

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BACHARELADO**

**A EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA  
METILARSENATO MONOSSÓDICO ALTERA  
OS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E A  
MORFOLOGIA EPIDIDIMÁRIA DE RATOS  
WISTAR?**

**THAÍS METZKER PINTO**

**SÃO MATEUS/ES  
ABRIL/2021**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BACHARELADO**

**A EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA  
METILARSENATO MONOSSÓDICO ALTERA  
OS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E A  
MORFOLOGIA EPIDIDIMÁRIA DE RATOS  
WISTAR?**

**THAÍS METZKER PINTO**

Monografia de conclusão de curso apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de BACHAREL EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Castro Monteiro Pirovani  
Coorientador: Lic. Niumaique Gonçalves da Silva

**SÃO MATEUS/ES  
ABRIL/2021**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO

# FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: **Thais Metzker Pinto**

Título: **A EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA METILARSENATO MONOSSÓDICO ALTERA OS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E A MORFOLOGIA EPIDIDIMÁRIA DE RATOS WISTAR?**

Monografia do Curso de Ciências Biológicas (Bacharelado)  
Defendida e aprovada em 30/04/2021.

Com nota 9,0 (nove) pela comissão julgadora:

*Ninmaique Gonçalves da Silva*

Coorientador(a) e presidente da Comissão Examinadora

*Fabrics*

Fabricia de Souza Predes

*Costa*

Pedro Victor de Carvalho Costa

*"Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade."*

Marie Curie

*Dedico a pessoa que sempre me apoiou  
incondicionalmente, minha mãe, Ednamar.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, por ter me guiado nessa jornada.

À minha mãe, Ednamar, a quem devo muito e quem eu mais amo nessa vida. Agradeço por todo apoio e incentivo que me deu para seguir os meus sonhos.

Ao meu pai, Claudiano, por sempre acreditar no meu potencial.

Aos meus avós, Edna e Edimar, e minhas irmãs, Layla e Kirna, que sempre zelaram por mim e a quem tenho amor e gratidão eternos.

Às minhas sobrinhas, Sophia e Laura, por sempre tornarem os dias mais leves e alegres.

À minha amiga-irmã Joyce, que desde o ensino médio me dá forças e me ensina a ser cada dia melhor. Eu te amo e agradeço por tudo que fez e faz por mim. Obrigada por sempre estar ao meu lado. Nós para sempre.

Às minhas amigas de “igreja”, Samira Abreu, Samira Teixeira e Manu, pelos bons momentos compartilhados e por sempre ouvirem minhas asneiras.

Ao meu amigo Igor, por tudo que me ensinou de Histologia e Embriologia, por tudo que me ensinou sobre o laboratório, pelas viagens e momentos que compartilhamos juntos. Sinto sua falta!

Ao meu amigo Pedro, pelo nosso tempo do movimento estudantil, por todo ensinamento de Bio Cel e de todas as áreas do conhecimento possíveis, pelas nossas viagens (obrigada por ser o melhor guia da UNICAMP) e momentos compartilhados.

Aos meus amigos de ensino médio e República Tcheca, João Victor e Victor, pelos anos de convivência, pela amizade construída e por tudo que vivemos.

Aos meus amigos Filipe, Guilherme e Antônio, que sempre estiveram presentes mesmo com a distância.

Ao meu amigo Jonas, por todas as aventuras e caronas até a UFES.

Ao meu mais novo amigo Adriano, que, mesmo nesse pouco tempo, já acumulamos muitas histórias para contar.

Aos meus amigos Lucas, Cíntia, Manu, Karla, Dudu, Rafa... e a TODOS os outros colegas de graduação – tentar nomeá-los seria confiar demais na minha memória débil. Agradeço cada vivência. E agradeço em especial ao meu amigo Jorge, companheiro de todos os trabalhos, provas, seminários, rocks e sofrimentos acadêmicos.

Às minhas “contemporâneas” de turma e laboratório, Layra e Júlia. Agradeço por todas as vezes que me abrigaram em São Mateus (que foram muitas), por todo conhecimento (e dúvidas) compartilhadas e por tudo que vivemos nesses anos de graduação.

Aos amigos que o Laboratório de Estrutural me deu: Niu, Isa, Ana, Brenda, Élio... obrigada por tudo que me ensinaram e que aprendemos juntos; pelos momentos de descontração e pelos cafezinhos no Lab.

A todo pessoal que conheci através da Rede Rio Doce Mar: Lolo, Dudis, Lele, Duda, Daniel, Big...Trabalhar com vocês foi uma experiência incrível. Obrigada por todo conhecimento compartilhado, pelas caronas, pelos memes, pelas confraternizações e por todos bons momentos.

A todos os professores que tive a oportunidade de ter aula durante a graduação e a todos aos servidores da UFES no geral, que foram essenciais para a minha formação. Agradeço, em especial, a professora Karina Mancini, um ser iluminado, que me inspira enquanto pessoa e enquanto profissional; que foi a melhor “chefe” (no Lab de Microscopia); e que foi a responsável por eu me apaixonar pela Biologia Celular e pela Histologia.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Juliana C. Monteiro Pirovani, pelos ensinamentos e por sempre acreditar no meu potencial, até mesmo quando eu não acreditava. Sou grata pelas inúmeras oportunidades que me deu, por todo incentivo e por nunca me desamparar. Agradeço pelos vários anos de laboratório (a escolha mais acertada que fiz em minha graduação), pela amizade e pelo exemplo de profissional que é – competente, paciente e justa. Gratidão!

Ao meu coorientador Lic. Niumaique da Silva, por ter aceitado de prontidão o convite da orientação, por tudo que me ensinou e por toda ajuda durante esses anos de laboratório.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabrícia Predes e ao Bel. Pedro Carvalho que gentilmente aceitaram compor a banca e colaborar com essa monografia.

A Universidade Federal do Espírito Santo, em especial ao Centro Universitário Norte do Espírito Santo, pela educação gratuita e de qualidade.

A todos que me apoiaram e que estiveram ao meu lado em algum momento da minha vida. Mesmo que eu não tenha te citado, saiba que sou grata. Muito obrigada!

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO .....	1
1.1.1 EPIDÍDIMO .....	1
1.2 AGROTÓXICOS .....	5
1.2.1 METILARSENATO MONOSSÓDICO .....	6
1.2.1.1 ARSÊNIO .....	7
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	9
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>10</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>15</b>
<b>A exposição ao herbicida Metilarsenato monossódico altera os parâmetros     espermáticos e a morfologia epididimária de ratos Wistar? .....</b>	<b>16</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>41</b>

## SUMÁRIO DE FIGURAS

- Figura 1.** Anatomia epididimária. À esquerda representação esquemática da anatomia do testículo e epidídimo (modificado de Seeley et al., 2014). À direita epidídimos de camundongo e humano. Camundongo: 1-segmento inicial/cabeça proximal; 2-porção média da cabeça; 3-porção distal da cabeça; 4-corpo; 5-cauda. Humano: ED- ductos eferentes; 1-cabeça anterior; 2-cabeça posterior; 3-corpo anterior; 4-corpo médio; 5-corpo posterior; 6-cauda anterior; 7-cauda posterior; DD-ducto deferente. Barra de 1 cm (Adaptado de Cornwall, 2009). .....2
- Figura 2.** Esquema demonstrando a organização dos principais tipos de células do epidídimo observadas ao microscópio óptico. A posição relativa e distribuição de cada um dos tipos celulares são ilustrados, bem como são identificadas as principais funções associadas a cada tipo de célula (Adaptado de Robaire, Hinton & Orgebin-Crist, 2006). .....3
- Figura 3.** Biometria de ratos Wistar tratados com MSMA e seus respectivos controles. (a) Ganho de massa corporal. (b) Massa relativa do epidídimo. Valores são média  $\pm$  desvio-padrão. Letras diferentes entre colunas indicam significância de  $p < 0,05$ . .....23
- Figura 4.** Fotomicrografia de secções transversais da cabeça (A, B) e cauda (C, D) do epidídimo de Ratos Wistar controle (A, C) e tratados com MSMA (B, D) durante 8 dias. Ep – Epitélio epididimário; Lce – Lúmen com espermatozoides; Tc – Tecido conjuntivo; M – Tecido muscular; Vs – Vaso sanguíneo; \* – Espermatozoides anormais; Seta – Células de defesa. Coloração HE. ....26
- Figura 5.** Fotomicrografia do epidídimo de ratos Wistar tratados com MSMA durante 60 dias. A, E - Cabeça do epidídimo Controle; B, F – Cabeça do epidídimo MSMA; C – Cauda do epidídimo Controle; D – Cauda do epidídimo MSMA. Sptz: espermatozoides; Lse: Lúmen sem espermatozoides; Ep: Epitélio epididimário; Tc: Tecido Conjuntivo; M: Músculo liso; Tp: Túnica própria; flecha: esterocílios;  $\rightarrow$ : aumento de células de defesa;  $\blacktriangleright$ : detritos celulares no lúmen; \*: vacuolizações. Coloração HE. ....27
- Figura 6.** Proporção de espermatozoides normais e anormais (%) presentes no ducto deferente de ratos Wistar tratados MSMA. Letras diferentes entre colunas indicam significância de  $p < 0,05$ . .....29
- Figura 7.** Morfologia dos espermatozoides anormais presentes no ducto deferente de ratos Wistar tratados com MSMA. A – Espermatozoide normal; B – Espermatozoide com cabeça normal separada do flagelo; C – Espermatozoide com gancho em diferente ângulo. ....30
- Figura 8.** Análise dos componentes principais com base no conjunto de dados do estudo de animais controle e tratados com MSMA por 8 e 60 dias. PI= peso inicial; PF= peso final; GP= ganho de peso; E= massa do epidídimo; E\_C= propor. volum. epitélio cabeça; E\_CD = propor. volum. epitélio cauda; LC.SPTZ\_C= propor. volum. de lúmen com espermatozoides na cabeça; LC SPTZ\_CD= propor. volum. de lúmen com espermatozoides na cauda; LS.SPTZ\_C= propor. volum. de lúmen sem espermatozoides na cabeça; LS.SPTZ\_CD= propor. volum. de lúmen sem espermatozoides na cauda; EM\_C= propor. volum. de estroma muscular na cabeça; EM\_CD= propor. volum. de estroma muscular na cauda; ENM\_C = propor. volum. de estroma não muscular na cabeça; ENM\_CD = propor. volum. de estroma não muscular na cauda; VS\_C= propor. volum. de vaso sanguíneo na cabeça; VS\_CD= propor. volum. de vaso sanguíneo na cauda; T\_C = propor. volum. de túnica na cabeça; T\_CD = propor. volum. de túnica na cauda; DT\_C= diâmetro de túbulo na cabeça; DT\_CD= diâmetro de túbulo na cauda; AE\_C = altura de epitélio na cabeça; AE\_CD= altura de epitélio na cauda; DL\_C= diâmetro de lúmen na cabeça; DL\_CD= diâmetro de lúmen na cauda. SPTZ\_N= espermatozoide normal; SPTZ\_A=

espermatozoide anormal; ST\_T= espermátide no testículo; ST\_GT= espermátide g/ testículo;  $N^{\circ} \times 10^6 O_{CD}$ = espermatozoides na cauda;  $N^{\circ} \times 10^6 GO_{CD}$ = espermatozoides g/ cauda;  $N^{\circ} \times 10^6 O_{CC}$ = espermatozoides cabeça/corpo;  $N^{\circ} \times 10^6 GO_{CC}$ = espermatozoides g/ cabeça/corpo; T\_CD= trânsito espermático na cauda; T\_CC= trânsito espermático na cabeça/corpo; PDE= produção diária de espermatozoides; PDE\_GT= produção diária de espermatozoides g/ testículo. ....31

**Figura 9.** Gráfico de correlação. À esquerda, contribuição por grupo. À direita, contribuição por parâmetro (Círculos maiores e com cores mais intensas indicam forte correlação entre os grupos e variáveis, sendo o vermelho correlação negativa e o azul correlação positiva). .....32

## SUMÁRIO DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Proporção volumétrica (%) dos componentes da cabeça do epidídimo de ratos Wistar tratados com Metilarsenato Monossódico por 8 e 60 dias (Média ± desvio padrão). .....	24
<b>Tabela 2.</b> Proporção volumétrica (%) dos componentes da cauda do epidídimo de ratos Wistar tratados com Metilarsenato Monossódico por 8 e 60 dias (Média ± desvio padrão). .....	24
<b>Tabela 3.</b> Morfometria do epidídimo de ratos Wistar tratados com Metilarsenato Monossódico durante 8 e 60 dias (Média ± desvio padrão). .....	25
<b>Tabela 4.</b> Contagem de espermátides no testículo e espermatozoides das porções cabeça/corpo e cauda do epidídimo, produção diária de espermatozoides (PDE) e tempo de trânsito epididimal de ratos Wistar tratados com MSMA durante 8 e 60 dias (Média ± desvio padrão). .....	28
<b>Tabela 5.</b> Anormalidades encontradas nos espermatozoides de ratos Wistar tratados com MSMA durante 8 e 60 dias. (Média ± desvio padrão). .....	30

## LISTA DE ABREVIACOES

AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry

CEUA – Comissão de tica com Uso de Animais

DMA - cido dimetil arsênico

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MMA – cido monometil arsênico

MSMA - Metano Arseniato cido Monossódico ou Metilarsenato Monossódico

PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos

PDE – Produo Diária de Espermatozoides

USEPA - United States Environmental Protection Agency

WHO – World Health Organization

## RESUMO

O epidídimo é o órgão do sistema reprodutor masculino responsável por importantes processos, como a maturação espermática. Assim, agentes tóxicos que alterem a morfofisiologia deste órgão poderão causar problemas à fertilidade masculina. O Metilarsenato monossódico (MSMA) é um composto utilizado na agricultura como herbicida e, por ser a base do metaloide Arsênio, pode representar ameaças aos sistemas orgânicos, como o reprodutor. Nesta perspectiva, este estudo avaliou os efeitos da exposição aguda e crônica ao MSMA na morfologia do epidídimo, através de análises biométricas, morfométricas e estereológicas. Para tanto, 32 ratos Wistar foram separados em: grupo controle (água destilada) e grupo MSMA (120 mg/kg/dia) e eutanasiados após o período de 8 e 60 dias. Testículos e epidídimos foram coletados e preparados para microscopia de luz e análises espermáticas. Observou-se que a intoxicação por MSMA diminuiu a obtenção de massa corporal e, o maior tempo de exposição, causou redução da massa do epidídimo. Diversas alterações morfológicas foram observadas, em sua maioria tempo-dependentes, como redução do percentual de lúmen com espermatozoides, aumento do tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. Patologias leves também foram observadas, como aumento de células de defesa no tecido conjuntivo e, em 60 dias, vacuolizações no epitélio e acúmulo de detritos no lúmen epididimário. Além dessas alterações na morfologia do epidídimo, a quantidade de espermatozoides no epidídimo foi menor e a proporção de anormalidades espermáticas aumentou no grupo que recebeu tratamento crônico. Esses resultados indicam que a exposição oral ao MSMA causa alterações na morfologia do epidídimo e, possivelmente, impactos na fertilidade masculina. Portanto, este herbicida carece de atenção e necessita de uma reavaliação da sua toxicidade.

**Palavras chave:** Arsênio. Epidídimo. Estereologia. Morfometria. Toxicidade.

## ***ABSTRACT***

The epididymis is the organ of the male reproductive system responsible for important processes, such as sperm maturation. Thus, toxic agents that modify the morphophysiology of this organ may cause problems with male fertility. Monosodium Methyl Arsenate (MSMA) is a compound used in agriculture as an herbicide and because it is derived from semimetal Arsenic, it can present threats to organic systems, such as the reproductive system. In this perspective, this study evaluated the effects of acute and chronic exposure to MSMA on the morphology of the epididymis, through biometric, morphometric and stereological analyzes. For that, 32 Wistar rats were separated into: control group (distilled water) and MSMA group (120mg / kg / day) and euthanized after the period of 8 and 60 days. Testicles and epididymis were collected and prepared for light microscopy and sperm analysis. It was observed that MSMA intoxication decreased the obtaining of body mass and, the longer exposure time, caused a reduction in the mass of the epididymis. Several morphological changes were observed, mostly time-dependent, such as a reduction in the percentage of lumen with sperm, an increase in connective tissue and blood vessels. Mild pathologies were also observed, such as an increase in defense cells in the connective tissue and, in 60 days, vacuolations in the epithelium and accumulation of debris in the epididymal lumen. In addition to these changes in the morphology of the epididymis, the amount of sperm in the epididymis was lower and the proportion of sperm abnormalities increased in the group that received chronic treatment. These results indicate that oral exposure to MSMA causes changes in the morphology of the epididymis and, possibly, impacts on male fertility. Therefore, this herbicide needs attention and needs a re-evaluation of its toxicity.

