

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Raquel Frenedoso da Silva

***Ação protetora da N-acetilcisteína sobre efeitos
persistentes do trióxido de arsênio no sistema
genital de camundongos Swiss***

*Campinas
2014*

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Raquel Frenedoso da Silva

***"Ação protetora da N-acetilcisteína sobre efeitos persistentes
do trióxido de arsênio no sistema genital de
camundongos Swiss"***

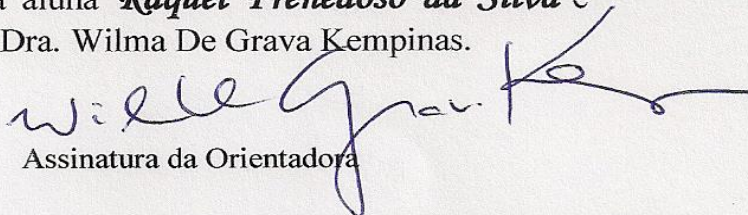
Orientadora: Dra. Wilma De Grava Kempinas

***"Protective action of N-acetylcysteine on the persistent effects
of arsenic trioxide in genital
system of Swiss male mice "***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestra em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.

Dissertation presented to the State University of Campinas in fulfillment of the requirements for the degree of Master on Cellular and Structural Biology Postgraduate Programme, in the Biology Institute, in the area of Cellular Biology.

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna ***Raquel Frenedoso da Silva*** e orientada pela Dra. Wilma De Grava Kempinas.


Assinatura da Orientadora

Campinas, 2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Si38a Silva, Raquel Frenedoso, 1988-
Ação protetora da N-acetilcisteína sobre efeitos persistentes do trióxido de arsênio no sistema genital de camundongos Swiss / Raquel Frenedoso da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Wilma De Grava Kempinas.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Trióxido de arsênio. 2. Reprodução. 3. Camundongo. 4. N-acetilcisteína. I. Kempinas, Wilma De Grava. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Protective action of N-acetylcysteine on the persistent effects of arsenic trioxide in genital system of Swiss male mouse

Palavras-chave em inglês:

Arsenic trioxide

Reproduction

Mice

N-acetylcysteine

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Wilma De Grava Kempinas [Orientador]

Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Erick José Ramo da Silva

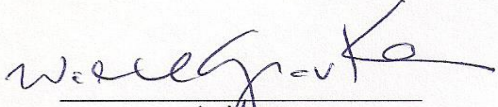
Data de defesa: 07-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

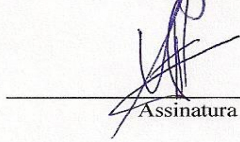
Campinas, 07 de fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

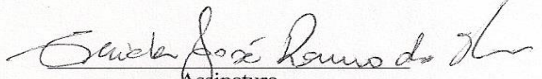
Dra. Wilma De Grava Kempinas (Orientadora)


Assinatura

Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete


Assinatura

Dr. Erick José Ramo da Silva


Assinatura

Dra. Arielle Cristina Arena

Assinatura

Dra. Amanda Cia Hetzl

Assinatura

Resumo

O trióxido de arsênio (As_2O_3) tem se mostrado altamente eficaz e muito utilizado no tratamento para diminuir ou eliminar a leucemia promielocítica aguda. Estudos mostram relação entre exposição a este composto e inibição da espermatogênese ou desenvolvimento do espermatozoide, uma vez que exerce efeito inibitório nos testículos. Diante da crescente utilização do As_2O_3 no tratamento da leucemia e da escassez de resultados sobre os seus efeitos adversos na reprodução masculina, justifica-se a realização do presente estudo, pelo qual se avaliou os efeitos imediatos e tardios do tratamento com As_2O_3 sobre fisiologia reprodutiva de camundongos Swiss adultos e se a co-administração de N-acetilcisteína (NAC), previne esses efeitos. Em um primeiro experimento, camundongos Swiss adultos foram tratados com veículo, 0,3 ou 3,0 mg/Kg/dia de As_2O_3 , via subcutânea, em 25 aplicações. No final do tratamento, metade dos animais foram eutanasiados para avaliação dos efeitos pós-tratamento e a outra metade foi mantida sem a droga por período de 50 dias, até que se procedeu a eutanasia para avaliação da possível reversibilidade dos efeitos. Foram investigados: peso dos órgãos vitais, reprodutores e glândulas sexuais acessórias, quantidade e qualidade espermáticas, dosagem de testosterona e dosagem de arsênio no sangue. Os animais tratados com 3,0 mg/kg de As_2O_3 e eutanasiados logo após o fim do tratamento mostraram diminuição no peso da vesícula seminal, número de espermatozoides móveis e produção espermática diária. Após período de suspensão do tratamento, os animais tratados com a mesma dose continuaram apresentando redução nos mesmos parâmetros. Em um segundo experimento, foi avaliada a contratilidade do ducto epididimário isolado tanto frente ao tratamento *in vivo* dos animais (tratados com o veículo ou com a dose de 3,0 mg/kg/dia de As_2O_3) quanto ao tratamento *in vitro* do tecido. Essa análise revelou que a contração máxima do ducto epididimário estava significativamente aumentada nos animais tratados com As_2O_3 *in vivo*. E em uma terceira etapa os animais foram divididos em Controle, As_2O_3 (3,0 mg/Kg/dia), NAC na água de beber (40mM) e As_2O_3 + NAC, tratados por 5 semanas. Após o final do tratamento, os animais foram avaliados quanto aos parâmetros que se apresentaram prejudicados com o tratamento

anterior, descrito na etapa um. Quando a NAC foi oferecida aos animais, houve uma melhora significativa nos parâmetros espermáticos antes prejudicados pela administração da droga, i.e., o peso de vesícula seminal, número de espermatozoides móveis e produção espermática diária do grupo As_2O_3 + NAC foram similares ao grupo controle. Podemos concluir que o As_2O_3 exerce efeitos tóxicos sobre o sistema genital de camundongos machos, e que esses efeitos podem ser persistentes mesmo após o término do tratamento. Os resultados mostraram, também, que a administração de um antioxidante pode prevenir os efeitos deletérios dessa droga sobre os parâmetros avaliados.

Abstract

Arsenic trioxide (As_2O_3), a trivalent arsenic form has proven highly effective and widely used in the treatment to reduce or eliminate acute promyelocytic leukemia. Studies show a relationship between exposure to this compound and inhibition of spermatogenesis and sperm development since it exerts an inhibitory effect on the testis. Given the growing use of As_2O_3 on treatment of leukemia and the lack of results about the side effects on male reproduction, it is justified to carry out this study, which evaluated the immediate and late effects of treatment with As_2O_3 on the structure and reproductive physiology of adult Swiss mice and whether the co-administration of N-acetylcysteine (NAC) prevents these effects. In a first experiment, adult Swiss mice were treated with vehicle, 0.3 or 3.0 mg/Kg/day of As_2O_3 , subcutaneously in 25 applications. At the end of treatment, half of the animals were euthanized for evaluation of the post- treatment effects and the other half was maintained without the drug for 50 days until the euthanasia to evaluate the potential reversibility of the effects. It was evaluated: the vital, reproductive and accessories organ weights, analyzes of sperm quantity and quality, testosterone and arsenic measurements in blood. Animals treated with 3.0 mg/Kg of As_2O_3 and euthanized immediately after the end of treatment showed a decrease of seminal vesicle weight, in number of motile spermatozoa and daily sperm production. After suspension of treatment, animals treated with this same dose continued to show reduction in these same parameters. In a second experiment, the contractility of the epididymal duct was evaluated both *in vivo* treatment of animals (treated with vehicle or a 3.0 mg/Kg/day of As_2O_3) and *in vitro* treatment of the tissues. This analysis revealed that the maximum contraction of the epididymal duct was significantly increased in *in vivo* treated animals. And in a third step animals were divided into Control, As_2O_3 (3.0 mg/Kg/day) NAC in tap water (40 mM) and As_2O_3 + NAC, treated for 5 weeks. After the end of treatment, animals were assessed for previously impaired parameters described in step one. When NAC was given to the animals, there was a significant improvement in sperm parameters before harmed by the drug administration, i.e. seminal vesicle weight, number of motile sperm and daily sperm production in As_2O_3 + NAC group were similar to the control group. We conclude that As_2O_3 exerts toxic effects on the male

mice genital system, and that these effects may be persistent even after the end of treatment. Also, the results showed that administration of an antioxidant can prevent the deleterious effects of this drug on the parameters evaluated.

Introdução	1
1. Sistema Genital Masculino de Roedores	2
1.1. Testículo	2
1.2. Epidídimo	4
1.3. Ducto deferente.....	6
1.4. Vesícula seminal	7
1.5. Próstata.....	7
2. Trióxido de arsênio	9
2.1. Eficácia no tratamento da leucemia	9
2.2. Efeitos adversos.....	11
3. Estresse oxidativo induzido pelo As_2O_3	12
4. Estresse oxidativo e o sistema genital masculino.....	13
5. Antioxidantes na prevenção de danos do estresse oxidativo	14
Justificativa.....	17
Objetivos	19
Manuscrito.....	21
1. INTRODUCTION.....	25
2. MATERIAL AND METHODS	26
3. RESULTS	32
4. DISCUSSION.....	34
5. ACKNOWLEDGMENTS.....	41
6. REFERENCES	42
Conclusão.....	58
Referências Bibliográficas da Introdução	60
Apêndices.....	67
Anexo	74

Dedicatória

Não só esse trabalho, mas todo o sucesso da minha vida, eu dedico e devo à minha mãe Maria. Ela acreditou em mim quando ninguém mais o fez. Ela me entendeu, mesmo quando não entendeu nada; me apoiou mesmo quando não concordou em nada; e me deixou ir, mesmo quando sua vontade era fazer ficar. Obrigada mãe, sempre foi e sempre vai ser por você!

“Tudo aquilo que sou, ou pretendo ser, devo a um anjo: minha mãe.”

Abraham Lincoln

Agradecimentos

A Deus, que permitiu a realização de todos os meus sonhos, e que continua olhando por mim a cada passo dado.

E acontecerá que, antes que eles clamem, eu os ouvirei; estando eles ainda a falar, eu os atenderei.

Isaías, 65:24

A minha orientadora Wilma De Grava Kempinas, pelo apoio, incentivo e colaboração durante toda a execução deste trabalho, e por me ajudar a realizar mais esse sonho.

Obrigada professora, pela confiança em mim e no meu trabalho!

"Se enxerguei mais longe, foi porque estava sobre os ombros de gigantes."

Isaac Newton.

A minha amiga Cibele, que por tantas vezes esteve ao meu lado, pessoal e profissionalmente, sem ressalvas. Obrigada por fazer o meu caminho um pouco mais leve e o meu trabalho um pouco menos árduo. Você foi fundamental.

"Um amigo é um anjo que nos ajuda a ficar de pé outra vez quando nossas asas se esqueceram de como voar."

Rossy Valdéz

A Patrícia, que foi companheira em tantos momentos de dificuldades e também de alegria. Esse trabalho não teria sido o mesmo sem a sua ajuda!

"Um amigo é a pessoa que nos mostra o rumo e percorre conosco uma parte do caminho."

Francisco Alberoni

A Gabriela, pela amizade e companheirismo de todos esses anos. Obrigada por me oferecer a sua amizade, e acima de tudo, por sempre me oferecer a verdade.

Nunca duas pessoas tão parecidas se deram tão bem!

"Cada novo amigo que ganhamos no decorrer da vida aperfeiçoa-nos e enriquece-nos, não tanto pelo que nos dá, mas pelo que nos revela de nós mesmos."

Miguel Unamuno

As companheiras de mestrado Marília e Josi que fizeram desses dois anos os mais divertidos. Uma das coisas que mais vou sentir falta é de rir com vocês!

“Não busque um amigo para matar as horas, busque-o com horas para viver”

Ana Flávia, com quem convivi por tão pouco tempo, mas com quem tive uma afinidade muito grande e instantânea. Você é uma das pessoas com quem eu mais me divirto!

“Quem caminha sozinho pode até chegar mas rápido, mas aquele que vai acompanhado dos amigos, com certeza vai mais longe”

A equipe da Farmacologia, Ricardo Kiguti e professor André Pupo, por todo o apoio e novas idéias que incrementaram o meu trabalho.

A Liliam Panagio, que sempre esteve disposta a me ajudar em tudo o que precisei e sempre teve paciência com as minhas dúvidas. Muito obrigada por seu apoio!

Aos membros titulares da banca, Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete e Dr. Erick José Ramo da Silva, e suplentes Dra. Arielle Cristina Arena e Dra. Amanda Cia Hetzl. Obrigada por aceitarem o meu convite!

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro na forma de Bolsa de Mestrado, processo nº 2012/14342-8.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida durante o início do meu mestrado.

E principalmente ao animais de laboratório utilizados nesse trabalhos, os camundongos Swiss.

"Jamais creia que os animais sofrem menos do que os humanos. A dor é a mesma para eles e para nós. Talvez pior, pois eles não podem ajudar a si mesmos."

Dr. Louis J. Camuti

Epígrafe

*Pensamos demasiadamente, sentimos muito pouco
Necessitamos mais de humildade que de máquinas
Mais de bondade e ternura que de inteligência
Sem isso, a vida se tornará violenta e tudo se perderá.*

Charles Chaplin

Introdução

1. Sistema Genital Masculino de Roedores

O sistema genital masculino de roedores assemelha-se a outros mamíferos, constituindo-se de testículos, epidídimos, ductos deferentes, glândulas sexuais como próstata e vesícula seminal, e órgão copulador, o pênis (Figura 1).

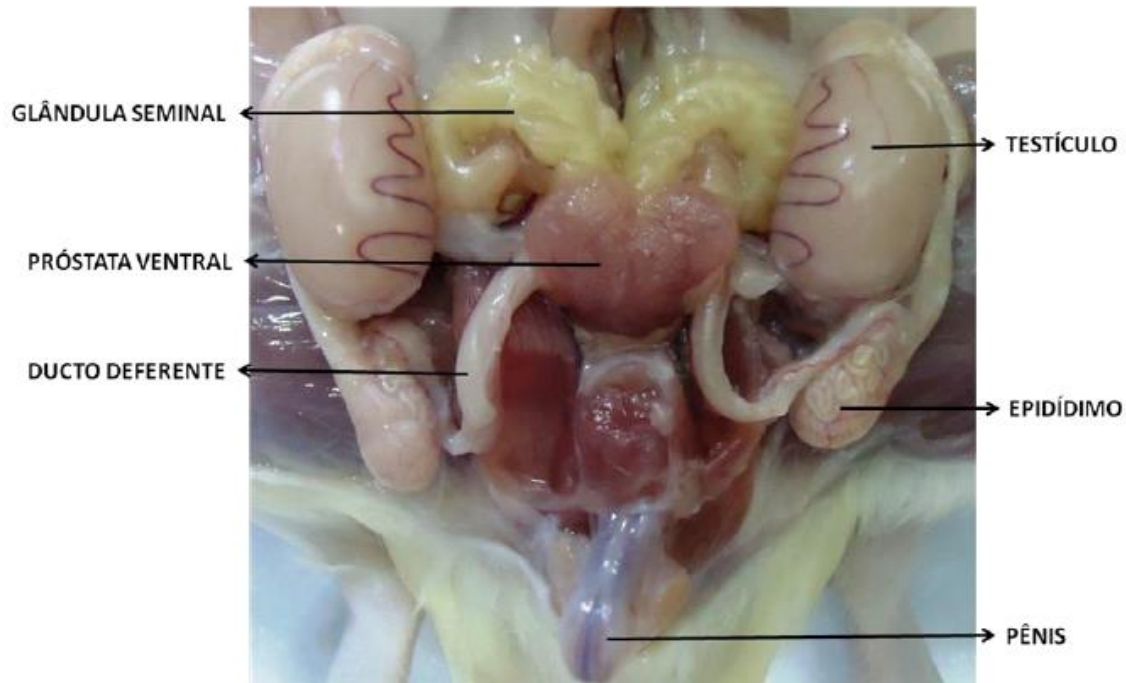


Figura 1: Órgãos genitais internos de rato *Wistar*. Fonte: Laboratório de Toxicologia da Reprodução e do Desenvolvimento.

1.1. Testículo

O testículo está localizado dentro da bolsa escrotal, o que faz com que sua temperatura seja diferente do restante do corpo. É envolvido por uma grossa cápsula de tecido conjuntivo denso, chamada túnica albugínea, e pode ser dividido funcional e anatomicamente em duas partes: túbulos seminíferos e tecido intersticial, sendo que o primeiro é responsável pela produção dos gametas masculinos, os espermatozoides, e o segundo realiza a estereoidogênese, ou seja, produção de hormônios esteróides (Johnson, 1997). O compartimento intersticial contém vasos linfáticos e sanguíneos,

nervos, macrófagos e células de Leydig, que ocupam a maior parte do espaço entre os túbulos seminíferos e representam a maior fonte de andrógenos, principalmente testosterona, sendo fonte também para produção de outros esteróides (Russel, 1990). Os túbulos seminíferos são formados por um epitélio germinativo ou seminífero, envolvido por uma lâmina basal e tecido conjuntivo contendo fibroblastos e células mióides.

No epitélio germinativo encontram-se dois tipos celulares: as células de Sertoli e as células da linhagem espermatogênica (Junqueira, 2008). As células de Sertoli apresentam papel importante no suporte físico e nutrição das células germinativas em desenvolvimento pela secreção de fluidos com proteínas e fatores de crescimento importantes para a viabilidade espermática. Além disso, são responsáveis pela compartimentalização do epitélio seminífero através da formação da Barreira de Células de Sertoli, que oferece um ambiente especializado que protege as células germinativas de substâncias tóxicas e reação autoimune. Realiza ainda a fagocitose do excesso de citoplasma liberado do espermatozoide diferenciado e células germinativas em degeneração (Franca et al., 2005, Griswold, 1998). Já as células da linhagem espermatogênica são aquelas que, dispostas em camadas, são responsáveis pela produção dos espermatozoides, processo denominado espermatogênese (Junqueira, 2008).

A espermatogênese é um processo cíclico no qual as espermatogônias diplóides, situadas próxima à lâmina basal, começam a sofrer mitose, proliferando-se e diferenciando-se para produzir novas gerações de células germinativas. Essa espermatogônia se modifica, originando os espermatócitos primários, que sofrem a primeira divisão meiótica para originar espermatócitos secundários, células haplóides. Em uma segunda meiose, essas células originam as espermatídes, que passarão por citodiferenciação para originar o espermatozoide, uma célula altamente diferenciada e especializada (Clermont, 1972, Amann, 1986).

