

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS BOTUCATU**

MICHELE KIMIE SANKAKO

**FUNÇÃO TESTICULAR DE RATOS EXPOSTOS À FUMAÇA
DO CIGARRO E POSSÍVEL PAPEL PROTETOR DO ZINCO -
ANÁLISES SEMINAIS, MORFOLÓGICAS E MOLECULARES**

**Botucatu - SP
2011**

MICHELE KIMIE SANKAKO

**FUNÇÃO TESTICULAR DE RATOS EXPOSTOS À FUMAÇA
DO CIGARRO E POSSÍVEL PAPEL PROTETOR DO ZINCO -
ANÁLISES SEMINAIS, MORFOLÓGICAS E MOLECULARES**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu,
como parte dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas –
Farmacologia

Orientador: Prof. Titular Oduvaldo Câmara Marques Pereira

Coorientadora: Dr^a Patrícia Carvalho Garcia

**Botucatu - SP
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Sankako, Michele Kimie.

Função testicular de ratos expostos à fumaça do cigarro e possível papel protetor do zinco - análises seminais, morfológicas e moleculares/
Michele Kimie Sankako. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Oduvaldo Câmara Marques Pereira

Co-orientador: Patrícia Carvalho Garcia

Capes: 21000000

1. Rato. 2. Zinco - Efeito fisiológico. 3. Cigarro.

Palavras-chave: Cigarro; Espermatozoides; Estresse oxidativo; Função testicular; Rato; Zinco.

Dedicatória

***Aos meus pais Mamoru e Célia e minha irmã Andréia por todo
amor, carinho, compreensão, amizade e incentivo dedicados
durante todos os anos de minha vida.***

Agradecimentos

Agradeço a Deus por toda proteção e orientação.

Agradeço ao Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira, orientador ímpar, por todos os seus ensinamentos, dedicação e paciência.

Agradeço a minha coorientadora Dr^a Patrícia Carvalho Garcia, pela imensa colaboração, amizade e dedicação.

Agradeço aos animais experimentais utilizados por doarem suas vidas.

Agradeço à Dr^a Renata Carolina Piffer, por todo seu auxílio e amizade.

À Prof^a Dr^a Débora Cristina Damasceno, Prof^a Dr^a Wilma de Grava Kempinas, e ao Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi, bem como suas alunas Bruna, Juliana e Aline pela imensa colaboração com a presente dissertação.

Ao Mário e José, funcionários do laboratório Experimental – FMB, pelo auxílio durante o período de tratamento dos animais. Ao José Eduardo pela confecção das lâminas histológicas.

Aos colegas e amigos do Programa de Pós-graduação, principalmente, Juliana, Fábio, Anthony, Vanessa, Leandro, Patrícia, por toda companhia, conselhos e amizade.

Aos funcionários da seção de Pós-graduação por todos os auxílios prestados.

Aos funcionários e colegas do departamento de Farmacologia por toda companhia, apoio e amizade.

Às meninas companheiras de república, Aline (“Fun”) e Tatícia (“Bú”), por toda amizade, conversas e companheirismo durante os dias divertidos e por me auxiliarem nos momentos tristes e estressantes.

A todos os professores que estiveram presentes em algum momento de minha formação.

A todas as pessoas, que estiveram presentes em minha vida, sejam de perto ou de longe e que sempre torceram por mim, me incentivando, me oferecendo palavras sábias e de amizade para que tudo se tornasse mais fácil.

À Fapesp pelo auxílio financeiro (processo 2009/03475-4) .

À Biblioteca da UNESP, campus de Botucatu, pela elaboração da ficha catalográfica.

Epígrafe

*“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que
querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de
êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o
palácio se não o fizerem ali?”*

(“Bernardo Soares” – Fernando Pessoa)

Resumo

A literatura mundial tem apontado e concluído que o cigarro (tabaco) causa danos na fertilidade masculina e feminina, sendo que cerca de 13% dos casos de infertilidade são atribuídos ao consumo do cigarro. O zinco, por sua vez, é um antioxidante e um cofator da divisão celular, exercendo um importante papel na reprodução. O objetivo do presente estudo foi avaliar a função testicular de ratos expostos à fumaça do cigarro e um possível papel protetor do zinco, por meio da realização de análises hormonal, seminal, histopatológica e molecular, bem como investigar um mecanismo pelo qual ocorrem essas alterações e proteção. Ratos machos Wistar (60 dias de idade) foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: controle (G1; n=10), exposto à fumaça do cigarro (G2; n=10; 20 cigarros/ dia/ 9 semanas) e exposto à fumaça do cigarro e suplementado com zinco (G3; n=8; 20 cigarros/ dia/ 9 semanas; 20 mg/ kg de cloreto de zinco diariamente durante 9 semanas, por gavagem). Terminado o período de tratamento, os animais foram eutanasiados e, em seguida, foram coletados materiais para as análises. O grupo exposto à fumaça do cigarro apresentou uma redução da massa corporal, comprometimento da concentração, motilidade, morfologia e vitalidade espermática e aumentos da concentração de malonaldeído, grupos tióis e atividade da superóxido dismutase, em relação ao grupo controle. O zinco foi capaz de prevenir a redução da concentração espermática e o aumento excessivo da lipoperoxidação; de induzir o aumento da concentração de testosterona plasmática, do peso úmido do testículo e da concentração de grupos tióis. Assim, a exposição à fumaça do cigarro pode exercer efeitos maléficos sobre a função testicular em decorrência, pelo menos parcialmente, do estresse oxidativo exacerbado induzido pelo cigarro. O zinco mostrou uma propriedade de desempenhar um importante papel modulador/protetor sobre determinados parâmetros, o que torna sua associação aos tratamentos convencionais para infertilidade relacionada ao tabagismo masculino uma alternativa promissora.

Palavras-chave: cigarro; espermatozoides; estresse oxidativo; função testicular; rato; zinco.

Abstract

The literature has reported and concluded that cigarette (tobacco) causes male and female infertility problems. Approximately 13% of infertility cases are attributed to cigarette smoking. Zinc, in its turn, is an antioxidant and a cofactor of cell division, playing an important role in reproduction. The aim of this study was to evaluate the testicular function of rats exposed to cigarette smoke and a possible protective role of zinc, through hormonal, seminal, histopathological and molecular analysis, and to investigate a responsible mechanism for these alterations and protection. Male Wistar rats (60 days old) were randomly divided into 3 groups: control (G1, n=10), exposed to cigarette smoke (G2, n=10; 20 cigarettes/ day/ 9 weeks) and exposed to tobacco smoke cigarette and supplemented with zinc (G3, n=8; 20 cigarettes/ day/ 9 weeks; 20 mg/ kg zinc chloride daily for 9 weeks, by gavage). After the treatment period, the animals were euthanized and materials were collected for analyses. The group exposed to cigarette smoke showed reduction in body mass, impaired sperm concentration, motility, morphology and vitality, besides increased malonaldehyde, thiol groups and superoxide dismutase activity when compared to control group. Zinc was able to prevent the reduction of sperm concentration and the excessive increase lipid peroxidation, induces an increase in the concentration of plasma testosterone, in the wet weight of testis and, also, in the thiol groups concentration. Thus, the cigarette smoke exposure can have harmful effects on testicular function at least partially due to oxidative stress induced by cigarette. Zinc supplementation can play an important modulator/protector role in certain parameters, which makes a promising alternative the association of zinc with conventional treatments of male infertility related to smoking.

Keywords: cigarette, sperm, oxidative stress, testicular function, rat, zinc.

Lista de Ilustrações

Figura 1- Aparato utilizado para a exposição à fumaça do cigarro.....	26
Figura 2- Órgãos da reprodução masculina.....	26
Figura 3- Visualização do material utilizado para a análise da motilidade e concentração dos espermatozoides.....	28
Figura 4- Visualização dos espermatozoides no teste de vitalidade.....	29
Figura 5- Visualização dos espermatozoides na avaliação morfológica (normal ou anormal) no aumento de 1000X.....	29
Figura 6- Microscópio óptico de luz utilizado.....	30
Figura 7- Equipamentos utilizados para extração de RNA total.....	32
Figura 8- Equipamento termociclador utilizado.....	33
Figura 9- Fonte de energia e cuba utilizada na eletroforese.....	35
Figura 10- Sistema de visualização do gel de agarose e de captação de imagem.....	36
Figura 11- Sistema de leitura por espectrofotometria.....	37
Figura 12- Massa corporal (g) dos animais do G1 (Controle), G2 (Cigarro) e G3 (Cigarro/Zinco).....	42
Figura 13- Concentração plasmática de testosterona (ng/ dL) dos animais do G1 (Controle), G2 (Cigarro) e G3 (Cigarro/Zinco).....	44
Figura 14- Concentração espermática (milhões/ mL) dos animais do G1 (Controle), G2 (Cigarro) e G3 (Cigarro/Zinco).....	45
Figura 15- Fotomicrografias de cortes transversais dos testículos dos animais do G1 (Controle), G2 (Cigarro) e G3 (Cigarro/Zinco).....	48

Figura 16- Géis representativos dos produtos amplificados por RT-PCR do RNA total extraído do testículo e próstata ventral dos animais do G1 (Controle), G2 (Cigarro) e G3 (Cigarro/Zinco), usando “primers” específicos para o gene ciclofilina e receptor de andrógeno..... 49

Figura 17- Concentração de malonaldeído no testículo (nM/ g de testículo) dos animais do G1 (Controle), G2 (Cigarro) e G3 (Cigarro/Zinco)..... 51

Lista de Tabelas

Tabela 1- Peso úmido (g) dos órgãos da reprodução masculina (testículo, epidídimo, próstata ventral e vesícula seminal com secreção) e secreção da vesícula seminal dos animais do G1 (Controle), G2 (Cigarro) e G3 (Cigarro/Zinco).....	43
Tabela 2- Análise seminal (motilidade, vitalidade e morfologia) dos animais do G1 (Controle), G2 (Cigarro) e G3 (Cigarro/Zinco).....	46
Tabela 3- Análise histopatológica do testículo dos animais do G1 (Controle), G2 (Cigarro) e G3 (Cigarro/Zinco).....	47
Tabela 4- Análise da expressão gênica relativa do receptor de andrógeno no testículo e na próstata ventral dos animais do G1 (Controle), G2 (Cigarro) e G3 (Cigarro/Zinco).....	50
Tabela 5- Determinação da concentração de hemoglobina (g/ dL), malonaldeído (nM/ g Hb), grupos tióis (μ M/ g Hb) e da atividade da glutathione peroxidase (U/ mg Hb) e superóxido dismutase (U/ mg Hb) no sangue dos animais do G1 (Controle), G2 (Cigarro) e G (Cigarro/Zinco).....	52

Sumário

Resumo	
Abstract	
Lista de Ilustrações	
Lista de Tabelas	
1. Introdução	14
2. Objetivos	22
3. Material e Métodos	
3.1. Animais.....	23
3.2. Drogas e reagentes.....	24
3.3. Exposição à fumaça do cigarro.....	25
3.4. Massa corporal e peso úmido dos órgãos da reprodução masculina....	25
3.5. Determinação da concentração plasmática de testosterona.....	26
3.6. Análise seminal.....	27
3.7. Análise histopatológica do testículo.....	30
3.8. Análise da expressão gênica relativa do receptor de andrógeno na próstata ventral e no testículo.....	31
3.9. Determinação de malonaldeído no testículo	36
3.10. Análise dos marcadores de estresse oxidativo no sangue.....	37
3.11. Análise dos resultados.....	40
4. Resultados	
4.1. Massa corporal, peso úmido dos órgãos da reprodução masculina e concentração plasmática de testosterona.....	41
4.2. Análise seminal.....	43
4.3. Análise histopatológica do testículo.....	46
4.4. Análise da expressão gênica relativa do receptor de andrógeno na próstata ventral e no testículo.....	47
4.5. Concentração de malonaldeído no testículo.....	50
4.6. Análise dos marcadores de estresse oxidativo no sangue.....	51
5. Discussão	53
6. Conclusão	63

7. Referências.....	64
Anexo	
Certificado de aprovação pela Comissão de Ética na Experimentação	
Animal.....	72

Introdução

1. Introdução

A infertilidade é definida como falta de gestação, sem método contraceptivo, em um casal com vida sexual regular no período de pelo menos um ano (JUUL; KARMAUS; OLSEN, 1999; ZHU et al., 2009). A infertilidade é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma questão de saúde pública, afetando de 9 a 15% da população sexualmente ativa (JUUL; KARMAUS; OLSEN, 1999; BOIVIN et. al., 2007). É importante se considerar que a infertilidade é um grande fardo psicológico e social para o casal, que se vê incapaz de gerar descendentes que possam vir a complementar seus projetos de vida. O quadro atual das pesquisas sobre infertilidade mostra efeitos psicológicos múltiplos e inter-relacionados. Pode abranger desde aqueles propriamente pessoais, como ansiedade, frustração, estresse e o comprometimento da autoestima, até as dificuldades no desempenho profissional e no convívio social (BURNS, 2007).

Vários eventos chaves são necessários para que ocorra a concepção e resulte em neonato saudável. Primeiramente, os gametas feminino (óvulo) e masculino (espermatozoide) devem ser produzidos, ou seja, os processos de gametogênese precisam ocorrer de forma adequada. Assim, um óvulo maduro deve ser liberado do ovário e ser captado pela tuba uterina, local onde o óvulo deve ser fertilizado por um espermatozoide maduro, que foi ejaculado e que se tornou totalmente capacitado no trato reprodutivo feminino. Posteriormente, o embrião deve ser transportado para o útero, onde deve ser implantado e assim se desenvolver até o momento do nascimento. A infertilidade resulta, portanto, de alguma falha que possa existir em uma ou mais etapas desses processos.

