (peso bruto), obtendo-se assim o peso líquido da porção funcional do órgão. O índice gonadossomático (IGS), definido pela razão entre a massa testicular e corporal, foi calculado usando a fórmula: $(PG/PC) \times 100$, onde PG = peso das gônadas e PC = peso corporal (Amann, 1970).

As densidades volumétricas ($v/v\%$) de túbulo seminífero (DVT) e intertúbulo (DVI) foram obtidas utilizando-se uma grade contendo 266 pontos projetados sobre imagens digitalizadas (100 x) do parênquima testicular, totalizando 2660 pontos por animal. Foram registrados pontos coincidentes sobre túnica própria, epitélio seminífero, lúmen e intertúbulo e, em seguida, calculado o percentual dos pontos sobre cada componente.

O volume de cada componente testicular foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume do parênquima testicular, através da fórmula: $(\% \text{ túbulo ou seus constituintes} \times \text{volume total do parênquima testicular}) / 100$ (Melo et al., 2010). Como a densidade do testículo de mamíferos é em torno de 1 (Johnson et al., 1981), a massa do testículo foi considerada igual ao seu volume. Baseado nos volumes dos túbulos seminíferos e nos pesos corporais foi calculado o índice tubulossomático (ITS) a partir da fórmula: $(VT/PC) \times 100$, onde VT = volume de túbulo seminífero e PC = peso corporal.

O diâmetro tubular médio foi obtido a partir de 20 secções transversais de túbulo seminífero para cada animal, sendo escolhidas as mais circulares possíveis, independentes do estágio em que se encontravam. Considerou-se para tal abordagem o menor diâmetro observado em cada secção transversal, conforme recomendação de

Berndtson et al. (1977). A altura do epitélio seminífero foi mensurada na mesma secção transversal em que foi aferido o diâmetro dos túbulos seminíferos. Neste caso, considerou-se a distância desde a túnica própria até a borda luminal, tomando-se duas medidas diametralmente opostas em cada secção transversal, sendo considerada como medida representativa a média das duas. O diâmetro do lúmen foi obtido subtraindo-se o diâmetro tubular das duas alturas obtidas para o epitélio seminífero.

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

4.3.3. Análises morfológicas dos componentes intertubulares

Para a obtenção das densidades volumétricas ($v/v\%$) dos componentes intertubulares foram contados 1.000 pontos projetados sobre imagens capturadas da região do intertúbulo, em aumento de 400x. Foram registrados os pontos coincidentes sobre núcleo e citoplasma de células de Leydig (NL e CL), vaso sanguíneo (VS), espaço linfático (EL), tecido conjuntivo (TC) e macrófagos (M). O percentual de cada elemento no intertúbulo foi obtido multiplicando o número de pontos contados sobre os elementos por 100 e dividindo o valor obtido por 1000. O volume de cada elemento no intertúbulo foi determinado através do produto da proporção do elemento no intertúbulo e o volume de intertúbulo (França et al., 2000).

O diâmetro nuclear médio das células de Leydig foi obtido a partir de imagens (400x) sendo mensurados trinta núcleos para cada animal escolhendo-se aqueles que apresentavam o contorno mais circular e cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. Foram calculados os volumes nuclear e citoplasmático e, em seguida, o volume de uma célula de Leydig. Para obtenção do volume nuclear (VN) utilizou-se a fórmula: $4/3\pi R^3$, onde R= raio nuclear. Para o cálculo do volume citoplasmático (VC) foi utilizada a fórmula: $\% \text{ citoplasma} \times VN / \% \text{ núcleo}$. Finalmente, o volume de uma célula de Leydig foi obtido somando-se o VN ao VC. Estes valores foram expressos em micrômetros cúbicos (μm^3). O cálculo do volume que as células de Leydig ocupam por testículo foi feito a partir da proporção das

células de Leydig no parênquima testicular x peso do parênquima de um testículo/100.

O volume que as células de Leydig ocupam por grama de testículo foi obtido utilizando-se o peso bruto dos testículos. O número total de células de Leydig por testículo foi calculado a partir do volume que as células de Leydig ocupam por testículo (μm^3) / volume de uma célula de Leydig (μm^3). Para calcular o número total de células de Leydig por grama de testículo utilizou-se a fórmula: volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo (μm^3) / volume de uma célula de Leydig (μm^3).

A fim de se quantificar o investimento em células de Leydig, em relação à massa corporal, foi calculado o índice Leydigossomático (ILS), utilizando-se a fórmula: volume total de célula de Leydig no parênquima testicular / PC x 100, onde PC= peso corporal. A relação nucleoplasmática (RNP) foi obtida dividindo-se o percentual do núcleo de células de Leydig pelo percentual de citoplasma de células de Leydig e multiplicando-se por 100.

4.3.4. Análise histopatológica qualitativa e quantitativa

Para se estimar as proporções de túbulos seminíferos normais e patológicos foram contados 100 túbulos por animal em campos aleatórios. Foram considerados túbulos com patologias aqueles que apresentavam qualquer alteração segundo Creasy (2001) e Boekelheide (2005). As alterações foram classificadas por Matta (2012) de acordo com a gravidade como descrito abaixo:

Nível 1: Túbulos seminíferos íntegros com células germinativas dispostas no seu sítio de localização, poucos vacúolos univesiculares e apoptose fisiológica;

Nível 2: Túbulos seminíferos apresentando vacúolos uni e multivesiculares nas células de Sertoli e apoptose fisiológica;

Nível 3: Desprendimento celular, células espermatogênicas no interior do lúmen, presença de células gigantes e em processo de degeneração e apoptose acentuada;

Nível 4: Túbulos seminíferos apresentando lúmen com aspecto aumentado refletindo a perda celular, alguns túbulos contendo apenas células do ambiente basal, túbulos seminíferos atrofiados e apoptose acentuada.

Nível 5: Túbulos seminíferos desprovidos de células de Sertoli ou germinativas, em estado irreversível de degeneração.

4.4. Análises estatísticas

Comparações entre os grupos foram feitas através de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls (SNK). Foi utilizado o software STATISTICA 7. Todos os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. O nível de significância considerado foi de $p \leq 0,05$.

5. Resultados

5.1. Análise estrutural

Nas secções testiculares dos ratos dos grupos controle (Grupos I e II) os túbulos seminíferos apresentaram-se bem organizados. O epitélio seminífero mostrou-se íntegro, com células espermatogênicas em todas as etapas de desenvolvimento e células de Sertoli com seu característico núcleo irregular e nucléolos evidentes (Figura 1 a, b).

O tratamento com acetato de chumbo provocou diferentes níveis de danos aos túbulos seminíferos (Figura 1 c, d). Observou-se a presença de túbulos atrofiados e túbulos em estado de degeneração avançada, com vacúolos citoplasmáticos das células de Sertoli preenchendo quase todo o túbulo. Nestes túbulos, detectou-se ausência de células germinativas restando apenas aglomerados de células de Sertoli (Figura 2).

Tanto nos grupos tratados com acetato de chumbo quanto nos grupos tratados com acetato de chumbo e açaí foi possível observar uma série de vacúolos no citoplasma das células de Sertoli, principalmente na região basal (Figura 1 c, d, e, f). O ambiente intertubular mostrou poucas alterações estruturais em relação aos grupos controle (Grupo I e Grupo II). O tecido intersticial foi similar ao dos grupos controle, contendo espaço linfático, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, células de Leydig e macrófagos (Figura 3).

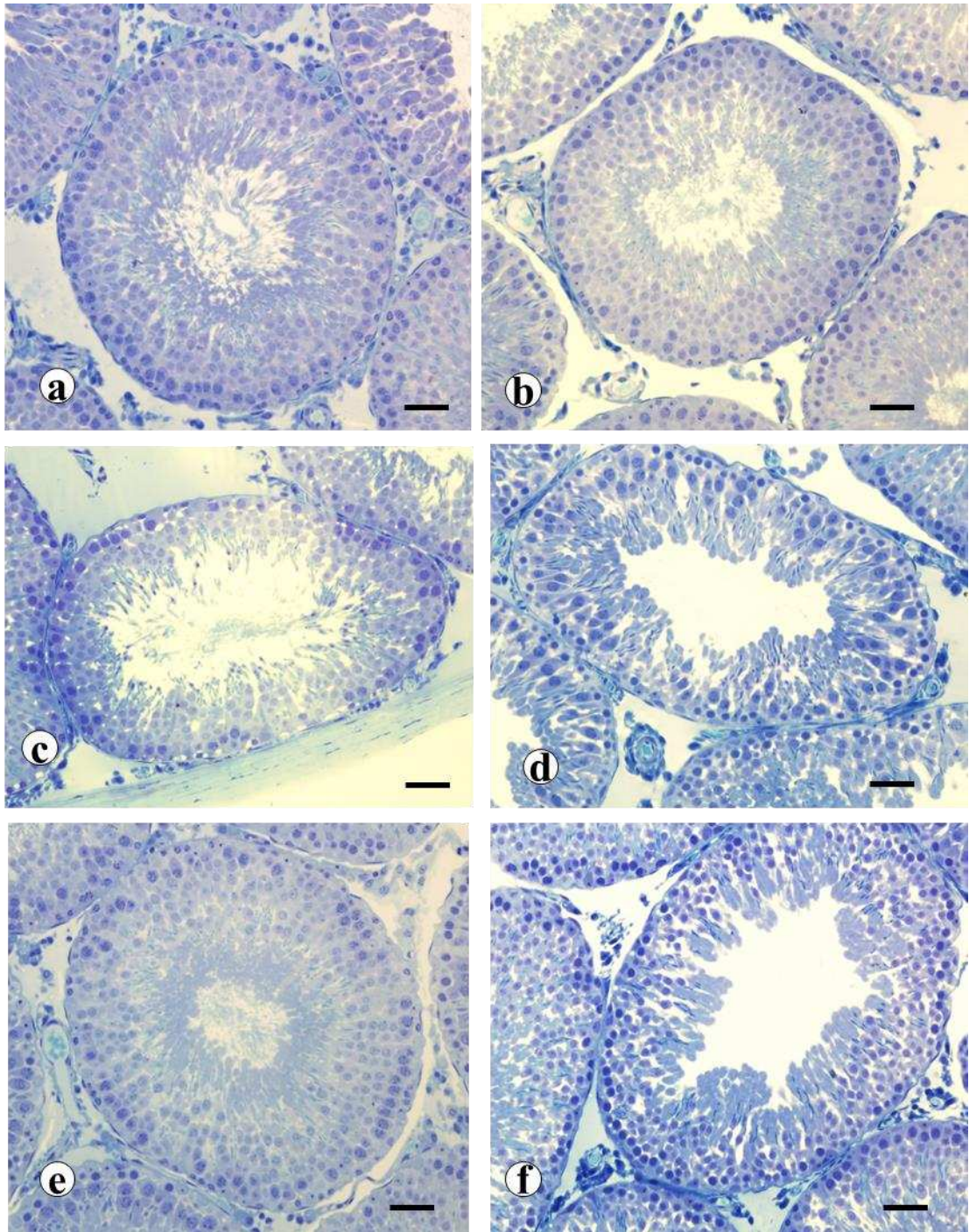


Figura 1. Secções histológicas do compartimento tubular de ratos Wistar. **a:** Grupo I (controle); **b:** Grupo II (açai 400 mg/kg); **c:** Grupo III (Pb 32 mg/kg); **d:** Grupo IV (Pb 128 mg/kg); **e:** Grupo V (açai 400 mg/kg e Pb 32 mg/kg); **f:** Grupo VI (açai 400 mg/kg e Pb 128 mg/kg). Coloração: azul de toluidina. Barras: 30 μ m.

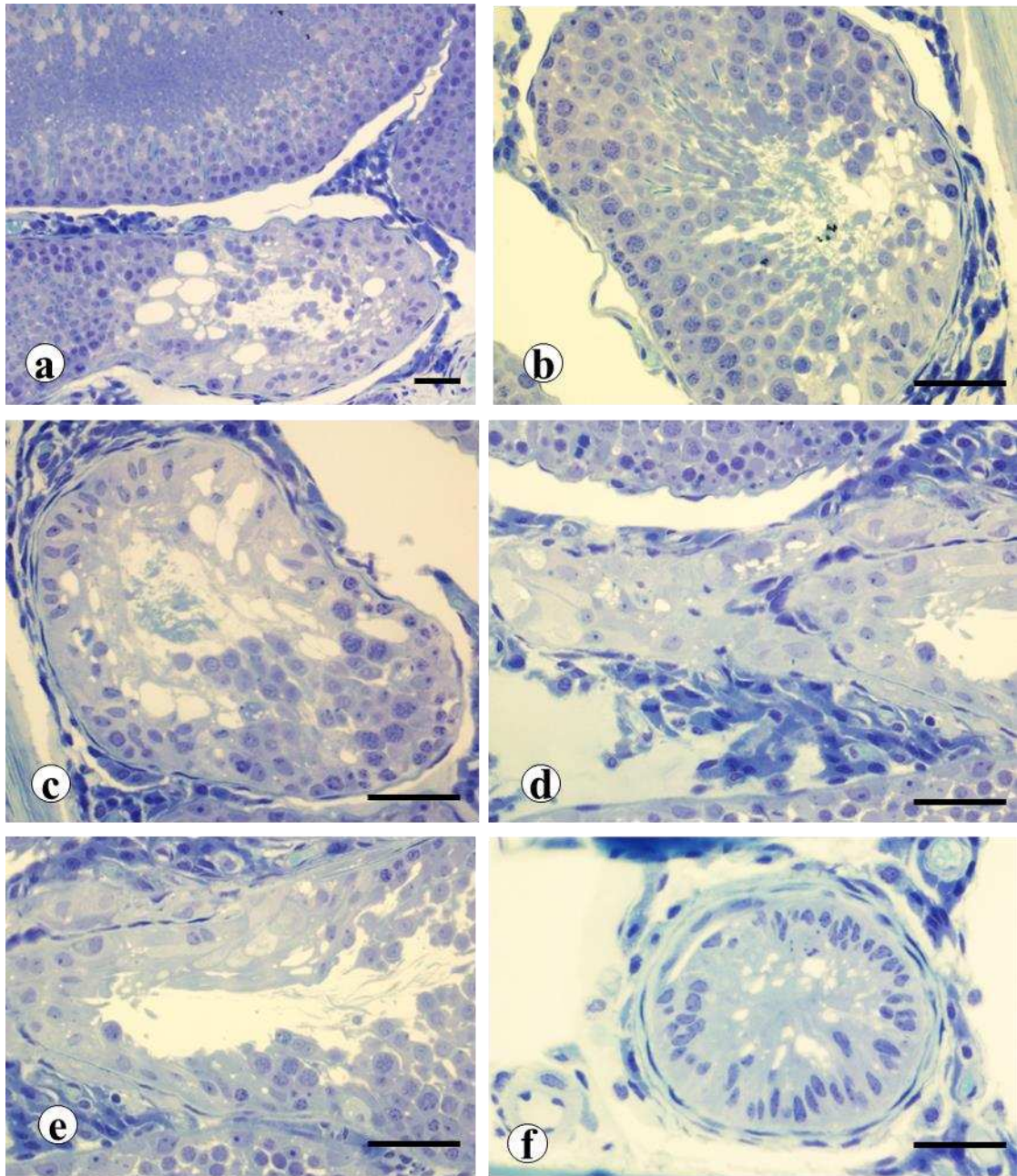


Figura 2. Secções histológicas do compartimento tubular de ratos Wistar evidenciando diferentes graus de patologias. **a, b:** Grupo III (Pb 32 mg/kg); **c, d, e, f:** grupo IV (Pb 128 mg/kg). Coloração: azul de toluidina. Barras: 30 μ m.

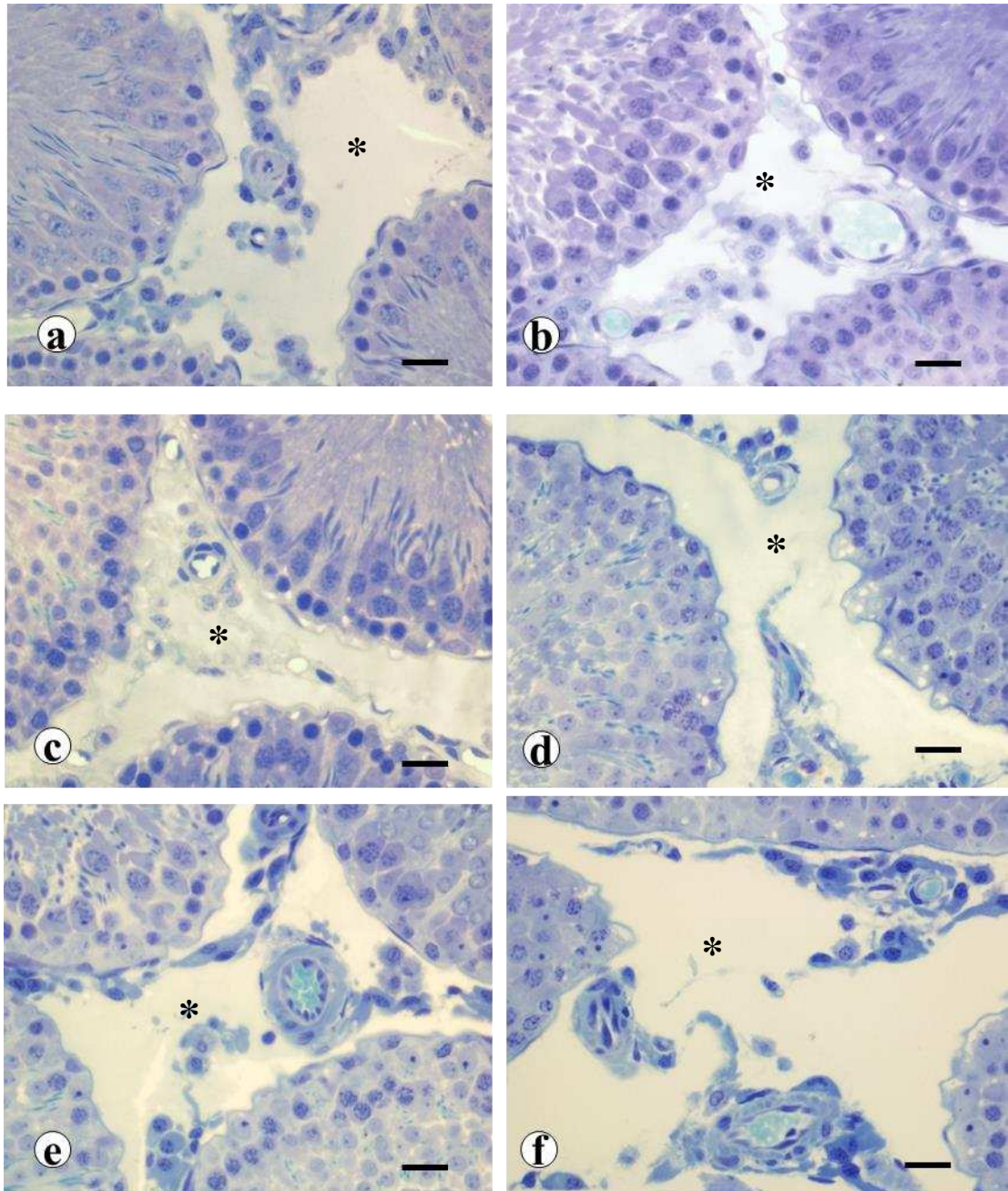


Figura 3. Secções histológicas do compartimento intertubular (*) de ratos Wistar. **a:** Grupo I (controle); **b:** Grupo II (açai 400mg/kg); **c:** Grupo III (Pb 32 mg/kg); **d:** Grupo IV (Pb 128 mg/kg); **e:** Grupo V (açai 400mg/kg e Pb 32 mg/kg); **f:** Grupo VI (açai 400mg/kg e Pb 128 mg/kg). Coloração: azul de toluidina. Barras: 15 μ m.

5.2. Análises biométricas

Os parâmetros biométricos analisados encontram-se na Tabela 1. Em relação ao peso corporal, apenas o grupo IV mostrou alteração apresentando-se menor do que os demais. Não houve alteração no peso testicular em qualquer um dos grupos avaliados. O peso do parênquima testicular (PPar) não sofreu alteração entre os grupos I, II, III e IV. Entretanto, animais que receberam chumbo e foram tratados com açaí (Grupos V e VI) apresentaram aumento no PPar, se comparados aos grupos controle e chumbo, nas duas dosagens. O índice gonadossomático (IGS) do Grupo IV foi estatisticamente maior se comparado a todos os outros grupos.

5.3. Análises morfométricas do compartimento tubular

Os parâmetros morfométricos tubulares do parênquima testicular encontram-se na Tabela 2. Não houve diferença significativa em relação à porcentagem de túbulo seminífero, diâmetro tubular, diâmetro do lúmen e comprimento dos túbulos entre os grupos.

Houve aumento na densidade volumétrica do epitélio seminífero (ES) nos Grupos V e VI em relação a todos os outros grupos. A altura do epitélio também aumentou nos Grupos V e VI em relação à todos os grupos, controle e tratados. O volume tubular apresentou-se menor nos grupos tratados com chumbo (Grupos III e IV) se comparados com os outros grupos. Por outro lado, animais que receberam chumbo e açaí (Grupos V e VI) apresentaram aumento significativo no volume tubular se comparados aos demais grupos. O índice tubulossomático (ITS) aumentou no Grupo VI comparado aos grupos I, II, III e IV, porém não apresentou diferença significativa em relação ao Grupo V.

Tabela 1. Parâmetros biométricos corporais e testiculares de ratos Wistar adultos (média \pm desvio padrão; n=6).

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
PC (g)	416,40 \pm 41,18 ^a	413,20 \pm 23,33 ^a	394,80 \pm 24,38 ^a	358,50 \pm 22,39 ^b	408,67 \pm 19,28 ^a	392,50 \pm 14,17 ^a
PT (g)	3,464 \pm 0,19 ^a	3,506 \pm 0,17 ^a	3,343 \pm 0,13 ^a	3,467 \pm 0,04 ^a	3,524 \pm 1,46 ^a	3,444 \pm 0,30 ^a
PPar (g)	2,117 \pm 0,17 ^a	2,098 \pm 0,21 ^a	1,935 \pm 0,14 ^a	1,980 \pm 0,19 ^a	2,379 \pm 0,35 ^b	2,353 \pm 0,18 ^b
IGS (%)	0,83 \pm 0,04 ^a	0,85 \pm 0,06 ^a	0,81 \pm 0,07 ^a	0,99 \pm 0,08 ^b	0,85 \pm 0,10 ^a	0,88 \pm 0,07 ^a

Letras iguais na linha indicam que as médias não diferem significativamente entre si ($p>0,05$). Grupo I: controle; Grupo II: açai 400 mg/kg; Grupo III: Pb 32 mg/kg; Grupo IV: Pb 128 mg/kg; Grupo V: açai 400 mg/kg e Pb 32 mg/kg; Grupo VI: açai 400mg/kg e Pb 128 mg/kg. PC: Peso Corporal; PT: Peso Testicular; PPar: Peso do Parênquima Testicular; IGS: Índice Gonadossomático.

Tabela 2. Parâmetros morfométricos tubulares do parênquima testicular de ratos Wistar adultos (média ± desvio padrão; n=6).

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
TS (%)	78,18±3,30 ^a	79,15±3,28 ^a	78,80±2,16 ^a	76,33±6,76 ^a	81,15±2,84 ^a	80,33±2,08 ^a
ES (%)	50,76±2,56 ^a	51,30±2,45 ^a	51,03±2,13 ^a	50,44±3,91 ^a	56,22±3,12 ^b	57,02±1,61 ^b
DT (µm)	265,92±11,50 ^a	265,89±7,20 ^a	275,37±22,45 ^a	270,10±22,45 ^a	280,67±9,35 ^a	275,36±13,77 ^a
AE (µm)	68,08±3,68 ^a	71,46±2,13 ^{ab}	67,47±4,52 ^a	66,01±3,43 ^a	74,66±5,04 ^b	75,07±4,38 ^b
DL (µm)	129,75±13,87 ^a	122,97±4,26 ^a	140,43±14,40 ^a	138,08±23,93 ^a	131,35±12,65 ^a	125,34±14,36 ^a
CT/T (µm)	27,97±2,87 ^a	26,70±4,94 ^a	27,08±2,57 ^a	27,62±6,75 ^a	31,98±4,24 ^a	32,80±6,65 ^a
CT/gT (µm)	8,20±0,99 ^a	7,58±1,10 ^a	8,10±0,77 ^a	7,82±1,96 ^a	9,22±0,76 ^a	9,34±1,10 ^a
VT (mL)	1,669±0,12 ^a	1,671±0,15 ^a	1,482±0,08 ^a	1,460±0,10 ^a	1,910±0,26 ^b	1,891±0,15 ^b
ITS (%)	0,41±0,04 ^a	0,40±0,03 ^a	0,37±0,02 ^a	0,39±0,03 ^a	0,45±0,11 ^{ab}	0,46±0,02 ^b

Letras iguais na linha indicam que as médias não diferem significativamente entre si ($p>0,05$). Grupo I: controle; Grupo II: açaí 400 mg/kg; Grupo III: Pb 32 mg/kg; Grupo IV: Pb 128 mg/kg; Grupo V: açaí 400mg/kg e Pb 32 mg/kg; Grupo VI: açaí 400 mg/kg e Pb 128 mg/kg. TS: Túbulo Seminífero; ES: Epitélio Seminífero; DT: Diâmetro Tubular; AE: Altura do Epitélio Seminífero; DL: Diâmetro do Lúmen Tubular; CT/T: Comprimento Total de Túbulos Seminíferos por Testículo; CT/g T: Comprimento Total de Túbulos Seminíferos por grama de Testículo; VT: Volume Tubular; ITS: Índice Tubulossomático.

5.4. Análises morfométricas dos componentes intertubulares

Os parâmetros morfométricos intertubulares encontram-se na Tabela 3. Não foram observadas variações significativas entre os grupos quanto ao percentual de intertúbulo, vaso sanguíneo, macrófago e espaço linfático. A densidade volumétrica de tecido conjuntivo por intertúbulo aumentou significativamente em todos os grupos quando comparados ao grupo controle (Grupo I). A densidade volumétrica por testículo foi maior no grupo IV se comparado com todos os grupos, exceto com o grupo III.

5.5 Análise estereológica das células de Leydig

Os parâmetros estereológicos de células de Leydig encontram-se na Tabela 4. Não houve variação em qualquer parâmetro relativo às células de Leydig entre os grupos estudados.

Tabela 3. Parâmetros morfométricos intertubulares do testículo de ratos Wistar adultos (média ± desvio padrão; n=6).

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
IT (%)	21,82±3,30 ^a	20,85±3,28 ^a	21,20±2,16 ^a	23,67±6,76 ^a	18,85±2,84 ^a	19,67±2,08 ^a
VS (%)	2,14±0,55 ^a	2,68±0,96 ^a	2,14±1,51 ^a	1,53±0,69 ^a	2,40±1,37 ^a	1,52±0,78 ^a
TCi (%)	15,00±2,41 ^a	20,72±2,54 ^b	21,02±2,57 ^b	21,18±2,56 ^b	18,47±1,59 ^b	20,03±2,31 ^b
TCt (%)	3,27±0,73 ^a	4,36±1,19 ^a	4,46±0,77 ^{ab}	4,95±1,29 ^b	3,47±0,47 ^a	3,93±0,57 ^a
M (%)	1,02±0,11 ^a	0,82±0,33 ^a	0,86±0,15 ^a	0,95±0,35 ^a	0,85±0,27 ^a	0,65±0,18 ^a
EL (%)	69,78±6,50 ^a	59,44±3,62 ^a	60,68±7,90 ^a	63,98±9,05 ^a	63,17±4,11 ^a	62,13±7,10 ^a
VI (µm³)	0,44±0,11 ^a	0,39±0,06 ^a	0,43±0,08 ^a	0,48±0,16 ^a	0,46±0,10 ^a	0,47±0,06 ^a

Letras iguais na linha indicam que as médias não diferem significativamente entre si ($p>0,05$). Grupo I: controle; Grupo II: açai 400mg/kg; Grupo III: Pb 32 mg/kg; Grupo IV: Pb 128 mg/kg; Grupo V: açai 400mg/kg e Pb 32 mg/kg; Grupo VI: açai 400mg/kg e Pb 128 mg/kg. IT: Intertúbulo; VS: Vaso Sanguíneo; TCi: Tecido Conjuntivo no intertúbulo; TCt: Tecido Conjuntivo no Testículo; M: Macrófago; EL: Espaço Linfático; VI: Volume Intertubular.

Tabela 4. Parâmetros estereológicos de células de Leydig de ratos Wistar adultos (média \pm desvio padrão; n=6).

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
CL (%)	12,06 \pm 5,75 ^a	16,34 \pm 3,34 ^a	15,30 \pm 4,73 ^a	12,35 \pm 6,73 ^a	15,12 \pm 3,06 ^a	15,67 \pm 5,74 ^a
NuL (%)	3,00 \pm 1,58 ^a	4,22 \pm 0,85 ^a	3,60 \pm 1,29 ^a	2,85 \pm 1,91 ^a	3,28 \pm 0,65 ^a	3,53 \pm 1,19 ^a
CiL (%)	9,06 \pm 4,20 ^a	12,12 \pm 2,64 ^a	11,70 \pm 3,53 ^a	9,50 \pm 4,84 ^a	11,83 \pm 2,76 ^a	12,13 \pm 4,65 ^a
VL (μm^3)	330,77 \pm 90,29 ^a	366,21 \pm 95,52 ^a	492,12 \pm 206,96 ^a	400,23 \pm 59,03 ^a	439,85 \pm 71,43 ^a	462,69 \pm 147,97 ^a
VNuL (μm^3)	79,16 \pm 21,03 ^a	93,71 \pm 20,74 ^a	114,25 \pm 48,05 ^a	89,15 \pm 21,96 ^a	95,42 \pm 11,39 ^a	103,27 \pm 26,25 ^a
VCiL (μm^3)	251,61 \pm 73,99 ^a	272,49 \pm 77,46 ^a	377,87 \pm 160,79 ^a	311,08 \pm 42,50 ^a	344,43 \pm 70,61 ^a	359,43 \pm 124,77 ^a
VLT (μm^3)	0,02 \pm 0,01 ^a	0,03 \pm 0,01 ^a	0,03 \pm 0,02 ^a	0,03 \pm 0,01 ^a	0,03 \pm 0,01 ^a	0,04 \pm 0,01 ^a
ILS (%)	0,012 \pm 0,005 ^a	0,015 \pm 0,005 ^a	0,017 \pm 0,007 ^a	0,015 \pm 0,004 ^a	0,017 \pm 0,002 ^a	0,019 \pm 0,007 ^a

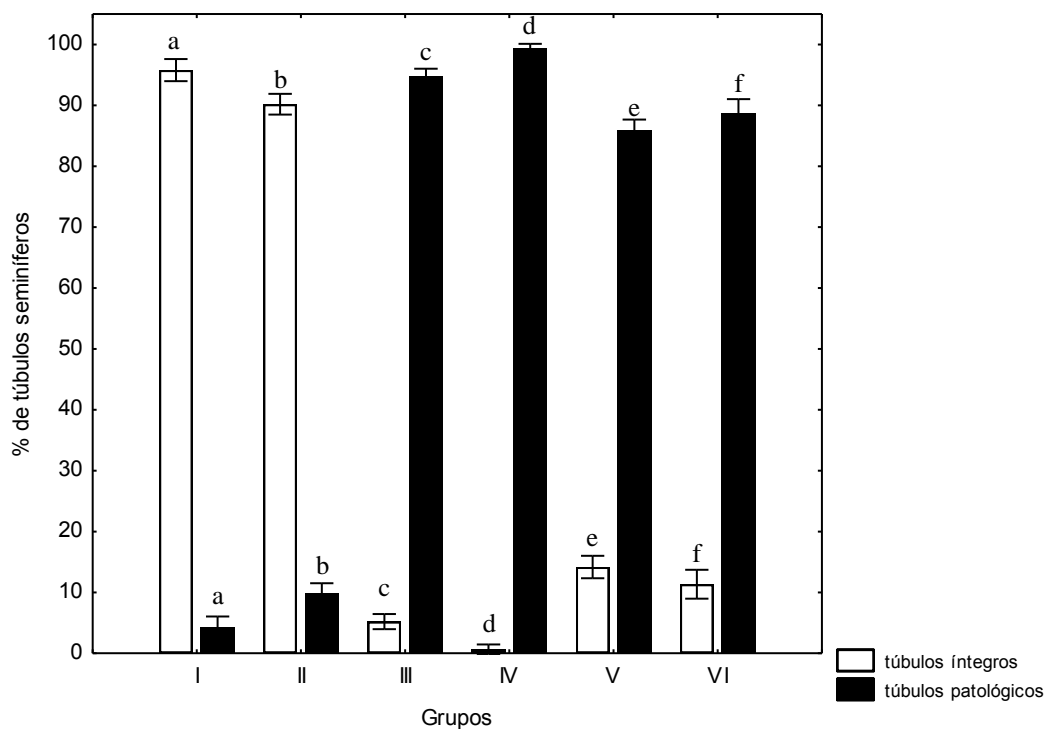
Letras iguais na linha indicam que as médias não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). Grupo I: controle; Grupo II: açaí 400mg/kg; Grupo III: Pb 32 mg/kg; Grupo IV: Pb 128 mg/kg; Grupo V: açaí 400mg/kg e Pb 32 mg/kg; Grupo VI: açaí 400mg/kg e Pb 128 mg/kg. CL: Célula de Leydig; NuL = Núcleo de Leydig; CiL = Citoplasma de Leydig; VL: Volume das Células de Leydig; VNuL: Volume do Núcleo das Células de Leydig; VCiL: Volume do Citoplasma das Células de Leydig; VLT: Volume das Células de Leydig por Testículo; ILS: Índice Leydigossomático.

5.6. Análise histopatológica qualitativa e quantitativa

A proporção de túbulos seminíferos patológicos aumentou nos animais que receberam acetato de chumbo (Grupos III e IV) em relação aos animais controles (Grupos I e II) e diminuiu nos animais que receberam acetato de chumbo e açaí (Grupos V e VI) em relação aos animais que receberam apenas acetato de chumbo (Figura 4). Além disso, animais dos Grupos V e VI tiveram melhora nos níveis de dano em relação aos animais dos Grupos III e IV (Figura 5).

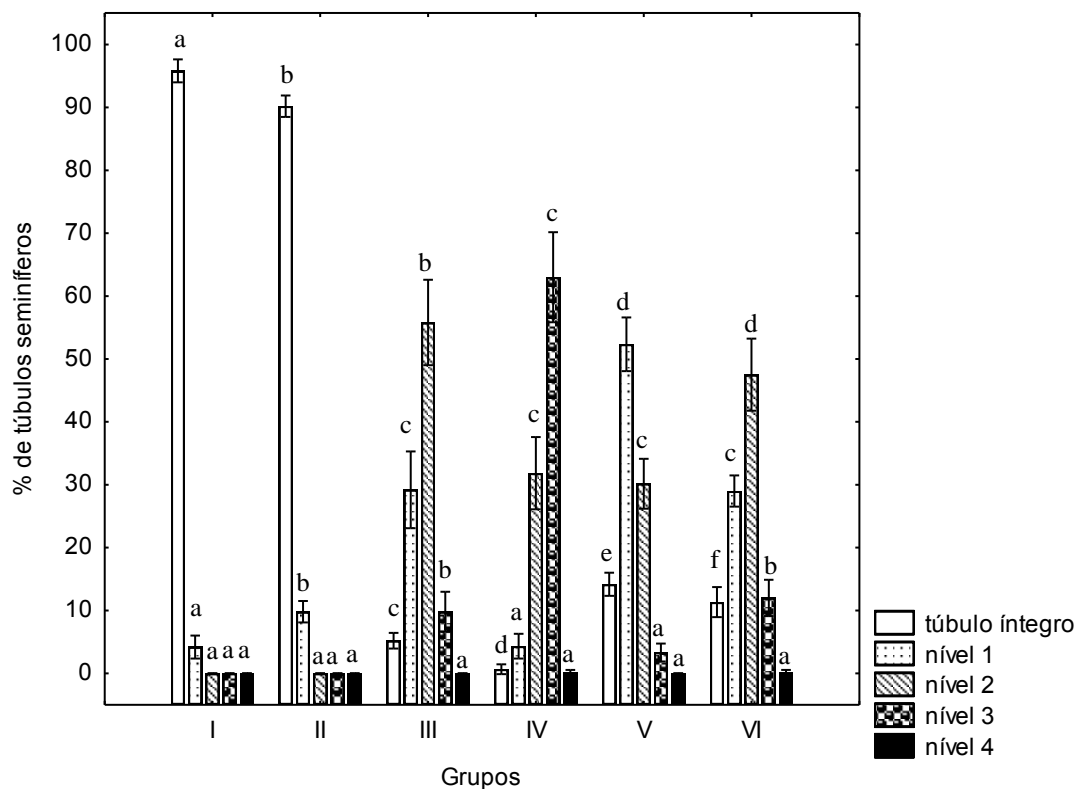
Os animais dos Grupos I e II apresentaram apenas alguns túbulos contendo pequenos vacúolos univesiculares, estando a maioria dos túbulos íntegros com as células germinativas bem preservadas e epitélio seminífero bem organizado determinando um arranjo normal (Figura 1 a, b). Estes dois grupos enquadraram-se no nível 1 de classificação histopatológica, pois os vacúolos univesiculares em baixa proporção podem ocorrer em indivíduos saudáveis (Figura 5). Animais que receberam acetato de chumbo (Grupos III e IV) apresentaram vacúolos uni e multivesiculares nas células de Sertoli, além de descamação de células germinativas oriundas do ambiente adluminal para o lúmen tubular, enquanto as células do ambiente basal permaneceram em seu sítio de localização juntamente com as células de Sertoli (Figura 1 c, d). Estes dois grupos enquadraram-se nos níveis 2 e 3 de classificação histopatológica (Figura 5). Entretanto, nos animais do Grupo IV as patologias apresentaram-se mais severas, enquadrando-se principalmente no nível 3 e pouquíssimos túbulos enquadrando-se no nível 4 (Figura 5). Animais que receberam acetato de chumbo e açaí (Grupos V e VI) continuaram apresentando vacúolos uni e multivesiculares nas células de Sertoli e descamação de células germinativas, mas em menor proporção se comparados aos Grupos III e IV (Figura 5). Nenhum dos animais apresentou histopatologia de nível 5, que se caracteriza por ausência total de células no túbulo seminífero. O dano mais severo presente principalmente nos animais do Grupo IV foi a presença de túbulos seminíferos apenas com células de Sertoli e espermatogônias na região basal – nível 4 (Figura 2).

Figura 4. Proporção de túbulos seminíferos íntegros e patológicos de ratos Wistar adultos.



Letras diferentes nas barras, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). Grupo I: controle; Grupo II: açai 400mg/kg; Grupo III: Pb 32 mg/kg; Grupo IV: Pb 128 mg/kg; Grupo V: açai 400mg/kg e Pb 32 mg/kg; Grupo VI: açai 400mg/kg e Pb 128 mg/kg.

Figura 5. Proporção de túbulos seminíferos íntegros e com diferentes níveis de patologia de ratos Wistar adultos.



Letras diferentes nas barras, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). Grupo I: controle; Grupo II: açúcar 400mg/kg; Grupo III: Pb 32 mg/kg; Grupo IV: Pb 128 mg/kg; Grupo V: açúcar 400mg/kg e Pb 32 mg/kg; Grupo VI: açúcar 400mg/kg e Pb 128 mg/kg.

6. Discussão

Pelo nosso conhecimento, não há publicações que tragam detalhes da combinação da exposição ao chumbo e do efeito protetor do açaí nos testículos.

No presente estudo, a exposição ao acetato de chumbo por 58 dias promoveu alterações nos túbulos seminíferos, embora muitas áreas tenham permanecido inalteradas e a espermatogênese aparentemente se manteve normal nesses túbulos. Alguns túbulos seminíferos apresentaram-se mais vulneráveis do que outros à ação do chumbo. Os grupos que receberam chumbo e foram tratados com açaí também apresentaram alterações nos seus túbulos seminíferos, mas em menor número e num grau patológico menos acentuado (Figura 1).

A vacuolização nas células de Sertoli é o primeiro sinal morfológico de danos tubulares antecedentes as alterações nas células germinativas, mostrando que as células de Sertoli são o local primário de ação de substâncias tóxicas nos testículos (Creasy, 2001; Boekelheide, 2005). As vacuolizações observadas no citoplasma das células de Sertoli no presente estudo podem ser derivadas da dilatação e vesiculação do retículo endoplasmático liso, presente em grande quantidade nestas células. Essas vacuolizações podem ser causadas pela entrada de água na célula como parte da degeneração hidrópica, uma resposta não específica das células de Sertoli para qualquer injúria química (Murthy et al., 1991). Uma das principais funções das células de Sertoli é manter um ambiente apropriado para proliferação e maturação de células germinativas e a vacuolização dessas células, que ocorre frequentemente no início da resposta histopatológica, poderá ter efeito secundário sobre a sobrevivência das células germinativas (Creasy, 2001). Consequentemente, alterações na função das células de Sertoli podem resultar em alteração e/ou perda de células germinativas no epitélio seminífero (Boekelheide et al., 2005). Estas afirmações foram comprovadas no presente estudo, pois animais que receberam acetato de chumbo apresentaram vacuolização uni e multivesiculares nas células de Sertoli, e estas, juntamente com as células germinativas iniciais, permaneceram no ambiente basal. Já as células do ambiente adluminal encontraram-se desorganizadas e frequentemente descamadas, o que indica uma ação direta do chumbo sobre as células de Sertoli, sem atingir a barreira hematotesticular. Embora sejam na maioria das vezes o sítio primário de injúrias, as células de Sertoli raramente se desprendem do epitélio seminífero, a não ser que os túbulos tenham atingido um grau máximo de resposta após a administração de uma substância (Russell et al., 1990b).

No presente estudo, apenas o grupo tratado com maior dose de chumbo (IV) sofreu alteração no peso corporal e no índice gonadossomático. Resultados similares também foram observados por Sokol (1990) e Sokol & Berman (1991), que expuseram ratos ao acetato de chumbo por via oral durante 30 dias. Entretanto, outros trabalhos não mostraram diferença significativa no peso corporal de animais expostos ao chumbo (Marchlewicz et al., 2004; Allouche et al., 2009; El-Sayed & El-Neweshy, 2010; Costa, 2013). O menor peso corporal reflete no maior índice gonadossomático apresentado pelos animais do grupo IV, já que não houve diferença no peso gonadal. Parte da heterogeneidade observada nos efeitos do chumbo em vários experimentos dificulta a comparação entre os trabalhos (Wang et al., 2008). De fato, a severidade da toxicidade do chumbo parece ser dependente de fatores tais como idade do animal, duração da exposição, rota de entrada, espécies animais utilizadas no experimento e dose administrada (Ronis et al., 1996; Wang et al., 2008).

O peso do parênquima testicular foi maior nos grupos tratados com chumbo e açaí (V e VI) em relação aos grupos tratados apenas com chumbo (III e IV), mas sem diferença significativa em relação ao grupo controle (I) e o que recebeu apenas açaí (II). Além disso, houve um aumento no percentual de epitélio seminífero nos grupos V e VI. Tudo isso pode indicar uma ação positiva do tratamento concomitante do extrato de açaí e acetato de chumbo no epitélio seminífero. Resultados semelhantes foram observados por Youssef & Salama (2009), que trataram os animais com cloreto de alumínio e própolis. Apesar de não ser significativo, o peso do parênquima testicular dos animais tratados com chumbo foi em torno de 10% menor do que os animais do grupo controle, sugerindo algum tipo de dano. Resultado similar foi observado por El-Sayed & El-Neweshy (2010) que trataram animais com água contaminada com acetato de chumbo por 60 dias.

No presente trabalho, o tratamento com acetato de chumbo não afetou o diâmetro tubular, que também foi observado por Costa (2013) que expôs ratos às mesmas doses de acetato de chumbo por via oral por 30 dias. Ratos que receberam acetato de chumbo por via intraperitoneal por 35 dias também não apresentaram alteração no diâmetro dos túbulos seminíferos (Thoreux-Manlay et al., 1995b). Por outro lado, Ahmad et al. (2003) e Hamadouche et al. (2009) observaram redução significativa do diâmetro tubular em ratos tratados com acetato de chumbo por via intraperitoneal por 30 dias e oral por 90 dias, respectivamente. Os resultados por

vezes controversos indicam que deve ser levada em conta a individualidade dos animais, que podem ser mais ou menos susceptíveis à ação do chumbo (Apostoli et al., 1998).

A altura do epitélio seminífero é a mensuração mais efetiva para avaliação da produção espermática por este ser um elemento dinâmico do túbulo seminífero (Wing & Christensen, 1982). Neste trabalho, a altura do epitélio seminífero apresentou-se maior nos grupos tratados com açaí e chumbo (V e VI) se comparados com o grupo controle (I) e com aqueles que receberam somente o metal (III e IV). Massanyi et al. (2007) e Costa (2013) observaram redução da altura dose-dependentes no epitélio seminífero de ratos expostos à diferentes doses de chumbo por 48 horas e 30 dias, respectivamente. O chumbo pode afetar a integridade funcional da barreira de células de Sertoli, danificando o epitélio seminífero e levando à diminuição da sua altura devido à perda de células germinativas (Bustos-Obregón & Hartley, 2008). Por outro lado, foi observado neste trabalho o aumento da densidade volumétrica ($v/v\%$) do epitélio nos grupos tratados com chumbo e açaí em relação aos grupos tratados com chumbo, demonstrando o efeito positivo do extrato de açaí sobre o túbulo seminífero de animais expostos ao metal.

O volume tubular reduziu nos grupos expostos ao chumbo (III e IV) em comparação aos grupos controle (I) e açaí (II), o que coincide com os achados de Massanyi et al. (2007) e Costa (2013), que relataram efeito negativo do chumbo sobre a estrutura dos túbulos seminíferos de ratos expostos ao metal. Estes autores observaram aumento da incidência de células apoptóticas no epitélio seminífero, o que culminou na redução do percentual de epitélio seminífero e do volume tubular. Entretanto, neste trabalho os grupos de animais expostos ao chumbo que recebem extrato de açaí (V e VI) mostraram aumento do volume tubular quando comparados a todos os grupos, incluindo o controle. Resultados semelhantes foram relatados por Haw et al. (2012), que trataram ratos com acetato de chumbo e *Etlíngera elatior* por via oral. Assim, entende-se que o maior volume dos túbulos seminíferos nos grupos tratados com açaí reforça a importância das antocianinas presentes no fruto no processo de recuperação tubular.

O índice tubulossomático (ITS) é um parâmetro que visa quantificar o investimento dos túbulos seminíferos em relação à massa corporal. Animais do grupo VI apresentaram ITS maior em relação aos outros grupos. Animais do Grupo V apresentaram ITS em torno de 20% maior que os grupos expostos ao chumbo, sendo

significativo com relação ao grupo III. Os grupos controle e aqueles submetidos ao chumbo não diferiram significativamente entre si em relação a este parâmetro, sugerindo que o investimento em massa tubular não sofreu alterações com a ação do metal no presente estudo. Resultado semelhante foi obtido por Carvalho (2009) em camundongos tratados com arsenato de sódio. Por outro lado, a redução do ITS foi observada em animais tratados com baixas concentrações de cádmio (Cupertino, 2012). O aumento do ITS no grupo V, em relação ao grupo III, ocorreu provavelmente devido ao maior volume tubular observado no primeiro grupo. O mesmo pode ser observado em relação aos grupos V e VI que apresentaram maior ITS em relação aos demais como reflexo do maior volume tubular.

Parâmetros estruturais como volume testicular e diâmetro tubular estão intimamente relacionados ao comprimento total dos túbulos seminíferos (França & Russell, 1998). Não houve diferença significativa no comprimento total de túbulos seminíferos e no comprimento de túbulos seminíferos por grama de testículo. Resultados semelhantes foram obtidos por Costa (2013) em um experimento usando ratos expostos ao acetato de chumbo por 30 dias.

A secreção de fluidos intersticiais no testículo tem função fundamental no transporte de oxigênio e nutrientes do sangue para o túbulo seminífero, além de ser um meio importante para o transporte de fatores parácrinos no testículo (Setchell, 1990). O volume do fluido intersticial é determinado pela permeabilidade das células endoteliais dos capilares testiculares em conjunto com o sistema linfático e é regulado em parte por fatores secretados pelas células de Leydig (Maddocks & Sharpe, 1989; Setchell, 1990; Creasy, 2001). Evidenciou-se neste trabalho o aumento percentual de tecido conjuntivo, por intertúbulo e por testículo, nos ratos expostos ao chumbo em relação ao controle. Resultados similares foram observados por Predes et al. (2009) no intertúbulo de ratos expostos a baixas doses de cádmio. Como outros parâmetros do intertúbulo se mostraram menores o conjuntivo refletiu o somatório desses parâmetros, o que deixou a diferença significativa. Sugere-se que o aumento de tecido conjuntivo em animais expostos ao chumbo pode afetar o movimento de fluidos e hormônios na comunicação parácrina entre as células de Leydig e os túbulos seminíferos. Entretanto, o percentual de tecido conjuntivo nos animais tratados com chumbo e açáí foi menor do que o dos animais expostos apenas ao chumbo, evidenciando o poder do açáí na reversão de danos causados pelo chumbo.

As células de Leydig são responsáveis pela secreção de andrógenos, principalmente a testosterona, fundamental para o desenvolvimento e a função reprodutiva no macho (Russell et al., 1996). No presente estudo, nenhum dos grupos tratados apresentou qualquer alteração estrutural nas células de Leydig. Além disso, também não foram observadas alterações no percentual e volume de células de Leydig no testículo, nem no índice Leydigossomático. Resultado semelhante foi observado por Leite et al., (2013).

A interrupção da biossíntese de testosterona por fatores ambientais, tais como, exposição a metais pesados pode causar disfunção sexual e infertilidade (Papadopoulos, 2007). Alguns estudos apontam que ratos expostos ao chumbo têm mostrado distúrbios na espermatogênese com degeneração e atrofia de células de Leydig e consequente redução dos níveis de testosterona (Thoreux-Manlay et al., 1995b; Wenda-Rozewicka et al., 1996; Cheng et al., 2005; Costa, 2013). Segundo Castro et al. (2002), não há correlação entre altas concentrações de testosterona e aumento da atividade espermatogênica. Como não houve alterações nos parâmetros intertubulares e, particularmente nas células de Leydig, entende-se que nas doses de chumbo a que foram submetidos os animais, não há prejuízo para a síntese de andrógenos.

7. Conclusões

Houve recuperação de parâmetros tubulares em animais expostos ao chumbo e submetidos ao tratamento com açaí, indicando o benefício do extrato na proteção testicular. Por outro lado, é possível que o testículo se adapte a exposição crônica ao chumbo a ponto do metal não causar danos tão marcantes no ambiente testicular. O açaí, *Euterpe edulis*, pode ser uma opção de tratamento contra os danos induzidos pelo chumbo nos componentes testiculares.

8. Referências Bibliográficas

Acharya, U. R., Rathore, R. M., Mishra, M. (2003). Role of vitamin C on lead acetate induced spermatogenesis in Swiss mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(1), 9-14.

Ahmad, I., Sabir, M., Yasin, K. F. (2003). Study of the effects of lead poisoning on the testes in albino rats. *Pakistan Journal of Medical Research*, 42(3), 1-8.

Alexander, B. H., Checkoway, H., van Netten, C., Muller, C. H., Ewers, T. G., Kaufman, J. D., Mueller, B. A., Vaughan, T. L., Faustman, E. M. (1996). Semen quality of men employed at a lead smelter. *Occupational and Environmental Medicine*, 53(6), 411-416.

Al-Modhefer, A. J. A., Bradbury, M. W. B., Simons, T. J. B. (1991). Observations on the chemical nature of lead in human blood serum. *Clinical Science*, 81, 823-829.

Allouche, L., Hamadouche, M., Touabti, A. (2009). Chronic effects of low lead levels on sperm quality, gonadotropins and testosterone in albino rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61(5), 503-510.

Amann, R. P. (1970). Sperm production rates. In: Johnson, A. D.; Gomes, W. R.; Vandemark, N. L. (Eds). *The testis*. New York: Academic Press, v.1, Cap.7, 433-482.

Anjum, M. R., Sainath, S. B., Suneetha, Y., Reddy, P. S. (2011). Lead acetate induced reproductive and paternal mediated developmental toxicity in rats. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(4), 793-799.

Apostoli, P., Romeo, L., Peroni, E., Ferioli, A., Ferrari, S., Pasini, F., Aprili, F. (1989). Steroid hormone sulphation in lead workers. *British Journal of Industrial Medicine*, 46(3), 204-208.

Apostoli, P., Kiss, P., Porru, S., Bonde, J. P., Vanhoorne, M. (1998). Male reproductive toxicity of lead in animals and humans. ASCLEPIOS Study Group. *Occupational and Environmental Medicine*, 55(6), 364-374.

Apostoli, P. (2002). Elements in environmental and occupational medicine. *Journal of Chromatography B*, 778(1), 63-97.

Assennato, G., Paci, C., Baser, M. E., Molinini, R., Candela, R. G., Altamura, B. M., Giorgino, R. (1986). Sperm count suppression without endocrine dysfunction in lead-exposed men. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 41(6), 387-390.

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

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2007). Toxicological Profile for lead. US Department of Health and Human Services, 1, 582.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2015) The Priority List of Hazardous Substances. Disponível em: < <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>>.

Baird, C. (2002). Metais pesados tóxicos. In: Química Ambiental. 2. ed. São Paulo: Bookman, 403-439.

Bardin, C. W. (1996). Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man. In: Payne, A. H., Hardy, M. P., Russell, L. D. (Eds). The Leydig cell. Vienna: Cache River Press, pp. 31-42.

Batra, N., Nehru, B., Bansal, M. P. (1998). The effect of zinc supplementation on the effects of lead on the rat testis. *Reproductive Toxicology*, 12(5), 535-540.

Belgaied, J. E. (2003). Release of heavy metals from Tunisian traditional earthenware. *Food and Chemical Toxicology*, 41(1), 95-98.

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

Biswas, N. M., Ghosh, P. (2004). Effect of lead on male gonadal activity in albino rats. *Kathmandu University Medical Journal (KUMJ)*, 2(1), 43-46.

Bizarro, P., Acevedo, S., Niño-Cabrera, G., Mussali-Galante, P., Pasos, F., Avila-Costa, M. R., Fortoul, T. I. (2003). Ultrastructural modifications in the mitochondrion of mouse Sertoli cells after inhalation of lead, cadmium or lead-cadmium mixture. *Reproductive Toxicology*, 17(5), 561-566.

Boekelheide, K., Johnson, K. J., Richburg, J. H. (2005). Sertoli Cell Toxicants. In: Skinner, M. K.; Griswold, M. D. (Eds). *Sertoli cell Biology*. London: Elsevier Academic Press. 345-382.

Borges, G. D. S. C., Vieira, F. G. K. Copetti, C., Gonzaga, L. V., Zambiasi, R. C., Mancini Filho, J., Fett, R. (2011). Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Research International*, 44(7), 2128-2133.

Bustos-Obregón, E., Hartley, B. (2008). Ecotoxicology and Testicular Damage (Environmental Chemical Pollution). A Review. *International Journal of Morphology*, 26(4).

Carvalho, F. A. R. (2009). Morfologia e morfometria testicular de camundongos adultos submetidos a exposição crônica ao arsenato. Dissertação Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 89p.

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

Cheng, J., Fu, J., Zhou, Z. (2005). The mechanism of manganese-induced inhibition of steroidogenesis in rat primary Leydig cells. *Toxicology*, 211(1), 1-11.

Cheng, C. Y., Wong, E. W. P., Lie, P. P. Y., Li, M. W. M., Su, L., Siu, E. R., Yang, H. H. N., Mannu, J., Mathur, P. P., Bonanomi, M., Silvestrini, B., Mruk, D. D. (2011). Environmental toxicants and male reproductive function. *Spermatogenesis*, 1(1), 2-13.

Conte, R., Nodari, R. O., Vencovsky, R., & dos Reis, M. S. (2003). Genetic diversity and recruitment of the tropical palm, *Euterpe edulis* Mart., in a natural population from the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity*, 91(4), 401-406.

Cordeiro, R., Lima Filho, E. C., Salgado, P. E. (1996). Distúrbios neurológicos em trabalhadores com baixos níveis de chumbo no sangue. I: Neuropatia periférica. *Revista de Saúde Pública*, 248-255.

Costa, K. L. C. (2013). Danos testiculares em ratos submetidos a diferentes doses de chumbo: Avaliação histomorfométrica, ultraestrutural e bioquímica. Dissertação Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. 86p.

Coura, J. R., Junqueira, A. C. (2015). Surveillance, health promotion and control of Chagas disease in the Amazon Region-Medical attention in the Brazilian Amazon Region: a proposal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(7), 825-830.

Creasy, D. M. (2001). Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicologic Pathology*, 29(1), 64-76.

Cullen, M. R., Robins, J. M., Eskenazi, B. (1983). Adult inorganic lead intoxication: presentation of 31 new cases and a review of recent advances in the literature. *Medicine*, 62(4), 221-247.

Cullen, M. R., Kayne, R. D., Robins, J. M. (1984). Endocrine and reproductive dysfunction in men associated with occupational inorganic lead intoxication. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 39(6), 431-440.

Cupertino, M. D. C. (2012). Danos oxidativos e histológicos crônicos causados pelo cádmio no fígado e na espermatogênese de ratos. Dissertação Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 81p.

De Brito, E. S., De Araujo, M. C. P., Alves, R. E., Carkeet, C., Clevidence, B. A., Novotny, J. A. (2007). Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9389-9394.

- Donovan, M. P., Schein, L. G., Thomas, J. A. (1980). Inhibition of androgen-receptor interaction in mouse prostate gland cytosol by divalent metal ions. *Molecular Pharmacology*, 17(2), 156-162.
- Duruibe, J. O., Ogwuegbu, M. O. C., Ekwurugwu, J. N. (2007). Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of Physical Sciences*, 2(5), 112-118.
- Ellis, G. B., Desjardins, C. (1982). Male Rats Secrete Luteinizing Hormone and Testosterone Episodically. *Endocrinology*, 110(5), 1618-1627.
- El-Neweshy, M. S., El-Sayed, Y. S. (2010). Influence of vitamin C supplementation on lead-induced histopathological alterations in male rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63(3), 221-227.
- El-Sayed, Y. S., El-Neweshy, M. S. (2010). Impact of lead toxicity on male rat reproduction at "hormonal and histopathological levels". *Toxicological and Environmental Chemistry*, 92(4), 765-774.
- El-Shafai, A., Zohdy, N., El Mulla, K., Hassan, M., Morad, N. (2011). Light and electron microscopic study of the toxic effect of prolonged lead exposure on the seminiferous tubules of albino rats and the possible protective effect of ascorbic acid. *Food and Chemical Toxicology*, 49(4), 734-743.
- Fawcett, D. W., Neaves, W. B., Flores, M. N. (1973). Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of Reproduction*, 9(5), 500-532.
- Fisher, I. J., Pain, D. J., Thomas, V. G. (2006). A review of lead poisoning from ammunition sources in terrestrial birds. *Biological Conservation*, 131(3), 421-432.
- Flora, S. J., Pande, M., Mehta, A. (2003). Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of chronic lead intoxication. *Chemico-biological Interactions*, 145(3), 267-280.
- Flora, S. J. S., Mittal, M., Mehta, A. (2008). Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research*, 128(4), 501.
- Flora, G., Gupta, D., Tiwari, A. (2012). Toxicity of lead: a review with recent updates. *Interdisciplinary Toxicology*, 5(2), 47-58.
- França, L. R.; Russell, L. D. (1998). The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia F, Regadera J (Eds). *Male reproduction - a multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Communications. 198-219.
- França, L. R., Leal, M. C., Sasso-Cerri, E., Vasconcelos, A., Debeljuk, L., Russell, L. D. (2000). Cimetidine (Tagamet) is a reproductive toxicant in male rats affecting peritubular cells. *Biology of Reproduction*, 63(5), 1403-1412.

- Fu, F., Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. *Journal of Environmental Management*, 92(3), 407-418.
- Ghiselli, A., Nardini, M., Baldi, A., Scaccini, C. (1998). Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(2), 361-367.
- Goldhaber, S. B. (2003). Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 38(2), 232-242.
- Guerrero, L. A., Maas, G., Hogland, W. (2013). Solid waste management challenges for cities in developing countries. *Waste management*, 33(1), 220-232.
- Guidotti, T. L., Ragain, L. (2007). Protecting children from toxic exposure: three strategies. *Pediatric Clinics of North America*, 54(2), 227-235.
- Gurer, H., Ercal, N. (2000). Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning?. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(10), 927-945.
- Gustafson, Å., Hedner, P., Schütz, A., Skerfving, S. (1989). Occupational lead exposure and pituitary function. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 61(4), 277-281.
- Haig, S. M., D'Elia, J., Eagles-Smith, C., Fair, J. M., Gervais, J., Herring, G., Rivers, J. W., Schulz, J. H. (2014). The persistent problem of lead poisoning in birds from ammunition and fishing tackle. *The Condor*, 116(3), 408-428.
- Hamadouche, N. A., Slimani, M., Merad-Boudia, B., Zaoui, C. (2009). Reproductive toxicity of lead acetate in adult male rats. *American Journal of Scientific Research*, 3, 38-50.
- Hamadouche, N. A., Nesrine, S., Abdelkeder, A. (2013). Lead toxicity and the hypothalamic-pituitary-testicular axis. *Notulae Scientia Biologicae*, 5(1), 1.
- Haouas, Z., Zidi, I., Sallem, A., Bhour, R., Ajina, T., Zaouali, M., & Mehdi, M. (2015). Reproductive toxicity of lead acetate in adult male rats: Histopathological and cytotoxic Studies. *Journal of Cytology & Histology*, 2015.
- Haw, K. Y., Chakravarthi, S., Haleagrahara, N., Rao, M. (2012). Effects of *Etilingera elatior* extracts on lead acetate-induced testicular damage: A morphological and biochemical study. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 3(1), 99-104.
- Hernberg, S. (2000). Lead poisoning in a historical perspective. *American Journal of Industrial Medicine*, 38(3), 244-254.
- Hu, H. (1998). Bone lead as a new biologic marker of lead dose: recent findings and implications for public health. *Environmental Health Perspectives*, 106 (Suppl 4), 961.

Hsu, P. C., Liu, M. Y., Hsu, C. C., Chen, L. Y., Guo, Y. L. (1997). Lead exposure causes generation of reactive oxygen species and functional impairment in rat sperm. *Toxicology*, 122(1), 133-143.

Hsu, P. C., Hsu, C. C., Liu, M. Y., Chen, L. Y., Guo, Y. L. (1998). Lead-induced changes in spermatozoa function and metabolism. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 55(1), 45-64.

Hsu, P. C., Guo, Y. L. (2002). Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology*, 180(1), 33-44.

Inácio, M. R. C., de Lima, K. M. G., Lopes, V. G., Pessoa, J. D. C., de Almeida Teixeira, G. H. (2013). Total anthocyanin content determination in intact açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and palmitero-juçara (*Euterpe edulis* Mart.) fruit using near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate calibration. *Food Chemistry*, 136(3), 1160-1164.

Inada, K. O. P., Oliveira, A. A., Revorêdo, T. B., Martins, A. B. N., Lacerda, E. C. Q., Freire, A. S., Braz, B. F., Santelli, R. E., Torres, A. G., Perrone, D., Monteiro, M. C. (2015). Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. *Journal of Functional Foods*, 17, 422-433.

Jacob, L. C. B., Alvarenga, K. D. F., Morata, T. C. (2002). Os efeitos da exposição ocupacional ao chumbo sobre o sistema auditivo: uma revisão da literatura. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 68(4), 564-9.

Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68(1), 167-182.

Johnson, L., Petty, C.S., Neaves, W.B. (1981). A new approach to qualification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, 25, 217-226.

Kakkar, P., Jaffery, F. N. (2005). Biological markers for metal toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19(2), 335-349.

Kamei, H., Hashimoto, Y., Koide, T., Kojima, T., Hasegawa, M. (1998). Anti-tumor effect of methanol extracts from red and white wines. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 13(6), 447-452.

Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27, 137.

Klaassen, C. D. Metais Pesados e seus Antagonistas. In: Gilman, A. Goodman et al. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.1061-1065.

Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5), 923-933.

Kosnett, M. J. (2003). Intoxicação por metais pesados e quelantes. In: Katzung, B. G., Masters, S. B., Trevor, A. J. (Eds.) Farmacologia básica e clínica. 12ed. Artmed. 1013-1026.

Lancranjan, I., Popescu, H. I., Găvănescu, O., Klepsch, I., Serbănescu, M. (1975). Reproductive ability of workmen occupationally exposed to lead. Archives of Environmental Health: An International Journal, 30(8), 396-401.

Landrigan, P. J., Boffetta, P., Apostoli, P. (2000). The reproductive toxicity and carcinogenicity of lead: a critical review. American Journal of Industrial Medicine, 38(3), 231-243.

Landrigan, P. J. (2002). The worldwide problem of lead in petrol. Bulletin of the World Health Organization, 80(10), 768-768.

Lasat, M. M. (2002). Phytoextraction of toxic metals. Journal of Environmental Quality, 31(1), 109-120.

Leite, R. P., Predes, F. S., Monteiro, J. C., Freitas, K. M., Wada, R. S., Dolder, H. (2013). Advantage of Guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation on cadmium-induced damages in testis of adult Wistar rats. Toxicologic Pathology, 41(1), 73-79.

Lessler, M. A. (1988). Lead and lead poisoning from antiquity to modern times. Ohio Journal of Science, 88, 78-84.

Lima, C. P., Cunico, M. M., Miyazaki, C. M. S., Miguel, O. G., Côcco, L. C., Yamamoto, C. I., Miguel, M. D. (2012). Conteúdo polifenólico e atividade antioxidante dos frutos da palmeira Juçara (*Euterpe edulis* Martius). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, 14(2), 321-326.

Lin, S. S. (1988). Efeito do tamanho e maturidade sobre a viabilidade, germinação e vigor do fruto de palmitero. Revista Brasileira de Sementes, 8(1), 57-66.

Liu, J.; Goyer, R. A.; Waalkes, M. P. (2008). Toxic effects of metals. In: Klaassen, C.D. (Ed.). Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons. 7 ed. New York: McGraw Hill, pp. 931-979.

Lockitch, G. (1993). Perspectives on lead toxicity. Clinical biochemistry, 26(5), 371-381.

Maddocks, S., Sharpe, R. M. (1989). Interstitial fluid volume in the rat testis: androgen-dependent regulation by the seminiferous tubules?. The Journal of Endocrinology, 120(2), 215.

Marchlewicz, M., Michalska, T., Wiszniewska, B. (2004). Detection of lead-induced oxidative stress in the rat epididymis by chemiluminescence. Chemosphere, 57(10), 1553-1562.

Massanyi, P., Lukac, N., Makarevich, A. V., Chrenek, P., Forgacs, Z., Zakrzewski, M., Stawarz, R., Toman, R., Lazor, P., Flesarova, S. (2007). Lead-induced alterations in rat kidneys and testes in vivo. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 42(5), 671-676.

Matta, A. P. D. L. F. (2012). Efeitos do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen sobre testículo e pênis de camundongos adultos. Dissertação Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. 93p.

Melo, F., Matta, S. L., Paula, T. A., Gomes, M. L., Oliveira, L. C. (2010). The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult Wistar rats. *Biological Research*, 43(4), 445-450.

Mertens-Talcott, S. U., Rios, J., Jilma-Stohlawetz, P., Pacheco-Palencia, L. A., Meibohm, B., Talcott, S. T., Derendorf, H. (2008). Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7796-7802.

Morais, A.C.T., Balarini, M.K., Lopes, E.O., Menezes, T.P., Quintela, F.M., Morais, D.B., Gomes, M.L.M., Matta, S.L. (2014). The tubular compartment and the spermatogenic dynamics of the wild rodent *Oxymycterus nasutus* (Rodentia: Cricetidae). *Animal Reproduction Science* 149, 249–258.

Muniz, D. H. D. F., Oliveira-Filho, E. C. (2006). Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. *Universitas: Ciências da Saúde*, 4(1), 83-100.

Murthy, R. C., Saxena, D. K., Gupta, S. K., Chandra, S. V. (1991). Lead induced ultrastructural changes in the testis of rats. *Experimental Pathology*, 42(2), 95-100.

Naha, N., Bhar, R. B., Mukherjee, A., Chowdhury, A. R. (2005). Structural alteration of spermatozoa in the persons employed in lead acid battery factory. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 49(2), 153-162.

Nóbrega, A. A., Garcia, M. H., Tatto, E., Obara, M. T., Costa, E., Sobel, J., Araujo, W. N. (2009). Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Headache*, 10, 91.

Ong, C. N., Chia, S. E., Foo, S. C., Ong, H. Y., Tsakok, M., Liouw, P. (1993). Concentrations of heavy metals in maternal and umbilical cord blood. *Biometals*, 6(1), 61-66.

Pacheco-Palencia, L. A., Talcott, S. T., Safe, S., Mertens-Talcott, S. (2008). Absorption and biological activity of phytochemical-rich extracts from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and oil in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3593-3600.

Pantaroto, H. L., Júnior, M. V., Figueiredo, P. J. M. (2007). A Eliminação do chumbo da gasolina. 5ª Mostra Acadêmica UNIMEP, Piracicaba, Brazil, 1-5.

Paoliello, M., Chasin, A. A., da Bahia, B. G. D. E. (2001). Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos. In *Cadernos de Referencia Ambiental*, 003. CRA, pp. 1-144.

Paoliello, M. M. B., De Capitani, E. M. (2005). Environmental contamination and human exposure to lead in Brazil. In: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Springer New York, pp. 59-96.

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

Paula, T. A. R., Costa, D. S., da Matta, S. L. P. (2002). Avaliação histológica quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas. *Bioscience Journal*, 18(1).

Pereira, K. S., Schmidt, F. L., Barbosa, R. L., Guaraldo, A. M. A., Franco, R. M. B., Dias, V. L., Passos, L. A. C. (2010). Transmission of Chagas disease (American trypanosomiasis) by food. *Advances in Food and Nutrition Research*, 59, 63-85.

Pizent, A., Tariba, B., Živković, T. (2012). Reproductive toxicity of metals in men. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 63(Supplement 1), 35-45.

Plum, L. M., Rink, L., & Haase, H. (2010). The essential toxin: impact of zinc on human health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(4), 1342-1365.

Predez, F. S., Diamante, M. A. S., Dolder, H. (2010). Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. *International Journal of Experimental Pathology*, 91(2), 125-131.

Reddy, A., Braun, C. L. (2010). Lead and the Romans. *Journal of Chemical Education*, 87(10), 1052-1055.

Reis, M. S., Fantini, A. C., Nodari, R. O., Reis, A., Guerra, M. P., Mantovani, A. (2000). Management and Conservation of Natural Populations in Atlantic Rain Forest: The Case Study of Palm Heart (*Euterpe edulis* Martius) 1. *Biotropica*, 32(4b), 894-902.

Ribeiro, L. O., Mendes, M. F., Pereira, C. S. S. (2011). Avaliação da composição centesimal, mineral e teor de antocianinas da polpa de juçará (*Euterpe edulis* Martius). *Revista Eletrônica TECCEN*, 4(3), 05-16.

Ribeiro, E.P., Seravalli, E.A.G. (2012). *Química de Alimentos*. 2º Ed. São Paulo: Editora Blucher: Instituto Mauá de Tecnologia, pp. 157-164.

Rodamilans, M., Osaba, M. J. M., To-Figueras, J., Fillat, F. R., Marques, J. M., Perez, P., Corbella, J. (1988). Lead toxicity on endocrine testicular function in an occupationally exposed population. *Human & Experimental Toxicology*, 7(2), 125-128.

- Ronis, M. J., Badger, T. M., Shema, S. J., Roberson, P. K., Shaikh, F. (1996). Reproductive toxicity and growth effects in rats exposed to lead at different periods during development. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 136(2), 361-371.
- Roque, A. L. R., Xavier, S. C. C., da Rocha, M. G., Duarte, A. C. M., D'Andrea, P. S., Jansen, A. M. (2008). Trypanosoma cruzi transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(5), 742-749.
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., de Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121(4), 996-1002.
- Russell, L.D., Ettlín, R.A., Sinha-Hikim, A.P., Clegg, E.D. (1990). Mammalian spermatogenesis. In: Russell, L.D., Ettlín, R.A., Sinha-Hikim, A.P., Clegg, E.D. (Eds.), *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Cache River Press, Bolesta, pp. 1-40.
- Russell, L. D. (1996). Mammalian Leydig cell structure. In: Payne, A. H.; Hardy, M. P.; Russell, L. D. (Eds). *The Leydig cell*. Vienna: Cache River Press, pp. 218-222.
- Sadao, M. (2002). Intoxicação por chumbo. *Revista de Oxidologia*, 37- 42.
- Schmitt-Jansen, M., Veit, U., Dudel, G., Altenburger, R. (2008). An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: approaches and challenges. *Basic and Applied Ecology*, 9(4), 337-345.
- Setchell, B. P. (1990). Local control of testicular fluids. *Reproduction, Fertility and Development*, 2(3), 291-309.
- Sharpe, R. M., Kerr, J. B., McKinnell, C., & Millar, M. (1994). Temporal relationship between androgen-dependent changes in the volume of seminiferous tubule fluid, lumen size and seminiferous tubule protein secretion in rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101(1), 193-198.
- Sheets, R. W. (1998). Release of heavy metals from European and Asian porcelain dinnerware. *Science of the Total Environment*, 212(2), 107-113.
- Shikanai-Yasuda, M. A., Carvalho, N. B. (2012). Oral transmission of Chagas disease. *Clinical Infectious Diseases*, cir956.
- Simons, T. J. (1993). Lead transport and binding by human erythrocytes in vitro. *Pflügers Archiv*, 423(3-4), 307-313.
- Skerfving, S., Nilsson, U., Schütz, A., & Gerhardsson, L. (1993). Biological monitoring of inorganic lead. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 59-64.
- Smith, C. M., Wang, X., Hu, H., Kelsey, K. T. (1995). A polymorphism in the delta-aminolevulinic acid dehydratase gene may modify the pharmacokinetics and toxicity of lead. *Environmental Health Perspectives*, 103(3), 248.

Sokol, R. Z. (1990). The effect of duration of exposure on the expression of lead toxicity on the male reproductive axis. *Journal of Andrology*, 11(6), 521-526.

Sokol, R. Z., Berman, N. (1991). The effect of age of exposure on lead-induced testicular toxicity. *Toxicology*, 69(3), 269-278.

Telišman, S., Cvitković, P., Jurasović, J., Pizent, A., Gavella, M., Rocić, B. (2000). Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. *Environmental Health Perspectives*, 108(1), 45.

Telišman, S., Jurasović, J., Pizent, A., Cvitković, P. (2001). Blood pressure in relation to biomarkers of lead, cadmium, copper, zinc, and selenium in men without occupational exposure to metals. *Environmental Research*, 87(2), 57-68.

Thoreux-Manlay, A., Vélez de la Calle, J. F., Olivier, M. F., Soufir, J. C., Masse, R., Pinon-Lataillade, G. (1995a). Impairment of testicular endocrine function after lead intoxication in the adult rat. *Toxicology*, 100, 101-109.

Thoreux-Manlay, A., Le Goascogne, C., Segretain, D., Jégou, B., Pinon-Lataillade, G. (1995b). Lead affects steroidogenesis in rat Leydig cells in vivo and in vitro. *Toxicology*, 103(1), 53-62.

Tslev, D. L.; Zaprianov, Z. K. (1985). Lead. In: *Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice*. Florida: CRC Press, 137-150.

Valente, S. A. S., Valente, V. C., Pinto, A. Y. N., César, M. J. B., Santos, M. P., Miranda, C. O. S., Cuervo, P., Fernandes, O. (2009). Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(3), 291-297.

Vanz, A., Mirlean, N., Baisch, P. R. M. (2003). Avaliação de poluição do ar por chumbo particulado: uma abordagem geoquímica. *Química Nova*, 26(1), 25-29.

Vigeh, M., Smith, D. R., Hsu, P. C. (2011). How does lead induce male infertility?. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 9(1), 1.

Wadi, S. A., Ahmad, G. (1999). Effects of lead on the male reproductive system in mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 56(7), 513-521.

Wang, L., Xun, P., Zhao, Y., Wang, X., Qian, L., Chen, F. (2008). Effects of lead exposure on sperm concentrations and testes weight in male rats: a meta-regression analysis. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 71(7), 454-463.

Wenda-Rózewicka, L., Marchlewicz, M., Barcew-Wiszniowska, B., Piasecka, M. (1996). The ultrastructure of the testis in rats after long-term treatment with lead acetate. *Andrologia*, 28(2), 97-102.

WHO - World Health Organization. (1995). *Environmental Health Criteria 165 - Inorganic lead*. Geneva.

WHO - World Health Organization. (2000). *Guidelines for Air Quality*. Geneva.

Wing, T. Y., Christensen, A. K. (1982). Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *American Journal of Anatomy*, 165(1), 13-25.

Yousef, M. I., Salama, A. F. (2009). Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1168-1175