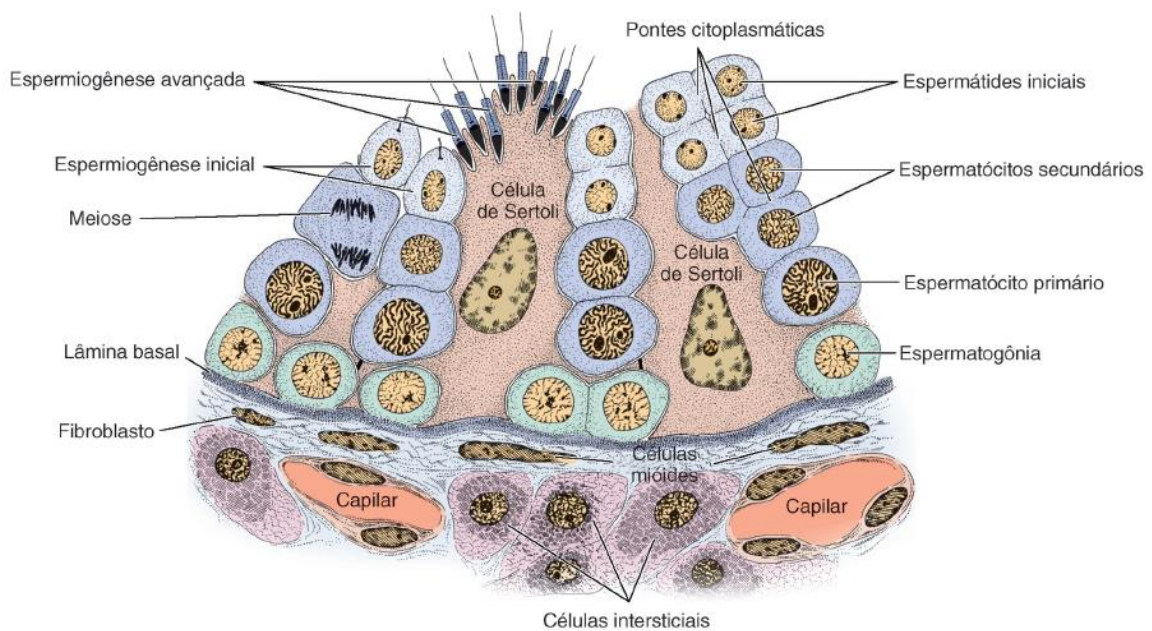


Figura 2. Esquema de túbulo seminífero mostrando as células da linhagem espermatogênica e o tecido intersticial, evidenciando seus principais componentes (Junqueira, 2008).

O sistema genital masculino é local de ação e/ou produção de hormônios que apresentam funções essenciais na espermatogênese, sendo eles: *testosterona*, secretada pelas células de Leydig, e que auxiliam no desenvolvimento das células germinativas; *hormônio luteinizante*, secretado pela hipófise anterior, tem função de estimular as células de Leydig; *hormônio folículo-estimulante*, também secretado pela hipófise para estimulação das células de Sertoli; e *hormônio do crescimento*, que promove a divisão da espermatogônia (Knobil, 2006)

1.2. Epidídimo

O epidídimo de roedores é formado por um único ducto altamente enovelado que conecta os ductos eferentes ao ducto deferente e pode ser dividido em regiões citológica e fisiologicamente distintas: segmento inicial, cabeça, corpo e cauda, que são subdivididas histologicamente de acordo com altura do epitélio, distribuição e quantidade de tipos celulares, proporcionando um microambiente específico para a passagem dos

espermatozoides vindos do testículo (Figura 3). O epidídimo pode ser dividido em três compartimentos: o lúmen do ducto, que contém espermatozoides e plasma, o epitélio de revestimento e o tecido conectivo (Cleland, 1957, Franca et al., 2005).

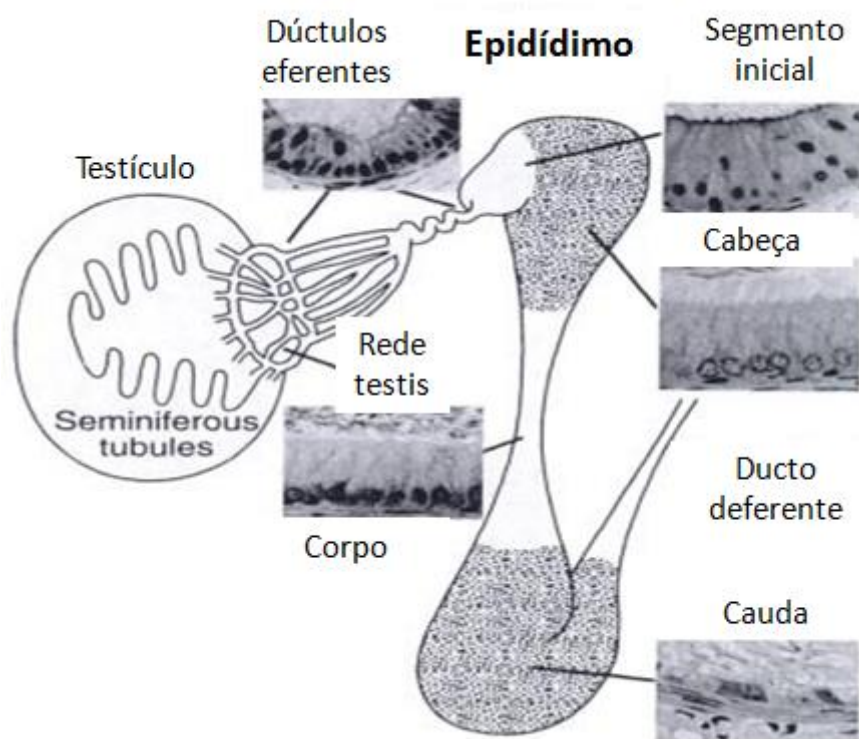


Figura 3. Trato genital masculino, mostrando a rede testis, ductulos eferentes, segmento inicial, cabeça corpo e cauda do epidídimo, além do ducto deferente. Modificado de (Klinefelter GR, 1998).

Apresenta papel importante na maturação das células germinativas que deixam os testículos morfológicamente formadas, porém ainda imaturas, i.e., sem habilidade de movimentação e fertilização do óócito. O espermatozoide, durante o seu trânsito pelo ducto epididimário, adquire mobilidade e também capacidade de reconhecimento e fertilização de ovócito secundário.. Ainda, além da maturação e transporte, o epidídimo fornece proteção às células germinativas e é responsável por concentrar e armazenar as células germinativas e liberá-las durante a ejaculação (Hermo, 2002).

Circundando o ducto epididimário existe uma camada de células musculares, mais fina na região da cabeça e corpo e mais grossa na região da cauda, que auxilia o trânsito de espermatozoides e sua expulsão para o ducto deferente (Ricker et al., 1997, Kempinas et al., 1998b). Sua contração auxilia no processo de trânsito espermático e, principalmente, expulsão dos espermatozoides da região da cauda para o ducto deferente (Bellentani et al., 2011). Essa camada apresenta diferença em sua espessura de acordo com a porção do epidídimo em que se encontra, sendo mais fina na região da cabeça e corpo e mais espessa na região da cauda (Figura 4), sendo importante no controle do processo contrátil que fornece tempo hábil para os espermatozoides se maturarem (Kempinas et al., 1998a).

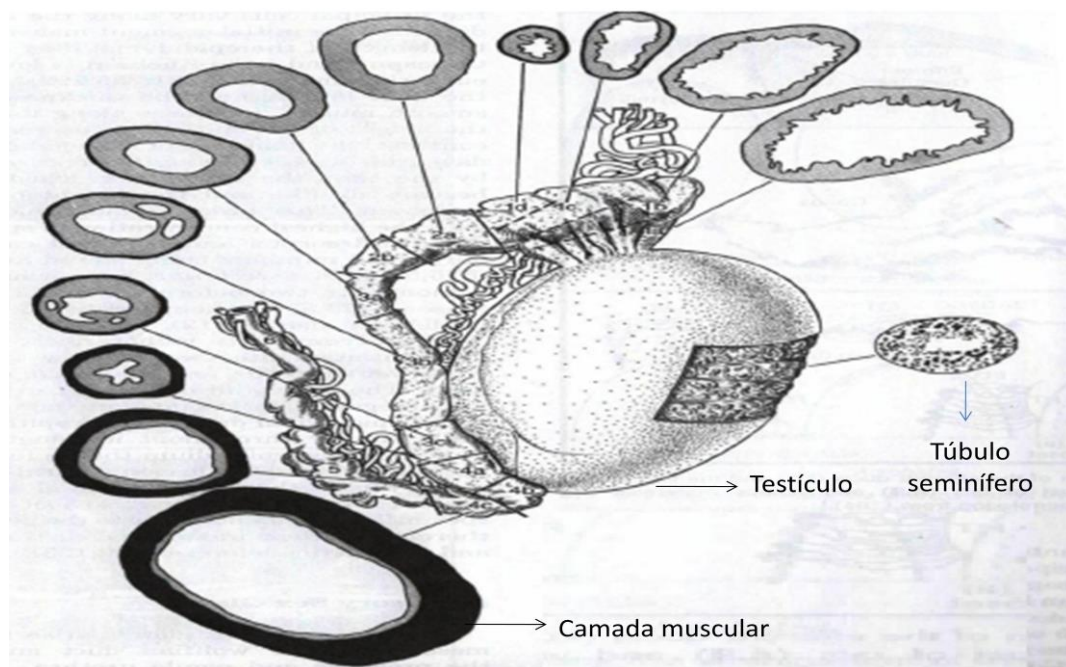


Figura 4. Esquema mostrando as diferenças de espessura da camada muscular entre as diversas porções do ducto epididimário. Modificado de (Azhar S, 2007).

1.3. Ducto deferente

O ducto deferente é um ducto muscular que sai da cauda do epidídimo, cuja função é levar o espermatozoide do epidídimo para a uretra e, através da secreção de seu epitélio,

contribuir para formação do meio que acompanha o espermatozoide durante seu trânsito. Sua principal função é transportar os espermatozoides e terminar o processo de maturação espermática (Dixon et al., 1998). Caracteriza-se por uma mucosa coberta por epitélio colunar com estereocílios, lúmen estreito e espessa camada de músculo liso que sofre fortes contrações para expulsão do sêmen durante a ejaculação (Junqueira, 2008).

1.4. Vesícula seminal

A vesícula seminal consiste em um único ducto dilatado e enovelado (Figura 5), revestido por epitélio pseudo-estratificado altamente pregueado rico em grânulos de secreção (Hayward et al., 1996a). Este epitélio secretor é constituído por uma fileira de células basais arredondadas e uma camada de células epiteliais colunares secretoras, que contém numerosos grânulos de secreção de coloração amarelada (Johnson, 1997). Sua secreção contém frutose, citrato e várias proteínas importantes para a nutrição do espermatozoide; os carboidratos secretados no líquido seminal constituem fonte energética para a motilidade espermática. Durante a ejaculação, a vesícula seminal se contrai para expulsão de seu conteúdo no ducto ejaculatório, e isso ocorre ao mesmo tempo em que o ducto deferente despeja seus espermatozoides (Guyton, 2006). Por ser um órgão andrógeno-dependente, a altura das células epiteliais e sua atividade secretora são dependentes dos níveis de testosterona circulante (Kierszenbaum, 2008, Junqueira, 2008).

1.5. Próstata

A próstata de roedores é uma glândula sexual acessória masculina, com aspecto multilobulado e situada ao redor da bexiga urinária (Figura 5). Essa glândula apresenta importante papel na fisiologia reprodutiva, uma vez que sua principal função é produzir uma secreção de natureza alcalina que compõe o fluído seminal. Essa secreção é essencial para a motilidade e fertilidade dos espermatozoides (Marker et al., 2003, Risbridger, 2006). É dividida em lobos classificados como ventral, dorsal e lateral, de acordo com a distribuição ao redor da uretra prostática, além do lobo anterior ou glândula de coagulação, situado na parte côncava da vesícula seminal, os quais apresentam características

histológicas, morfológicas, de expressão protéica e de síntese de DNA diferenciadas (Cunha et al., 2004).

A próstata é dividida em dois compartimentos extremamente diferenciados entre si: epitelial glandular e estroma fibromuscular. O compartimento epitelial é composto por epitélio cubóide a colunar secretor, com células neuroendócrinas e basais, organizadas em ácinos glandulares que secretam para o espaço interluminal. Já o compartimento estromal possui células estromais, vasos sanguíneos, nervos e células do sistema imune como macrófagos e linfócitos. Há ainda a presença de fibroblastos, principal tipo celular presente, responsável por sintetizar a matriz extracelular, uma rede de proteínas fibrilares, glicoproteínas e proteoglicanos (Kreis, 1999), e moléculas regulatórias, como fatores de crescimento, e enzimas que agem coordenadamente, regulando a fisiologia celular e mantendo a homeostase (Tuxhorn et al., 2001).

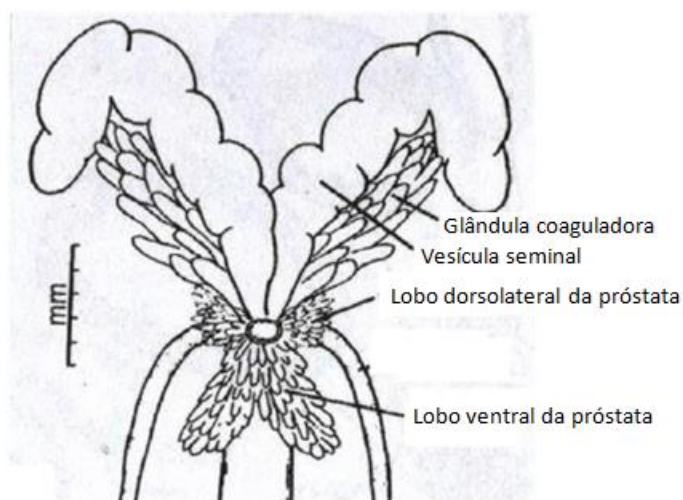


Figura 5. Esquema mostrando vesícula seminal e próstata de um roedor. Fonte desconhecida.

2. *Trióxido de arsênio*

O arsênio (As) é um metal pesado distribuído por toda a crosta terrestre, solo, sedimentos, água, ar e organismos vivos. Assim sendo, a exposição natural a este metal torna-se inevitável, caracterizando-o como um contaminante ambiental, com efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos já descritos (Mandal and Suzuki, 2002). Esse metal ocorre em dois estados de oxidação: a forma trivalente, o trióxido de arsênio ou arsenito (As_2O_3) e a forma pentavalente, o arsenato (As_2O_5), sendo que o primeiro é 60 vezes mais tóxico do que o segundo (Ratnaike, 2003). Apesar do perigo de envenenamento, compostos a base de arsênio são de interesse a mais de 2.400 anos por apresentar também efeitos terapêuticos no tratamento de úlceras, doenças de pele e até mesmo sífilis (Kritharis et al., 2013).

2.1. *Eficácia no tratamento da leucemia*

Embora o As seja carcinogênico, uma vez que a exposição pode levar ao desenvolvimento de câncer de pescoço, pele e rim, seu uso tem se mostrado paradoxal. Isso porque, na década de 90, pesquisadores chineses descobriram que injeções intravenosas de uma solução contendo As_2O_3 poderiam ser usadas no tratamento de um tipo de câncer, a leucemia promielocítica aguda (LPA), uma forma rara de leucemia, associada a uma anormalidade genética específica identificada como anemia mielóide aguda (AML) pela classificação da French-American-British (FAB). Citogeneticamente, a LPA é caracterizada por um deslocamento recíproco entre os cromossomos 15 e 17, como resultado da fusão entre o gene da leucemia promielocítica (PML) e receptores α do ácido retinóico ($\text{RAR}\alpha$), resultando no gene PML- $\text{RAR}\alpha$ (Figura 6) (Yoshino et al., 2009). O tratamento usual da LPA se dava, até então, com ácido transretinótico (ATRA) e antraciclinas, no qual se obtinha taxa de remissão completa em até 90% dos pacientes; entretanto, havia uma considerável proporção de pacientes que apresentavam reincidência da doença. Assim, o As_2O_3 se mostrou efetivo no tratamento de pacientes com LPA recidiva (Hu, 2011). Um dos casos mais expressivos descritos na literatura relata que em um estudo com 72 pacientes, 62 deles foram curados da doença tratando-se apenas com o agente As_2O_3 ; os pacientes recebiam a droga por um período de no máximo 60-75 dias, até que a remissão

completa fosse atingida. Depois de um intervalo de um mês, a droga era novamente administrada pelo período de quatro semanas, em uma terapia denominada Consolidação (Mathews et al., 2006). Muitos outros estudos comprovaram que o As_2O_3 é capaz de promover não só a remissão da doença, mas também a sobrevivência em longo prazo de mais de 90% dos pacientes tratados, além de ser bem menos tóxico que outras quimioterapias convencionais (Soignet et al., 1998, Chiou et al., 2008, Kritharis et al., 2013).

Devido à sua eficácia, em 2000, o As_2O_3 foi aprovado pela US Food & Drug Administration (FDA) para uso no tratamento da LPA (Anonymous, 2001). Seu mecanismo de ação antitumoral se dá através da degradação da proteína resultante do gene fusionado PML-RAR α pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) formadas, o que leva à diferenciação e apoptose das células leucêmicas (Powell et al., 2010). Além disso, (Zheng et al., 2005) mostrou que o tratamento com As_2O_3 causa mudanças conformacionais que ativam a proteína Bax, uma proteína pro-apoptótica que regula a iniciação da apoptose. Sua ativação requer estresse oxidativo intracelular, causado pela geração de ERO, sugerindo que a ação antitumoral do As_2O_3 está relacionada ao aumento na produção dessas moléculas (Zheng et al., 2005). Entretanto, a promoção de apoptose não está limitada às células leucêmicas.

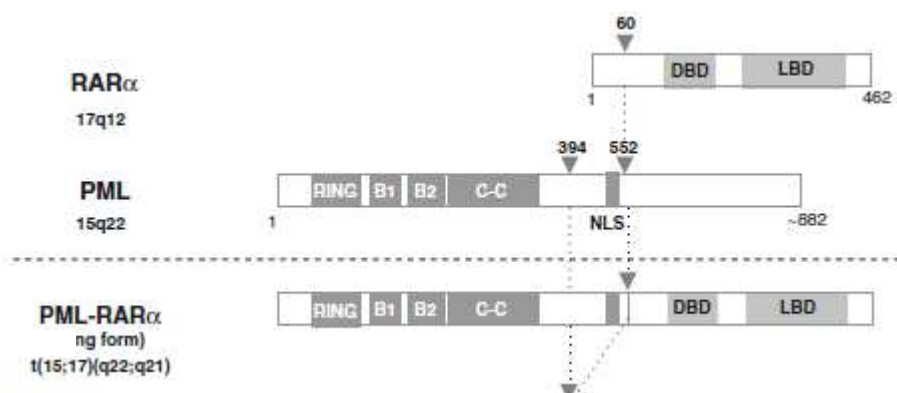


Figura 6. Representação esquemática da fusão dos genes PML e RAR α na leucemia promielocítica aguda (Tomita et al., 2013).

