

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDERSON TADEU DE ARAÚJO RAMOS

ASPECTOS IMUNOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E ENDÓCRINOS DA TOXICIDADE  
TESTICULAR DO ARSENITO DE SÓDIO EM RATOS

CURITIBA

2020

ANDERSON TADEU DE ARAÚJO RAMOS

ASPECTOS IMUNOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E ENDÓCRINOS DA TOXICIDADE  
TESTICULAR DO ARSENITO DE SÓDIO EM RATOS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Ramos, Anderson Tadeu de Araújo  
Aspectos imunológicos, morfológicos e endócrinos da toxicidade  
testicular do arsenito de sódio em ratos. / Anderson Tadeu de Araújo  
Ramos. – Curitiba, 2020.  
81 p.: il.

Orientador: Anderson Joel Martino Andrade

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Arsênio 2. Aparelho genital 3. Toxicologia 4. Macrófagos I.  
Título II. Andrade, Anderson Joel Martino, 1977- III. Universidade  
Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Fisiologia.

CDD (22. ed.) 571.95

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FISILOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ANDERSON TADEU DE ARAÚJO RAMOS** intitulada: **ASPECTOS IMUNOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E ENDÓCRINOS DA TOXICIDADE TESTICULAR DO ARSENITO DE SÓDIO EM RATOS.**, sob orientação do Prof. Dr. ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 07 de Abril de 2020.

Assinatura Eletrônica

07/04/2020 17:07:19.0

**ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE**

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

07/04/2020 17:08:14.0

**CIRO ALBERTO DE OLIVEIRA RIBEIRO**

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

07/04/2020 17:08:05.0

**FABÍOLA IAGHER**

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

## **AGRADECIMENTOS**

Inicialmente, eu gostaria de agradecer os meus pais Adilson Tadeu de Ramos e Rosane Leite de Araújo Ramos pelo amor, suporte e educação que me deram durante toda a minha vida. Gostaria de agradecer os meus irmãos, em especial, a minha irmã Julia de Araújo Basso, pelo apoio que talvez nem ela saiba da importância que teve.

Gostaria de agradecer a minha companheira Jyulie M. Singo pelo amor, carinho, conselhos e suporte emocional durante os momentos difíceis. Sem você, muitas coisas não teriam sido possíveis, incluindo este mestrado.

Agradeço também a meus amigos (Seven), Emerson Luis Pawoski da Silva e o meu cunhado Iann Takami Singo, pelos diálogos e por tornarem a minha vida mais leve.

Não posso deixar de agradecer também os amigos e companheiros que fiz durante o mestrado, pelo auxílio e companhia: Gustavo David Santos, Jefferson Santos, Franco Souza, Roberto (Secretário do PPG-Fisiologia), Carla Giovana Basso, Nathalia F. Camarço, Marcella Tapias Passoni e Daniele Krebs.

Agradeço a equipe do Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas, pela sua disposição, seriedade, comprometimento e capacidade em resolver conflitos.

Gostaria de agradecer a minha ex-orientadora Fabrícia de Souza Predes, por me ter feito acreditar de que a ciência era o caminho para mim. Agradeço também suas alunas pelo auxílio prestado.

Agradeço as professoras Renata (e suas alunas) e Katherine pela colaboração prestada a este estudo. Seus esforços foram fundamentais para que essa dissertação fosse possível.

Por fim, e não menos importante, gostaria de fazer um agradecimento especial ao meu orientador, Anderson Joel Martino Andrade. Obrigado por aceitar um desconhecido como teu orientado, pelos conhecimentos transmitidos, pelo exemplo dado como profissional e como ser humano!

The truth is more magical in the best and most exciting sense of the word than any myth, or made-up mystery or miracle. Science has its own magic: the magic of reality  
(Richard Dawkins, 2011).

## **NOTA EXPLICATIVA**

Esta dissertação é apresentada em formato alternativo – artigo para publicação – de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Universidade Federal do Paraná, constando de um resumo, uma revisão de literatura, objetivos do trabalho e observação indicando os participantes do trabalho, discussão estendida e conclusão em português, além do artigo científico em inglês.

## RESUMO

O sistema reprodutor masculino é responsável pela produção da testosterona e dos espermatozoides, por meio da esteroidogênese e espermatogênese, respectivamente. Estes processos podem ser perturbados pela exposição aos desreguladores endócrinos. Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, um desregulador endócrino é “um agente exógeno que interfere na produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais do corpo responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento”. Dentro desta classe de agentes químicos, encontra-se o arsênio (As). O As é um metaloide com ampla distribuição global, o qual estima-se que, só pela água, mais de 200 milhões de pessoas estejam expostas a concentrações superiores ao limiar estipulado pela OMS ( $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Uma das consequências da exposição ao As é a desregulação da função reprodutiva em machos, embora os mecanismos não estejam totalmente elucidados. Em um estudo anterior, foi sugerido que os macrófagos testiculares possam desempenhar algum papel na desregulação endócrina causada pelo As, visto que citocinas pró-inflamatórias podem inibir a síntese de andrógenos. Portanto, o objetivo desta dissertação foi avaliar os efeitos da exposição crônica ao arsenito de sódio sobre as funções esteroidogênicas e gametogênicas em ratos Wistar e examinar a possível participação da ativação de macrófagos e da resposta inflamatória nesses processos. Por meio de técnicas de ELISA, RT-QPCR e histologia, constatou-se que o As na dose de  $5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ , durante 60 dias, induziu alterações na espermatogênese. A co-exposição com LPS promoveu a diminuição da síntese de testosterona e inibiu o aumento da expressão de *Cd68*, um marcador de macrófagos pró-inflamatórios, o que pode tornar o testículo mais suscetível a infecções. Além disso, parece ter ocorrido o aumento da expressão das citocinas pró-inflamatórias *Il1b* e *Tnf*. Os nossos resultados sugerem que não houve a participação de macrófagos na toxicidade do As no testículo, embora estas células possam desempenhar algum papel importante na desregulação endócrina sob desafios imunológicos.

Palavras-chave: arsênio; sistema reprodutor masculino; toxicologia; macrófago.

## ABSTRACT

The male reproductive system is responsible for testosterone and sperm production by steroidogenesis and spermatogenesis, respectively, which can be disturbed by exposure to endocrine-disrupting chemicals. This class of chemical agents includes arsenic (As). One of the consequences due to As exposure is the deregulation of the male reproductive function, although the mechanisms are not fully understood. In a previous study, it was suggested that testicular macrophages could display a role in endocrine disruption by As exposure since pro-inflammatory cytokines can inhibit the androgen synthesis. Thus, this work aimed to evaluate the effects of chronic exposure to arsenic on steroidogenic and gametogenic function in Wistar rats and examine the possible participation of macrophage activation and inflammatory response in these processes. By ELISA, RT-QPCR and histology techniques, we have demonstrated that As on 5 mg.kg<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup> dose during 60 days induced changes in spermatogenesis. LPS and As co-exposure promoted a decrease in testosterone synthesis and inhibited the increase of *Cd68* expression, a marker for pro-inflammatory macrophages, which could turn the testis susceptible to infections. Besides, it seems to have occurred an increase of pro-inflammatory cytokines *Il1b* and *Tnf* expression. Our results suggest the non-involvement of macrophages in the As toxicity in the testis, although these cells could play an important role in endocrine disruption under immunological challenges.

Keywords: arsenic; male reproductive system; toxicology; macrophage.

## SUMÁRIO

|          |                                                                              |           |
|----------|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                      | <b>11</b> |
| 1.1      | SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO.....                                            | 11        |
| 1.1.1    | EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-TESTÍCULO E ESTEROIDOGENESE .....                   | 16        |
| 1.1.2    | TÚBULO SEMINÍFERO E BARREIRA HEMATO-TESTICULAR .....                         | 21        |
| 1.1.3    | ESPERMATOGÊNESE .....                                                        | 23        |
| 1.1.4    | MACRÓFAGOS E IMUNOLOGIA REPRODUTIVA MASCULINA.....                           | 25        |
| <b>2</b> | <b>DESREGULADORES ENDÓCRINOS .....</b>                                       | <b>29</b> |
| 2.1      | ARSÊNIO COMO DESREGULADOR ENDÓCRINO DO SISTEMA<br>REPRODUTOR MASCULINO ..... | 30        |
| 2.2      | JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....                                                | 33        |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                                                        | <b>36</b> |
| 3.1      | OBJETIVO GERAL .....                                                         | 36        |
| 3.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                                   | 36        |
| <b>4</b> | <b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>                                               | <b>38</b> |
| <b>5</b> | <b>INTRODUCTION.....</b>                                                     | <b>39</b> |
| <b>6</b> | <b>MATERIAL AND METHODS .....</b>                                            | <b>41</b> |
| 6.1      | ANIMALS .....                                                                | 41        |
| 6.2      | CHEMICALS AND EXPERIMENTAL DESIGN .....                                      | 41        |
| 6.3      | EUTHANASIA AND ORGANS SAMPLING .....                                         | 42        |
| 6.4      | GENE EXPRESSION .....                                                        | 42        |
| 6.5      | PLASMA TESTOSTERONE CONCENTRATION .....                                      | 43        |
| 6.6      | SPERM ANALYSIS .....                                                         | 44        |
| 6.7      | HISTOLOGICAL ANALYSIS.....                                                   | 44        |
| 6.8      | STATISTICAL ANALYSIS .....                                                   | 45        |
| <b>6</b> | <b>RESULTS .....</b>                                                         | <b>45</b> |
| 7.1      | WEIGHT GAIN AND FINAL BODYWEIGHT .....                                       | 45        |
| 7.2      | GENE EXPRESSION .....                                                        | 47        |
| 7.3      | PLASMA TESTOSTERONE CONCENTRATION .....                                      | 49        |
| 7.4      | SPERM ANALYSIS .....                                                         | 50        |
| 7.5      | HISTOLOGICAL ANALYSIS.....                                                   | 51        |
| <b>7</b> | <b>DISCUSSION .....</b>                                                      | <b>54</b> |
| <b>8</b> | <b>CONCLUSION .....</b>                                                      | <b>57</b> |

|           |                                  |           |
|-----------|----------------------------------|-----------|
| <b>9</b>  | <b>DISCUSSÃO ESTENDIDA .....</b> | <b>59</b> |
| <b>10</b> | <b>CONCLUSÃO .....</b>           | <b>70</b> |
|           | <b>REFERÊNCIAS .....</b>         | <b>71</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

O sistema reprodutor masculino é responsável pela produção da testosterona e dos espermatozoides, para que o animal possa se reproduzir. Nesta seção, serão apresentados os órgãos que constituem este sistema, abordando a sua estrutura e função e, os mecanismos por trás da ereção, orgasmo e ejaculação. Em seguida, será explorado como o eixo hipotálamo-hipófise regula a produção da testosterona e quais são as ações deste hormônio no corpo. Após, os túbulos seminíferos, que é o local no testículo onde os espermatozoides são produzidos, são apresentados, enfatizando a importância das células de Sertoli e da barreira hemato-testicular, que criam um microambiente para o desenvolvimento dos espermatozoides. Depois, é discutido como a espermatogênese ocorre, destacando os tipos celulares envolvidos e as transformações que as espermatídes sofrem para formar os espermatozoides. Finalmente, serão examinados os macrófagos testiculares, células de defesa extremamente importantes para a produção da testosterona e para a manutenção de um ambiente anti-inflamatório no testículo.

## 1.1 SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

O sistema reprodutor masculino consiste em um par de testículos, glândulas acessórias, ductos genitais e pênis (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Este sistema é responsável pela produção de gametas (espermatozoides), hormônios androgênicos (principalmente a testosterona) e secreções que formam o sêmen (Figura 1).

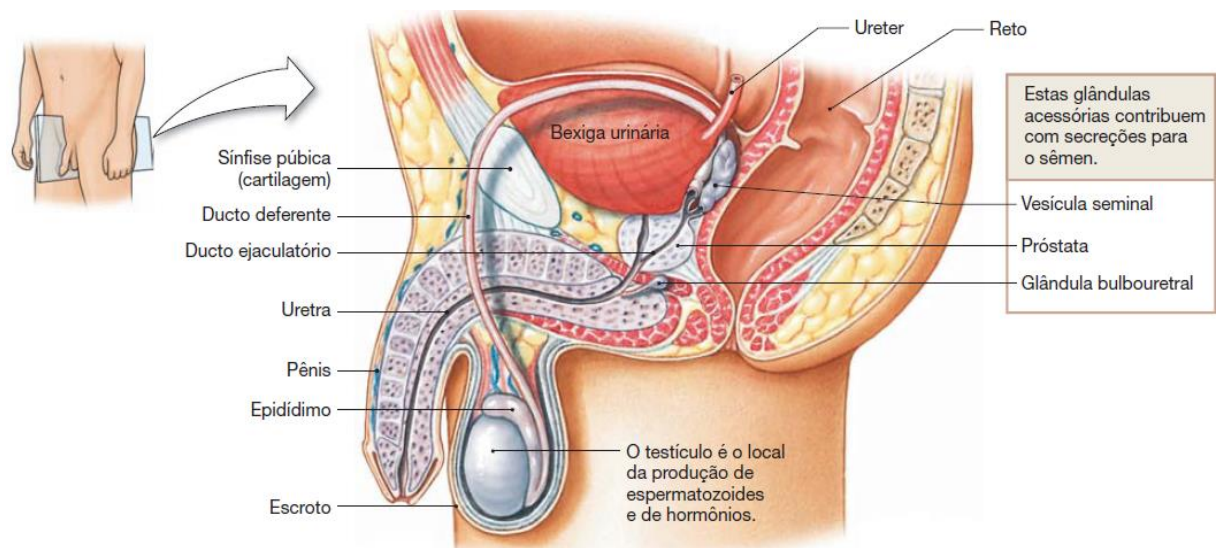


Figura 1 – Representação dos órgãos do sistema reprodutor masculino. FONTE: SILVERTHORN, 2017.

O testículo é o órgão responsável pela produção de hormônios androgênicos e espermatozoides, suspenso no escroto pelo funículo espermático. O funículo espermático origina-se no anel inguinal profundo, passa pelo canal inguinal e termina no escroto na porção posterior testicular (MOORE; PERSAUD, 2008). Cada testículo humano mede em média de 4 a 5 cm de comprimento, 2,5 a 3 cm de largura e 1,8 a 2,4 cm de espessura (FIETZ; BERGMANN, 2017). Eles são envoltos por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, chamada de túnica albugínea, que se alarga na borda posterior do testículo, numa região chamada de mediastino. Esta região origina septos fibrosos incompletos, que penetram no testículo, separando-o em cerca de 250 lóbulos. Cada lóbulo consiste de um a quatro túbulos seminíferos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Entre a túnica albugínea e o parênquima testicular, há a túnica vascular, um tecido altamente irrigado por vasos sanguíneos. No parênquima testicular, estão situados o tecido intersticial e os túbulos seminíferos.

O tecido intersticial possui as células de Leydig, responsáveis pela produção da testosterona, macrófagos, mastócitos, linfócitos, fibroblastos, vasos capilares e vasos linfáticos (RUSSELL; FRANÇA, 1995). Os túbulos seminíferos, por sua vez, possuem as células germinativas, responsáveis por dar origem aos espermatozoides, por meio do processo de espermatogênese, as células de Sertoli, responsáveis pela manutenção do *milieu* intratubular e, as células mioides peritubulares, que envolvem os túbulos seminíferos e auxiliam na movimentação do fluido luminal e dos espermatozoides por meio de contrações musculares (MAYERHOFER, 2013; FRANÇA *et al.*, 2016).

Ambas as extremidades dos túbulos seminíferos se conectam a pequenos ductos, chamados de túbulos retos ou *tubuli recti*. Estes, por sua vez, fazem uma junção entre os túbulos seminíferos e um conjunto de tubos em forma de labirinto, denominado rede testicular ou *rete testis*, presente no mediastino (MALOLINA; KULIBIN, 2017). A rede testicular é formada por um epitélio simples pavimentoso ou cúbico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Da rede testicular, partem de 6 a 15 ductos eferentes em humanos e, de 5 a 7 em ratos (JONES; JURD, 1987). Na zona proximal, os ductos eferentes estão organizados paralelamente e, conforme alcançam a zona distal, conhecida como *coni vasculosi*, um sistema ductal vai se tornando sinuoso e anastomosado. Ao final, estes ductos se abrem diretamente no ducto epididimário (KNOBIL, 2006). O epidídimo é um único ducto altamente enovelado, medindo de 4 a 6 metros de comprimento em humanos, arranjado em lóbulos. É classificado anatomicamente em três grandes segmentos: cabeça, corpo e cauda. O corpo é a região mais estreita, ao passo que a cauda é a região mais espessa, devido a uma túnica de músculo liso bem desenvolvida

(KNOBIL, 2006). Os espermatozoides chegam até o epidídimo por meio da movimentação ciliar presente no epitélio dos ductos eferentes (RIBEIRO, 2013), que respondem principalmente ao estrogênio, por ação do receptor estrogênico alfa (ER- $\alpha$ ) (COOKE *et al.*, 2017). As funções do epidídimo incluem: o armazenamento dos espermatozoides até que sejam expelidos durante a ejaculação, o transporte de espermatozoides, o desenvolvimento de motilidade e maturação espermática, por meio de absorção e secreção do fluido intratubular (RIBEIRO, 2013). O epitélio colunar pseudoestratificado do epidídimo é formado pelas células principais, células apicais, células halo, células claras, células basais, células estreitas e leucócitos intraepiteliais (BRETON *et al.*, 2016). A superfície deste epitélio é recoberta por estereocílios, uma adaptação de membranas que permite o aumento da área de contato, que atua nos processos de absorção e secreção (KNOBIL, 2006). Por fim, a região distal do epidídimo desemboca no ducto deferente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O ducto deferente é um canal não anastomosado que possui uma camada muscular lisa relativamente espessa e um lúmen estreito. Ao final de sua extensão, alarga-se formando a ampola do ducto deferente e, finalmente, funde-se ao ducto ejaculatório na vesícula seminal (MOORE; PERSAUD, 2008). Sua mucosa é arranjada em pregas longitudinais e é revestida por um epitélio pseudoestratificado com estereocílios (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

As vesículas seminais são dois tubos alongados, que medem de 5 a 10 cm de comprimento (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Situam-se entre a região posterior da bexiga e o reto (MOORE; PERSAUD, 2008). São responsáveis pela secreção de um líquido amarelado de aspecto leitoso, rico em prostaglandinas, citrato, inositol, agentes anti-oxidantes (como as enzimas superóxido dismutase e catalase), semenogelina I (responsável pela coagulação do sêmen) e frutose, que é a principal fonte energética para a motilidade dos espermatozoides. Sua secreção compõe 75% do sêmen e sua produção e liberação são dependentes de testosterona (MOORE; PERSAUD, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; STRAUSS, 2019). Possui uma mucosa pregueada, revestida por um epitélio cúbico ou pseudoestratificado prismático e, externamente, há uma camada de músculo liso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A próstata é a maior glândula acessória do sistema reprodutor masculino, medindo cerca de 3 cm de comprimento, 4 cm de largura e 2 cm de profundidade (MOORE; PERSAUD, 2008). Este órgão é constituído por um sistema de 30 a 50 glândulas tubuloalveolares que circundam a uretra prostática, local onde as secreções são liberadas (MOORE; PERSAUD, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A próstata é dividida em três grandes segmentos: zona central, zona de transição e zona periférica. O sistema tubuloalveolar é formado por células

epiteliais cuboide ou pseudoestratificadas colunares, circundado por um estroma fibromuscular. Externamente, ela é envolta por uma cápsula de músculo liso e fibras, que se ramificam e dividem a próstata em lóbulos discretos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). O fluido prostático compreende aproximadamente um terço do volume do sêmen, consistindo de altas concentrações de zinco, ácido cítrico, colina, fosfatase ácida, semenina e ativador de plasminogênio (STRAUSS, 2019).

As glândulas bulbouretrais ou glândulas de Cowper são pequenas estruturas arredondadas, com 3 a 5 mm de diâmetro que estão localizadas na região postero-lateral da uretra membranosa. Sua secreção lubrificante é liberada em pequenas aberturas na região esponjosa da uretra, no bulbo peniano, durante o ato sexual (MOORE; PERSAUD, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O pênis é a genitália externa masculina que oferece a saída comum para a urina e o sêmen (MOORE; PERSAUD, 2008). O pênis é dividido em três regiões, denominadas raiz (proximal), corpo (medial) e glande (distal). Possui três tecidos cilíndricos eréteis: dois corpos cavernosos, na região dorsal e, um corpo esponjoso, na região ventral, que envolve a uretra e que se expande na extremidade do pênis, formando a glande. A glande é recoberta pelo prepúcio, que é um prolongamento da pele e da fáscia peniana. Externamente a cada corpo cavernoso, há a presença de uma cápsula fibrosa, chamada de túnica albugínea (MOORE; PERSAUD, 2008). A irrigação do pênis é oriunda dos ramos das artérias pudendas internas. As artérias dorsais do pênis seguem paralelamente à veia dorsal profunda entre os corpos cavernosos, irrigando o tecido fibroso, corpo esponjoso, uretra e a pele peniana. As artérias profundas do pênis, por sua vez, irrigam os corpos cavernosos, sendo um componente-chave na ereção peniana (MOORE; PERSAUD, 2008). A drenagem venosa se dá por um plexo venoso que se une à veia dorsal profunda, alcançando a veia dorsal superficial. Os nervos penianos originam-se dos segmentos S2-S4 da medula espinal e dos gânglios sensitivos espinais do plexo pélvico. O nervo dorsal do pênis é um ramo terminal do nervo pudendo que inerva a glande e a pele do pênis, responsável pela entrada de estímulos aferentes. Os nervos cavernosos conduzem fibras parassimpáticas que inervam as artérias profundas do pênis.

A ereção peniana resulta de uma série de complexos mecanismos centrais, neurovasculares, moleculares, psicológicos e endócrinos. O controle cerebral é induzido por estímulos visuais e/ou táteis, sendo processados principalmente pelos núcleos hipotalâmicos da área pré-óptica e o núcleo paraventricular (ALWAAL; BREYER; LUE, 2015). A ereção é modulada principalmente pela ação parassimpática, embora a inibição simpática controlada

centralmente possa influenciar no processo de ereção. O estado flácido é mantido pelo músculo liso e pela contração tônica das artérias profundas e do corpo cavernoso, resultando em baixo fluxo sanguíneo. Durante a estimulação sexual, os nervos terminais do corpo cavernoso liberam óxido nítrico (NO), por meio da ação da enzima óxido nítrico sintase neuronal. O NO ativa a guanilato ciclase, formando guanilato monofosfato cíclico (cGMP), que por sua vez, resulta no relaxamento do músculo liso e vasodilatação (CHEN *et al.*, 2019). Estes eventos neurovasculares resultam no aumento do fluxo sanguíneo, elevando a pressão arterial para níveis superiores a 100 mgHg. Além disso, ocorre a vasoconstrição de vênulas penianas, que impedem o retorno venoso. Embora o início da ereção ocorra pela ação da NO sintase neuronal, sua manutenção é mantida pela NO sintase endotelial (ALWAAL; BREYER; LUE, 2015).

A ejaculação é um processo fisiológico controlado principalmente pelo sistema nervoso autônomo e ela consiste em duas fases: emissão e expulsão. Durante a emissão, a bexiga se fecha para prevenir o fluxo retrógrado do fluido oriundo da vesícula seminal. Após isso, há a liberação da secreção prostática com espermatozoides presentes nos ductos deferentes dentro da uretra prostática. Em seguida, ocorre a liberação dos fluidos da vesícula seminal e glândulas bulbouretrais que se misturam com o fluido prostático (VIRAJ; TUREK, 2001). Fibras simpáticas originadas dos nervos hipogástrico e pélvico desempenham um papel fundamental na fase de emissão, secretando principalmente noradrenalina (ALWAAL; BREYER; LUE, 2015). A fase subsequente, a expulsão, é responsável pela ejeção do sêmen pela uretra. Músculos esqueléticos da pelve, incluindo o isquicavernoso e bulbocavernoso, contraem-se ritmicamente, ao passo que o esfíncter externo da uretra se abre (GERSTENBERG; LEVIN; WAGNER, 1990).

O orgasmo é um evento relacionado com a ejaculação, embora sejam processos fisiológicos distintos. Apesar de não haver consenso, o orgasmo é uma sensação prazerosa que é caracterizada pelo aumento da ventilação pulmonar, para até 40 ciclos respiratórios por minutos, taquicardia e elevação da pressão arterial (ALWAAL; BREYER; LUE, 2015). Além disso, durante o orgasmo por estimulação peniana, ocorre de 4 a 8 contrações vigorosas dos músculos pélvicos isquicavernoso e bulbocavernoso (GERSTENBERG; LEVIN; WAGNER, 1990). As áreas do sistema nervoso central ativadas durante o orgasmo incluem a linha média, a zona incerta, o núcleo talâmico intralaminar e ventroposterior, o núcleo suprafascicular, a área tegmentar ventral, cerebelo, ao passo que as áreas como o córtex entorrinal e a amígdala reduzem as suas atividades (HOLSTEGE *et al.*, 2003).

O desenvolvimento e o funcionamento do sistema reprodutor masculino são totalmente dependentes do eixo hipotálamo-hipófise, o qual regula a produção dos espermatozoides e da testosterona. O eixo será discutido a seguir.

### 1.1.1 EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-TESTÍCULO E ESTEROIDOGENÊSE

A produção de testosterona pelo testículo está sob o controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (KOEPPEN; STANTON, 2009), num intricado processo repleto de sinais aferentes que informam as condições ambientais e internas do organismo (AIRES, 2012). O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH, do inglês *gonadotropin release hormone*) é produzido pelo hipotálamo e é o principal fator regulador da secreção do hormônio folículo-estimulante (FSH, do inglês *follicle-stimulating hormone*) e do hormônio luteinizante (LH, do inglês *luteinizing hormone*). Por sua vez, o FSH regula a espermatogênese ao se ligar às células de Sertoli e, o LH controla a produção de testosterona e outros androgênios nas células de Leydig. A testosterona e outros fatores (ex. estrogênio, progesterona, inibina, GnIH e etc.) diminuem a taxa de produção e secreção do GnRH, FSH e LH por feedback negativo (DAMIÁN; BAUSERO; BIELLI, 2015; STRAUSS, 2019).