***Keywords:*** *Arsenic. Epididymis. Morphometry. Stereology. Toxicity.*

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

O sistema reprodutor masculino de mamíferos é composto pelos testículos (gônadas), por um sistema de ductos, que inclui os ductos eferentes, os epidídimos e o ducto deferente, pelas glândulas acessórias (glândulas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais) e por várias estruturas de apoio, entre elas o órgão copulador (Tortora & Nielsen, 2017; Junqueira & Carneiro, 2017).

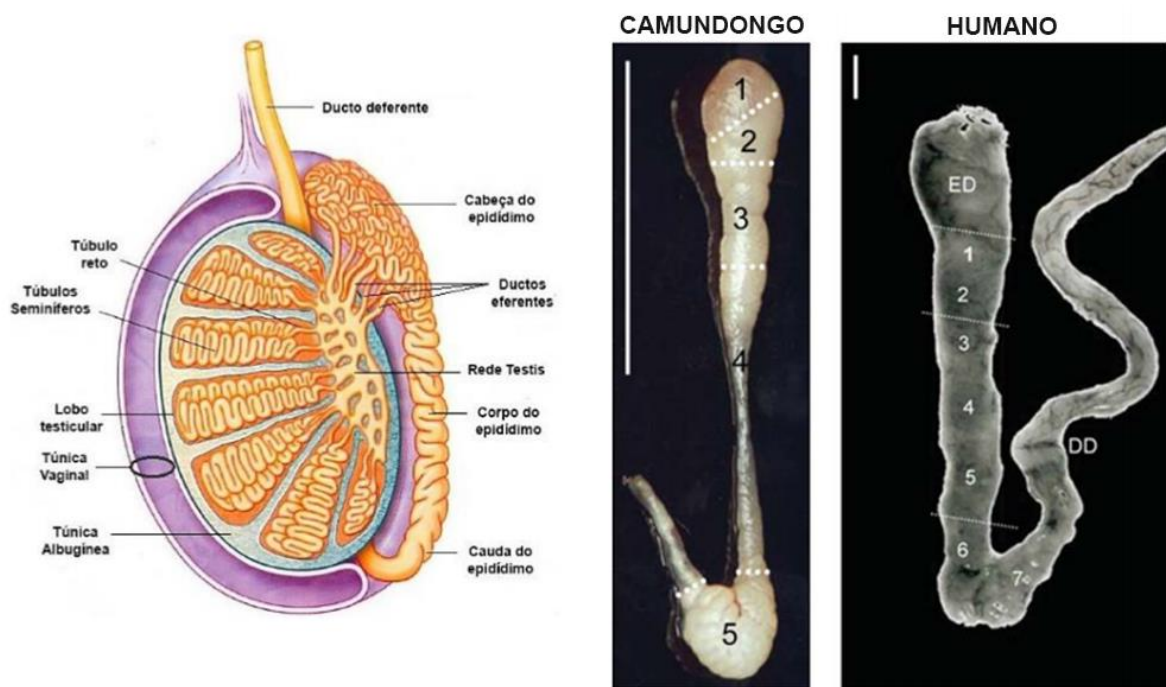
Os testículos têm a função dupla de produzir os hormônios sexuais masculinos e espermatozoides. O sistema de ductos realiza o transporte, maturação e armazenamento dos espermatozoides e as glândulas acessórias produzem fluidos essenciais para a função reprodutiva (Tortora & Nielsen, 2017).

### 1.1.1 EPIDÍDIMO

O epidídimo, que do grego significa "em ou adjacente testículo", é um órgão bilateral, descrito como um ducto único, altamente enovelado, oriundo da fusão de ductos eferentes que partem da rede testicular (Robaire, Hinton & Orgebin-Crist, 2006).

Juntamente com o tecido conjuntivo e vasos sanguíneos que o circundam, o epidídimo é tradicionalmente dividido em quatro regiões anatômicas (Figura 1): o segmento inicial, cabeça, corpo e cauda, conforme descrito pela primeira vez por Benoit (1926).

Esta regionalização é baseada na variação da altura do epitélio, no diâmetro tubular e na frequência dos diferentes tipos celulares ao longo do órgão. O epitélio epididimário conta com seis tipos celulares: células principais, células apicais, células basais, células halo, células claras e células estreitas e é classificado como pseudoestratificado prismático (Figura 2). Além disso, este epitélio é dotado de estereocílios, que são microvilos encontrados na superfície das células principais (Robaire Hinton & Orgebin-Crist, 2006; Oliva, Rinaldo & Stumpp, 2009; Cornwall, 2009).

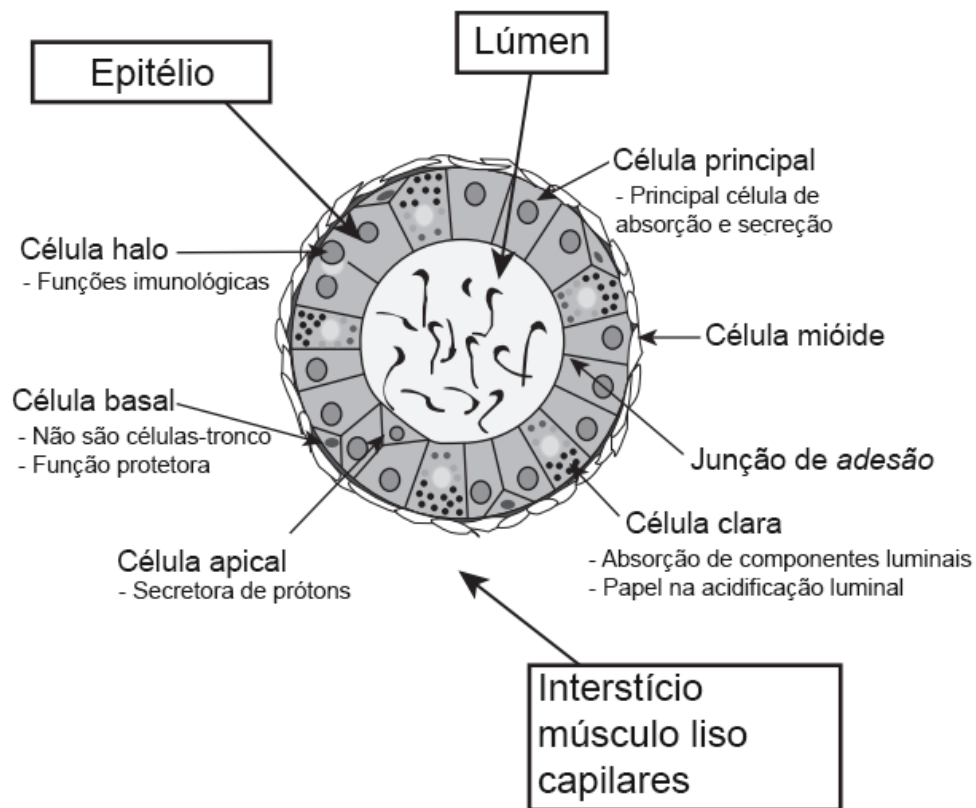


**Figura 1.** Anatomia epididimária. À esquerda representação esquemática da anatomia do testículo e epidídimo (modificado de Seeley et al., 2014). À direita epidídimos de camundongo e humano. Camundongo: 1-segmento inicial/cabeça proximal; 2-porção média da cabeça; 3- porção distal da cabeça; 4-corpo; 5-cauda. Humano: ED- ductos eferentes; 1-cabeça anterior; 2-cabeça posterior; 3-corpo anterior; 4-corpo médio; 5-corpo posterior; 6-cauda anterior; 7-cauda posterior; DD-ducto deferente. Barra de 1 cm (Adaptado de Cornwall, 2009).

Os diferentes tipos celulares desempenham funções distintas e também apresentam localizações diferenciais no órgão. As células principais, que compreendem aproximadamente 65% a 80% do total da população de células epiteliais do epidídimo, aparecem ao longo de todo o ducto e exibem diferenças estruturais em cada região. As células estreitas são encontradas apenas no segmento inicial, enquanto as células claras aparecem apenas nas regiões da cabeça, corpo e cauda. As células basais e halo aparecem ao longo de todo o epidídimo (Hamilton, 1975; Trasler, Hermo & Robaire, 1988; Hermo & Robaire, 2002).

Quanto às funções desempenhadas por cada tipo celular, as células principais são responsáveis pela secreção da maior parte das proteínas do lúmen, fazem endocitose e também têm papel imunoprotetor, por fazerem a barreira hemato-epididimária. Menos se sabe sobre a função dos demais tipos de células, no entanto, as células apicais também apresentam funções secretórias, estando associadas à acidificação luminal e, também, à endocitose de componentes luminiais; as células estreitas também auxiliam na acidificação do lúmen; as células claras têm ativa função endocítica, atuando na depuração de proteínas do lúmen, mas também secreta prótons para o lúmen; as células basais possuem função protetora, já que contribuem para a formação da barreira hemato-epididimária e participam do processo de eliminação de espécies reativas de oxigênio; e as células halo fazem a defesa imunológica primária do epidídimo

(Robaire, Hinton & Orgebin-Crist, 2006; Pietrement et al., 2006; Kujala et al., 2007; Cornwall, 2009; Oliva, Rinaldo & Stumpp, 2009).



**Figura 2.** Esquema demonstrando a organização dos principais tipos de células do epidídimo observadas ao microscópio óptico. A posição relativa e distribuição de cada um dos tipos celulares são ilustrados, bem como são identificadas as principais funções associadas a cada tipo de célula (Adaptado de Robaire, Hinton & Orgebin-Crist, 2006).

Apesar da independência dos tipos celulares, há uma integração que garante a fisiologia do epidídimo. Isto é, interações célula-célula afetam diretamente o ambiente luminal e, por conseguinte, a maturação dos espermatozoides (Cheung et al., 2005).

Cada região do epidídimo apresenta características distintas e condições apropriadas para a maturação espermática. O segmento inicial, por exemplo, está relacionado com a absorção de fluidos oriundos do testículo; a cabeça e corpo estão envolvidos com a aquisição da motilidade progressiva e da capacidade de reconhecimento e fertilização do ovócito; e a cauda está associada à fagocitose de espermatozoides anormais e com o armazenamento espermático (Oliva, Rinaldo & Stumpp, 2009; Souza, 2013).

Todas as características supracitadas criam um microambiente que torna o epidídimo apto para as funções de transportar, realizar a maturação, estocar e proteger os espermatozoides. O transporte dos espermatozoides pelo epidídimo é desempenhado pela contração da

musculatura lisa do entorno deste órgão, controlada por andrógenos e pelo sistema nervoso autônomo. O tempo de trânsito dos espermatozoides no epidídimo varia de 3 a 15 dias, a depender da espécie (Cosentino e Cockett, 1986). Em ratos, o tempo médio é de 8 dias (Robb, Amman & Killian, 1978; França, Avelar & Almeida, 2005) e alterações nesse tempo podem afetar a maturação espermática e, conseqüentemente, a fertilidade, bem como alterar a quantidade de espermatozoides disponíveis para a ejaculação (Klinefelter, 2002).

Em relação à maturação espermática, processo em que os espermatozoides adquirem motilidade e capacidade de fertilização, há uma interação orquestrada entre os gametas e as proteínas produzidas e secretadas pelo epitélio epididimário (Sullivan et al., 2005; Cornwall, 2009). Os espermatozoides recém saídos do testículo são células imóveis e pouco capazes de fertilizar um ovócito e é o trânsito no epidídimo que lhes confere essas competências (Shum et al., 2009). A capacidade de sofrer a reação acrossômica, reconhecer e se ligar à zona pelúcida, como observado em camundongos, estão associados à passagem pelo epidídimo (Saling, 1982; Lakoski, 1988).

Além das alterações funcionais, os espermatozoides também sofrem alterações estruturais durante a passagem pelo epidídimo, como migração da gota citoplasmática ao longo do flagelo, modificações no acrossoma, mudanças na cromatina, dentre outros (Bedford, 1973).

Outra função atribuída ao epidídimo é o armazenamento e proteção dos gametas masculinos. O principal local de armazenamento dos espermatozoides, em mamíferos, é a cauda epididimária, onde ficam por até 30 dias e são protegidos pela barreira hemato-epididimária (Orgebin-Crist, Danzo & Davies, 1975; Ribeiro, 2013).

Cabe ressaltar que toda funcionalidade epididimal está associada a vias hormonais e não hormonais. A testosterona e o estradiol parecem ser os principais responsáveis pela manutenção da estrutura e função do epidídimo, assim como os receptores de estrógenos (ER) auxiliam no funcionamento deste órgão. Portanto, percebe-se que vários fatores influenciam o ducto epididimário, desde hormônios testiculares a ação proteica intracelular, o que evidencia a integração com outros órgãos do sistema reprodutor (Leite, 2019).

Por fim, diante do exposto, compreende-se a importância do epidídimo no contexto da fertilidade masculina. Corroborando isso, Cornwall (2009) aponta que 40% da infertilidade masculina podem advir de anormalidades na maturação dos espermatozoides. Assim, agentes tóxicos que possam alterar a morfofisiologia deste órgão representam riscos à fertilidade, visto que podem afetar o papel fundamental de maturação dos espermatozoides.

## 1.2 AGROTÓXICOS

Agrotóxicos, defensivos agrícolas, pesticidas e praguicidas são algumas das várias denominações relacionadas às substâncias químicas utilizadas no controle de pragas (animal e vegetal) e “doenças” de plantas. Estes compostos são empregados em larga escala na agricultura, nas pastagens, na silvicultura e até em campanhas sanitárias para o controle de vetores de doenças (Peres, Moreira & Dubois, 2003).

No Brasil, essas substâncias são definidas, de acordo com a Lei 7.802/1989, como:

“Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (Brasil, 1989).

Independentemente da denominação ou definição atribuída, o que se sabe é que os agrotóxicos começaram a ser amplamente utilizados no pós-guerra, visando exterminar insetos e plantas invasoras das culturas e aumentar a produtividade. No Brasil, o uso desses produtos acompanhou a tendência mundial em plena “Revolução Verde”. Ainda na segunda metade do século XX, o país começou a investir em culturas de interesse internacional (Peres, Moreira & Dubois, 2003; Matos & Pessôa, 2011).

Paralelamente a isso, a partir da década 80, começou-se a visualizar e descrever os resultados nocivos dos agrotóxicos. Desde então, várias publicações têm denunciado os efeitos adversos à saúde humana e ao meio ambiente causados pelos diferentes tipos de pesticidas (Doull & Levien, 1993; Carvalho, Nodari & Nodari, 2017).

Não obstante, o consumo desses produtos continua crescendo. No Brasil, por exemplo, a agricultura é ainda muito dependente do uso de agrotóxicos. O país, inclusive, ocupa a marca de maior consumidor mundial desses compostos desde 2009 (Goes & Campos, 2019). Somente no ano de 2020 o Brasil aprovou o registro de 493 pesticidas, 4% superior ao ano de 2019 e um recorde histórico (Grigori, 2021). Acompanhado do aumento do consumo de agrotóxicos, observa-se um aumento no número de notificações por intoxicações.

De acordo com o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), entre 2007 e 2014, a quantidade de agrotóxicos comercializados passou de cerca de 623.353.689 quilos para 1.552.998.056 quilos, um aumento equivalente a 149,14%. Concomitantemente a isso, no período de 2007 a 2015, houve um acréscimo no número de 139% de notificações por intoxicações por agrotóxicos, sendo o total acumulado de 84.206 casos (Brasil, 2018).

Apesar desses registros, sabe-se que a subnotificação ainda é expressiva no Brasil e no mundo, sobretudo nos casos de intoxicação crônica. Este fato dificulta o dimensionamento do problema no País, além de invisibilizar os custos desses atendimentos para o SUS (Brasil, 2018). Cabe ressaltar que os agrotóxicos podem causar quadros de intoxicação de leve a grave nos seres humanos, a depender da quantidade e da toxicidade do produto, do tempo de exposição e do tempo de espera ao atendimento médico (Brasil, 2013).

Além da problemática da intoxicação pelo contato direto com os agrotóxicos, por camponeses, trabalhadores rurais e seus familiares, também pode haver alguma “contaminação indireta”, através dos alimentos, da população em geral. Em 2019, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) publicou o relatório das amostras de alimentos analisadas no período de 2017-2018 do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA) e constatou um número superior a 20% de amostras insatisfatórias. Dentre as irregularidades encontradas, estavam a utilização de agrotóxicos proibidos e resíduos de agrotóxicos superiores ao limite permitido (Bombardi, 2012; Anvisa, 2019).