2.2. Efeitos adversos

Apesar da sua eficácia no tratamento de diversas patologias, a exposição aguda, crônica ou mesmo farmacológica ao arsênio pode resultar em muitos efeitos adversos secundários. A exposição aguda ao arsênio pode ocasionar cardiomiopatias, falências renal e respiratória bem como edema pulmonar, enquanto que a exposição crônica pode levar ao desenvolvimento de diabetes, hiperglicemia, hepatomegalia e cirrose. Já a exposição a doses farmacológicas pode resultar no aparecimento de encefalopatias, neutropenia e taquicardias (Kritharis et al., 2013).

A exposição ao As inorgânico, em doses ambientalmente relevantes, está diretamente relacionada com a infertilidade em homens, sendo que os indivíduos expostos apresentam menor quantidade de espermatozoides viáveis (Meeker et al., 2010). Estudos mostraram que a exposição ao As_2O_3 está associada à espermatoxicidade, inibição da androgênese testicular e redução do peso dos testículos e das glândulas sexuais acessórias (Pant et al., 2004, Sarkar et al., 2003). Além disso, (Jana et al., 2006) demonstrou uma ação inibitória sobre o testículo e danos sobre o eixo hipotálamo-hipofisário, levando à diminuição na concentração plasmática do hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), com conseqüente prejuízo da estrutura e função testicular normal, tanto do ponto de vista da produção de testosterona pelas células de Leydig quanto da própria espermatogênese em ratos.

(Chiou et al., 2008) realizaram um experimento em camundongos administrando As_2O_3 por um período de três semanas. Os autores reportaram alta toxicidade causada pelo composto inorgânico sobre o sistema genital masculino, evidenciada pela redução de motilidade, viabilidade espermática e número de espermatozoides na cauda epididimária. A diminuição dos níveis de testosterona plasmática e intratesticular podem indicar alterações na espermatogênese e esteroidogênese, tendo como alvo as células germinativas masculinas.

A literatura apresenta alguns trabalhos a respeito dos efeitos adversos no sistema genital masculino promovidos pelo tratamento com As_2O_3 , mostrando sua capacidade de inibir a espermatogênese e a esteroidogênese. Entretanto, faltam dados sobre a possível reversibilidade dos efeitos, ou seja, se a reprodução desses indivíduos continua afetada

mesmo após o término do tratamento. Ainda, novas estratégias para prevenir ou atenuar os efeitos adversos da droga são necessários, a fim de melhorar a qualidade de vida dos indivíduos em tratamento da LPA.

3. *Estresse oxidativo induzido pelo As₂O₃*

Nas células do câncer, os níveis de ERO inerentes estão aumentados, tornando-as altamente susceptíveis a apoptose. Assim, a eficácia do tratamento com As₂O₃ está relacionada ao estresse oxidativo, visto que substâncias que aumentem ainda mais os níveis dessas moléculas possuem ação pró-apoptótica antitumoral (Gao et al., 2004). Entretanto, esse estresse é gerado também nas células normais, sendo uma das principais causas da toxicidade reprodutiva do As₂O₃.

O mecanismo de ação pelo qual o As₂O₃ leva ao estresse oxidativo é através da diminuição do potencial de membrana mitocondrial, o que resulta em aumento na liberação de ERO por essa organela. Em condições fisiológicas, as ERO são continuamente formadas pela cadeia respiratória mitocondrial, uma vez que são fundamentais no metabolismo celular; quando elas aumentam acima dos níveis normais, as células valem-se de um eficiente sistema antioxidante composto principalmente de enzimas como a superóxido desmutase, glutathione peroxidase e catalase, responsáveis pela detoxificação das ERO em excesso, mantendo-as estáveis (Gao et al., 2004). Entretanto, a exposição crônica ao As₂O₃ também é capaz de inibir o funcionamento dessas enzimas, o que leva à desregulação do balanço pró e antioxidante da célula (Figura 7) (Emadi and Gore, 2010, Flora, 2011).

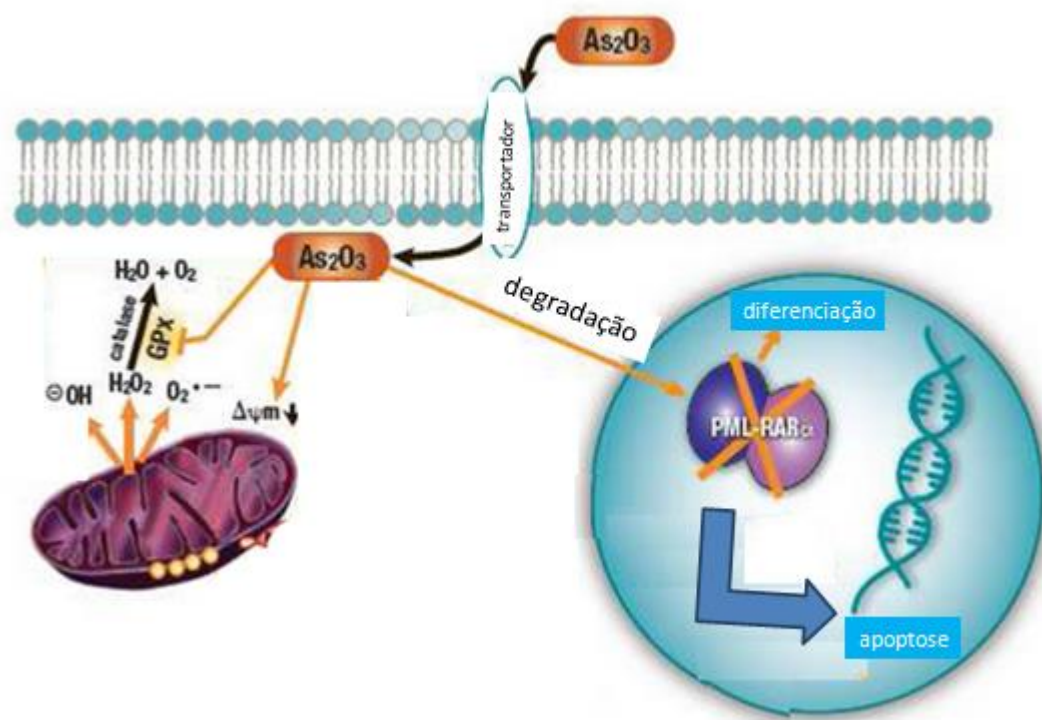


Figura 7. Mecanismo de ação do As_2O_3 . À esquerda, o aumento da liberação de ERO a partir da mitocôndria e a inibição das enzimas antioxidantes. À direita, degradação da proteína resultante do gene fusionado PML-RAR α no núcleo da célula leucêmica, levando-a a apoptose. Adaptado de (Emadi and Gore, 2010).

4. *Estresse oxidativo e o sistema genital masculino*

O estresse oxidativo tem papel importante na etiologia da infertilidade masculina, sendo reconhecido como uma de suas principais causas. As ERO são essenciais para o funcionamento do sistema genital masculino, visto que em baixas concentrações são fundamentais tanto à capacitação e hiperativação espermática quanto à fusão do espermatozoide ao oócito (de Lamirande and O'Flaherty, 2008, Rivlin et al., 2004). Entretanto em altas concentrações pode ter efeitos deletérios, afetando negativamente a qualidade espermática devido à indução de modificações químicas e estruturais ao DNA e membrana lipídica da célula germinativa (Benedetti et al., 2012).

Khosrowbeygi and Zarghami (2007), em um estudo com amostras espermáticas de humanos, mostraram que a peroxidação lipídica, que apresenta correlação positiva com os níveis de estresse oxidativo, é maior em espermatozoides com alguma anormalidade morfológica. Essa peroxidação de lipídeos acontece porque a membrana plasmática do espermatozoide é altamente vulnerável a ação de ERO, principalmente devido à sua composição predominante de ácidos graxos poliinsaturados (Aksoy et al., 2006). A modificação da fluidez da membrana pode afetar processos importantes como a motilidade espermática e a fertilização do oócito (Benedetti et al., 2012).

O estresse oxidativo também está relacionado a baixas taxas de fertilização, desenvolvimento embrionário deficiente, perdas gestacionais e defeitos ao nascimento devido aos danos causados ao DNA mitocondrial e nuclear do espermatozoide (Aitken and Baker, 2006, Aitken and De Iuliis, 2010)

5. Antioxidantes na prevenção de danos do estresse oxidativo

Os testículos apresentam um elaborado sistema antioxidante que garante que a espermatogênese e a estereidogênese não sejam impactadas pela geração de espécies reativas. Essa defesa é de extrema importância, uma vez que os danos oxidativos são a maior causa de função testicular prejudicada (Aitken and Roman, 2008).

Além dessas enzimas, os testículos apresentam pequenos fatores para sua proteção. São moléculas de baixo peso molecular como íons e radicais livres (e.g. zinco, vitaminas C e E, citocromo C). O zinco participa da formação de enzimas detoxificantes como a superóxido desmutase e também da proteção do grupo sulfidril de proteínas, além de impedir a peroxidação lipídica (Bray and Bettger, 1990). Sabe-se que a vitamina E é vital para a manutenção da espermatogênese em mamíferos devido ao seu alto poder antioxidante, e está presente em altas concentrações nas células de Sertoli, espermatócitos e espermátides (Johnson, 1979). O papel da vitamina C está relacionado à vitamina E; ela contribui para a manutenção da espermatogênese na medida em que mantém a vitamina E em seu estado ativo. Deficiências nessas vitaminas levam ao estresse oxidativo que pode

desregular tanto a espermatogênese quanto à produção de testosterona (Paolicchi et al., 1996, Johnson, 1979).

Apesar da presença dessas enzimas e fatores, o sistema genital pode necessitar de proteção antioxidante adicional, visto que os espermatozoides são mais vulneráveis ao estresse oxidativo por perder grande parte do seu citoplasma no processo de citodiferenciação que ocorre durante a espermiogênese, mantendo apenas uma pequena quantidade de enzimas e moléculas detoxificantes (Aitken and Sawyer, 2003). Assim, grande atenção tem sido dada ao estudo do poder antioxidante de algumas substâncias, como resveratrol, dexpantenol, carnitina e N-acetilcisteína. Na busca de resultados positivos, esses antioxidantes têm sido administrados a homens inférteis na esperança de se obter melhorias na qualidade espermática desses indivíduos.

A N-acetilcisteína (NAC) (Figura 8) é um composto a base de tiol tem sido amplamente usada para atenuar condições de estresse oxidativo há 40 anos, visto que apresenta importante papel na proteção de constituintes celulares. A suplementação com esse antioxidante tem se mostrado um método eficaz na contenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (Atkuri et al., 2007). Sua ação antioxidante deriva da habilidade em estimular e sustentar os níveis intracelulares de glutathione pela suplementação do aminoácido cisteína, utilizado na síntese da principal enzima de detoxificação das ERO. Além disso, é eficiente na quelação de metais tóxicos, e apresenta propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas (Reddy et al., 2011, Moldeus and Cotgreave, 1994). Estudos mostraram que, após infusão intravenosa de 200 mg de NAC, o pico plasmático decai rapidamente, atingindo metade da concentração em 40 minutos. Entretanto, a aplicação oral de mesma dose, detecta-se a NAC oxidada após 3 horas da ingestão (Moldeus and Cotgreave, 1994). Além disso, a administração oral de até 8000 mg/kg não parece causar efeitos adversos significativos (De Rosa et al., 2000).

Essa substância tem sido usada ainda no tratamento de várias patologias como imunodeficiência adquirida (AIDS), fibrose cística, e doença obstrutiva do pulmão (Atkuri et al., 2007). Santra et al. (2007) mostraram que injúrias no fígado decorrentes do estresse oxidativo causado pela exposição ao arsênio foram suprimidas quando esses animais receberam pré-tratamento com NAC.

Considerando-se que os efeitos tóxicos dos compostos de arsênio no sistema genital devem-se, pelo menos em parte, a danos causados pelo estresse oxidativo, e que a NAC possui a forte habilidade em restaurar o equilíbrio pró e antioxidante da célula, torna-se interessante estudar se a suplementação com esse antioxidante é capaz de suprimir os efeitos deletérios do As_2O_3 em pacientes sob tratamento da LPA.

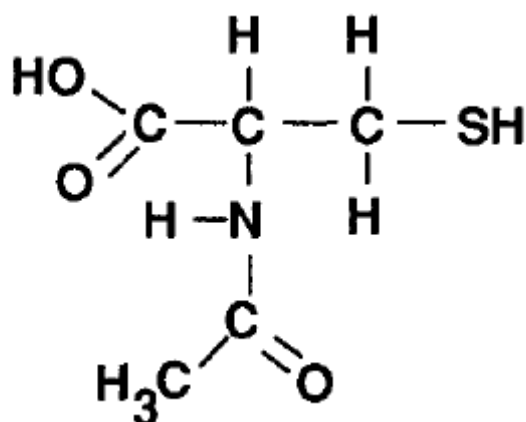


Figura 7. Estrutura química da N-acetilcisteína. (Moldeus and Cotgreave, 1994)

Justificativa

Diante da crescente utilização do As_2O_3 como uma terapia alternativa para o tratamento da leucemia promielocítica aguda e da escassez de resultados sobre os seus efeitos adversos sobre a reprodução masculina, justificou-se a realização do presente estudo, pelo qual avaliou-se os efeitos da droga sobre o sistema genital masculino de camundongos expostos na idade adulta. Espera-se que, através dos resultados experimentais obtidos seja possível contribuir para um melhor esclarecimento sobre os impactos do As_2O_3 sobre a reprodução, melhorando a qualidade de vida dos usuários do As_2O_3 como quimioterapia alternativa no tratamento da LPA.

Objetivos

O objetivo fundamental do projeto foi analisar parâmetros de qualidade espermática de camundongos Swiss expostos ao As_2O_3 durante a idade adulta.

Os objetivos específicos foram:

- Investigar os efeitos da droga no sistema genital masculino logo após o término do período de tratamento de 5 semanas.
- Investigar se os efeitos da droga foram persistentes mesmo após suspensão do tratamento por 50 dias.
- Investigar se o As_2O_3 é capaz de alterar a contratilidade do ducto epididimário.
- Investigar se a administração do antioxidante N-acetilcisteína seria capaz de prevenir os efeitos causados pela droga no sistema genital.

Para o cumprimento dos objetivos foram investigados parâmetros como peso dos órgãos vitais, reprodutores e glândulas sexuais acessórias, análises espermáticas (produção, motilidade e morfologia espermáticas), dosagem de testosterona no soro, dosagem de arsênio no sangue e contratilidade do ducto epididimário isolado.

Manuscrito

Esse trabalho deu origem ao manuscrito “**THE CO-ADMINISTRATION OF N-ACETYL CYSTEINE BLOCKS THE EFFECTS OF ARSENIC TRIOXIDE ON THE MALE MOUSE GENITAL SYSTEM**”

THE CO-ADMINISTRATION OF N-ACETYLCYSTEINE BLOCKS THE EFFECTS OF ARSENIC TRIOXIDE ON THE MALE MOUSE GENITAL SYSTEM¹

Running Title: N-acetylcysteine prevents male reproductive toxicity of arsenic trioxide

Summary sentence: The harmful effects of arsenic trioxide on Swiss male mice genital system are prevented by the co-administration of N-acetylcysteine

Keywords: arsenic trioxide, N-acetylcysteine, antioxidants, genital system, male mice.

Raquel Frenedoso da Silva^{1*}; Cibele dos Santos Borges¹; Patrícia Villela e Silva¹; Gabriela Missassi¹; Luiz Ricardo de Almeida Kiguti²; André Sampaio Pupo²; Fernando Barbosa Junior³; Janete Aparecida Anselmo Franci⁴, Wilma De Grava Kempinas².

Departments of ¹Morphology and ²Pharmacology, Institute of Biosciences, UNESP – Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil.

³Department of Clinical Analyses, Toxicology and Food Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, USP - University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

⁴Department of Morphology, Stomatology, and Physiology, School of Dentistry, USP – University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

*Graduate Program in Cell and Structural Biology, UNICAMP – University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

¹ This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Grant #2012/14342-8

²Correspondence to: Wilma De Grava Kempinas
Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências – UNESP
Caixa Postal 510, 18618-970 Botucatu, SP, Brasil
Tel.: +55 14 3880-0476
E-mail: kempinas@ibb.unesp.br

ABSTRACT

Arsenic trioxide (As_2O_3) has been shown effective in the treatment of acute leukemia, leading to remission of the disease in most patients. The efficiency is due to its apoptosis-inducing activity in cancer cells. However, As_2O_3 can induce apoptosis in germ cells, thus associating it with reproductive toxicity. Since the toxicity of As_2O_3 is closely related to generation of reactive oxygen species, remediation with N-acetylcysteine (NAC) may mitigate the side effects caused by exposure. This study aimed to assess the effects of As_2O_3 on the Swiss male mouse genital system and its potential reversibility after cessation of exposure or co-administration of NAC. Animals were treated with 0, 0.3 or 3.0 mg/Kg/day of As_2O_3 subcutaneously and 40mM of NAC in tap water. Analysis of sperm counts and quality revealed that As_2O_3 impaired spermatogenesis and sperm motility besides decreasing seminal vesicle weight and testosterone serum levels; after suspension of treatment, these parameters remained altered. Epididymal duct contractility was increased in As_2O_3 -treated animals. However, when NAC was given to these animals, there was a significant improvement in sperm parameters and seminal vesicle weight before being harmed by the drug. We concluded that the chemotherapeutic agent As_2O_3 is toxic to the male mouse genital system by compromising sperm quality and quantity, and that these effects persisted even after suspension of the treatment. Furthermore, the co-administration of an antioxidant substance such as NAC prevents the harmful effects of the drug on the male genital system.

1. INTRODUCTION

Arsenic is a heavy metal that is widespread in the soil, water, air and organisms. The consequent inevitability of natural exposure to this metal, characterizes it as an environmental contaminant with known carcinogenic, mutagenic and teratogenic effects
25 (Mandal and Suzuki, 2002). This metal occurs in two oxidation states: the trivalent form – arsenic trioxide or arsenite (As_2O_3) and the quinquivalent form – arsenate (As_2O_5), with the former state being 60 times more toxic than the latter (Ratnaike, 2003).

In 1970, a research group from China found that intravenous injections of a solution containing As_2O_3 could be used in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL),
30 and are able to promote complete disease remission in over 60% of the cases (Chen, 1997). Ever since, several studies have confirmed its role in complete remission induction in over 80% of leukemia patients undergoing treatment (Soignet et al., 1998, Soignet et al., 2001, Mathews et al., 2006, Mathews et al., 2011, Lin et al., 2013).

The drug acts through differentiation induction and programmed cell death of
35 malignant cells (Lorenzo et al., 1999). Despite its efficiency in the treatment of leukemia, As_2O_3 can be toxic for the male genital system, since it can cause apoptosis in germ cells. Studies showed that As_2O_3 can induce Sertoli cells apoptosis and decrease testosterone levels and sperm motility (Chiou et al., 2008, Kim et al., 2011). However, it is unknown whether these effects on the genital system remain when exposure ends.

40 N-acetylcysteine (NAC) is an antioxidant substance that plays an important role in the protection of cell constituents from oxidative stress. Since the toxicity of As_2O_3 is closely related to the generation of reactive oxygen species (ROS), a process that leads to

lipid peroxidation and DNA damage in exposed cells (Cobo and Castineira, 1997) remediation with NAC can mitigate the side effects caused by the drug.