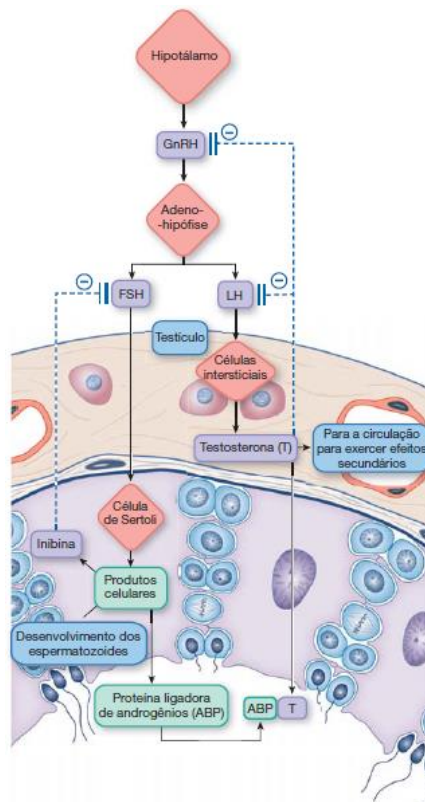


Figura 2 – Representação do eixo hipotálamo-hipófise-testículo. FONTE: SILVERTHORN, 2017.

O GnRH é um decapeptídeo codificado pelo gene *GNRH1*, presente no cromossomo 8 (8p11.2-p21), de estrutura Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly. O produto traduzido inicial consiste no pré-pró-GnRH, um peptídeo com 92 aminoácidos, que inclui uma sequência-sinal com 23 aminoácidos, o GnRH, um sítio proteolítico com 3 aminoácidos e um peptídeo associado ao GnRH, com 56 aminoácidos (STRAUSS, 2019). Os neurônios GnRH, responsáveis pela sua produção, consistem em duas populações heterogêneas presentes principalmente no núcleo infundibular (núcleo arqueado em roedores) e, em menor extensão, na área pré-óptica medial do hipotálamo, totalizando cerca de apenas 1500 neurônios (STRAUSS, 2019). As projeções das extremidades das fibras destes neurônios apresentam uma característica morfológica atípica, com terminais denominados “dendrônios”, por expressarem marcadores de ambos os dendritos e axônio (HERDE *et al.*, 2013). Estas adaptações permitem que outros neurônios especializados, como os neurônios KNDy e os tanicitos (células endimárias modificadas), modulem a secreção de GnRH ao modificar o seu acesso na eminência mediana (STRAUSS, 2019).

O GnRH apresenta um padrão de secreção pulsátil, com picos a cada 2 horas em homens adultos (TSUTSUMI; WEBSTER, 2009; STRAUSS, 2019). Estudos tem demonstrado que a pulsatilidade da produção do GnRH é intrínseca aos neurônios GnRH, numa espécie de marca-passo (ESCALERA; CHOI; WEINER, 1992). Contudo, diversos fatores como neurotransmissores e neuromoduladores podem alterar os seus picos de produção e secreção. Os neurônios KNDy parecem desempenhar um papel-chave na pulsatilidade do GnRH e, sobretudo, no sistema reprodutor. Estes neurônios são responsáveis pela produção dos peptídeos kisspeptina, neurocinina B (NKB) e dinorfina que, em conjunto, orquestram a pulsatilidade de GnRH (NAVARRO, 2012). Além disso, os neurônios KNDy expressam em altas concentrações o receptor androgênico (AR), o receptor estrogênico alfa (ER- $\alpha$ ) e o receptor de prolactina (PR). Uma vez que os neurônios GnRH expressam estes receptores em baixas quantidades, os neurônios KNDy são os principais responsáveis pelo feedback negativo desempenhado pelos esteroides gonadais (STRAUSS, 2019). As populações de neurônios KNDy coexistem com os neurônios GnRH no núcleo infundibular e na área pré-óptica do hipotálamo (STRAUSS, 2019).

A kisspeptina é capaz de despolarizar diretamente os neurônios GnRH ao se ligar ao seu receptor e, desta forma, aumentar a taxa de secreção de GnRH (AVENDAÑO; VAZQUEZ; TENA-SEMPERE, 2017). No entanto, o seu principal mecanismo ocorre indiretamente, ao

aumentar correntes pós-sinápticas GABAérgicas<sup>1</sup> e glutamatérgicas (STRAUSS, 2019). A NKB também atua estimulando a secreção de GnRH diretamente, porém, a sua principal função é aumentar a secreção de kisspeptina (AVENDAÑO; VAZQUEZ; TENA-SEMPERE, 2017). Peptídeos opioides endógenos, incluindo endorfinas, encefalinas e dinorfinas, participam da modulação do GnRH ao participar parcialmente no sistema de feedback negativo exercido por esteroides gonadais ao reduzirem a produção e a secreção de kisspeptina (STRAUSS, 2019).

Pistas ambientais como balanço energético, estresse, sono e ritmos biológicos também podem influenciar a atividade dos neurônios GnRH. A leptina é um hormônio produzido pelo tecido adiposo que age sinalizando o status metabólico, influenciando, portanto, a ingesta alimentar, o gasto de energia e a reprodução (HUSSAIN; KHAN, 2017). A falta de leptina, resultante de uma diminuição das reservas de gordura, culmina em uma diminuição da expressão de kisspeptina (LIVADAS; CHROUSOS, 2016). Em situações de estresse crônico, mediadores como CRH (do inglês *corticotropin release hormone*), cortisol, urocortinas, ACTH (do inglês *adrenocorticotropic hormone*) e vias neurais adrenérgicas promovem a diminuição da produção de GnRH (STRAUSS, 2019).

O GnRH é secretado na eminência mediana para ser transportado à adeno-hipófise através do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário (KOEPPEN; STANTON, 2009). Em seguida, ele se liga ao receptor de GnRH do tipo 1 (GnRHR1) presente nos gonadotrofos, que são as células especializadas pela produção de LH e FSH (STRAUSS, 2019). O LH e o FSH fazem parte da família dos hormônios glicoproteicos, em conjunto com a gonadotrofina coriônica humana e o hormônio tireoestimulante. Estes hormônios são heterodímeros que compartilham uma subunidade  $\alpha$ , ligada não covalentemente a uma subunidade  $\beta$ , que caracteriza os seus efeitos biológicos (STRAUSS, 2019). O pulso de GnRH é essencial para a produção do LH e do FSH, uma vez que este estímulo promove a produção e manutenção dos receptores de GnRH. Além disso, a exposição contínua ao GnRH faz com que ocorra *downregulation* dos receptores e diminuição da produção de gonadotrofinas (TSUTSUMI; WEBSTER, 2009).

Portanto, para a produção das gonadotrofinas, o GnRHR1, que é um receptor acoplado à proteína  $G\alpha_{q/11}$ , precisa ser ativado pelo GnRH, para que haja o aumento das concentrações intracelulares de trifosfato de 1,3,5-inositol ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG). Após a ativação, há o aumento da concentração intracelular de cálcio e ativação de várias proteínas quinase C (PKC),

---

<sup>1</sup> - O neurotransmissor GABA geralmente possui efeitos inibitórios em neurônios pós-sinápticos. No entanto, alguns neurônios GnRH, paradoxalmente, são estimulados pelo GABA. (HERDE et al., 2013).

proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK), quinase dependente de cálcio/calmodulina II e adenilato ciclase (TSUTSUMI; WEBSTER, 2009). A via das MAPK também pode ser ativada pela proteína  $G\alpha_s$  (STRAUSS, 2019). Altas frequências de pulso do GnRH favorecem a produção e a secreção de LH, enquanto que baixas frequências, favorecem a produção e a secreção de FSH, por meio do acoplamento de diferentes proteínas G, que ativam diferencialmente diversos fatores de transcrição que promovem a síntese da subunidade  $\beta$  das gonadotrofinas (STRAUSS, 2019). Após a sua tradução, o LH e o FSH sofrem glicosilações em diferentes sítios no complexo de Golgi. O LH então é empacotado em vesículas e aguarda o estímulo promovido pelo GnRH para ser secretado pelo polo basolateral do gonadotrofo, diferentemente do FSH, que é secretado conforme é produzido e, que não apresenta um padrão de polaridade de secreção (STRAUSS, 2019).

O LH é transportado para o testículo via circulação sanguínea e ativa o seu receptor cognato nas células de Leydig, no interstício testicular. O receptor de LH (LHCGR) é um receptor acoplado a proteína G, que promove a ativação da adenilato ciclase, com aumento da concentração intracelular de cAMP e de  $Ca^{2+}$ , com subsequente ativação da PKA, PKC e da cálcio-calmodulina quinase, que tem como efeito global a ativação dos fatores de transcrição CREB, CREM, GATA4, SF-1 e NUR77, responsáveis pela expressão gênica das enzimas esteroidogênicas e a ativação da proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR) (PLANT; ZELEZNIK, 2015).

O primeiro passo da esteroidogênese envolve a mobilização do colesterol e seu transporte para dentro da mitocôndria, uma vez que esta molécula é a precursora de todos os hormônios esteroides (HALES, 2002). A obtenção do colesterol se dá pela remoção do plasma via receptores de LDL e HDL presentes na membrana, pela síntese *de novo* a partir do acetil-coA, da remoção do estoque das membranas ou da hidrólise de ésteres de colesterol do *pool* de gotículas lipídicas citoplasmáticas (KOEPPEN; STANTON, 2009). O estímulo originado pelo LH promove a ativação de lipases sensíveis a hormônio e aumento da expressão dos receptores e de enzimas envolvidas na síntese *de novo*. A StAR é responsável pela mobilização do colesterol disponível para a membrana interna da mitocôndria, sendo esta etapa passo-limitante para a produção de todos os hormônios esteroides (STRAUSS, 2019).

Na membrana interna mitocondrial, a cadeia lateral do colesterol é clivada pela enzima CYP11A1 em três etapas: nas duas primeiras, são adicionadas hidroxilas nas posições C-22 e C-20, respectivamente e, na terceira, a ligação entre esses carbonos é clivada (STRAUSS, 2019). Com isso, o colesterol é convertido em pregnenolona, que em seguida é desidrogenado

pela enzima  $3\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase ( $3\beta$ -HSD), pela via  $\Delta^4$ . A CYP17, que possui atividade 17-hidroxilase e 17,20-liase, forma a androstenediona. A testosterona é formada pela conversão da androstenediona pela enzima  $17\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase ( $17\beta$ -HSD). O pregnenolona, pela via alternativa  $\Delta^5$ , é convertido pela CYP17 em  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona e em seguida, em desidroepiandrosterona (DHEA), seguida pela conversão em androstenediol, via  $17\beta$ -HSD e, em testosterona, via  $3\beta$ -HSD (KOEPPEN; STANTON, 2009). Vale ressaltar que os andrógenos são sintetizados em menor grau pela glândula adrenal (AIRES, 2012)

A testosterona é importante para a manutenção da espermatogênese, atuando em conjunto com o FSH na célula de Sertoli (WALKER, 2010). A testosterona também é responsável pelo crescimento sexualmente dimórfico de massa muscular, aumento do LDL e VLDL e redução do HDL, crescimento e rigidez dos ossos, manutenção da saúde do sistema cardiovascular, saúde mental e habilidades cognitivas, aumento da produção de eritrócitos, deposição de tecido adiposo abdominal, função erétil, libido e crescimento de pelos (KOEPPEN; STANTON, 2009; TYAGI *et al.*, 2017). Como mencionado anteriormente, a testosterona promove o feedback negativo a nível hipotalâmico e hipofisário.

A testosterona age principalmente pelo receptor de andrógeno (AR), que é um fator de transcrição presente no citoplasma ligado a chaperonas. Quando ativado pela ligação à testosterona, ocorre a dissociação das chaperonas, dimerização e translocação para o núcleo, onde há a interação com os elementos responsivos a andrógenos (AREs), seguido pelo recrutamento de co-ativadores e outros fatores de transcrição, que resulta na expressão de genes específicos (WALKER, 2010). Nos últimos anos, estudos têm apontado que a testosterona e o AR agem por mecanismos não genômicos, atuando por transativação do EGFR e ativação da via das MAPK, pela ativação de uma proteína  $G_q$  ainda desconhecida e mediadores *downstream* da via da PLC, além de promover o fechamento de canais de  $K^+$ , resultando em uma leve despolarização celular que abre os canais de cálcio do tipo L (RAHMAN; CHRISTIAN, 2007; WALKER, 2010). Estes mesmos autores ainda discutem que estas vias de sinalização não canônicas também ativam os elementos responsivos ao cAMP, que promove a ativação de outros genes, que é independente dos AREs (RAHMAN; CHRISTIAN, 2007; WALKER, 2010).

A testosterona pode ser encontrada no plasma na sua forma livre (2%) que é biologicamente ativa, ligada à albumina (38%), onde possui baixa atividade biológica, ou ainda, ligada a globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG, do inglês *sexual hormone binding globulin*), biologicamente inativa e que compreende cerca de 60% da testosterona plasmática

total (TYAGI *et al.*, 2017). O metabolismo da testosterona ocorre no fígado, onde é conjugada com glicouronato ou sulfato, para ser excretada posteriormente na urina (KOEPPEN; STANTON, 2009).

A testosterona pode ser convertida periféricamente em di-hidrotestosterona pela enzima 5 $\alpha$ -redutase, que é um andrógeno com maior afinidade pelo AR e, portanto, um andrógeno mais potente (TYAGI *et al.*, 2017). Além disso, no tecido adiposo e nas células de Sertoli, a testosterona é convertida em 17  $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) pela enzima aromatase, que pertence à família das enzimas citocromo P450. Embora o E<sub>2</sub> historicamente tenha sido considerado um hormônio feminino, ele parece exercer importantes funções fisiológicas masculinas, como reabsorção de água e transporte de espermatozoides nos ductos eferentes e epidídimo, além de outros efeitos não reprodutivos no cérebro, tecido adiposo, ossos, músculos, sistema imunológico e cardiovascular (COOKE *et al.*, 2017).

### 1.1.2 TÚBULO SEMINÍFERO E BARREIRA HEMATO-TESTICULAR

Os túbulos seminíferos são estruturas arredondadas responsáveis pela espermatogênese. Devido a sua importância na função reprodutiva, os túbulos seminíferos ocupam entre 60 a 80% do volume do parênquima testicular (FIETZ; BERGMANN, 2017).

Os túbulos seminíferos são envoltos por uma camada chamada de lâmina própria, formada por fibras colágenas e células peritubulares (PTCs). Em humanos, as PTCs estão arranjadas em 4 ou 5 camadas, ao passo que em roedores, há apenas uma camada (FIETZ; BERGMANN, 2017). As PTCs possuem características tanto de fibroblastos, quanto de células musculares lisas, pois expressam marcadores para ambos os tipos celulares, como a vimentina, desmina, calponina, cadeia pesada da miosina e actina de músculo liso, além de secretar a matriz extracelular de fibras colágenas (I, VI e XVIII), laminina e fibronectina, que compõe a lâmina própria (ALBRECHT, 2009). Estas células contraem-se em resposta à ocitocina, vasopressina, prostaglandina F<sub>2 $\alpha$</sub>  e endotelina para transportar os espermatozoides e o fluido tubular para os ductos eferentes e epidídimo (KNOBIL, 2006).

A célula de Sertoli é o principal tipo de célula somática presente no túbulo seminífero. As células de Sertoli apresentam um nucléolo esférico bem evidente e ramificações de membrana, cuja função é manter contato com todas as células germinativas, sendo uma característica fundamental para a regulação da espermatogênese (FRANÇA *et al.*, 2016). Ela foi descrita pelo pesquisador italiano Enrico Sertoli em 1865 e chamada de “*nurse cell*”, devido

as suas funções de suporte e de regulação do ciclo espermatogênico (PETERSEN; SÖDER, 2006). Estas funções incluem a produção de proteína ligadora de andrógeno (ABP, do inglês *androgen binding protein*), transferrina, ativador de plasminogênio, glicoproteínas, proteínas sulfatadas, mioinositol, hormônio anti-Mülleriano, ligante kit c, inibina, além da regulação do pH intratubular, reabsorção e degradação de *debris* celulares, transporte de água, formação de junções especializadas com as células germinativas, responsáveis pelo tráfego de nutrientes e metabólitos de até 1000 kD (ALVES *et al.*, 2013).

Tais junções entre as células de Sertoli e as células germinativas são responsáveis pela formação da barreira hemato-testicular (BHT), uma estrutura que separa o túbulo seminífero nos compartimentos basal e apical. A BHT consiste em uma série de proteínas e seus adaptadores que formam as junções entre as células (Sertoli-Sertoli ou Sertoli-células germinativas), incluindo as junções de oclusão (occludina-ZO-1, claudina - ZO-1, JAM-A e B - ZO-1), especialização ectoplasmática (caderina - catenina, nectina - afadina), junções comunicantes (conexina-43 - placofilina-2), desmossomos (desmogleína-2/desmocolina-2 - placofilina/placoglobina) e hemidesmossomos. Estas interações intercelulares atuam em conjunto com uma barreira física formada pela túnica própria, composta pelas PTCs, matriz colágena, vasos linfáticos do tecido intersticial e membrana basal do túbulo seminífero (STANTON, 2016).

As especializações ectoplasmáticas configuram uma junção celular distinta e característica do testículo, com filamentos de actina organizados em bandas entre as membranas plasmáticas e as cisternas de retículo endoplasmático de células de Sertoli justapostas (MRUK; CHENG, 2015). Esta característica ultraestrutural faz com que a BHT seja umas das barreiras mais justas em mamíferos (ALVES *et al.*, 2013). Apesar disso, a BHT é uma estrutura extremamente dinâmica, sendo desarranjada e rearranjada periodicamente para permitir o fluxo de espermátócitos no estágio pré-leptóteno para a porção apical do epitélio seminífero, onde as demais etapas da meiose e diferenciação celular ocorrerão (CHENG; MRUK, 2012).

Cheng e Musk (2012) descrevem um modelo de reorganização da BHT: os complexos de adesão celular formados por occludina, claudina, N-caderina, JAM-A, JAM-B e nectina conferem a integridade da barreira, por meio da fosforilação destas proteínas integrais de membrana e seus adaptadores, além de proteínas de polaridade - que guiam o posicionamento das proteínas estruturais -, via proteínas quinase não receptoras. Os filamentos de actina reforçam e auxiliam as junções de oclusão e são mantidos por uma razão adequada dos complexos proteicos Eps8 e Arp2/3. Quando o epitélio seminífero está no estágio VIII do ciclo

espermatogênico, os espermatócitos pré-leptóteno precisam transitar pela barreira hemato-testicular. Para isto, ocorrem os seguintes eventos:

- A testosterona liga-se ao receptor de andrógeno, promovendo a síntese de proteínas de membrana, como ocludina, claudina e seus adaptadores, que começam a se organizar atrás do espermatócito para formar uma nova barreira;
- Uma porção das proteínas que fazem parte da barreira localizada acima do espermatócito é transportada dos complexos junção celular para a nova barreira em formação, mediado por GTPases e endossomos;
- Algumas proteínas são endocitadas, degradadas e recicladas para formar novas proteínas e desestabilizar a barreira antiga. As vesículas são guiadas pelas proteínas de polaridade 14-3-3, PAR3, PAR6 e Cdc42. Além disso, a testosterona e o TNF- $\alpha$  promovem a expressão de caveolina-1 e Rab11, marcadores de transcitose. As citocinas TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 3 e IL-1 $\alpha$  participam deste processo ao ativar as proteínas quinase FAK, c-Src e c-Yes, ou fosfatases, que em conjunto, alteram o estado de fosforilação das proteínas de membranas e seus adaptadores, mediando as vias de degradação dependentes de endossomos e/ou ubiquitina;
- A IL-1 $\alpha$  também promove uma alteração da razão entre Esp8 e Arp2/3, desestabilizando as bandas de actina das especializações ectoplasmáticas;
- Por fim, durante a passagem do espermatócito através da barreira, suas proteínas integrais formam uma barreira transitória enquanto as proteínas da célula de Sertoli estão sofrendo rearranjo, impedindo o extravasamento de conteúdo intracelular.

Desta forma, a principal função da BHT é sequestrar as células germinativas que residem no compartimento adluminal dos sistemas linfático e circulatório, que atua em concerto com a imunossupressão local para fornecer um microambiente imunoprivilegiado para que a meiose ocorra (MRUK; CHENG, 2015). Os detalhes da imunossupressão e imunoprivilégio testicular serão discutidos mais adiante, no item 1.1.4.

Tomando em conta a relação da estrutura e função da BHT e dos túbulos seminíferos, o processo da espermatogênese, que é dependente destas estruturas, será descrito a seguir.

### 1.1.3 ESPERMATOGÊNESE

A espermatogênese é o processo responsável pela formação dos espermatozoides, consistindo de várias etapas que envolvem a expansão da população das células germinativas e seu desenvolvimento que ocorre dentro dos túbulos seminíferos. A espermatogênese

compreende três fases: renovação das células-tronco e proliferação, meiose e diferenciação e espermição (WALKER, 2010). O processo inicia-se com as células-tronco indiferenciadas na base do túbulo seminífero. Essas células se dividem e se diferenciam em espermatócito A, o qual dá origem, posteriormente, aos espermatócitos B que, por sua vez, resultam em espermátides alongadas onde, finalmente, irão gerar os espermatozoides (WALKER, 2010). Este processo requer que células germinativas diploides sofram um processo de divisão reducional, conhecida como meiose, para formar gametas funcionais, os quais são produzidos constantemente ao longo da vida reprodutiva do macho (GRISWOLD, 2019).

Na membrana basal dos túbulos seminíferos, há espermatogônias-tronco indiferenciadas (SSCs, do inglês *Spermatogonial Stem Cells*) que se dividem intensamente para a formação e manutenção de um *pool* de células com capacidade proliferativa, que posteriormente darão origem a um outro tipo de célula, porém comprometida com a meiose (GRISWOLD, 2019). Huckins (1971) estabeleceu um esquema conhecido como o modelo “A’s” para a proliferação de SSCs em roedores. Nesse modelo, quando uma única espermatogônia não diferenciada ( $A_{\text{single}}$ ) se divide, suas duas células-filhas podem migrar apicalmente ou permanecer unidas por meio de pontes citoplasmáticas devido a citocinese incompleta, formando espermatogônias pareadas ( $A_{\text{paired}}$ ). As  $A_{\text{paired}}$  em seguida se dividem e formam cadeias de células alinhadas e unidas, formando as  $A_{\text{aligned}}$ , consistindo em cadeias de 4, 8 ou 16 células. As espermatogônias  $A_{\text{aligned}}$  então sofrem a transição de espermatogônias A para A1, as quais são células consideradas diferenciadas e estão irreversivelmente comprometidas com a meiose (PLANT; ZELEZNIK).

As SSCs residem num nicho especializado sobre a membrana basal do túbulo seminífero, onde elas estão em contato direto com as células de Sertoli, que produz alguns fatores parácrinos que regulam a sua autorrenovação e diferenciação (PLANT; ZELEZNIK, 2014). Além disso, sabe-se que o tecido intersticial também produz moléculas que ajudam a regular a proliferação e diferenciação. Os fatores de crescimento produzidos pelas células de Sertoli incluem o GDNF, FGF2, CXCL12 e WNT5A. Já as PTCs, produzem o fator 1 estimulante de colônia (CSF1) e o GDNF. Um dos mecanismos pelos quais o GDNF controla a proliferação das SSCs se dá via regulação para cima do *Early growth response 2* (Egr2). O Egr2 é um fator de transcrição importante para a manutenção e proliferação das espermatogônias (ROSSI *et al.*, 2008). Para as SSCs entrarem na meiose, o Egr2 deve ser regulado para baixo (PELLEGRINI *et al.*, 2008). Além disso, uma população de macrófagos peritubulares também secretam o CSF1 e expressam a maquinaria celular envolvida na

formação do ácido retinoico, que é importante para a diferenciação das espermatogônias A para A1 (DEFALCO *et al.*, 2015).

Assim que as espermatogônias entrem no estágio A1, elas se diferenciam em espermatogônias do tipo B e alcançam a fase de pré-leptóteno, onde elas precisarão atravessar a BHT, como descrito anteriormente. Então, a espermatogônia pré-leptóteno passa a ser chamada de espermatócito primário, que é uma célula diploide (2n) e inicia a meiose I, separando os cromossomos homólogos, que origina dois espermatócitos secundários haploides (n). Os espermatócitos secundários, por sua vez, sofrem a meiose II, que é o processo onde as cromátides-irmãs são segregadas, para formar quatro espermátides arredondadas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). As espermátides arredondadas, por meio da espermiogênese, sofrem uma série de modificações estruturais e bioquímicas para formar as espermátides alongadas e finalmente, os espermatozoides. Na espermiogênese, acontecem os processos de formação do acrossomo<sup>2</sup>, alterações nucleares, desenvolvimento do flagelo, reorganização do citoplasma e das organelas, que terão como produto final uma célula alongada e móvel, que apresenta três regiões distintas: cabeça, peça intermediária e cauda (KNOBIL, 2006). Finalmente, ocorre a espermição, que é a liberação do espermatozoide no lúmen tubular (WALKER, 2010).

Para que a espermatogênese ocorra de maneira adequada, é necessário que o testículo possua mecanismos de imunossupressão, em virtude da ausência da tolerância aos autoantígenos dos espermatozoides, pois estas células surgem após o período de desenvolvimento de autotolerância. A seguir, serão apresentados os macrófagos testiculares e como estas células influenciam o funcionamento das células de Leydig, além dos mecanismos endógenos do imunoprivilégio testicular.

#### 1.1.4 MACRÓFAGOS E IMUNOLOGIA REPRODUTIVA MASCULINA

Os macrófagos foram descritos pela primeira vez por Elie Metchnikoff no século 19, com o seu nome derivando dos radicais “macro – grande” e “fago – o que come”, devido ao seu tamanho, com um diâmetro de 25 a 50 µm e a sua capacidade de fagocitar *debris* celulares e antígenos potencialmente perigosos ao hospedeiro (NATHAN *et al.*, 2008; SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018). Os macrófagos pertencem ao sistema fagocítico mononuclear

---

<sup>2</sup> O acrossomo é uma estrutura formada pela migração e fusão do Complexo de Golgi com a membrana plasmática, na região anterior da cabeça do espermatozoide. Esta estrutura tem como função permitir a fusão do espermatozoide com o ovócito II para formar o zigoto (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

(MPS, do inglês *mononuclear phagocyte system*). O MPS é definido como uma família de células derivada de um progenitor pluripotente na medula óssea. Esta família inclui a célula progenitora pluripotente, células intermediárias, monócitos e macrófagos (JENKINS; HUME, 2014).