A azoospermia, ausência de espermatozoides no ejaculado, pode ser classificada como obstrutiva (por exemplo, ausência congênita do ducto deferente, obstrução do ducto ou vasectomia) ou não-obstrutiva. A maioria dos casos de azoospermia não-obstrutiva é devido a uma falha testicular primária. Já a oligospermia, número reduzido de espermatozoides no ejaculado, pode resultar de problemas hormonais, ejaculação retrógrada, varicocele ou problema testicular primário com produção de espermatozoides. Doenças genéticas associadas com a azoospermia ou oligospermia severa incluindo síndrome de Klinefelter (47, XXY) e microdeleções do cromossomo Y podem ocorrer. A deficiência de elementos como zinco, folato e selênio podem levar a prejuízo na função espermática. Além disso, infecção geniturinária e fatores ambientais como medicamentos, drogas, álcool, cigarro e radiação podem prejudicar a produção e função espermática (ADAMSON; BAKER, 2003). Um fator masculino sozinho é responsável pela infertilidade de 20% dos casais, podendo, em combinação com causas de origem feminina, estar envolvido com 50% dos casos de infertilidade (WHO, 1999). As causas mais frequentes relacionadas ao fator feminino são: endometriose, tubas obstruídas, fator hormonal, processos infecciosos e idade.

O testículo é o órgão do sistema reprodutor masculino que produz os espermatozoides e o hormônio sexual masculino, a testosterona (STANBENFELD; EDQVIST, 1996). É constituído, principalmente, por células espermatogênicas, células de Sertoli e células intersticiais de Leydig (FRANÇA et al.,1993; RUSSEL; FRANÇA, 1995). Estas últimas produzem a testosterona que é essencial para os caracteres secundários e a completa competência reprodutiva no adulto. Algumas das funções das células de Sertoli são: auxiliar no processo espermatogênico e produzir a proteína transportadora de andrógeno (ABP), que carrega a testosterona

através do ducto eferente para o epidídimo, sendo o andrógeno utilizado para auxiliar na função normal do epidídimo (DADOUNE; DEMOULIN, 1993; STANBENFELD; EDQVIST, 1996). O epidídimo é outro órgão do sistema reprodutivo masculino e é formado por ductos altamente contorcidos que conecta o ducto eferente ao ducto deferente (HERMO; ROBAIRE, 2002; SULLIVAN et al., 2005). Os espermatozoides de mamíferos ao saírem do testículo são funcionalmente imaturos e necessitam do processo de maturação que ocorre durante a passagem pelo epidídimo (CUASNICÚ et al., 2002; OLSON; NAGDAS; WINFREY, 2002). A testosterona modifica a transcrição gênica ao interagir com receptores androgênicos nucleares, resultando na síntese de ácido ribonucleico (RNA) e proteínas específicas. O receptor de andrógeno responsável por essa interação é codificado por um gene presente no cromossomo X (BRINKMANN et al., 1989), existindo, portanto, em ambos os sexos. A próstata, a vesícula seminal, epidídimo e testículo que são órgãos da reprodução masculina possuem receptores para os andrógenos (BLOK et al., 1992; VAN ROIJEN et al., 1997) e assim são dependentes desta substância para se desenvolver e exercer suas funções.

Nas últimas décadas, tem se observado uma diminuição da concentração dos espermatozoides e do volume do sêmen em humanos (CARLSEN et al., 1992; AUGER et al., 1995) e isto vem associado a fatores ambientais e ao estilo de vida (SHARPE et al., 2000; SHARPE; FRANKS, 2002; FOSTER et al., 2008).

Cerca de um terço da população mundial acima dos 15 anos de idade possui o hábito de fumar e o tabagismo é reconhecido como um grande risco à saúde, sendo responsável por inúmeras doenças, por exemplo, respiratória (TAGER et al., 1988), cardiovascular (TEO et al., 2006) e câncer (SASCO; SECRETAN;

STRAIF, 2004). O cigarro contém numerosas substâncias incluindo nicotina, monóxido de carbono, aminas aromáticas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e reconhecidos carcinógenos e mutágenos tais como polônio radioativo, cádmio e benzopireno (STEDMAN, 1968). Algumas destas substâncias e/ou seus metabólitos podem ser detectados no plasma seminal (HASSAN et al., 2008). Isto indica a passagem destas substâncias através da barreira hemato-testicular. Assim, o cigarro pode levar a prejuízo à função espermática bem como ao material genético. Estudos têm apontado que o tabagismo reduz a motilidade espermática (SOFIKITIS et al., 1995), aumenta o número de espermatozoides com morfologia anormal (SOFIKITIS et al., 1995; KÜNZLE et al., 2003), reduz a concentração espermática (KÜNZLE et al., 2003) e reduz nível de testosterona plasmática (TRUMMER et al., 2002). O espermatozoide possui uma baixa capacidade de reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA), desta forma, a transmissão paterna de um dano genotóxico é grande (ZENZES; BIELECKI; REED, 1999). Como consequência, há aumento da frequência de malformações e câncer infantil nos descendentes (SORAHAN et al., 1997). Em mulheres, o cigarro pode acarretar alterações hormonais, além de acelerar a perda da função reprodutiva, adiantando a menopausa em até 4 anos e aumentar o risco de aborto espontâneo e gravidez ectópica (ASRM PRACTICE COMMITTEE, 2006).

A literatura mundial tem apontado e concluído que o cigarro (tabaco) causa danos na fertilidade masculina e feminina, sendo que cerca de 13% dos casos de infertilidade são atribuídos ao consumo do cigarro. Um fato relevante é que pessoas não fumantes, mas expostas passivamente à fumaça do cigarro podem apresentar consequências reprodutivas semelhantes aos fumantes ativos (ASRM PRACTICE COMMITTEE, 2006). Há evidências também de que o tabagismo afeta

mais a saúde reprodutiva tanto de homens quanto mulheres, quando comparado ao consumo de cafeína e álcool (CURTIS; SAVITZ; ARBUCKLE, 1997).

Vale a pena considerar o fato de que as células espermáticas dos mamíferos apresentam uma composição lipídica específica, marcadamente distinta das células somáticas, apresentando elevado nível de fosfolipídeos, esteróis e ácidos graxos saturados e poliinsaturados. Estes lipídeos são responsáveis pela fluidez da membrana celular e pelas mudanças na composição da membrana plasmática das células espermáticas que ocorrem na sua maturação e capacitação. Além disso, parece estar envolvido na regulação da espermatogênese, reação acrossômica e na fusão celular (SCHLEGEL et al., 1986; TESARÍK; FLÉCHON, 1986). Estes lipídeos também são os principais substratos da peroxidação causada por espécies reativas do oxigênio (EROs). A peroxidação é capaz de gerar disfunção dos espermatozoides associada à perda da função e integridade de sua membrana. Desta forma, os espermatozoides são susceptíveis aos danos induzidos pela peroxidação causada pela produção excessiva de EROs (AITKEN; CLARKSON, 1987). Por outro lado, um nível fisiológico de peroxidação lipídica proporciona ao espermatozoide humano capacidade de interação com a zona pelúcida. Sabe-se que as espécies reativas do oxigênio podem representar fator etiológico de diversas doenças. Esta geração excessiva de EROs pode ser causada por diversos mecanismos: radiação ionizante (SADANI; NADKARNI, 1997), ativação de oxidases e oxigenases (DAVYDOV, 2001) e perda da capacidade antioxidante (HSU et al., 1998). Com base nestas considerações, um dos possíveis mecanismos pelo qual a exposição à fumaça do cigarro leva a danos nos parâmetros reprodutivos é o estresse oxidativo (SALEH et al., 2002; OZYURT et al., 2006) pela produção de espécies reativas do oxigênio (TRUMMER et al., 2002).

Fisiologicamente, existe um equilíbrio entre a produção de EROs e a proteção antioxidante. O sistema antioxidante sanguíneo é classificado em enzimático e não-enzimático. O enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes: a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2), a catalase (CAT) que atua na decomposição de H_2O_2 a O_2 e água (H_2O) e a glutathione peroxidase (GSH-Px) que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutathione como cofator (VASCONCELOS et al., 2007). A SOD corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD. A forma SOD-cobre/zinco (Cu/Zn-SOD) está presente principalmente no citoplasma, enquanto que SOD-manganês (Mn-SOD) está localizada primariamente na mitocôndria (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Assim, havendo uma produção excessiva de EROs como consequência do estilo de vida, como observado no exercício físico intenso (KOURY; DONANGELO, 2003) e no consumo de cigarro (RAJPURKAR et al., 2000), ocasionará a peroxidação lipídica, com a produção de produtos citotóxicos, como o malonaldeído (MDA), que pode levar a uma série de eventos deletérios que afetam até mesmo a integridade da cromatina espermática (AITKEN, 1999; AITKEN; BAKER, 2006) e causa alta frequência de quebra de fitas de DNA (FRAGA et al., 1996; AITKEN; KRAUSZ, 2001). Desta forma, poderá induzir aneuploidia, que é um dos maiores defeitos genéticos que pode ser transmitido via espermatozoide (RUBES et al., 1998; SHI et al., 2001) e câncer nos descendentes (SORAHAN et al., 1997; SALEH et al., 2002).

O zinco é componente estrutural e/ou funcional de numerosas metaloenzimas e metaloproteínas (COLEMAN, 1992). Está envolvido na função imune (FRAKER et al., 2000), no crescimento e proliferação celular (MACDONALD, 2000), bem como na replicação e transcrição do DNA (WU; WU, 1987). Além disso, o zinco é comumente importante para a reprodução, uma vez que possui um papel essencial no desenvolvimento das células germinativas (BEDWAL; BAHUGUNA, 1994). Algumas proteínas formadas com a participação do zinco estão implicadas na expressão gênica dos receptores dos hormônios esteroides (FAVIER, 1992; FREEDMAN, 1992). O zinco também tem propriedades antiapoptóticas (CHIMIENTI et al., 2003), antidepressivas (CIESLIK et al., 2007) e antioxidantes (ZAGO; OTEIZA, 2001). Três possíveis mecanismos para essa função antioxidante foram descritos: o zinco pode *induzir à síntese da metalotioneína* a qual inibe reações de propagação de radicais livres (MARET, 2000); ser *componente estrutural e catalítica da enzima superóxido dismutase (SOD)*, reduzindo a toxicidade das espécies reativas do oxigênio, pois catalisa a dismutação do radical O_2^- em H_2O_2 e O_2 (FERREIRA; MATSUBARA, 1997); o zinco pode *agir contra a oxidação pela ligação aos grupos sulfidrilas em proteínas de membranas celulares* por ocupar os sítios de ligação do ferro e cobre que são pró-oxidantes (BRAY; BETTGER, 1990; ZAGO; OTEIZA, 2001). A recomendação diária de zinco é de 8 mg para mulheres e 11 mg para homens, podendo ser encontrado em diversos alimentos como ostra, marisco, carne vermelha, fígado e ovos (MAFRA; COZZOLINO, 2004) .

Na infertilidade masculina, diferentemente das causas genéticas, causas ambientais/estilo de vida são de particular interesse devido à possibilidade de medidas curativas ou preventivas. Embora existam grandes evidências de que a infertilidade masculina associada ao tabagismo tenha o estresse oxidativo como um

importante mecanismo, pouco se progrediu para o desenvolvimento de terapias antioxidantes. Assim, uma terapia direcionada a estes pacientes poderá evitar procedimentos de elevados custos como a reprodução assistida, poupará tempo bem como um desgaste emocional por não conseguir gerar descendentes.

Objetivos

2. Objetivos

Avaliar a função testicular de ratos expostos à fumaça do cigarro, realizando análises hormonal, seminal, histopatológica e molecular, bem como verificar se a suplementação com zinco é capaz de atuar como protetor das disfunções resultantes desta exposição. Investigar também um possível mecanismo pelo qual ocorrem estas alterações e proteção, realizando análise de determinados marcadores do estresse oxidativo.

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados ratos albinos Wistar machos provenientes da colônia do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Botucatu. Por ocasião dos experimentos, os animais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, onde foram mantidos sob condições padronizadas (temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade de $55 \pm 5\%$, fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro), com água e ração à vontade e 5 animais por gaiola.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu (nº 114, 03 de Abril de 2009 - anexo).

➤ Grupos experimentais

O período de tratamento utilizado foi escolhido com a finalidade de mimetizar, em humanos, um consumo de cigarro que contemplasse um ciclo espermático completo. Aos 60 dias de idade os ratos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais:

- Grupo 1 (G1 - Controle): 10 ratos não expostos à fumaça do cigarro e sem suplementação com zinco ;

- Grupo 2 (G2 - Cigarro): 10 ratos expostos à fumaça do cigarro (20 cigarros), uma hora por dia, durante 9 semanas (adaptado de KAPAWA et al., 2004);
- Grupo 3 (G3 - Cigarro/Zinco): 8 ratos expostos à fumaça do cigarro (20 cigarros), uma hora por dia, durante 9 semanas e suplementados diariamente, durante este período de exposição à fumaça do cigarro, com zinco (20 mg/ Kg de cloreto de zinco) por gavagem (PAKSY; VARGA; LAZAR, 1996; ALI et al., 2002).

3.2. Drogas e reagentes

Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico - DTNB (Sigma Chemical Co., EUA); Ácido acético (Dinâmica Química, Brasil); Ácido pirogálico (Lab. Synth, Brasil); Ácido sulfossalicílico (Lab. Synth, Brasil); Ácido tiobarbitúrico (Sigma Chemical Co., EUA); Agarose (Invitrogen, EUA); Água ultrapura (Amresco, EUA); Álcool etílico (Lab. Merck, Brasil); Brometo de etídio (Amresco, EUA); Cigarro (Dallas - filtro amarelo, Philip Morris Brasil Ind. e Com., Brasil); Cloreto de magnésio (Dinâmica Química, Brasil); Cloreto de potássio (Chemco Ind. e Com., Brasil); Cloreto de zinco (Lab. Synth, Brasil); Corante de Shorr (Dinâmica Química, Brasil); DNA ladder 100bp (Invitrogen, EUA); DNase (Invitrogen, EUA); DNTP mix (Invitrogen, EUA); Eosina (Lab. Synth, Brasil); Formaldeído (Dinâmica Química, Brasil); Glutathione (Sigma Chemical Co., EUA); Glutathione redutase (Sigma Chemical Co., EUA); Lauril sulfato de sódio (Sigma Chemical Co., EUA); Malonaldeído (Sigma Chemical Co., EUA); Meio de cultura (Nutriente de Ham F- 10 modificado, Cultilab Mat. Cult., Brasil); Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido – NADPH (Sigma Chemical Co., EUA); Oligonucleotídeo iniciador - Oligo (dt) (Invitrogen, EUA); Paraplast (Sigma

Chemical Co., EUA); Pentobarbital Sódico (Hypnol 3%, Fontoveter); Primers (Invitrogen, EUA); RNase OUT inhibitor (Invitrogen, EUA); Solução de Drabkin (Ceaquim, Brasil); Super Script III (Invitrogen, EUA); Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA); T-butil hidroperóxido (Sigma Chemical Co., EUA); Trizol (Invitrogen, EUA); Xilol (Lab. Synth, Brasil).