45 To identify the adverse effects of As₂O₃ and its possible reversibility, experiments conducted on laboratory animals are required. Thus, the present study aimed to assess the effects of As₂O₃ on the Swiss male mouse genital system and its potential reversibility after either the cessation of exposure or co-administration of NAC.

50 2. **MATERIAL AND METHODS**

Animals

Swiss male mice (70 days old, weighting 30-40g) were supplied by the Multidisciplinary Center for Biological Investigation, State University of Campinas. Animals were kept in a controlled environment with temperature at 25°C, humidity of 55 ±
55 5 %; 12-h light/dark cycle (lights on 7:00 a.m.) and had free access to regular lab chow and tap water. The experimental procedures were approved by the Ethics Committee for the Use of Experimental Animals from UNESP Botucatu (protocol number 429-CEUA), and are in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health). The study was conducted in three steps: Experiment 1, 2 and 3,
60 described as follows.

Drugs and solutions

As₂O₃ was obtained from Acros (1327-53-3, Arsenic (III) Oxide, 99.5%), N-Acetyl-L-cysteine, Norepinephrine (NE) (NE bitartrate salt monohydrate) and Carbacol (CCh) (Carbamoylcholine chloride) from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.

Experiment 1. Assessment of As₂O₃ effects in male genital system and its reversibility after a recovery period

Animals were randomly allocated into three experimental groups: control group, treated with distilled water, and treated groups that received 0.3 and 3.0 mg/Kg/day of As₂O₃ (n=20/group), subcutaneously, in 25 applications, administered 5 days per week, followed by 2 days of interruption, repeated by 5 weeks. Treatment regimen and dose selection were based on consolidation therapy used for humans. According to Soignet (Soignet et al., 1998) As₂O₃ is effective in APL treatment at doses of 0.06 to 0.2 mg/Kg and above this dose did not note a difference in effectiveness. Since there is a correspondence between the appropriate doses for humans and that used in animal studies, it is necessary to use a normalization based on body surface area (BSA) proposed by Reagan-Shaw (Reagan-Shaw et al., 2008). The higher dose proposed in this study is equivalent to a dose of 0.2 mg/Kg for humans and the lower its tenth.

After the last administration of As₂O₃, animals from control and treated groups (10 animals per group, 105 days old) were weighted and euthanized by cervical dislocation to evaluate the immediate effects of the treatment on male genital system. Furthermore, 10 animals of each group were kept without treatment for a period of 50 days, corresponding approximately to the time of spermatogenesis and sperm transit through epididymis (Franca

85 et al., 2005). After this period, 155 days old animals were euthanized in order to assess the potential reversibility of the drug effects.

Organ weights

Immediately after the euthanasia, kidney, liver, adrenal, testis, epididymis, ventral
90 prostate and seminal vesicle (without the coagulating gland) were removed and had their wet weights (absolute and relative to body weight) measured.

Testosterone measurement

After euthanasia, blood was collected by cardiac puncture (between 9:00 and
95 11:30 AM) and serum was obtained by centrifugation (1236xg, for 20 min at 4 °C). The concentrations of testosterone were determined by the technique of double antibody radioimmunoassay. Testosterone assay was performed using a TESTOSTERONE MAIA[®] kit (Biochem Immuno System).

100 Arsenic measurements in blood

For the determination of arsenic in whole blood, mass spectrometry coupled plasma (ICP-MS) was used. Reagents and solutions: high-purity deionized water (resistivity 18.2 MW.cm) obtained by the Milli-Q system (Millipore[®]) was used throughout the analysis. Nitric acid was distilled at a temperature lower than the boiling, using quartz retort Körner
105 Analysentechnik to eliminate impurities. All solutions were stored in polyethylene bottles. Plastic bottles, auto sampler cups and glassware was immersed in a solution containing 20% v/v HNO₃ for 24 h, washed five times with Milli-Q water and dried in a laminar flow

class 100. All operations for the preparation of standard solutions of arsenic were held in clean room class 10000. The stock solution each containing 1.0g/L (Perkin -Elmer, Inc.)
110 standardized by "National Institutes of Standards and Technology" (NIST) was used.

Sperm motility and morphology

Sperm were obtained from the right vas deferens and immediately diluted in 0.3 ml modified HTF medium (Human Tubular Fluid, Irvine Scientific), pre-warmed to 34°C.
115 Then an aliquot of 10 µl of the diluted sperm was placed in a Makler chamber (Irvine, Israel) and analyzed under a light microscope at 400x magnification. One hundred sperm were evaluated per animal and classified for motility into type A, motile with progressive trajectory; type B, motile with non-progressive trajectory; or type C, immotile. For morphology assay, sperm were removed from the left vas deferens by internal rinsing with
120 1 ml formol-saline solution with the aid of a syringe and needle. Smears were prepared on histological slides that were left to dry for 90 min and observed in a phase-contrast microscope (400x magnification) (Seed et al., 1996). Two hundred spermatozoa were analyzed per animal, and morphological abnormalities were classified into two general categories: head morphology and tail (Filler, 1993). Sperm were also classified as to the
125 presence or absence of the cytoplasmic droplet.

Daily sperm production per testis

The right testis was used for sperm counts. Homogenization-resistant testicular spermatids (stage 16 of spermiogenesis) in the testis were counted as described previously
130 (Robb et al., 1978). Briefly, the testis was decapsulated, weighed soon after collection and

homogenized in 5 ml NaCl 0.9% containing Triton x100 at 0.5%, followed by sonication for 30s. After a 10-fold dilution, one sample was transferred to Neubauer chambers (four fields per animal), and late spermatids were counted. To calculate the daily sperm production (DSP), the number of homogenization resistant spermatids was divided by 4.84, 135 the number of days that these spermatids are present in the seminiferous epithelium.

Experiment 2. Pharmacological assay

At this step, it was evaluated the contractility of epididymal duct both *in vivo* treated animals and *in vitro* As₂O₃ exposed.

140

In vitro tension of the isolated epididymal duct of animals treated with vehicle and As₂O₃.

CE duct was used for evaluation of the effects of *in vivo* treatment with As₂O₃ on the tension. After completion of treatment male mice were euthanized by cervical dislocation and the left epididymis was isolated. The epididymal duct from the distal cauda 145 was uncoiled with scissors and the luminal contents were washed with nutrient solution (composition below). A CE duct segment of approximately 1.0 cm length was isolated and attached to FORT10 isometric force transducer (WPI, USA) connected to Transbridge 4M Transducer Amplifier (WPI, USA) to record of isometric tension development in a PC based System (MP100, Biopac System INC., USA) and analyzed off-line using 150 AcqKnowledge version 3.5.7 software (Biopac System INC., USA) (please see Supplemental Figure S1). CE duct were mounted under a 0.5g resting tension and maintained in a modified Tyrode's solution of following composition (mM): NaCl 138; KCl 5.7; CaCl₂ 1.8; NaH₂PO₄0.36; NaHCO₃ 15; dextrose 5.5, prepared in glass-distilled

de-ionised water, pH 7.4, maintained at 30°C and continuously bubbled with
155 95%O₂/5%CO₂. After mounting, a 30 minutes stabilization period was allowed.

After the stabilization period the tension developed to 80mM KCl was evaluated
twice at 30 minutes interval to ascertain tissue viability. The tension of CE duct from each
mice developed to 80mM KCl, NE (10⁻⁸M – 10⁻⁴M) and to the muscarinic receptor agonist
CCh (10⁻⁶M – 10⁻³M) were recorded. The maximal tension developed (Emax, in grams of
160 tension, g) and the potency of NE and CCh in inducing tension of epididymal duct
(expressed as pEC₅₀ the –log of NE and CCh concentration inducing 50% of maximal
tension) were evaluated.

In vitro tension of the isolated epididymal duct of untreated animals exposed to arsenic
165 *trioxide in vitro*

Untreated mice were killed by cervical dislocation, both epididymides were
collected and the distal CE duct (1 segment per epididymis) was isolated and mounted as
described above. From the same animal one CE duct was exposed to As₂O₃ and the other
was maintained as the untreated control (without drug exposure). Treated CE duct were
170 exposed to a single As₂O₃ concentration (10 or 100uM) for 45minutes or 2 hours and then a
cumulative concentration-response curve to NE (10⁻⁸M – 10⁻⁴M) was obtained. Control
tissues were maintained untreated for the same time period as the treated CE ducts and then
a concentration-response curve to NE was obtained. The maximal tension and the pEC₅₀
induced by NE were evaluated.

175

Experiment 3. Co-administration of As₂O₃ and antioxidant NAC

In this step of experiment, Swiss male mice (70 days old) were divided into four groups (n=8 per group): Control group, treated with distilled water; As₂O₃ group, that received 3.0mg/Kg/day of As₂O₃; NAC group, that received 40 mM of NAC on tap water (Sablina et al., 2005) and As₂O₃+ NAC group, that received the same treatment than the last two groups. Animals were treated as previously described. At the end of treatment, they were weighted and euthanized by cervical dislocation for evaluation of the NAC antioxidant potential on parameters before affected by exposure to As₂O₃, i.e. seminal vesicle weight, sperm motility assay and testis for sperm counts and determination of DSP, following the methodology described above.

Statistical analysis

Data are presented as mean $\pm$ Standard Error of Mean (SEM) or median and interquartile range. ANOVA test followed by Tukey or Newman Keuls were used for comparison of parametric variables. Nonparametric variables were compared by Kruskal-Wallis followed by Dunns test. Differences were considered significant when $p < 0.05$. The statistical analyses were performed by GraphPadPrism (version 5.0).

3. RESULTS

Experiment 1

Body weight gain was similar among experimental groups. However, at the end of treatment, absolute and relative full seminal vesicle weights were significantly decreased in the group treated with 3.0mg/Kg/day of As₂O₃ (Table 1). After the recovery period, this

same group showed increased liver and kidney weights and continued to show reduced full
200 seminal vesicle weight (Table 2).

Assessment of sperm quality revealed statistically significant reduction in type A
sperm in highest dose treated group; consequently, the percentage of type B sperm and type
C sperm were significantly increased. After suspension of treatment, this group continued
presenting reduction in type A sperm and increased in type B sperm (Figure 1). Sperm
205 morphology evaluation showed that the percentages of abnormal and normal sperm were
similar among experimental groups and these results remained after period without drug
exposure (data not shown). Furthermore, evaluation of sperm counts both after the
treatment and after recovery period showed that treatment with 3.0mg/Kg/day of As₂O₃
reduced testicular sperm counts and DSP (Table 3).

210 On 105 days old arsenic blood levels ($\mu\text{g/L}$, mean $\pm$ SEM, ANOVA followed by
Tukey test) were 16.02% and 109.94% higher than in the control group (n=9) in the As₂O₃-
treated groups (0.3 mg/Kg/day, n=10: 10.50 ± 1.17 , $p>0.05$; 3.0 mg/Kg/day, n=9: $19.00 \pm$
2.18, $p<0.05$). After the suspension of the treatment, on 155 days old (n=10 per group),
blood arsenic concentration in the treated groups was comparable to the control group (data
215 not shown).

The hormonal dosages revealed that testosterone levels were diminished in the
highest dose treated group, a condition that remained even after suspension of treatment
(Figure 2).

220 **Experiment 2**

The tensions developed by NE or CCh are shown in Table 4. As noted, the pEC50 of NE and CCh induced tension of the epididymal duct was similar among groups. However, maximal tension (Emax) of epididymal duct induced by NE was significantly increased in As₂O₃ group when compared to control group. Furthermore, tension developed by 80mM KCl was increased in this same group compared to control (Figure 3).

In vitro incubation of epididymal duct with 10 or 100 µM of As₂O₃ for 45 minutes or 2 hours does not change the potency and the maximal tension induced by NE (Figure 4).

Experiment 3

As previously noted, treatment with As₂O₃ decreased absolute and relative weights of full seminal vesicle, which was restored by the administration of NAC (Figure 5A). In the same manner, assessment of sperm motility revealed decreased percentage of motile sperm and increased percentage of non-progressive and immotile sperm in As₂O₃-treated group; on the other hand, group treated with both As₂O₃ and NAC showed lack of statistical difference in sperm motility when compared to control group (Figures 5B, 5C and 5D).

As₂O₃ treatment also impaired DSP, as previously showed in this study. However, administration of NAC to As₂O₃ treated animals was able to restore sperm production, since this group presented DSP similar to control group (Table 5).

4. DISCUSSION

ROS are generated continuously and in small amounts in normal cells, since they are essential for many biological functions (Moncada et al., 1991, Suzuki YJ, 1997).

However, these inherent ROS levels are elevated in cancer cells, which become highly
245 susceptible to apoptosis. Thus, As₂O₃ treatment of APL has been shown effective due to
increased ROS production in these cells, leading to oxidative stress that can trigger
conformational changes in Bax protein, a pro-apoptotic member of the Bcl-2 family,
responsible for regulating the initiation of apoptosis. Then, Bax is translocated from cytosol
to mitochondria, where it initiates the apoptotic cascade in leukemic cells (Zheng et al.,
250 2005). Thus, the antitumor action of As₂O₃ has been linked to the induction of apoptosis of
tumor cells (Yi et al., 2002).

Despite its effectiveness, exposure to As₂O₃ can cause apoptosis of normal cells,
since chronic exposure, besides increasing ROS production, also results in reduced activity
of the enzymes of antioxidant defense system such as superoxide dismutase, catalase and
255 glutathione, which are capable of scavenging excessive ROS, thereby keeping its level
steady under physiological conditions. This imbalance between the pro- and antioxidant
states of the cell can impair its physiology (Flora, 2011, Gao et al., 2004), since the
oxidative stress state causes oxidation of cell membrane proteins, enzymes and DNA,
leading to damage that can be irreversible (Vendemiale et al., 1999). The irreversibility of
260 the effects can also be related to excretion of the As₂O₃, since the complete elimination of
inorganic arsenic from the body requires months (Jomova et al., 2011).

Under normal conditions, ROS are produced by the sperm capacitation process
(Lavranos et al., 2012). However, when the male genital system is exposed to substances
that increase ROS production beyond normal levels, such as heat, radiation or chemicals,
265 the spermatogenesis process may be impaired, since the testis represents one of the major
organs at risk due to exposure to agents that damage the genetic material (Atorino et al.,

2001). Indeed, in the present work, exposure to As_2O_3 reduced the daily sperm production, probably caused by apoptosis of germ cells. This effect seems to be permanent, since treated animals showed reduced daily sperm production after treatment discontinuation, suggesting that initial germ cells may be affected by the drug. Corroborating our findings Nava-Hernandez *et al.* (Nava-Hernandez et al., 2009) demonstrated that exposure to As_2O_3 causes significant damage to DNA of primary spermatocytes.

The spermatozoa are highly susceptible to oxidative stress caused by As_2O_3 due to significant loss of cytoplasm and thus large amounts of cell antioxidant enzymes responsible for ROS scavenging. They also present a plasma membrane rich in polyunsaturated fatty acids that are vulnerable to lipid peroxidation and thus alters the fluidity of the lipid bilayer. These changes are associated with decreased sperm quality, given that they can compromise sperm motility (Benedetti et al., 2012). Furthermore, exposure to As_2O_3 is able to decrease mitochondrial membrane potential, which can also impair sperm motility capacity in a dose-dependent manner (Emadi and Gore, 2010, Chiou et al., 2008). In the present work, As_2O_3 treated animals showed reduced number of motile sperm, even after the treatment has been discontinued. Considering that sperm motility is one of the most important parameters for assessing sperm quality and is highly correlated with fertile capacity (Mangelsdorf et al., 2003), exposure to As_2O_3 can potentially decrease fertility in the treated animals.

Arsenic toxicity studies in laboratory animals showed that dose-related changes occur primarily in the liver and kidney, since the liver is the major metabolism site of inorganic As, whereas the kidney is a major pathway of excretion (Greaves, 2000). The increase in liver and kidney weights described in the present study may be associated with

290 hepatocellular hypertrophy and renal necrosis, measures that seem unrelated to body weight. A recent work showed that a large amount of arsenic accumulates in these organs after exposure to As_2O_3 , causing damage by ROS generation. Moreover, a significant decrease in the activity of scavenging enzymes such as catalase and glutathione peroxidase suggests a compromise of the antioxidant defense system and consequently a physiological
295 effect on these organs (Kotyzová D, 2013).

The determination of reproductive organ weights is an important parameter for assessing the risk of toxicity on the male genital system (Clegg ED, 2001). Animals treated with As_2O_3 displayed no change in testis, epididymis and prostate weights. However, we observed reduced weight of full seminal vesicle, a gland responsible for secretion of
300 nutrients that compose the seminal fluid (Hayward et al., 1996b), indicating that secretion by epithelial cells was affected by treatment. This effect was persistent even after the suspension of As_2O_3 treatment. Since this gland is androgen-dependent, it is possible that the decrease in testosterone levels, observed in the arsenic-exposed animals, contributed to impairing seminal secretion. Maines and Mayer (Maines and Mayer, 1985) suggested that
305 ROS can damage Leydig cells, leading to decreased testosterone levels.

The measurement of arsenic revealed that even control animals presented arsenic in the blood. This is probably due to the fact that arsenic is found in rodent chow, through the addition of contaminated rice bran (Batista et al., 2011). A small amount of arsenic is also found in drinking water (Bhattacharya et al., 2002). As expected, As_2O_3 -treated
310 animals showed higher blood levels of arsenic, in a dose-dependent manner. However, since arsenic is rapidly metabolized and remains few hours in blood, it can accumulate in tissues of exposed individuals (Aposhian, 1997). Thus, the measurement performed after

the treatment suspension found that the blood arsenic levels were similar in all experimental groups, showing that the metal may have accumulated in the organs,
315 contributing to the persistence of harmful effects.

Florea and *et al.* (Florea and Busselberg, 2008) showed that As_2O_3 is involved in inhibiting growth and inducing apoptosis of malignant cells also by elevating intracellular calcium. The increase of calcium in a cell may be due to: i) its entry from the extracellular space through selective calcium channels present in the plasma membrane or ii) release
320 from intracellular stores such as mitochondria and endoplasmic reticulum (Berridge et al., 2003). These authors suggested that arsenic interaction with the cells occurs in these two pathways: a small amount of As_2O_3 that enters the cell is sufficient to cause calcium release from the stores, and its binding to extracellular membrane receptors triggers pathways that result in increased levels of intracellular calcium (Florea and Busselberg, 2009). *In vitro*
325 treatment of CE duct with As_2O_3 for short periods (45 minutes to 2 hours) showed that the increase in intracellular calcium caused by the drug tends to be a slow process that only occurs with prolonged exposure, since there was no change in muscle contractility immediately drug administration.