Jenkins e Hume (2014) propõem um modelo da formação dos macrófagos por meio do MPS: a célula-tronco hematopoiética sob o estímulo de interleucina-34 e/ou fator estimulante de colônia de macrófagos 1 (MCSF1, do inglês *macrophage colony-stimulating factor 1*) se ligam ao CSF1R e geram o progenitor linfoide multipotente (LMPP, do inglês *lymphoid-primed multipotent progenitor*). O LMPP por sua vez, através da ativação dos receptores CSF1R e flt3, gera o progenitor de granulócito-macrófago, em seguida o progenitor comum da célula dendrítica e depois o progenitor de macrófago e célula dendrítica. A partir deste momento, esta célula progenitora deixa de expressar o flt3 e apenas sob o controle do CSF1R, a linhagem celular gera o progenitor de monócito e, finalmente, o monócito, que é então liberado na corrente sanguínea. Os monócitos que são células positivas para o marcador Ly6c, migram para os tecidos via CCR2 (receptor de quimiocina C-C do tipo 2), onde se tornam macrófagos residentes de tecidos. No entanto, os macrófagos também são formados por meio da autorrenovação de macrófagos residentes nos tecidos que são derivados do fígado fetal e/ou do saco vitelínico, que migram para os tecidos durante o desenvolvimento (BONNARDEL; GUILLIAMS, 2018; GORDON; PLÜDDEMANN, 2018). Nos testículos, já foi estabelecido que a maior parte do *pool* de macrófagos é oriunda do saco vitelínico (MEINHARDT *et al.*, 2018).

Os macrófagos são células extremamente plásticas, que respondem às variações internas e ambientais e apresentam diversas funções, tanto imunológicas quanto homeostáticas, incluindo a fagocitose e destruição de patógenos, remodelamento tecidual, produção de mediadores inflamatórios, apresentação de antígenos, hematopoiese, absorção de surfactante nos pulmões, absorção e degradação de neurotransmissores no sistema nervoso central, remodelamento ósseo, metabolismo energético e etc (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014).

Em 2000, Mills e colaboradores sugeriram uma classificação fenotípica para as subpopulações de macrófagos, amplamente utilizada atualmente, baseada nos estímulos que essas células recebem e no metabolismo da arginina em células T helper 1 e 2 de camundongos. Com isso, os macrófagos “classicamente ativados”, isto é, estimulados com interferon- $\gamma$ , lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa de bactérias gram-negativas e fator  $\alpha$  de

necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) apresentam um fenótipo caracterizado pela produção de NO a partir da arginina e por citocinas pró-inflamatórias (ex: IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) são tidos como M1. Em contrapartida, a “ativação alternativa” de macrófagos quando expostos a interleucinas como a IL-4, IL-10 e IL-13, resulta na produção de ornitina a partir da arginina e citocinas anti-inflamatórias (ex: IL-10). Desta forma, a classificação em M1 e M2 está intimamente associada com a resposta Th1 e Th2. No entanto, esta dicotomia nem sempre representa o amplo espectro fenotípico adotado pelos macrófagos, assim, o fenótipo M2, foi dividido posteriormente em M2a, M2b, M2c e M2d (MANTOVANI *et al.*, 2004).

Os macrófagos testiculares (MTs) representam a maior população de leucócitos neste órgão e, a segunda maior população no tecido intersticial, sendo superada somente pelas células de Leydig (CHEN; DENG; HAN, 2016). A classificação de M1 e M2 para MTs é adequada, sendo os macrófagos M2 homeostáticos e residentes, provenientes da migração de células do saco vitelínico e, a população M1 fornecida pelo *input* de monócitos da corrente sanguínea, apresentando um fenótipo pró-inflamatório, onde posteriormente tornam-se M2. Estima-se que 20% da população de MTs resulte do influxo de monócitos (BHUSHAN; MEINHARDT, 2017). O fenótipo dos MTs é identificado por métodos imunológicos por meio da ligação dos anticorpos monoclonais ED1 e ED2, que reconhecem os marcadores CD68 e CD163, respectivamente (RIVAL *et al.*, 2008). Assim, os MTs ED1<sup>+</sup>ED2<sup>-</sup> são macrófagos M1, ED1<sup>-</sup>ED2<sup>+</sup> são macrófagos M2 e os macrófagos ED1<sup>+</sup>ED2<sup>+</sup> são M1 que se diferenciam em M2 devido ao ambiente imunossupressor (JACOBO *et al.*, 2011).

Os MTs apresentam uma associação íntima com as células de Leydig, a qual mantém uma relação numérica (4 células de Leydig: 1 macrófago) e física por meio de uma especialização de membrana, conhecida como interdigitação, que se desenvolve na idade púbere e que é responsável pela transferência de moléculas sinalizadoras, que influenciam drasticamente a esteroidogênese. Dentre elas, destaca-se o 25-hidroxicolesterol, uma molécula que estimula fortemente a esteroidogênese e que também serve como substrato para a formação da testosterona (HALES, 2002; POTTER; DE FALCO, 2017). Estudos envolvendo *knockout* da StAR, que é responsável pela mobilização do colesterol para a mitocôndria, demonstraram que as células de Leydig apresentam alguma atividade esteroidogênica, evidenciando que a produção da testosterona pode ser compensada por meio da via do 25-hidroxicolesterol dos MTs (HUTSON, 2006).

Em contrapartida, quando o testículo está inflamado, como na orquite, os macrófagos recrutados da corrente sanguínea liberam diversos mediadores pró-inflamatórios, como

espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) e citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ ), que inibem a expressão e a função das enzimas esteroidogênicas nas células de Leydig, reduzindo, portanto, a produção de andrógenos (HALES, 2002).

Para evitar este problema, os MTs em conjunto com outras células, como as células dendríticas, células de Sertoli, células T, criam um microambiente imunoprivilegiado no testículo (CHEN; DENG; HAN, 2016). Atualmente, imunoprivilegio é definido como a sobrevivência estendida de células que expressam antígenos que, sob condições normais, induziriam uma resposta imunológica (MEINHARDT; HEDGER, 2011). Os principais órgãos imunoprivilegiados são o cérebro, placenta, retina e testículo (MOSSADEGH-KELLER; SIEWEKE, 2018). O imunoprivilegio testicular é importante para a manutenção da capacidade reprodutiva do animal, porque os espermatozoides começam a ser formados na puberdade, que é um período posterior ao do desenvolvimento da tolerância a autoantígenos. Sendo assim, os macrófagos não podem reconhecer os espermatozoides como antígenos e desencadear uma resposta imunológica (QU *et al.*, 2019). Além do mais, a produção de mediadores imunológicos é extremamente controlada para impactar minimamente a esteroidogênese nas células de Leydig.

Os mecanismos responsáveis pela formação do imunoprivilegio no testículo incluem a presença da BHT, que age como uma barreira física que impede o acesso de leucócitos no interior dos túbulos seminíferos; a produção de fatores parácrinos anti-inflamatórios como a IL-10 e glicocorticoides pelos TMs, Gas6 (inibidor de célula dendrítica) pela célula de Leydig, activina A e TGF- $\beta$  (inibem células dendríticas e MTs) e sPDL-1 (inibe linfócito T) pela célula de Sertoli (CHEN; DENG; HAN, 2016).

## 2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Os organismos multicelulares necessitam de diversos hormônios que trabalham em sincronia para coordenar inúmeros parâmetros, visando a manutenção da homeostasia. Os hormônios são moléculas sinalizadoras as quais permitem a comunicação entre diferentes órgãos e tecidos e que controlam comportamentos e fatores fisiológicos como o balanço hidroeletrolítico, reprodução, glicemia, crescimento e metabolismo. Os hormônios são produzidos e secretados por glândulas endócrinas e, são transportados até as células-alvo que possuem receptores específicos, os quais geram uma resposta. No entanto, têm se descoberto diversas substâncias capazes de interferir no funcionamento do sistema endócrino (DARBRE, 2019). Estas substâncias são conhecidas principalmente como desreguladores endócrinos (EDC, do inglês *Endocrine-disrupting chemical*), mas as denominações de moduladores endócrinos, hormônios ambientais ou compostos hormonalmente ativos também são utilizadas, porém com menor frequência (YANG *et al.*, 2015).

A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2002) define um EDC como “substância ou mistura exógena que altera a função do sistema endócrino e, conseqüentemente, causa efeitos adversos à saúde de um organismo intacto ou sua progênie, ou (sub)populações”. Ainda, segundo Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (1997), um desregulador endócrino é “um agente exógeno que interfere na produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais do corpo responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento”.

Darbre (2019) sumariza os eventos históricos importantes por trás da desregulação endócrina. Com a descoberta da secretina em 1902, iniciaram-se os estudos em Endocrinologia e a concepção do conceito de hormônio. Posteriormente, na década de 1920, pesquisadores perceberam que a infertilidade de porcos nas fazendas dos Estados Unidos era resultado do consumo de alimentos ricos em micoestrógenos, i.e., substâncias estrogênicas produzidas por fungos, portanto, consequência da desregulação endócrina. Já na década de 1940, ovelhas na Austrália desenvolveram infertilidade por se alimentarem de pastos de trevo, uma planta rica em fitoestrógenos. Em humanos, o primeiro caso de desregulação endócrina que recebeu destaque foi relacionado ao uso do fármaco dietilestilbestrol (DES). Este medicamento com capacidade estrogênica foi comercializado entre os anos de 1940 e 1971 para evitar abortos no primeiro trimestre da gestação. No entanto, as filhas expostas *in utero* a este fármaco se tornaram inférteis, apresentavam anomalias anatômicas uterinas e desenvolveram o câncer

vaginal de células claras. Eventos importantes concomitantes à veiculação do DES foram a descoberta do mecanismo de ação dos hormônios por meio de receptores e a publicação do livro “Primavera Silenciosa”, de Rachel Carson em 1962, que denunciava os efeitos deletérios do pesticida diclorodifeniltricloroetano (DDT) em animais e humanos. Na década de 1980, diversos genes de receptores foram clonados, o que possibilitou a expansão do conhecimento acerca dos mecanismos genômicos e não genômicos dos hormônios e a distribuição dos receptores nos tecidos. Em 1991, na *World Wildlife Fund Wingspread Conference*, em Wisconsin (EUA), foi cunhado o termo desregulador endócrino. Em 1996, Colborn e colaboradores compilaram diversas evidências científicas no livro “Nosso Futuro Roubado”. Estes marcos foram importantes para obrigar agências regulatórias dos Estados Unidos e Europa a criarem diversos mecanismos legais acerca dos EDCs.

Entre as substâncias conhecidas como EDCs estão os estrógenos naturais (fito e microestrógenos), fármacos (como o DES), plastificantes (ftalatos), agrotóxicos e metais tóxicos (LI *et al.*, 2016). Estas substâncias podem causar diversas doenças em animais e humanos. Li *et al.* (2016) exemplifica algumas destas substâncias e sumariza os seus efeitos adversos à saúde conhecidos: Alguns pesticidas organofosfatados, organoclorados, piretroides e carbamatos podem desencadear doenças neuroendócrinas, tireoidianas, reprodutivas e resistência à insulina; Um dos componentes do plástico, o bisfenol-A, é conhecido por possuir atividade estrogênica, sendo capaz de desregular o sistema reprodutor, hormônios tireoidianos e desencadear doenças cardiovasculares e diabetes; Ftalatos são substâncias utilizadas para conferir maleabilidade aos plásticos, estando, portanto, presentes numa ampla gama de produtos. Os ftalatos impactam o funcionamento da tireoide, promovem resistência insulínica, obesidade e diversas desordens reprodutivas, como baixa qualidade do sêmen; Metais tóxicos também têm sido associados a problemas endócrinos, devido a capacidade estrogênica destas substâncias. Dentre os metais, destacam-se o cádmio, o chumbo e o arsênio (DARBRE, 2006).

## 2.1 ARSÊNIO COMO DESREGULADOR ENDÓCRINO DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

O arsênio (As) é um metaloide com ampla distribuição global, cuja ocorrência se dá de forma natural, por meio da atividade vulcânica e pela dissolução de minerais em lençóis freáticos. Contudo, influências antropogênicas, como a mineração, fundição de metais, queima de combustíveis fósseis, usos como conservante de madeira e praguicida, têm contribuído para

o aumento de sua concentração no ambiente (WHO, 2010a). No ambiente, o As é encontrado principalmente na forma inorgânica pentavalente ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) e trivalente ( $\text{As}^{\text{III}}$ ), sendo a forma trivalente mais tóxica (SUN *et al.*, 2016). A maior parte do As é encontrada combinada com sulfetos, em associação com minérios de outros metais, carvão e sedimentos (BENCKO; FOONG, 2017). O arsênio elementar forma trióxidos ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) e pentóxidos ( $\text{As}_2\text{O}_5$ ). Na água, o  $\text{As}^{\text{III}}$  forma o ácido arsenoso, que origina alguns sais, incluindo o arsenito de sódio ( $\text{NaAsO}_2$ ). O arsenito de sódio foi extremamente utilizado como herbicida (Agent Blue<sup>®</sup>) e conservante de madeira (sal de Wolman) (BENCKO; FOONG, 2017). Segundo SOUZA *et al.* (2019), substâncias contendo o As são usadas irrestritamente no Brasil: O metil arsenato monossódico é um herbicida utilizado em plantações de café, algodão, cana de açúcar e citrus; o arseniato de cobre cromatado é um conservante de madeira, utilizado no tratamento do eucalipto.

As principais vias de exposição ao As se dão pela ingestão de água e alimentos contaminados, embora a exposição ocupacional por meio da inalação também ocorra (ZHOU; XI, 2018). Atualmente, estima-se que 200 milhões de pessoas ao redor do mundo estejam expostas cronicamente ao As, principalmente pela água, em concentrações superiores ao limiar estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*), de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  (WHO, 2010a; NAUJOKAS *et al.*, 2013). Em águas profundas e superficiais as concentrações variam entre 0,5 e  $5000 \mu\text{g.L}^{-1}$  (MANDAL; SUZUKI, 2002). Os países com os maiores índices de contaminação são Bangladesh, Índia, Taiwan, China, Chile, Argentina, México e Estados Unidos (DANGLEBEN; SKIBOLA; SMITH, 2013; ZHOU; XI, 2018). Contudo, na França, Polônia, Vietnã, Turquia, Canadá também já foram reportadas concentrações consideradas tóxicas (SOUZA *et al.*, 2019).

No Brasil, há poucos estudos sobre as concentrações de As, embora, três regiões têm sido avaliadas devido a intensa atividade de mineração: Quadrilátero Ferrífero (MG), Vale do Ribeira (PR e SP) e Santana (AP) (SOUZA *et al.*, 2019). No Quadrilátero Ferrífero, foram encontradas em águas superficiais concentrações entre 57,7 e  $414 \mu\text{g.L}^{-1}$ , em águas profundas a concentração máxima foi de  $2980 \mu\text{g.L}^{-1}$  e em sedimentos entre 0,63 e  $1961 \text{mg.kg}^{-1}$ . No Vale do Ribeira, em sedimentos foram encontradas concentrações de aproximadamente  $345 \text{mg.kg}^{-1}$  e na água superficial entre 1 e  $9 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Em Santana, nos rios foram observadas concentrações próximas a  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$  696 e  $1600 \text{mg.kg}^{-1}$  em sedimentos (SOUZA *et al.*, 2019). No Rio de Janeiro, Fernandes *et al.* (2018) avaliaram a concentração de As em amostras biológicas em crianças de escolas públicas. Os autores relataram concentrações de As acima dos valores reportados para população não expostas, sendo observados valores acima de  $40 \mu\text{g.L}^{-1}$  na urina.

Além disso, foi encontrada uma associação entre o consumo de frutos do mar e concentrações elevadas de As no cabelo. Quintela *et al.* (2019) encontraram na Reserva Ecológica do Taim (RS) as maiores concentrações de As já relatadas em peixes utilizados na dieta humana (até 19,46  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Os autores sugerem que estes dados podem estar relacionados a atividades agrícolas presentes na região.

O As, uma vez internalizado pelos organismos, passa pelos processos de redução e metilação. O  $\text{As}^{\text{v}}$  é transformado em  $\text{As}^{\text{III}}$ , em seguida é convertido em monometil-arsênio (MMA) e, por fim, em dimetil-arsênio (DMA) (HONG; SONG; CHUNG, 2014). Embora a metilação de substâncias exógenas possua o objetivo de reduzir a sua toxicidade e aumentar a solubilidade, a metilação parcial do arsênio aumenta a sua toxicidade (TCHOUNWOU; CENTENO; FOOD, 2003). Quanto à excreção, estima-se que 10 a 20% do As seja eliminado como As inorgânico, 10 a 15% como MMA e 60 a 75% como DMA (ARGOS; AHSAN; GRAZIANO, 2012). Contudo, há uma variabilidade interindividual na capacidade de metilação do As que explica parcialmente a suscetibilidade diferencial de toxicidade em humanos (MINATEL *et al.*, 2018).

A Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer, órgão pertencente à OMS, classificou o As como carcinógeno de classe I, devido a associação entre a concentração de arsênio na água de consumo e o risco elevado de desenvolvimento de câncer de pele, pulmão, bexiga, fígado, rim, próstata, útero e mama (ARGOS; AHSAN; GRAZIANO, 2012). A exposição crônica ao As ainda pode causar outras doenças, como obesidade, diabetes, problemas reprodutivos, malformações, doença pulmonar obstrutiva, doenças neurológicas e cardiovasculares e hiperqueratose. Quanto a exposição aguda, são relatados os seguintes sintomas: vômito, náuseas, dores abdominais, queda gradual da pressão arterial, desidratação e diarreia (BENCKO; FOONG, 2017). Levando em conta tais doenças, sintomas e a exposição humana, a OMS classificou o As como uma das dez substâncias de maior preocupação para a saúde pública (WHO, 2010b).

Os mecanismos gerais de toxicidade do As descritos até o momento incluem genotoxicidade, redução da atividade das enzimas de reparo de DNA, alterações cromossômicas, alteração da expressão gênica, mecanismos epigenéticos e estresse oxidativo (ZHOU; XI, 2018). Diversos estudos mostram que o arsênio é tóxico para o sistema reprodutor masculino e, sobretudo, o testículo. O As é capaz de reduzir o peso dos testículos e o diâmetro dos túbulos seminíferos, diminuir a atividade do sistema antioxidante e liberar EROs, causar alterações epigenéticas nas células de Leydig, diminuir a produção de testosterona, inibir o eixo

hipotálamo-hipófise-gônada via redução da produção de LH e FSH, reduzir e alterar a morfologia e a contagem de espermatozoides<sup>3</sup>, aumentar a concentração de corticosterona (que inibe o eixo reprodutivo) e reprimir a atividade transcricional do AR (RENU *et al.*, 2018). Ainda, foi proposto que o As atue como metaloestrógeno, agindo como um agonista do ER- $\alpha$  (JANA; JANA; SAMANTA, 2006). Outro mecanismo que parece ser importante e pouco explorado é a indução de marcadores inflamatórios por meio da ativação de macrófagos. Foi demonstrado que, em ratos, a exposição aguda ao As por dois dias e em alta concentração (10 mg.kg<sup>-1</sup> de arsenito de sódio) induz a produção dos marcadores inflamatórios TNF- $\alpha$ , iNOS, COX-2, fator endotelial de crescimento vascular, NF- $\kappa$ B e caspase-3. Em frangos neonatos, a exposição ao trióxido de arsênio (7,5 15 ou 30 mg.kg<sup>-1</sup> por 30, 60 e 90 dias) levou a produção de NF- $\kappa$ B, iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$  e prostaglandina E sintase (RENU *et al.*, 2018). No entanto, estes dados foram obtidos sob concentrações extremamente elevadas, as quais não são ambientalmente relevantes e, em um destes estudos, o trióxido de arsênio e não o arsenito de sódio foi empregado.

## 2.2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Desde a segunda metade do século XX, a saúde reprodutiva de homens tem sido alterada, cujos impactos são refletidos na redução da contagem de espermatozoides (LEVINE *et al.*, 2017). Um possível fator etiológico envolvido em tal redução é a exposição ubíqua aos DEs (YANG *et al.*, 2015), o que pode apresentar implicações importantes na reprodução humana e de outros animais. Como discutido anteriormente, os DEs são capazes de impactar o funcionamento do sistema endócrino, prejudicando diversas funções no organismo, incluindo a reprodução. O As é um DE que impacta o sistema reprodutor. Embora o seu mecanismo de ação não esteja completamente elucidado, há evidências suficientes para afirmar que o As é um agonista do receptor estrogênico, inibidor síntese e secreção de gonadotropinas, além de também poder comprometer o funcionamento da célula de Leydig, que tem como desfecho uma menor concentração de testosterona (IAVICOLI; FONTANA; BERGAMASCHI, 2009; RENU *et al.*, 2018). Esta interferência na síntese de testosterona resulta na diminuição da contagem espermática, fato observado em humanos (XU *et al.*, 2012).

---

<sup>3</sup> Já foi constatado em estudos epidemiológicos que o As reduz a qualidade do sêmen em humanos (XU *et al.*, 2012).

Somado a isso, o As pode desencadear uma resposta inflamatória em diversos tecidos, levando ao aumento de mediadores pró-inflamatórios, como a IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-4, IL-6 e NO (DANGLEBEN; SKIBOLA; SMITH, 2013; PRASAD; SINHA, 2017). No testículo, já foi verificado que as administrações agudas de trióxido de arsênio e arsenito de sódio podem induzir a expressão dos mediadores pró-inflamatórios nos testículos de frangos e ratos, respectivamente (RENU *et al.*, 2018). Estes mediadores podem inibir a expressão e a função da via da produção da testosterona (HALES, 2002). Estudos envolvendo a aplicação sistêmica de lipopolissacarídeos (LPS), demonstraram a diminuição da produção de testosterona (O'BRYAN *et al.*, 2000; REDDY *et al.*, 2006). Homens que apresentam doenças crônicas, queimaduras, sepse e artrite reumatoide, possuem uma baixa concentração sérica de testosterona (HALES, 2002), evidenciando que a produção sistêmica de mediadores pró-inflamatórios pode interferir no funcionamento da célula de Leydig. Contudo, até o momento nenhum estudo avaliou qual é o papel do sistema imunológico e, principalmente, dos macrófagos, no testículo após a exposição oral crônica ao arsenito de sódio, sobretudo, em doses semelhantes com as encontradas no ambiente, como de 1 e 5 mg.kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. A hipótese desta dissertação é que a exposição crônica ao arsenito de sódio possa induzir o aumento da expressão de marcadores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , ambos capazes de prejudicar a esteroidogênese testicular, o que levaria a redução da produção e concentração de testosterona, cujos impactos são visualizados em alterações da contagem e da morfologia espermática. Além disso, se a exposição crônica ao arsenito de sódio pode desencadear uma resposta inflamatória, a co-exposição com LPS desempenharia um efeito sinérgico ou aditivo, promovendo ainda mais o aumento da expressão de mediadores pró-inflamatórios, com impactos mais severos na esteroidogênese e espermatogênese.

Este estudo visa responder também se a possível associação entre a diminuição da produção da testosterona e o aumento de citocinas pró-inflamatórias poderia apresentar impactos na BHT e demais junções celulares presentes dentro do túbulo seminífero, levando a perda de adesão das células, que por sua vez, prejudicaria a produção de espermatozoides. Sabe-se que o As pode reduzir a expressão das proteínas de membrana claudina-11 e ocludina (JEONG *et al.*, 2017; RAMOS-TREVIÑO *et al.*, 2017), ambas presente na BHT.

Por fim, foi mencionado acima que o As apresenta efeitos estrogênicos no testículo. Jana, Jana e Samanta (2006) comparam a exposição ao As com a exposição ao estradiol, onde foi relatado efeitos semelhantes e sinergismo (na co-exposição), como a inibição do eixo hipotálamo-hipófise-testículo, indicando um efeito estrogênico deste metaloide. Além do

agonismo direto do receptor estrogênico (DARBRE, 2006), é possível supor que os efeitos estrogênicos do As sejam oriundos do aumento da síntese de estradiol, via aumento da expressão da enzima CYP19A1, ou aromatase. Um estudo *in vitro* demonstrou que a exposição ao arsenito de sódio induziu a superexpressão de aromatase na linhagem celular MCF-10A (XU; TOKAR; WAALKES, 2014), indicando um mecanismo de toxicidade adicional do As. No entanto, a análise de expressão dessa enzima nunca foi realizada no testículo sob exposição crônica ao arsenito de sódio. A Figura 3 ilustra a hipótese desta dissertação.