3.3. Exposição à fumaça do cigarro

Foi utilizado o método descrito por Simani, Inoue e Hoogs (1974), que utiliza um aparato especialmente projetado para expor os animais à fumaça de cigarro (Figura 1). Os ratos foram colocados em uma câmara transparente conectada ao aparato de fumar com um volume de aproximadamente 95x80x65 cm³. *Puffs* de fumaça foram retirados do cigarro por vácuo e jogados na câmara. A fumaça foi liberada em uma taxa de 10 cigarros/ 30 minutos com intervalo de descanso de 10 minutos. Este procedimento foi realizado duas vezes no período da manhã, até o final do período de tratamento que foi de 9 semanas, período este que abrange um ciclo espermático completo, que nos ratos é de aproximadamente 52 dias (RUSSELL; BRINSTER, 1996; FRANÇA et al., 1998). Foi utilizado cigarro comercial com a seguinte composição: 0,7 mg de nicotina, 10 mg de alcatrão e 10 mg de monóxido de carbono (dados fornecidos pelo fabricante).

3.4. Massa corporal e peso úmido dos órgãos da reprodução masculina

Na manhã seguinte ao término do tratamento, os animais dos diferentes grupos experimentais foram pesados com auxílio de balança apropriada. Posteriormente, foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/ Kg), pela via intraperitoneal (i.p.) e submetidos à laparotomia. Estando os animais ainda sob ação

do anestésico geral, o testículo, o epidídimo, a vesícula seminal e a próstata ventral foram identificados (Figura 2) e removidos. Após a secagem com papel de filtro foram determinados os respectivos pesos úmidos dos órgãos, empregando-se balança analítica.



Figura 1 - Aparato utilizado para a exposição à fumaça do cigarro

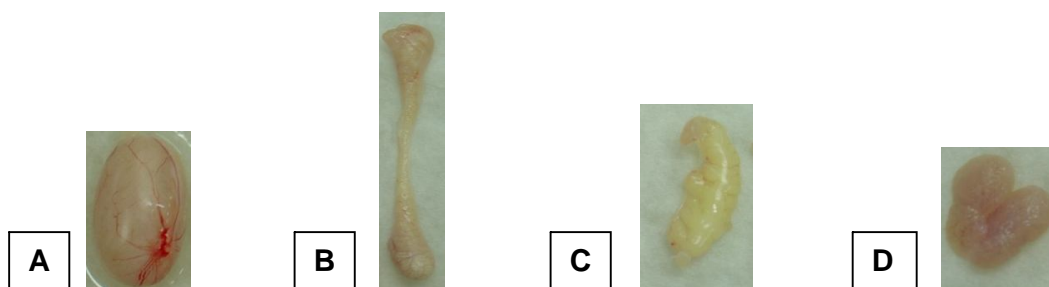


Figura 2 - Órgãos da reprodução masculina

A) Testículo; **B)** Epidídimo; **C)** Vesícula seminal; **D)** Próstata Ventral

3.5. Determinação da concentração plasmática de testosterona

Estando os animais sob ação do anestésico geral (item 3.4), amostras de sangue foram coletadas das artérias aorta abdominais, em seringas contendo

heparina. Todo o experimento foi realizado sempre no mesmo horário. Imediatamente após a coleta, parte das amostras de sangue foi centrifugada (2500 rpm por 20 minutos a 2°C), sendo o plasma estocado a -20°C. A determinação da concentração plasmática de testosterona foi realizada por quimioluminescência, sendo os resultados expressos em nanograma por decilitro (ng/ dL).

3.6. Análise seminal

Logo após a coleta do sangue (item 3.5), os espermatozoides foram coletados por perfuração do ducto deferente (Figura 3 A). Posteriormente, foram diluídos em 0,5 mL de meio de cultura (Nutriente de Ham F- 10 modificado, Cultilab Mat. Cult., Brasil) e mantidos na chapa aquecedora a 37°C para a realização da análise.

➤ Motilidade espermática

Para esta avaliação 10 µL de espermatozoides diluídos foram colocados na câmara de contagem de Makler (Figura 3 B) e a leitura foi feita em microscopia de fase no aumento de 100X. Foi realizada a contagem de duas amostras diferentes de cada animal (Figura 3 C) sendo analisados 100 espermatozoides por amostra e feita a média. Os padrões foram:

- Progressivos: espermatozoides móveis com progressão rápida ou lenta, com capacidade fertilizante;
- Não-progressivos: móveis sem progressão e espermatozoides imóveis

➤ **Concentração espermática**

Após a análise do padrão de motilidade foi verificada a concentração dos espermatozoides estimada em milhões por mililitro. Para tanto foram utilizadas as câmaras de contagem de Makler preparadas no item anterior. Foi realizada a contagem de duas amostras diferentes de cada animal, sendo que para cada amostra foram realizadas três contagens e feita a média. A leitura foi realizada em microscopia de fase no aumento de 100X.



Figura 3 - Visualização do material utilizado para a análise da motilidade e concentração dos espermatozoides

A) Ducto deferente de rato; **B)** Câmara de Makler; **C)** Amostra de espermatozoide na câmara de Makler vista ao microscópio (aumento de 100X)

➤ **Vitalidade espermática**

Em um tubo foram acrescentados a 50 µL espermatozoides diluídos em meio de cultura (Nutriente de Ham F- 10 modificado, Cultilab Mat. Cult., Brasil), uma gota de eosina amarela a 3% e duas gotas de nigrosina a 8% e homogeneizados. Foram confeccionados esfregaços e as lâminas foram analisadas em microscopia de fase com aumento de 400X (Figura 4). Para cada animal foram realizados dois esfregaços e em cada um foi contabilizado um total de 100 células e feita a média.

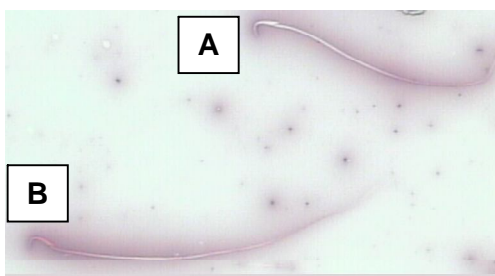


Figura 4 - Visualização dos espermatozoides no teste de vitalidade

A) Espermatozoide vivo; **B)** Espermatozoide morto (aumento de 400X)

➤ **Morfologia espermática**

Foram preparados dois esfregaços de sêmen de cada animal, secados à temperatura ambiente e fixados em álcool a 70% por 15 minutos. As lâminas foram coradas com hematoxilina e depois colocadas em corante de Shorr por 5 minutos. Foram contados, no mínimo, 200 espermatozoides por lâmina com aumento de 1000X (Figura 5), sendo os espermatozoides classificados como morfológicamente normais ou anormais (LINDER; SLOTT; SUAREZ, 1992).



Figura 5- Visualização dos espermatozoides na avaliação morfológica (normal ou anormal) no aumento de 1000X

3.7. Análise histopatológica do testículo

Posteriormente à determinação do peso úmido dos órgãos da reprodução (item 3.4), os testículos direitos foram imersos em uma solução fixadora de Alfac (85% de álcool, 10% de formaldeído e 5% de ácido acético). Após uma pré-fixação de 4 horas, os órgãos foram removidos do fixador e recortados, retornando em seguida ao fixador. Após 24 horas, a solução foi substituída por álcool 80° até o processamento histológico que consistiu na inclusão do material em paraplast, obtenção de cortes com 5 µm de espessura e coloração com hematoxilina e eosina. A avaliação histopatológica foi realizada utilizando-se cortes transversais do órgão (3 cortes não consecutivos por animal), analisados em ensaio cego com auxílio de microscópio de luz (Figura 6).

A inspeção histopatológica foi realizada de modo quantitativo, analisando-se 100 cortes de túbulos seminíferos por animal e classificando-os em normais ou anormais. Os túbulos foram considerados anormais frente à presença de células acidófilas, células multinucleadas, espermátides retidas, degeneração de tipos celulares, vacuolização do epitélio ou esfoliação de células na luz. O aspecto do interstício tubular foi avaliado de modo qualitativo.



Figura 6 - Microscópio óptico de luz utilizado

3.8. Análise da expressão gênica relativa do receptor de andrógeno na próstata ventral e no testículo

Posteriormente à determinação dos pesos úmidos, a próstata ventral e o testículo esquerdo foram armazenados à -80°C até o dia da análise.

A expressão de RNA mensageiro (RNAm) para o receptor de andrógeno (AR) na próstata ventral e no testículo esquerdo foi detectada em nosso laboratório por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) semiquantitativo, utilizando-se o protocolo descrito no "Kit" SuperScript III (Invitrogen, EUA) e "primers" específicos para o AR.

➤ Extração de RNA total

A próstata ventral e o testículo esquerdo (100 mg) foram individualmente imersos em 1 mL de solução Trizol, homogeneizados (Figura 7 A - Polytron-Ultra Turrax/ T25) e submetidos ao protocolo Trizol de extração de RNA total.

Ao final da extração, as amostras de RNA total foram solubilizadas em 20 µL de água ultrapura. As concentrações das amostras de RNA total foram mensuradas por espectrofotometria (Figura 7 B - Biophotometer-Eppendorf®) no comprimento de onda de 260 nm.

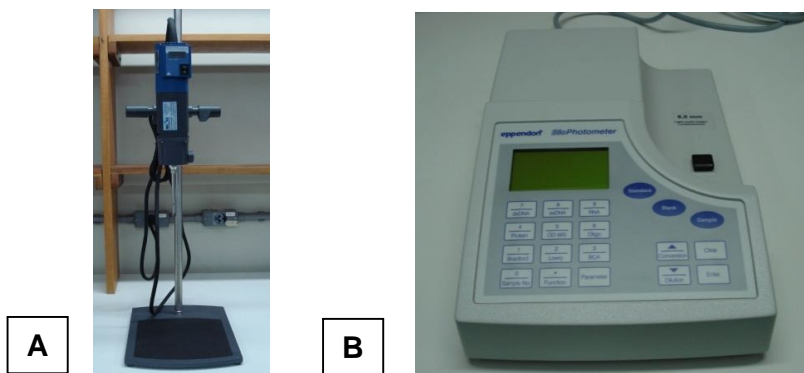


Figura 7 - Equipamentos utilizados para extração de RNA total

A) Homogeneizador; **B)** Espectrofotômetro

➤ **Transcrição reversa (RT)**

A fim de evitar que uma eventual contaminação por DNA genômico interfira nos resultados, todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase antes de serem submetidas ao RT-PCR. Conforme as instruções do protocolo DNase I – Amplification Grade (Invitrogen, EUA), o volume da solução de RNA total a ser tratado com DNase foi calculado a fim de conter 1 µg de RNA total. A este volume, foi adicionado 1 µL de tampão DNase, 1 µL de DNase I (1 unidade/ µL) e água “RNase free” suficiente para completar 10 µL. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 1 µL de EDTA (25 mM) e incubada a 65°C por 10 minutos. Após esse procedimento, as amostras foram transferidas para o gelo e imediatamente submetidas à reação de transcrição reversa.

Para a reação de transcrição reversa, foi utilizado o “kit” SuperScript III (Invitrogen, EUA), cujo protocolo inicia-se pela adição em tubo estéril de 8 µL da solução de RNA total tratada com DNase, 1 µL de oligonucleotídeo iniciador Oligo (dt) (500 µg/ mL), 1 µL de DNTP Mix (10 nM) e 3 µL de água ultrapura. Essa

solução foi incubada a 65° C por 5 minutos e, em seguida, sofreu uma segunda incubação em gelo por 1,5 minuto. Após essas etapas, foi adicionado à solução 4 µL de tampão “First Strand” 5X, 1 µL de DTT (0,1 M) e 1 µL de “RNase OUT Inhibitor” (40 unidades/ µL). Na sequência, foi acrescido 1 µL (200 U) de SuperScript III (transcriptase reversa) e iniciou-se a incubação, primeiramente a 50°C por 50 minutos, depois a 70°C por 15 minutos e, finalmente, em gelo por 2 minutos. As amostras de DNA complementar (cDNA) foram mantidas em gelo para utilização imediata no PCR ou armazenadas (-20°C).



Figura 8 - Equipamento termociclador utilizado

➤ **Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A próstata e o testículo possuem receptores de andrógenos (VAN ROIJEN et al., 1997), desta forma para a análise de AR na próstata utilizamos o testículo como controle positivo e para análise no testículo utilizamos a próstata. Para as duas situações, utilizamos a água como controle negativo em substituição ao cDNA.

Seguindo a padronização em nosso laboratório (PIFFER, 2009), como controle interno das reações de RT-PCR foi utilizado à amplificação do gene constitutivamente expresso ciclofilina, a fim de testar a integridade das amostras de

RNA e o sucesso da reação de transcrição reversa. Foram utilizadas as seguintes sequências de oligonucleotídeos iniciadores (“primers”):

Receptor de andrógeno (AR): sense: AAG CAG GGA TGA CTC TGG GA

antissense: GGA ATC AGG CTG GTT GTT GT

Ciclofilina: sense: ACG CCG CTG TCT CTT TTC

antissense: TGC CTT CTT TCA CCT TGC

O tamanho esperado para o produto amplificado por PCR é de 227 pares de base (pb) para o receptor de andrógeno e de 440 pares de base para a ciclofilina.