Since the initial stimulus for the smooth muscle contraction is the increase of
330 intracellular calcium, the augmentation of the maximum CE duct response caused by *in vivo* treatment reflects increased contraction strength of the cauda epididymis muscle in response to As_2O_3 exposure. Therefore, this increase occurred both in the presence of NE and CCh stimulus, suggesting that As_2O_3 acts on muscle cells, i.e. it is not dependent on adrenergic and muscarinic receptors. It is known that changes in the contractile activity of
335 these muscles that are capable of increasing or decreasing the sperm transit time can impair

their maturation (Bellentani et al., 2011). This is due to the fact that sperm are still immature when leaving the testis and require a later stage of maturation, a critical process that occurs during their transit through a progressively modified atmosphere present in the epididymis, the organ responsible for sperm maturation and motility acquisition.

340 Maturation occurs mainly during the transit through the transition region between corpus and cauda epididymis (Cooper, 1998, Chaturapanich et al., 1999).

In contrast to the epididymal caput region, where the fluid motion is enabled by peristaltic contractions of the organ itself, the cauda region presents a smooth muscle contraction of the epididymal duct which promotes sperm passage through the epididymis

345 (Amann and Schanbacher, 1983). Thus, Borges *et al.* (Borges et al., 2013) demonstrated that the decrease in sperm transit time through the cauda epididymis duct of rats is caused by increased contractility of smooth muscle surrounding the cauda, which compromises the fertile potential of these animals. Since the transit time through the epididymis is critical for sperm maturation, and that alteration in contractility of the epididymal cauda can alter this

350 transit, sperm that leave the epididymis faster may present a reduced motility and fertility capacity. Indeed, in the present work, compromised sperm quality may be due to the possible altered sperm transit time.

Facing the constant risk of oxidative stress which germ cells are subject during treatment of APL with As_2O_3 , which may impair reproductive physiology, the gonads may

355 require antioxidant protection during gamete production. Thus, the use of substances with antioxidant properties has been proven effective at protecting germ cells against damages caused by ROS generation. In this sense, several studies have shown that NAC can attenuate the effects caused by oxidative stress (Modi et al., 2006, Santra et al., 2007). We

evaluated whether the antioxidant ability of NAC was able to restore the anti- and pro-oxidant balance of the cells, and thus mitigate the harmful effects of As₂O₃ treatment.

Indeed, when animals treated with As₂O₃ also received NAC in tap water, reproductive parameters previously affected by treatment such as daily sperm production, sperm motility and seminal vesicle weight were similar to control group, showing the protective effect of this antioxidant against oxidative stress damages. This is due to the fact that NAC is a precursor of glutathione (GSH), an important enzyme of the cellular antioxidant system, which is able to stimulate and sustain its intracellular levels, which will detoxify ROS. Furthermore, NAC has been shown to be effective in metal chelating (Reddy et al., 2011, Santra et al., 2007).

We conclude that the chemotherapeutic agent As₂O₃ is toxic to the male mouse genital system, by compromising sperm quality and quantity, and that these effects are persistent even after suspension of the treatment. This compromised sperm quality in As₂O₃-exposed animals may be due to the altered epididymal duct contractility. Furthermore, the administration of an antioxidant substance such as NAC blocks the harmful effects of the drug on the genital system.

375

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

5. ACKNOWLEDGMENTS

380 The authors would like to acknowledge Dr. Ruither de Oliveira Gomes Carolino of the Department of Morphology, Physiology and Basic Pathology Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, for the collaboration with the hormonal assays.

6. REFERENCES

1. Mandal BK, Suzuki KT. Arsenic round the world: a review. *Talanta* 2002; 58:201-235.
2. Ratnaike RN. Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgrad Med J* 2003; 79:391-396.
3. Chen GQS, X.G.; Tang, W.; Xiong, S.M.; Zhu, J.; Cai, X.; Han, Z.G.; Ni, J.H.; Shi, G.Y.; Jia, P.M.; Liu, M.M.; He, K.L.; Niu, C.; Ma, J.; Zhang, P.; Zhang, T.D.; Paul, P.; Naoe, T.; Kitamura, K.; Miller, W.; Waxman, S.; Wang, Z.Y.; de The, H.; Ch. Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As₂O₃ exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood* 1997; 89:3345-3353.
4. Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, Jhanwar S, Calleja E, Dardashti LJ, Corso D, DeBlasio A, Gabrilove J, Scheinberg DA, Pandolfi PP, Warrell RP, Jr. Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med* 1998; 339:1341-1348.
5. Soignet SL, Frankel SR, Douer D, Tallman MS, Kantarjian H, Calleja E, Stone RM, Kalaycio M, Scheinberg DA, Steinherz P, Sievers EL, Coutre S, et al. United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2001; 19:3852-3860.
6. Mathews V, George B, Lakshmi KM, Viswabandya A, Bajel A, Balasubramanian P, Shaji RV, Srivastava VM, Srivastava A, Chandy M. Single-agent arsenic trioxide in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: durable remissions with minimal toxicity. *Blood* 2006; 107:2627-2632.
7. Mathews V, Chendamarai E, George B, Viswabandya A, Srivastava A. Treatment of acute promyelocytic leukemia with single-agent arsenic trioxide. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2011; 3:e2011056.
8. Lin J, Zhu H, Li S, Fan H, Lu X. Complete remission of acute promyelocytic leukemia in a very elderly patient after treatment with low dose arsenic trioxide and sequential retinoic acid: a case report. *Ann Hematol* 2013.
9. Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6:516-524.
10. Chiou TJ, Chu ST, Tzeng WF, Huang YC, Liao CJ. Arsenic trioxide impairs spermatogenesis via reducing gene expression levels in testosterone synthesis pathway. *Chem Res Toxicol* 2008; 21:1562-1569.

11. Kim YJ, Chung JY, Lee SG, Kim JY, Park JE, Kim WR, Joo BS, Han SH, Yoo KS, Yoo YH, Kim JM. Arsenic trioxide-induced apoptosis in TM4 Sertoli cells: the potential involvement of p21 expression and p53 phosphorylation. *Toxicology* 2011; 285:142-151.
12. Cobo JM, Castineira M. Oxidative stress, mitochondrial respiration, and glycemic control: clues from chronic supplementation with Cr³⁺ or As³⁺ to male Wistar rats. *Nutrition* 1997; 13:965-970.
13. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2008; 22:659-661.
14. Franca LR, Avelar GF, Almeida FF. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 2005; 63:300-318.
15. Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hurtt ME, Klinefelter GR, Makris SL, Perreault SD, Schrader S, Seyler D, Sprando R, et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation. *Reprod Toxicol* 1996; 10:237-244.
16. Filler R. Methods for evaluation of rats epididymal sperm morphology. In: JH CRH (ed.) *Male reproductive toxicology*: San Diego, California: Academic Press; 1993: 334-343.
17. Robb GW, Amann RP, Killian GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil* 1978; 54:103-107.
18. Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* 2005; 11:1306-1313.
19. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142.
20. Suzuki YJ FH, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biology & Medicine* 1997; 22:269-285.
21. Zheng Y, Yamaguchi H, Tian C, Lee MW, Tang H, Wang HG, Chen Q. Arsenic trioxide (As₂O₃) induces apoptosis through activation of Bax in hematopoietic cells. *Oncogene* 2005; 24:3339-3347.
22. Yi J, Gao F, Shi G, Li H, Wang Z, Shi X, Tang X. The inherent cellular level of reactive oxygen species: one of the mechanisms determining apoptotic susceptibility of leukemic cells to arsenic trioxide. *Apoptosis* 2002; 7:209-215.
23. Flora SJ. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic Biol Med* 2011; 51:257-281.

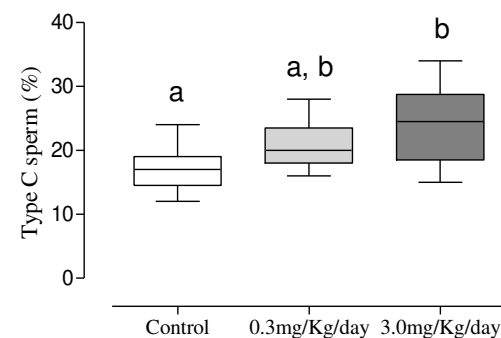
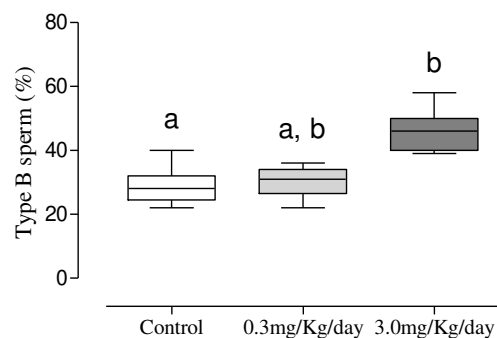
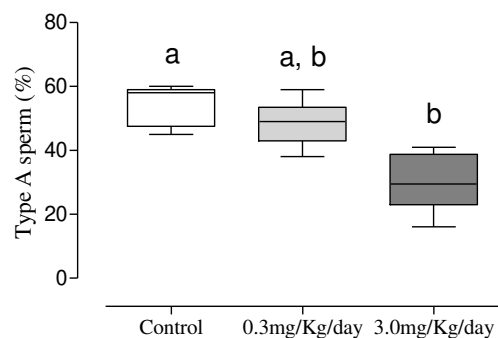
24. Gao F, Yi J, Yuan JQ, Shi GY, Tang XM. The cell cycle related apoptotic susceptibility to arsenic trioxide is associated with the level of reactive oxygen species. *Cell Res* 2004; 14:81-85.
25. Vendemiale G, Grattagliano I, Altomare E. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *Int J Clin Lab Res* 1999; 29:49-55.
26. Jomova K, Jenisova Z, Feszterova M, Baros S, Liska J, Hudecova D, Rhodes CJ, Valko M. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J Appl Toxicol* 2011; 31:95-107.
27. Lavranos G, Balla M, Tzortzopoulou A, Syriou V, Angelopoulou R. Investigating ROS sources in male infertility: a common end for numerous pathways. *Reprod Toxicol* 2012; 34:298-307.
28. Atorino L, Di Meglio S, Farina B, Jones R, Quesada P. Rat germinal cells require PARP for repair of DNA damage induced by gamma-irradiation and H₂O₂ treatment. *Eur J Cell Biol* 2001; 80:222-229.
29. Nava-Hernandez MP, Hauad-Marroquin LA, Bassol-Mayagoitia S, Garcia-Arenas G, Mercado-Hernandez R, Echavarri-Guzman MA, Cerda-Flores RM. Lead-, cadmium-, and arsenic-induced DNA damage in rat germinal cells. *DNA Cell Biol* 2009; 28:241-248.
30. Benedetti S, Tagliamonte MC, Catalani S, Primiterra M, Canestrari F, De Stefani S, Palini S, Bulletti C. Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality. *Reprod Biomed Online* 2012; 25:300-306.
31. Emadi A, Gore SD. Arsenic trioxide - An old drug rediscovered. *Blood Rev* 2010; 24:191-199.
32. Mangelsdorf I, Buschmann J, Orthen B. Some aspects relating to the evaluation of the effects of chemicals on male fertility. *Regul Toxicol Pharmacol* 2003; 37:356-369.
33. Greaves P. *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies: Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation*. Elsevier Science, Amsterdam; 2000.
34. Kotyzová D BM, Eybl V. Differential influences of various arsenic compounds on antioxidant defense system in liver and kidney of rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2013; 36(3):1015-1021.
35. Clegg ED P, D., Klinefelter, G.R. Assessment of male reproductive toxicity. In: AW H (ed.) *Principles and Methods of Toxicology*: Philadelphia: Taylor & Francis.; 2001: 1263-1300.
36. Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Foster BA, Cunha AR, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat (Basel)* 1996; 155:94-103.
37. Maines MD, Mayer RD. Inhibition of testicular cytochrome P-450-dependent steroid biosynthesis by cis-platinum. Reversal by human chorionic gonadotropin. *J Biol Chem* 1985; 260:6063-6068.

38. Batista BL, Souza JM, De Souza SS, Barbosa F, Jr. Speciation of arsenic in rice and estimation of daily intake of different arsenic species by Brazilians through rice consumption. *J Hazard Mater* 2011; 191:342-348.
39. Bhattacharya P, Jacks G, Ahmed KM, Routh J, Khan AA. Arsenic in groundwater of the Bengal delta plain aquifers in Bangladesh. *Bull Environ Contam Toxicol* 2002; 69:538-545.
40. Aposhian HV. Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37:397-419.
41. Florea AM, Busselberg D. Arsenic trioxide in environmentally and clinically relevant concentrations interacts with calcium homeostasis and induces cell type specific cell death in tumor and non-tumor cells. *Toxicol Lett* 2008; 179:34-42.
42. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4:517-529.
43. Florea AM, Busselberg D. Anti-cancer drugs interfere with intracellular calcium signaling. *Neurotoxicology* 2009; 30:803-810.
44. Bellentani FF, Fernandes GS, Perobelli JE, Pacini ES, Kiguti LR, Pupo AS, Kempinas WD. Acceleration of sperm transit time and reduction of sperm reserves in the epididymis of rats exposed to sibutramine. *J Androl* 2011; 32:718-724.
45. Cooper TG. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 1998; 53:119-136.
46. Chaturapanich G, Sujarit K, Pholpramool C. Effects of sulphapyridine on sperm transport through the rat epididymis and contractility of the epididymal duct. *J Reprod Fertil* 1999; 117:199-205.
47. Amann RP, Schanbacher BD. Physiology of male reproduction. *J Anim Sci* 1983; 57 Suppl 2:380-403.
48. Borges CS, Missassi G, Pacini ES, Kiguti LR, Sanabria M, Silva RF, Banzato TP, Perobelli JE, Pupo AS, Kempinas WG. Slimmer or fertile? Pharmacological mechanisms involved in reduced sperm quality and fertility in rats exposed to the anorexigen sibutramine. *PLoS One* 2013; 8:e66091.
49. Modi M, Kaul RK, Kannan GM, Flora SJ. Co-administration of zinc and n-acetylcysteine prevents arsenic-induced tissue oxidative stress in male rats. *J Trace Elem Med Biol* 2006; 20:197-204.
50. Santra A, Chowdhury A, Ghatak S, Biswas A, Dhali GK. Arsenic induces apoptosis in mouse liver is mitochondria dependent and is abrogated by N-acetylcysteine. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 220:146-155.

51. Reddy PS, Rani GP, Sainath SB, Meena R, Supriya C. Protective effects of N-acetylcysteine against arsenic-induced oxidative stress and reprotoxicity in male mice. *J Trace Elem Med Biol* 2011; 25:247-253.

FIGURES

A



B

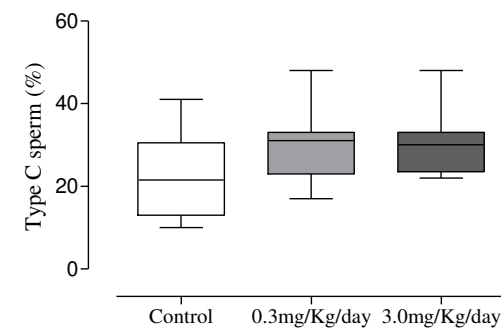
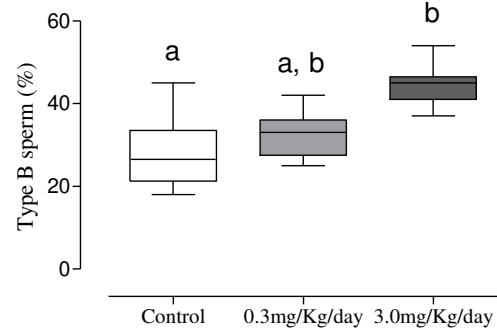
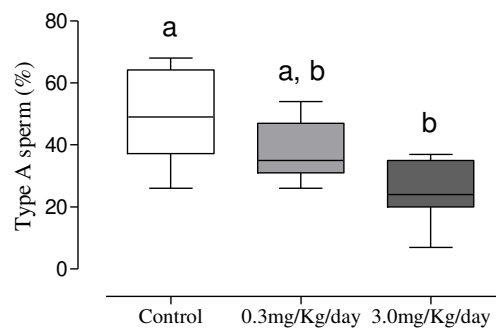


Figure 1. Sperm motility in (A) 105 days old animals and (B) 155 days old animals. Values expressed as median and interquartile range. Kruskal Wallis analysis of variance test, followed by Dunns test. Different letters indicate medians that differ at 5% significance level.

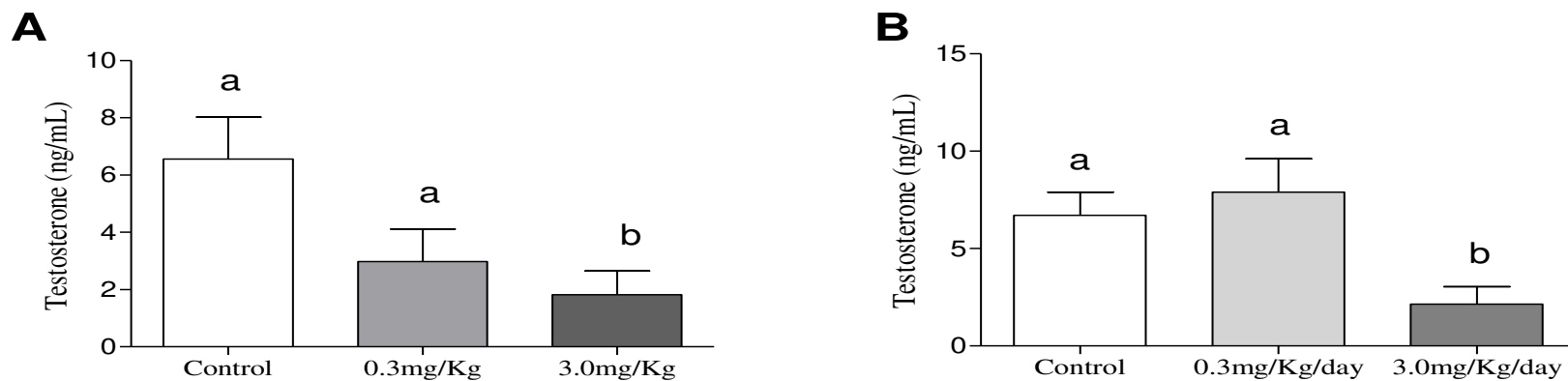


Figure 2. Serum testosterone levels of (C) 105 days old animals (control (n=9), 0.3mg/Kg (n=10) and 3.0mg/Kg (n=7)) and (D) 155 days old animals (control (n=9), 0.3mg/Kg (n=8) and 3.0mg/Kg (n=7)) Values expressed as mean $\pm$ S.E.M. One-way analysis of variance (ANOVA) test, followed by Tukey test. Different letters indicate means that differ at 5% significance level.