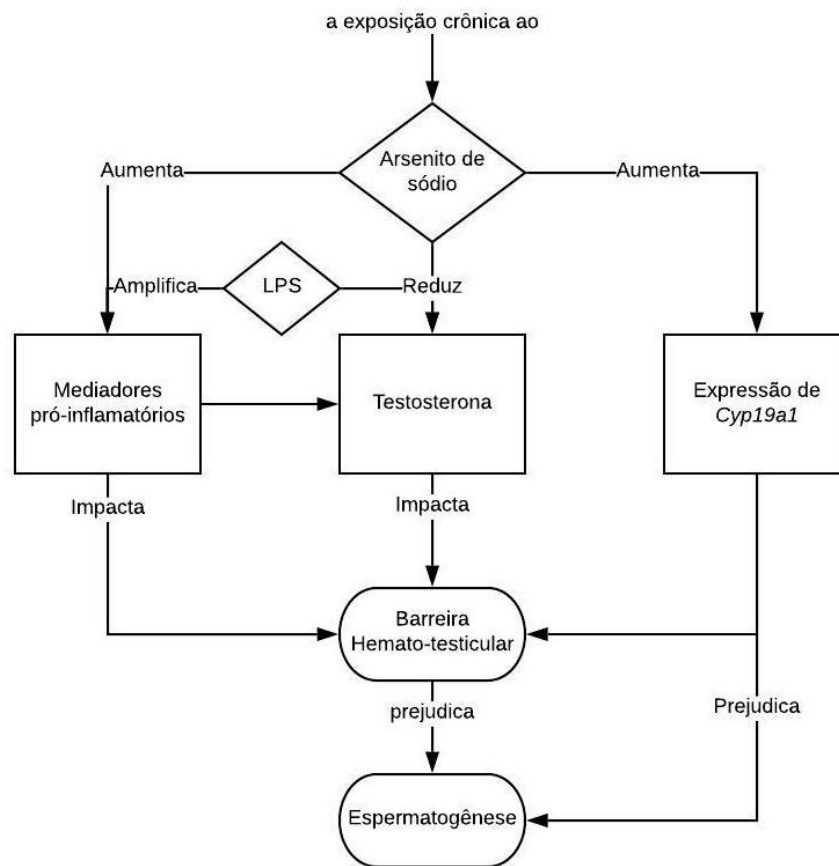


Figura 3 – Representação esquemática das hipóteses propostas nesta dissertação.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos da exposição crônica ao arsenito de sódio sobre as funções esteroidogênicas e gametogênicas em ratos e examinar a possível participação da ativação de macrófagos e da resposta inflamatória nesses processos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os efeitos do arsenito de sódio sobre o *status* androgênico e a expressão de enzimas esteroidogênicas;
- Investigar os efeitos do arsenito de sódio sobre a contagem e a morfologia espermática e a histologia testicular;
- Verificar se os tratamentos crônicos (60 dias) com arsenito de sódio, associados ou não a um tratamento agudo com LPS resultarão em alterações nas subpopulações de macrófagos testiculares M1 e M2;
- Analisar se o cotratamento de arsenito de sódio e LPS resulta em efeitos testiculares mais severos, associados a alterações nas subpopulações de macrófagos e perfil de citocinas expressas.

Observação: As acadêmicas Daniele Cristine Krebs Ribeiro e Marcella Tapias Passoni Pereira da Silva participaram na eutanásia e coleta de órgãos dos animais. Os dados de RT-qPCR foram obtidos pela colaboração da professora doutora Renata Marino Romano, da Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná e de suas alunas Jeane Maria de Oliveira e Isabela Medeiros de Oliveira; os dados histológicos foram obtidos pela colaboração da professora doutora Fabrícia de Souza Predes, da Universidade Estadual do Paraná e de suas alunas Camila Merino, Jéssica Maiara Marques Sandri e Mylla Freitas de Almeida; os dados da concentração de testosterona e metabólitos esteroides fecais foram obtidos graças à colaboração da professora Katherinne Maria Spercoski; os dados de contagem espermática foram obtidos por meio da colaboração da doutoranda Carla Giovana Basso; os dados de massa corporal e tratamento dos animais foram possíveis por meio da participação das alunas Bruna Furtado da Costa e Samara

Christina França de Almeida. O autor desta dissertação, Anderson Tadeu de Araújo Ramos, participou efetivamente de todos os procedimentos experimentais, análise e interpretação de dados, redação do artigo e da dissertação. O professor doutor Anderson Joel Martino Andrade participou como orientador e coordenador desta dissertação.

#### 4 ARTIGO CIENTÍFICO

### IMMUNOLOGICAL, MORPHOLOGICAL, AND ENDOCRINE ASPECTS OF THE TESTICULAR SODIUM ARSENITE TOXICITY IN RATS

Anderson Tadeu de Araújo-Ramos<sup>1</sup>, Carla Giovana Basso<sup>1</sup>, Marcella Tapias Passoni<sup>2</sup>,  
Daniele Cristine Krebs Ribeiro<sup>2</sup>, Katherinne Maria Spercoski<sup>3</sup>, Jeane Maria de Oliveira<sup>4</sup>,  
Isabela Medeiros de Oliveira<sup>4</sup>, Renata Marino Romano<sup>4</sup>, Camila Merino<sup>5</sup>, Jéssica Maiara  
Marques Sandri<sup>5</sup>, Mylla Freitas de Almeida<sup>5</sup>, Fabrícia de Souza Predes<sup>5</sup>, Anderson Joel  
Martino-Andrade<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Department of Physiology, Animal Endocrine and Reproductive Physiology Laboratory,  
Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil;

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, Reproductive Toxicology Laboratory, Federal University of  
Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil;

<sup>3</sup>Department of Biosciences, Federal University of Paraná (UFPR), Palotina, PR, Brazil;

<sup>4</sup>Department of Pharmacy, Laboratory of Reproductive Toxicology, State University of Centro-  
Oeste, Guarapuava, Brazil;

<sup>5</sup>Department of Biological Sciences, Laboratory of Morphology, State University of Paraná,  
Paranaguá, PR, Brazil.

#### **Corresponding author:**

Anderson Joel Martino Andrade

Laboratório de Fisiologia Endócrina e Reprodutiva Animal, Departamento de  
Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico –  
Jardim das Américas, ZIP 81531-980, Curitiba – PR, PO Box 19031, Brazil.

Phone: + 55 41 3361-1719

E-mail: [anderson.andrade@ufpr.br](mailto:anderson.andrade@ufpr.br)

## 5 INTRODUCTION

Arsenic (As) is a metalloid widespread in the world, which occurs naturally, by volcano activity and dissolution of minerals in groundwater. However, anthropogenic influences have been increasing its levels, like mining, metal smelting, combustion of fossil fuels, uses as a wood preservative, and in agriculture, acting as a praguicide agent (WHO, 2010a). Thus, humans are exposed to As mainly through consumption of contaminated water and food, and inhalation as an occupational via by workers (FLORA; AGRAWAL, 2017). It is estimated that 200 million people in 70 countries are exposed to As to concentrations at or above the WHO threshold ( $10 \mu\text{g. L}^{-1}$ ), where most occurrences are in India, Bangladesh, Taiwan, Chile, and the United States (DANGLEBEN; SKIBOLA; SMITH, 2013; MINATEL *et al.*, 2018; WHO, 2010a).

Since As is a very toxic substance, the World Health Organization (WHO) has classified it as one of the 10 chemicals of major public health concern (WHO, 2010b). Its toxicity culminates in various types of cancer, such as skin, lung, breast, bladder, uterus, kidney, liver, and prostate (IARC, 2004). Besides of that, As exposure results in deregulation of the reproductive system (BOURGUIGNON *et al.*, 2017; CHOWDHURY *et al.*, 2017; DANGLEBEN; SKIBOLA; SMITH, 2013; IAVICOLI; FONTANA; BERGAMASCHI, 2009; JAMES *et al.*, 2015; RENU *et al.*, 2018; SIDHU *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2016; XU; TOKAR; WAALKES, 2014).

As can be considered an endocrine-disrupting chemical (EDC) through its influences on the endocrine system (IAVICOLI; FONTANA; BERGAMASCHI, 2009; SUN *et al.*, 2016). A classical definition of U. S. Environmental Protection Agency about EDCs is “an agent that interferes with the synthesis, secretion, transport, binding or elimination of natural hormones in the body that are responsible for the maintenance of homeostasis, reproduction, development and/or behavior” (KAVLOCK *et al.*, 1996). It was showed that sodium arsenite (a trivalent arsenic species) exposure leads to a decrease of LH and FSH secretion from pituitary, androgen-receptor (AR) and some key steroidogenic enzymes (CYP11, CYP17, and  $3\beta$ -HSD) subexpression in the testis, corroborating that As is an EDC (SUN *et al.*, 2016). Besides of that, there is some evidence As can act as a metalloestrogen, i.e., As can bind to the estrogen receptor (ER- $\alpha$ ) and promote estrogenic effects (DARBRE, 2006; JANA; JANA; SAMANTA, 2006),

It is believed that main arsenic toxicity mechanisms in the testis are mediated by oxidative stress through the generation of reactive oxygen species (ROS), mitochondria

disruption, binding in cysteine-rich proteins, DNA, and membrane lipids. Besides overexpression of DNA repair enzymes, resulting in chromosomal aberrations, mutations, membrane peroxidation, and cellular signaling pathways disorders, which results in male infertility (RENU *et al.* 2018; MINATEL *et al.* 2018). However, there is no study have analyzed the testicular macrophage participation in endocrine disruption.

Macrophages are components of the innate immune system, which participate in antigen-presenting to the adaptive immune system, microbial elimination, phagocytosis, and inflammation (SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018). But, testicular macrophages (TMs) are key cells to promote homeostasis and androgen production, once they secrete 25-hydroxycholesterol, a stimulatory and precursor molecule to testosterone synthesis in Leydig cells (HUTSON, 2006). Moreover, there is an intimate relationship between TMs and Leydig cells, which they posse a membrane specialization, called digitations, which seems to regulate steroidogenesis. By the way, the homeostatic macrophage population in the testis displays an M2 phenotype (BHUSHAN; MEINHARDT, 2017). However, in immunological challenges, when testis undergoes an increase of M1/M2 ratio phenotype, steroidogenesis is inhibited, through pro-inflammatory cytokines and other immunological mediators that downregulate the expressions of steroidogenic enzymes and decrease their activity (HALES, 2002). Thus, it is important to investigate if environmental substances, such as arsenic, could lead to an increase of the M1 macrophage population in the testis, and thus, result in infertility. So, the aim of this study was to asses if sodium arsenite disturbs the gametogenic and steroidogenic function in rats and also to assess the possible participation of macrophages in these processes.

## 6 MATERIAL AND METHODS

### 6.1 ANIMALS

60-days-old Wistar rats were obtained from the animal facilities of the Universidade Federal do Paraná. The protocol was approved by the local Ethics Committee on Animal Use (CEUA, registration number: 1221). Animals underwent acclimatization by one month until the beginning of the experiments when they were approximately 90-days-old. During all experimental period, animals were kept under a 12-h light/dark cycle, controlled temperature ( $22 \pm 2$  °C), and housed in groups of 3-4 animals in polypropylene cages (414 mm  $\times$  344 mm  $\times$  168 mm). Standard pellet food (NUVILAB-CR1; QUIMTIA, Colombo, Brazil) and tap water were provided ad libitum.

### 6.2 CHEMICALS AND EXPERIMENTAL DESIGN

Chemicals and reagents used in this experiment included Lipopolysaccharides (LPS from *Escherichia coli*, O127: B8, Sigma-Aldrich), Sodium arsenite (Sigma-Aldrich) CAS number: 7784-46-5, Isofluorane CAS number: 26675-46-7, Trizol<sup>®</sup> (Life Technologies) CAS-number: 136426-54-5.

90-days old male rats were divided into 5 groups ( $n = 15$  rats/group): vehicle group (distilled water), As1 (1 mg.kg.day<sup>-1</sup> of sodium arsenite), As5 (5 mg.kg.day<sup>-1</sup> of sodium arsenite), LPS (distilled water and 50  $\mu$ g.kg<sup>-1</sup> of LPS) and As5 + LPS (5 mg.kg.day<sup>-1</sup> of sodium arsenite and 50  $\mu$ g.kg<sup>-1</sup> of LPS). Animals were exposed to distilled water or sodium arsenite by gastric gavage during 60 days, and LPS dissolved in ultrapure water was administered by a single intraperitoneal injection at the 59<sup>th</sup> day of treatment to animals from LPS and As5+LPS group. The 60-day treatment was chosen because this period corresponds approximately to a complete spermatogenic cycle in the rat (RUSSEL 1990). The selection of the highest dose (As 5 mg.kg<sup>-1</sup>) was based on our previous As toxicity study (RAMOS *et al.* 2017), which reported changes in testicular morphometric parameters in adult rats, while in the current study we also included a lower dose (As 1 mg.kg<sup>-1</sup>). The LPS treatment with 50  $\mu$ g.kg<sup>-1</sup> was chosen because this is a dose that has been previously reported to induce immunological stimulation in our rat strain (TELLES *et al.*, 2017). Bodyweight was monitored daily throughout the treatment period. In each group, mean body weight on day 0 of treatment was defined as 100%. The body weight

variation across the treatment period was calculated by subtracting the weight of the 60th day of treatment by day 0. To assess the impact of acute LPS administration on day 59, we calculated the bodyweight variation between days 59 and 60.

### 6.3 EUTHANASIA AND ORGANS SAMPLING

After 60-day treatment, a first set of rats ( $n = 7/\text{group}$ ), which organs were destined to histological analysis, were sedated with isoflurane in a closed chamber, and after ventral incision, the diaphragm was cut. Animals were perfused with saline solution to wash the vascular bed and then fixed with Karnovsky fixative solution (2.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde, 0.1 M PBS,  $\text{pH} \approx 7.3$ ) for 25 to 30 minutes. Next, the testes were re-fixed by immersion in the same fixative solution for 24 hours.

A second set of rats ( $n = 6-7/\text{group}$ ) was sedated with isoflurane in a closed chamber and decapitated using a guillotine. Trunk blood was collected into test tubes containing 20  $\mu\text{L}$  of sodic heparin as an anticoagulant. Blood was centrifuged and then stocked at  $-20^\circ\text{C}$  until analysis. From these animals, we recorded the body weight and absolute and relative weights (organ weights divided by body weight multiplied by 100) of the following organs: testis, ventral prostate, bulbourethral glands, seminal vesicle with fluid, levator ani/bulbocavernosus muscle (LABC), kidney, and liver. The left testes were frozen at  $-80^\circ\text{C}$  and then used for RT-QPCR, whereas the right testes were used for spermatid counting. Vas deferens were collected and destined for sperm morphology analysis.

### 6.4 GENE EXPRESSION

The mRNA expression of the following genes was analyzed by RT-QPCR: *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Cyp19a1*, *Star*, *Tnf*, *Il1b*, *Il10*, *Egr2*, *Gpr18*, *Cd68*, *Cd163*, and *Rpl19*. *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Cyp19a1*, and *Star* were chosen because they code for proteins that participate in critical steps of testicular steroids production. *Cd68*, *Tnf* and *Il1b* were analyzed because they are markers expressed by M1 macrophages. On the other hand, *Cd163* and *Il10* are markers produced by M2 macrophages. *Il10* gene is expressed constitutively by resident testicular macrophages (WINNALL; MUIR; HEDGER, 2011; BHUSHAN; MEINHARDT, 2017). Finally, according to Jablonski *et al.* 2015, *Gpr18* and *Egr2* are reliable RT-PCR markers for M1 and M2 macrophages, respectively, and we decided to test if they fit well in our study

design. *Rpl19* was employed as the constitutive gene, as previously reported in other gene expression studies in rat testicular samples (REBOURCET *et al.*, 2010; CURI *et al.*, 2019).

After collection, the testes were frozen at -80 °C until the analysis. Each testis was powdered and 50 mg was transferred to microtubes. Total RNA isolation was performed by the guanidine-phenol-chloroform extraction (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 2006) using Trizol<sup>®</sup>, according to fabricant instructions. After extraction, 2.5 µg RNA was used to synthesize cDNA by reverse transcription reaction, using the GoScript<sup>™</sup> Reverse Transcription System kit (Promega, Madison, USA). Samples were incubated in a thermal cycler (Axygen Maxygene, term-1000) under 70° C by 5 minutes. Next, samples were immediately cold to 4° C and kept at this temperature for 5 minutes. Then, it was added for each sample a solution containing 2 µL enzyme buffer (GoScript 5X), 3.25 µL RNase free ultrapure water, 0.5 µL of ddNTPs, 0.25 µL RNasin, 1µL MgCl<sub>2</sub>, and 0.5 µL mmLv GoScript Reverse Transcriptase enzyme. The reaction with a total volume of 10 µL was incubated in thermal cycler initially by 5 minutes under 25° C, followed by 1 hour under 42° C. In each reaction, 10 µL of cDNA was obtained with a final estimated concentration of 250 ng. µL<sup>-1</sup>. The forward and reverse primers of the selected genes and reference sequences are shown in Table S1. The qPCR was performed using Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR Super Mix-UDG (Life Technologies, Carlsbad, USA). Amplification was done in StepOnePlus<sup>™</sup> Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Singapore), according to the following cycle configurations: 50° C for 2 minutes, 95° C for 2 minutes, and 40 cycles of 95° C for 15 seconds and 60° C for 30 seconds. Mean values of threshold cycle (Ct) were determined by StepOne<sup>™</sup> Software v2.3 (Applied Biosystems) and quantification of gene expression was performed by the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

## 6.5 PLASMA TESTOSTERONE CONCENTRATION

The Enzyme-Linked Immunoassay (ELISA) was performed to determine the concentrations of plasma testosterone using a polyclonal anti-testosterone antibody (R 156/71:7500 dilution) and respective horseradish peroxidase-testosterone conjugate obtained from Coralie Munro at the University of California (Davis, CA, USA). 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt [ABTS]) was used as a substrate buffer containing hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). Absorbance measurements were performed at 405nm in a microplate reader (BioTek, Winooski). Results

were expressed as ng/ml and the assay sensitivity was 2.3 pg/well. All samples were evaluated in duplicate. The testosterone analysis was performed in a single run and the intra-assay coefficients of variation were less than 10%.

## 6.6 SPERM ANALYSIS

For spermatid counting, testis was homogenized in a tissue homogenizer with 10 mL saline solution containing 0.05% Triton x-100. Then, the homogenates were diluted 10x in saline solution and placed into a Neubauer chamber. Two analyzers counted the four peripheral squares twice. Coefficients of variation for intra- and inter-analyzer counting were less than 10%.

For sperm morphology, fresh vas deferens were placed into a microtube containing saline solution and sperm were allowed to diffuse for at least 15 minutes. Then, 10  $\mu$ L were placed into glass slides and analyzed under a contrast phase microscope. Two hundred sperm per animal were categorized as having normal morphology, head abnormalities, and tail abnormalities.

## 6.7 HISTOLOGICAL ANALYSIS

Testis fixed with Karnovsky fixative solution was cut in small pieces and prepared for embedding in glycolmethacrylate (Historesin, Leica). Sections of 4  $\mu$ m thickness were obtained and stained with toluidine blue/1% sodium borate. The volume density of testis compartments (interstitial tissue vs seminiferous epithelium vs tubular lumen) was determined using a 300 points intersection grid projected by Image J software associated with an Olympus BX-40 microscope at 200x magnification. Ten fields were scored for each animal. The volume density of the interstitial tissue components (Leydig cell vs blood vessels vs lymphatic space vs macrophages) were determined using an 1850 points intersection grid projected by the same software at 400x magnification. The tubular diameter and height of seminiferous tubule epithelium were measured at 100x magnification. Thirty tubular profiles that were round or nearly round were chosen randomly and measured for each animal, through the mean between two diametrically opposed measurements. The epithelium height was obtained from the same tubules used to determine the tubular diameter, through the mean between four diametrically opposed measurements.

## 6.8 STATISTICAL ANALYSIS

The statistical analysis was performed using Graph-Pad Prism software version 6.0 (Graph-Pad, San Diego, CA, USA). Normality, heterogeneity of variances, skewness, and kurtosis were evaluated for every data before the test choice. Weight gain was evaluated by Mixed ANOVA, followed by Tukey's post-test, where treatment was considered a between-subjects factor and time the within-subjects factor. Sperm analyses, plasma testosterone, tubular diameter, epithelium height, volumetric densities of histomorphometric analyses, final body, and organs' weights were analyzed by One-Way ANOVA followed by Tukey post-test for parametric data or, alternatively, by Kruskal-Wallis Rank Test followed by Dunn's post-test for non-parametric data. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Results were considered significant when  $p \leq 0.05$ , however, borderline statistical significance ( $p = 0.06$  to  $0.10$ ) were taken into account when the results showed a biological meaning compared to the literature (AMRHEIN; GREENLAND; MCSHANE, 2019).

## 6 RESULTS

### 7.1 WEIGHT GAIN AND FINAL BODYWEIGHT

The body weight gain during the treatment period is represented in Figure 1. Mixed Two-way ANOVA revealed a significant difference in time factor ( $F [9, 630]$ ,  $p < 0.0001$ ) and interaction between time and treatment ( $F [36, 630]$ ,  $p < 0.0001$ ), but no differences were found for the overall treatment factor ( $F [4, 70]$ ,  $p = 0.7687$ ). Tukey's post hoc test revealed no differences between treatment groups at different time points. However, acute LPS administration on day 59 resulted in a significant drop in body weight measured on day 60. The body weight change between days 59 and 60 was significant in the post hoc test, but only for the groups treated with LPS and As5 + LPS. This was further confirmed by the analysis of the weight difference between days 59 and 60, which resulted in a significant weight loss in LPS and As5+LPS groups in relation to all other groups ( $p < 0.001$  for all pairwise comparisons between LPS or As5+LPS and all other groups).

The final body weights of the animals are shown in Table 1. There was a reduction of As1 weight ( $p = 0.0453$ ), and a borderline significant reduction of As5 and As5+LPS (both  $p =$

0.065) in relation to the control group. As1 ( $p = 0.0113$ ) and As5 ( $p = 0.0169$ ) displayed lower body weight in relation to LPS group.

The absolute and relative organs' weight are shown in Table 1. We did not observe any significant differences between groups for absolute and relative testis weights. All treated groups showed a reduction in absolute and relative ventral prostate weights in relation to control, except for the relative prostate weight of As1. The weights of other androgen-dependent organs were also affected in some of our treatment groups. As5 group showed a significant reduction in absolute seminal vesicle weight ( $p = 0.0369$ ) and a reduction of borderline significance for LABC weight ( $p = 0.065$ ) in comparison to control, while the treatment with As5+LPS resulted in a reduction of absolute LABC weight ( $p = 0.04$ ) when compared to control. Also, the absolute weight of the bulbourethral glands of the As1 group was lower than the control ( $p = 0.0290$ ). Nonreproductive organs weights, and in particular the liver, were also responsive to As treatment. As5 and As5+LPS increased the relative liver weight in relation to control ( $p = 0.0009$  and  $<0.0001$ , respectively), while As5+LPS also increased the absolute liver weight in relation to control ( $p = 0.0334$ ) and to As1 ( $p = 0.0092$ ). Animals treated with As5+LPS also had higher relative liver weights in comparison to LPS (0.0068). As1 reduced the absolute kidney weight in relation to LPS ( $p = 0.0048$ ).

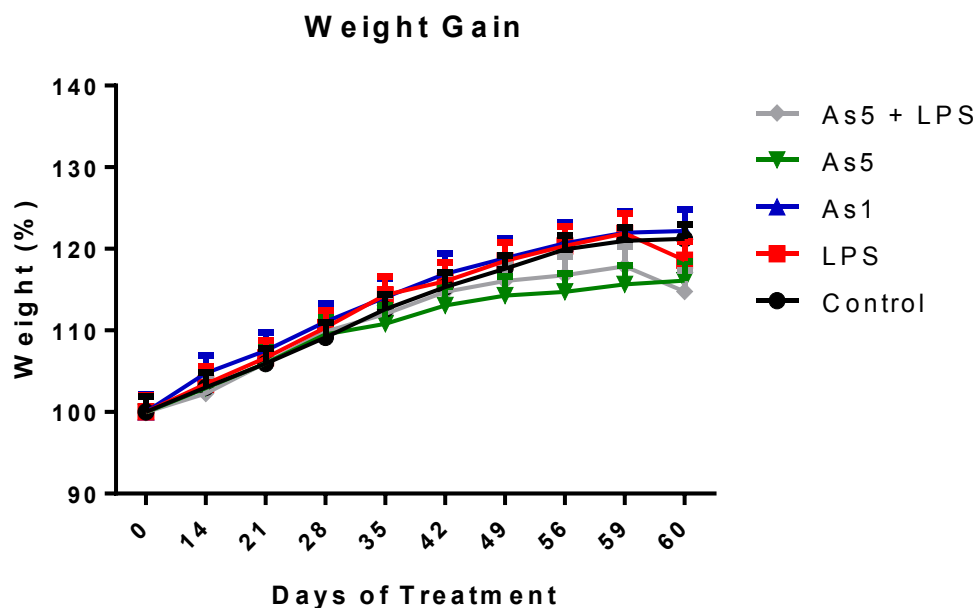


Figure 1 – Normalized weight gain throughout the treatment of 60 days. In each group, the first day of treatment was set at 100%. Mixed ANOVA/Tukey revealed a significant difference in time factor ( $F [9, 630]$ ,  $p < 0.0001$ ) and interaction between time and treatment ( $F [36, 630]$ ,  $p < 0.0001$ ), but no significant differences in pairwise comparisons.  $N = 15$ , except for LPS group,  $N = 14$ . Data expressed by mean and standard deviation.