Embora pouco se saiba das consequências do consumo de alimentos contaminados, é muito bem definido os efeitos da exposição direta aos agrotóxicos, ao qual muitos brasileiros estão suscetíveis. Dentre as inúmeras consequências descritas na literatura, destacam-se alergias, distúrbios gastrintestinais, respiratórios, endócrinos, reprodutivos e neurológicos e neoplasias (World Health Organization, 2019).

### 1.2.1 METILARSENATO MONOSSÓDICO

Dentre a variedade de agrotóxicos existentes e permitidos no Brasil, deve-se chamar atenção para o controverso Metano Arseniato Ácido Monossódico ou Metilarsenato Monossódico (MSMA). O MSMA tem a fórmula química  $\text{CH}_4\text{AsNaO}_3$  e é um arsênico orgânico pentavalente utilizado na agricultura como herbicida não seletivo, não sistêmico, pós-emergente e classificado pela Anvisa como altamente tóxico (Classe II) (Anvisa, 2020).

Atualmente, existem nove produtos diferentes à base de MSMA registrados no Brasil e que são amplamente usados no combate a ervas daninhas em culturas como algodão, cana, citrícios e café, mesmo com este agrotóxico sendo classificado pela Portaria Normativa do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), nº84, de 15 de outubro de 1996, como “muito perigoso”, quanto ao potencial de periculosidade ambiental (Serodio, 2014).

Outro fator preocupante é a degradação do MSMA em metabólitos tóxicos, que além de perigosa ambientalmente, é nociva à saúde humana. Além disso, sabe-se que por se tratar de

um arsênico orgânico, uma pequena exposição já pode causar risco à saúde humana. Contudo, mesmo a Anvisa tendo feito uma nota técnica em 2002 para a reavaliação toxicológica do MSMA, esta ainda não ocorreu e o produto segue sendo vastamente utilizado (Serodio, 2014).

Apesar de escassos, estudos com o MSMA em ratos e coelhos indicaram que, em exposição aguda este herbicida, por via oral e inalatória provoca diarreia, decréscimo da atividade motora, fígado e pulmões hemorrágicos, secreção ocular, redução do ganho de peso corpóreo, decréscimo da respiração, hemorragia ou alteração de cor do estômago, ulceração do escroto, entre outros, conforme exposto na Nota Técnica de Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo MSMA (Anvisa, 2002).

No que diz respeito aos efeitos no sistema reprodutor masculino, de maneira aguda e crônica, pouco se conhece, o que evidencia a necessidade de investigar as implicações do MSMA nestes órgãos. Estudos do grupo de pesquisa apontam que esse herbicida é citotóxico e induz a proliferação de células neoplásicas na próstata (Víctor-Carvalho et al., 2021). Contudo, dados em relação ao epidídimo são praticamente inexistentes.

#### 1.2.1.1 ARSÊNIO

O Arsênio (As), elemento do qual se deriva o MSMA, é um semimetal, natural, abundante na crosta terrestre e, para a Toxicologia, é considerado um metal pesado. Os números de oxidação mais comuns deste elemento são +5, +3 e -3, nos quais ele é capaz de formar compostos orgânicos e inorgânicos no ambiente ou no corpo humano (Orloff, Mistry, Metcalf, 2009; Jomova et al., 2011).

Este elemento se torna disponível no ambiente através de fontes geológicas naturais e de atividades humanas, como mineração, processos de fabricação de eletrônicos, incineração de resíduos, combustão do carvão e fundição de metais (Hughes et al., 2011). Com isso, a contaminação do homem pode advir da inalação, no caso de pessoas que trabalham em fundições e indústrias, ou do consumo, através de água contaminada e de alguns alimentos, como o arroz (Jana, Jana & Samanta, 2006; Wu *et al.*, 2011).

A contaminação da água pelo arsênio pode ser vista como um problema de saúde pública, já que a Organização Mundial da Saúde estima que mais de 140 milhões de indivíduos em 50 países têm bebido água contendo arsênio em níveis acima do valor da diretriz provisória da OMS de 10 µg/L (World Health Organization, 2018). Os elevados níveis de Arsênio no solo e nas águas está muito relacionado ao amplo uso deste metaloide na sociedade, como na fabricação de tintas, inseticidas, fungicidas, herbicidas, conservantes, semicondutores, diodos, lasers e transistores (Ratnaike, 2003).

Nesse cenário, deve-se chamar atenção que a agência internacional Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) aponta o arsênio como o elemento químico mais perigoso da Priority List of Hazardous Substances (ATSDR, 2019). Além disso, o Ministério da Saúde considera o arsênio como um elemento químico que apresenta potenciais riscos à saúde humana (Brasil, 2006).

O efeito tóxico das espécies de arsênio depende principalmente da sua fórmula química, sendo que arsenito ( $\text{As}^{3+}$ ) inorgânico é mais tóxico que o arsenato inorgânico ( $\text{As}^{5+}$ ) e estes são mais tóxicos que o arsenito e arsenato orgânicos, respectivamente (USEPA, 2001). Entretanto, essa regra não é absoluta, já que alguns estudos têm demonstrado que as formas metiladas podem ser mais tóxicas que as formas inorgânicas (Silva, Barrio & Moreira, 2014).

Segundo Serodio (2014), o arsênio pentavalente ( $\text{As}^{5+}$ ) é rapidamente reduzido à forma trivalente ( $\text{As}^{3+}$ ), que penetra nas células, principalmente, nos hepatócitos, e nelas é metilado para formar o MMA (ácido monometil arsênico) que, posteriormente, sofre metilação oxidativa para formar o DMA (ácido dimetil arsênico), sendo todos estes compostos tóxicos.

A literatura explicita que vários são os efeitos dos compostos arsenicais nos sistemas orgânicos. Sabe-se que o arsênio está relacionado ao acúmulo em tecidos e células, à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e alteração na função de enzimas relacionadas com a metilação, o que pode levar à alterações degenerativas, inflamatórias e neoplásicas aos sistemas nervoso, respiratório, hematopoiético, cardiovascular e reprodutor (Cui e Okayasu, 2008; Chen et al., 2011; Watanabe e Hirano, 2013).

No sistema reprodutor masculino, o metaloide causa redução da massa dos testículos e órgãos sexuais acessórios, inibição da espermatogênese e alterações atróficas do testículo (Altoé et al, 2016); diminuição da motilidade espermática e contagem de espermatozoides epididimais (Souza, 2013); comprometimento da qualidade seminal e redução do peso de órgãos sexuais acessórios, como o epidídimo (Li et al., 2012), dentre outros. Neste contexto, tem se tornado cada vez mais necessário investigar as implicações do uso de substâncias derivadas desse metal pesado no sistema reprodutor masculino, tal como herbicida alvo deste estudo, o MSMA.

Assim, considerado a potencial toxicidade do Metilarsenato Monossódico, o presente trabalho avaliou os efeitos da exposição aguda e crônica a este herbicida na morfologia do epidídimo e dos espermatozoides de ratos Wistar em idade reprodutiva, produzindo dados que poderão ser utilizados como subsídios científicos para a reavaliação toxicológica deste agrotóxico no futuro.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos da exposição aguda e crônica ao Metilarsenato Monossódico (MSMA) nos parâmetros espermáticos e na morfologia do epidídimo de ratos Wistar adultos.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar a proporção volumétrica (%) dos componentes do epidídimo de ratos Wistar expostos ao MSMA durante 8 e 60 dias;
- Avaliar os diâmetros tubular e luminal e altura de epitélio epididimário de ratos Wistar tratados com MSMA de forma aguda e crônica;
- Fazer a avaliação histopatológica os tecidos epididimais dos ratos tratados e controles;
- Determinar o número de espermátides e espermatozoides, a produção espermática diária e tempo de trânsito epididimal de ratos Wistar tratados com MSMA;
- Avaliar a morfologia espermática de ratos Wistar expostos ao MSMA.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Gerência Geral de Toxicologia. Gerência de Análise Toxicológica. **Nota técnica: Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo MSMA**, 2002.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Monografias de agrotóxicos: M 24 - MSMA**. Brasília: [s.n.], 2020. 2p. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas-por-letra>. Acesso em: 07/04/2021.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): Relatório das Amostras Analisadas de 2017-2018**. Brasília, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>. Acesso em: 07/04/2021.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR. **Priority List of Hazardous Substances for 2019**. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html#2019spl>. Acesso em: 07/04/2021.
- ALTOÉ, L. S; REIS, I. B; GOMES, M. L. M; DOLDER, H; MONTEIRO-PIROVANI, J. C. Could vitamin C and zinc chloride protect the germ cells against sodium arsenite?. **Human & experimental toxicology**, v. 36, n.10, p. 1049-1058, 2016.
- BEDFORD, J. M. Components of sperm maturation in the human epididymis. **Advances in the Biosciences**, v. 10, p. 145–155, 1973.
- BENOIT, J. Recherches anatomiques, cytologiques et histophysiologiques sur les voies excrétrices du testicule chez les mammifères. **Archives d'anatomie, d'histologie et d'embryologie: normales et expérimentales**, 5, p. 173–412, 1926.
- BOMBARDI, L. **Agrotóxicos e agronegócio: arcaico e moderno se fundem no campo brasileiro**. In: MERLINO, T. & MENDONÇA, M. L. (Org.). Direitos Humanos no Brasil 2012 - Relatório da Rede Social de Justiça e Direitos Humanos. São Paulo, 2012.
- BRASIL. **Lei n.º 7.802, de 12 de julho de 1989**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, de 12 de julho de 1989.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**, v. 1, t. 2. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Instrutivo operacional de vigilância em saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano**. Brasília: Ministério da Saúde, 212 p., 2006.

- CARVALHO, M. M. X; NODARI, E. S; NODARI, R. O. “Defensivos” ou “agrotóxicos”? História do uso e da percepção dos agrotóxicos no estado de Santa Catarina, Brasil, 1950-2002. **História, Ciências, Saúde**. Rio de Janeiro, v. 24, n. 1, p. 75-91, 2017.
- CHEN, B; ARNOLD, L. L; COHEN, S. M; THOMAS, D. J; LE, X. C. Mouse arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase genotype affects metabolism and tissue dosimetry of arsenicals after arsenite administration in drinking water. **Toxicological Sciences**, v. 124, n. 2, p. 320-326, 2011.
- CHEUNG, K. H; LEUNG, G. P; LEUNG, M. C; SHUM, W. W; ZHOU, W. L; WONG, P. Y. Cell–cell interaction underlies formation of fluid in the male reproductive tract of the rat. **The Journal of General Physiology**, v. 125, p. 443 – 454, 2005.
- CORNWALL, G. A. New insights into epididymal biology and function. **Human Reproduction Update**, v. 15, p. 213-227, 2009.
- COSENTINO, M. J. & COCKETT, A. T. K. Review Article: Structure and Function of the Epididymis. **Urological Research**, v. 14, p. 229-240, 1986.
- VÍCTOR-CARVALHO, P. C; LEITE, I. B; PINTO, T. M; PIROVANI, J. C. M. **Efeitos da exposição ao Metilarsenato Monossódico (MSMA) na morfologia prostática de ratos Wistar machos**. In: FAJARDO, P. A. (Org.). O Fortalecimento Intensivo das Ciências Biológicas e suas Interface. Ponta Grossa: Atena Editora, v. 1, 1 ed, p. 62-73, 2021.
- CUI, X. & OKAYASU, R. Arsenic accumulation, elimination, and interaction with copper, zinc and manganese in liver and kidney of rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 12, p. 3646-3650, 2008.
- DOULL, J. & LEVIEN, R.S. Global estimates of acute pesticide morbidity and mortality. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, 129:29-44, 1993.
- FRANÇA, L. R; AVELAR, G. F; ALMEIDA, F. F. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 300-318, 2005.
- GOES, D. M. & CAMPOS, M. C. Uso de agrotóxicos e produção agroecológica: percepção de estudantes secundaristas de uma escola do campo. **Revista NERA**, v. 22, n. 46, p. 85-105, 2019.
- GRIGORI, P. **2020 é o ano com maior aprovação de agrotóxicos da história**. Disponível em:<https://ciclovivo.com.br/vida-sustentavel/alimentacao/2020-e-o-ano-com-maior-aprovacao-de-agrotoxicos-da-historia/>. Acesso em: 06/04/2021.
- HAMILTON, D. W. Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymidis and ductus deferens in the rat. **Handbook of Physiology**. Sec. 7, v. 5, p. 259–301, 1975.
- HERMO, L. & ROBAIRE, B. **Epididymal cell types and their functions**. In: ROBAIRE, B. & HINTON, B. T. The Epididymis - from molecules to clinical practice. New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher, p. 81-102, 2002.

- HUGHES, M. F; BECK, B. D; CHEN, Y; LEWIS, A. S; THOMAS, D. J. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. **Toxicological Sciences**, v. 123, n. 2, p. 305-332, 2011.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (Brasil). **Portaria Normativa IBAMA n.84, de 15 de outubro de 1996**. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/component/legislacao/?view=legislacao&legislacao=99498>. Acesso em: 07/04/2021.
- JANA, K; JANA, S; SAMANTA, P. K. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2006.
- JOMOVA, K; JESINOVA, Z; FESZTEROVA, M; BAROS, S; LISKA, J; HUDECOVA, D; RHODES, C. J; VALKO, M. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. **Journal Applied Toxicology**, v. 31, n. 2, p. 95-107, 2011.
- JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
- KLINFELTER, G. R. **Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis**. In: ROBAIRE, B. & HINTON, B. T. The Epididymis – from molecules to clinical practice. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publisher, p. 353-369, 2002.
- KUJALA, M; HIHNALA, S; TIENARI, J; KAUNISTO, K; HASTBACKA, J; HOLMBERG, C; KERE, J; HOGLUND, P. Expression of ion transport-associated proteins in human efferent and epididymal ducts. **Reproduction**, v. 133, p. 775 – 784, 2007.
- LAKOSKI, K. A; CARRON, C. P; CABOT, C. L; SALING, P. M. Epididymal maturation and the acrosome reaction in mouse sperm: response to zonapellucida develops coincident with modification of M42 antigen. **Reproductive Biology**, v. 38, p. 221–233, 1988.
- LEITE, L. C. **Avaliação do efeito terapêutico do extrato da casca de jabuticaba frente à senescência e obesidade sobre o testículo e epidídimo de camundongos (fvb)**. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2019.
- LI, P; ZHONG, Y; JIANG, X; WANG, C; ZUO, Z; SHA, A. Seminal plasma metals concentration with respect to semen quality. **Biological Trace Element Research**, v. 148, n. 1, p. 1-6, 2012.
- MATOS, P. F. & PESSÔA, V. L. S. A modernização da agricultura no Brasil e os novos usos do território. **Geo UERJ**, ano 13, v. 2, n. 22, p. 290-322, 2011.
- OLIVA, S. U.; RINALDO, P. A.; STUMPP, T. Biologia epididimária: maturação espermática e expressão gênica. **O Mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 419-425, 2009.
- ORGBIN-CRIST, M-C; DANZO, B. J; DAVIES, J. **Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis**. In: GREEP, R. O. & ASTWOOD, E. B. Handbook of Physiology. Seção 7, Volume 2, 319–338 p. Washington, DC: American Physiological Society, 1975.

- ORLOFF, K; MISTRY, K; METCALF, S. Biomonitoring for environmental exposures to arsenic. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 12, n. 7, p. 509-524, 2009.
- PERES, F; MOREIRA, J. C; DUBOIS, G. S. **Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema**. In: PERES, F. & MOREIRA, J. C. (orgs.). *É veneno ou é remédio? agrotóxicos, saúde e ambiente*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2003.
- PIETREMENT, C.; SUN-WADA, G. H; SILVA, N. D; MCKEE, M; MARSHANSKY, V; BROWN, D; FUTAI, M; BRETON, S. Distinct expression patterns of different subunit isoforms of the V-ATPase in the rat epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 185 – 194, 2006.
- RATNAIKE, R. N. Acute and chronic arsenic toxicity. **Postgraduate Medical Journal**, v. 933, p. 391-6, 2003.
- RIBEIRO, S. P. **Efeitos do cádmio, chumbo e zinco em epidídimo de ratos Wistar**. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2013.
- ROBAIRE, B; HINTON, B.T. & ORGEBIN-CRIST, M.C. **The epididymis**. p. 1071–1148. In: PLANT, T. M. & ZELEZNIK, A. J. Editado por NEILL, J. D. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3 ed., v. 1. St Louis, MO: Elsevier Academic Press, 2006.
- ROBB, G. W; AMMAN, R. P; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **The Journal of Reproduction & Infertility**, v. 54, p. 103-107, 1978.
- SALING, P. M. Development of the ability to bind to zonae pellucidae during epididymal maturation: reversible immobilization of mouse spermatozoa by lanthanum. **Biology of Reproduction**, v. 26, p. 429–436, 1982.
- SEELEY, R. R; VANPUTTE, C; REGAN, J; RUSSO, A. **Seeley's anatomy and physiology**. Nova York: McGraw-Hill Education, 10 ed., 2014.
- SERODIO, P. S. **Identificação do dano causado pelo uso agrícola do ingrediente ativo Metano-arseniato ácido monossódico (MSMA): uma reavaliação toxicológica**. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária), Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.
- SHUM, W. W; DA SILVA, N; BROWN, D; BRETON, S. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. **The Journal of Experimental Biology**, v. 212, p. 1753-1761, 2009.
- SILVA, J. M. B; BARRIO, R. J; MOREIRA, J. C. Arsênico – saúde: uma relação que exige vigilância. **Revista Visa em Debate**, v.2, n.1, p.57-63, 2014.
- SOUZA, A. C. F. **Comparação dos efeitos da ingestão crônica de arsenito e arsenato de sódio sobre parâmetros testiculares e epididimários**. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, MG, 2013.