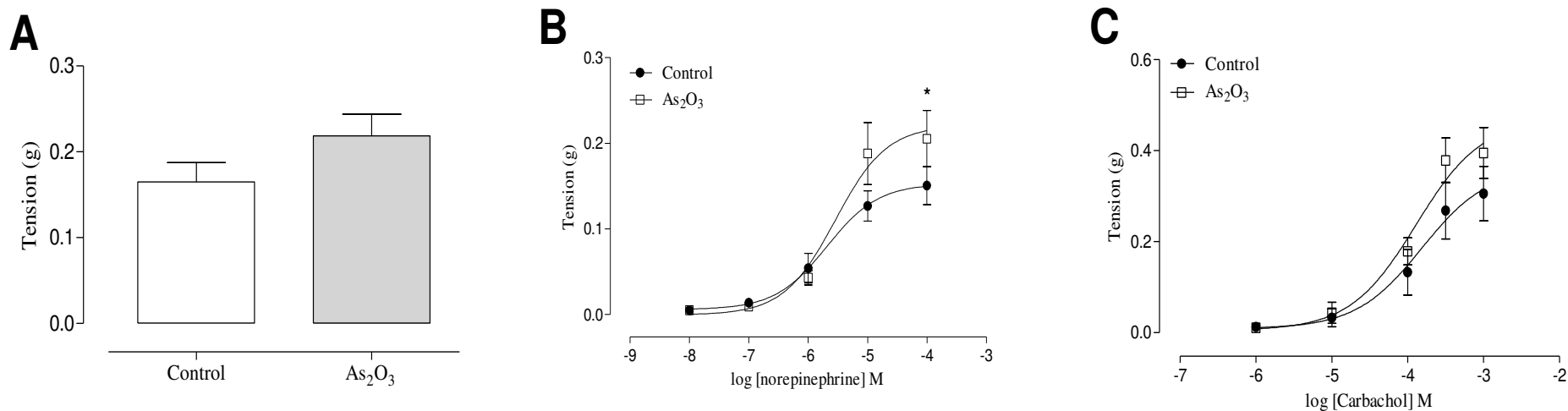


Figure 3. A) Tension developed by 80mM KCl. Concentration-response curve to B) NE ($10^{-8}\text{M} - 10^{-4}\text{M}$) and C) to CCh ($10^{-6}\text{M} - 10^{-3}\text{M}$) showing maximal tension (E_{max}) and the potency (pEC_{50}) in developing tension of epididymal duct of control group and animals treated with 3.0mg/Kg/day of As₂O₃. Values expressed as mean $\pm$ S.E.M. One-way analysis of variance (ANOVA) test, followed by Tukey test. * $p < 0.05$. * $p < 0.05$.

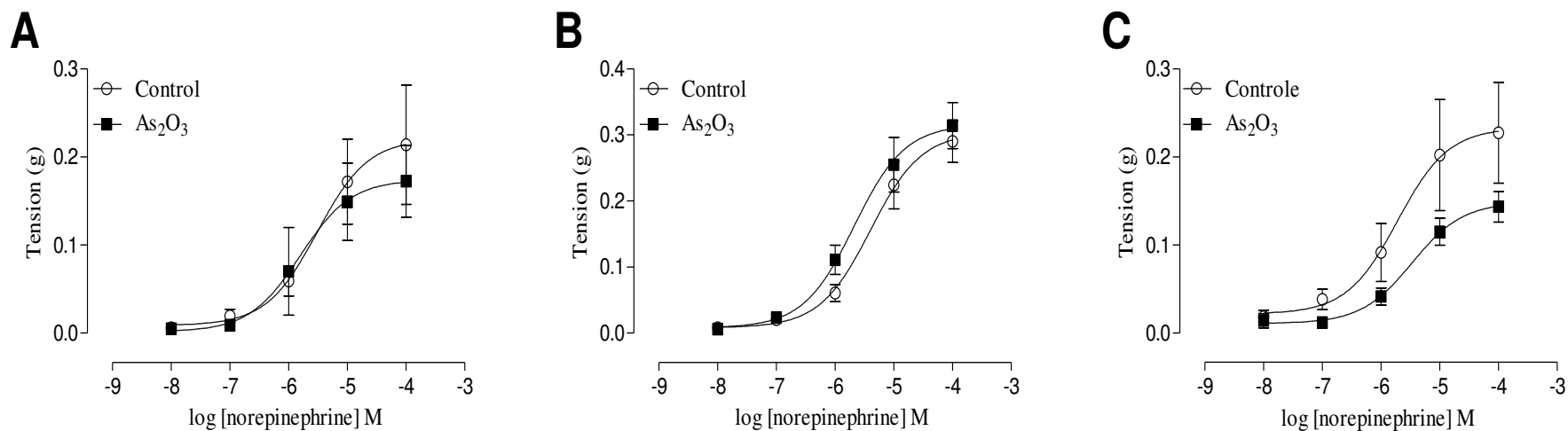


Figure 4. Concentration-response curve of epididymal duct to NE ($10^{-8}\text{M} - 10^{-4}\text{M}$). A) Non-exposed ($n=4$) and exposed *in vitro* ($n=6$) to $10\mu\text{M}$ of As_2O_3 for 45 minutes. B) Non-exposed ($n=3$) and exposed *in vitro* to $10\mu\text{M}$ of As_2O_3 for 2 hours. C) Non-exposed ($n=7$) and exposed *in vitro* ($n=8$) to $100\mu\text{M}$ of As_2O_3 for 2 hours. Values expressed as mean $\pm$ S.E.M. One-way analysis of variance (ANOVA) test, followed by Tukey test.

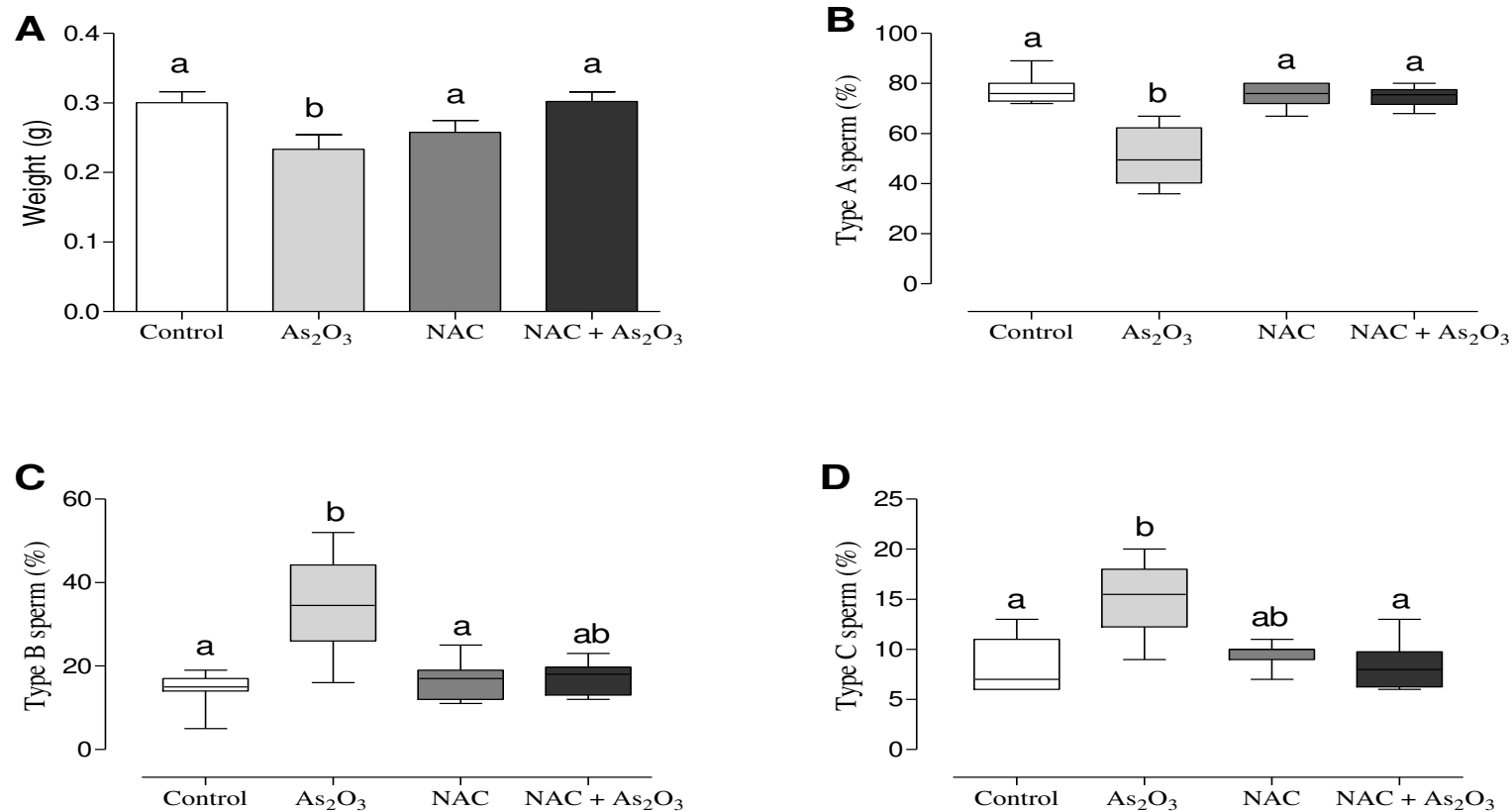


Figure 5. A) Weight of full seminal vesicle (n=10 per group). Values expressed as mean $\pm$ S.E.M. One-way analysis of variance (ANOVA) test, followed by Tukey test. B, C and D) Sperm motility of control animals (n=7) and treated with 3.0mg/Kg of As₂O₃ (n=8), 40mM of NAC (n=7) or both As₂O₃ and NAC (n=8). Values expressed as median, Kruskal Wallis analysis of variance test, followed by Dunn's test. Different letters indicate median that differ at 5% significance level.

Figure S1.

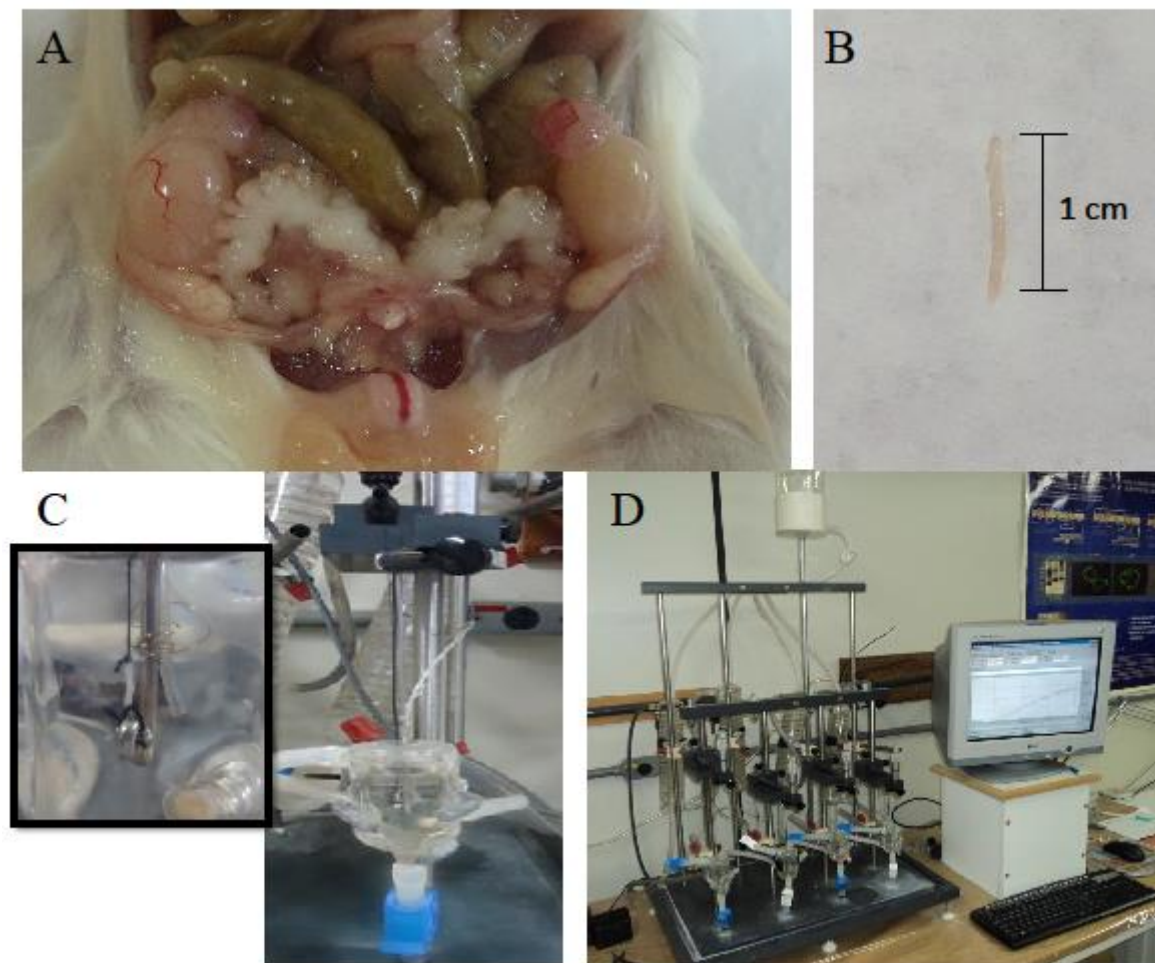


Table 1. Body weight gain and organ weights at 105 days of age.

<i>Parameters</i>	<i>Control</i> (<i>n</i> = 10)	<i>0.3 mg/Kg</i> (<i>n</i> = 10)	<i>3.0 mg/Kg</i> (<i>n</i> = 10)
<i>Absolute weights</i>			
Body weight gain (g)	3.11 ± 0.29	3.38 ± 0.23	3.23 ± 0.20
Testis (mg)	118.10 ± 5.15	114.10 ± 3.96	113.40 ± 4.39
Epididymis (mg)	51.56 ± 2.10	48.58 ± 1.15	50.42 ± 1.31
Ventral prostate (mg)	16.74 ± 1.98	16.19 ± 0.97	14.06 ± 2.43
Full seminal vesicle (mg)	386.70 ± 22.55 ^a	339.0 ± 15.66 ^{a, b}	324.60 ± 11.54 ^b
Empty seminal vesicle (mg)	183.40 ± 14.09	191.50 ± 12.30	190.40 ± 8.52
Kidney (mg)	309.40 ± 11.18	320.30 ± 13.14	332.10 ± 11.14
Liver (mg)	2238 ± 78.75	2272 ± 60.50	2402 ± 88.38
Adrenal (µg)	2530 ± 253.00	2530 ± 181.40	2660 ± 272.50
<i>Relative weights</i>			
Testis (mg/g)	2.94 ± 0.09	2.87 ± 0.11	2.75 ± 0.12
Epididymis (mg/g)	1.28 ± 0.04	1.22 ± 0.04	1.22 ± 0.04
Ventral prostate (mg/g)	0.42 ± 0.04	0.45 ± 0.04	0.45 ± 0.05
Full seminal vesicle (mg/g)	9.62 ± 0.53 ^a	8.56 ± 0.46 ^{a, b}	7.84 ± 0.26 ^b
Empty seminal vesicle (mg/g)	4.58 ± 0.37	4.81 ± 0.31	4.60 ± 0.21
Kidney (mg/g)	7.70 ± 0.26	8.01 ± 0.27	8.01 ± 0.23
Liver (mg/g)	55.68 ± 1.62	55.78 ± 0.56	57.89 ± 1.46
Adrenal (µg/g)	63.10 ± 6.33	63.80 ± 5.08	64.3 ± 6.40

Values expressed as mean ± S.E.M. One-way analysis of variance (ANOVA) test, followed by Tukey test.

Different letters indicate means that differs at 5% significance level.

Table 2. Body weight gain and organ weights at 155 days of age.

<i>Parameters</i>	<i>Control</i> (<i>n</i> = 10)	<i>0.3 mg/Kg</i> (<i>n</i> = 10)	<i>3.0 mg/Kg</i> (<i>n</i> = 10)
<i>Absolute weights</i>			
Body weight gain (g)	3.18 ± 0.29	3.30 ± 0.46	3.12 ± 0.32
Testis (mg)	115.90 ± 5.14	109.00 ± 5.58	111.80 ± 4.98
Epididymis (mg)	52.14 ± 1.62	50.69 ± 2.07	49.17 ± 2.18
Ventral prostate (mg)	17.84 ± 1.16	17.99 ± 2.59	14.77 ± 0.59
Full seminal vesicle (mg)	467.90 ± 24.41 ^a	401.00 ± 28.27 ^{a, b}	347.70 ± 27.67 ^b
Empty seminal vesicle (mg)	198.60 ± 11.47	236.30 ± 18.88	183.00 ± 20.07
Kidney (mg)	323.90 ± 9.07	317.80 ± 12.98	345.90 ± 18.41
Liver (mg)	2289 ± 101	2257 ± 103	2466 ± 59.25
Adrenal (µg)	2.440 ± 268.80	2.722 ± 261.30	2.633 ± 204.10
<i>Relative weights</i>			
Testis (mg/g)	2.69 ± 0.09	2.71 ± 0.14	2.75 ± 0.09
Epididymis (mg/g)	1.22 ± 0.03	1.22 ± 0.05	1.21 ± 0.03
Ventral prostate (mg/g)	0.42 ± 0.03	0.42 ± 0.05	0.36 ± 0.02
Full seminal vesicle (mg/g)	10.89 ± 0.47 ^a	9.68 ± 0.72 ^{a, b}	8.52 ± 0.52 ^b
Empty seminal vesicle (mg/g)	4.63 ± 0.25	5.65 ± 0.38	4.48 ± 0.44
Kidney (mg/g)	7.59 ± 0.27 ^a	7.62 ± 0.18 ^{a, b}	8.53 ± 0.38 ^b
Liver (mg/g)	53.24 ± 1.47 ^a	54.12 ± 1.53 ^{a, b}	61.37 ± 2.70 ^b
Adrenal (µg/g)	57.71 ± 6.95	65.16 ± 5.65	66.00 ± 6.11

Values expressed as mean ± S.E.M. One-way analysis of variance (ANOVA) test, followed by Tukey test.

Different letters indicate means that differs at 5% significance level.

Table 3. Sperm counts control and treated animals.

<i>Parameters</i>	<i>Control (n = 10)</i>	<i>0.3 mg/kg (n = 10)</i>	<i>3.0 mg/kg (n = 10)</i>
<i>105 days old mice</i>			
Sperm head count (x 10 ⁶ /testis)	22.53 ± 0.85 ^a	21.12 ± 0.84 ^{a, b}	16.11 ± 0.53 ^b
Sperm head count (x10 ⁶ /g testis)	218.70 ± 11.35 ^a	205.50 ± 10.59 ^{a, b}	161.70 ± 9.40 ^b
Daily sperm production (x 10 ⁶ /testis)	4.65 ± 0.18 ^a	4.36 ± 0.17 ^{a, b}	3.32 ± 0.11 ^b
Daily sperm production (x10 ⁶ /g testis)	45.19 ± 0.18 ^a	42.44 ± 2.19 ^{a, b}	33.37 ± 1.95 ^b
<i>155 days old mice</i>			
Sperm head count (x 10 ⁶ /testis)	22.11 ± 1.29 ^a	23.67 ± 1.15 ^{a, b}	14.13 ± 1.00 ^b
Sperm head count (x10 ⁶ /g testis)	242.8 ± 12.63	304.3 ± 26.53	241.3 ± 22.77
Daily sperm production (x10 ⁶ /testis)	4.56 ± 0.27 ^a	4.98 ± 0.23 ^{a, b}	3.53 ± 0.21 ^b
Daily sperm production (x10 ⁶ /g testis)	50.11 ± 2.61	62.89 ± 5.57	49.73 ± 4.73

Values expressed as mean ± S.E.M. One-way analysis of variance (ANOVA) test, followed by Tukey test. Different letters indicate groups that differ at 5% significance level.