A PCR para amplificação da ciclofilina e do gene-alvo (AR) foram realizadas conforme o protocolo descrito a seguir: adicionou-se ao cDNA (1 μ L); 2,5 μ L de tampão PCR 10X; 0,75 μ L de $MgCl_2$ (50 mM); 0,5 μ L de dNTP Mix (10 mM); 1 μ L de oligonucleotídeo iniciador “sense” (20 mM); 1 μ L de oligonucleotídeo iniciador “antissense” (20 mM); 0,25 μ L de Taq DNA polimerase (5 unidades/ μ L) e água ultrapura para completar 25 μ L. Em seguida, as amostras foram submetidas à incubação a 94°C por 3 minutos em termociclador (Figura 8 - Mastercycler-Eppendorf®) seguida pelas incubações cíclicas descritas abaixo:

- desnaturação: 94°C por 45 segundos;
- anelamento: 57°C por 45 segundos para a próstata e 61°C por 45 segundos para o testículo;
- extensão: 72°C por 1 minuto.

Após 26 ciclos para o gene da ciclofilina e 28 ciclos para o gene AR, as amostras foram mantidas a 4°C.

➤ **Eletroforese em gel de agarose**

Os produtos da PCR (15 µL) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% (Figura 9), voltagem constante de 100 Volts por uma hora e 30 minutos. O DNA “Ladder” 100bp foi utilizado como referência para avaliar o tamanho dos fragmentos. Posteriormente, os géis foram colocados por 30 minutos em solução de brometo de etídio (5 µg/ mL). As imagens dos géis foram visualizadas à luz ultravioleta (Figura 10 - GelVue UV Transilluminator, Syngene) e digitalizadas através do sistema de captura de imagem (Figura 10 - DigiGenius, Fuji Finepix S95000 Digital Câmera). Para a validação e ensaios do RT-PCR semiquantitativo, a intensidade das bandas foi determinada por densitometria computadorizada.



Figura 9 - Fonte de energia e cuba utilizada na eletroforese



Figura 10 - Sistema de visualização do gel de agarose e de captação de imagem

3.9. Determinação de malonaldeído no testículo

A determinação de malonaldeído (MDA) no testículo foi realizada de acordo com o método descrito por Zingarelli, Szabo e Salzman (1999), seguindo algumas modificações.

As amostras do testículo esquerdo foram homogeneizadas em solução de KCl a 1,15% na proporção de 1:5. O homogenato foi centrifugado a 9000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Foram utilizados 400 µL do sobrenadante, que foi adicionado em tubo de vidro com tampa de rosca, ao qual também foram adicionados 200 µL de lauril sulfato de sódio a 8,1%; 1500 µL de ácido acético a 20% com pH 3,5; 1500 µL de ácido tiobarbitúrico a 0,8% diluído em ácido acético e 400 µL de água destilada. Para curva padrão, foram utilizados 100 µL de diferentes concentrações de malonaldeído, 700 µL de água destilada e os demais reagentes.

Os frascos contendo essa mistura foram colocados em banho-maria a 95°C durante uma hora. Após isso, as amostras foram transferidas para microtubos e centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, 200 µL do

sobrenadante foram colocados em placa de 96 poços e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Figura 11 - PowerWave 340 - BioTek®) a 532nm. O valor da concentração de MDA foi multiplicado por 50 e os resultados foram expressos em nanomoles/ grama de tecido (nM/ g de testículo).



Figura 11 - Sistema de leitura por espectrofotometria

3.10. Análise dos marcadores de estresse oxidativo no sangue

Parte das amostras de sangue coletadas no item 3.5 foi centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C e, após esse procedimento, foi retirado o plasma, glóbulos brancos e plaquetas por aspiração. Em seguida, as hemácias foram lavadas três vezes com tampão salina fosfato (PBS), centrifugando esta suspensão a 3500 rpm a 4°C por um minuto. Em um microtubo foi acrescentado 100 µL das hemácias lavadas e 1900 µL de água deionizada, o qual foi agitado por inversão para obtenção do hemolisado. Este hemolisado foi utilizado para as determinações de: hemoglobina (Hb), grupos tióis (SH) e atividade da superóxido dismutase (SOD). Para a determinação da atividade enzimática de glutathione peroxidase (GSH-Px), foi adicionado 50 µL da hemácia lavada e 950 µL de solução estabilizadora (2,7 mM EDTA e 0,7 mM 2-mercaptoetanol). As técnicas empregadas para determinação dos

biomarcadores antioxidantes seguiram a metodologia modificada de Ferreira, Machado e Matsubara (1999).

➤ **Determinação da hemoglobina**

Para determinação da hemoglobina, 20 µL do hemolisado foram diluídos e agitados em 2 mL de solução de Drabkin. Após 10 minutos de repouso, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 546 nm e o resultado foi expresso em gramas por decilitro (g/ dL) (DE SOUZA et al., 2010).

➤ **Determinação de malonaldeído**

Em um tubo foi adicionado 1 mL de ácido sulfossalicílico a 3% e 1 mL de hemolisado. Posteriormente, este tubo foi agitado por 10 segundos, centrifugado a 11000 rpm por 3 minutos e deixado em repouso durante 15 minutos. Em seguida, foi retirada uma alíquota (500 µL) do sobrenadante ao qual foi adicionado 500 µL de ácido tiobarbitúrico a 0,67%. A mistura foi aquecida a 80°C por 30 minutos e a absorbância determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 535 nm. Os resultados foram expressos em nanomoles por grama de hemoglobina (nM/ g Hb) (DE SOUZA et al., 2010).

➤ **Determinação da concentração de grupos tióis**

A concentração de grupos tióis foi determinada pela adição da forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), que inicia a reação enzimática da glutatona com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) formando o ácido 2-nitro-5-tiobenzoico. A reação consiste na adição de 1290 µL de água destilada, 200 µL de tampão Tris/HCl (EDTA 1M; pH 8,0; 5 mM), 200 µL de 10

U/ mL de glutathione reductase (GSH-Rd), 200 μ L de NADPH (2 mM) e 100 μ L de DTNB (12 mM) a 10 μ L de hemolisado. Para obtenção da curva padrão, foi realizado o mesmo ensaio, substituindo-se a amostra de hemolisado por 10 μ L de solução padrão 1:1000 glutathione oxidada (GSSG) a 33 mM. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 412 nm. A concentração de grupos tióis foi expressa em micromoles do substrato reduzido por grama de hemoglobina (μ M/ g Hb) (DE SOUZA et al., 2010).

➤ **Determinação da atividade da glutathione peroxidase**

A determinação da atividade da GSH-Px foi realizada pelo monitoramento da oxidação do NADPH. A reação consiste na adição de 1300 μ L de água destilada, 200 μ L de tampão Tris/HCl (EDTA 1M; pH 8,0; 5 mM), 200 μ L de 10 U/ mL de glutathione reductase (GSH-Rd), 200 μ L de NADPH (2 mM), 40 μ L de glutathione (0,1 M) a 40 μ L de hemolisado. A mistura foi agitada em vórtex durante 10 segundos. Em seguida, foram adicionados 20 μ L de T-Butil hidroperóxido (7 mM) e mantida a 37°C durante 10 minutos. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 340 nm. A atividade da GSH-Px foi expressa em unidades de atividade enzimática por miligrama de hemoglobina (U/ mg Hb) (DE SOUZA et al., 2010).

➤ **Determinação da atividade de superóxido dismutase**

A atividade total de SOD foi determinada pela sua capacidade de inibir a auto-oxidação do ácido pirogálico (pirogalol) pelo ânion superóxido. A reação consiste na adição de 100 μ L de tampão Tris/HCl (EDTA 1M; pH 8,0; 5 mM), 20 μ L de pirogalol 10 mM e 860 μ L de água deionizada a 20 μ L de hemolisado. A

absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 420 nm. A quantidade de SOD capaz de produzir 50% de inibição da oxidação do pirogallol por miligrama de hemoglobina é definida como uma unidade de atividade enzimática expressa em U/ mg Hb (DE SOUZA et al., 2010).

3.11. Análise dos resultados

Foram determinadas as médias \pm erro padrão da média ou medianas e intervalo interquartil (IQ_{25%}-IQ_{75%}) dos resultados obtidos nos diferentes grupos experimentais. Para a interpretação, foi realizada análise de Variância seguida de testes estatísticos *a posteriori*, de acordo com as características de cada dado obtido.

Foram consideradas significantes as diferenças associadas à probabilidade $p < 0,05$.

Para a avaliação estatística foi utilizado o programa INSTAT 3.0 (GraphPad Software).

Resultados

4. Resultados

4.1. Massa corporal, peso úmido dos órgãos da reprodução masculina e concentração plasmática de testosterona

Pela análise da Figura 12, verifica-se uma redução da massa corporal dos animais dos grupos expostos à fumaça do cigarro (G2) em relação ao grupo Controle (G1), indicando que a exposição à fumaça do cigarro reduz significativamente a massa corporal dos animais machos utilizados.

Os resultados do peso úmido dos órgãos da reprodução (testículo, epidídimo, próstata ventral e vesícula seminal) e secreção da vesícula seminal estão apresentados na Tabela 1. Podemos observar um aumento significativo do peso úmido do testículo no G3 em relação ao G2, mostrando um efeito do zinco sobre este órgão. O peso úmido dos demais órgãos bem como da secreção da vesícula seminal não se mostraram alterados entre os grupos.

A concentração plasmática de testosterona mostrou-se aumentada no G3 em relação ao G2 (Figura 13), indicando um efeito do zinco sobre este parâmetro.

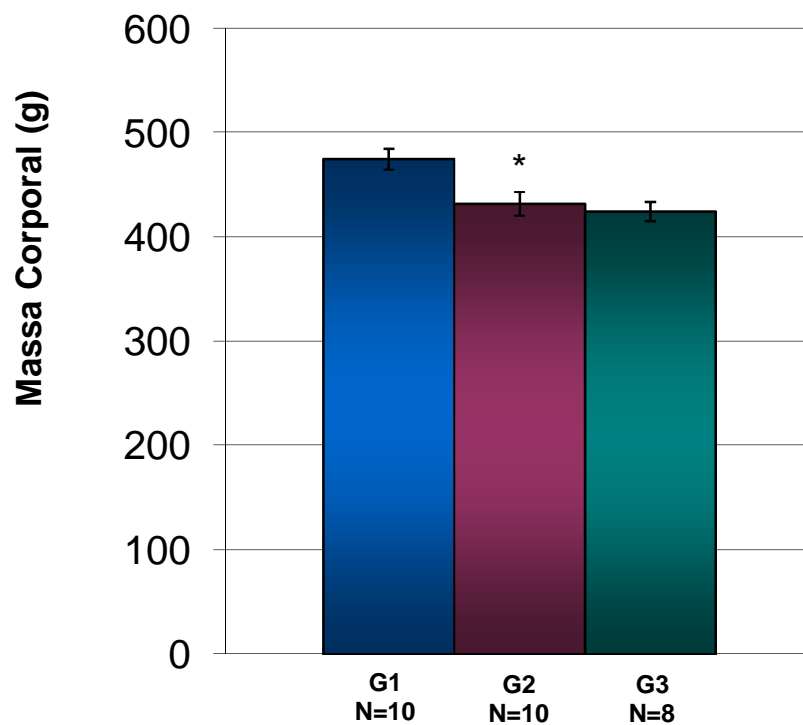


Figura 12 - Massa corporal (g) dos animais do G1 (Controle), G2 (Cigarro) e G3 (Cigarro/Zinco)

Valores expressos em média \pm erro padrão da média, $p < 0,05$, teste de análise de variância (ANOVA) complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. * $p < 0,05$ (G1 x G2)

Tabela 1 - Peso úmido (g) dos órgãos da reprodução masculina (testículo, epidídimo, próstata ventral e vesícula seminal com secreção) e secreção da vesícula seminal dos animais do G1 (Controle), G2 (Cigarro) e G3 (Cigarro/Zinco)

	Grupos Experimentais		
	G1 (Controle)	G2 (Cigarro)	G3 (Cigarro/Zinco)
	N=10	N=10	N=8
Testículo (g)	1,74 ± 0,04	1,69 ± 0,04	1,92 ± 0,07 §
Epidídimo (g)	0,65 ± 0,02	0,63 ± 0,03	0,65 ± 0,04
Próstata ventral (g)	0,47 ± 0,03	0,48 ± 0,04	0,43 ± 0,04
Vesícula seminal com secreção (g)	0,76 ± 0,04	0,88 ± 0,03	0,85 ± 0,05
Secreção vesicular (g)	0,47 ± 0,03	0,47 ± 0,03	0,41 ± 0,04

Valores expressos em média ± erro padrão da média, $p < 0,05$, teste de análise de variância (ANOVA) complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. § $p < 0,05$ (G2 x G3)

4.2. Análise seminal

A Figura 14 apresenta os resultados da concentração espermática dos animais dos três grupos experimentais. Pode-se observar uma redução significativa desta concentração no grupo Cigarro (G2) tanto em relação a G1 quanto em relação a G3, demonstrando um possível papel protetor do zinco sobre este parâmetro.

Pela análise da Tabela 2, pode-se observar uma redução significativa na porcentagem de espermatozoides progressivos, vivos e morfologicamente normais no grupo exposto à fumaça do cigarro (G2) em relação ao grupo Controle (G1).

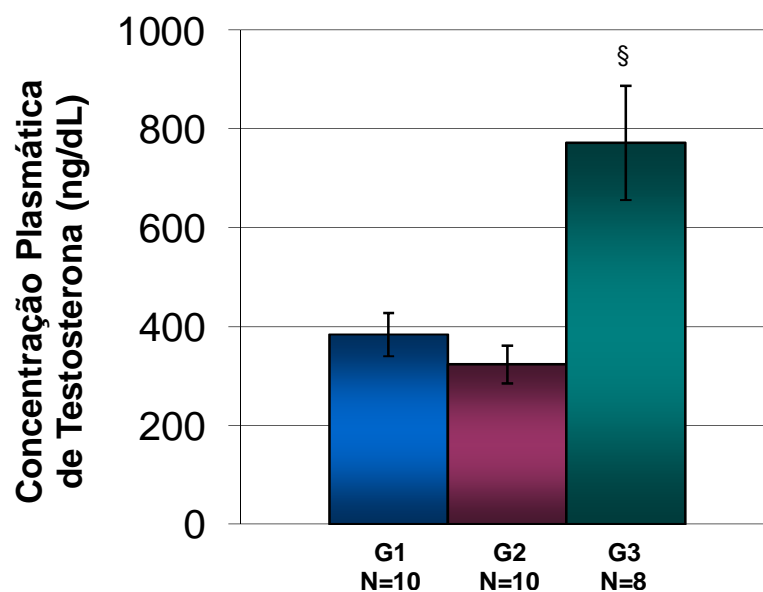


Figura 13 - Concentração plasmática de testosterona (ng/ dL) dos animais do G1 (Controle), G2 (Cigarro) e G3 (Cigarro/Zinco)

Valores expressos em média \pm erro padrão da média, $p < 0,05$, teste de análise de variância (ANOVA) complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. § $p < 0,05$ (G2 x G3)

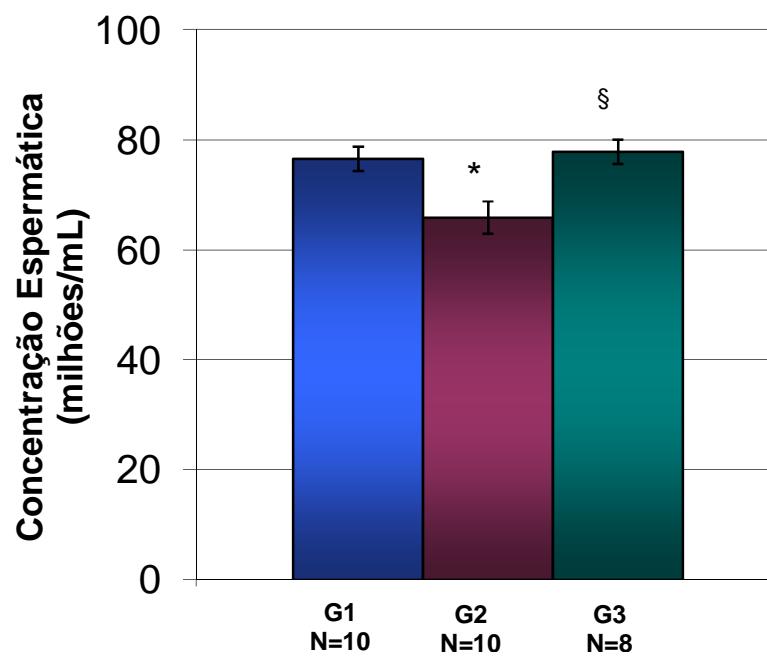


Figura 14 - Concentração espermática (milhões/ mL) dos animais do G1 (Controle), G2 (Cigarro) e G3 (Cigarro/Zinco)

Valores expressos em média \pm erro padrão da média, $p < 0,05$, teste de análise de variância (ANOVA) complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. * $p < 0,05$ (G1 x G2); § $p < 0,05$ (G2 x G3)

Tabela 2 - Análise seminal (motilidade, vitalidade e morfologia) dos animais do G1 (Controle), G2 (Cigarro) e G3 (Cigarro/Zinco)

	Grupos Experimentais		
	G1 (Controle) N=10	G2 (Cigarro) N=10	G3 (Cigarro/Zinco) N=8
Espermatozoides progressivos (%)	25,50 (22,75 - 28,75)	18,50 (15,00 - 23,25)*	22,00 (18,00 - 23,00)
Espermatozoides vivos (%)	98,50 (98,00 - 99,00)	96,00 (95,00 - 97,00)*	97,00 (96,00 - 97,00)
Espermatozoides morfologicamente normais (%)	99,00 (98,00 - 99,00)	95,50 (93,00 - 96,75)*	97,00 (97,00 - 98,00)

Valores expressos em mediana e intervalo interquartil (IQ_{25%}-IQ_{75%}), p<0,05, teste de Kruskal-Wallis complementado com teste de comparações múltiplas de Dunn.

* p<0,05 (G1 x G2)

4.3. Análise histopatológica do testículo

A Tabela 3 apresenta os resultados da análise histopatológica quantitativa realizada no testículo dos animais dos três grupos experimentais. Não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de túbulos seminíferos normais entre os grupos. A Figura 15 ilustra o aspecto histológico dos testículos dos animais pertencentes aos grupos experimentais.

Tabela 3 - Análise histopatológica do testículo dos animais do G1 (Controle), G2 (Cigarro) e G3 (Cigarro/Zinco)

	Grupos Experimentais		
	G1 (Controle) N=7	G2 (Cigarro) N=7	G3 (Cigarro/Zinco) N=7
Túbulos seminíferos normais (%)	97,00 (94,00 - 97,00)	96,00 (92,50 – 96,00)	95,00 (93,50 – 97,00)

Valores expressos em mediana e intervalo interquartil (IQ_{25%}-IQ_{75%}). Não houve diferença significativa entre os grupos; $p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis.

4.4. Análise da expressão gênica relativa do receptor de andrógeno na próstata ventral e no testículo

A Figura 16 mostra os géis representativos dos produtos amplificados por RT-PCR do RNA total extraído do testículo e próstata ventral dos animais dos grupos experimentais para análise da expressão gênica relativa do receptor de andrógeno, baseando-se na expressão do gene da ciclofilina. Não houve diferença significativa deste parâmetro entre os três grupos experimentais, conforme podemos observar na Tabela 4.

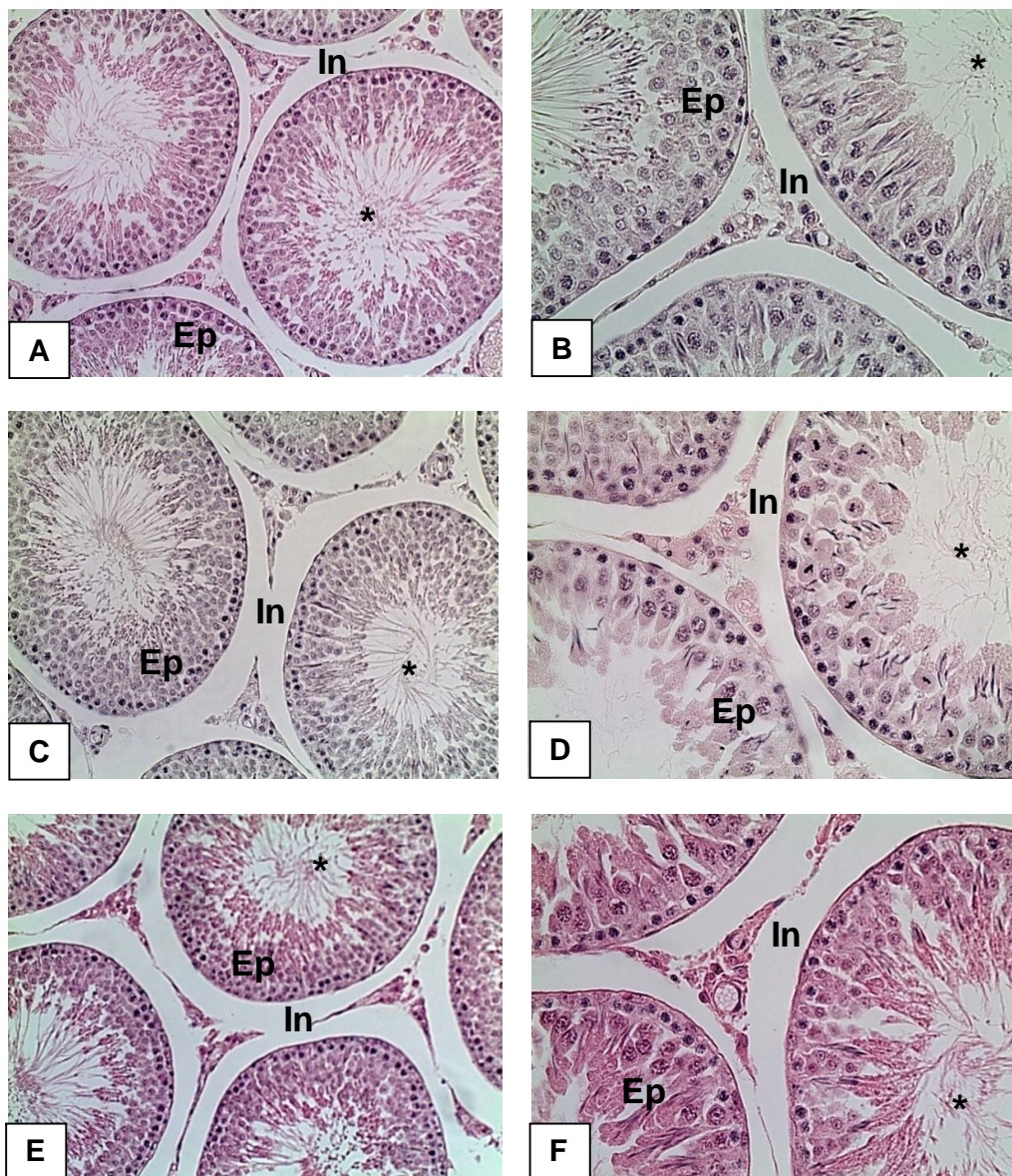


Figura 15 – Fotomicrografias de cortes transversais dos testículos dos animais do G1 (Controle), G2 (Cigarro) e G3 (Cigarro/Zinco)

A) Túbulos seminíferos do G1, aumento de 200X; **B)** Túbulos seminíferos do G1, aumento de 400X; **C)** Túbulos seminíferos do G2, 200X; **D)** Túbulos seminíferos do G2, 400X; **E)** Túbulos seminíferos do G3, 200X; **F)** Túbulos seminíferos do G3, 400X; **Ep**= Epitélio; **In**= Interstício; * = Lúmen com espermatozoides

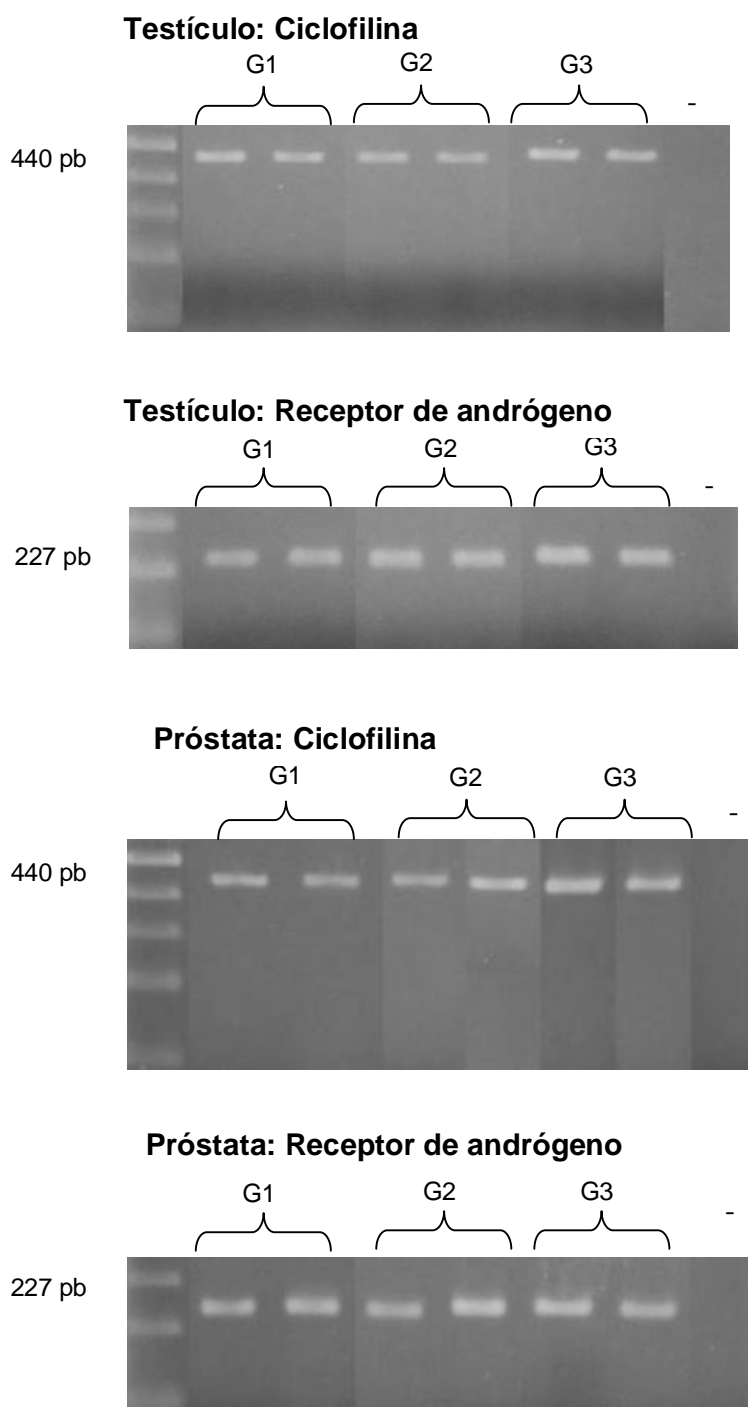


Figura 16 - Géis representativos dos produtos amplificados por RT-PCR do RNA total extraído do testículo e próstata ventral dos animais do G1 (Controle), G2 (Cigarro) e G3 (Cigarro/Zinco), usando “primers” específicos para o gene ciclofilina e receptor de andrógeno

Tabela 4 - Análise da expressão gênica relativa do receptor de andrógeno no testículo e na próstata ventral dos animais do G1 (Controle), G2 (Cigarro) e G3 (Cigarro/Zinco)

	Grupos Experimentais		
	G1 (Controle)	G2 (Cigarro)	G3 (Cigarro/Zinco)
	N=5	N=5	N=5
Testículo	1,77 ± 0,12	1,86 ± 0,14	1,96 ± 0,15
Próstata ventral	1,36 ± 0,09	1,24 ± 0,10	1,12 ± 0,07

Valores expressos em média ± erro padrão da média. Não houve diferença significativa entre os grupos; $p > 0,05$, teste de análise de variância (ANOVA).

4.5. Concentração de malonaldeído no testículo

A concentração de MDA, produto da lipoperoxidação, no testículo mostrou-se aumentada no G2 tanto em relação a G1 como em relação a G3 (Figura 17), indicando que a exposição à fumaça do cigarro leva a uma maior lipoperoxidação e que a suplementação com zinco consegue prevenir esta alteração.

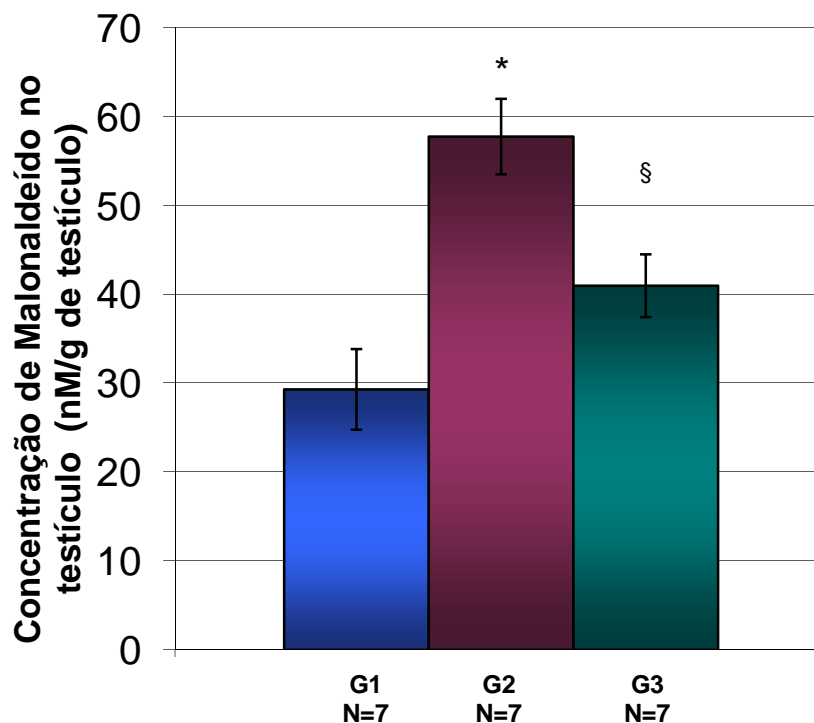


Figura 17 - Concentração de malonaldeído no testículo (nM/ g de testículo) dos animais do G1 (Controle), G2 (Cigarro) e G3 (Cigarro/Zinco)

Valores expressos em média \pm erro padrão da média, $p < 0,05$, teste de análise de variância (ANOVA) complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. * $p < 0,05$ (G1 x G2); § $p < 0,05$ (G2 x G3)

4.6. Análise dos marcadores de estresse oxidativo no sangue

A Tabela 5 apresenta os resultados da análise dos marcadores de estresse oxidativo no sangue dos animais dos grupos Controle, Cigarro e Cigarro/Zinco. Observamos um aumento significativo na concentração de MDA no G2 em relação a G1, mostrando que a exposição à fumaça do cigarro leva a uma maior lipoperoxidação. O G2 apresentou um aumento da concentração de grupos tióis (SH) em relação a G1 e uma menor concentração quando comparado ao G3.

Houve também um aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) no G2 em relação ao G1, mas não foi detectada qualquer diferença na atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px).

Tabela 5 - Determinação da concentração de hemoglobina (g/ dL), malonaldeído (nM/ g Hb), grupos tióis (μM / g Hb) e da atividade da glutathiona peroxidase (U/ mg Hb) e superóxido dismutase (U/ mg Hb) no sangue dos animais do G1 (Controle), G2 (Cigarro) e G3 (Cigarro/Zinco)

	Grupos Experimentais		
	G1 (Controle) N=7	G2 (Cigarro) N=7	G3 (Cigarro/Zinco) N=7
Hb (g/ dL)	1,10 \pm 0,04	1,10 \pm 0,01	1,16 \pm 0,02
MDA (nM/ g Hb)	751,79 \pm 54,26	1213,01 \pm 181,11*	1060,25 \pm 109,87
SH (μM/ g Hb)	16,22 \pm 0,78	21,29 \pm 0,55*	25,73 \pm 0,71 §
GSH-Px (U/ mg Hb)	3,82 \pm 0,34	3,44 \pm 0,21	2,61 \pm 0,33
SOD (U/ mg Hb)	9,18 \pm 0,14	10,16 \pm 0,14*	9,78 \pm 0,28

Valores expressos em média \pm erro padrão da média, $p < 0,05$, teste de análise de variância (ANOVA) complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. * $p < 0,05$ (G1 x G2); § $p < 0,05$ (G2 x G3)

Discussão

5. Discussão

O tabagismo é considerado um risco a saúde de fumantes ativos e passivos e pode estar relacionado ao estado de subfertilidade, que é qualquer forma e grau de redução da fertilidade, e infertilidade tanto feminina como masculina. Há um particular interesse nos fatores ambientais e estilo de vida implicados na subfertilidade e infertilidade, uma vez que diferentemente das causas genéticas, medidas curativas e/ou preventivas podem ser acrescentadas ao tratamento. É importante considerar que futuros pais não somente cessem o hábito de fumar como também evitem a exposição à fumaça do cigarro, ou seja, o fumo passivo (POLYZOS et al., 2009). Confirmou-se no presente estudo que a exposição à fumaça do cigarro, de fato, é prejudicial aos parâmetros seminais e reprodutivos masculinos. Além disso, o estresse oxidativo pode ser um mecanismo envolvido com as disfunções encontradas e um possível papel protetor do zinco pode também ser observado em alguns parâmetros analisados.

No presente estudo, utilizando rato como modelo animal, a massa corporal dos grupos expostos à fumaça do cigarro (G2) mostrou-se reduzida quando comparada ao grupo controle (G1). Isto indica que a exposição à fumaça do cigarro leva a perda de massa corporal e que a suplementação com zinco não é capaz de prevenir esta alteração. Este resultado corrobora com estudo realizado anteriormente em nosso laboratório, no qual foi observada uma perda de massa corporal nos animais expostos à fumaça do cigarro no dia zero de abstinência e um aumento deste mesmo parâmetro aos 60 dias de abstinência à fumaça do cigarro (SANKAKO, 2008). Esta redução da massa corporal é documentada em humanos, sendo que alguns indivíduos, principalmente adolescentes, adquirem este hábito na

tentativa de perder peso (JOHNSON et al., 2009). Conseqüentemente, durante a abstinência deste hábito, estes indivíduos passam por diversas mudanças incluindo aumento de apetite e ganho de peso corporal (ROSAS; BAPTISTA, 2002; GUERRA, 2004). Estas alterações podem ter ocorrido devido ao efeito metabólico da nicotina (NERÍN et al., 2007). Bellinger et al. (2010) mostraram que a administração de nicotina em ratos induziram uma redução na massa corporal que não foi resultante de um aumento da taxa metabólica, mas sim devido a uma redução na ingestão de alimento. Desta forma, o mecanismo exato que a nicotina afeta o comportamento de ingestão de alimento precisa ser elucidado, entretanto, há algumas sugestões: os neuropeptídeos como neuropeptídeo Y (BISHOP; PARKER; COSCINA, 2002) e hormônios peptídeos como leptina (KLEIN; CORWIN; CEBALLOS, 2004) podem estar envolvidos. O neuropeptídeo Y é um potente estimulante para a ingestão de alimento e pode ter sua quantidade reduzida por indução da nicotina. Por outro lado, a leptina, que é um regulador negativo da ingestão de alimento, atua como molécula sinalizadora, comunicando o nível de reserva de gordura corporal ao hipotálamo e pode estar aumentada na presença de nicotina. Além disso, a nicotina também pode aumentar a liberação de neurotransmissores incluindo dopamina e serotonina que são inibidores da ingestão de alimento (YANG et al., 1999).

A concentração plasmática de testosterona mostrou-se aumentada no grupo exposto à fumaça do cigarro e que foi suplementado com zinco (G3) quando comparado ao grupo que somente foi exposto à fumaça do cigarro (G2), mostrando um efeito modulador do zinco sobre este parâmetro. Apesar de não termos detectado diferença significativa entre o grupo controle e o grupo exposto à fumaça do cigarro, Yamamoto et al. (1998) e Kapawa et al. (2004) observaram baixos níveis de testosterona em ratos expostos à fumaça do cigarro e Trummer et al. (2002)

relataram redução no nível de testosterona em homens fumantes. Provavelmente, o tempo de exposição à fumaça do cigarro (60 dias) não tenha sido suficiente para podermos obter resultados compatíveis com os trabalhos anteriormente citados.

Com relação ao peso úmido dos órgãos da reprodução masculina, detectamos um aumento significativo no peso úmido do testículo dos animais do grupo Cigarro/Zinco (G3) quando comparado aos animais do grupo Cigarro (G2) que somente foram expostos à fumaça do cigarro. Este resultado é condizente com a concentração plasmática de testosterona encontrada no presente estudo, uma vez que a testosterona é produzida nos testículos e os mesmos dependem deste hormônio para se desenvolver e exercer suas funções. Diversos estudos tanto experimentais (MANSOUR et al., 1989; HAMDÍ; NASSIF; ARDAWI, 1997) como em humanos (LEAKE; CHISHOLM; HABIB, 1984; PRASAD et al., 1996) têm demonstrado que uma dieta deficiente em zinco leva a uma redução da concentração de testosterona, mostrando que existe uma ação direta do zinco na esteroidogênese testicular e corrobora com a sugestão de que o hipogonadismo relacionado com a deficiência de zinco resulta principalmente de mudanças na esteroidogênese testicular ou de falha nas células de Leydig. Em adição, Mansour et al. (1989) acrescentaram que ratos com deficiência de zinco além de apresentarem redução da concentração de testosterona quando comparado ao grupo controle e ao grupo suplementado com zinco, apresentaram também redução da atividade da 3 beta-hidroxiesteroide desidrogenase, importante enzima envolvida na biossíntese da testosterona. Hesketh (1982) observou em estudo com javalis mediante a uma dieta deficiente em zinco alterações ultraestruturais nas células de Leydig, indicando que o zinco pode estar envolvido com a função destas células produtoras de testosterona. Merrells et al. (2009) observaram que a deficiência de zinco na dieta

leva a uma redução do peso do testículo e um aumento de espermatozoides morfológicamente anormais, sugerindo que esta associação seja precedida por uma composição alterada dos ácidos graxos da membrana destas células.

Uma redução na concentração de espermatozoides, na porcentagem de espermatozoides vivos, na porcentagem de espermatozoides progressivos e na porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais foi encontrada nos ratos expostos à fumaça do cigarro (G2) quando comparados aos animais controles (G1). Em um estudo anterior realizado em nosso laboratório foi observada a permanência de efeitos prejudiciais na concentração espermática, nas porcentagens de espermatozoides progressivos e morfológicamente normais durante períodos de abstinência à exposição à fumaça do cigarro. Além disso, foi observada recuperação espontânea destes parâmetros durante um ciclo espermático completo (cerca de 52 dias nos ratos) após cessar a exposição (SANKAKO, 2008). Os parâmetros seminais podem fornecer informações valiosas sobre o potencial tóxico reprodutivo (SEED et al., 1996). Em humanos, há relatos de que os fumantes apresentam concentração espermática reduzida (KÜNZLE et al., 2003; RAMLAU-HANSEN et al., 2007; LIU et al., 2010), menores porcentagens de espermatozoides móveis (SOFIKITIS et al., 1995; KUMOSANI et al., 2008; LIU et al., 2010) e de espermatozoides morfológicamente normais (SOFIKITIS et al., 1995; KÜNZLE et al., 2003; LIU et al., 2010). O hábito de fumar foi também correlacionado à retenção anormal de resíduos citoplasmáticos nos espermatozoides, o que caracteriza uma morfologia anormal, prejudicando sua função (MAK et al., 2000). Já em ratos, Kapawa et al. (2004) e Yamamoto et al. (1998) observaram que a exposição à fumaça do cigarro provocou reduções na concentração espermática e/ou em sua motilidade. A correlação potencial entre parâmetros seminais e um agente que

altera a função reprodutiva masculina é maior em humanos que em animais. Desta forma, é prudente assumir que muitas alterações da função reprodutiva que não afeta a taxa de nascimento em uma população de mamíferos infra-humanos podem causar falhas reprodutivas em humanos (AMANN, 1986).

Ainda com relação aos parâmetros seminais, observamos um efeito benéfico do zinco sobre a concentração espermática, uma vez que o grupo Cigarro/Zinco apresentou um aumento com relação grupo Cigarro. Um fato interessante é que em fumantes a concentração sérica de zinco parece estar reduzida (UZ et al., 2003). Ademais, a concentração do zinco no plasma seminal parece também estar reduzida nos fumantes e isto está relacionada aos prejuízos encontrados nos parâmetros seminais (LIU et al., 2010). Abbasi et al. (1980) observaram em humanos que uma restrição de zinco na dieta leva a uma redução da contagem espermática, sendo que esta oligospermia é reversível com uma suplementação com zinco.

Não detectamos diferenças significativas entre os grupos na análise histopatológica do testículo. Entretanto, há relatos de que ratos expostos à fumaça do cigarro apresentaram menor número de células da linhagem germinativa (RAJPURKAR; LI; DHABUWALA, 2000; AHMADNIA et al., 2007), de Sertoli (AHMADNIA et al., 2007) e de Leydig (YARDIMCI et al., 1997; AHMADNIA et al., 2007), além de degeneração da última (YARDIMCI et al., 1997). Esta discordância de resultados pode ser devido à diferença entre os protocolos utilizados, uma vez que os estudos acima citados expuseram os animais por um período e taxa superiores ao do presente estudo. A não observação de tais diferenças significativas

não exclui disfunção das células presentes no testículo frente à exposição à fumaça do cigarro, bem como um papel importante do zinco sobre estas células.

Os androgênios são críticos hormônios esteroides que determinam o fenótipo masculino. Suas ações são mediadas por receptores de andrógenos que quando ligados ao hormônio androgênico translocam-se ao núcleo e regulam a expressão de genes responsivos aos androgênios. O gene que codifica os receptores de andrógenos estão presentes no cromossomo X (BRINKMANN et al., 1989), existindo, portanto, em ambos os sexos. A próstata, a vesícula seminal, epidídimo e testículo que são órgãos da reprodução masculina possuem receptores para os andrógenos (BLOK et al., 1992; VAN ROIJEN et al., 1997) e assim são dependentes destas substâncias para se desenvolver e exercer suas funções. No presente estudo, analisamos a expressão gênica relativa do receptor de andrógenos por RT-PCR semiquantitativo. Não detectamos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nos dois órgãos analisados: testículo e próstata ventral. Apesar de termos observado alterações importantes no testículo como já foi discutido anteriormente, temos uma indicação de que o protocolo utilizado não gera alteração a nível de expressão gênica. Mais uma vez aqui, acreditamos que o tempo de exposição à fumaça do cigarro não tenha sido suficiente para induzir a alterações nesta expressão. Na literatura não há relatos de estudos semelhantes.

Um dos possíveis mecanismos pelo qual o cigarro leva a danos aos parâmetros reprodutivos masculinos é o estresse oxidativo associado a espécies reativas do oxigênio. Isto merece grande importância pelo fato de que diferentemente das células somáticas, as células espermáticas possuem uma composição lipídica específica com elevada quantidade de ácidos graxos saturados

e poliinsaturados que são substratos da peroxidação lipídica. Com o intuito de observar tal alteração analisamos a concentração de malonaldeído (MDA), produto desta reação de peroxidação, no sangue e no testículo dos animais dos três grupos experimentais. No sangue verificamos que o grupo Cigarro (G2) apresentou uma quantidade de MDA superior ao do grupo Controle (G1). Já no testículo observamos esta mesma alteração, além de detectarmos que o grupo exposto à fumaça do cigarro e suplementado com zinco (G3) apresentou uma concentração de MDA inferior ao do grupo somente exposto à fumaça do cigarro (G2). Com base nestes resultados, a exposição à fumaça do cigarro leva realmente a uma maior lipoperoxidação e a suplementação com zinco pode prevenir esta alteração no testículo. Esta maior lipoperoxidação, demonstrada pelo aumento da concentração de malonaldeído, tem sido relatada tanto em fumantes ativos como passivos de ambos os sexos (ORHAN; EVELO; SAHIN, 2005; SOLAK et al., 2005; YOKUS et al., 2005) e também em animais expostos à fumaça do cigarro (OZYURT et al., 2006; KIRAL; ULUTAS; FIDANCI, 2008). Além disso, alguns estudos traçaram uma correlação entre a lipoperoxidação e os parâmetros seminais. Abdallah et al. (2009) observaram uma correlação positiva entre os níveis de MDA com anomalia acrossômica e presença de gotículas citoplasmática residuais nos espermatozoides. Posteriormente, Shamsi et al. (2010) detectaram uma correlação positiva entre o nível de MDA no sangue e as porcentagens de espermatozoides com morfologia anormal e mortos e também uma correlação negativa entre o MDA, tanto no sangue como no plasma seminal, com a motilidade progressiva dos espermatozoides. Segundo estes autores o aumento da lipoperoxidação pode resultar em perda da integridade e fluidez da membrana, aumento da permeabilidade celular, danos na

estrutura do DNA, inativação de enzimas, redução do potencial fertilizante dos espermatozoides e morte celular.

A concentração de grupos tióis e atividade da SOD mostraram-se aumentadas no grupo Cigarro com relação ao controle e não foi detectada qualquer diferença significativa na atividade da GSH-Px. De acordo com os resultados obtidos, podemos sugerir que frente à lipoperoxidação exacerbada promovida pela exposição à fumaça do cigarro, observada pelo aumento de MDA, houve ativação do sistema antioxidante, evidenciado pelos aumentos da concentração de grupos tióis e da atividade da SOD no Grupo Cigarro. Apesar desta maior ativação do sistema antioxidante, não houve prevenção da elevada lipoperoxidação neste grupo (G2). Por outro lado, o grupo Cigarro/Zinco apresentou uma maior concentração de grupos tióis que o Grupo Cigarro, demonstrando que a suplementação com zinco foi capaz de induzir esta elevação e como consequência reduzir o estresse oxidativo no testículo. Yokus et al. (2005) observaram um aumento da atividade da SOD e redução da atividade de GSH-Px nos fumantes ativos e passivos quando comparado ao grupo não fumante. Zahraie et al. (2005) observaram um aumento da atividade da enzima Cu/Zn-SOD em fumantes, redução no nível de selênio sérico, no entanto, não detectaram diferenças significativas na atividade da GSH-Px e níveis séricos de cobre, zinco e ferro. Orhan, Evelo e Sahin (2005) observaram tanto redução da atividade da SOD como também da GSH-Px. Já Solak et al. (2005) verificaram uma redução da atividade da GSH-Px nos fumantes além de uma correlação negativa entre esta atividade enzimática e o nível de MDA. Até o momento não está claro como o cigarro induz o estresse oxidativo. Em alguns estudos a nicotina e o cádmio podem estar relacionados com a produção oxidante em consequência do hábito de fumar (SZUSTER-CIESIELSKA et al., 2000; NEUNTEUFL et al., 2002). Por outro

lado, o tabagismo pode causar estimulação da resposta inflamatória (SHER et al., 1999) que pode acarretar em elevação da atividade da Cu/Zn-SOD. Segundo Shamsi et al. (2010) uma correlação positiva da contagem espermática com a SOD sanguínea pode ser estabelecida e indicar que a avaliação de SOD poderia ser um indicador da análise do meio oxidante dos espermatozoides e também ser um parâmetro bioquímico para quantificar a concentração espermática. Estes autores também observaram uma correlação positiva entre a SOD do plasma seminal e as porcentagens de espermatozoides morfologicamente anormais e mortos. Neste mesmo sentido, Abdallah et al. (2009) observaram uma correlação positiva entre a concentração de MDA e a atividade da SOD e ainda sugeriram que a avaliação dos status oxidativo e antioxidante devem ser tomados como uma importante ferramenta para o diagnóstico e tratamento da infertilidade masculina.

Ozyurt et al. (2006) analisaram um aumento da concentração de MDA nos testículos de ratos expostos à fumaça do cigarro, indicando que o cigarro leva a uma maior lipoperoxidação do testículo e que uma suplementação com o éster feniletil do ácido cafeico, composto do própolis e que possui diversas atividades inclusive capacidade antioxidante, é eficaz em prevenir esta alteração. Além disso, verificaram a atividade da superóxido dismutase que se mostrou aumentada no grupo somente exposto à fumaça do cigarro tanto com relação ao grupo controle como também ao grupo exposto à fumaça do cigarro e que foi suplementado com o éster. Com relação à atividade da glutathione peroxidase, os autores detectaram uma redução nos dois grupos expostos à fumaça do cigarro quando comparados ao grupo controle. Os autores concluíram que a exposição à fumaça do cigarro resulta em uma produção elevada de espécies reativas do oxigênio no testículo dos ratos e que uma suplementação adequada com o éster pode prevenir dos efeitos adversos

provocados pelo estresse oxidativo. Estes dados corroboram com os resultados encontrados no presente estudo.

Com base na discussão apresentada, verifica-se que a exposição à fumaça do cigarro realmente exerce efeitos maléficos sobre a função testicular e que o estresse oxidativo exacerbado induzido pelo cigarro pode ser um dos mecanismos envolvidos. Adicionalmente, uma suplementação com zinco foi capaz de prevenir certas alterações, seja por inibir o estresse oxidativo elevado como também por desempenhar um efeito modulador/protetor sobre determinados parâmetros relacionados ao sistema reprodutor masculino, podendo vir a se tornar uma alternativa promissora quando de sua associação aos tratamentos convencionais para infertilidade relacionada ao tabagismo masculino.

Conclusão

6. Conclusão

A exposição à fumaça do cigarro:

- Foi capaz de reduzir a massa corporal dos animais, enquanto que o zinco não conseguiu prevenir esta alteração.

- Não alterou a concentração plasmática de testosterona e o peso úmido dos órgãos da reprodução masculina quando comparado ao grupo controle. O grupo exposto à fumaça do cigarro e suplementado com zinco apresentou um aumento significativo da concentração deste hormônio bem como aumento no peso úmido do testículo quando comparado ao grupo que foi somente exposto à fumaça do cigarro.

- Levou a danos nos parâmetros seminais: concentração, motilidade, vitalidade e morfologia. A suplementação com zinco foi capaz de proteger a redução da concentração espermática.

- Levou a um maior estresse oxidativo, evidenciado pela maior concentração do produto de lipoperoxidação - MDA.

- Levou a uma maior ativação da linha de defesa antioxidante, representada pela concentração de grupos tióis e atividade da superóxido dismutase, sendo que esta ativação por si só não foi capaz de prevenir a elevada lipoperoxidação. Por outro lado, a suplementação com zinco conseguiu prevenir o estresse oxidativo exacerbado no testículo, pelo menos em parte, por aumentar a concentração de grupos tióis.

A exposição à fumaça do cigarro, na taxa e período de exposição utilizados no presente estudo, não alterou a histologia do testículo como também não gerou danos no nível de expressão gênica do receptor de andrógeno no testículo e na próstata ventral.

O zinco mostrou exercer atividade antioxidante e efeito modulador/protetor sobre determinados parâmetros relacionados ao sistema reprodutor masculino, podendo vir a se tornar uma alternativa promissora quando de sua associação aos tratamentos convencionais para infertilidade relacionada ao tabagismo masculino.

Referências

7. Referências

- ABBASI, A.A. et al. Experimental zinc deficiency in man. Effect on testicular function. **J. Lab. Clin. Med.**, v.96, n.3, p.544-550, 1980.
- ABDALLAH, F.B. et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in infertile men: correlation with semen parameter. **J. Clin. Lab. Anal.**, v.23, n.2, p.99-104, 2009.
- ADAMSON, G.D.; BAKER, V.L. Subfertility: causes, treatment and outcome. **Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.**, v.17, n.2, p.169-185, 2003.
- AHMADNIA, H. et al. Effect of cigarette smoke on spermatogenesis in rats. **Urol. J.**, v.4, p.159-163, 2007.
- AITKEN, R.J. The amoroso lecture. The human spermatozoon – a cell in crisis? **J. Reprod. Fertil.**, v.115, p.1-7, 1999.
- AITKEN, R.J.; BAKER, M.A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.250, p.66-69, 2006.
- AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **J. Reprod. Fert.**, v.81, n.2, p.459-469, 1987.
- AITKEN, R.J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and Y chromosome. **Reproduction**, v.122, p. 497-506, 2001.
- ALI, M.M. et al. Induction of metallothionein by zinc protects daunorubicin toxicity in rats. **Toxicology**, v.179, p.85-93, 2002.
- AMANN, R.P. Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals. **Environ. Health Perspect.**, v.70, p.149-158, 1986.
- AUGER, J. et al. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. **N. Engl. J. Med.**, v.332, n.5, p.281-285, 1995.
- BEDWAL, R.S.; BAHUGUNA, A. Zinc, copper and selenium in reproduction. **Experientia**, v.50, p.626-640, 1994.
- BELLINGER, L.L. et al. The effects of chronic nicotine on meal patterns, food intake, metabolism and body weight of male rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.95, p.92-99, 2010.
- BISHOP, C.; PARKER, G.C.; COSCINA, D.V. Nicotine and its withdrawal after feeding induced by paraventricular hypothalamic injections of neuropeptide Y in Sprague-Dawley rats. **Psychopharmacology**, v.162, p.265-272, 2002.

- BLOK, L.J. et al. Effect of testosterone deprivation on expression of androgen receptor in rat prostate, epididymis and testis. **Int. J. Androl.**, v.15, p.182-198, 1992.
- BOIVIN, J. et al. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. **Hum. Reprod.**, v.22, n.6, p.1506-1512, 2007.
- BRAY, T.M.; BETTGER, W.J. Physiological role of zinc as an antioxidant. **Free Radic. Biol. Med.**, v.8, p.281-291, 1990.
- BRINKMANN, A.O. et al. The human androgen receptor: domain structure, genomic organization and regulation of expression. **J. Steroid. Biochem.**, v.34, p.307-310, 1989.
- BURNS, L.H. Psychiatric aspects of infertility and infertility treatments. **Psychiatr. Clin. N. Am.**, v.30, p.689-716, 2007.
- CARLSEN, E. et al. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. **Br. Med. J.**, v.305, p.609-613, 1992.
- CHIMIANTI, F. et al. Zinc homeostasis-regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate. **Curr. Drug Targets**, v.4, p.323-328, 2003.
- CIESLIK, K. et al. Influence of zinc supplementation on imipramine effect in a chronic unpredictable stress (CUS) model in rats. **Pharmacol. Rep.**, v.59, p.46-52, 2007.
- COLEMAN, J.E. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. **Annu. Rev. Biochem.**, v.61, p.897-946, 1992.
- CUASNICÚ, P.S. et al. Changes in specific sperm proteins during epididymal maturation. In: ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. (Eds). **The epididymis – from molecules to clinical practice**. New York: Kluwer Academic, 2002. p.389-403.
- CURTIS, K.M.; SAVITZ, D.A.; ARBUCKLE, T.E. Effects of cigarette smoking, caffeine consumption, and alcohol intake on fecundability. **Am. J. Epidemiol.**, v.146, n.1, p.32-41, 1997.
- DADOUNE, J.; DEMOULIN, A. Structure and functions of testis. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M.C.; HUNTER, R.H.F. (Eds). **Reproduction in mammals and man**. Paris: Ellipses, 1993. cap.13, p.227-255.
- DAVYDOV, D.R. Microsomal monooxygenase in apoptosis: another target for cytochrome c signaling? **Trends Biochem. Sci.**, v.26, n.3, p.155-160, 2001.
- DE SOUZA, M.D. et al. Oxidative stress status and lipid profiles of diabetic pregnant rats exposed to cigarette smoke. **Reprod. Biomed. Online**, v.20, n.4, p.547-552, 2010.
- FAVIER, A.E. The role of zinc in reproduction. Hormonal mechanisms. **Biol. Trace Elem. Res.**, v.32, p.363-382, 1992.

FERREIRA, A.L.A.; MACHADO, P.E.A.; MATSUBARA, L.S. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes and glutathione levels in human erythrocytes exposed to colloidal iron hydroxide in vitro. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.32, n.6, p.689-694, 1999.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.43, p.61-68, 1997.

FOSTER, W.G. et al. Environmental contaminants and human infertility: hypothesis or cause for concern? **J. Toxicol. Environ. Health B.**, v.11, p.162-176, 2008.

FRAGA, C.G. et al. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. **Mutat. Res.**, v.35, p.199-203, 1996.

FRAKER, P.J. et al. The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. **J. Nutr.**, v.30, p.1399S-1406S, 2000.

FRANÇA, L.R. et al. Surface and surface-to-volume relationships of the sertoli cell during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Biol. Reprod.**, v.49, p.1215-1228, 1993.

FRANÇA, L.R. et al. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. **Biol. Reprod.**, v.59, p.1371-1377, 1998.

FREEDMAN, L.P. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. **Endocr. Rev.**, v.13, p.129-145, 1992.

GUERRA, M.P. A abstenção tabágica: Reflexões sobre a recaída. **Aná. Psicológica** v.22, p.507-518, 2004.

HAMDY, S.A.; NASSIF, O.I.; ARDAWI, M.S. Effect of marginal or severe dietary zinc deficiency on testicular development and functions of the rat. **Arch. Androl.**, v.38, p.243-253, 1997.

HASSAN, A. et al. Seminal plasma cotinine and insulin-like growth factor-I in idiopathic oligoasthenozoospermic smokers. **BJU Int.**, v.103, p.108-111, 2008.

HERMO, L.; ROBAIRE, B. Epididymal cell types and their functions. In: ROBAIRE, B.; HINTON, B.T. (Eds). **The Epididymis: from molecules to clinical practice**. New York: Kluwer Academic, 2002. p. 81-102.

HESKETH, J.E. Effects of dietary zinc deficiency on leydig cell ultrastructure in the boar. **J. Comp. Pathol.**, v.92, n.2, p.239-247, 1982.

HSU, P.C. et al. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm. **Toxicology**, v.128, n.3, p.169-179, 1998.

JOHNSON, J.L. et al. Associations of trying to lose weight, weight control behaviors, and current cigarette use among US high school students. **J. Sch. Health**, v.79, p.355-360, 2009.

JUUL, S.; KARMAUS, W.; OLSEN, J. Regional differences in waiting time to pregnancy : pregnancy-based surveys from Denmark, France, Germany, Italy and Sweden. **Hum. Reprod.**, v.14, n.5, p.1250-1254, 1999.

KAPAWA, A. et al. Effects of paternal cigarette smoking on testicular function, sperm fertilizing capacity, embryonic development, and blastocyst capacity for implantation in rats. **Andrologia**, v.36, n.2, p.57-68, 2004.

KIRAL, F.; ULUTAS, P.A.; FIDANCI, U.R. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rats exposed to cigarette smoke. **Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.**, v.55, p.145-148, 2008.

KLEIN, L.C.; CORWIN, E.J.; CEBALLOS, R.M. Leptin, hunger, and body weight: influence of gender, tobacco smoking, and smoking abstinence. **Addic. Behav.**, v.29, p.921-927, 2004.

KOURY, J.C. ; DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev. Nutr.**, v.16, p.433-441, 2003.

KUMOSANI, T.A. et al. The influence of smoking on semen quality seminal microelements and Ca²⁺-ATPase activity among infertile and fertile men. **Clin. Biochem.**, v.41, p.1199-1203, 2008.

KÜNZLE, R. et al. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. **Fertil. Steril.**, v.79, n.2, p.287-291, 2003.

LEAKE, A.; CHISHOLM, G.D.; HABIB, F.K. The effect of zinc on the 5 alpha-reduction of testosterone by hyperplastic human prostate gland. **J. Steroid Biochem.**, v.20, p.651-655, 1984.

LINDER, R.E.; SLOTT, V.L.; SUAREZ, J. Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposure to fourteen reproductive toxicants. **Reprod. Toxicol.**, v.6, p.491-505, 1992.

LIU, R-Z. et al. Seminal plasma zinc level may be associated with the effect of cigarette smoking on sperm parameters. **J. Int. Med. Res.**, v.38, p.923-928, 2010.

MACDONALD, R.S. The role of zinc in growth and cell proliferation. **J. Nutr.**, v.130, p.1500S-1508S, 2000.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S.M.F. A importância do zinco na nutrição humana. **Rev. Nutr.**, v.17, p.79-87, 2004.

MAK, V. et al. Smoking is associated with the retention of cytoplasm by human spermatozoa. **Urology**, v.56, n.3, p.463-466, 2000.

MANSOUR, M.M. et al. Role of zinc in regulating the testicular function. Part 2. Effect of dietary zinc deficiency on gonadotropins, prolactin and testosterone levels as well as 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in testes of male albino rats. **Nahrung.**, v.33, n.10, p.941-947, 1989.

MARET, W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. **J. Nutr.**, v.130, p.1455S – 1458S, 2000.

MERRELLS, K.J. et al. Relationship between abnormal sperm morphology induced by dietary zinc deficiency and lipid composition in testes of growing rats. **Br. J. Nutr.**, v.102, n.2, p.226-232, 2009.

NERÍN, I. et al. Weight gain and anxiety levels in recent ex-smokers. **Arch. Bronconeumol.**, v.41, p.9-15, 2007.

NEUNTEUFL, T. et al. Contribution of nicotine to acute endothelial dysfunction in long-term smokers. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.39, n.2, p. 251-256, 2002.

OLSON, G.E.; NAGDAS, S.K.; WINFREY, V.P. Structural differentiation of spermatozoa during post-testicular maturation. In: ROBAIRE, B.; HINTON, B.T. (Eds). **The Epididymis: from molecules to clinical practice**. New York: Kluwer Academic, 2002, p.371-387.

ORHAN, H.; EVELO, C.T.A.; SAHIN, G. Erythrocyte antioxidant defense response against cigarette smoking in humans - the glutathione s-transferase vulnerability. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v.19, n.4, p.226-233, 2005.

OZYURT, H. et al. Oxidative stress in testicular tissues of rats exposed to cigarette smoke and protective effects of caffeic acid phenethyl ester. **Asian J. Androl.**, v.8, n.2, p.189-193, 2006.

PAKSY, K.; VARGA, B.; LAZAR, P. Zinc protection against cadmium-induced infertility in female rats. Effect of zinc and cadmium on the progesterone production of cultured granulosa cells. **BioMetals**, v.10, p.27-35, 1996.

PIFFER, R.C. **Influência da terapia pré-natal com betametasona sobre o desenvolvimento da prole, do nascimento à vida adulta reprodutiva, em ratos**. Tese (Doutorado em Fisiopatologia em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2009.

POLYZOS, A. et al. Differential sensitivity of male germ cells to mainstream and sidestream tobacco smoke in the mouse. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v.237, p.298-305, 2009.

PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Smoking and infertility. Review. **Fertil. Steril.**, v.86 (4 Supl), p.S172-S177, 2006.

PRASAD, A.S. et al. Zinc status and serum testosterone levels of healthy adults. **Nutrition**, v.12, n.5, p.344-348, 1996.

RAJPURKAR, A. et al. Chronic cigarette smoking induces an oxidant/antioxidant imbalance in the testis. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.**, v.19, p.369-373, 2000.

RAJPURKAR, A.; LI, H.; DHABUWALA, C.B. Morphometric analysis of rat testis following chronic exposure to cigarette smoke. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.**, v.19, p.363-368, 2000.

RAMLAU-HANSEN, C.H. et al. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. **Hum. Reprod.**, v.22, n.1, p.188-196, 2007.

ROSAS, M.; BAPTISTA, F. Desenvolvimento de estratégias de intervenção psicológica para a cessação tabágica. **Aná. Psicológica**, v.20, p.45-56, 2002.

RUBES, J. et al. Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men. **Fertil. Steril.**, v.70, p.715-723, 1998.

RUSSELL, L. D.; BRINSTER, R.L., Ultrastructural observations of spermatogenesis following transplantation of rat testis cells into mouse seminiferous tubules. **J. Androl.**, v.17, p.615-627, 1996.

RUSSELL, L.D.; FRANÇA, L.R. Building a testis. **Tissue Cell**, v.27, n.2, p.129-147, 1995.

SADANI, G.R.; NADKARNI, G.D. Changes in lipid peroxide levels and the activity of reactive oxygen scavenging systems in thyroid tissue after exposure to radioactive iodine in rats. **Thyroid**, v.7, n.6, p.937-941, 1997.

SALEH, R.A. et al. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress infertile men: a prospective study. **Fertil. Steril.**, v.79, n.6, p.1469-1470, 2002.

SANKAKO, M.K. **Avaliação da função testicular de ratos em abstinência ao cigarro.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas - Modalidade Médica) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2008.

SASCO, A.J.; SECRETAN, M.B.; STRAIF, K. Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. **Lung Cancer**, v.45, p.53-59, 2004.

SCHLEGEL, R.A. et al. Changes in the organization of the lipid bilayer of the plasma membrane during spermatogenesis and epididymal maturation. **Biol. Reprod.**, v.34, n.2, p.379-391, 1986.

SEED, J. et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. **Reprod. Toxicol.**, v.10, p.237-244, 1996.

SHAMSI, M.B. et al. Antioxidant levels in blood and seminal plasma and their impact on sperm parameters in infertile men. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v.47, n.1, p.38-43, 2010.

SHARPE, R.M. Lifestyle and environmental contribution to male infertility. **Br. Med. Bull.**, v.56, p.630-642, 2000.

SHARPE, R.M.; FRANKS, S. Environment, lifestyle and infertility-an inter-generational issue. **Nat. Cell. Biol.**, v.4, p.33-40, 2002.

SHER, M.E. et al. The influence of cigarette smoking on cytokine levels in patients with inflammatory bowel disease. **Inflamm. Bowel Dis.**, v.5, n.2, p.73-78, 1999.

SHI, Q. et al. Cigarette smoking and aneuploidy in human sperm. **Mol. Reprod. Dev.**, v.59, p.417-421, 2001.

SIMANI, A.S.; INOUE, S.; HOOGS, J.C. Penetration of the respiratory epithelium of guinea pigs following exposure to cigarette smoke. **Lab Invest.**, v.31, p. 75-81, 1974.

SOFIKITIS, N. et al. Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. **J. Urol.**, v.154, p.1030-1034, 1995.

SOLAK, Z.A. et al. Effect of different levels of cigarette smoking on lipid peroxidation, glutathione enzymes and paraoxonase 1 activity in healthy people. **Clin. Exp. Med.**, v.5, n.3, p.99-105, 2005.

SORAHAN, T.P. et al. Childhood cancer and parental use of tobacco. Deaths from 1953 to 1955. **Br. J. Cancer**, v.75, p.134-138, 1997.

STANBENFELD, G.H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. (Eds). **Dukes - fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan S. A., 1996. cap.35, p.603-614.

STEDMAN, R.L. The chemical composition of tobacco and tobacco smoke. **Chem. Rev.**, v.68, p.153-207, 1968.

SULLIVAN, R. et al. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. **Blood Cells Mol. Dis.**, v.35, p.1-10, 2005.

SZUSTER-CIESIELSKA, A. et al. The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. **Toxicology**, v.145, p.159-171, 2000.

TAGER, I.B. et al. The natural history of forced expiratory volumes. Effect of cigarette smoking and respiratory symptoms. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.138, p.837-849, 1988.

TEO, K.K. et al. Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study. **Lancet**, v.368, p.647-658, 2006.

TESARÍK, J.; FLÉCHON, J.E. Distribution of sterols and anionic lipids in human sperm plasma membrane: effects of *in vitro* capacitation. **J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.**, v.97, p.227-237, 1986.

TRUMMER, H. et al. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. **Hum. Reprod.**, v.17, n.6, p.1554-1559, 2002.

UZ, E. et al. The relationship between serum trace element changes and visual function in heavy smokers. **Acta Ophthalmol. Scand.**, v.81, n.2, p.161-164, 2003.

VAN ROIJEN, J.H. et al. Comparison of the response of rat testis and accessory sex organs to treatment with testosterone and the synthetic androgen methyltrienolone (R1881). **J. Androl.**, v.18, p.51-61, 1997.

VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v.30, p.1323-1338, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction**. 4. ed. Australian: Cambridge University Press, 1999. 128 p.

WU, F.Y.-H.; WU, C.-W. Zinc in DNA replication and transcription. **Ann. Rev. Nutr.**, v.7, p.251-272, 1987.

YAMAMOTO, Y. et al. Effects of smoking on testicular function and fertilizing potential in rats. **Urol. Res.**, v.26, n.1, p.45-48, 1998.

YANG, Z.-J. et al. Infusion of nicotine into the LHA enhances dopamine and 5-HT release and suppresses food intake. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.64, p.155-159, 1999.

YARDIMCI, S. et al. Long-term effects of cigarette-smoke exposure on plasma testosterone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone levels in male rats. **Br. J. Urol.**, v.79, p.66-69, 1997.

YOKUS, B. et al. Effects of active and passive smoking on antioxidant enzymes and antioxidant micronutrients. **Biotechnol. & Biotechnol. Eq.**, v.19, n.3. p.117-122, 2005.

ZAGO, M.P.; OTEIZA, P.I. The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. **Free Radic. Biol. Med.**, v.31, p.266-274, 2001.

ZAHRAIE, M. et al. Effects of cigarette smoking on erythrocyte antioxidative enzyme activities and plasma concentrations of their cofactors. **Acta Medica Iranica**, v.43, n.4, p.253-258, 2005.

ZENZES, M.T.; BIELECKI, R.D.V.M.; REED, T.E. Detection of benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in sperm of men exposed to cigarette smoke. **Fertil. Steril.**, v.72, p.330-335, 1999.

ZHU, J.L. et al. Infertility, infertility treatment and psychomotor development: the Danish National Birth Cohort. **Paediatr. Perinat. Epidemiol.**, v.23, p.98-106, 2009.

ZINGARELLI, B.; SZABO, C.; SALZMAN, A.L. Reduced oxidative and nitrosative damage in murine experimental colitis in the absence of inducible nitric oxide synthase. **Gut.**, v.45, p.199-209, 1999.

Anexo

Anexo**Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº **114-CEEA**, sobre “Função testicular de ratos expostos à fumaça do cigarro – análises seminais, morfológicas e moleculares e possível papel protetor do zinco”, sob a responsabilidade de **ODUVALDO CÂMARA MARQUES PEREIRA**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL** (CEEA), em reunião de **03/04/2009**.

Botucatu, 3 de abril de 2009.



Prof. Dra. **PATRÍCIA FERNANDA F. PINHEIRO**
Presidente - CEEA