- SULLIVAN, R; SAEZ, F; GIROUARD, J; FRENETTE, G. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 35, p. 1 – 10, 2005.
- TORTORA, G. J. & NIELSEN, M. T. Revisão: PASSOS, M. A. R. F. Tradução: WERNECK, A; ARAÚJO, C. L. C. **Princípios de anatomia humana**. 12 ed (Reimpressão). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
- TRASLER, J. M; HERMO, L. & ROBAIRE, B. Morphological changes in the testis and epididymis of rats treated with cyclophosphamide: a quantitative approach. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 463–479, 1988.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. National Primary Drinking Water Regulations. **Arsenic and Classifications to Compliance and New Source Contaminants Monitoring**, 2001.
- WATANABE, T. & HIRANO, S. Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 6, p. 969-979, 2013.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Arsenic**. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>. Acesso em: 06/04/2021.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Department of Public Health, Environmental and Social Determinants of Health. **Exposure to highly hazardous pesticides: a major public health concern**. Suíça: World Health Organization, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-CED-PHE-EPE-19.4.6>. Acesso em: 07/04/2021.
- WU, C; YE, Z; SHU, W; ZHU, Y; WONG, M. Arsenic accumulation and speciation in rice are affected by root aeration and variation of genotypes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 3, p. 1-10, 2011.

#### **4. RESULTADOS**

Os resultados serão apresentados no manuscrito intitulado como “**A exposição ao herbicida Metilarsenato monossódico altera os parâmetros espermáticos e a morfologia epididimária de ratos Wistar?**”.

## **A exposição ao herbicida Metilarsenato monossódico altera os parâmetros espermáticos e a morfologia epididimária de ratos Wistar?**

**Autores:** Thaís Metzker Pinto<sup>1</sup>, Igor Buzzatto Leite<sup>2</sup>, Pedro Victor Carvalho<sup>2</sup>, Jorge da Cruz Moschem<sup>2</sup>, Juliana Castro Monteiro Pirovani<sup>1</sup>

### **Filiação:**

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas, UFES, São Mateus, ES, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

**Correspondência:** Juliana C. M. Pirovani; Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas – DCAB; Centro Universitário do Norte do Espírito Santo – CEUNES; CEP: 29.932-540; São Mateus, ES, Brasil; Tel: 27 33121552; *E-mail:* julianacmonteiro@gmail.com

## RESUMO

Ao longo do tempo, técnicas agrícolas vêm sendo desenvolvidas pela humanidade com intuito de aumentar a produtividade vegetal, como o advento dos agrotóxicos. Um deles, utilizado no Brasil, é o Metilarsenato Monossódico (MSMA), um organoarsênico usado como herbicida. A literatura explicita que a exposição ao Arsênio, metaloide presente no MSMA, ocasiona efeitos deletérios ao sistema reprodutor masculino. Nesta perspectiva, este estudo verificou os efeitos da exposição aguda e crônica ao MSMA no epidídimo. Trinta e dois ratos Wistar foram divididos em: controle (água) e MSMA (120 mg/kg/dia) e eutanasiados após 8 e 60 dias de tratamento. O epidídimo foi processado para microscopia de luz e analisado utilizando ferramentas estereológicas e morfométricas. Além disso, parâmetros espermáticos foram avaliados. Constatou-se que a administração de MSMA causa diminuição de massa corporal e a exposição crônica leva à redução da massa do epidídimo. A administração do herbicida causou diversas alterações morfológicas, como redução do percentual de lúmen com espermatozoides, aumento do tecido conjuntivo e vasos sanguíneos, dentre outros, em sua maioria tempo-dependentes. Além disso, observou-se aumento de células de defesa e, em 60 dias, vacuolizações no epitélio e acúmulo de detritos no lúmen epididimário. Além dessas alterações na morfologia do epidídimo, a quantidade de espermatozoides reduziu em todas as regiões analisadas do epidídimo e a proporção de anormalidades espermáticas aumentou no grupo crônico. Esses resultados sugerem que a administração de MSMA causa alterações na morfologia e, possivelmente, na funcionalidade do epidídimo. Portanto, este herbicida carece de atenção e necessita de uma reavaliação da sua toxicidade.

Palavras-chave: *Agrotóxico. Arsênio. Epidídimo. Sistema reprodutor masculino.*

## INTRODUÇÃO

A história da humanidade foi marcada pela busca contínua em aumentar a produtividade vegetal e, neste contexto, houve o advento dos agrotóxicos. Essas substâncias começaram a ser amplamente utilizadas na década de 50, a fim de exterminar insetos e plantas invasoras das culturas. Contudo, a partir da década 80, começou-se a visualizar e descrever os efeitos nocivos desses produtos (Peres, Moreira & Dubois, 2003; Carvalho, Nodari & Nodari, 2017). Apesar disso, no Brasil, o processo agrário tem se tornado cada vez mais dependente do uso de agrotóxicos, ocupando desde 2009 a posição de maior consumidor mundial desses produtos (Goes & Campos, 2019).

Entre os anos de 2007 e 2014, a quantidade de agrotóxicos comercializados no Brasil passou de cerca de 623 mil toneladas para 1 milhão e 550 mil toneladas, um aumento equivalente a 149,14%. Paralelamente a isso, no período de 2007 a 2015, houve um acréscimo de 139% no número de notificações por intoxicações por agrotóxicos, sendo o total acumulado de 84.206 casos (Brasil, 2018).

Figurando na grande lista de agrotóxicos permitidos no Brasil, deve-se destacar o controverso Metano Arseniato Ácido Monossódico ou Metilarsenato Monossódico (MSMA). O MSMA é um arsênico orgânico pentavalente, utilizado na agricultura como herbicida não seletivo, não sistêmico, pós-emergente e classificado pela ANVISA como altamente tóxico (Classe II) e pelo IBAMA como “muito perigoso”, quanto ao potencial de periculosidade ambiental (IBAMA, 1996; ANVISA, 2002; Serodio, 2014).

A literatura explicita que a exposição ao Arsênio, semimetal presente no MSMA, ocasiona impactos deletérios aos sistemas orgânicos. Seu efeito está associado ao acúmulo em tecidos e células, à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e alteração na função de enzimas relacionadas com a metilação, o que pode levar à alterações degenerativas, inflamatórias e neoplásicas aos sistemas nervoso, respiratório, hematopoiético, cardiovascular e reprodutor (Cui e Okayasu, 2008; Chen et al., 2011; Watanabe e Hirano, 2013). No sistema reprodutor masculino, o efeito desse metaloide é observado na redução da massa dos testículos e órgãos sexuais acessórios, inibição da espermatogênese e em alterações atróficas do testículo (Altoé et al, 2016); diminuição da motilidade espermática e contagem de espermatozoides epididimais (Souza, 2013); comprometimento da qualidade seminal e redução do peso de órgãos sexuais acessórios, como o epidídimo (Li et al., 2012a); dentre outros.

Entretanto, no que diz respeito aos efeitos do organoarsênico MSMA no sistema reprodutor masculino, pouco se conhece, evidenciando a necessidade de investigar as suas implicações nestes órgãos. Estudos do grupo de pesquisa, apontam que esse herbicida é

citotóxico e induz a proliferação de células neoplásicas na próstata (Víctor-Carvalho et al., 2021). Contudo, dados em relação ao epidídimo são inexistentes.

O epidídimo é um ducto único, altamente enovelado, oriundo da fusão dos ductos eferentes que partem da rede testicular. Este órgão desempenha funções essenciais ao sistema reprodutor, como a maturação espermática, processo que envolve a aquisição de motilidade e a capacidade de reconhecer o ovócito pelos espermatozoides (Shum et al., 2009). Além disso, durante o trânsito epididimário, os gametas passam por alterações estruturais, como migração da gota citoplasmática ao longo do flagelo, modificações no acrossoma etc (Bedford, 1973) e, por fim, são armazenados na cauda do epidídimo.

Cornwall (2009) descreve que 40% da infertilidade masculina podem vir de anormalidades na maturação dos espermatozoides. Levando isto em consideração, bem como todas as importantes funções do epidídimo, agentes tóxicos que alterem a morfologia e, conseqüentemente, a fisiologia deste órgão e dos espermatozoides, podem afetar negativamente a fertilidade.

Agrotóxicos podem ser considerados agentes tóxicos aos órgãos do sistema reprodutor masculino. Assim, considerando o potencial tóxico do herbicida Metilarsenato Monossódico e do metaloide Arsênio do qual é derivado, bem como a escassez de estudos envolvendo este agrotóxico e o sistema reprodutor masculino, o presente estudo avaliou os efeitos do MSMA na morfologia do epidídimo e nos espermatozoides de ratos Wistar em idade reprodutiva.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **ANIMAIS**

Ratos Wistar machos adultos (80 dias de idade) foram obtidos a partir do Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo e acomodados no Laboratório de Bioexperimentação do Centro Universitário Norte do Espírito Santo sob as condições padrão de temperatura (25 + 1°C) e luminosidade (12 - 12h claro/escuro).

### **GRUPOS DE ESTUDO E PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

Os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=8, cada): C8, MSMA8, C60, MSMA60. Os grupos controles receberam somente água destilada e os tratados receberam 120 mg/kg/dia de Metilarsenato monossódico diluído em água - dosagem baseada no estudo de Prokop & Savage (1986).

A administração das substâncias foi realizada por gavagem (0,5 ml por animal), durante 8 (para os grupos de exposição aguda) e 60 dias consecutivos (para os grupos de exposição crônica). A alimentação (ração comercial) e água foram fornecidos *ad libitum*. Este protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais - CEUA/UFES (75/2017) (Anexo I).

## **COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS**

Vinte e quatro horas após o término de cada tratamento, os animais foram pesados e anestesiados com Xilazina e Ketamina (5 e 80 mg/Kg, respectivamente, por via intramuscular). Em seguida, foram eutanasiados e tiveram os testículos e epidídimos coletados, dissecados e pesados.

Os epidídimos direitos foram segmentados de acordo com as três principais regiões do órgão e imersos em solução fixadora de Karnovsky (4% de paraformaldeído e 4% glutaraldeído em tampão fosfato 0,1 mol<sup>L-1</sup>, pH 7,2) por 24 h. Posteriormente, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool e incluídos em resina de glicol metacrilato (Leica Historesin, Leica Microsystems Nussloch, Alemanha). Os cortes histológicos foram feitos em micrótomo rotativo (cortes semisseriados), a 3 µm, e corados com Hematoxilina e Eosina.

Os testículos e epidídimos esquerdos foram congelados (-20°C) para a determinação da quantidade de espermatozoides nestes órgãos, produção diária de espermatozoides (PDE) e tempo trânsito espermático.

## **ANÁLISES DO DUCTO EPIDIDIMÁRIO**

### ***Biometria***

O ganho de peso corporal e a massa relativa do epidídimo foram determinados, com base nas massas corporal e epididimária obtidas após a eutanásia dos animais.

### ***Estereologia e Morfometria***

As análises morfométricas e estereológicas foram feitas com o software Image ProPlus 4.5® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA), a partir de fotomicrografias do ducto epididimário das regiões da cabeça e cauda, obtidas com câmera digital acoplada ao microscópio de luz (Leica Microsystem DM500).

Na estereologia, foram estimadas as proporções volumétricas do epidídimo. Para tanto, contou-se 2660 pontos, por animal, projetados sobre 10 imagens capturadas em campos

aleatórios no aumento de 200X. Foram quantificados elementos do compartimento tubular (epitélio, túnica própria, lúmen com presença de espermatozoides e lúmen sem espermatozoides) e intertubular (músculo liso, tecido conjuntivo e vasos sanguíneos).

Na morfometria, determinou-se o diâmetro tubular, luminal e altura do epitélio epididimário médios. Para tanto, foi realizada a partir da mensuração, ao acaso, de 20 secções transversais do epidídimo que apresentaram contorno o mais circular possível no aumento de 100x. O diâmetro tubular foi obtido medindo-se da porção basal de uma célula principal à porção basal da célula principal oposta, já o diâmetro luminal foi mensurado a partir da porção apical de uma célula principal à porção apical da célula principal oposta; e a altura do epitélio epididimário foi determinada pela medida da porção basal de uma célula principal até a porção apical da mesma célula. O valor encontrado para a altura do epitélio, em cada túbulo, representou a média de quatro medidas, enquanto o diâmetro tubular e luminal foi dado pela média de duas medidas diametralmente opostas.

### ***Histopatologia***

Secções da cabeça e cauda do epidídimo foram analisadas em microscópio óptico, em diferentes aumentos, avaliando-se a organização tecidual e possíveis alterações histológicas.

## **CONTAGEM DE ESPERMÁTIDES, PRODUÇÃO DIÁRIA DE ESPERMATOZOIDES E TEMPO DE TRÂNSITO EPIDIDIMAL**

Espermátides resistentes à homogeneização no testículo esquerdo, e espermatozoides das porções cabeça/corpo e cauda do epidídimo esquerdo foram contados em câmaras de Neubauer (4 campos por animal), após homogeneização dos órgãos (homogeneizador Ultra-Turrax – Janke & Kunkel IkaWerk) em mistura de 0,9% de NaCl, 0,05% de Triton X 100, segundo método descrito previamente (ROBB et al., 1978). A produção diária de espermatozoides (PDE) foi determinada pelo cálculo do número de espermatozoides por testículo dividido por 6,1 (número de dias em que as espermátides maduras estão presentes no epitélio seminífero). Já o Tempo de Trânsito Espermático na cabeça/corpo ou cauda do epidídimo foi estimado pelo cálculo de divisão entre número de espermatozoides, em cada porção, pela PDE. Estas metodologias foram realizadas de acordo com técnicas descritas por KEMPINAS et al. (1998).

## **MORFOLOGIA ESPERMÁTICA**

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

## **ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

As médias obtidas a partir das análises foram verificadas quanto à normalidade, utilizando-se o software BioEstat 5.0. Após verificação, dados paramétricos foram avaliados estatisticamente por ANOVA seguido de Tukey e, não-paramétricos, por Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney, a 5% de significância.

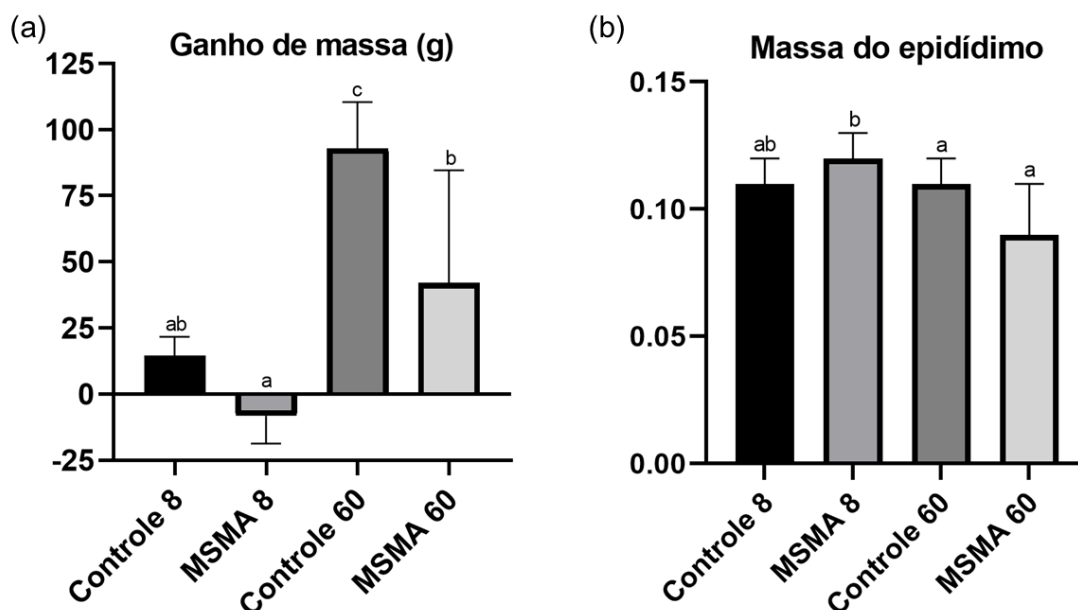
Para avaliar a diversidade entre os tratamentos existentes e identificar padrões de similaridade entre as variáveis, realizou-se uma análise de componentes principais (PCA). As variáveis foram centralizadas e escaladas antes da análise em si. Com o objetivo de explorar as possíveis relações entre as variáveis, foram realizadas correlações lineares exploratórias (Pearson) como sugerido por Borcard et al. (2011). A análise de componentes principais e gráficos foram realizadas com o Software R (RStudio versão 4.0.2, 2020), usando os pacotes car, ggplot, factoextra, corrplot, scales, vegan, ggvega, FactorMineR e BBmisc.

## **RESULTADOS**

### **BIOMETRIA**

O grupo tratado com MSMA por 60 dias apresentou menor ganho de massa corporal em relação ao seu controle ( $p < 0,05$ ). Embora os animais tratados por 8 dias tenham perdido massa corporal durante o período experimental, não houve diferença neste parâmetro ao se comparar com os animais controle ( $p > 0,05$ ). Entre os dois grupos tratados, o agudo mostrou-se significativamente menor que o crônico quanto a massa corporal (Figura 3).

A massa do epidídimo não variou entre animais tratados e seus respectivos controles ( $p > 0,05$ ). Entretanto, os animais expostos ao MSMA por 60 dias (tratamento crônico) apresentaram a massa relativa do epidídimo menor em relação aos animais expostos ao MSMA por 8 dias (tratamento agudo) ( $p < 0,05$ ) (Figura 3).



**Figura 3.** Biometria de ratos Wistar tratados com MSMA e seus respectivos controles. (a) Ganho de massa corporal. (b) Massa relativa do epidídimo. Valores são média  $\pm$  desvio-padrão. Letras diferentes entre colunas indicam significância de  $p < 0,05$ .

### ESTEREOLOGIA

As análises estereológicas do compartimento tubular da cabeça do epidídimo (Tabela 1) indicaram aumento significativo na proporção volumétrica do epitélio dos ratos tratados com MSMA por 60 dias em relação ao seu controle. Além disso, esse efeito foi tempo-dependente, uma vez que os ratos tratados de maneira crônica apresentaram valores estatisticamente maiores ( $p < 0,05$ ) que os tratados de maneira aguda. Não foram observadas alterações na túnica própria.

Ainda no compartimento tubular, notou-se redução significativa na proporção de lúmen com espermatozoides no grupo MSMA60 em relação ao seu controle. Além disso, observou-se também diminuição tempo-dependente expressiva ( $p < 0,05$ ) neste mesmo parâmetro, já que no grupo MSMA60 diminuiu significativamente a proporção de lúmen com espermatozoides em comparação ao grupo MSMA8. De maneira complementar, a proporção de lúmen sem espermatozoides teve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos ratos com tratamento crônico. Além disso, foi observado aumento tempo-dependente neste parâmetro entre os grupos tratados.

No compartimento intertubular da cabeça do epidídimo (Tabela 1) não foram encontradas diferenças significativas na proporção de músculo liso e conjuntivo entre os grupos tratados e seus respectivos controles e entre os grupos MSMA. Contudo, a proporção volumétrica de vasos sanguíneos aumentou ( $p < 0,05$ ) no grupo tratado com MSMA por 60 dias em relação ao grupo tratado por 8 dias.

**Tabela 1.** Proporção volumétrica (%) dos componentes da cabeça do epidídimo de ratos Wistar tratados com Metilarsenato Monossódico por 8 e 60 dias (Média  $\pm$  desvio padrão).

Parâmetro (%)	Grupo			
	Controle 8	MSMA 8	Controle 60	MSMA 60
<b>Epitélio</b>	21,28 $\pm$ 3,57 <sup>ab</sup>	19,59 $\pm$ 1,13 <sup>a</sup>	25,91 $\pm$ 4,82 <sup>b</sup>	31,98 $\pm$ 4,55 <sup>c</sup>
<b>Túnica própria</b>	0,95 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	0,74 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	1,17 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>	1,01 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>
<b>Lúmen com SPTZ</b>	59,79 $\pm$ 6,70 <sup>b</sup>	60,41 $\pm$ 8,49 <sup>b</sup>	46,69 $\pm$ 14,13 <sup>b</sup>	27,66 $\pm$ 19,16 <sup>a</sup>
<b>Lúmen sem SPTZ</b>	3,10 $\pm$ 2,03 <sup>ab</sup>	2,27 $\pm$ 1,34 <sup>a</sup>	1,94 $\pm$ 1,72 <sup>a</sup>	13,37 $\pm$ 15,05 <sup>b</sup>
<b>Músculo liso</b>	5,69 $\pm$ 1,53 <sup>a</sup>	5,88 $\pm$ 1,63 <sup>ab</sup>	8,25 $\pm$ 2,35 <sup>c</sup>	8,01 $\pm$ 1,13 <sup>bc</sup>
<b>Conjuntivo</b>	8,74 $\pm$ 3,41 <sup>a</sup>	10,78 $\pm$ 5,08 <sup>a</sup>	14,67 $\pm$ 8,11 <sup>a</sup>	15,00 $\pm$ 6,04 <sup>a</sup>
<b>Vasos sanguíneos</b>	0,39 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	0,31 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	1,37 $\pm$ 0,78 <sup>b</sup>	1,71 $\pm$ 0,94 <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma linha indicam significância de  $p < 0,05$ . SPTZ = espermatozoides.

A estereologia dos componentes da cauda do epidídimo (Tabela 2) não apontou alterações na proporção do epitélio entre os diferentes grupos, entretanto a proporção de túnica própria dos ratos tratados com MSMA por 60 dias reduziu ( $p < 0,05$ ) ao se comparar com o tratamento agudo. A proporção de lúmen com espermatozoides nos ductos da cauda do epidídimo reduziu ( $p < 0,05$ ) no MSMA60 em relação ao MSMA8. Consequentemente houve aumento de ductos com lúmen sem espermatozoides no grupo que recebeu tratamento crônico em relação ao grupo com tratamento agudo ( $p < 0,05$ ).

Quanto aos componentes intertubulares da cauda do epidídimo, não foram observadas variações significativas nas proporções volumétricas de músculo liso entre os diferentes grupos experimentais. No entanto, houve aumento de tecido conjuntivo nos ratos tratados com MSMA por 60 dias em relação ao controle e ao grupo tratado por 8 dias ( $p < 0,05$ ). A proporção de vasos sanguíneos aumentou significativamente no grupo tratado com MSMA 60 dias em comparação a todos os grupos.

**Tabela 2.** Proporção volumétrica (%) dos componentes da cauda do epidídimo de ratos Wistar tratados com Metilarsenato Monossódico por 8 e 60 dias (Média  $\pm$  desvio padrão).

Parâmetro (%)	Grupo			
	Controle 8	MSMA 8	Controle 60	MSMA 60
<b>Epitélio</b>	10,76 $\pm$ 1,69 <sup>a</sup>	11,26 $\pm$ 1,54 <sup>a</sup>	11,31 $\pm$ 3,77 <sup>a</sup>	11,97 $\pm$ 3,98 <sup>a</sup>
<b>Túnica própria</b>	1,13 $\pm$ 0,24 <sup>bc</sup>	1,27 $\pm$ 0,41 <sup>c</sup>	0,60 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	0,79 $\pm$ 0,23 <sup>ab</sup>
<b>Lúmen com SPTZ</b>	68,05 $\pm$ 2,99 <sup>b</sup>	69,56 $\pm$ 2,22 <sup>b</sup>	68,08 $\pm$ 3,86 <sup>ab</sup>	55,66 $\pm$ 16,24 <sup>a</sup>
<b>Lúmen sem SPTZ</b>	0,23 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	0,02 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,81 $\pm$ 1,02 <sup>b</sup>	5,35 $\pm$ 9,56 <sup>b</sup>
<b>Músculo liso</b>	8,44 $\pm$ 1,32 <sup>a</sup>	8,85 $\pm$ 1,20 <sup>ab</sup>	9,37 $\pm$ 1,05 <sup>ab</sup>	10,76 $\pm$ 2,15 <sup>b</sup>
<b>Conjuntivo</b>	10,80 $\pm$ 1,23 <sup>ab</sup>	8,67 $\pm$ 1,67 <sup>a</sup>	9,16 $\pm$ 2,87 <sup>a</sup>	14,33 $\pm$ 5,57 <sup>b</sup>
<b>Vasos sanguíneos</b>	0,49 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	0,34 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	0,67 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	1,15 $\pm$ 0,37 <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma linha indicam significância de  $p < 0,05$ . SPTZ = espermatozoides.

## MORFOMETRIA

As análises morfométricas são apresentadas na Tabela 3. Observou-se na região da cabeça do epidídimo diminuição significativa no diâmetro tubular e luminal dos ratos tratados com MSMA durante 60 dias em relação aos tratados por 8 dias. Além disso, a altura de epitélio do grupo tratado por 60 dias reduziu em relação ao seu controle, e aumentou em relação aos ratos tratados por 8 dias ( $p < 0,05$ ).

Por outro lado, na região da cauda do epidídimo foi observado um aumento significativo no diâmetro tubular dos ratos do grupo que receberam tratamento crônico em relação aos do grupo agudo e a altura epitelial aumentou ( $p < 0,05$ ) no MSMA60 quando se compara com o MSMA8.

**Tabela 3.** Morfometria do epidídimo de ratos Wistar tratados com tratados com Metilarsenato Monossódico durante 8 e 60 dias (Média  $\pm$  desvio padrão).

Parâmetro	Grupos			
	Controle 8	MSMA 8	Controle 60	MSMA 60
<i>Cabeça do epidídimo</i>				
Diâmetro de Túbulo ( $\mu\text{m}$ )	304,38 $\pm$ 30,91 <sup>b</sup>	278,69 $\pm$ 33,69 <sup>b</sup>	185,75 $\pm$ 31,94 <sup>a</sup>	222,27 $\pm$ 59,40 <sup>a</sup>
Diâmetro de Lúmen ( $\mu\text{m}$ )	265,79 $\pm$ 32,79 <sup>b</sup>	238,20 $\pm$ 33,04 <sup>b</sup>	117,18 $\pm$ 33,91 <sup>a</sup>	161,95 $\pm$ 62,25 <sup>a</sup>
Altura de Epitélio ( $\mu\text{m}$ )	19,75 $\pm$ 1,44 <sup>a</sup>	20,27 $\pm$ 1,55 <sup>a</sup>	34,15 $\pm$ 2,53 <sup>c</sup>	30,03 $\pm$ 3,82 <sup>b</sup>
<i>Cauda do epidídimo</i>				
Diâmetro de Túbulo ( $\mu\text{m}$ )	391,64 $\pm$ 18,46 <sup>a</sup>	388,24 $\pm$ 21,35 <sup>a</sup>	469,90 $\pm$ 96,94 <sup>ab</sup>	409,39 $\pm$ 42,67 <sup>a</sup>
Diâmetro de Lúmen ( $\mu\text{m}$ )	359,28 $\pm$ 20,59 <sup>a</sup>	355,07 $\pm$ 22,11 <sup>a</sup>	432,73 $\pm$ 103,63 <sup>a</sup>	369,07 $\pm$ 46,34 <sup>a</sup>
Altura de Epitélio ( $\mu\text{m}$ )	16,05 $\pm$ 1,37 <sup>a</sup>	16,35 $\pm$ 1,08 <sup>a</sup>	18,94 $\pm$ 2,77 <sup>b</sup>	20,10 $\pm$ 2,17 <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma linha indicam significância de  $p < 0,05$ .

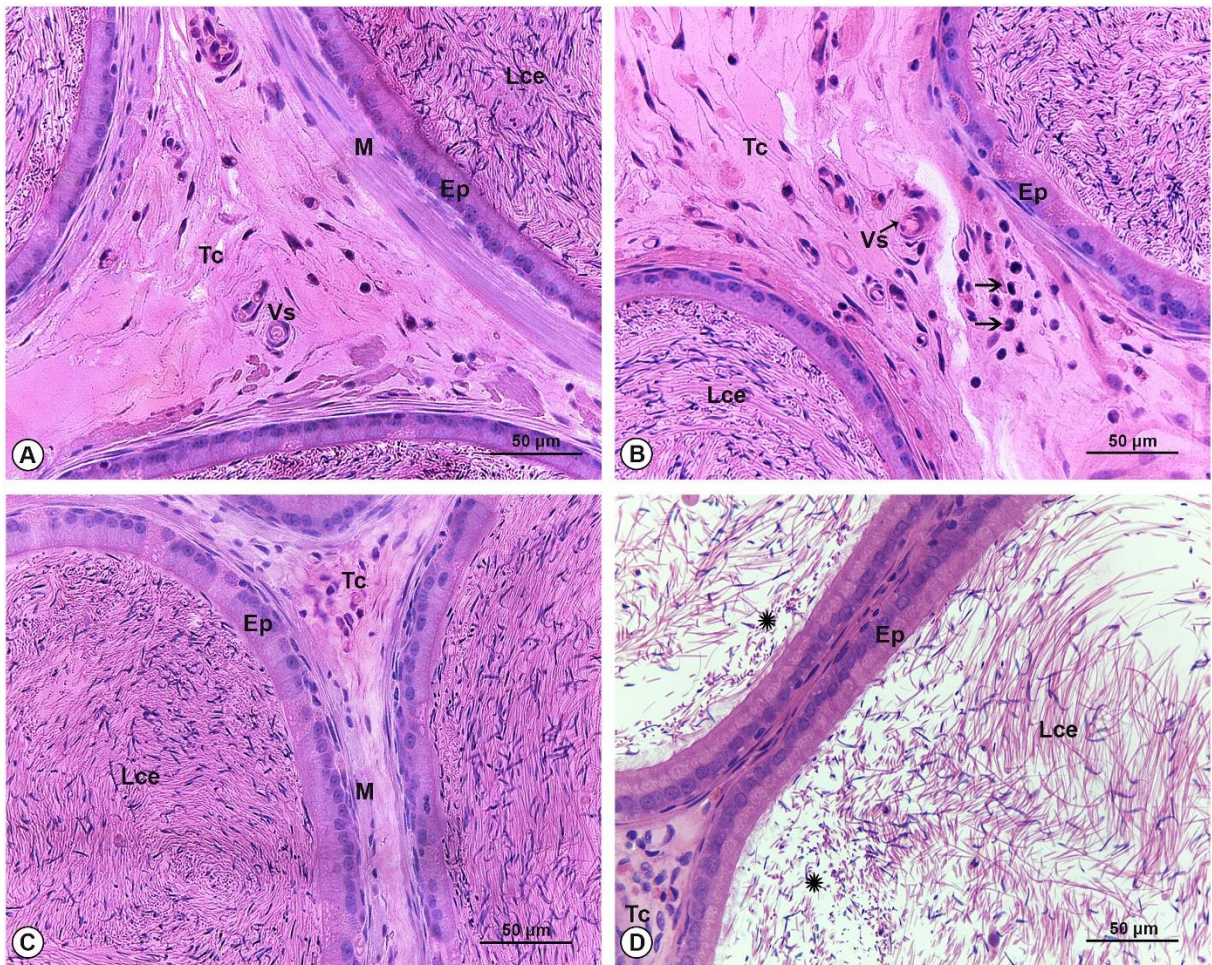
## HISTOPATOLOGIA

A análise histológica do ducto epididimário dos ratos tratados durante 8 dias com MSMA mostrou algumas alterações teciduais. No compartimento intertubular da cabeça e cauda do epidídimo, músculo liso, tecido conjuntivo e vasos sanguíneos, no geral, apresentaram-se semelhantes ao grupo controle. Entretanto, na região da cauda do epidídimo, observou-se aumento na quantidade de células de defesa no tecido conjuntivo (Figura 4 A e B).

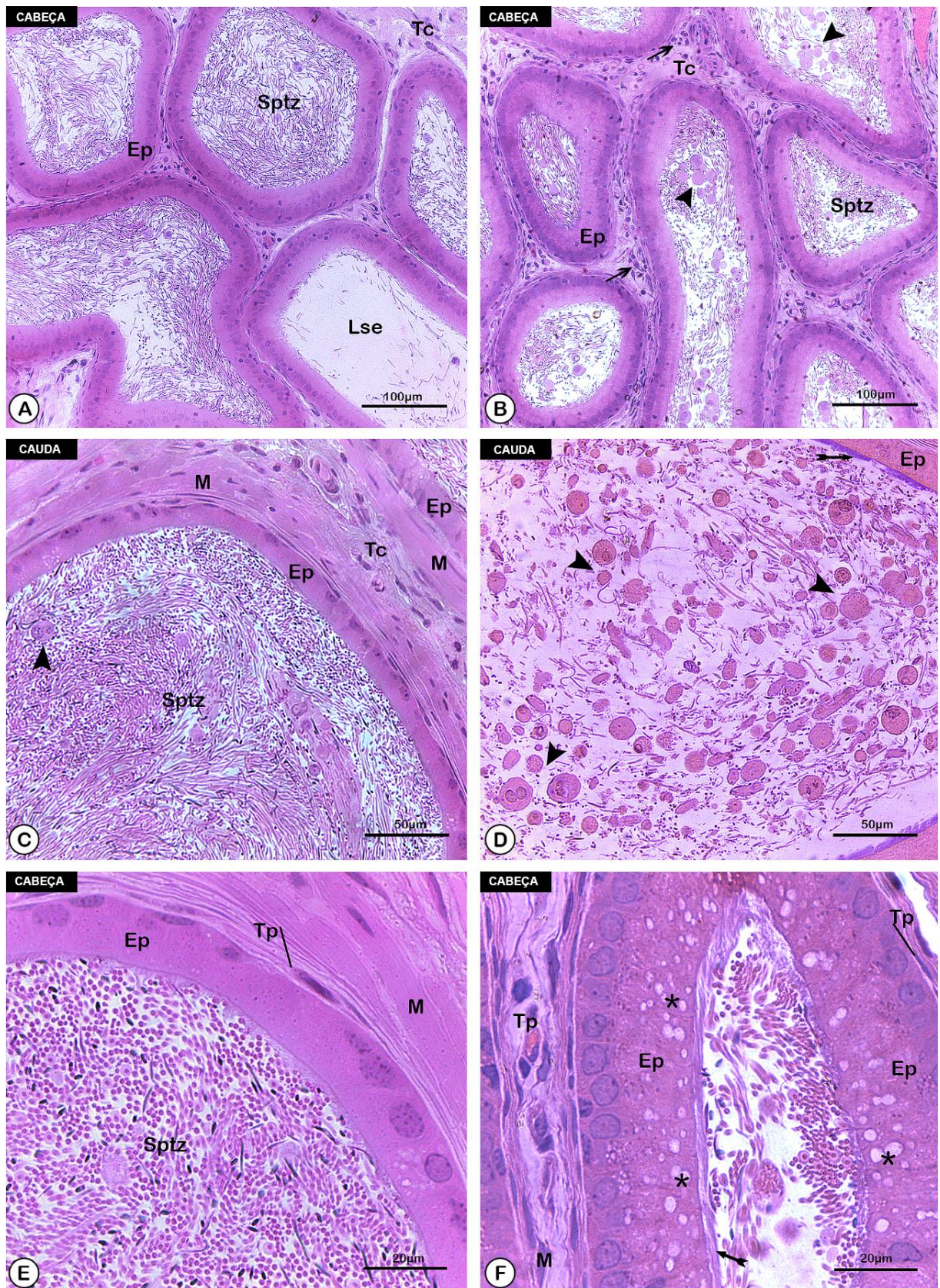
No compartimento tubular de todas as regiões do órgão, túnica e epitélio se mostraram íntegros em ambos os grupos. No entanto, no lúmen dos ductos da cauda do epidídimo dos ratos expostos ao MSMA de maneira aguda, verificou-se maior presença de espermatozoides anormais (Figura 4 – C e D).

Em relação ao epidídimo dos ratos tratados com MSMA por 60 dias, também foi observado aumento de células de defesa no compartimento intertubular (Figura 5 A e B). No compartimento tubular, a região da cabeça do epidídimo dos ratos tratados com MSMA

apresentou vacuolizações no epitélio (Figura 5F). Na região da cauda, observou-se acúmulo de detritos celulares no lúmen e redução da quantidade de espermatozoides, bem como maior presença de espermatozoides anormais (Figura 5 C e D).



**Figura 4.** Fotomicrografia de secções transversais da cabeça (A, B) e cauda (C, D) do epidídimo de Ratos Wistar controle (A, C) e tratados com MSMA (B, D) durante 8 dias. Ep – Epitélio epididimário; Lce – Lúmen com espermatozoides; Tc – Tecido conjuntivo; M – Tecido muscular; Vs – Vaso sanguíneo; \* – Espermatozoides anormais; Seta – Células de defesa. Coloração HE.



**Figura 5.** Fotomicrografia do epidídimo de ratos Wistar tratados com MSMA durante 60 dias. A, E - Cabeça do epidídimo Controle; B, F - Cabeça do epidídimo MSMA; C - Cauda do epidídimo Controle; D - Cauda do epidídimo MSMA. Sptz: espermatozoides; Lse: Lúmen sem espermatozoides; Ep: Epitélio epididimário; Tc: Tecido Conjuntivo; M: Músculo liso; Tp: Túnica própria; flecha: esterocílios; →: aumento de células de defesa; ►: detritos celulares no lúmen; \*: vacuolizações. Coloração HE.

## CONTAGEM DE ESPERMÁTIDES, PRODUÇÃO DIÁRIA DE ESPERMATOZOIDES E TEMPO DE TRÂNSITO EPIDIDIMAL

O número de espermátides maduras no testículo e por grama de órgão, bem como a produção espermática diária (PDE) foram reduzidos ( $p < 0,05$ ) no grupo tratado com MSMA durante 60 dias em relação ao grupo tratado por 8 dias (Tabela 4), embora os grupos tratados não tenham variado com seus respectivos controles.

O número de espermatozoides na cabeça/corpo do epidídimo e por grama destas regiões reduziu significativamente no grupo MSMA60 em relação ao seu controle e ao MSMA8. O tempo de trânsito espermático nesta região não sofreu alterações significativas entre os grupos (Tabela 4).

Na região da cauda do epidídimo, o número de espermatozoides no órgão e por grama de órgão e o tempo de trânsito espermático reduziram significativamente nos animais expostos ao MSMA por 60 dias em relação ao seu controle (Tabela 4). O tratamento agudo com MSMA não alterou esses parâmetros ( $p > 0,05$ ).

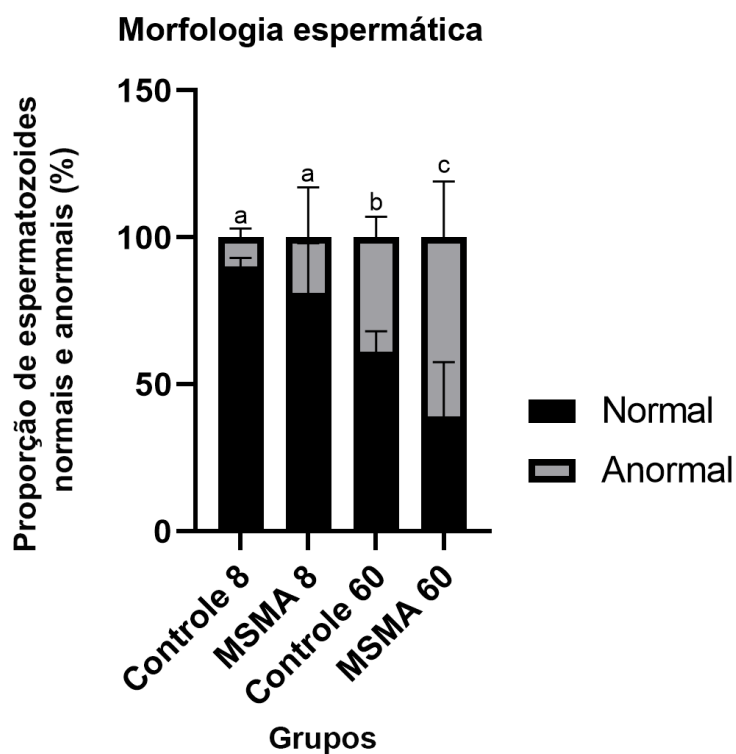
**Tabela 4.** Contagem de espermátides no testículo e espermatozoides das porções cabeça/corpo e cauda do epidídimo, produção diária de espermatozoides (PDE) e tempo de trânsito epididimal de ratos Wistar tratados com MSMA durante 8 e 60 dias (Média  $\pm$  desvio padrão).

Parâmetro	Grupos			
	Controle 8	MSMA 8	Controle 60	MSMA 60
Nº de espermátides ( $\times 10^6$ /testículo)	74,15 $\pm$ 17,60 <sup>b</sup>	83,70 $\pm$ 29,85 <sup>b</sup>	66,46 $\pm$ 15,09 <sup>ab</sup>	44,37 $\pm$ 10,79 <sup>a</sup>
Nº de espermátides ( $\times 10^6$ /g testículo)	88,46 $\pm$ 22,28 <sup>b</sup>	90,35 $\pm$ 38,91 <sup>b</sup>	67,05 $\pm$ 24,30 <sup>ab</sup>	55,95 $\pm$ 16,10 <sup>a</sup>
PDE ( $\times 10^6$ /testículo/dia)	12,16 $\pm$ 2,88 <sup>b</sup>	13,72 $\pm$ 4,89 <sup>b</sup>	10,90 $\pm$ 2,47 <sup>ab</sup>	7,27 $\pm$ 1,77 <sup>a</sup>
Nº de sptz na cabeça/corpo do epidídimo ( $\times 10^6$ /epidídimo)	52,49 $\pm$ 12,88 <sup>b</sup>	55,88 $\pm$ 13,52 <sup>b</sup>	56,94 $\pm$ 10,96 <sup>b</sup>	29,40 $\pm$ 8,24 <sup>a</sup>
Nº de sptz na cabeça/corpo do epidídimo ( $\times 10^6$ /g órgão)	235,21 $\pm$ 55,71 <sup>b</sup>	215,00 $\pm$ 54,32 <sup>b</sup>	227,50 $\pm$ 37,38 <sup>b</sup>	131,25 $\pm$ 31,41 <sup>a</sup>
Trânsito espermático na cabeça do epidídimo (dias)	4,42 $\pm$ 1,14 <sup>a</sup>	5,20 $\pm$ 4,07 <sup>a</sup>	5,34 $\pm$ 1,04 <sup>a</sup>	4,15 $\pm$ 2,07 <sup>a</sup>
Nº de sptz na cauda do epidídimo ( $\times 10^6$ /g epidídimo)	78,99 $\pm$ 22,26 <sup>a</sup>	98,54 $\pm$ 45,80 <sup>a</sup>	151,58 $\pm$ 38,20 <sup>b</sup>	71,06 $\pm$ 29,99 <sup>a</sup>
Nº de sptz na cauda do epidídimo ( $\times 10^6$ /g órgão)	417,92 $\pm$ 101,51 <sup>a</sup>	489,06 $\pm$ 194,94 <sup>ab</sup>	626,87 $\pm$ 116,75 <sup>b</sup>	376,25 $\pm$ 104,67 <sup>a</sup>
Trânsito espermático na cauda do epidídimo (dias)	6,75 $\pm$ 2,47 <sup>a</sup>	7,54 $\pm$ 3,13 <sup>a</sup>	14,12 $\pm$ 3,17 <sup>b</sup>	9,14 $\pm$ 2,69 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma linha indicam significância de  $p < 0,05$ . PDE = Produção Diária de Espermatozoides. Sptz = espermatozoides.

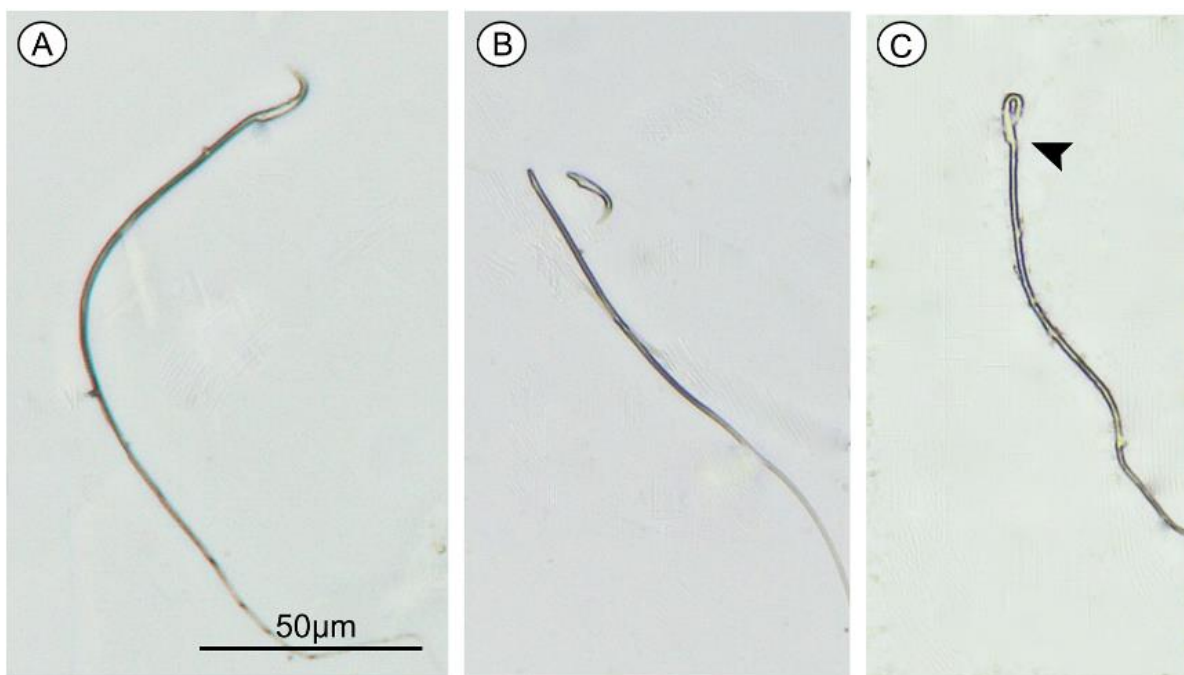
## MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

Os animais que receberam tratamento crônico com MSMA apresentaram maior proporção ( $p < 0,05$ ) de espermatozoides anormais em relação ao seu grupo controle e ao grupo que recebeu tratamento agudo (Figura 6).



**Figura 6.** Proporção de espermatozoides normais e anormais (%) presentes no ducto deferente de ratos Wistar tratados MSMA. Letras diferentes entre colunas indicam significância de  $p < 0,05$ .

Os espermatozoides anormais foram subdivididos em três categorias: espermatozoide com cabeça normal separada do flagelo; gancho em diferente ângulo e flagelo enrolado (Figura 7). Os animais tratados com MSMA por 60 dias apresentaram aumento significativo na proporção de espermatozoides com cabeça normal separada do flagelo em relação ao seu controle e aos animais tratados por 8 dias (Tabela 5).



**Figura 7.** Morfologia dos espermatozoides anormais presentes no ducto deferente de ratos Wistar tratados com MSMA. A – Espermatozoide normal; B – Espermatozoide com cabeça normal separada do flagelo; C – Espermatozoide com gancho em diferente ângulo.

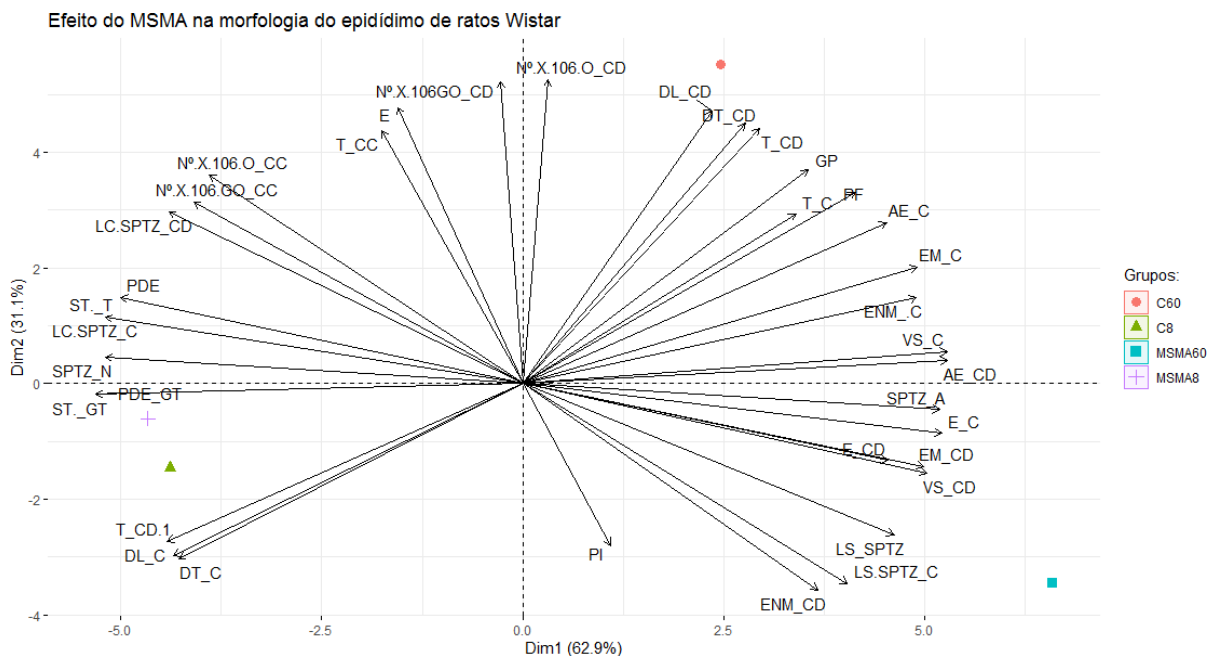
**Tabela 5.** Anormalidades encontradas nos espermatozoides de ratos Wistar tratados com MSMA durante 8 e 60 dias. (Média  $\pm$  desvio padrão).

Anormalidades	Grupos			
	Controle 8	MSMA 8	Controle 60	MSMA 60
<b>Cabeça normal separada do flagelo</b>	18,00 $\pm$ 6,26 <sup>a</sup>	37,25 $\pm$ 32,55 <sup>a</sup>	77,37 $\pm$ 13,67 <sup>b</sup>	120,87 $\pm$ 37,30 <sup>c</sup>
<b>Gancho em diferente ângulo</b>	1,17 $\pm$ 1,94	0,75 $\pm$ 0,89	0,00	0,37 $\pm$ 1,06
<b>Flagelo enrolado</b>	0,67 $\pm$ 0,81	0,50 $\pm$ 0,93	0,00	0,00

Letras diferentes na mesma linha indicam significância de  $p < 0,05$ .

## ANÁLISE MULTIVARIADA DOS PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS E ESTEREOLÓGICOS DO EPIDÍDIMO

Ao se observar o *biplot* da análise de componentes principais (PCA), nota-se que os parâmetros epididimários de ratos Wistar submetidos ao tratamento com MSMA explicaram 94% da variabilidade dos dados nas duas dimensões do gráfico (Figura 8).

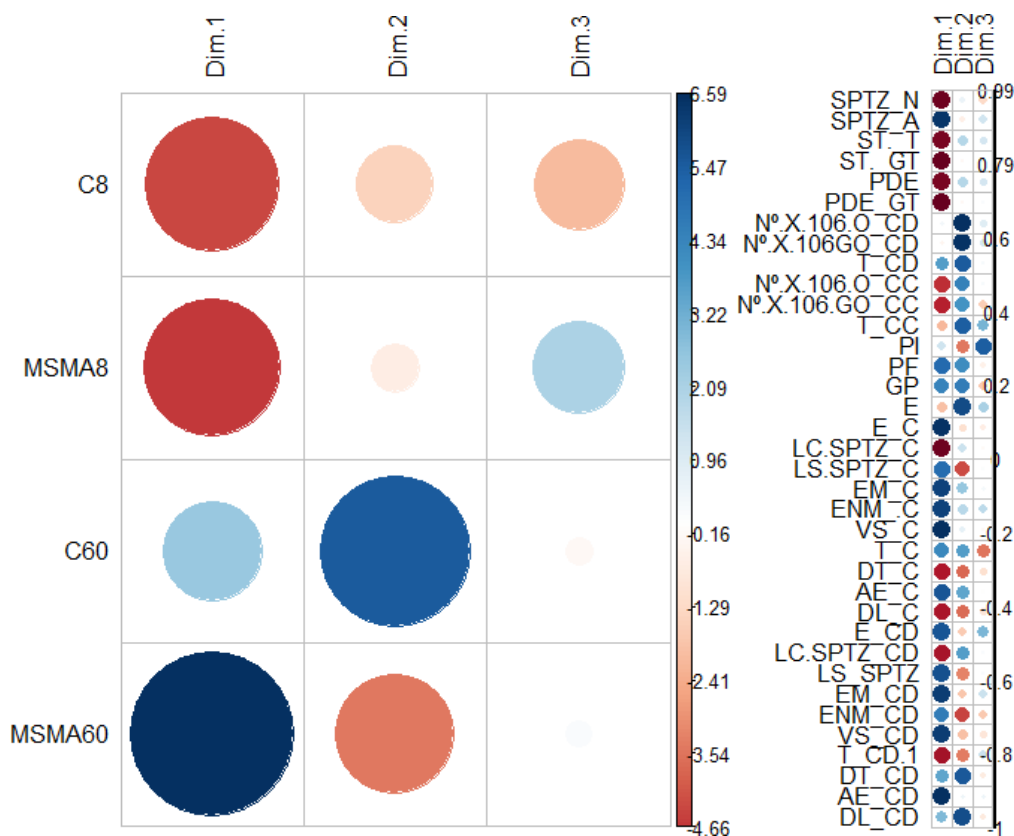


**Figura 8.** Análise dos componentes principais com base no conjunto de dados do estudo de animais controle e tratados com MSMA por 8 e 60 dias. PI= peso inicial; PF= peso final; GP= ganho de peso; E= massa do epidídimo; E\_C= propor. volum. epitélio cabeça; E\_CD = propor. volum. epitélio cauda; LC.SPTZ\_C= propor. volum. de lúmen com espermatozoides na cabeça; LC SPTZ\_CD= propor. volum. de lúmen com espermatozoides na cauda; LS.SPTZ\_C= propor. volum. de lúmen sem espermatozoides na cabeça; LS.SPTZ\_CD= propor. volum. de lúmen sem espermatozoides na cauda; EM\_C= propor. volum. de estroma muscular na cabeça; EM\_CD= propor. volum. de estroma muscular na cauda; ENM\_C = propor. volum. de estroma não muscular na cabeça; ENM\_CD = propor. volum. de estroma não muscular na cauda; VS\_C= propor. volum. de vaso sanguíneo na cabeça; VS\_CD= propor. volum. de vaso sanguíneo na cauda; T\_C = propor. volum. de túnica na cabeça; T\_CD = propor. volum. de túnica na cauda; DT\_C= diâmetro de túbulo na cabeça; DT\_CD= diâmetro de túbulo na cauda; AE\_C = altura de epitélio na cabeça; AE\_CD= altura de epitélio na cauda; DL\_C= diâmetro de lúmen na cabeça; DL\_CD= diâmetro de lúmen na cauda. SPTZ\_N= espermatozoide normal; SPTZ\_A= espermatozoide anormal; ST\_T= espermátide no testículo; ST\_GT= espermátide g/ testículo; N°x10<sup>6</sup>O\_CD= espermatozoides na cauda; N°x10<sup>6</sup>GO\_CD= espermatozoides g/ cauda; N°x10<sup>6</sup>O\_CC= espermatozoides cabeça/corpo; N°x10<sup>6</sup>GO\_CC= espermatozoides g/ cabeça/corpo; T\_CD= trânsito espermático na cauda; T\_CC= trânsito espermático na cabeça/corpo; PDE= produção diária de espermatozoides; PDE\_GT= produção diária de espermatozoides g/ testículo.

As variáveis explicativas do componente principal 1 (PC1) sumarizam 62,9% dos dados no grupo tratado por 60 dias (MSMA 60). As proporções volumétricas de epitélio (E\_C e E\_CD), estroma muscular (=músculo liso, EM\_C e EM\_CD) e vaso sanguíneo (VS\_C e VS\_CD) na cabeça e cauda; a altura do epitélio das duas regiões do órgão (AE\_C e AE\_CD); a proporção volumétrica de estroma não muscular na cabeça (= conjuntivo, ENM\_C); e a quantidade de espermatozoides anormais (SPTZ\_A), correlacionaram positivamente no grupo tratado por 60 dias. Já a proporção volumétrica de túnica na cauda (T\_CD) e de lúmen com espermatozoides na cabeça (LCSPTZ\_C); a PDE e a PDE por grama de testículo (PDE e PDE\_GT), a quantidade de espermátides no testículo e por grama (ST\_T e ST\_GT) e a

proporção de espermatozoides normais (SPTZ\_N), correlacionaram de forma negativa no grupo MSMA de 60 dias (Figuras 8 e 9).

Para o componente principal 2 (PC2), as variáveis explicativas resumiram 31,1% da variabilidade dos dados no grupo Controle 60 e MSMA 60. Os parâmetros diâmetro de túbulo (DT\_CD) e de lúmen (DL\_CD) da cauda, a quantidade de espermatozoides na cauda e por grama desta região (Nº.X.106.O\_CD, Nº.X.106.GO\_CD); o tempo de trânsito espermático na cabeça/corpo e na cauda (T\_CC e T\_CD), o ganho de peso (GP), o peso final (PF) e a massa relativa do epidídimo (E) obtiveram relação positiva no grupo controle 60. Já a proporção volumétrica de estroma não muscular da cauda (ENM\_CD) e de lúmen sem espermatozoides na cabeça (LS.SPTZ\_C); e a quantidade de espermatozoides da cabeça/corpo e por grama dessas regiões (Nº.X.106.O\_CC e Nº.X.106.GO\_CC) obtiveram relação negativa no grupo (Figura 8 e 9).



**Figura 9.** Gráfico de correlação. À esquerda, contribuição por grupo. À direita, contribuição por parâmetro (Círculos maiores e com cores mais intensas indicam forte correlação entre os grupos e variáveis, sendo o vermelho correlação negativa e o azul correlação positiva).

## DISCUSSÃO

Estudos recentes com testículo e próstata (Leite, 2018; Víctor-Carvalho et al., 2021) têm demonstrado o potencial tóxico do Metilarsenato monossódico. Contudo, dados do efeito deste herbicida ainda são escassos, sobretudo para o epidídimo. Os resultados deste trabalho indicam

que o MSMA altera os parâmetros espermáticos e a morfologia epididimária e que seus efeitos são mais expressivos na exposição crônica do que na aguda.

A administração oral de MSMA reduziu ganho de massa corporal e, conseqüentemente, a massa corporal final nos ratos tratados por 8 e 60 dias. Prukop e Savage (1986), em seu estudo pioneiro utilizando o mesmo herbicida, também descreveram redução de ganho de massa e relataram que, quanto maior a dose utilizada dessa substância, menor o ganho de massa pelos animais tratados. Nesta perspectiva e considerando que a massa corporal pode ser uma medida de toxicidade (Fernandez et al., 2008; Lamb & Foster, 2016), estes valores encontrados podem indicar o potencial tóxico e as possíveis lesões geradas por este composto a base de arsênio.

Já no epidídimo, os efeitos do MSMA se destacaram entre os diferentes tempos de exposição. Os animais que receberam o tratamento crônico apresentaram a massa relativa do epidídimo menor em relação aos do tratamento agudo, o que pode corroborar a hipótese do grupo de pesquisa de que os efeitos nocivos do arsênio no organismo são tempo-dependente (Silva, 2013; Altoé et al., 2016; Littike & Monteiro-Pirovani, 2020). Além disso, Predes, Diamante & Dolder (2010) também constataram redução progressiva na massa do epidídimo em ratos tratados com 1,2 mg/kg de Cádmio por 7 e 56 dias. Sabe-se que alterações no peso dos órgãos sexuais acessórios são indicadores de possíveis alterações no estado androgênico dos animais e, como a exposição a metais pesados pode afetar a biossíntese e/ou disponibilização de testosterona, a exposição por maior tempo a este herbicida pode gerar tais efeitos (Creasy, 2001; Papadopoulos, 2007).

Nos parâmetros morfológicos também foram observadas alterações nos ratos expostos ao herbicida. Na região da cabeça e cauda do epidídimo dos animais que receberam o tratamento crônico constatou-se redução na proporção de lúmen com espermatozoides e concomitante aumento na proporção de lúmen sem espermatozoides. Li e colaboradores (2012b) também observaram redução na área de lúmen com espermatozoides em epidídimo de camundongos expostos a 2 e 4 mg/L de trióxido de arsênio por 60 dias. Do mesmo modo, Ribeiro (2013) ao utilizar o metal pesado Cádmio por 56 dias (1,8 mg/Kg de peso corporal de  $ClCd_2$ ) também observou redução na proporção de lúmen sem espermatozoides em todas as regiões do epidídimo.

Esta diminuição no percentual de lúmen com espermatozoides pode estar associada a alterações na produção espermática no testículo e/ou a remoção excessiva destas células durante a passagem pelo lúmen do epidídimo. Segundo Li et al. (2012b), a redução de lúmen com espermatozoides foi decorrente da redução no número de diferentes linhagens das células

germinativas. No presente trabalho, a PDE e tempo de trânsito foram alterados nos animais tratados com MSMA e podem ter refletido na quantidade de espermatozoides no lúmen.

O aumento da proporção volumétrica de vasos na cauda do epidídimo no tratamento crônico sugere o efeito do arsênio na atividade angiogênica tecidual, uma vez que estudos *in vivo* e *in vitro* têm indicado que este metal pesado é capaz de promover o surgimento de novos vasos sanguíneos por estimular a expressão de fator de crescimento endotelial vascular (Soucy et al., 2003; Straub et al., 2007; Klei e Barchowsky, 2008; Wang et al., 2013). Estes achados corroboram Lima (2013) que descreveu aumento no percentual de vasos sanguíneos para o segmento inicial do epidídimo de ratos tratados com 0,01mg/L de arsenato de sódio e com as concentrações de 0,01 mg/L e 10 mg/L de arsenito de sódio.

Observou-se maior proporção de tecido conjuntivo na cauda do epidídimo dos animais do tratamento crônico em relação ao controle e aos animais do tratamento agudo. São escassos os estudos com epidídimo de roedores que reforcem esse tipo de alteração, contudo estudos com microscopia eletrônica de transmissão podem esclarecer quais elementos deste tecido estão aumentados. Predes, Diamante e Dolder (2010) encontraram aumento na densidade do conjuntivo dos testículos de ratos tratados com 1,2 mg/kg de cloreto de cádmio por 7 e 56 dias em observações com microscopia de varredura. Esse aumento, de acordo com as autoras, é provavelmente um edema decorrente do rompimento da camada endotelial, que permite que fluidos do sangue vão para o interstício. Neste sentido, o MSMA também pode estar gerando edema no tecido conjuntivo do epidídimo.

Nos parâmetros morfométricos, observou-se que a região da cabeça do epidídimo dos ratos tratados por 60 dias, houve redução na altura do epitélio em relação ao seu controle, embora a esterologia tenha apontado um aumento no percentual deste tecido. Apesar de parecer paradoxal, estes resultados refletem uma tendência de aumento no diâmetro tubular e luminal dos ductos dos ratos que receberam tratamento crônico em comparação ao controle. Ribeiro (2013) observou redução na altura do epitélio e aumento dos diâmetros tubular e luminal na cauda do epidídimo de ratos expostos à 1,4 mg/Kg de peso corporal de cloreto de cádmio. Com isso, a autora afirma que este resultado se deve, provavelmente, à redução da atividade das células principais do epitélio epididimário decorrente do estresse oxidativo gerado pelo metal pesado, reduzindo a reabsorção do fluido luminal, o que pode ter causado a redução do percentual de epitélio e aumento nos referidos diâmetros (Ilkes, 2004; Ribeiro, 2013). Acredita-se que fenômeno semelhante ao citado pela autora pode ter acontecido na cauda do epidídimo, explicando os valores encontrados no tratamento crônico.

Na avaliação histopatológica constatou-se aumento nas células de defesa no tecido conjuntivo, sobretudo na região da cabeça dos animais expostos ao MSMA de forma aguda. A maior quantidade de células de defesa no epidídimo dos animais tratados com MSMA corrobora os estudos do grupo de pesquisa, em que os ratos submetidos a tratamento agudo, com a mesma dose de MSMA, apresentaram aumento significativo de macrófagos no interstício testicular (Leite, 2018). De acordo com este trabalho, o aumento dessas células pode estar associado à resposta “imediate” ao estresse oxidativo induzido pelo arsênio.

A presença expressiva de vacuolizações no epitélio dos animais do tratamento crônico com MSMA pode ser explicada, segundo Robaire & Hinton (2002), como resultado de alterações degenerativas, na qual ocorre o acúmulo intracelular de fluidos, glicoproteínas, lipídios e fosfolipídios. Acredita-se que este tipo de patologia também esteja associado ao estresse oxidativo gerado pelo MSMA. Souza (2013) também descreveu vacuolizações no epitélio seminífero de ratos tratados com 10 mg/L de arsenato e arsenito durante 56 dias. Sanghamitra et al. (2008), que avaliaram a histopatologia do testículo de ratos tratados com 30 e 40 mg/L de arsenito de sódio durante 30, 45 e 60 dias, também encontraram essas alterações. Tais achados confirmam a toxicidade dos compostos a base de arsênio no epitélio epididimário.

Verificou-se a presença expressiva de células germinativas no lúmen da cauda do epidídimo dos ratos tratados com MSMA por 60 dias, alteração que pode ter sido resultado de lesões no epitélio germinativo testicular, que são causadas, por exemplo, pela diminuição androgênica gerada pela ação de agentes tóxicos (Kempinas & Klinefelter, 2014; Leite, 2019). Assim, a vasta presença de detritos luminiais nos animais expostos ao MSMA pode indicar processos degenerativos no testículo desses animais, desencadeados pelo efeito tóxico desse composto.

O número de espermátides maduras e a PDE foram reduzidos no grupo MSMA60 em relação ao grupo MSMA8, mostrando, mais uma vez, o efeito tempo-dependente deste herbicida nos parâmetros espermáticos e na morfologia do epidídimo. Lozi (2019) observou que o número de espermátides no testículo e por grama de testículo e a produção espermática diária no testículo e por grama de testículo diminuíram em ratos tratados com 1,5 mg/Kg de arsenito e arsenato de sódio. Zeng et al. (2018) apontaram redução significativa no número de espermátides de camundongos tratados com 5 ppm ( $p < 0,05$ ) e 50 ppm ( $p < 0,01$ ) de arsênio. Neste sentido, apesar das concentrações e tempo de exposição estudados não terem alterado esses parâmetros entre o grupo tratado e controle, este herbicida merece atenção, visto que diferentes dosagens de outras formas de arsênios são capazes de alterá-los.

O número de espermatozoides na cabeça e corpo do epidídimo reduziu no grupo MSMA60 em relação ao seu controle e ao grupo MSMA8 e, na região da cauda, foi observado menor número de espermatozoides nos animais expostos ao MSMA por 60 dias em relação ao seu controle. Estes resultados refletem a redução da produção diária de espermatozoides (PDE) entre o grupo crônico e agudo, bem como pode ter sido decorrente da maior remoção de espermatozoides no órgão, devido ao grande número de anormalidades.

O menor tempo de trânsito espermático causado pelo MSMA nos animais tratados por 60 dias em relação ao controle é indicativo da toxicidade deste herbicida e pode gerar defeitos aos espermatozoides, conforme a literatura (Robaire & Hinton, 2002; Garcia et al., 2012). A análise da morfologia espermática corrobora com este resultado, visto que os animais do tratamento crônico com MSMA apresentaram maior proporção de espermatozoides anormais em relação ao seu grupo controle e ao grupo que recebeu tratamento agudo.

Além de estar relacionado ao menor tempo de trânsito, Altoé et al. (2016) associa as anormalidades morfológicas nos espermatozoides às espécies reativas de oxigênio geradas pelo arsênio, sendo uma outra hipótese para o resultado provocado pelo MSMA. Sabe-se que a morfologia espermática, juntamente com a motilidade, são características importantes para a fecundação e, distúrbios nesta função podem causar danos à fertilidade (De Jonge & Barratt, 2006). Assim, as alterações na morfologia dos espermatozoides dos ratos expostos ao MSMA reiteram os efeitos deletérios deste herbicida.

Diante do exposto, pode-se inferir que a exposição oral ao herbicida Metilarsenato monossódico, sobretudo de maneira crônica, causa várias alterações nos parâmetros morfológicos do epidídimo e na sua funcionalidade, bem como altera os parâmetros espermáticos. Neste sentido, este agrotóxico pode ser uma ameaça à fertilidade masculina e deve ser tratado com mais atenção pelo órgão de registro e fiscalização nacional.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Gerência Geral de Toxicologia. Gerência de Análise Toxicológica. **Nota técnica: Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo MSMA**, 2002.
- ALTOÉ, L. S; REIS, I. B; GOMES, M. L. M; DOLDER, H; MONTEIRO-PIROVANI, J. C. Could vitamin C and zinc chloride protect the germ cells against sodium arsenite?. **Human & experimental toxicology**, v. 36, n.10, p. 1049-1058, 2016.
- BEDFORD, J. M. Components of sperm maturation in the human epididymis. **Advances in the Biosciences**, v. 10, p. 145–155, 1973.
- BORCARD, D; GILLET, F; LEGENDRE, P. **Numerical Ecology with R**. Baltimore: Springer, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Brasília: Ministério da Saúde, v. 1, 2018.
- CARVALHO, M. M. X; NODARI, E. S; NODARI, R. O. “Defensivos” ou “agrotóxicos”? História do uso e da percepção dos agrotóxicos no estado de Santa Catarina, Brasil, 1950-2002. **História, Ciências, Saúde. Rio de Janeiro**, v. 24, n. 1, p. 75-91, 2017.
- CHEN, B; ARNOLD, L. L; COHEN, S. M; THOMAS, D. J; LE, X. C. Mouse arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase genotype affects metabolism and tissue dosimetry of arsenicals after arsenite administration in drinking water. **Toxicological Sciences**, v. 124, n. 2, p. 320-326, 2011.
- CORNWALL, G. A. New insights into epididymal biology and function. **Human Reproduction Update**, v. 15, p. 213-227, 2009.
- VÍCTOR-CARVALHO, P. C; LEITE, I. B; PINTO, T. M; PIROVANI, J. C. M. **Efeitos da exposição ao Metilarsenato Monossódico (MSMA) na morfologia prostática de ratos Wistar machos**. In: FAJARDO, P. A. (Org.). O Fortalecimento Intensivo das Ciências Biológicas e suas Interface. Ponta Grossa: Atena Editora, v. 1, 1 ed, p. 62-73, 2021.
- CREASY, D.M. **Pathogenesis of male reproductive toxicity**. *Journal of Toxicologic Pathology*, v. 29, p. 64-76, 2001.
- CUI, X. & OKAYASU, R. Arsenic accumulation, elimination, and interaction with copper, zinc and manganese in liver and kidney of rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 12, p. 3646-3650, 2008.
- DE JONGE, C. J.; BARRATT, C. R. L. **The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization e Regeneration**. Cambridge University Press, p. 359, 2006.
- FAVARETO, A.P.A.; FERNANDEZ, C.D.B.; DA SILVA, D.A.F.; ANSELMOFRANCO, J.A.; KEMPINAS, W.G. Persistent impairment of testicular histology and sperm motility

- in adult rats treated with cisplatin at peripuberty. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 109, p. 85-96, 2011.
- FERNANDEZ, C. D. B; PORTO, E. M. ARENA, A. C; KEMPINAS, W. G. Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. **International Journal of Andrology**, v. 31, p. 427-437, 2008.
- GARCIA, P. V.; BARBIERI, M. F.; PEROBELLI, J. E.; CONSONNI, S. R.; MESQUITA, S. F.; KEMPINAS, W. G.; PEREIRA, L. A. Morphometric-stereological and functional epididymal alterations and a decrease in fertility in rats treated with finasteride and after a 30-day post-treatment recovery period. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 6, p.14-51, 2012.
- GOES, D. M. & CAMPOS, M. C. Uso de agrotóxicos e produção agroecológica: percepção de estudantes secundaristas de uma escola do campo. **Revista NERA**, v. 22, n. 46, p. 85-105, 2019.
- ILKES, A; SUZEN, H. S; AYDIN, A; KARAGAYA, A. The oxidative DNA base damage in testes of rats after intraperitoneal cadmium injections. **Biomaterials**, v. 17, p. 371- 377, 2004.
- KEMPINAS, W. G. et al. Rat Epididymal Sperm Quantity, Quality, and Transit Time after Guanethidine Induced Sympathectomy. **Biology of reproduction**, p. 890–896, 1998.
- KEMPINAS, W. G., KLINEFELTER, G. R. Interpreting histopathology in the epididymis. **Spermatogenesis**, v. 4, p. 1-32, 2014.
- KLEI, L. R; BARCHOWSKY, A. Positive signaling interactions between arsenic and ethanol for angiogenic gene induction in human microvascular endothelial cells. **Toxicological Sciences**, v. 102, v. 2, p. 319-327, 2008.
- LAMB, J. C. & FOSTER, P. M. D. (Ed.). *Physiology and toxicology of male reproduction*. Elsevier, 2016.
- LEITE, I. B. **O Metil Arsenato Monossódico (MSMA) pode causar danos à morfologia testicular de ratos Wistar?**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Espírito, 2018. (Dados não publicados).
- LEITE, L. C. **Avaliação do efeito terapêutico do extrato da casca de jabuticaba frente à senescência e obesidade sobre o testículo e epidídimo de camundongos (fvb)**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2019.
- LI, P; ZHONG, Y; JIANG, X; WANG, C; ZUO, Z; SHA, A. Seminal plasma metals concentration with respect to semen quality. **Biological Trace Element Research**, v. 148, n. 1, p. 1-6, 2012a.
- LI, Y; WANG, M; PIAO, F; WANG, X. Subchronic exposure to arsenic inhibits spermatogenesis and downregulates the expression of ddx3y in testis and epididymis of mice. **Toxicological Sciences**, v. 128, n. 2, p. 482-89, 2012b.
- LIMA, G. D. A. **Fertilidade e morfofisiologia epididimária de ratos wistar submetidos a ingestão de arsenato e arsenito de sódio**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2019.

- LITTIKE, A. P. A. & MONTEIRO-PIROVANI, J. C. **A exposição crônica ao MSMA pode causar danos ao epidídimo de ratos Wistar?**. In: Anais da Jornada Científica da UFES, v. 11, Vitória: PRPPG, 2020.
- LOZI, A. A. **Toxicidade comparada dos metais pesados, arsênio, cádmio, chumbo, cromo e níquel, sobre parâmetros reprodutivos de camundongos machos adultos após exposição aguda**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2019.
- OLIVA, S. U.; RINALDO, P. A.; STUMPP, T. Biologia epididimária: maturação espermática e expressão gênica. **O Mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 419-425, 2009.
- OLIVEIRA, H.; SPANÒ, M.; SANTOS, C.; PEREIRA, M. L. Adverse effects of cadmium exposure on mouse sperm. **Reproductive Toxicology**, v. 28, p. 550–555, 2009.
- PAPADOPOULOS, V. **Environmental factors that disrupt Leydig cell steroidogenesis**. In: Payne, A.H., Hardy, M.P. (Eds). *Contemporary Endocrinology. The Leydig cell in the health and disease*. New Jersey: Humana Press. p. 393-413, 2007.
- PERES, F; MOREIRA, J. C; DUBOIS, G. S. **Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema**. In: PERES, F. & MOREIRA, J. C. (orgs.). *É veneno ou é remédio? agrotóxicos, saúde e ambiente*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2003.
- PREDES, F. S; DIAMANTE, M. A. S; DOLDER, H. Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. **International Journal of Experimental Pathology**, n. 91, p. 125–131, 2010.
- PRUKOP, J. A.; SAVAGE, N. L. Some effects of multiple, sublethal doses of monosodium methanearsonate (MSMA) herbicide on hematology, growth, and reproduction of laboratory mice. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 36, n. 1, p. 337-341, 1986.
- RIBEIRO, S. P. **Efeitos do cádmio, chumbo e zinco em epidídimo de ratos Wistar**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.
- ROBAIRE, B. & HINTON, B. T. **The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, p. 558, 2002.
- ROBAIRE, B; HINTON, B.T. & ORGEBIN-CRIST, M.C. **The epididymis**. p. 1071–1148. In: PLANT, T. M. & ZELEZNIK, A. J. Editado por NEILL, J. D. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3 ed., v. 1. St Louis, MO: Elsevier Academic Press, 2006.
- ROBB, G. W.; AMANN, R. P.; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reverses of pubertal and adult rats. **Reproduction**, p. 103–107, 1978.
- SANGHAMITRA, S; HAZRA, J; UPADHYAY, S.N; SINGH, R.K; AMAL, R.C. Arsenic induced toxicity on testicular tissue of mice. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 52, p. 84-90, 2008.
- SEED, J.; CHAPIN, R. E.; CLEGG, E. D.; DOSTAL, L. A.; FOOTE, R. H.; HURTT, M. E.; KLINEFELTER, G. R.; MAKRIS, S. L.; PERREAULT, S. D.; SCHRADER, S.; SEYLER, D.; SPRANDO, R.; TREINEN, K. A.; VEERAMACHANANI, D. N. R.; WISE, L. D.

Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. **Reproductive Toxicology**, v. 10, p. 237-244, 1996.

SERODIO, P. S. **Identificação do dano causado pelo uso agrícola do ingrediente ativo Metano-arseniato ácido monossódico (MSMA): uma reavaliação toxicológica.** Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária), Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

SHUM, W. W; DA SILVA, N; BROWN, D; BRETON, S. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. **The Journal of Experimental Biology**, v. 212, p. 1753-1761, 2009.

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

SOUZY, N. V; IHNAT, M. A; KAMAT, C. D; HESS, L; POST, M. J; KLEI, L. R; CLARK, C; BARCHOWSKY, A. Arsenic stimulates angiogenesis and tumorigenesis in vivo. **Toxicological Sciences**, v. 76, n. 2, p. 271-279, 2013.

SOUZA, A. C. F. **Comparação dos efeitos da ingestão crônica de arsenito e arsenato de sódio sobre parâmetros testiculares e epididimários.** Dissertação (mestrado). Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, MG, 2013.

STRAUB, A. C; STOLZ, D. B; VIN, H; ROSS, M. A; SOUCY, N. V; KLEI, L. R; BARCHOWSKY, A. Low level arsenic promotes progressive inflammatory angiogenesis and liver blood vessel remodeling in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 222, n. 3, p. 327-36, 2007.

WANG, Z; HUMPHRIES, B; XIAO, H; JIANG, Y; YANG, C. Epithelial to mesenchymal transition in arsenic-transformed cells promotes angiogenesis through activating  $\beta$ -catenin-vascular endothelial growth factor pathway. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 271, n. 1, p. 20-29, 2013.

WATANABE, T. & HIRANO, S. Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 6, p. 969-979, 2013.

ZENG, Q; Y, H; HUANG, L; AN, Q; WANG, H. Reduced testosterone and Ddx3y expression caused by long-term exposure to arsenic and its effect on spermatogenesis in mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 2018.

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Este estudo constatou que a exposição ao MSMA é capaz de afetar o ganho de massa corporal e, em exposição crônica, reduzir também a massa do epidídimo. A intoxicação por este herbicida causou danos à morfologia epididimária em vários aspectos, como na proporção e altura do epitélio, proporção de estroma não muscular e vasos sanguíneos, dentre outros. Além disso, o MSMA está associado à diminuição do número de espermatozoides nas regiões da cauda e da cabeça do epidídimo e à maior proporção de espermatozoides anormais.

As alterações na morfologia epididimária e dos espermatozoides confirmam a periculosidade deste organoarsênico e o seu potencial tóxico à fertilidade. Nesta perspectiva, o MSMA carece de mais atenção, de mais estudos e, sobretudo, de uma nova reavaliação toxicológica.

## ANEXO I



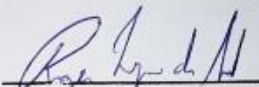
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

# CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos do MSMA na morfologia do sistema reprodutor de ratos Wistar", Protocolo nº.75/2017, sob a responsabilidade de Juliana Castro Monteiro Pirovani que envolve a produção manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata(exceto o homem), para fins de pesquisa científica(ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal(CONCEA), e foi aprovado "Ad referendum" pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS(CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde-Maruípe-Vitória-ES em 04-01-2018.

Vigência do Projeto	Início: Março/2018 Término:Dezembro/2018
Espécie/Linhagem	Ratus norvegicus albinus( linhagem <i>Wistar</i> )
Nº de Animais	Experimento Piloto:0 Protocolo Experimental:42 Total:42
Peso/Idade	Peso: 250-300g Idade:80 dias
Sexo	Macho
Origem	Mamíferos

Vitória (ES), 04 de janeiro de 2018.

  
Prof. Roger Lyrio dos Santos  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/CCS/UFES