Table 4. Potency (pEC₅₀) and maximal tension (Emax) developed by NE and CCh on CE duct.

<i>Parameters</i>	<i>Control</i> (<i>n</i> = 8)	As ₂ O ₃ (<i>n</i> = 8)
pEC ₅₀ NE	5.687±0.237	5.544±0.248
Emax NE	0.1529 ± 0.0139 ^a	0.2209±0.0227 ^b
pEC ₅₀ CCh	3.814±0.341	3.890±0.213
Emax CCh	0.3621 ± 0.0744 ^a	0.4687 ±0.0573 ^{a,b}

Values expressed as mean ± S.E.M. One-way analysis of variance (ANOVA) test, followed by Tukey test.

Table 5. Sperm counts in control animals and treated with 3.0mg/Kg of As₂O₃, 40mM of NAC, and both As₂O₃ and NAC.

<i>Parameters</i>	<i>Control</i> (<i>n</i> = 8)	<i>As₂O₃</i> (<i>n</i> = 8)	<i>NAC</i> (<i>n</i> = 8)	<i>NAC + As₂O₃</i> (<i>n</i> = 8)
Sperm head count (x 10 ⁶ /testis)	21.89 ± 1.06 ^a	16.96 ± 0.71 ^b	22.25 ± 1.24 ^a	21.97 ± 1.29 ^a
Sperm head count (x10 ⁶ /g testis)	199.50 ± 6.55 ^a	150.90 ± 9.25 ^b	198.9 ± 7.09 ^a	214.70 ± 12.85 ^a
Daily sperm production (x 10 ⁶ /testis)	4.52 ± 0.22 ^a	3.50 ± 0.15 ^b	4.59 ± 0.26 ^a	4.54 ± 0.26 ^a
Daily sperm production (x10 ⁶ /g testis)	41.22 ± 1.36 ^a	31.08 ± 1.83 ^b	41.06 ± 1.46 ^a	44.34 ± 2.65 ^a

Values expressed as mean ± S.E.M. One-way analysis of variance (ANOVA) test, followed by Tukey test. Different letters indicate means that differs at 5% significance

level.

Conclusão

Concluiu-se que o As_2O_3 exerceu toxicidade no sistema genital masculino do camundongo, comprometendo a quantidade e qualidade espermática, e que esses efeitos foram persistentes mesmo após suspensão do tratamento. Além disso, a administração concomitante do antioxidante N-acetilcisteína preveniu os efeitos deletérios causados pelo As_2O_3 no sistema genital masculino. Esses resultados, obtidos em roedores, podem ter implicações na saúde reprodutiva humana, tendo-se em vista a utilização do As_2O_3 como quimioterápico no tratamento da leucemia.

Referências
Bibliográficas da
Introdução

- AITKEN, R. J. & BAKER, M. A. 2006. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol*, 250, 66-9.
- AITKEN, R. J. & DE IULIIS, G. N. 2010. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 16, 3-13.
- AITKEN, R. J. & ROMAN, S. D. 2008. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev*, 1, 15-24.
- AITKEN, R. J. & SAWYER, D. 2003. The human spermatozoon--not waving but drowning. *Adv Exp Med Biol*, 518, 85-98.
- AKSOY, Y., AKSOY, H., ALTINKAYNAK, K., AYDIN, H. R. & OZKAN, A. 2006. Sperm fatty acid composition in subfertile men. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 75, 75-9.
- AMANN, R. P. 1986. Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals. *Environ Health Perspect*, 70, 149-58.
- AMANN, R. P. & SCHANBACHER, B. D. 1983. Physiology of male reproduction. *J Anim Sci*, 57 Suppl 2, 380-403.
- ANONYMOUS 2001. Arsenic-based therapy benefits leukemia patients. *FDA Consum*, 35, 4.
- APOSHIAN, H. V. 1997. Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 37, 397-419.
- ATKURI, K. R., MANTOVANI, J. J., HERZENBERG, L. A. & HERZENBERG, L. A. 2007. N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol*, 7, 355-9.
- ATORINO, L., DI MEGLIO, S., FARINA, B., JONES, R. & QUESADA, P. 2001. Rat germinal cells require PARP for repair of DNA damage induced by gamma-irradiation and H₂O₂ treatment. *Eur J Cell Biol*, 80, 222-9.
- AZHAR S, R. E. 2007. Regulation of Leydig Cell Cholesterol Metabolism. In: PAYNE AHH, M. P. (ed.) *The Leydig Cell in Health & Disease*. New Jersey: Humana Press, Totowa.
- BATISTA, B. L., SOUZA, J. M., DE SOUZA, S. S. & BARBOSA, F., JR. 2011. Speciation of arsenic in rice and estimation of daily intake of different arsenic species by Brazilians through rice consumption. *J Hazard Mater*, 191, 342-8.
- BELLENTANI, F. F., FERNANDES, G. S., PEROBELLI, J. E., PACINI, E. S., KIGUTI, L. R., PUPO, A. S. & KEMPINAS, W. D. 2011. Acceleration of sperm transit time and reduction of sperm reserves in the epididymis of rats exposed to sibutramine. *J Androl*, 32, 718-24.
- BENEDETTI, S., TAGLIAMONTE, M. C., CATALANI, S., PRIMITERRA, M., CANESTRARI, F., DE STEFANI, S., PALINI, S. & BULLETTI, C. 2012. Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality. *Reprod Biomed Online*, 25, 300-6.
- BERRIDGE, M. J., BOOTMAN, M. D. & RODERICK, H. L. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 517-29.
- BHATTACHARYA, P., JACKS, G., AHMED, K. M., ROUTH, J. & KHAN, A. A. 2002. Arsenic in groundwater of the Bengal delta plain aquifers in Bangladesh. *Bull Environ Contam Toxicol*, 69, 538-45.
- BORGES, C. S., MISSASSI, G., PACINI, E. S., KIGUTI, L. R., SANABRIA, M., SILVA, R. F., BANZATO, T. P., PEROBELLI, J. E., PUPO, A. S. & KEMPINAS, W. G. 2013. Slimmer or fertile? Pharmacological mechanisms involved in reduced sperm quality and fertility in rats exposed to the anorexigen sibutramine. *PLoS One*, 8, e66091.
- BRAY, T. M. & BETTGER, W. J. 1990. The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radic Biol Med*, 8, 281-91.

- CHATURAPANICH, G., SUJARIT, K. & PHOLPRAMOOL, C. 1999. Effects of sulphapyridine on sperm transport through the rat epididymis and contractility of the epididymal duct. *J Reprod Fertil*, 117, 199-205.
- CHEN, G. Q. S., X.G.; TANG, W.; XIONG, S.M.; ZHU, J.; CAI, X.; HAN, Z.G.; NI, J.H.; SHI, G.Y.; JIA, P.M.; LIU, M.M.; HE, K.L.; NIU, C.; MA, J.; ZHANG, P.; ZHANG, T.D.; PAUL, P.; NAOE, T.; KITAMURA, K.; MILLER, W.; WAXMAN, S.; WANG, Z.Y.; DE THE, H.; CH 1997. Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As₂O₃ exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood*, 89, 3345-3353.
- CHIOU, T. J., CHU, S. T., TZENG, W. F., HUANG, Y. C. & LIAO, C. J. 2008. Arsenic trioxide impairs spermatogenesis via reducing gene expression levels in testosterone synthesis pathway. *Chem Res Toxicol*, 21, 1562-9.
- CLEGG ED, P., D., KLINEFELTER, G.R. 2001. Assessment of male reproductive toxicity. In: AW, H. (ed.) *Principles and Methods of Toxicology*. Philadelphia: Taylor & Francis.
- CLELAND, K. W. 1957. The structure and fuction of the Epididymis. 1. The histology of the Rat Epididymis. *Australian Journal of Zoology*, 5, 223-246.
- CLERMONT, Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev*, 52, 198-236.
- COBO, J. M. & CASTINEIRA, M. 1997. Oxidative stress, mitochondrial respiration, and glycemic control: clues from chronic supplementation with Cr³⁺ or As³⁺ to male Wistar rats. *Nutrition*, 13, 965-70.
- COOPER, T. G. 1998. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 53, 119-136.
- CUNHA, G. R., RICKE, W., THOMSON, A., MARKER, P. C., RISBRIDGER, G., HAYWARD, S. W., WANG, Y. Z., DONJACOUR, A. A. & KURITA, T. 2004. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 92, 221-36.
- DE LAMIRANDE, E. & O'FLAHERTY, C. 2008. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim Biophys Acta*, 1784, 106-15.
- DE ROSA, S. C., ZARETSKY, M. D., DUBS, J. G., ROEDERER, M., ANDERSON, M., GREEN, A., MITRA, D., WATANABE, N., NAKAMURA, H., TJIOE, I., DERESINSKI, S. C., MOORE, W. A., ELA, S. W., PARKS, D., HERZENBERG, L. A. & HERZENBERG, L. A. 2000. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. *Eur J Clin Invest*, 30, 915-29.
- DIXON, J. S., JEN, P. Y. & GOSLING, J. A. 1998. Structure and autonomic innervation of the human vas deferens: a review. *Microsc Res Tech*, 42, 423-32.
- EMADI, A. & GORE, S. D. 2010. Arsenic trioxide - An old drug rediscovered. *Blood Rev*, 24, 191-9.
- FILLER, R. 1993. Methods for evaluation of rats epididymal sperm morphology. In: JH, C. R. H. (ed.) *Male reproductive toxicology*. San Diego, California: Academic Press.
- FLORA, S. J. 2011. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic Biol Med*, 51, 257-81.
- FLOREA, A. M. & BUSSELBERG, D. 2008. Arsenic trioxide in environmentally and clinically relevant concentrations interacts with calcium homeostasis and induces cell type specific cell death in tumor and non-tumor cells. *Toxicol Lett*, 179, 34-42.
- FLOREA, A. M. & BUSSELBERG, D. 2009. Anti-cancer drugs interfere with intracellular calcium signaling. *Neurotoxicology*, 30, 803-10.
- FRANCA, L. R., AVELAR, G. F. & ALMEIDA, F. F. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, 63, 300-18.

- GAO, F., YI, J., YUAN, J. Q., SHI, G. Y. & TANG, X. M. 2004. The cell cycle related apoptotic susceptibility to arsenic trioxide is associated with the level of reactive oxygen species. *Cell Res*, 14, 81-5.
- GREAVES, P. 2000. *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies: Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation*, Elsevier Science, Amsterdam.
- GRISWOLD, M. D. 1998. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 9, 411-6.
- GUYTON, A. C. H., J.E. 2006. *Tratado de Fisiologia Médica*, Rio de Janeiro, Elsevier.
- HAYWARD, S. W., BASKIN, L. S., HAUGHNEY, P. C., CUNHA, A. R., FOSTER, B. A., DAHIYA, R., PRINS, G. S. & CUNHA, G. R. 1996a. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anat (Basel)*, 155, 81-93.
- HAYWARD, S. W., BASKIN, L. S., HAUGHNEY, P. C., FOSTER, B. A., CUNHA, A. R., DAHIYA, R., PRINS, G. S. & CUNHA, G. R. 1996b. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat (Basel)*, 155, 94-103.
- HERMO, L. R., B. 2002. Epididymal cells types and their function. In: ROBAIRE, B., HINTON, B. (ed.) *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York.
- HU, J. 2011. Arsenic in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: current status and future research direction. *Front Med*, 5, 45-52.
- JANA, K., JANA, S. & SAMANTA, P. K. 2006. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. *Reprod Biol Endocrinol*, 4, 9.
- JOHNSON, F. C. 1979. The antioxidant vitamins. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr*, 11, 217-309.
- JOHNSON, L., WELSH, T.H.J.R., WILKER, C.E. 1997. Anatomy and physiology of the male reproductive system and potential targets of toxicants. In: SIPES, G., MCQUEEN, C.A., GANDOLFI, A.J. (ed.) *Comprehensive Toxicology*. New York Elsevier Science Inc.
- JOMOVA, K., JENISOVA, Z., FESZTEROVA, M., BAROS, S., LISKA, J., HUDECOVA, D., RHODES, C. J. & VALKO, M. 2011. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J Appl Toxicol*, 31, 95-107.
- JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. 2008. Aparelho Reprodutor Masculino. *Histologia Básica*. Editora Guanabara Koogan.
- KEMPINAS, W. D., SUAREZ, J. D., ROBERTS, N. L., STRADER, L., FERRELL, J., GOLDMAN, J. M. & KLINEFELTER, G. R. 1998a. Rat epididymal sperm quantity, quality, and transit time after guanethidine-induced sympathectomy. *Biol Reprod*, 59, 890-6.
- KEMPINAS, W. D., SUAREZ, J. D., ROBERTS, N. L., STRADER, L. F., FERRELL, J., GOLDMAN, J. M., NAROTSKY, M. G., PERREAULT, S. D., EVENSON, D. P., RICKER, D. D. & KLINEFELTER, G. R. 1998b. Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy. *Biol Reprod*, 59, 897-904.
- KHOSROWBEYGI, A. & ZARGHAMI, N. 2007. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 77, 117-21.
- KIERSZENBAUM, A. L. 2008. Transporte e maturação de espermatozoides. *Histologia e Biologia Celular*. Rio de Janeiro: Elsevier.
- KIM, Y. J., CHUNG, J. Y., LEE, S. G., KIM, J. Y., PARK, J. E., KIM, W. R., JOO, B. S., HAN, S. H., YOO, K. S., YOO, Y. H. & KIM, J. M. 2011. Arsenic trioxide-induced apoptosis in TM4 Sertoli cells:

- the potential involvement of p21 expression and p53 phosphorylation. *Toxicology*, 285, 142-51.
- KLINEFELTER GR, H. R. 1998. Toxicology of the Male Excurrent Ducts and Accessory Sex Glands. In: K.S.K. (ed.) *Reproductive and Developmental Toxicology*.
- KNOBIL, E., NEILL, J.D. 2006. Endocrine Regulation of Spermatogenesis. In: ERNST KNOBIL, J. D. N. (ed.) *Physiology of Reproduction*. Elsevier Academic Press.
- KOTYZOVÁ D, B. M., EYBL V. 2013. Differential influences of various arsenic compounds on antioxidant defense system in liver and kidney of rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(3), 1015-1021.
- KREIS, T. A. V., R 1999. *Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins*, New York: Oxford University.
- KRITHARIS, A., BRADLEY, T. P. & BUDMAN, D. R. 2013. The evolving use of arsenic in pharmacotherapy of malignant disease. *Ann Hematol*, 92, 719-30.
- LAVRANOS, G., BALLA, M., TZORTZOPOULOU, A., SYRIOU, V. & ANGELOPOULOU, R. 2012. Investigating ROS sources in male infertility: a common end for numerous pathways. *Reprod Toxicol*, 34, 298-307.
- LIN, J., ZHU, H., LI, S., FAN, H. & LU, X. 2013. Complete remission of acute promyelocytic leukemia in a very elderly patient after treatment with low dose arsenic trioxide and sequential retinoic acid: a case report. *Ann Hematol*.
- LORENZO, H. K., SUSIN, S. A., PENNINGER, J. & KROEMER, G. 1999. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ*, 6, 516-24.
- MAINES, M. D. & MAYER, R. D. 1985. Inhibition of testicular cytochrome P-450-dependent steroid biosynthesis by cis-platinum. Reversal by human chorionic gonadotropin. *J Biol Chem*, 260, 6063-8.
- MANDAL, B. K. & SUZUKI, K. T. 2002. Arsenic round the world: a review. *Talanta*, 58, 201-35.
- MANGELSDORF, I., BUSCHMANN, J. & ORTHEN, B. 2003. Some aspects relating to the evaluation of the effects of chemicals on male fertility. *Regul Toxicol Pharmacol*, 37, 356-69.
- MARKER, P. C., DONJACOUR, A. A., DAHIYA, R. & CUNHA, G. R. 2003. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol*, 253, 165-74.
- MATHEWS, V., CHENDAMARAI, E., GEORGE, B., VISWABANDYA, A. & SRIVASTAVA, A. 2011. Treatment of acute promyelocytic leukemia with single-agent arsenic trioxide. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 3, e2011056.
- MATHEWS, V., GEORGE, B., LAKSHMI, K. M., VISWABANDYA, A., BAJEL, A., BALASUBRAMANIAN, P., SHAJI, R. V., SRIVASTAVA, V. M., SRIVASTAVA, A. & CHANDY, M. 2006. Single-agent arsenic trioxide in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: durable remissions with minimal toxicity. *Blood*, 107, 2627-32.
- MEEKER, J. D., ROSSANO, M. G., PROTAS, B., PADMANAHBAN, V., DIAMOND, M. P., PUSCHECK, E., DALY, D., PANETH, N. & WIRTH, J. J. 2010. Environmental exposure to metals and male reproductive hormones: circulating testosterone is inversely associated with blood molybdenum. *Fertil Steril*, 93, 130-40.
- MODI, M., KAUL, R. K., KANNAN, G. M. & FLORA, S. J. 2006. Co-administration of zinc and n-acetylcysteine prevents arsenic-induced tissue oxidative stress in male rats. *J Trace Elem Med Biol*, 20, 197-204.
- MOLDEUS, P. & COTGREAVE, I. A. 1994. N-acetylcysteine. *Methods Enzymol*, 234, 482-92.