Table 1 – Absolute and relative (%) organ weights.

| Parameters                     | CONTROL                    | LPS                           | As1                           | As5                             | As5 + LPS                        |
|--------------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
|                                | N = 15                     | N = 14                        | N = 15                        | N = 15                          | N = 15                           |
| Final body weight              | 497.3 ± 27.64 <sup>a</sup> | 504.9 ± 39.18 <sup>a,b</sup>  | 459.1 ± 37.81 <sup>c</sup>    | 461.1 ± 35.69 <sup>a,c\$</sup>  | 479.1 ± 42.09 <sup>a,b,c\$</sup> |
| Weight variation: day 0 to 60  | 87.07 ± 16.65 <sup>a</sup> | 82.73 ± 27.67 <sup>ab</sup>   | 83.33 ± 18.24 <sup>abc</sup>  | 64 ± 13.83 <sup>bcd&amp;#</sup> | 61.67 ± 18.27 <sup>d</sup>       |
| Weight variation: day 59 to 60 | 1.07 ± 2.94 <sup>a</sup>   | -14.93 ± 9.91 <sup>b</sup>    | 0.73 ± 4.33 <sup>a</sup>      | 1.87 ± 4.42 <sup>a</sup>        | -12.93 ± 10.75 <sup>b</sup>      |
|                                | N = 7-8                    | N = 7                         | N = 6-8                       | N = 7-8                         | N = 8                            |
| Testis (g)                     | 2.23 ± 0.19                | 2.14 ± 0.15                   | 2.02 ± 0.03                   | 2.05 ± 0.10                     | 2.10 ± 0.16                      |
| Testis (%)                     | 0.45 ± 0.04                | 0.41 ± 0.04                   | 0.44 ± 0.04                   | 0.44 ± 0.04                     | 0.44 ± 0.04                      |
| Ventral prostate (mg)          | 503.8 ± 0.11 <sup>a</sup>  | 352.9 ± 0.10 <sup>b</sup>     | 365 ± 0.03 <sup>b</sup>       | 307.1 ± 0.08 <sup>b</sup>       | 335 ± 0.04 <sup>b</sup>          |
| Ventral prostate (%)           | 0.10 ± 0.02 <sup>a</sup>   | 0.07 ± 0.02 <sup>b</sup>      | 0.08 ± 0.01 <sup>a,b</sup>    | 0.07 ± 0.02 <sup>b</sup>        | 0.07 ± 0.01 <sup>b</sup>         |
| Seminal vesicle (g)            | 1.86 ± 0.40 <sup>a</sup>   | 1.61 ± 0.34 <sup>a,b</sup>    | 1.53 ± 0.29 <sup>a,b</sup>    | 1.36 ± 0.13 <sup>b</sup>        | 1.48 ± 0.35 <sup>a,b</sup>       |
| Seminal vesicle (%)            | 0.37 ± 0.07                | 0.31 ± 0.07                   | 0.34 ± 0.06                   | 0.29 ± 0.03                     | 0.31 ± 0.07                      |
| Bulbourethral gland (mg)       | 163.8 ± 0.05 <sup>a</sup>  | 152.9 ± 0.03 <sup>a,b</sup>   | 102.9 ± 0.04 <sup>b</sup>     | 124.3 ± 0.04 <sup>a,b</sup>     | 126.3 ± 0.03 <sup>a,b</sup>      |
| Bulbourethral gland (%)        | 0.03 ± 0.01                | 0.03 ± 0.01                   | 0.02 ± 0.01                   | 0.03 ± 0.01                     | 0.03 ± 0.01                      |
| LABC (g)                       | 1.28 ± 0.17 <sup>a</sup>   | 1.16 ± 0.09 <sup>a,b</sup>    | 1.09 ± 0.16 <sup>a,b</sup>    | 1.05 ± 0.14 <sup>\$b</sup>      | 1.05 ± 0.12 <sup>b</sup>         |
| LABC (%)                       | 0.26 ± 0.02                | 0.22 ± 0.03                   | 0.24 ± 0.03                   | 0.23 ± 0.03                     | 0.22 ± 0.03                      |
| Liver (g)                      | 15.39 ± 1.42 <sup>a</sup>  | 17.33 ± 1.63 <sup>a,b,c</sup> | 14.93 ± 1.93 <sup>a,b,c</sup> | 17.48 ± 1.70 <sup>a,b</sup>     | 18.15 ± 2.23 <sup>b</sup>        |
| Liver (%)                      | 3.09 ± 0.20 <sup>a</sup>   | 3.29 ± 0.40 <sup>a,b</sup>    | 3.34 ± 0.24 <sup>a,b,c</sup>  | 3.68 ± 0.22 <sup>b,c,d</sup>    | 3.78 ± 0.17 <sup>d</sup>         |
| Kidney (g)                     | 1.50 ± 0.10 <sup>a</sup>   | 1.68 ± 0.23 <sup>a,b</sup>    | 1.36 ± 0.17 <sup>a,c</sup>    | 1.48 ± 0.17 <sup>a,b,c</sup>    | 1.51 ± 0.13 <sup>a,b,c</sup>     |
| Kidney (%)                     | 0.30 ± 0.02                | 0.32 ± 0.05                   | 0.30 ± 0.02                   | 0.31 ± 0.03                     | 0.32 ± 0.02                      |

Data expressed by mean ± standard deviation. LABC – Levator ani/bulbocavernosus muscle.

Different letters indicate statistically significant ( $p \leq 0.05$ ). One-Way ANOVA/Tukey for all parameters, except for LABC (g and %) and weight variation from day 59 to 60: Kruskal-Wallis/Dunn. Symbols: borderline significance in relation to control (\$), LPS (&) and As1 (#).

## 7.2 GENE EXPRESSION

Data on relative gene expression of the steroidogenic markers are shown in Figure 2 and Figure 3, respectively. We did not observe significant differences in relative gene expression for *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Cyp19a1*, and *Egr2*. *Tnf*, *IL10* and *IL1b* gene expression was higher in LPS ( $p = 0.046$ ;  $0.007$ ;  $0.028$ , respectively) and As5+LPS ( $p = 0.078$ ;  $0.007$ ;  $0.003$  respectively) in relation to control. Also, *Il1b* expression was higher in As5+LPS in relation to As5 ( $p = 0.0245$ ). Similarly, *Gpr18* expression was higher in LPS with borderline significance ( $p = 0.07$ ) and in As5+LPS ( $p = 0.0237$ ) in comparison to control. Besides that, *Gpr18* in LPS group was also higher than As1 ( $p = 0.0329$ ) and As5 ( $p = 0.0235$ ). We did not find any statistical difference between the groups for the expression of the M2 marker *Cd163*. On the other hand, the M1 macrophage marker *Cd68* showed overexpression in the LPS group ( $p = 0.05$ ).

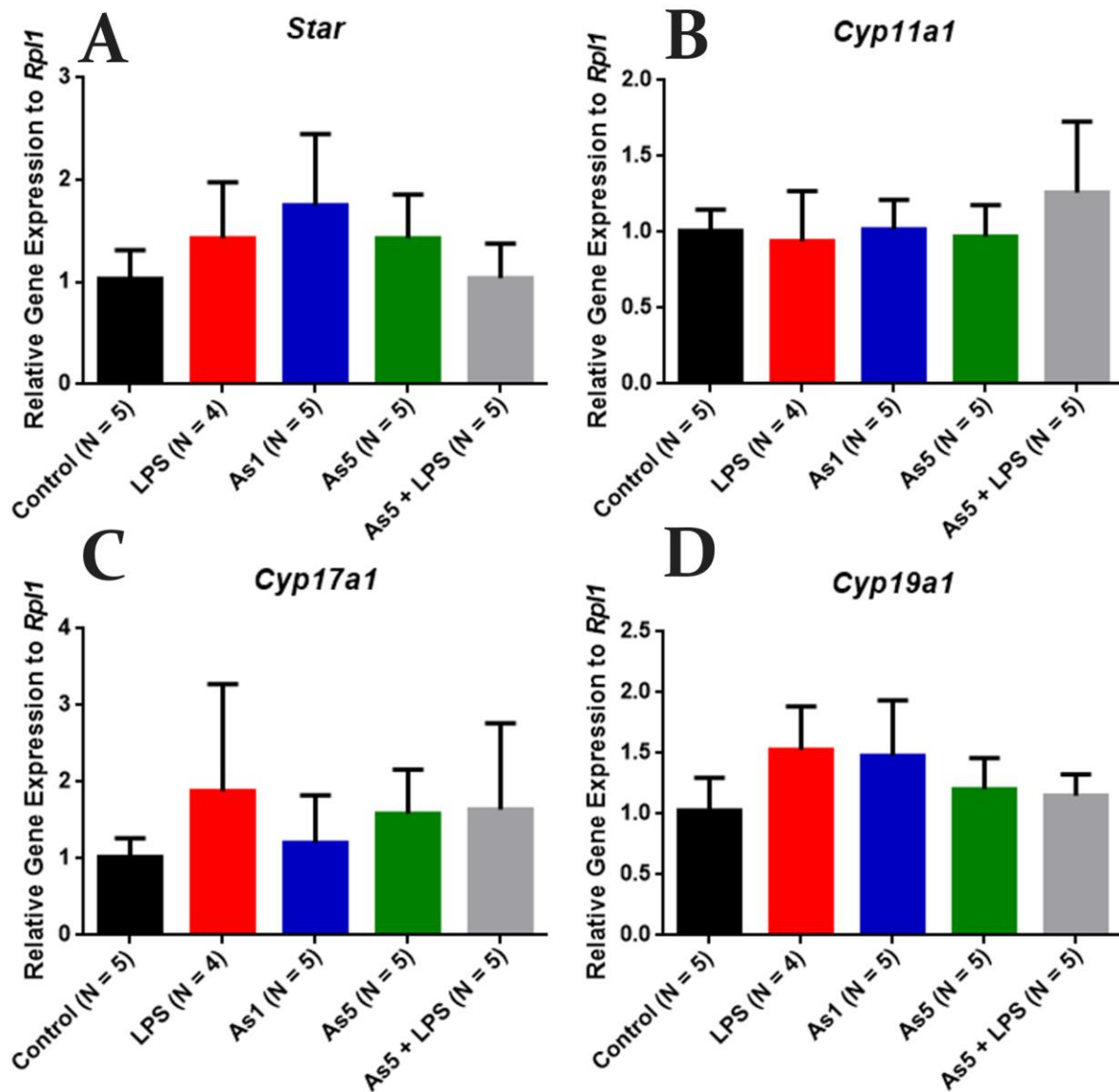


Figure 2 - Relative gene expression of the steroidogenic enzymes *Star* (A), *Cyp11a1* (B), *Cyp17a1* (C) and *Cyp19a1* (D). One-Way ANOVA/Tukey for *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp19a1*, and Kruskal-Wallis/Dunn for *Cyp17a1*. Bars = mean and standard deviation. Different letters indicate statistical significance ( $p \leq 0.05$ ).

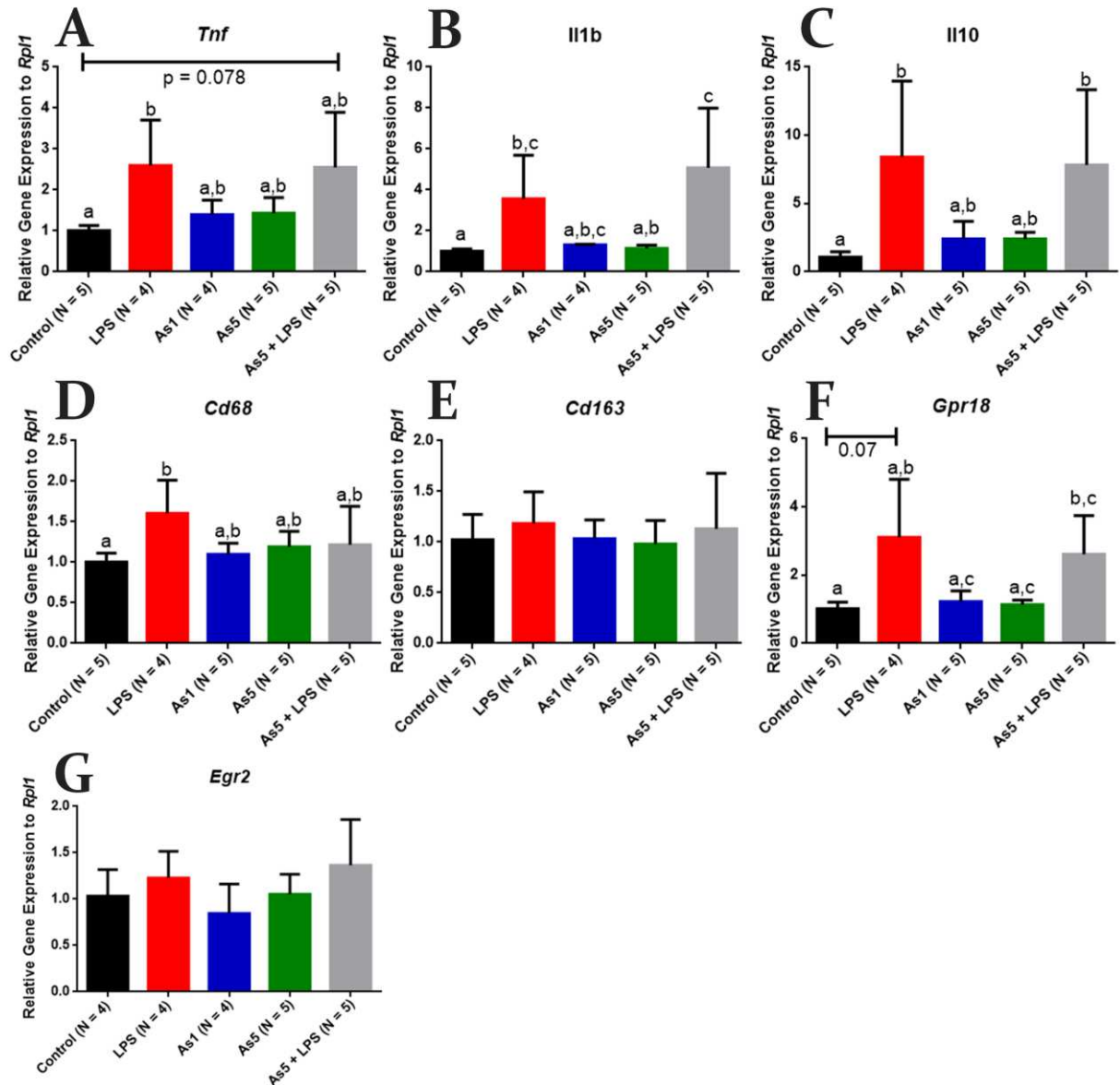


Figure 3 - Relative gene expression of the steroidogenic enzymes *Tnf* (A), *Il1b* (B), *Il10* (C), *Cd68* (D), *Cd163* (E), *Gpr18* (F) and *Egr2* (G). One-Way ANOVA/Tukey for *Cd163* and *Cd68*, and Kruskal-Wallis/Dunn for *Tnf*, *Il1b*, *Il10*, *Gpr18*, and *Egr2*. Bars = mean and standard deviation. Different letters indicate statistical significance ( $p \leq 0.05$ ).

### 7.3 PLASMA TESTOSTERONE CONCENTRATION

Data on plasma testosterone concentrations are shown in Figure 4. There was a reduction in As5+LPS plasma testosterone concentrations in comparison to control ( $p = 0.05$ ) and LPS ( $p = 0.05$ ) groups.

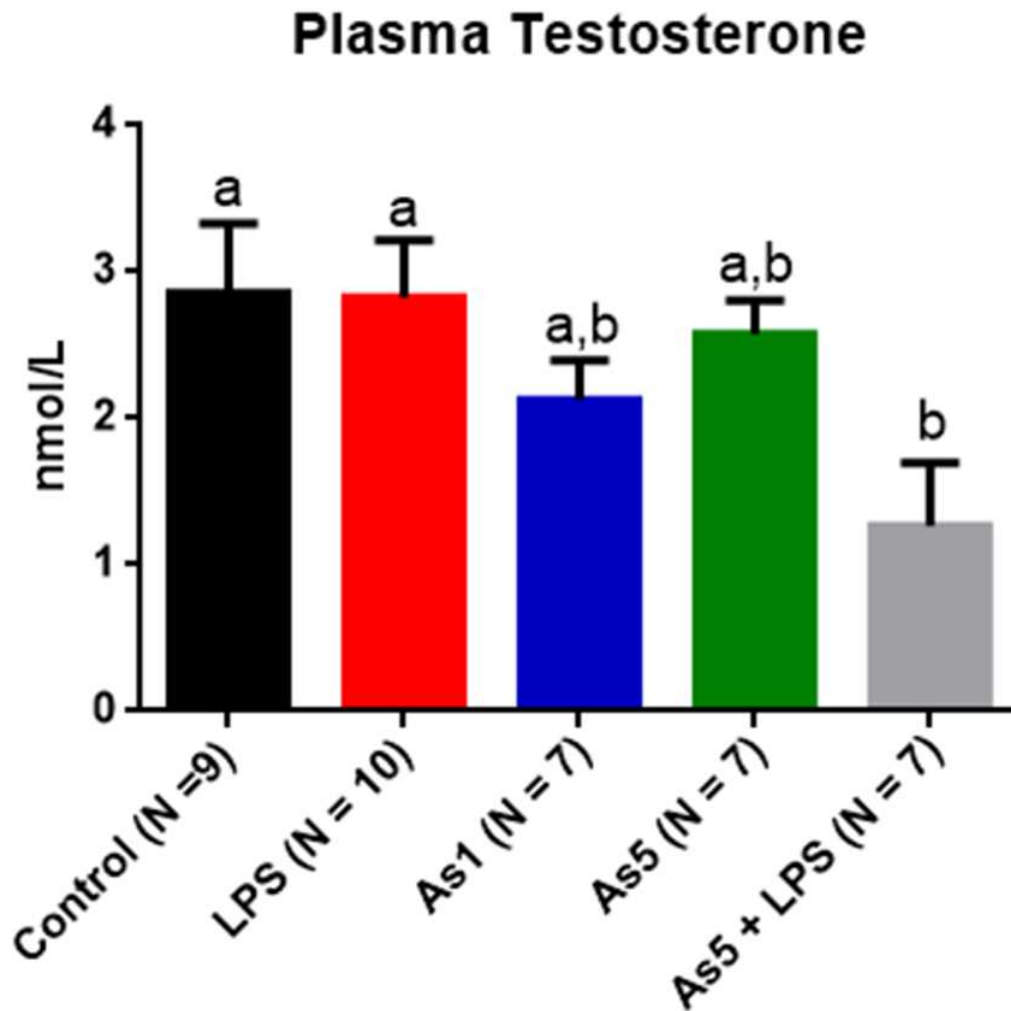


Figure 4 - Plasma testosterone concentration under different treatments. Bars = mean and standard deviation. One-Way ANOVA/Tukey.

#### 7.4 SPERM ANALYSIS

Data on spermatid count and sperm morphology are shown in Table 2. There was a reduction in spermatid count in testis in LPS ( $p = 0.0186$ ), As1 ( $p = 0.125$ ) and As5 ( $p = 0.0298$ ) groups and comparison to control. Spermatid count was also reduced in the As5+LPS treatment group, but not significantly so ( $p = 0.2034$ ).

Data on sperm morphology is represented as the percentage of sperms with normal morphology or with defects in the head or tail. We observed a statistical difference in the percentage of sperm with normal morphology, where the As5 group displayed a reduction of normal sperm in relation to As5+LPS ( $p = 0.05$ ). LPS increased the percentage of sperms with

damage in the head in comparison to control ( $p = 0.0315$ ). Besides that, we observed an increase of sperm with damage in head on LPS group in comparison to As5 treatment ( $p = 0.05$ ). Moreover, As5 induced an increase of damage in the tail when compared to the LPS group ( $p = 0.0226$ ).

Table 2 - Spermatid count and sperm morphology (%).

| Parameters           | CONTROL                | LPS                    | As1                    | As5                    | As5 + LPS               |
|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
|                      | N = 6                  | N = 7                  | N = 6                  | N = 7                  | N = 6                   |
| Spermatid count      | $177.7 \pm 15.88^a$    | $142 \pm 23.14^b$      | $138.8 \pm 15.74^b$    | $144.1 \pm 21.24^b$    | $153.2 \pm 17.07^{a,b}$ |
|                      | N = 6                  | N = 7                  | N = 5                  | N = 7                  | N = 7                   |
| Sperm Morphology (%) |                        |                        |                        |                        |                         |
| Normal               | $80.42 \pm 3.61^{a,b}$ | $77.36 \pm 7.67^{a,b}$ | $81.30 \pm 2.36^{a,b}$ | $73.86 \pm 3.17^{a,b}$ | $81.07 \pm 4.27^a$      |
| Head abnormalities   | $4.75 \pm 2.53^a$      | $13.50 \pm 7.88^b$     | $7.50 \pm 4.72^{a,b}$  | $8.71 \pm 5.12^a$      | $5.71 \pm 2.34^{a,b}$   |
| Tail abnormalities   | $14.83 \pm 4.91^{a,b}$ | $9.14 \pm 4.34^a$      | $11.20 \pm 5.43^{a,b}$ | $17.43 \pm 5.56^b$     | $13.21 \pm 4.68^{a,b}$  |

Data expressed by mean  $\pm$  standard deviation. Different letters indicate statistical differences.

One-Way ANOVA/Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

## 7.5 HISTOLOGICAL ANALYSIS

Many seminiferous tubules from treated animals displayed a normal morphology. However, it is worthy to mention that some tubules of all treated groups exhibited germ cells and cell-cell interactions loss, resulting in an increase of the lumen (Figure 4). Nevertheless, the LPS group, which was not exposed to As during the 60-day treatment period, was less affected than other groups.

Testicular histomorphometric parameters are shown in Table 3. Tubular diameter and epithelium height did not change between the groups. Furthermore, we did not find any differences concerning volumetric densities of seminiferous epithelium, tubular lumen, and interstitial tissue. However, a non-significant increase of interstitial tissue volumetric proportion was seen in LPS ( $p = 0.54$ ), As1 ( $p = 0.56$ ) and As5+LPS ( $p = 0.69$ ) groups in comparison to control group.

Finally, no differences between groups were seen on volume densities of interstitial components, such as macrophages, Leydig cells, blood vessels or lymphatic space.

Table 3 – Histomorphometrical parameters.

| Parameters                          | CONTROL<br>N = 5 | LPS<br>N = 6      | As1<br>N = 6      | As5<br>N = 5      | As5 + LPS<br>N = 5 |
|-------------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Tubular diameter ( $\mu\text{m}$ )  | 354.2 $\pm$ 9.02 | 337.5 $\pm$ 25.07 | 357 $\pm$ 19.57   | 353.9 $\pm$ 16.76 | 341.5 $\pm$ 7.26   |
| Epithelium height ( $\mu\text{m}$ ) | 105.4 $\pm$ 4.23 | 107.7 $\pm$ 6.89  | 105.8 $\pm$ 5.19  | 109.3 $\pm$ 2.17  | 109.7 $\pm$ 10.24  |
| Seminiferous epithelium (%)         | 71.37 $\pm$ 2.42 | 65.90 $\pm$ 4.00  | 66.21 $\pm$ 9.54  | 79.84 $\pm$ 3.91  | 67.50 $\pm$ 5.93   |
| Tubular lumen (%)                   | 15.34 $\pm$ 1.11 | 14.53 $\pm$ 3.08  | 14.37 $\pm$ 4.61  | 14.23 $\pm$ 2.39  | 13.67 $\pm$ 2.50   |
| Interstitial tissue (%)             | 13.29 $\pm$ 3.34 | 19.56 $\pm$ 4.91  | 19.42 $\pm$ 13.43 | 14.93 $\pm$ 5.14  | 18.84 $\pm$ 5.02   |
| Macrophages (%)                     | 2.91 $\pm$ 1.29  | 3.23 $\pm$ 2.40   | 2.76 $\pm$ 1.46   | 3.74 $\pm$ 1.40   | 2.97 $\pm$ 1.30    |
| Leydig cells (%)                    | 5.51 $\pm$ 3.01  | 4.25 $\pm$ 1.57   | 2.94 $\pm$ 1.26   | 3.21 $\pm$ 1.21   | 6.22 $\pm$ 3.70    |
| Lymphatic space (%)                 | 82.92 $\pm$ 7.54 | 87.96 $\pm$ 6.50  | 92.13 $\pm$ 2.70  | 88.72 $\pm$ 5.75  | 86.99 $\pm$ 8.29   |
| Blood vessels (%)                   | 8.67 $\pm$ 8.34  | 4.56 $\pm$ 4.46   | 2.18 $\pm$ 2.80   | 1.97 $\pm$ 2.92   | 3.82 $\pm$ 4.89    |

Data expressed by mean  $\pm$  standard deviation.

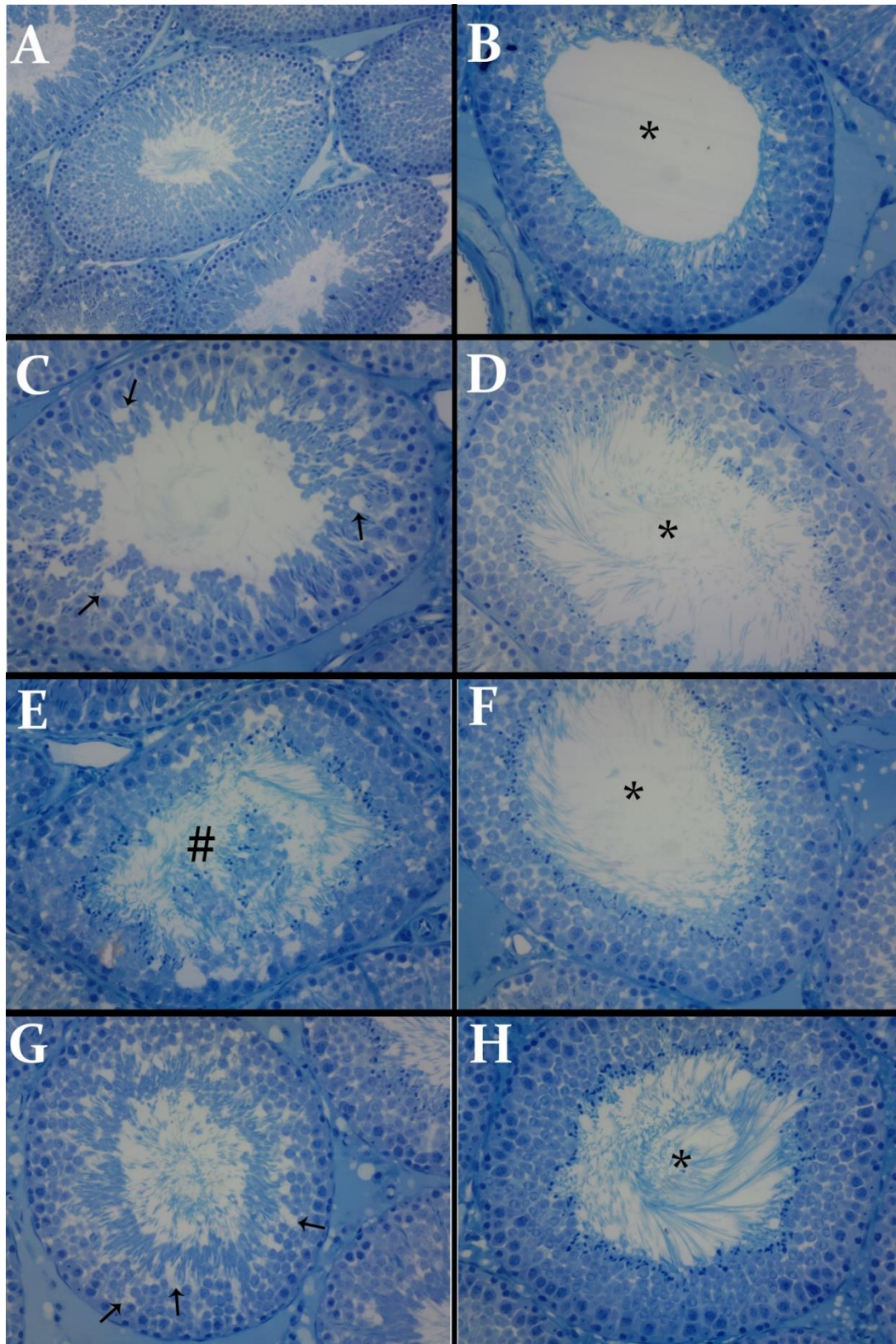


Figure 4 – Histology of seminiferous tubules from control (A), LPS (B), As1 (C and D), As5 (E and F) and As5+LPS (G and H) groups. \* indicate the increase of lumen and degeneration of germ cells, black arrows indicate loss of cell-cell interactions, # indicate seminiferous tubule amorphous. Magnification: 200x; except for A: 100x. Staining: toluidine blue 1% sodium borate.

## 7 DISCUSSION

Arsenic (As) is an EDC that impairs the testosterone and sperm production. In this study, we demonstrated that As can interact with the testicular immunological system, potentializing some deleterious effects of systemic LPS administration on testosterone production and promoting the increase of pro-inflammatory cytokines expression. However, As alone did not change the expression of pro-inflammatory cytokines nor the expression of molecular markers of the M1 macrophages, indicating no significant macrophage activation. On the contrary, co-exposure of As5 and LPS attenuated the mRNA expression of M1 marker *Cd68*.

We choose the systemic administration for both sodium arsenite and LPS because this model represents the main pathway of exposure for these substances. Indeed, several studies used oral gavage and i.p. injection for As and LPS, respectively (RAMOS *et al.*, 2017; O'BRYAN *et al.*, 2000, 2005; SOUZA *et al.*, 2016), altering the testis homeostasis.

During the treatment, we observed changes in the final body weight and body weight gain rate, which are general health markers. Our results indicate that long-term As exposure impairs the weight gain of the animals, as shown by other studies (PRABU; MUTHUMANI, 2012; RANA *et al.*, 2012). The body weight variation between the days 59 and 60 showed that acute LPS administration reduced the weight of the animals, but As co-treatment did not amplify this effect. Another work reported acute body weight effects induced by systemic LPS administration, but at a higher dose (5 mg.kg<sup>-1</sup>) and using different rat lineage (O'BRYAN *et al.*, 2000). The mechanism by which LPS reduced weight gain could be explained by pro-inflammatory cytokines production and their mimicking effects on leptin function, by activating downstream mediators of leptin receptor on arcuate and paraventricular nuclei (BORGES *et al.*, 2015).

Intriguingly, we did not observe any change in testis weight, which is in disagreement with several other studies (JANA; JANA; SAMANTA, 2006; SARKAR; HAZRA; CHOWDHURY, 2008; LI *et al.*, 2012; RENU *et al.*, 2018). However, it is worthy to mention that many morphological and functional testicular parameters can be affected by exposure to chemical agents without changes in testis weight. But, all other reproductive accessory organs and LABC had their weight reduced by As exposure, mainly in the highest dose (5 mg.kg<sup>-1</sup>). Surprisingly, the seminal vesicle was affected only by the lower dose (1 mg.kg<sup>-1</sup>). Indeed, LPS administration did not potentialize the As toxicity on sexual organs' weight. It is well

established that As can reduce the weight of accessory reproductive organs mainly by oxidative stress and reduction of testosterone production (RENU *et al.*, 2018). However, our work showed that As exposure alone did not reduce significantly the testosterone levels. It is important to highlight that analysis of testosterone concentrations was performed at a single time point at the end of the exposures, which may not represent the overall hormonal status throughout the treatment period.

We analyzed *Cyp19a1* relative expression for the first time after As chronic exposure. This gene codes for aromatase, an enzyme responsible for converting androgens into estrogens. It was proposed that As plays estrogenic effects by either binding to the estrogen receptor (DARBRE, 2006) or by increasing estrogen levels through upregulation of aromatase enzyme *in vitro* (XU; TOKAR; WAALKES, 2014). However, our *in vivo* data showed that As cannot induce an increase of *Cyp19a1* expression.

RT-QPCR revealed that neither As nor LPS, isolated or in combination to As, reduced the expression of the steroidogenic enzymes (*Cyp11a1* and *Cyp17a1*) and *Star*. These data is controversial since some authors reported that As exposure reduced steroidogenic biosynthetic pathway gene expression (CHIOU *et al.*, 2008), whereas others do not (KHAN; TELANG; MALIK, 2013). Again, as gene expression analyses were performed at the end of the treatment, it could not represent all exposure time status. But, it is worthy to mention that As can also impact the enzyme activity (JANA; JANA; SAMANTA, 2006; CHANG *et al.*, 2007), another mechanism of As toxicity in the testis.

The reduction of testosterone levels in the As5+LPS group raises some important considerations for discussion. First, in this group, there was an increase in the relative gene expression of pro-inflammatory cytokines *Il1b* and *Tnf*, likely promoting the increase of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels. It is well known that these cytokines can disrupt testosterone production by inhibiting both gene expression and activity of the steroidogenic biosynthetic pathway (HALES, 2002). Second, both As and LPS can generate ROS, another group of molecules that can interfere in the Leydig cell function in producing testosterone. Although we have not observed a reduction in the gene expression of the steroidogenic enzymes, these mechanisms could at least in part explain the reduction in testosterone production after 24h of LPS administration.

Others showed that As can potentialize the capacity of the human macrophage in primary culture in producing pro-inflammatory cytokines after LPS administration (DANGLEBEN; SKIBOLA; SMITH, 2013). We demonstrated that testis response in

expressing *Il1b* and *Tnf* was increased in As5+LPS animals. However, it is difficult to attribute these data to testicular macrophages, since other testicular cells can express these genes (CHEN; DENG; HAN, 2016), and testicular macrophages displayed a subdued response (BHUSHAN *et al.*, 2015). Additionally, we reported a reduction in the expression of *Cd68*, an M1 macrophage marker, in the group co-exposed to As5 and LPS, in relation to animals exposed to LPS only, suggesting that As can inhibit the macrophage activation or recruitment instead of exacerbating this LPS effect, as we have initially hypothesized. If this is reflected on the protein level, it could have important repercussions, because testis can be infected by a myriad of pathogens, such as uropathogenic *Escherichia coli*, *Toxoplasma gondii*, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas* spp. (FIJAK *et al.*, 2018), resulting in testis damage.

We also examined the mRNA expression of other genes associated with M1 and M2 macrophage activity. As mentioned earlier, *Gpr18* was suggested to be a marker for M1 macrophage in PCR analyses. Our results showed that in testis it can fit well, once its level was similar to *Cd68* expression in the LPS group. On the other hand, *Egr2* also displayed a similar expression about *Cd163*, suggesting that *Egr2* could be an alternative M2 macrophage marker in the testis. However, it lacks specificity for macrophages in the testis, because this transcription factor is expressed by spermatogonia and it has an important function on the proliferation of these cells (IVANSKI *et al.*, 2020). The reliability of this gene as an M2 macrophage marker in the testis would be confirmed by immunoblot and immunolocalization analyses at the protein level. Additionally, since As does not change the relative expression of *Egr2*, it is possible to suggest that this is not a mechanism by which As can impair spermatogenesis.

We observed that As and LPS can reduce sperm count and quality. LPS, As1, and As5 were able to reduce sperm count significantly. Surprisingly, As5+LPS does not reduce sperm count, which seems to be due to chance. Other studies showed that the male germ cell population was affected after LPS (KAJIHARA; OKAGAKI; ISHIHARA, 2006; REDDY *et al.*, 2006) or As (CHIOU *et al.*, 2008; SHARMA; KUMAR, 2012) exposure, reducing the number of sperm. We also observed qualitative histological changes in testicular sections of all treated groups, including germ cell loss, decreased cell-cell interactions, and dilation of seminiferous tubules lumen, which could all be related to the reported reduction in spermatid counts and sperm morphology. In fact, As can downregulate *Cldn11* and *Ocln*, both present in the blood-testis barrier (RAMOS-TREVIÑO *et al.*, 2017), leading to loss of cell interaction and deregulation of spermatogenesis. Besides, TNF- $\alpha$  and IL-1B produced under LPS challenge, can interfere

with blood-testis barrier dynamics and can also disrupt sperm production (CHENG; MRUK, 2012; MRUK; CHENG, 2015). However, no changes were observed in our morphometrical results, indicating that the histological changes were not homogenous among animals of a given treatment group.

Regarding sperm morphology, As5 and LPS induced an increase of damaged sperm. Other studies reported an increased rate of abnormal sperm after As exposure (KHAN; TELANG; MALIK, 2013; PANT *et al.*, 2001; ZUBAIR *et al.*, 2016), although one study did not find any significant damage (SOUZA *et al.*, 2016). The main mechanisms responsible for sperm morphology impairment after As exposure is the decrease of mitochondrial potential and ROS generation (RENU *et al.*, 2018).

In summary, our data confirm that As is an EDC that negatively affects the male reproductive system. Although some mechanisms have been proposed, such as ROS generation and decrease of FSH and LH secretion (SUN *et al.*, 2016), there are still uncertainties on the different mechanisms underlying endocrine and reproductive toxicity following As exposure. Our study examined for the first time the relationship between reproductive toxicity of As and changes in molecular macrophage markers in the testis, which has been previously suggested to play a role on As changes in the male reproductive system (RAMOS *et al.*, 2017). Our results suggest that macrophage activation and/or recruitment are not elicited after long-term exposure to As1 and As5 mg.kg<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>. On the contrary, our results demonstrate that As5 can attenuate the expression of molecular markers of macrophage activation, notably mRNA expression of *Cd68*, suggesting that the testis could be more become more susceptible to infections following repeated exposure to As. However, our work has some limitations. We analyzed the macrophage products only by RT-QPCR, which cannot be reflected at the protein level. It would be interesting to evaluate ROS generation and estrogen production.

## 8 CONCLUSION

In this work were explored new mechanisms by which arsenic could disrupt the endocrine system in the testis, and consequently, spermatogenesis. We have shown that arsenic does change *Cyp19a1* (aromatase) or *Egr2* expression. On the other hand, under LPS challenge, arsenic amplified *Il1b* and *Tnf* expression, whose products can inhibit testosterone synthesis (HALES, 2002). Besides, subexpression of *Cd68* observed after co-treatment of arsenic chronic exposure and acute LPS administration suggests that innate capacity of the testis in combating

external insults could be injured, turning the testis more susceptible to infections. Nevertheless, arsenic alone was not able to promote overexpression of cytokine genes, demonstrating that this is possibly not a major mechanism by which this metalloid plays its endocrine disrupting properties in homeostatic situations, at least in our experimental conditions. Thus, it is possible that other mechanisms discussed, such as ROS generation and decrease of gonadotropin secretion play a more important role in gametogenic and steroidogenic changes induced by arsenic.

Table S1 - Genes analyzed and their respective forward and reverse primers.

| Gene                                                                       | NCBI<br>Reference<br>Sequence | Primer sequence (5' – 3')                             |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <b>Cyp11a1</b><br>(Cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1) | NM_017286                     | F: GGAGCTGGTATCTCCTCTACCA<br>R: TTGCCCAGCTTCTCCCTGTAA |
| <b>Cyp17a1</b><br>(Cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1) | NM_012753                     | F: GTGCAGGGAGAAGTTCGACA<br>R: CCCCAAAGATGTCTCCCACC    |
| <b>Cyp19a1</b><br>(Cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide 1) | NM_017085                     | F: CGTCATGTTGCTTCTCATCG<br>R: TACCGCAGGCTCTCGTTAAT    |
| <b>Star</b><br>(Steroidogenic acute regulatory protein)                    | NM_031558                     | F: ACCAAGCGTAGAGGTTCCAC<br>R: TTCAGCTCTGATGACACCGC    |
| <b>Tnf</b><br>(Tumor necrosis factor)                                      | NM_012675                     | F: ACTGAACTTCGGGGTGATCG<br>R: TGGTGGTTTGCTACGACGTG    |
| <b>Il1b</b><br>(Interleukin 1 beta)                                        | NM_031512                     | F: CGACAAAATCCCTGTGGCCT<br>R: TGTTTGGGATCCACACTCTCC   |
| <b>Il10</b><br>(Interleukin 10)                                            | NM_012854                     | F: TGCACGCTGTCATCGATTT<br>R: GTAGATGCCGGGTGGTTCAA     |
| <b>Egr2</b><br>(Early growth response 2)                                   | NM_053633                     | F: AGGAGCAAATGATGACCGCC<br>R: CATGCCATCTCCAGCCACTC    |
| <b>Gpr18</b><br>(G protein-coupled receptor 18)                            | NM_001079710                  | F: GACGGACAGGAGTTTCTACG<br>R: AAGACCAGGGCTGCGATTTT    |
| <b>Rpl19</b><br>(Ribosomal protein L19)                                    | NM_031103.1                   | F: CAATGAAACCAACGAAATCG<br>R: TCAGGCCATCTTTGATCAGCT   |
| <b>Cd68</b><br>(Cd68 molecule)                                             | NM_001031638                  | F: TCCAGCAATTCACCTGGACC<br>R: AAGAGAAGCATGGCCCGAAG    |
| <b>Cd163</b><br>(Cd163 molecule)                                           | NM_001107887                  | F: TGAAATCCTCGGGTTGGCAT<br>R: TGCAGGTTCACTAGAGTGC     |

## 9 DISCUSSÃO ESTENDIDA

O As é um desregulador endócrino que impacta a produção de testosterona e de espermatozoides. Neste estudo, foi demonstrado que o As pode interagir com o sistema imunológico testicular, ao potencializar alguns efeitos deletérios da aplicação sistêmica de LPS na produção de testosterona e promover o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, além de reduzir a expressão do marcador de macrófagos M1. Contudo, a nossa hipótese de que o As promove a ativação de macrófagos, ao menos nas condições avaliadas, mostrou-se incorreta.

We choose the systemic administration for both sodium arsenite and LPS, because they represent the main pathway, which these substances can enter into the body. Indeed, several studies used the oral gavage and i.p. injection for As and LPS, respectively (RAMOS *et al.*, 2017; O'BRYAN *et al.*, 2000, 2005; SOUZA *et al.*, 2016), altering the testis homeostasis. Foi escolhida a administração sistêmica para ambos arsenite de sódio e LPS, pois este modelo representa a principal via de exposição pela qual estas substâncias podem entrar no corpo. De fato, muitos estudos utilizaram a gavagem oral e injeção intraperitoneal para o As e o LPS, respectivamente (RAMOS *et al.*, 2017; O'BRYAN *et al.*, 2000; 2005; SOUZA *et al.*, 2016), os quais foram capazes de alterar a homeostasia testicular.

Durante o tratamento, foram observadas alterações no peso final e na taxa de ganho de peso dos animais, que são marcadores de condição de saúde. Nossas análises indicam que houve interação entre o tratamento com o As e a duração do tratamento, evidenciando que a sua exposição a longo prazo interfere no ganho de peso dos animais. No entanto, o pós-teste da ANOVA mista não mostrou a partir de qual dia ou qual grupo a diminuição no ganho de peso ocorreu. Desta forma, em seguida foi analisada a variação do peso dos animais imediatamente antes do início do tratamento até o último dia de exposição. Foi encontrado que os animais As5 e As5+LPS foram afetados pelo tratamento. Estas informações concordam com o trabalho realizado por Prabu e Muthumani (2012). Estes autores ao avaliarem a nefrotoxicidade do As em ratos, na dose de 5 mg.kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> por 35 dias, também relataram uma redução do ganho de peso dos animais e, atribuem esta redução à diminuição da ingesta de ração e de água, fato que foi corroborado experimentalmente por estes autores. Em contrapartida, Jana, Jana e Samanta (2006) aplicaram a mesma dose de 5 mg.kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> por 6 dias por semana, durante 4 semanas, em ratos. Eles não relataram nenhuma alteração no ganho de peso dos animais ou no consumo de ração e água. No entanto, a duração de seu experimento foi inferior ao do nosso trabalho e

em um dia da semana, não houve a aplicação do arsenito de sódio nos animais. A exposição prolongada ao As aumenta o risco de desenvolvimento de diabetes mellitus, o que pode explicar, em conjunto com a redução da ingestão de alimentos, a perda de peso observada no presente estudo

O LPS também foi capaz de reduzir o peso dos animais, após 24h de sua aplicação, observado na análise de variação de peso entre os dias 59 e 60. O co-tratamento com o arsenito de sódio na dose de  $5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  não intensificou a redução. O'Bryan *et al.* (2000) aplicaram por injeção intraperitoneal em ratos Sprague-Dawley duas doses de LPS: 0,1 e  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Na menor dose, não foi observada nenhuma perda de peso após 24h. Na maior dose, após 72h, os ratos haviam perdido 20% do peso. Contudo, vale ressaltar algumas diferenças marcantes, como a dose utilizada no nosso estudo, que foi de  $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , muito inferior que as utilizadas por O'Bryan e colaboradores (2000). Além disso, no presente estudo, utilizamos a variedade Wistar e não a Sprague-Dawley. No entanto, está claro que o LPS pode reduzir o peso do animal a curto prazo. Um possível mecanismo que explica redução de peso pelo LPS se dá por meio de uma mimetização dos efeitos da leptina (um hormônio que sinaliza a saciedade), no núcleo arqueado e no núcleo paraventricular, ambos presentes no hipotálamo. A aplicação aguda sistêmica de LPS é capaz de ativar os mediadores *downstream* do receptor de leptina por meio de citocinas pró-inflamatórias, envolvendo a via da JAK-2 (*Janus Kinase-2*) - STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), promovendo a transcrição dos genes da POMC e SOCS3 (*supressor of cytokine signaling 3*), que resultam na redução da ingestão alimentar (BORGES *et al.*, 2015).

Os pesos absoluto e relativo do testículo não se alteraram entre os grupos. Contraditoriamente, diversos estudos demonstram que o As é capaz de reduzir o peso deste órgão, tanto em ratos, quanto em camundongos, em doses maiores ou menores que as utilizadas neste trabalho (JANA; JANA; SAMANTA, 2006; SARKAR; HAZRA; CHOWDHURY, 2008; LI *et al.*, 2012; RENU *et al.*, 2018). A susceptibilidade de toxicidade ao As depende de alguns fatores como a idade, dieta e da variabilidade genética dos indivíduos na capacidade de metabolizá-lo e em reparar o DNA (MINATEL *et al.*, 2018). No entanto, é importante destacar que diversos parâmetros morfológicos e funcionais do testículo podem ser afetados pela exposição a agentes químicos sem ocasionar alterações no peso do órgão.

O As foi capaz de reduzir o peso de todos os outros órgãos sexuais acessórios e do LABC, porém a suscetibilidade de cada órgão diferiu para as doses de As testadas. A dose de  $5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  foi a que mostrou efeitos mais severos na próstata ventral, vesícula seminal e

LABC. Por outro lado, o peso da glândula bulbouretral foi reduzido apenas na menor dose (As  $1 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ), indicando um possível efeito não monotônico. Mas, em contrapartida, a menor dose não alterou o peso do LABC. Sabe-se que o As pode reduzir o peso dos órgãos sexuais acessórios, principalmente pelo estresse oxidativo e redução da síntese de andrógenos (ver RENU *et al.*, 2018). Contudo, neste trabalho, não observamos reduções significativas nas concentrações plasmáticas de testosterona nos grupos expostos ao As. Vale ressaltar, no entanto, que as medidas de testosterona plasmáticas foram feitas em um único ponto, ao final do tratamento, que pode não refletir de maneira adequada o *status* hormonal real dos animais ao longo do período de exposição. O co-tratamento de As com o LPS não potencializou os efeitos sobre o peso de órgãos andrógeno-dependentes e, surpreendentemente, o peso absoluto da vesícula seminal deste grupo não diferiu do controle significativamente.

No fígado foi observada a hepatomegalia no grupo As5. Embora o aumento do peso absoluto do fígado não tenha sido significativo, é possível reconhecer este efeito quando o peso relativo é levado em conta. Além do mais, o co-tratamento com LPS intensificou este fenômeno, sendo significativo para ambos os pesos, absoluto e relativo. O resultado acerca do peso hepático está em concordância com a literatura, pois tem sido relatado que o As é capaz de induzir hepatomegalia e outras alterações no fígado (JAIN; CHANDRAMANI, 2018). Nos rins, não foram observadas alterações marcantes.

Em discordância com um estudo em camundongos (CHIOU *et al.*, 2008) e com outro em ratos (KHAN; TELANG; MALIK, 2013), não foi possível encontrar nenhuma diminuição na expressão dos genes responsáveis pela esteroidogênese, como a Star, Cyp11a1 e Cyp17a1. Mas o estudo em camundongos utilizou uma espécie diferente de arsênio (trióxido de arsênio) e o estudo em ratos utilizou uma dose de arsenito de sódio muito superior à utilizada no presente trabalho, de 40 ppm. Porém, Chang *et al.*, (2007) também em camundongos, utilizando as concentrações de 20 e 40  $\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  de arsenito de sódio, não observaram nenhuma redução na expressão destas enzimas. Estes dados concordam parcialmente com o fato de não terem sido observadas alterações na concentração da testosterona sérica, nos grupos As1 e As5. No entanto, há outras duas enzimas responsáveis pela esteroidogênese ( $3\beta$  e  $17\beta$ -HSD) que não foram avaliadas neste trabalho e para as quais existem evidências mostrando que o As reduz suas expressões relativas (SUN *et al.*, 2016). Como foi encontrada uma redução na concentração da testosterona sérica somente no grupo As5+LPS, não se pode descartar que a redução da testosterona neste grupo talvez esteja relacionada com a diminuição da expressão dessas enzimas. Contudo, há dados que sugerem que o As pode reduzir a síntese de testosterona

pela redução da atividade das enzimas esteroidogênicas, sem que ocorra diminuição de sua expressão (JANA; JANA; SAMANTA, 2006; CHANG *et al.*, 2007). O LPS também pode inibir a síntese de testosterona via produção de EROs, como consequência do aumento de mediadores pró-inflamatórios e interferência no sistema antioxidante testicular. Acredita-se que um dos principais mecanismos seja pelo desbalanço do gradiente eletroquímico mitocondrial nas células de Leydig, devido a geração de EROs, que resulta na redução do processamento proteolítico da StAR (REDDY *et al.*, 2006). Desta forma, tanto o LPS quanto o As, podem inibir a esteroidogênese pela redução do processamento da StAR, sem necessariamente haver diminuição de sua expressão.

Pela primeira vez foi avaliada a expressão da *Cyp19a1* (aromatase) no testículo sob exposição crônica ao As. Jana, Jana e Samanta (2006) propuseram que o As possa desempenhar um efeito estrogênico, possivelmente por agonismo e aumento da expressão do ER. Um outro possível mecanismo associado poderia estar relacionado com o aumento da síntese de estrogênio via superexpressão da *Cyp19a1*, nas células de Sertoli. De fato, o As é capaz de induzir a sua superexpressão em algumas linhagens celulares, como MCF-10A, o que pode explicar a associação da exposição ao As com o desenvolvimento de câncer de mama (XU; TOKAR; WAALKES, 2014). No entanto, o mecanismo estrogênico do As no testículo parece ser somente por agonismo direto e aumento da expressão do ER, uma vez que o As seja um metaloestrógeno (DARBRE, 2006), e não pela superexpressão de *Cyp19a1* e superprodução de estrogênio.

Nos grupos LPS e As5+LPS houve o aumento esperado da expressão das duas citocinas pró-inflamatórias. O LPS serviu como um controle positivo, pois esta substância é um padrão molecular associado a patógenos, que é reconhecido pelo *Toll Like Receptor - 4* (TLR-4) (BHUSHAN; MEINHARDT, 2017). No testículo, os receptores da família TLR estão presentes nas células do sistema imunológico inato, células de Sertoli, células de Leydig e células germinativas e são capazes de ativar vias de sinalização que promovem a inflamação, levando a produção e a secreção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  (CHEN; DENG; HAN, 2016). Os resultados encontrados concordam com outros estudos que também verificaram um aumento na expressão de *Il1b* e *Tnf*. Em um trabalho o qual foi administrado o LPS de forma sistêmica e aguda, nas doses de 0,1 e 5 mg.kg<sup>-1</sup> em ratos Sprague-Dawley, houve o aumento da expressão de *Il1b* (O'BRYAN *et al.*, 2005). Em cultura de macrófagos isolados de testículos de ratos Sprague-Dawley, a aplicação de 100 ng.ml<sup>-1</sup> foi capaz de promover o aumento da expressão destes mesmos genes (WINNALL; MUIR; HEDGER, 2011). Neste

estudo, os grupos As1 e As5 não apresentaram alterações na expressão gênica dos marcadores imunológicos. No entanto, alguns estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado resultados opostos, onde em alguns casos, é observado o aumento, a redução ou nenhuma alteração da expressão dessas enzimas (DANGLEBEN; SKIBOLA; SMITH, 2013; DUAN *et al.*, 2017; LIAO *et al.*, 2017).

Quando comparado com outros tecidos, o testículo secreta estas citocinas em menor quantidade (BHUSHAN *et al.*, 2015). Mesmo assim, quando liberadas, são capazes de inibir a esteroidogênese (HALES, 2002). Este mecanismo poderia explicar a redução da concentração da testosterona no grupo As5+LPS, pois pode ter ocorrido o aumento da expressão de *Il1b* em níveis que poderiam ser suficientemente inibitórios, onde o As parece ter potencializado os efeitos do LPS em induzir a expressão dessa citocina. Todavia, é difícil afirmar com segurança que o aumento da expressão desses genes é decorrente da ativação e/ou recrutamento de macrófagos, pois a expressão de *Cd68* (marcador de macrófagos M1) no grupo As5+LPS não diferiu do controle. Ainda, os macrófagos testiculares secretam a IL-1 $\beta$  principalmente na sua forma inativa, pois estas células expressam a caspase-1 (a enzima que cliva o precursor de IL-1 $\beta$  na sua forma ativa) em baixas concentrações (O'BRYAN *et al.*, 2005). Visto que outras células no testículo produzem estas citocinas, talvez o somatório de sua produção por outros tipos celulares tenha uma maior contribuição que a produção pelos macrófagos. No entanto, em macrófagos de outros tecidos, o As é capaz de aumentar a resposta pró-inflamatória frente ao estímulo do LPS (DANGLEBEN; SKIBOLA; SMITH, 2013). O dado referente à expressão de *Cd68*, ainda sugere que o As tem um efeito inibitório na ativação e/ou recrutamento de macrófagos, indicando que o testículo pode se tornar suscetível a infecções, visto que este órgão pode ser infectado por uma miríade de patógenos como a *Escherichia coli* uropatogênica, *Toxicoplasma gondii*, *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp. e outros (FIJAK *et al.*, 2018). Outros estudos determinaram que o As é capaz de reduzir a migração e diferenciação de monócitos na corrente sanguínea para outros tecidos (DANGLEBEN; SKIBOLA; SMITH, 2013). No entanto, esta informação é contrária à hipótese sugerida em um estudo anterior de que o As poderia apresentar um efeito pró-inflamatório e ativador de macrófagos no testículo (RAMOS *et al.*, 2017). Todavia, a hipótese mostra-se parcialmente correta, pois o aumento da expressão gênica de *Il1b* e *Tnf*, que pode ter a participação dos macrófagos, pode contribuir para a desregulação endócrina da testosterona.

A *Il10* também teve a sua expressão aumentada nos grupos LPS e As5+LPS. A IL-10 é uma citocina que possui ação regulatória na inflamação e que é secretada constitutivamente no

testículo pelos macrófagos testiculares (WINNALL; MUIR; HEDGER, 2011). A IL-10 age pela ativação da via de sinalização da STAT3, a qual inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias (BHUSHAN *et al.*, 2015). Alguns estudos demonstraram que a aplicação de LPS induz um aumento substancial na sua produção, concordando com os resultados obtidos neste trabalho (O'BRYAN *et al.*, 2005; WINNALL; MUIR; HEDGER, 2011). No entanto, o As no co-tratamento com LPS não potencializou e nem reduziu a sua expressão.

Ainda, foram avaliadas as expressões de outros três marcadores: *Cd163*, *Egr2* e *Gpr18*. O CD163 é um marcador de macrófagos M2 e objetivo desta molécula ter sido avaliada foi inferir se o As pode desempenhar alguma ação neste subtipo celular, o qual os resultados obtidos demonstram que não. Jablonski *et al.* (2015) determinaram empiricamente que o *Egr2* e o *Gpr18* podem ser marcadores de macrófagos M2 e M1, respectivamente, analisados pela técnica de RT-QPCR. Um dos intuitos deste trabalho foi avaliar se a expressão gênica desses marcadores moleculares no testículo poderia ser útil na identificação das subpopulações de macrófagos testiculares. O *Gpr18*, que é um receptor acoplado a proteína G regulado para cima em condições inflamatórias, apresentou um aumento significativo de sua expressão no grupo LPS. No grupo As5+LPS, embora tenha ocorrido um aumento nítido na sua expressão, ele não diferiu estatisticamente do controle. Este marcador pode ser útil pois, quando comparado com o marcador clássico de macrófagos M1 (CD68), apresentou resultados semelhantes. O *Egr2* apresentou expressão semelhante ao *Cd163*, no entanto, nossos dados não são suficientes para determinar se o *Egr2* seria um bom marcador, pois lhe falta especificidade, devido a sua ampla expressão em espermatogônias. O *Egr2* apresenta um papel importante na espermatogênese, onde promove a mitose das espermatogônias e deve ser regulado para baixo para que estas células entrem na mitose (PELLEGRINI *et al.*, 2008; BAKSI *et al.*, 2018). Se este fenômeno não ocorrer, pode haver menor produção de espermatozoides pela diminuição do *pool* de células em estágios mais iniciais da espermatogênese. No entanto, este não parece ser um mecanismo pelo qual o As atue, pois a expressão de *Egr2* não diferiu entre os grupos.

Foi encontrada uma diminuição na quantidade de espermátides nos grupos LPS, As1 e As5 em relação ao controle. É bem documentado que o As reduz a contagem e a produção diária de espermatozoides. Na dose de 4 mg.kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> em camundongos, o arsenito de sódio foi capaz de reduzir a contagem espermática no epidídimo (SHARMA; KUMAR, 2012). Em outro estudo com camundongos, o tratamento com 3 mg.kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> de trióxido de arsênio por 3 semanas (5 dias por semana), reduziu a contagem espermática no epidídimo em 52,3% (CHIOU *et al.*, 2008). Em ratos Wistar, na dose de 40 ppm de arsenito de sódio após 28 dias de tratamento,

também houve uma redução na contagem de espermatozoides na cauda do epidídimo (KHAN; TELANG; MALIK, 2013). Os dados da contagem de espermatozoides no epidídimo refletem a produção de espermátides no testículo, portanto, estes resultados estão de acordo com os encontrados neste trabalho. O As inibe a atividade transcricional do AR, via *downregulation* do AR, desregulação da translocação nuclear e diminuição da ligação à testosterona, que já tem a sua produção diminuída pela célula de Leydig, resulta em apoptose das células germinativas. Adicionalmente, o As ativa nas células de Sertoli a via das MAPK e fosforilação do NF- $\kappa$ B, que por sua vez inibe a espermatogênese (RENU *et al.*, 2018).

Quanto ao LPS, há estudos mostram a sua interferência direta na espermatogênese. Foi demonstrado em ratos Wistar que a injeção intraperitoneal de LPS a 5 mg.kg<sup>-1</sup> após 24h reduziu a população de células germinativas nos túbulos seminíferos, que pode levar a diminuição da produção de espermatozoides, a qual os autores atribuem ao estresse oxidativo promovido (REDDY *et al.*, 2006). No entanto, estes autores não mensuraram diretamente o número de espermatozoides. Em camundongos, o LPS na dose de 0,1 mg.kg<sup>-1</sup> administrado pela via intraperitoneal durante 7 dias, foi capaz de reduzir a contagem de espermatozoides na cauda do epidídimo uma semana após a última injeção de LPS (KAJIHARA; OKAGAKI; ISHIHARA, 2006). Em comparação com o presente estudo, foi observada uma redução da contagem de espermátides no testículo após 24h da injeção contendo LPS. A implicação deste resultado é que os espermatozoides humanos possuem o receptor TLR-4, o qual sua ativação pela ligação ao LPS induz a apoptose destas células (FUJITA *et al.*, 2011). Além do estresse oxidativo, um provável mecanismo envolvido na diminuição da contagem de espermátides em ratos também seja pela ativação de receptores da família TLR, o que pode diminuir a viabilidade dessas células.

A respeito da morfologia espermática, observou-se que o grupo LPS aumentou a incidência de espermatozoides com danos na região da cabeça e o grupo As5 aumentou na região da cauda e uma tendência no aumento de espermatozoides com danos na cabeça. Porém, é digno de nota que o grupo controle apresentou uma alta taxa de espermatozoides com danos na cauda. Paradoxalmente, o grupo As5+LPS não apresentou nenhuma alteração. Outros estudos também demonstram que o As tem um efeito prejudicial na morfologia espermática: o arsenito de sódio na dose de 0,1 e 10 mg.L<sup>-1</sup> durante o período de 56 dias, não induziu nenhuma alteração na morfologia espermática em ratos (SOUZA *et al.*, 2016); Em camundongos, no período de 35 dias na concentração de 533,90  $\mu$ M, o arsenito de sódio aumentou a porcentagem de espermatozoides anormais, embora não tenha ocorrido um aumento estatisticamente

significativo quando as anormalidades foram categorizadas como danos na cabeça ou na cauda (PANT *et al.*, 2001); Em ratos, o arsenito de sódio à 40 ppm por 28 dias aumentou a taxa de espermatozoides com ambos danos na cabeça e na cauda (KHAN; TELANG; MALIK, 2013). O principal mecanismo envolvido na alteração da morfologia espermática se dá pela geração de espécies reativas de oxigênio e diminuição do potencial da membrana mitocondrial (ZUBAIR; AHMAD; QURESHI, 2017).

A respeito da histologia testicular, inicialmente as lâminas foram submetidas a uma avaliação qualitativa. Constatou-se que a maioria dos túbulos seminíferos apresentou uma morfologia normal. Porém, todos os grupos tratados apresentaram alguns túbulos onde as junções celulares foram perdidas. Este fato pode ter consequências importantes na barreira hemato-testicular, tornando a espermatogênese menos eficiente e permitindo com que o ambiente tubular se torne mais suscetível a influências externas. Um dos mecanismos pelos quais o As impacta as junções celulares se dá por meio da redução da expressão da proteína de membrana claudina-11 (JEONG *et al.*, 2017). A claudina-11 está presente na BHT, especificamente nas junções de oclusão. O LPS, por sua vez, pode desregular a BHT pela indução da produção de TNF- $\alpha$ , que é capaz de promover a expressão de caveolina-1 e Rab11 e ativação de quinases ou fosfatases, influenciando as vias de transcitose e degradação das proteínas de membrana presentes nas junções celulares (CHENG; MRUK, 2012). Também foi observado que outros túbulos seminíferos dos animais tratados apresentaram perda da camada de células germinativas. Sarkar *et al.* (2008) descreveram estas mesmas características nos túbulos de camundongos tratados com 30 e 40 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> de arsenito de sódio, durante 30, 45 e 60 dias de tratamento. Igualmente, estes efeitos em camundongos também são obtidos em doses menores, como 7,5 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> de arsenito de sódio durante 70 dias (FERREIRA *et al.*, 2012). Baltaci *et al.* (2016) também descreveu perda de células germinativas e vacuolização dos túbulos, porém, em ratos Sprague-Dawley, utilizando 10 mg. L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> de arsenito de sódio durante 15 dias. Ainda, é descrito que nesta mesma dose e linhagem animal, a exposição ao arsenito de sódio por somente dois dias causa efeitos semelhantes na morfologia tubular (FOUAD *et al.*, 2015). Em conjunto, a análise qualitativa histológica reforça os dados espermatológicos alterados, como prejuízo da morfologia espermática e a redução da contagem de espermátides.

Embora alguns túbulos tenham apresentado certo grau de degeneração, não foram encontradas alterações no diâmetro do túbulo seminífero e na altura do epitélio. Isto significa que a grande maioria dos túbulos não sofreu os impactos da exposição ao As. Ainda, estes dados

são reforçados pelo resultado do peso testicular: o peso do testículo é totalmente dependente das células germinativas, desta forma, alterações no diâmetro tubular decorrente da perda destas células, refletem na diminuição do peso testicular. Em um estudo anterior, 56 dias de exposição a  $5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  de arsenito de sódio foi capaz de reduzir o diâmetro tubular de ratos Wistar (RAMOS *et al.*, 2017). Em camundongos, Sarkar *et al* (2008) observaram que as doses de 30 e  $40 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  de arsenito de sódio reduziram o diâmetro tubular em camundongos após 45 e 60 dias de tratamento. No entanto, foram utilizadas doses muito superiores que as utilizadas no presente estudo, em uma espécie diferente. Ferreira *et al.* (2012) relataram que  $7,5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  de arsenito de sódio reduziu o diâmetro dos túbulos seminíferos, em camundongos. Em contrapartida, Souza *et al.* (2016) não encontraram nenhuma alteração no diâmetro dos túbulos seminíferos de ratos nas doses de 0,01 e  $10 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  de arsenato de sódio e nem de arsenito de sódio, após 56 dias de tratamento. Porém,  $0,01 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  de arsenato de sódio aumentou a altura do epitélio seminífero.

Em seguida, foram analisadas as densidades volumétricas entre túbulo seminífero, lúmen e tecido intersticial, porém nenhuma alteração foi encontrada para esses parâmetros. Em um estudo anterior, utilizando  $5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  de arsenito de sódio durante 56 dias, também não foram observadas alterações nas densidades volumétricas do túbulo seminífero e tecido intersticial (RAMOS *et al.* 2017). Contudo, a contagem de pontos referentes ao lúmen foi computada em conjunto com os dados do túbulo seminífero. Souza *et al.* (2016) também não encontraram nenhuma alteração nas densidades volumétricas destas estruturas. Quanto às densidades volumétricas dos componentes intersticiais, também não foram encontradas alterações. Estes dados estão de acordo com o estudo anterior (RAMOS *et al.*, 2017). Por outro lado, Souza *et al.* (2016) observaram um aumento da densidade volumétrica do espaço linfático, vasos sanguíneos, macrófagos e uma redução na densidade volumétrica nas células de Leydig. De fato, alguns estudos mostram que o As pode atrofiar e induzir a apoptose das células de Leydig (SARKAR; HAZRA; CHOWDHURY, 2008; KHAN; TELANG; MALIK, 2013), porém em doses muito superiores que as utilizadas neste estudo. Como não foi observada nenhuma redução na volumetria das células de Leydig, é improvável que tenha ocorrido sua atrofia neste estudo.

Está claro que o As é um desregulador endócrino que impacta negativamente o sistema reprodutor masculino. Os seus principais mecanismos de desregulação envolvem, principalmente, a geração de espécies reativas de oxigênio e diminuição da secreção de FSH e LH. Outros mecanismos que também contribuem para a toxicidade testicular consistem na

indução de apoptose das células germinativas, alteração na expressão e na estrutura do receptor de andrógeno e possível desregulação da barreira hemato-testicular, por redução da expressão de claudina-11 (JEONG *et al.*, 2017; RENU *et al.*, 2018). Esta é a primeira vez que foi avaliada a relação da toxicidade reprodutiva do As com marcadores moleculares de macrófagos no testículo. Os resultados deste estudo sugerem que não houve ativação e/ou recrutamento de macrófagos nos grupos As1 e As5 e, além disso, aparentemente o As5 ainda não foi capaz de induzir a ativação de macrófagos ou de recrutá-los no co-tratamento com LPS, o que pode permitir que o testículo se torne mais suscetível a infecções. Também, como documentado em outros tecidos, o As5 amplificou a capacidade do testículo em expressar marcadores pró-inflamatórios como *Il1b* e *Tnf* frente ao desafio imunológico ao LPS, o que pode refletir no aumento de suas concentrações. Estas citocinas são capazes de reduzir a produção de testosterona pela célula de Leydig. Se comprovado que o As aumente a concentração destas citocinas, seria caracterizado um novo mecanismo de toxicidade que ainda não havia sido descrito para o As no testículo.

Embora o nosso estudo não tenha tido como objetivo avaliar o potencial efeito estrogênico do As no testículo, foi avaliada pela primeira vez a expressão da *Cyp19a1*, que codifica a aromatase, enzima responsável pela conversão de precursores andrógenos em hormônios estrogênicos. Como não foi observada um aumento de sua expressão, o nosso estudo descarta um dos possíveis mecanismos estrogênicos que poderiam ser desempenhados pela exposição crônica ao As no testículo.

Porém, o presente estudo possui algumas limitações. As citocinas avaliadas foram analisadas somente por RT-QPCR. No entanto, as células apresentam mecanismos de regulação pós-transcricionais, onde nem sempre é possível estabelecer uma relação entre RNAm e concentração proteica. Além disso, os marcadores *Cd163* e *Cd68* deveriam passar por uma prova real como, por exemplo, pela análise de imunohistoquímica, imunofluorescência, ou ainda, em conjunto com as citocinas, pela citometria de fluxo, que pode quantificar diversos marcadores simultaneamente. Embora tenha sido o desejo inicial do nosso grupo utilizar estas técnicas, o corte de recursos que as agências de fomento vêm sofrendo nos últimos anos impediu que fossem obtidos os reagentes e anticorpos necessários para essas análises. Outros fatores limitantes incluem a ausência da quantificação de hormônios estrogênicos, análises de cinética de reação das enzimas antioxidantes e das enzimas esteroideogênicas, sobretudo, no grupo As5+LPS, onde é de se imaginar que possa haver alterações nesses parâmetros. No futuro,

espera-se que estas análises de cinética, em conjunto com análises sobre a atividade de macrófagos complementem os nossos resultados.

## 10 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram explorados novos mecanismos pelos quais o arsênio poderia desregular o sistema endócrino do testículo e, por consequência, a espermatogênese. Constatou-se que o arsênio não age pela superexpressão de *Cyp19a1* (aromatase) ou o fator de transcrição *Egr2*. Em contrapartida, o arsênio administrado conjuntamente com LPS, pode amplificar a expressão de *Il1b* e *Tnf*, cujos ambos seus produtos são capazes de inibir a síntese de testosterona. Além disso, a subexpressão de *Cd68* no co-tratamento crônico de arsênio e exposição aguda ao LPS sugere que a capacidade inata do testículo em combater insultos externos pode tornar-se prejudicada, fazendo com que o testículo seja mais vulnerável a infecções. Todavia, o arsênio sozinho não foi capaz de aumentar a expressão de tais citocinas, demonstrando que este não é um mecanismo de desregulação endócrina pelo qual este metaloide desempenhe em situações homeostáticas, ao menos em nossas condições experimentais. Assim, é possível que outros mecanismos previamente descritos, como a geração de espécies reativas de oxigênio e a diminuição da secreção de gonadotrofinas pela hipófise, desempenhem um papel mais importante nas alterações das funções esteroidogênicas e gametogênicas induzidas pelo As no testículo.

## REFERÊNCIAS

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kooger, 2012.

ALBRECHT, Martin. Insights into the nature of human testicular peritubular cells. **Annals of Anatomy**, [S. l.], v. 191, n. 6, p. 532–540, 2009. DOI: 10.1016/j.aanat.2009.08.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aanat.2009.08.002>.

ALVES, Marco G.; RATO, Luís; CARVALHO, Rui A.; MOREIRA, Paula I.; SOCORRO, Sílvia; OLIVEIRA, Pedro F. Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. l.], v. 70, n. 5, p. 777–793, 2013. DOI: 10.1007/s00018-012-1079-1.

ALWAAL, Amjad; BREYER, Benjamin N.; LUE, Tom F. Normal male sexual function: Emphasis on orgasm and ejaculation. **Fertility and Sterility**, [S. l.], v. 104, n. 5, p. 1051–1060, 2015. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.08.033. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.08.033>.

AMRHEIN, Valentin; GREENLAND, Sander; MCSHANE, Blake. Retire statistical significance. **Nature**, [S. l.], v. 567, p. 305–307, 2019.

ARGOS, Maria; AHSAN, Habibul; GRAZIANO, Joseph H. Arsenic and human health: Epidemiologic progress and public health implications. **Reviews on Environmental Health**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 191–195, 2012. DOI: 10.1515/reveh-2012-0021.

AVENDAÑO, M. S.; VAZQUEZ, M. J.; TENA-SEMPERE, M. Disentangling puberty: Novel neuroendocrine pathways and mechanisms for the control of mammalian puberty. **Human Reproduction Update**, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 737–763, 2017. DOI: 10.1093/humupd/dmx025.

BAKSI, Arka; JAIN, Ruchi; MANJITHAYA, Ravi; S, Vasanth S.; KONDAIAH, Paturu; DIGHE, Rajan R. Correlation between the aberrant human testicular germ-cell gene expression and disruption of spermatogenesis leading to male infertility. **BioRxiv**, [S. l.], 2018.

BENCKO, Vladimir; FOONG, Florence Yan Li. The history of arsenical pesticides and health risks related to the use of Agent Blue. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 312–316, 2017. DOI: 10.26444/aaem/74715.

BHUSHAN, Sudhanshu; MEINHARDT, Andreas. The macrophages in testis function. **Journal of Reproductive Immunology**, [S. l.], v. 119, p. 107–112, 2017. a. DOI: 10.1016/j.jri.2016.06.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2016.06.008>.

BHUSHAN, Sudhanshu; TCHATALBACHEV, Svetlin; LU, Yongning; FRÖHLICH, Suada; FIJAK, Monika; VIJAYAN, Vijith; CHAKRABORTY, Trinad; MEINHARDT, Andreas. Differential Activation of Inflammatory Pathways in Testicular Macrophages Provides a Rationale for Their Subdued Inflammatory Capacity. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 194, n. 11, p. 5455–5464, 2015. DOI: 10.4049/jimmunol.1401132. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1401132>.

BONNARDEL, Johnny; GUILLIAMS, Martin. Developmental control of macrophage function. **Current Opinion in Immunology**, [S. l.], v. 50, p. 64–74, 2018. DOI:

10.1016/j.coi.2017.12.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2017.12.001>.

BORGES, Beatriz de Carvalho; RORATO, Rodrigo C.; UCHOA, Ernane Torres; MARANGON, Paula B.; ELIAS, Carol F.; ANTUNES-RODRIGUES, Jose; ELIAS, Lucila L. K. Protein tyrosine phosphatase-1b contributes to Lps-induced Leptin resistance in male rats. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 308, n. 1, p. E40–E50, 2015. DOI: 10.1152/ajpendo.00094.2014.

BOURGUIGNON, Nadia Soledad; BONAVENTURA, María Marta; RODRÍGUEZ, Diego; BIZZIOZERO, Marianne; VENTURA, Clara; NUÑEZ, Mariel; LUX-LANTOS, Victoria Adela; LIBERTUN, Carlos. Evaluation of sodium arsenite exposure on reproductive competence in pregnant and postlactational dams and their offspring. **Reproductive Toxicology**, [S. l.], v. 69, p. 1–12, 2017. DOI: 10.1016/j.reprotox.2017.01.002.

BRETON, Sylvie; RUAN, Ye Chun; PARK, Yoo Jin; KIM, Bongki. Regulation of epithelial function, differentiation, and remodeling in the epididymis. **Asian Journal of Andrology**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 3–9, 2016. DOI: 10.4103/1008-682X.165946.

CHANG, Soo Im; JIN, Bohwan; YOUN, Pilju; PARK, Changbo; PARK, Jung Duck; RYU, Doug Young. Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S. l.], v. 218, n. 2, p. 196–203, 2007. DOI: 10.1016/j.taap.2006.11.009.

CHEN, Lei; SHI, Guang rui; HUANG, Dan dan; LI, Yang; MA, Chen chao; SHI, Min; SU, Bin xiao; SHI, Guang jiang. Male sexual dysfunction: A review of literature on its pathological mechanisms, potential risk factors, and herbal drug intervention. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 112, n. August 2018, p. 108585, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.01.046. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.046>.

CHEN, Qiaoyuan; DENG, Tingting; HAN, Daishu. Testicular immunoregulation and spermatogenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [S. l.], v. 59, p. 157–165, 2016. DOI: 10.1016/j.semcdb.2016.01.019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.01.019>.

CHENG, C. Y.; MRUK, Dolores D. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. **Pharmacological Reviews**, [S. l.], v. 64, n. 1, p. 16–64, 2012. DOI: 10.1124/pr.110.002790.

CHIOU, Tzeon Jye; CHU, Sin Tak; TZENG, Woan Fang; HUANG, Yu Chen; LIAO, Chi. Arsenic trioxide impairs spermatogenesis via reducing gene expression levels in testosterone synthesis pathway. **Chemical Research in Toxicology**, [S. l.], v. 21, n. 8, p. 1562–1569, 2008. DOI: 10.1021/tx700366x.

CHOMCZYNSKI, Piotr; SACCHI, Nicoletta. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 581–585, 2006. DOI: 10.1038/nprot.2006.83.

CHOWDHURY, Wahida Khan et al. The Role of Arsenic on Skin Diseases, Hair Fall and Inflammation: An Immunological Review and Case Studies. **Journal of Clinical & Experimental Dermatology Research**, [S. l.], v. 08, n. 02, 2017. DOI: 10.4172/2155-

9554.1000384.

COOKE, Paul S.; NANJAPPA, Manjunatha K.; KO, Chemyong; PRINS, Gail S.; HESS, Rex A. Estrogens in male physiology. **Physiological Reviews**, [S. l.], v. 97, n. 3, p. 995–1043, 2017. DOI: 10.1152/physrev.00018.2016.

CURI, Tatiana Zauer; NEUBERT DA SILVA, Gabriela; PASSONI, Marcella Tapias; LIMA TOLOUEI, Sara Emilia; MELDOLA, Heloísa; ROMANO, Renata Marino; GRECHI, Nicole; DALSENTER, Paulo Roberto; MARTINO-ANDRADE, Anderson Joel. In Utero and Lactational Exposure to Diisopentyl Phthalate Induces Fetal Toxicity and Antiandrogenic Effects in Rats. **Toxicological Sciences**, [S. l.], v. 171, n. 2, p. 347–358, 2019. DOI: 10.1093/toxsci/kfz159.

DAMIÁN, Juan Pablo; BAUSERO, María; BIELLI, Alejandro. Acute stress, hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis and testicular function-a review. **Annals of Animal Science**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 31–50, 2015. DOI: 10.2478/aoas-2014-0084.

DANGLEBEN, Nygerma L.; SKIBOLA, Christine F.; SMITH, Martyn T. Arsenic immunotoxicity: A review. **Environmental Health: A Global Access Science Source**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1, 2013. DOI: 10.1186/1476-069X-12-73. Disponível em: Environmental Health.

DARBRE, P. D. Metalloestrogens: An emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast. **Journal of Applied Toxicology**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 191–197, 2006. DOI: 10.1002/jat.1135.DEFALCO, Tony; POTTER, Sarah J.; WILLIAMS, Alyn V.; WALLER, Brittain; KAN, Matthew J.; CAPEL, Blanche. Macrophages Contribute to the Spermatogonial Niche in the Adult Testis. **Cell Reports**, [S. l.], v. 12, n. 7, p. 1107–1119, 2015. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.07.015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.015>.

DUAN, Xiaoxu et al. Acute arsenic exposure induces inflammatory responses and CD4 + T cell subpopulations differentiation in spleen and thymus with the involvement of MAPK, NF- $\kappa$ B, and Nrf2. **Molecular Immunology**, [S. l.], v. 81, n. 77, p. 160–172, 2017. DOI: 10.1016/j.molimm.2016.12.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2016.12.005>.

EPELMAN, Slava; LAVINE, Kory J.; RANDOLPH, Gwendalyn J. Origin and Functions of Tissue Macrophages. **Immunity**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 21–35, 2014. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.06.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.013>.

FERREIRA, Mónica; MATOS, Rita Cerejeira; OLIVEIRA, Helena; NUNES, Bruno; PEREIRA, Maria De Lourdes. Impairment of mice spermatogenesis by sodium arsenite. **Human and Experimental Toxicology**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 290–302, 2012. DOI: 10.1177/0960327111405862.

FIETZ, D.; BERGMANN, M. Functional Anatomy and Histology of the Testis. In: HUHTANIEMI, Manuela Simonilpo T. (org.). **Endocrinology of the Testis and Male Reproduction**. 1. ed. [s.l.] : Springer, 2017. p. 313–341. DOI: 10.1007/978-3-319-29456-8. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-29456-8>.

FIJAK, Monika; PILATZ, Adrian; HEDGER, Mark P.; NICOLAS, Nour; BHUSHAN, Sudhanshu; MICHEL, Vera; TUNG, Kenneth S. K.; SCHUPPE, Hans Christian; MEINHARDT, Andreas. Infectious, inflammatory and “autoimmune” male factor infertility: How do rodent models inform clinical practice? **Human Reproduction Update**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 416–441, 2018. DOI: 10.1093/humupd/dmy009.

FLORA, Swaran J. S.; AGRAWAL, Shruti. **Arsenic, Cadmium, and Lead**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2017. DOI: 10.1016/b978-0-12-804239-7.00031-7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-804239-7.00031-7>.

FOUAD, Amr A.; ALBUALI, Waleed H.; AL-MULHIM, Abdulruhman S.; JRESAT, Iyad. Protective effect of telmisartan treatment against arsenic-induced testicular toxicity in rats. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, [S. l.], v. 70, n. 7–8, p. 175–181, 2015. DOI: 10.1515/znc-2015-5031.

FRANÇA, L. R.; HESS, R. A.; DUFOUR, J. M.; HOFMANN, M. C.; GRISWOLD, M. D. The Sertoli cell: One hundred fifty years of beauty and plasticity. **Andrology**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 189–212, 2016. DOI: 10.1111/andr.12165.

FUJITA, Youko et al. Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 on human sperm recognize bacterial endotoxins and mediate apoptosis. **Human Reproduction**, [S. l.], v. 26, n. 10, p. 2799–2806, 2011. DOI: 10.1093/humrep/der234.

GERSTENBERG, T. C.; LEVIN, R. J.; WAGNER, G. Erection and Ejaculation in Man. Assessment of the Electromyographic Activity of the Bulbocavernosus and Ischiocavernosus Muscles. **British Journal of Urology**, [S. l.], v. 65, n. 4, p. 395–402, 1990. DOI: 10.1111/j.1464-410X.1990.tb14764.x.

GORDON, Siamon; PLÜDDEMANN, Annette. Macrophage clearance of apoptotic cells: A critical assessment. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 9, n. JAN, p. 1–9, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00127.

GRISWOLD, Michael D. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. **Physiological Reviews**, [S. l.], v. 96, n. 37, p. 1–17, 2019. DOI: 10.1152/physrev.00013.2015.

HALES, Dale Buchanan. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. **Journal of Reproductive Immunology**, [S. l.], v. 57, n. 1–2, p. 3–18, 2002. DOI: 10.1016/S0165-0378(02)00020-7.

HERDE, Michel K.; IREMONGER, Karl J.; CONSTANTIN, Stephanie; HERBISON, Allan E. GnRH neurons elaborate a long-range projection with shared axonal and dendritic functions. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 33, n. 31, p. 12689–12697, 2013. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0579-13.2013.

HOLSTEGE, Gert; GEORGIADIS, Janniko R.; PAANS, Anne M. J.; MEINERS, Linda C.; VAN DER GRAAF, Ferdinand H. C. E.; REINDERS, A. A. T. Simone. Brain Activation during Human Male Ejaculation. **The Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 23, n. 27, p. 9185–9193, 2003.

HONG, Young Seoub; SONG, Ki Hoon; CHUNG, Jin Yong. Health effects of chronic arsenic

exposure. **Journal of Preventive Medicine and Public Health**, [S. l.], v. 47, n. 5, p. 245–252, 2014. DOI: 10.3961/jpmph.14.035.

HUSSAIN, Zulfia; KHAN, Junaid Ali. Food intake regulation by leptin: Mechanisms mediating gluconeogenesis and energy expenditure. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, [S. l.], v. 10, n. 10, p. 940–944, 2017. DOI: 10.1016/j.apjtm.2017.09.003.

HUTSON, James C. Physiologic interactions between macrophages and Leydig cells. **Experimental Biology and Medicine**, [S. l.], v. 231, n. 1, p. 1–7, 2006. DOI: 10.1177/153537020623100101.

IARC. Some Drinking-water Disinfectants and Contaminants, Including Arsenic - IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer - Google Books. [S. l.], v. 84, 2004. Disponível em: [https://books.google.com.pk/books?hl=en&lr=&id=op79jfMFM9gC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Some+Drinking-Water+Disinfectants+and+Contaminants,+Including+Arsenic.+&ots=iDPGVwH\\_ZS&sig=4TGgoF0bmyThQR1fqLD0vdG2QdY#v=onepage&q=Some Drinking-Water Disinfectants and C.](https://books.google.com.pk/books?hl=en&lr=&id=op79jfMFM9gC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Some+Drinking-Water+Disinfectants+and+Contaminants,+Including+Arsenic.+&ots=iDPGVwH_ZS&sig=4TGgoF0bmyThQR1fqLD0vdG2QdY#v=onepage&q=Some+Drinking-Water+Disinfectants+and+C)

IAVICOLI, Ivo; FONTANA, Luca; BERGAMASCHI, Antonio. The effects of metals as endocrine disruptors. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 206–223, 2009. DOI: 10.1080/10937400902902062.

IVANSKI, Fernanda et al. Prepubertal acrylamide exposure causes dose-response decreases in spermatogenic production and functionality with modulation of genes involved in the spermatogenesis in rats. **Toxicology**, [S. l.], v. 436, n. February, p. 152428, 2020. DOI: 10.1016/j.tox.2020.152428. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152428>.

JABLONSKI, Kyle A.; AMICI, Stephanie A.; WEBB, Lindsay M.; RUIZ-ROSADO, Juan De Dios; POPOVICH, Phillip G.; PARTIDA-SANCHEZ, Santiago; GUERAU-DE-ARELLANO, Mireia. Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 12, p. 5–11, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0145342.

JACOBO, Patricia; GUAZZONE, Vanesa Anabella; THEAS, María Susana; LUSTIG, Livia. Testicular autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 201–204, 2011. DOI: 10.1016/j.autrev.2010.09.026. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2010.09.026>.

JAIN, Nupur; CHANDRAMANI, Srinath. Arsenic poisoning- An overview. **Indian Journal of Medical Specialities**, [S. l.], p. 4–6, 2018. DOI: 10.1016/j.injms.2018.04.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.injms.2018.04.006>.

JAMES, Katherine A.; BYERS, Tim; HOKANSON, John E.; MELIKER, Jaymie R.; ZERBE, Gary O.; MARSHALL, Julie A. Association between lifetime exposure to inorganic arsenic in drinking water and coronary heart disease in Colorado residents. **Environmental Health Perspectives**, [S. l.], v. 123, n. 2, p. 128–134, 2015. DOI: 10.1289/ehp.1307839.

JANA, Kuladip; JANA, Subarna; SAMANTA, Prabhat Kumar. 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**, [S. l.], v. 4, p. 1–13, 2006. DOI: 10.1186/1477-7827-4-9.

JENKINS, Stephen J.; HUME, David A. Homeostasis in the mononuclear phagocyte system. **Trends in Immunology**, [S. l.], v. 35, n. 8, p. 358–367, 2014. DOI: 10.1016/j.it.2014.06.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2014.06.006>.

JEONG, Chang Hee; SEOK, Jin Sil; PETRIELLO, Michael C.; HAN, Sung Gu. Arsenic downregulates tight junction claudin proteins through p38 and NF- $\kappa$ B in intestinal epithelial cell line, HT-29. **Toxicology**, [S. l.], v. 379, p. 31–39, 2017. DOI: 10.1016/j.tox.2017.01.011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2017.01.011>.

JONES, Russell C.; JURD, Karenne M. Structural differentiation and fluid reabsorption in the ductuli efferentes testis of the rat. **Australian Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 79–90, 1987. DOI: 10.1071/B19870079.

KAJIHARA, Takeshi; OKAGAKI, Ryugo; ISHIHARA, Osamu. LPS-induced transient testicular dysfunction accompanied by apoptosis of testicular germ cells in mice. **Medical Molecular Morphology**, [S. l.], v. 39, p. 203–208, 2006. DOI: 10.1007/s00795-006-0334-7.

KAVLOCK, Robert J. et al. Kavlock Et Al. **Environ Health Perspect**, [S. l.], v. 1, n. August, p. 715–740, 1996. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1469675/pdf/envhper00347-0026.pdf>.

KHAN, S.; TELANG, AG; MALIK, JK. Arsenic-induced oxidative stress, apoptosis and alterations in testicular steroidogenesis and spermatogenesis in wistar rats: ameliorative effect of curcumin. **Wudpecker Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [S. l.], v. 2, n. May, p. 33–48, 2013.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Berne & Levy: Fisiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

LEVINE, Hagai; JØRGENSEN, Niels; MARTINO-ANDRADE, Anderson; MENDIOLA, Jaime; WEKSLER-DERRI, Dan; MINDLIS, Irina; PINOTTI, Rachel; SWAN, Shanna H. Temporal trends in sperm count: A systematic review and meta-regression analysis. **Human Reproduction Update**, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 646–659, 2017. DOI: 10.1093/humupd/dmx022.

LI, Xiuting et al. Exposure to environmental endocrine disruptors and human health. **Public Health and Emergency**, [S. l.], v. 1, p. 47–47, 2016. DOI: 10.21037/phe.2016.11.01.

LI, Yachen; WANG, Man; PIAO, Fengyuan; WANG, Xianghu. Subchronic exposure to arsenic inhibits spermatogenesis and downregulates the expression of Ddx3y in testis and epididymis of mice. **Toxicological Sciences**, [S. l.], v. 128, n. 2, p. 482–489, 2012. DOI: 10.1093/toxsci/kfs169.

LIAO, Wei Ting; LU, Jian He; LEE, Chih Hung; LAN, Cheng Che E.; CHANG, Jan Gowth; CHAI, Chee Yin; YU, Hsin Su. An Interaction between Arsenic-Induced Epigenetic Modification and Inflammatory Promotion in a Skin Equivalent during Arsenic Carcinogenesis. **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 137, n. 1, p. 187–196, 2017. DOI: 10.1016/j.jid.2016.08.017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2016.08.017>.

LIVADAS, Sarantis; CHROUSOS, George P. Control of the onset of puberty. **Current Opinion in Pediatrics**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 551–558, 2016. DOI: 10.1097/MOP.0000000000000386.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.

MALOLINA, E. A.; KULIBIN, A. Yu. Rete testis and the adjacent seminiferous tubules during postembryonic development in mice. **Russian Journal of Developmental Biology**, [S. l.], v. 48, n. 6, p. 385–392, 2017. DOI: 10.1134/S1062360417060029.

MANDAL, Badal Kumar; SUZUKI, Kazuo T. Arsenic round the world : a review. [S. l.], v. 58, p. 201–235, 2002.

MANTOVANI, Alberto; SICA, Antonio; SOZZANI, Silvano; ALLAVENA, Paola; VECCHI, Annunciata; LOCATI, Massimo. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, [S. l.], v. 25, n. 12, p. 677–686, 2004. DOI: 10.1016/j.it.2004.09.015.

MARTINEZ DE LA ESCALERA, G.; CHOI, A. L. H.; WEINER, R. I. Generation and synchronization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulses: Intrinsic properties of the GT1-1 GnRH neuronal cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 89, n. 5, p. 1852–1855, 1992. DOI: 10.1073/pnas.89.5.1852.

MAYERHOFER, Artur. Human testicular peritubular cells: More than meets the eye. **Reproduction**, [S. l.], v. 145, n. 5, 2013. DOI: 10.1530/REP-12-0497.

MEINHARDT, Andreas; HEDGER, Mark P. Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [S. l.], v. 335, n. 1, p. 60–68, 2011. DOI: 10.1016/j.mce.2010.03.022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2010.03.022>.

MEINHARDT, Andreas; WANG, Ming; SCHULZ, Christian; BHUSHAN, Sudhanshu. Microenvironmental signals govern the cellular identity of testicular macrophages. [S. l.], n. March, p. 757–766, 2018. DOI: 10.1002/JLB.3MR0318-086RR.

MINATEL, Brenda C.; SAGE, Adam P.; ANDERSON, Christine; HUBAUX, Roland; MARSHALL, Erin A.; LAM, Wan L.; MARTINEZ, Victor D. Environmental arsenic exposure: From genetic susceptibility to pathogenesis. **Environment International**, [S. l.], v. 112, n. November 2017, p. 183–197, 2018. DOI: 10.1016/j.envint.2017.12.017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.12.017>.

MOSSADEGH-KELLER, Noushin; SIEWEKE, Michael H. Testicular macrophages: guardians of fertility. **Cellular Immunology**, [S. l.], n. March, 2018. DOI: 10.1016/j.cellimm.2018.03.009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.03.009>.

MRUK, Dolores D.; CHENG, C. Yan. The mammalian blood-testis barrier: Its biology and regulation. **Endocrine Reviews**, [S. l.], v. 36, n. 5, p. 564–591, 2015. DOI: 10.1210/er.2014-

1101.

NATHAN, Carl; ALBERT, Pasteur Matthew; DAËRON, Marc; SANTO, James Di; HERBOMEL, Philippe. Metchnikoff's Legacy in 2008. **Nature**, [S. l.], v. 9, n. 7, p. 695–698, 2008.

NAUJOKAS, Marisa F.; ANDERSON, Beth; AHSAN, Habibul; APOSHIAN, H. Vasken; GRAZIANO, Joseph H.; SUK, William A. Review The Broad Scope of Health Effects from Chronic Arsenic Exposure : Update on a Worldwide Public Health Problem. **Environmental Health Perspectives**, [S. l.], v. 121, n. 3, p. 295–302, 2013.

NAVARRO, Víctor M. New insights into the control of pulsatile GnRH release: The role of Kiss1/neurokinin B neurons. **Frontiers in Endocrinology**, [S. l.], v. 3, n. APR, p. 1–9, 2012. DOI: 10.3389/fendo.2012.00048.

O'BRYAN, Moira K.; GERDPRASERT, Orapin; NIKOLIC-PATERSON, David J.; MEINHARDT, Andreas; MUIR, Julie A.; FOULDS, Lynda M.; PHILLIPS, David J.; DE KRETZER, David M.; HEDGER, Mark P. Cytokine profiles in the testes of rats treated with lipopolysaccharide reveal localized suppression of inflammatory responses. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, [S. l.], v. 288, n. 6, p. R1744-55, 2005. a. DOI: 10.1152/ajpregu.00651.2004. Disponível em: <http://ajpregu.physiology.org/content/288/6/R1744.abstract>.

O'BRYAN, Moira K.; SCHLATT, Stefan; PHILLIPS, David J.; DE KRETZER, David M.; HEDGER, Mark P. Bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels in vivo. **Endocrinology**, [S. l.], v. 141, n. 1, p. 238–246, 2000. a. DOI: 10.1210/endo.141.1.7240.

PANT, N.; KUMAR, R.; MURTHY, R. C.; SRIVASTAVA, S. P. Male reproductive effect of arsenic in mice. **BioMetals**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 113–117, 2001. DOI: 10.1023/A:1016686113763.

PELLEGRINI, Manuela et al. ATRA and KL promote differentiation toward the meiotic program of male germ cells. **Cell Cycle**, [S. l.], v. 4101, 2008. DOI: 10.4161/cc.7.24.7262.

PETERSEN, Cecilia; SÖDER, Olle. The Sertoli cell - A hormonal target and “super” nurse for germ cells that determines testicular size. **Hormone Research**, [S. l.], v. 66, n. 4, p. 153–161, 2006. DOI: 10.1159/000094142.

POTTER, Sarah J.; DE FALCO, Tony. Role of the testis interstitial compartment in spermatogonial stem cell function. **Reproduction**, [S. l.], v. 153, n. 4, p. R151–R162, 2017. DOI: 10.1530/REP-16-0588.

PRASAD, Priyanka; SINHA, Dona. Low-level arsenic causes chronic inflammation and suppresses expression of phagocytic receptors. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 24, n. 12, p. 11708–11721, 2017. DOI: 10.1007/s11356-017-8744-8.

QU, Ning; OGAWA, Yuki; KURAMASU, Miyuki; NAGAHORI, Kenta; SAKABE, Kou; ITOH, Masahiro. Immunological microenvironment in the testis. **Reproductive Medicine and Biology**, [S. l.], n. July, p. 1–8, 2019. DOI: 10.1002/rmb2.12293.

RAHMAN, Faisal; CHRISTIAN, Helen C. Non-classical actions of testosterone: an update. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 18, n. 10, p. 371–378, 2007. DOI: 10.1016/j.tem.2007.09.004.

RAMOS, A. T.; DIAMANTE, M. A. S.; DE ALMEIDA LAMAS, C.; DOLDER, H.; DE SOUZA PREDES, F. Morphological and morphometrical changes on adult Wistar rat testis caused by chronic sodium arsenite exposure. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 24, n. 36, 2017. DOI: 10.1007/s11356-017-0200-2.

RAMOS-TREVIÑO, Juan; BASSOL-MAYAGOITIA, Susana; RUIZ-FLORES, Pablo; ESPINO-SILVA, Perla Karina; SAUCEDO-CÁRDENAS, Odila; VILLA-CEDILLO, Sheila Adela; NAVA-HERNÁNDEZ, Martha P. In Vitro Evaluation of Damage by Heavy Metals in Tight and Gap Junctions of Sertoli Cells. **DNA and Cell Biology**, [S. l.], v. 36, n. 10, p. 829–836, 2017. DOI: 10.1089/dna.2017.3839.

REBOURCET, D. et al. The effects of an in utero exposure to 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin on male reproductive function: Identification of Ccl5 as a potential marker. **International Journal of Andrology**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 413–424, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2009.01020.x.

REDDY, Mallikarjuna M.; MAHIPAL, Suraneni V. K.; SUBHASHINI, Jagu; REDDY, Madhava C.; ROY, Karnati R.; REDDY, Gorla V.; REDDY, Pingili R. K.; REDDANNA, Pallu. Bacterial lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the impairment of steroidogenesis and spermatogenesis in rats. **Reproductive Toxicology**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 493–500, 2006. a. DOI: 10.1016/j.reprotox.2006.03.003.

RENU, Kaviyarasi; MADHYASTHA, Harishkumar; MADHYASTHA, Radha; MARUYAMA, Masugi. Review on molecular and biochemical insights of arsenic-mediated male reproductive toxicity. **Life Sciences**, [S. l.], v. 212, n. September, p. 37–58, 2018. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.09.045. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.09.045>.

RIVAL, C.; THEAS, M. S.; SUESCUN, M. O.; JACOBO, P.; GUAZZONE, V.; ROOIJEN, N. Van; LUSTIG, L. Functional and phenotypic characteristics of testicular macrophages in experimental autoimmune orchitis. [S. l.], n. January, p. 108–117, 2008. DOI: 10.1002/path.

ROSSI, Pellegrino; LOLICATO, Francesca; GRIMALDI, Paola; DOLCI, Susanna; SAURO, Annarita Di; FILIPPONI, Doria; GEREMIA, Raffaele. Transcriptome analysis of differentiating spermatogonia stimulated with kit ligand. **Gene Expression Patterns**, [S. l.], v. 8, p. 58–70, 2008. DOI: 10.1016/j.modgep.2007.10.007.

RUSSELL, Lonnie D.; DE FRANÇA, Luiz Renato. Building a testis. **Tissue and Cell**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 129–147, 1995. DOI: 10.1016/S0040-8166(95)80016-6.

SARKAR, Sanghamitra; HAZRA, J.; CHOWDHURY, Amal R. O. Y. Arsenic Induced Toxicity on Testicular Tissue of Mice. **Indian J. Physiol. Pharmacol.**, [S. l.], v. 52, n. 52, p. 84–90, 2008.

SHAPOURI-MOGHADDAM, Abbas et al. **Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease**. [s.l.: s.n.]. v. 233 DOI: 10.1002/jcp.26429.

SHARMA, Garima; KUMAR, Madhu. Antioxidant and modulatory role of *Chlorophytum borivilianum* against arsenic induced testicular impairment. **Journal of Environmental Sciences (China)**, [S. l.], v. 24, n. 12, p. 2159–2165, 2012. DOI: 10.1016/S1001-0742(11)61019-X. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)61019-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742(11)61019-X).

SIDHU, Mandeep S.; DESAI, Karan P.; LYNCH, Heather N.; RHOMBERG, Lorenz R.; BECK, Barbara D.; VENDITTI, Ferdinand J. Mechanisms of action for arsenic in cardiovascular toxicity and implications for risk assessment. **Toxicology**, [S. l.], v. 331, p. 78–99, 2015. DOI: 10.1016/j.tox.2015.02.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2015.02.008>.

SILVERTHORN, Dee Unglaub. **Fisiologia Humana - Uma Abordagem Integrada**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SOUZA, Ana Cláudia Ferreira; MARCHESI, Sarah Cozzer; FERRAZ, Rafael Penha; DE ALMEIDA LIMA, Graziela Domingues; DE OLIVEIRA, Juraci Alves; MACHADO-NEVES, Mariana. Effects of sodium arsenate and arsenite on male reproductive functions in Wistar rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, [S. l.], v. 79, n. 6, p. 274–286, 2016. DOI: 10.1080/15287394.2016.1150926.

SOUZA, Annaliza Carvalho Meneguelli De; ALMEIDA, Marcelo Gomes; PESTANA DE, Inácio Abreu; DE SOUZA, Cristina Maria Magalhães. Arsenic Exposure and Effects in Humans: A Mini-Review in Brazil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, [S. l.], v. 76, n. 3, p. 357–365, 2019. DOI: 10.1007/s00244-018-00586-6.

STANTON, Peter G. Regulation of the blood-testis barrier. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [S. l.], v. 59, p. 166–173, 2016. DOI: 10.1016/j.semcd.2016.06.018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2016.06.018>.

STRAUSS, Jerome F. **Yen & Jaffe's reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management**. 8. ed. [s.l.] : Elsevier, 2019.

SUN, Hong Jie; XIANG, Ping; LUO, Jun; HONG, Huachang; LIN, Hongjun; LI, Hong Bo; MA, Lena Q. Mechanisms of arsenic disruption on gonadal, adrenal and thyroid endocrine systems in humans: A review. **Environment International**, [S. l.], v. 95, p. 61–68, 2016. DOI: 10.1016/j.envint.2016.07.020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2016.07.020>.

TCHOUNWOU, Paul B.; CENTENO, Jose A.; FOOD, U. S. Carcinogenic and Systemic Health Effects Associated with Arsenic Exposure—A Critical Review. **Toxicologic Pathology**, [S. l.], v. 31, p. 575–588, 2003. DOI: 10.1080/714044691.

TELLES, Tatiane M. B. B.; DE OLIVEIRA, Bruna M. T.; LOMBA, Luis A.; LEITE-AVALCA, Mariane G.; CORREIA, Diego; ZAMPRONIO, Aleksander R. Effects of Binge-Like Ethanol Exposure During Adolescence on the Febrile Response in Rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, [S. l.], v. 41, n. 3, p. 507–515, 2017. DOI: 10.1111/acer.13333.

TSUTSUMI, Rie; WEBSTER, Nicholas J. G. GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. **Endocrine Journal**, [S. l.], v. 56, n. 6, p. 729–737, 2009. DOI: 10.1507/endocrj.K09E-185.

TYAGI, Vineet; SCORDO, Michael; YOON, Richard S.; LIPORACE, Frank A.; GREENE, Loren Wissner. Revisiting the role of testosterone: Are we missing something? **Reviews in urology**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 16–24, 2017. DOI: 10.3909/riu0716. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28522926> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5434832>.

VIRAJ, A.; TUREK, Paul J. Ejaculatory physiology and dysfunction. **Urologic Clinics of North America**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 363–376, 2001. DOI: 10.1016/S0094-0143(05)70145-2.

WALKER, William H. Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [S. l.], v. 365, n. 1546, p. 1557–1569, 2010. DOI: 10.1098/rstb.2009.0258.

WHO. Exposure to Arsenic: A Major Public Health Concern. **Agriculture**, [S. l.], p. 5, 2010. a. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2011.12.007. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/features/arsenic.pdf?ua=1>.

WHO. Ten chemicals of major public health concern. **Who**, [S. l.], p. 1–4, 2010. b. Disponível em: [http://www.who.int/ipcs/features/10chemicals\\_en.pdf?ua=1](http://www.who.int/ipcs/features/10chemicals_en.pdf?ua=1).

WINNALL, Wendy R.; MUIR, Julie A.; HEDGER, Mark P. Rat resident testicular macrophages have an alternatively activated phenotype and constitutively produce interleukin-10 in vitro. [S. l.], v. 90, n. July, p. 133–143, 2011. DOI: 10.1189/jlb.1010557.

XU, Weipan et al. Environmental exposure to arsenic may reduce human semen quality: Associations derived from a Chinese cross-sectional study. **Environmental Health: A Global Access Science Source**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–9, 2012. DOI: 10.1186/1476-069X-11-46.

XU, Yuanyuan; TOKAR, Erik J.; WAALKES, Michael P. Arsenic-induced cancer cell phenotype in human breast epithelia is estrogen receptor-independent but involves aromatase activation. **Archives of Toxicology**, [S. l.], v. 88, n. 2, p. 263–274, 2014. DOI: 10.1007/s00204-013-1131-4.

YANG, Oneyeol; KIM, Hye Lim; WEON, Jong-Il; SEO, Young Rok. Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. **Journal of Cancer Prevention**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 12–24, 2015. DOI: 10.15430/jcp.2015.20.1.12.

ZHOU, Qing; XI, Shuhua. **A review on arsenic carcinogenesis: Epidemiology, metabolism, genotoxicity and epigenetic changes**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2018. v. 99 DOI: 10.1016/j.yrtph.2018.09.010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.09.010>.

ZUBAIR, M.; AHMAD, M.; JAMIL, H.; DEEBA, F. Toxic effects of arsenic on semen and hormonal profile and their amelioration with vitamin E in Teddy goat bucks. **Andrologia**, [S. l.], v. 48, n. 10, p. 1220–1228, 2016. DOI: 10.1111/and.12564.

ZUBAIR, M.; AHMAD, M.; QURESHI, Z. I. Review on arsenic-induced toxicity in male reproductive system and its amelioration. **Andrologia**, [S. l.], v. 49, n. 9, p. 1–8, 2017. DOI: 10.1111/and.12791.