- MONCADA, S., PALMER, R. M. & HIGGS, E. A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43, 109-42.
- NAVA-HERNANDEZ, M. P., HAUAD-MARROQUIN, L. A., BASSOL-MAYAGOITIA, S., GARCIA-ARENAS, G., MERCADO-HERNANDEZ, R., ECHAVARRI-GUZMAN, M. A. & CERDA-FLORES, R. M. 2009. Lead-, cadmium-, and arsenic-induced DNA damage in rat germinal cells. *DNA Cell Biol*, 28, 241-8.
- PANT, N., MURTHY, R. C. & SRIVASTAVA, S. P. 2004. Male reproductive toxicity of sodium arsenite in mice. *Hum Exp Toxicol*, 23, 399-403.
- PAOLICCHI, A., PEZZINI, A., SAVIOZZI, M., PIAGGI, S., ANDREUCCETTI, M., CHIELI, E., MALVALDI, G. & CASINI, A. F. 1996. Localization of a GSH-dependent dehydroascorbate reductase in rat tissues and subcellular fractions. *Arch Biochem Biophys*, 333, 489-95.
- POWELL, B. L., MOSER, B., STOCK, W., GALLAGHER, R. E., WILLMAN, C. L., STONE, R. M., ROWE, J. M., COUTRE, S., FEUSNER, J. H., GREGORY, J., COUBAN, S., APPELBAUM, F. R., TALLMAN, M. S. & LARSON, R. A. 2010. Arsenic trioxide improves event-free and overall survival for adults with acute promyelocytic leukemia: North American Leukemia Intergroup Study C9710. *Blood*, 116, 3751-7.
- RATNAIKE, R. N. 2003. Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgrad Med J*, 79, 391-6.
- REAGAN-SHAW, S., NIHAL, M. & AHMAD, N. 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*, 22, 659-61.
- REDDY, P. S., RANI, G. P., SAINATH, S. B., MEENA, R. & SUPRIYA, C. 2011. Protective effects of N-acetylcysteine against arsenic-induced oxidative stress and reprotoxicity in male mice. *J Trace Elem Med Biol*, 25, 247-53.
- RICKER, D. D., CRONE, J. K., CHAMNESS, S. L., KLINEFELTER, G. R. & CHANG, T. S. 1997. Partial sympathetic denervation of the rat epididymis permits fertilization but inhibits embryo development. *J Androl*, 18, 131-8.
- RISBRIDGER, G. P. 2006. Physiology of the Male Accessory Sex Structures: The Prostate Gland, Seminal Vesicles, and Bubourethral Glands. In: N, J. (ed.) *and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier.
- RIVLIN, J., MENDEL, J., RUBINSTEIN, S., ETKOVITZ, N. & BREITBART, H. 2004. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod*, 70, 518-22.
- ROBB, G. W., AMANN, R. P. & KILLIAN, G. J. 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil*, 54, 103-7.
- RUSSEL, L. D., ETTLIN, R.A., HIKIM, A.P.S, CLEGG, E.D. 1990. Mammalian Spermatogenesis. In: PRESS, C. R. (ed.) *Histological & Histopathological Evaluation of the Testis*. United States.
- SABLINA, A. A., BUDANOV, A. V., ILYINSKAYA, G. V., AGAPOVA, L. S., KRAVCHENKO, J. E. & CHUMAKOV, P. M. 2005. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med*, 11, 1306-13.
- SANTRA, A., CHOWDHURY, A., GHATAK, S., BISWAS, A. & DHALI, G. K. 2007. Arsenic induces apoptosis in mouse liver is mitochondria dependent and is abrogated by N-acetylcysteine. *Toxicol Appl Pharmacol*, 220, 146-55.
- SARKAR, M., CHAUDHURI, G. R., CHATTOPADHYAY, A. & BISWAS, N. M. 2003. Effect of sodium arsenite on spermatogenesis, plasma gonadotrophins and testosterone in rats. *Asian J Androl*, 5, 27-31.
- SEED, J., CHAPIN, R. E., CLEGG, E. D., DOSTAL, L. A., FOOTE, R. H., HURTT, M. E., KLINEFELTER, G. R., MAKRI, S. L., PERREAULT, S. D., SCHRADER, S., SEYLER, D., SPRANDO, R., TREINEN, K. A., VEERAMACHANENI, D. N. & WISE, L. D. 1996. Methods for assessing sperm motility,

- morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation. *Reprod Toxicol*, 10, 237-44.
- SOIGNET, S. L., FRANKEL, S. R., DOUER, D., TALLMAN, M. S., KANTARJIAN, H., CALLEJA, E., STONE, R. M., KALAYCIO, M., SCHEINBERG, D. A., STEINHERZ, P., SIEVERS, E. L., COUTRE, S., DAHLBERG, S., ELLISON, R. & WARRELL, R. P., JR. 2001. United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 19, 3852-60.
- SOIGNET, S. L., MASLAK, P., WANG, Z. G., JHANWAR, S., CALLEJA, E., DARDASHTI, L. J., CORSO, D., DEBLASIO, A., GABRILOVE, J., SCHEINBERG, D. A., PANDOLFI, P. P. & WARRELL, R. P., JR. 1998. Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med*, 339, 1341-8.
- SUZUKI YJ, F. H., SEVANIAN A. 1997. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biology & Medicine*, 22, 269-285.
- TOMITA, A., KIYOI, H. & NAOE, T. 2013. Mechanisms of action and resistance to all-trans retinoic acid (ATRA) and arsenic trioxide (As₂O₃) in acute promyelocytic leukemia. *Int J Hematol*, 97, 717-25.
- TUXHORN, J. A., AYALA, G. E. & ROWLEY, D. R. 2001. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol*, 166, 2472-83.
- VENDEMIALE, G., GRATAGLIANO, I. & ALTOMARE, E. 1999. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *Int J Clin Lab Res*, 29, 49-55.
- YI, J., GAO, F., SHI, G., LI, H., WANG, Z., SHI, X. & TANG, X. 2002. The inherent cellular level of reactive oxygen species: one of the mechanisms determining apoptotic susceptibility of leukemic cells to arsenic trioxide. *Apoptosis*, 7, 209-15.
- YOSHINO, Y., YUAN, B., MIYASHITA, S. I., IRIYAMA, N., HORIKOSHI, A., SHIKINO, O., TOYODA, H. & KAISE, T. 2009. Speciation of arsenic trioxide metabolites in blood cells and plasma of a patient with acute promyelocytic leukemia. *Anal Bioanal Chem*, 393, 689-97.
- ZHENG, Y., YAMAGUCHI, H., TIAN, C., LEE, M. W., TANG, H., WANG, H. G. & CHEN, Q. 2005. Arsenic trioxide (As₂O₃) induces apoptosis through activation of Bax in hematopoietic cells. *Oncogene*, 24, 3339-47.

Apêndices

As figuras e tabelas pertencentes a esta seção não foram incluídas no manuscrito, entretanto foram análises realizadas durante a execução do projeto de pesquisa que originou esta dissertação.

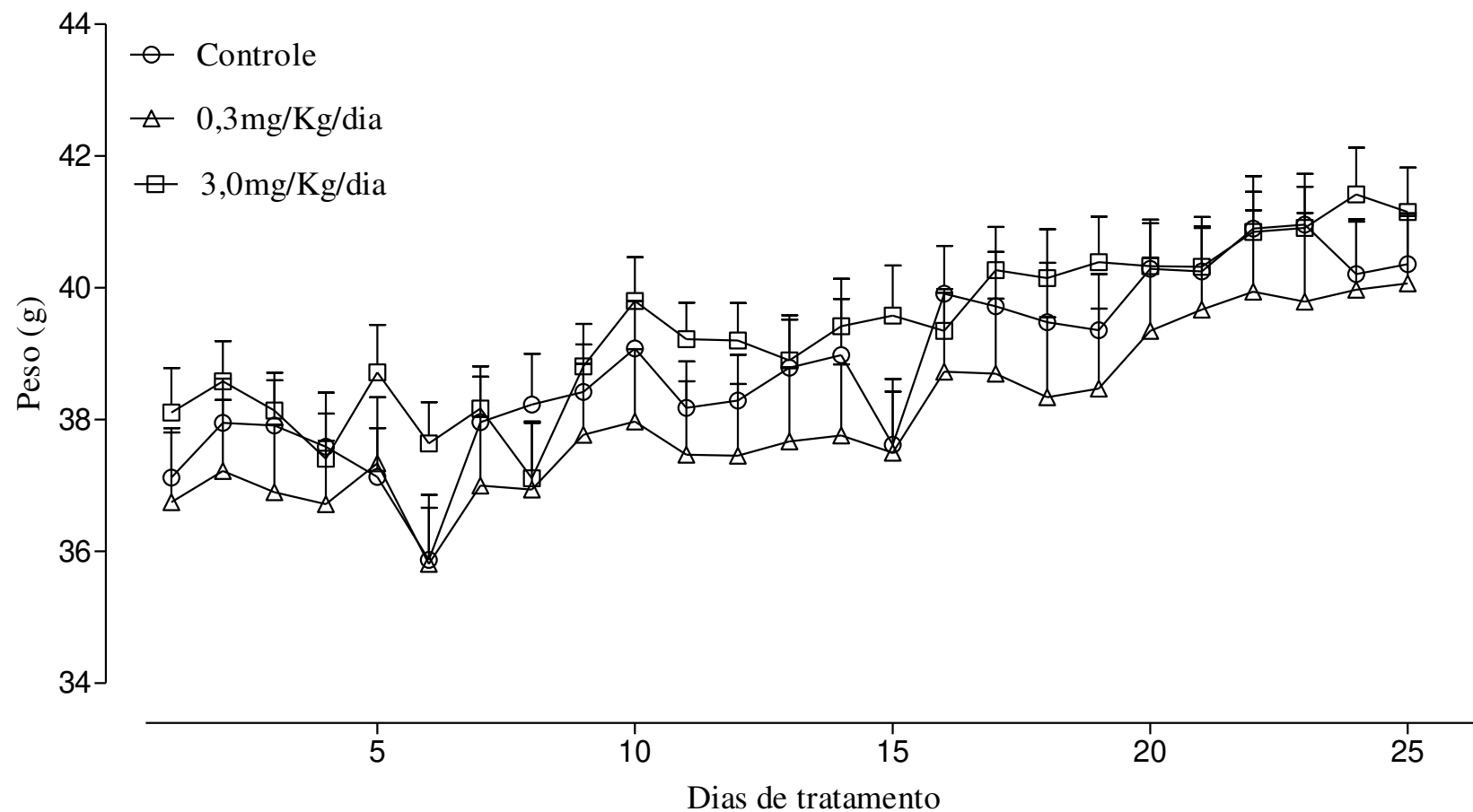


Figura 1. Evolução de peso corpóreo durante o tratamento dos animais controles e tratados com As_2O_3 (n=10/grupo) na etapa de avaliação imediata. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Teste ANOVA com teste a posteriori de Dunnett.

Tabela 1. Morfologia espermática de camundongos com 105 dias de idade, tratados com controle ou As_2O_3 , na etapa de avaliação imediata.

<i>Parâmetros</i>	<i>Controle (n=10)</i>	<i>0,3mg/kg (n=10)</i>	<i>3,0mg/kg (n=10)</i>
Espermatozoide normal	85,75 (84,88 - 87,00)	82,00 (80,13 - 86,50)	82,75 (78,88 - 85,88)
Espermatozoide com anormalidade de cabeça	8,50 (6,50 - 8,62)	8,50 (6,87 - 10,25)	9,25 (7,25 - 11,88)
Espermatozoide com anormalidade de cauda	6,00 (4,00 - 8,00)	8,00 (6,75 - 9,25)	6,50 (5,37 - 9,25)
Presença de gota citoplasmática	31,25 (23,25 - 39,50)	38,75 (18,75 - 54,25)	27,50 (19,25 - 46,00)

Valores expressos em mediana e intervalo interquartilico. Kruskal Wallis seguido de Dunn's.

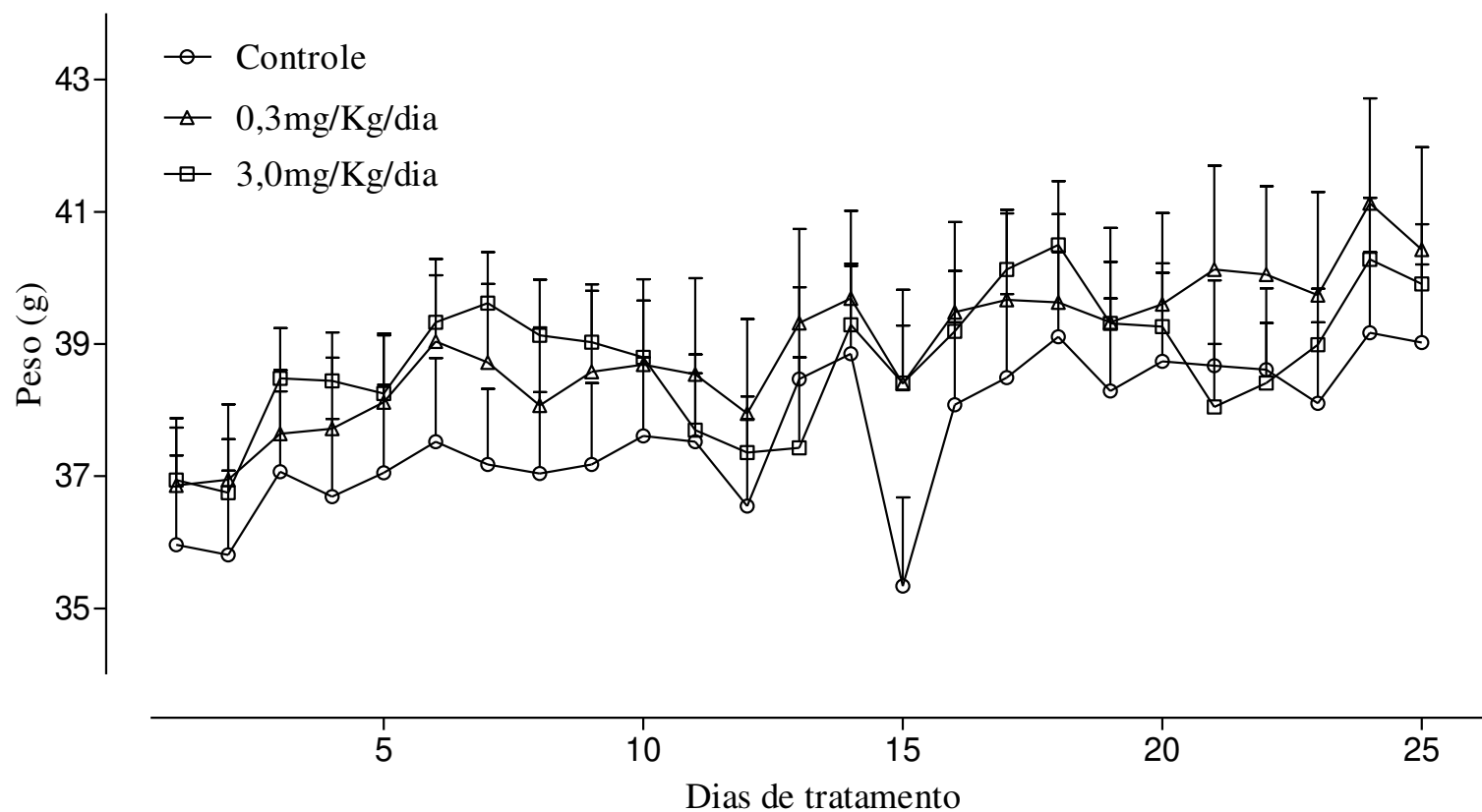


Figura 2. Evolução de peso corpóreo durante o tratamento dos animais controles e tratados com As_2O_3 (n=10/grupo) na etapa de avaliação tardia. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Teste ANOVA com teste a posteriori de Dunnett.

Tabela 2. Morfologia espermática de camundongos com 155 dias de idade, tratados com controle ou As₂O₃, na etapa de avaliação tardia.

<i>Parâmetros</i>	<i>Controle (n=10)</i>	<i>0,3mg/kg (n=8)</i>	<i>3,0mg/kg (n=10)</i>
Espermatozoide normal	89,50 (87,88 - 91,25)	90,50 (87,63 - 91,50)	91,00 (89,75 - 93,00)
Espermatozoide com anormalidade de cabeça	4,25 (3,50 - 6,62)	5,25 (2,87 - 8,75)	3,50 (2,75 - 6,00)
Espermatozoide com anormalidade de cauda	6,00 (3,87 - 6,62)	4,25 (3,62 - 5,00)	4,50 (4,00 - 5,00)
Presença de gota citoplasmática	22,00 (16,13 - 35,38)	30,50 (26,38 - 35,13)	33,50 (25,75 - 34,75)

Valores expressos em mediana e interval interquartílico. Kruskal Wallis seguido de Dunn's.

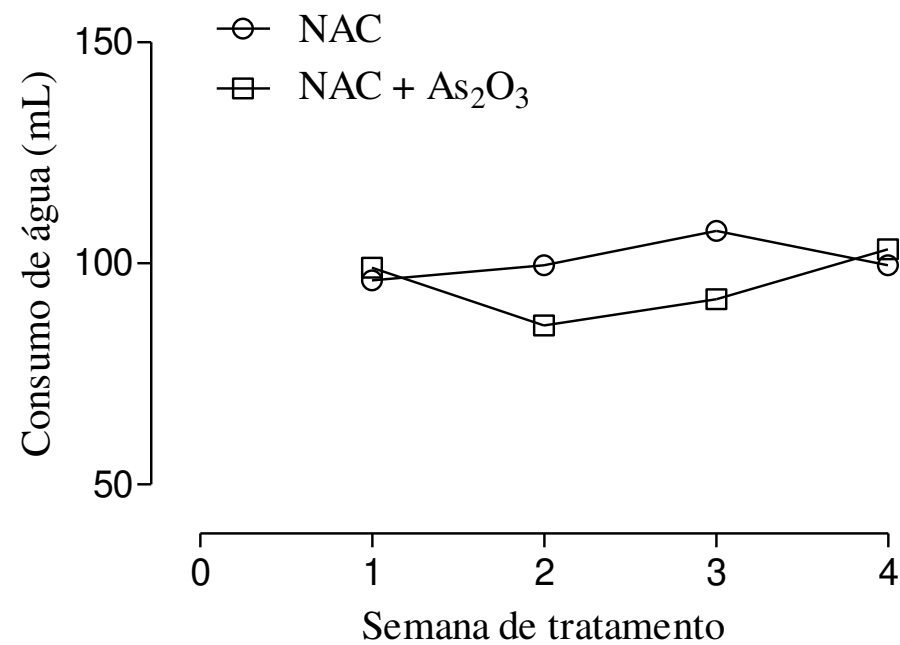


Figura 3. Controle do consumo de água contendo NAC nos dois grupos experimentais que receberam suplementação com o antioxidante. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Teste t seguido de Mann-Whitney.

Anexo

Certificado

Certificamos que o Protocolo nº **429-CEUA**, sobre "Avaliação dos efeitos dos trióxidos de arsênio sobre o sistema genital de camundongos adultos", sob a responsabilidade de **Wilma De Grava Kempinas**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado "Ad referendum" da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Botucatu, 29 de agosto de 2012.


Prof.ª Dr.ª Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro
Presidente da CEUA

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Dissertação de Mestrado** intitulada "*Ação protetora da N-acetilcisteína sobre efeitos irreversíveis do trióxido de arsênio no sistema genital de camundongos Swiss*":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

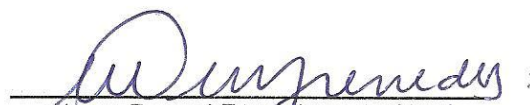
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº _____, Instituição: _____

(X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 429, Instituição: Universidade Estadual Paulista – UNESP Botucatu.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

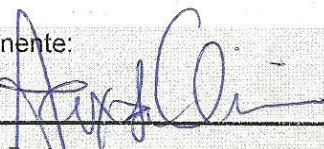

Aluna: Raquel Frenedoso da Silva


Orientadora: Wilma De Grava Kempinas

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Prof. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura