




Patrícia Carvalho Garcia

Papel do zinco sobre a
fertilidade e função testicular
de ratos expostos ao tabaco

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista -
UNESP, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor
no Programa de Pós-Graduação em
Fisiopatologia em Clínica Médica
(Área de Concen-tração: Saúde).

Botucatu - SP
2009



Patrícia Carvalho Garcia

**PAPEL DO ZINCO SOBRE A FERTILIDADE E FUNÇÃO
TESTICULAR DE RATOS EXPOSTOS AO TABACO**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica (Área de Concentração: Saúde).

Orientador: Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira

Botucatu – SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *Rosemeire Aparecida Vicente*

Garcia, Patricia Carvalho.

Papel do zinco sobre a fertilidade e função testicular de ratos expostos ao tabaco / Patrícia Carvalho Garcia. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientador: Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira
Assunto CAPES: 40101002

1. Fumo – Vício. 2. Fertilidade. 3. Zinco.

CDD 616.07

Palavras-chave: Espermatozóides; Fertilidade; Função testicular; Tabaco; Zinco.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP

Faculdade de Medicina de Botucatu

Candidata: Patrícia Carvalho Garcia

Tese: Papel do zinco sobre a fertilidade e função testicular de ratos expostos ao tabaco

Orientador: Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a 18/02/2009, considerou

() Aprovada

() Reprovada

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....



Dedicatória



A Deus

Presença constante em minha vida!

*Aos meus Pais: Durval e Maria José
e aos meus irmãos: Mirna, Mirela, Marcelo e Alexandre.*

*Pelo imenso amor, enorme compreensão, orações e constante
estímulos que me impulsionaram a buscar vida nova a cada dia,
meus agradecimentos por terem aceito se privar de minha companhia
pelos estudos, concedendo a mim a oportunidade de me realizar ainda mais.*

Ao Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira

*Não existem palavras que possam exprimir a gratidão
e o reconhecimento por transmitir suas experiências
e conhecimentos com muita dedicação e respeito.
Obrigada por todos esses anos preciosos de ensinamentos!*

Ao meu namorado Fabiano Paixão

*Se hoje consigo subir mais um degrau da escada
da vida é porque sempre tive você ao meu lado.*

Obrigada por fazer parte de minha vida!



Agradecimentos



*A realização deste trabalho só foi possível graças á colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto a todas elas e de maneira particular: a todos os amigos do Hemocentro que sempre me incentivaram e me ajudaram a vencer mais um obstáculo: **Adriana, Ana Cláudia, Carla, Claudete, Cléo, Fernando, Gleide, Giancarla, José Mauro, Marcelo, Márcia, Nádia, Pollyanna, Sandra, Silvio, Rosane, Rejane, Rute** e muitos que não citarei nome, mas que estão no meu coração, muito obrigado!*

*A **Dra. Eliana Milanesi Rubio**, que me ensinou os primeiros passos da pesquisa científica e de Educação, além de me apoiar e acreditar no meu trabalho.*

*Aos amigos **Michele, Renata e Rodrigo** pelos ensinamentos, dedicação e auxílios prestados nos experimentos.*

*Aos amigos e professores do Departamento de **Clínica Médica e Farmacologia**, por terem contribuído para meu crescimento intelectual e profissional.*

*Aos amigos dos Laboratórios Experimentais, em especial **Ivone, Georgette, Mário e Davidson**, pelos cuidados com os animais e auxílio no desenvolvimento do protocolo experimental.*

*Ao Professor Doutor **Carlos Alberto Padovani**, pelos auxílios prestados com maior competência para a realização da análise estatística deste trabalho.*

Aos amigos do departamento de Farmacologia pela amizade e pelas experiências acadêmicas trocadas

Agradecimentos

A Maria Inês e Valéria Secco, pelos muitos ensinamentos, sempre me acolhendo e incentivando minha vida profissional. Obrigado por acreditarem em mim

Às funcionárias da biblioteca pela revisão das referências bibliográficas.

Aos animais de laboratório utilizados para que este trabalho pudesse ser desenvolvido.

Aos amigos que embora não tenham contribuído diretamente, estão sempre ao meu lado.



Epígrafe



Certeza!

*De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...
Portanto devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda um passo de dança...
Do medo uma escada...
Do sonho uma ponte...
Da procura um encontro...*

(Fernando Pessoa)



Resumo



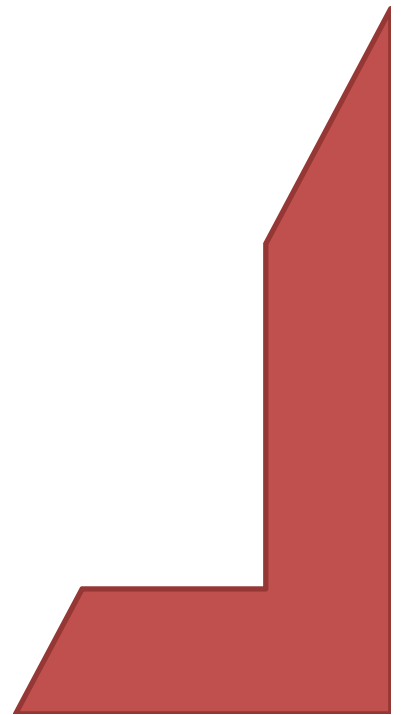
GARCIA, P.C. Papel do zinco sobre a fertilidade e função testicular de ratos expostos ao tabaco. 2009. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, São Paulo.

Aproximadamente um terço da população mundial é tabagista. Devido ao fato de ser um carcinógeno que causa mutações nas células somáticas, o tabaco pode afetar a saúde reprodutiva masculina. No homem o tabagismo é um fator de risco para o desenvolvimento de diversas enfermidades urológicas, embora o mecanismo exato de atuação seja ainda desconhecido. Por outro lado, ao analisarmos os aspectos reprodutivos, verificamos que o zinco é essencial para a espermatogênese como um co-fator de metaloenzimas envolvidas na transcrição do DNA, na expressão dos receptores esteróides e na síntese protéica, bem como apresenta ação anti-oxidante e anti-apoptótica. Com base nestas informações, o objetivo do presente trabalho consistiu em analisar o papel do zinco sobre a fertilidade e função testicular de ratos expostos ao tabaco. Ratos Wistar com 60 dias de idade (n=10/grupo) foram divididos em quatro grupos G1 (grupo controle), G2 (expostos a fumaça do tabaco-20 cigarros/dia), G3 (grupo controle suplementado com zinco-20mg/Kg cloreto de zinco diariamente por gavagem) e G4 (expostos a fumaça do tabaco e suplementados com zinco). A duração do tratamento foi de oito semanas. Ao final do experimento foram avaliados os seguintes parâmetros: massa corporal, peso úmido dos órgãos da reprodução e da glândula adrenal, concentração plasmática de testosterona, função testicular (análise seminal e produção diária de espermatozóides), fertilidade e comportamento sexual. As respostas farmacológicas da musculatura lisa genital acessória masculina (vesícula seminal e ducto deferente) a drogas autonômicas e danos no DNA do espermatozóide foram também avaliados. Os resultados foram comparados entre si pela análise de variância não-paramétrica, para modelo com dois fatores, complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey, $p < 0,05$. No grupo G2 (exposto ao tabaco) observou-se uma diminuição na concentração de testosterona associada à diminuição na concentração, na motilidade e na morfologia dos espermatozóides. Em consequência desses efeitos tóxicos na espermatogênese verificaram-se taxas reduzidas de fertilidade e viabilidade fetal. Foram também observados comprometimento no comportamento sexual masculino e dano no DNA dos espermatozóides. No ducto deferente a exposição ao tabaco levou a uma diminuição na resposta contrátil à noradrenalina sem comprometer a sensibilidade. Finalizando, a suplementação com zinco foi capaz de proteger os danos tóxicos que o tabaco provocou nos espermatozóides e na fertilidade. A exposição ao tabaco mostrou-se também relacionada a uma diminuição na qualidade seminal. Demonstrou-se assim uma correlação, entre o tabagismo e a infertilidade/subfertilidade masculina, enquanto que a suplementação com zinco protegeu a maioria das alterações provocadas pelo tabaco. Portanto o zinco, um agente anti-oxidante e estimulante de divisão celular, pode ser indicado como um tratamento promissor em homens com infertilidade provocada pelos componentes tóxicos do tabaco.

Palavras- chave: espermatozóides – tabaco - zinco - fertilidade – função testicular



Abstract



GARCIA, P.C. Role of zinc on fertility and testicular function of rats exposed to tobacco. 2009. Doctor Thesis- Botucatu Medical School, São Paulo State University – UNESP, São Paulo.

About one-third of the world's male population smokes tobacco daily. Considering the larger number of men worldwide who smoke, and that cigarette is a known somatic cells mutagen and carcinogen, there is a major concern that smoking may adversely affect male reproductive health. For men the smoking is a risk factor for the development of a variety of urological diseases, although the exact mechanism of action is still unknown. Furthermore, when we look at the reproductive issues, we found that zinc is essential for spermatogenesis as a co-factor of metalloenzyme involved in the transcription of DNA, the expression of steroid receptors and protein synthesis. In addition, zinc presents anti-oxidant and anti-apoptotic actions. Based on this information, the purpose of this study was to examine the role of zinc on fertility and testicular function in rats exposed to tobacco. Male Wistar rats were divided into four groups (10/group): Control (G1), Cigarette smoke (G2), Zinc (G3: Zn 20mg/kg-daily by gavages) and Zinc/cigarette (G4). The treatment was applied during eight weeks. After finishing the treatment, the following parameters were analyzed: body weight, wet weight of the reproductive organs and the adrenal gland; plasma testosterone concentration, testicular function (seminal analysis and daily production of spermatozoa); fertility and sexual behavior. The pharmacological responses of male accessory genital smooth muscle (vas deferens and seminal vesicle) to autonomic drugs and DNA damage in the spermatozoa were also evaluated. The results were compared by non-parametric analysis of variance, for model with two factors, and the test for multiple comparisons of Tukey was applied when necessary, $p < 0.05$. The exposure to cigarette smoke decreased the concentration of testosterone parallel to a decrease in the concentration, morphology, and motility of spermatozoa. As a result of these toxic effects on spermatogenesis the rates of fertility and fetal viability were reduced. Impairment was also observed in male sexual behavior and damages the DNA in spermatozoa. The vas deferens exposure to tobacco led to a decrease in contractile response to norepinephrine without compromising the sensitivity to this drug. Finally, zinc supplementation was able to protect the toxic damage that smoking caused in the spermatozoa and fertility. Exposure to tobacco proved to be also linked to a decrease in spermatozoa quality. This study showed a correlation between the smoking and male infertility/subfertility, and that the majority of the changes caused by smoking was protected by zinc supplementation. As a result the zinc, an anti-oxidant agent and stimulant of cell division, can be indicated as a promising treatment in men with infertility caused by toxic components of tobacco.

Key-words: spermatozoa – tobacco – zinc – fertility – testicular function



*Lista de Figuras e
Tabelas*



LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Aparato utilizado para a exposição à fumaça do cigarro.....35
- Figura 2:** A) Laparotomia exploratória; B) Dissecação de órgãos da reprodução e glândula adrenal.....37
- Figura 3:** Análise seminal: A) Câmara de Makler; B) Amostra de espermatozóides na câmara de Makler vista ao microscópio (10x); C) Vitalidade espermática (cabeça incolor = vivo e cabeça corada = morto) (40x); D) Análise morfológica (40x).....39
- Figura 4:** A) Câmara de Neubauer vista ao microscópio com os cinco quadrantes escolhidos para contagem; B) Ampliação do quadrante e visualização das espermátides ou das cabeças de espermatozóides.....40
- Figura 5:** Laparotomia exploratória. A) Visualização dos cornos uterinos; B) Ponto de reabsorção fetal; C) Ovários dissecados e corpos lúteos separados.....42
- Figura 6:** Comportamento sexual. A) Caixa de observação; B) Comportamento sexual masculino de monta com intromissão e fêmeas em lordose.....44
- Figura 7:** A) Polígrafo - transdutor de força isométrico e câmara muscular de órgão isolado; B) Curvas concentração-resposta.....47
- Figura 8:** A) Equipamentos para a corrida de eletroforese: cuba de eletroforese com banho de gelo e fonte de eletroforese; B) Microscópio de Fluorescência acoplado ao software Comet Assay II.....49
- Figura 9:** Taxas de perda pré- e pós-implantação, implantação e viabilidade fetal, de ratas que acasalaram com machos dos grupos controle, tabaco, zinco e tabaco + zinco.....57
- Figura 10:** Curvas concentração-resposta para ACh (Acetilcolina) de vesícula seminal isolada de ratos dos grupos controle, tabaco, zinco e tabaco + zinco.....59
- Figura 11:** Curvas concentração-resposta para a MCh (Acetil- β -metilcolina) de vesícula seminal isolada de ratos dos grupos controle, tabaco, zinco e tabaco + zinco.....60
- Figura 12:** Lâminas contendo os espermatozóides dos diferentes grupos experimentais analisadas pelo Software do Teste do COMETA para danos oxidativos no DNA. A) espermatozóides dos ratos do grupo controle; B) espermatozóides dos ratos do grupo tabaco; C) espermatozóides dos ratos do grupo zinco; D) espermatozóides dos ratos do grupo tabaco + zinco.....63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Massa corporal, peso úmido de órgãos da reprodução, da glândula adrenal e testosterona plasmática dos ratos dos grupos controle, tabaco, zinco e tabaco+zinco.....52
- Tabela 2:** Análise seminal (vitalidade, motilidade, morfologia e concentração) dos ratos dos grupos controle, tabaco, zinco e tabaco+zinco.....53
- Tabela 3:** Contagem espermática (Número de espermátides, Produção diária de espermatozóides, Número de espermatozóides na cabeça/corpo e cauda do epidídimo e trânsito espermático) de ratos dos grupos controle, tabaco, zinco e tabaco+zinco.....55
- Tabela 4:** Número de ratas acasaladas e prenhes, corpos lúteos, fetos vivos, sítios de reabsorção, pontos de implantação, índices gestacional, de fertilidade e de masculinidade, obtidos a partir do teste de fertilidade com machos dos grupos controle, tabaco, zinco e tabaco + zinco.....56
- Tabela 5:** Comportamento sexual (latência para a 1ª intromissão, número de intromissões, latência para a 1ª ejaculação, latência para intromissão pós-ejaculação, número de intromissões pós-ejaculação, número total de intromissões e número total de ejaculações) dos ratos dos grupos controle, tabaco, zinco e tabaco + zinco.....58
- Tabela 6:** Respostas farmacológicas dos agonistas total Acetilcolina (ACh) e parcial Acetil-β-metilcolina (MCh) em vesícula seminal isolada de ratos adultos dos grupos controle, tabaco, zinco e tabaco + zinco.....60
- Tabela 7:** Resposta farmacológica do agonista total Noradrenalina em vesícula seminal e ducto deferente isolados de ratos dos grupos controle, tabaco, zinco e tabaco + zinco.....61
- Tabela 8:** Análise dos danos oxidativo do DNA nos espermatozóides dos grupos controle, tabaco, zinco e tabaco + zinco, através do teste do COMETA.....63



Sumário



SUMÁRIO

1	Introdução	22
2	Objetivo	30
3	Material e Métodos	32
3.1.	Animais	32
3.2.	Drogas e reagentes	32
3.3.	Acasalamento e diagnóstico de prenhez	33
3.4.	Grupos experimentais	33
3.5.	Exposição ao cigarro	34
3.6.	Determinação da concentração plasmática de testosterona	35
3.7.	Massa corporal e peso úmido de órgãos da reprodução	36
3.8.	Avaliação da função testicular	37
3.9.	Análise reprodutiva	40
3.10.	Parâmetros farmacológicos	44
3.11.	Determinação de danos oxidativos no DNA	47
3.12.	Análise dos resultados	49
4	Resultados	51
5	Discussão	65
6	Conclusões	77
7	Referências Bibliográficas	79
8	Anexos	94



Introdução



1 INTRODUÇÃO

O tabaco foi usado inicialmente nas Américas com propósitos religiosos e cerimoniais. Atualmente, aproximadamente, um terço da população mundial de 15 anos ou mais é tabagista (fumantes ativos), o que corresponde a 1,2 bilhões de pessoas. Uma parcela significativa de indivíduos é também afetada quando estes inalam fumaça proveniente do cigarro (fumantes passivos) (DAVIS, 1997; ZENZES, 2000; YACH & BETTCHER, 2000). O tabagismo é reconhecido mundialmente como um perigo à saúde e como principal causa de algumas patologias. Porém, dados nacionais recentes têm mostrado prevalência ao redor de 40% entre homens e de 25% entre mulheres (BRASIL, 2004).

Considerando-se o grande número de tabagistas e o fato de que o tabaco é um conhecido carcinógeno que causa mutações nas células somáticas, há um consenso que o tabaco pode afetar a saúde reprodutiva masculina (SCHIMIDT, 1986; VINE, 1996; ZAVOS *et al.*, 1998; KAPAWA *et al.*, 2004). Entretanto, por razões éticas, não é possível testar tal hipótese em humanos através de um estudo randomizado e controlado. Além disso, poucos constituintes do tabaco foram avaliados em relação à sua toxicidade ou efeito no espermatozóide humano (SERGERIE *et al.*, 2000; SALEH *et al.*, 2002). Portanto, o impacto do tabaco na fertilidade masculina permanece ainda um assunto altamente controverso. Vários estudos mostram que o tabaco tem um efeito prejudicial na qualidade do sêmen, mais significativamente na concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides (VINE *et al.*, 1996; MERINO *et al.*, 1998; MAK *et al.*, 2000). Além disso, o cigarro foi também associado a um prejuízo na capacidade de penetração do espermatozóide (SOFIKITIS *et al.*, 1995). Adicionalmente, pais que fumavam tiveram um aumento significativo na porcentagem de espermatozoides com algum dano no DNA (POTTS *et al.*, 1999; LU & MORIMOTO, 2008) e um elevado risco de defeitos ao nascimento, além do aparecimento de câncer na

infância em seus descendentes (ZHANG *et al.*, 1992; SORAHAN, 1995; SORAHAN *et al.*, 1997). Por outro lado, estudos não encontraram associação entre o tabaco e a qualidade do esperma (HOIDAS *et al.*, 1985; VOGT *et al.*, 1986), prejuízo na capacidade de penetração ou dano no DNA do espermatozóide (SERGERIE *et al.*, 2000). Tais resultados contraditórios seriam, em parte, devido ao fato de que estes estudos foram conduzidos em duas populações diferentes: homens saudáveis e homens inférteis. Outra importante fonte de conflito entre os estudos pode ser a dificuldade em controlar fatores que se misturam como a exposição a outras substâncias tóxicas, *status* socioeconômico e anormalidades na genitália masculina (SALEH *et al.*, 2002).

Há relatos de diminuição na concentração dos espermatozóides e do volume do sêmen nos últimos 50 anos (CARLSEN *et al.*, 1992; YOUNGLAI, *et al.*, 1998). Isto vem sendo associado a fatores ambientais e ao estilo de vida (SHARPE *et al.*, 2000; SHARPE & FRANKS, 2002; POLANSKA & WIDLAK, 2003). Diferentemente das causas genéticas de infertilidade masculina, causas ambientais de infertilidade são de particular interesse devido à possibilidade de medidas curativas ou preventivas. Um fator significativo e corrigível é a nutrição e mudança de estilo de vida. Estudos experimentais em animais têm demonstrado a importância dos efeitos da nutrição na espermatogênese (KWIECINSKI *et al.*, 1989; VAN PELT & ROOIJ, 1991; CIERESZKO & DABROWSKI, 1995; WONG *et al.*, 2000a). Infertilidade pode ser definida como a incapacidade de um casal sexualmente ativo, sem a utilização de métodos contraceptivos, de estabelecer gravidez dentro de um período de um ano, período no qual por volta de 90% dos casais o fazem. Ela é um fenômeno universal que atinge aproximadamente 8% a 15% dos casais, independente dos fatores socioeconômicos ou culturais (WHO, 1999). Aproximadamente 25% de todos os casos de infertilidade masculina são atribuídos a defeitos nos espermatozóides. Destes casos, em 50% o defeito ocorre no espermatozóide e pode estar relacionado ao consumo de tabaco (HULL *et al.*, 2000). É

importante se considerar que a infertilidade é um grande fardo psicológico e social para o casal, que se vê incapaz de ter descendentes que possam vir a complementar seus projetos de vida. O quadro atual das pesquisas sobre infertilidade mostra efeitos psicológicos múltiplos e inter-relacionados. Pode abranger desde aqueles propriamente pessoais, como o estresse, sentimentos de perda e o comprometimento da auto-estima, até as dificuldades para o relacionamento conjugal, implicando mesmo em prejuízo para o relacionamento social mais extenso (DUNKEL-SCHETTER & LOBEL, 1991; HANSELL *et al.*, 1998; TRINDADE & ENUMO, 2002).

No homem o tabagismo é também um fator de risco para o desenvolvimento de diversas enfermidades urológicas, embora o mecanismo exato de atuação seja ainda desconhecido (MIKHAILIDIS *et al.*, 1998). A presença de cotinina, metabólito da nicotina, no líquido seminal foi associada à toxicidade aos espermatozóides, alterando a morfologia, diminuindo a motilidade e levando o homem a uma condição de subfertilidade (PATTERSON *et al.*, 1990; VINE *et al.*, 1996; WONG *et al.*, 2000b). Por outro lado, Trummer *et al.* (2002) correlacionaram o tabagismo com baixos níveis de testosterona e um aumento no número de leucócitos no sêmen. Este último, por sua vez, está associado ao estresse oxidativo seminal pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SALEH *et al.*, 2002; PASQUALOTTO *et al.*, 2008). Portanto, o sêmen de indivíduos tabagistas pode apresentar altos níveis de estresse oxidativo devido à quantidade elevada de EROs e uma capacidade antioxidante reduzida (ASAMI *et al.*, 1997; FRAGA *et al.*, 1996; ZENZES *et al.*; 1999).

O mecanismo de ação das EROs na fisiologia normal dos espermatozóides não foi completamente elucidado. Vários resultados de estudos convergem para a definição de que os processos de hiperativação, capacitação, ligação com a zona pelúcida e reação acrossômica sejam processos oxidativos ou regulados por redução (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1995; DE LAMIRANDE *et al.*, 1997; AITKEN *et al.*, 1991). Fisiologicamente, existe um

equilíbrio entre a produção de EROs e a proteção antioxidante. Os agentes antioxidantes estão presentes tanto no gameta masculino (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase/redutase, entre outros) quanto no plasma seminal (albumina, piruvato, taurina, hipotaurina e vitaminas C e E, entre outros) (DE LAMIRANDE *et al.*, 1997). No entanto, os espermatozóides por si próprios possuem uma capacidade limitada de resistir ao estresse oxidativo, sendo altamente dependentes do sistema de proteção antioxidante do plasma seminal. Isto ocorre porque os espermatozóides possuem apenas uma pequena quantidade de citoplasma em sua porção intermediária, o que por sua vez não é suficiente para a proteção completa da membrana. Desta forma, a pouca quantidade de citoplasma e a presença de grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados na membrana plasmática dos espermatozóides os tornam susceptíveis ao estresse oxidativo (AITKEN, 1994). Assim, a produção excessiva de EROs leva à peroxidação lipídica, responsável por uma série de eventos deletérios que afetam a integridade da cromatina espermática, causam alta frequência de quebra de fitas de DNA (FRAGA *et al.*, 1996; AITKEN & KRAUSZ, 2001; HAUSER *et al.*, 2003); podendo prejudicar a concentração, motilidade e a morfologia dos espermatozóides comprometendo assim seu bom funcionamento; diminuem a taxa de reação acrossômica, capacitação espermática e ligação do espermatozóide à zona pelúcida do oócito devido a perda de fluidez da membrana (ALVAREZ *et al.*, 1987; AGARWAL *et al.*, 1994; REQUENA *et al.*, 1997; PASQUALOTTO *et al.*, 2000; SHARMA *et al.*, 1999) e finalmente, podem provocar a destruição da membrana plasmática levando à morte celular (CHEESEMAN & SLATER, 1993; YAGI, 1987). Embora exista um consenso em relação ao estresse oxidativo como a principal fonte de dano ao espermatozóide, pouco se progrediu para o desenvolvimento de terapias antioxidantes para a infertilidade. Reforçando esses achados, estudo anterior realizado em nosso laboratório (GARCIA *et al.*, 2004), mostrou que

indivíduos tabagistas apresentavam diminuição na qualidade seminal (volume, concentração, motilidade e morfologia) levando a um estado de subfertilidade.

Adicionalmente, o tabaco contém substâncias químicas, que são capazes de induzir aneuploidia, uma das mais comuns e sérias anormalidades cromossômicas que afetam os embriões e a prole humana. A aneuploidia compreende um dos maiores defeitos genéticos que pode ser transmitido via espermatozóide (RUBES *et al.*, 1998; SHI *et al.*, 2001; COMHAIRE *et al.*, 2000). O mecanismo ainda é incerto, mas sabe-se que o tabaco contém agentes aneugênicos e mutagênicos que podem atuar diretamente na meiose das células germinativas após a formação de metabólitos tóxicos (RUBES *et al.*, 1998; ROBBINS *et al.*, 2005). Os espermatozoides e as espermátides parecem ser altamente vulneráveis a mutações químicas durante o período pós-meiótico, quando freqüentemente aparecem novos pontos de mutações e rearranjos estruturais nos cromossomas (SALEH *et al.*, 2002; SAKKAS *et al.*, 2002). Os espermatozoides, desta maneira, representam o produto celular final do processo de indução, acumulação de dano cromossomal e mutação gênica que tenham ocorrido na linhagem germinativa masculina. Agravante é o fato de que as células espermáticas possuem pouca capacidade de reparo e, portanto, o risco de transmissão paterna de dano genotóxico é grande (ZENZES *et al.*, 1999; SAID, 2003; SHAMSI *et al.* 2008).

O zinco é um micronutriente que atua como co-fator para mais de 80 metaloenzimas envolvidas na transcrição do DNA e na síntese protéica (EBISCH *et al.*, 2006). Uma vez que a transcrição do DNA é a principal parte do desenvolvimento das células germinativas, o zinco é comumente importante para a reprodução. Desta forma, algumas proteínas formadas com a participação do zinco estão implicadas na expressão genética dos receptores dos hormônios esteróides (FAVIER, 1992; FREEDMAN, 1992). O zinco também têm propriedades anti-apoptóticas (CHIMIENTI *et al.*, 2003), anti-depressivas (CIESLIK *et al.*,

2007) e anti-oxidantes (ZAGO & OTEIZA, 2001). Dois mecanismos para essa função antioxidante foram descritos: o zinco pode agir contra a oxidação pela ligação aos grupos sulfidril em proteínas, e por ocupar os sítios de ligação do ferro e cobre em lipídios, proteínas e DNA (BRAY & BETTGER, 1990; ZAGO & OTEIZA, 2001).

O sistema antioxidante sanguíneo é classificado em enzimático e não enzimático. O enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes: a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido (O_2^*) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 , a catalase (CAT) que atua na decomposição de H_2O_2 a O_2 e H_2O e a glutathiona peroxidase (GPx) que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutathiona como co-fator (VASCONCELOS *et al.*, 2007). A SOD corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD. A forma SOD – cobre/zinco está presente principalmente no citoplasma, enquanto que SOD - manganês está localizada primariamente na mitocôndria (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). A enzima Cu-Zn SOD é a primeira linha de defesa contra as espécies reativas do oxigênio e contra a peroxidação do lipídio (SUN *et al.*, 2006).

Na reprodução masculina o zinco parece ser importante em vários aspectos como: esteroidogênese testicular (FAVIER, 1992; HAMDI *et al.*, 1997; AGARWAL & SALEH, 2002); desenvolvimento testicular (HAMDI *et al.*, 1997); consumo de oxigênio pelo espermatozóide (ELIASSON *et al.*, 1971; HUACUJA *et al.*, 1973); condensação da cromatina nuclear (KVIST *et al.*, 1990); reação acrossômica (RIFFO *et al.*, 1992); atividade da acrosina (STEVEN *et al.*, 1982); estabilização da cromatina do espermatozóide (KVIST *et al.*, 1990); síntese de testosterona (LEAKE *et al.*, 1984), e conversão de testosterona a 5α – dihidrotestosterona (NETTER *et al.*, 1981). As concentrações de zinco estão muito elevadas nos órgãos genitais masculinos, comparadas a outros tecidos e fluídos corporais (MANN, 1964), particularmente na glândula prostática a qual é amplamente responsiva às altas

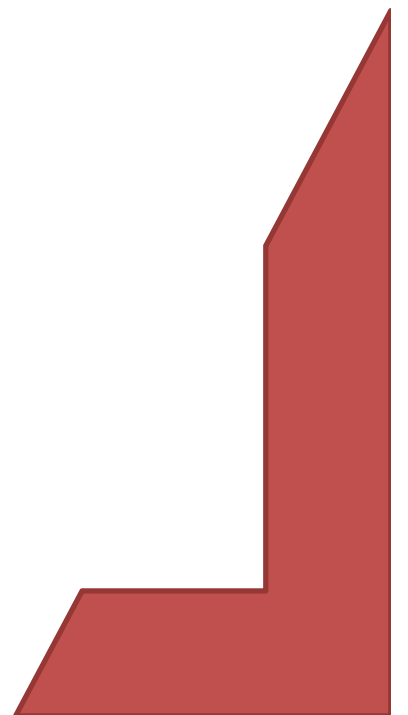
quantidades de zinco no plasma do sêmen. Os próprios espermatozóides contêm zinco, provenientes dos testículos (KVIST *et al.*, 1990). Entretanto, a relação entre as concentrações de zinco no sêmen e os parâmetros de fertilidade, entretanto, não estão elucidados.

Omu *et al.* (1998) demonstraram que a terapia com zinco apresenta um importante papel no tratamento de pacientes astenozoospermicos, provavelmente pela sua ação antioxidante, estabilizando a membrana do espermatozóide. Neste sentido, Koca *et al.* (2003) demonstraram que pacientes inférteis tem uma diminuição nos níveis de frutose e zinco no sêmen, sendo estes associados a uma diminuição na capacidade antioxidante, resultando em dano na função dos espermatozóides. Estudos recentes também associam a deficiência de zinco como fator de risco para subfertilidade masculina e após tratamento com o zinco foi observada uma melhora na concentração e na motilidade dos espermatozóides dos pacientes inférteis (WONG *et al.*, 2000b; WONG *et al.*, 2002; HAIDL, 2002).

Dessa forma, torna-se interessante uma maior atenção ao estilo de vida, hábitos alimentares e/ou exposição a determinadas substâncias que possam levar a prejuízos na reprodução, comprometendo assim a perpetuação das espécies. Procurou-se, desta maneira, demonstrar os prováveis efeitos ocasionados pelo tabaco sobre a fertilidade e verificar se um micronutriente como zinco, importante para a espermatogênese, pode proteger desses efeitos.



Objetivos



2. OBJETIVO GERAL

Investigar alterações reprodutivas resultantes da exposição ao tabaco em ratos e o papel do zinco como um possível protetor.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Investigar se a exposição ao tabaco em ratos pode causar disfunções:
 - no comportamento sexual, na fertilidade e parâmetros seminais;
 - na concentração plasmática de testosterona, no peso corporal e de órgãos acessórios da reprodução;
 - no padrão de resposta da vesícula seminal e ducto deferente a drogas autonômicas;
 - no DNA do espermatozóide;
- Avaliar se a suplementação com zinco pode atuar como um possível protetor das disfunções resultantes da exposição ao tabaco.



*Material e
Métodos*



3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos albinos Wistar, machos e fêmeas, provenientes da colônia do Biotério da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP. Para realização dos experimentos, os animais foram transferidos para o Centro de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, onde foram mantidos sob condições padronizadas (temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade de $55 \pm 5\%$, fotoperíodo de 12h claro/12h escuro) e com água e ração à vontade. O projeto de pesquisa e o protocolo experimental foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (protocolo 430-anexo).

3.2. DROGAS E REAGENTES

Acetilcolina (acetylcholine chloride, Sigma Co., EUA); Acetil- β -metilcolina (acetyl- β -methylcholine, Sigma Co., EUA); Ácido ascórbico P.A. (L-ascorbic chloride, Sigma Co., EUA); Adrenalina (epinephrine bitartrate, Sigma Co., EUA); Albumina bovina (Sigma Co., EUA); Bicarbonato de sódio P.A. (NaHCO_3 , Lab. Synth, Brasil); 17β -Benzoato de Estradiol (Sigma Co., EUA); Cloreto de cálcio diidratado P.A. ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Lab. Nuclear, Brasil); Cloreto de potássio P.A. (KCl, Lab. Pro Analysis, Brasil); Cloreto de sódio P.A. (NaCl, Lab. Nuclear, Brasil); Cocaine hydrochloride (Lab. Merck do Brasil); Corticosterona (Sigma Co., EUA); DL-Propranonol (Sigma Co., EUA); DTT (^{DL}-Dithiothreitol, Sigma Co., EUA); EDTA (Invitrogen S.A, EUA); Fenilefrina (phenylephrine hydrochloride, Sigma Co., EUA); Fosfato de sódio hidratado P.A. ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Lab. Merck do Brasil); Glicose P.A. (Lab. Inlab, Brasil); Noradrenalina (arterenol hydrochloride, Sigma Co., EUA); Prazosin hydrochloride (Pfizer S.A); Propionato de Testosterona (Sigma Co., EUA); Pentobarbital Sódico (Hypnol 3%, Fontoveter); Proteinase K (Fungal, Invitrogen); Sulfeto de Amônio, solução a 40 %

puríssima (Vetec-Química fina Ltda); Thimerosal (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA); Triton X100 (Octyl-phenoxy polyethoxyethanol, Sigma Chemical Co., EUA); MOPS (3-N-morpholino propanesulfonic acid - Invitrogen S.A, EUA); Yohimbine hydrochloride (Sigma Co., EUA);

3.3. ACASALAMENTO E DIAGNÓSTICO DE PREENHEZ

Para a obtenção dos diferentes grupos experimentais foram colocados para acasalar em gaiolas coletivas, no final da tarde, duas ratas fêmeas adultas em proestro e estro, virgens e ciclando normalmente, com um rato macho adulto comprovadamente fértil. Foram utilizados animais com 90 dias de idade. Na manhã do dia seguinte, os machos foram retirados das gaiolas das fêmeas e foram coletadas células da mucosa vaginal, com o auxílio de um *swab* embebido em solução fisiológica (NaCl 0,9%), tomando-se o cuidado de não estimular a cérvix, evitando-se assim a indução de pseudo-prenhez. O material coletado foi espalhado em uma lâmina histológica para análise ao microscópio óptico (“Zeiss”, aumento 10/0, 25 x 6,3). A prenhez foi considerada positiva quando foram encontrados espermatozóides nas lâminas de esfregaço vaginal e constatada a fase estro do ciclo estral. Esse dia foi considerado o primeiro dia da prenhez (PEREIRA *et al.*, 2003).

3.4. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Aos 60 dias de idade, os filhotes obtidos no item anterior foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos (n=10/grupo):

- Grupo 1 (controle): ratos não expostos à fumaça do tabaco e sem suplementação com zinco;
- Grupo 2 (tabaco): ratos expostos à fumaça do tabaco (20 cigarros) uma hora por dia, durante 8 semanas (adaptado de KAPAWA *et al.*, 2004);

- Grupo 3 (zinco): ratos não expostos à fumaça do tabaco e suplementados com zinco. Os animais receberam 20mg/Kg de cloreto de zinco – dose fisiológica (PAKSY *et al.*, 1996; ALI *et al.*, 2002) por gavagem diariamente, durante 8 semanas;
- Grupo 4 (tabaco/zinco): ratos expostos à fumaça do tabaco (20 cigarros) uma hora por dia durante 8 semanas e suplementados diariamente com zinco (20mg/Kg de cloreto de zinco) por gavagem;

3.5. EXPOSIÇÃO AO CIGARRO

Foi utilizado o método descrito por Paiva *et al.* (2003), que utiliza um aparato especialmente construído para expor os animais à fumaça de cigarro. Os ratos foram colocados em uma câmara transparente conectada ao aparato de fumar com um volume de aproximadamente 95x80x65 cm³. *Puffs* de fumaça foram retirados do cigarro por vácuo e jogados na câmara. A fumaça foi liberada em uma taxa de 10 cigarros/30minutos com intervalo de descanso de 10 minutos. Este procedimento foi realizado duas vezes no período da manhã, até o final do período de tratamento (oito semanas), período que abrange o ciclo espermático completo nos ratos – aproximadamente 52 dias (RUSSEL & BRINSTER, 1996; FRANÇA *et al.*, 1998). Foi utilizado cigarro comercial com a seguinte composição especificada pelo fabricante: 0,7 mg de nicotina, 10 mg de alcatrão e 10 mg de monóxido de carbono. A eficácia da exposição ao tabaco foi confirmada pela dosagem de carboxi-hemoglobina que obteve os níveis equivalentes a tabagistas após um mês da exposição ao tabaco (COHb/mg/dl= 5.3±2.8) (CASTARDELI *et al.*, 2005).



Figura1. Aparato utilizado para a exposição à fumaça do cigarro.

3.6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TESTOSTERONA

Na manhã seguinte ao término do tratamento, os animais dos diferentes grupos experimentais foram pesados, anestesiados com pentobarbital sódico, pela via intra-peritoneal (i.p.), na dose de 40 mg/Kg e submetidos à laparotomia. Amostras de sangue foram coletadas da artéria aorta abdominal, em seringas contendo heparina. Todo o experimento foi realizado sempre no mesmo horário. Imediatamente após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas (2.500 rpm por 20 minutos a 2°C) e o plasma estocado a -20° C para posterior determinação da concentração plasmática de testosterona por radioimunoensaio (GERARDIN *et al.*, 2005). Para a dosagem de testosterona plasmática foi utilizado o kit de Testosterona total, Coat-A-Count® (Diagnostics Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). Consiste de um radioimunoensaio de fase sólida marcado com ¹²⁵I designado para a dosagem quantitativa da testosterona em soro ou plasma em ratos sem extração. O princípio do procedimento é o imunoensaio competitivo, utilizando-se anticorpos altamente específicos à testosterona. Foram utilizadas 20µL de cada amostra para o procedimento, sendo a sensibilidade analítica do teste de 4ng/dL (0,14nmol/L). O coeficiente de variação intraensaio foi de 4,1 %.

Para a dosagem de testosterona plasmática o procedimento consistiu em adicionar 50 µL da amostra de plasma e 1mL de ¹²⁵I em tubos de polipropileno revestidos com anticorpos específicos para a testosterona, sendo incubados em banho-maria a 37°C durante 3 horas. Em seguida, procedeu-se à remoção do ¹²⁵I. As contagens foram realizadas em contador de raios gama (Gamma 5500B, Beckman), sendo a quantidade de testosterona presente determinada a partir de uma curva de calibração. As análises foram realizadas no Laboratório do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, sob supervisão da Profa. Dra. Eunice Oba.

3.7. MASSA CORPORAL E PESO ÚMIDO DE ÓRGÃOS DA REPRODUÇÃO

Os animais foram pesados e após a coleta de sangue (item 3.6) os órgãos da reprodução (testículos, epidídimo, vesícula seminal com secreção e sem secreção - conteúdo vesicular, ducto deferente e próstata ventral) e a glândula adrenal foram identificados, removidos e dissecados (Figura 2). Após secagem em papel de filtro foram determinados os respectivos pesos úmidos, empregando-se balança analítica. A partir do peso úmido dos testículos direito e esquerdo e da massa corporal, foi determinado o índice gônado-somático dos animais, empregando-se a fórmula:

$$\text{Índice gônado-somático} = \frac{\text{peso do TD} + \text{peso do TE}}{\text{massa corporal}} \times 100$$

Onde, TD = testículo direito e TE = testículo esquerdo.



Figura 2. A) Laparotomia exploratória; B) dissecação de órgãos da reprodução e glândula adrenal.

3.8. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO TESTICULAR

A) Análises Seminais, adaptado para ratos da WHO (1999).

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico, 40 mg/Kg, i.p. para a coleta dos espermatozóides, por perfuração do ducto deferente. Imediatamente após, os espermatozóides foram diluídos em 0,5 mL de meio de cultura e mantidos em placa aquecedora a 37°C, para análise microscópica.

➤ **Motilidade espermática:** 10µl de espermatozóides diluídos foram colocados na câmara de contagem de Makler (Makler Counting Chamber, Sefi-Medical, Haifa, Israel- Figura 3A) e a leitura feita em microscopia de fase no aumento 200X (Figura 3B). A leitura foi feita em duas amostras diferentes de cada animal sendo analisados 100 espermatozóides por amostra e realizada a média. Os espermatozóides foram classificados como **móveis** (tipo A+B: espermatozóides com progressão rápida ou lenta, com capacidade fertilizante) e **imóveis** (tipo C+D: espermatozóides sem progressão ou imóveis).

➤ **Concentração espermática:** após a análise do padrão de motilidade, verificou-se a concentração dos espermatozóides estimada em milhões por mililitro. Utilizou-se câmara de Makler com microscopia de fase, aumento 200X, com auxílio de contador de células. A

câmara de Makler possui uma profundidade de 0,01 mm e uma marcação graduada de 100 quadrados (área total de 1 mm²) cada um com 0,1 mm x 0,1 mm. O volume compreendido na área de 10 quadrados após a colocação da lamínula é de 0,001 mm³ ou 1 milhão por mL (Figura 3B). Foram contados os espermatozóides presentes em 10 quadrados (marcação da própria câmara) escolhidos aleatoriamente, em três campos diferentes e realizada a média.

- **Vitalidade espermática:** foi analisada após a sobrevivência dos espermatozóides ao corante eosina. Em um tubo contendo 50 µL de espermatozóides diluídos em meio de cultura foram adicionadas uma gota de eosina amarela (3%) e duas gotas de nigrosina (8%). Após a homogeneização realizaram-se os esfregaços em lâminas. A vitalidade foi analisada em microscopia de fase com aumento de 400X. Para cada animal foram realizados dois esfregaços e em cada um foi contabilizado um total de 100 células e realizada a média. Nos espermatozóides mortos a cabeça apresentou-se corada com eosina (vermelho) e os vivos não se coraram (Figura 3C).

- **Morfologia espermática:** foram preparados dois esfregaços de sêmen para cada animal, secados à temperatura ambiente e fixados em álcool 70 % por 15 minutos. As lâminas foram coradas com hematoxilina e depois colocadas em corante de Shorr por 5 minutos. Foram contados, no mínimo, 200 espermatozóides por lâmina com aumento de 1000X (imersão) e classificados como morfológicamente normais ou anormais (Figura 3D) (LINDER *et al.*, 1992).

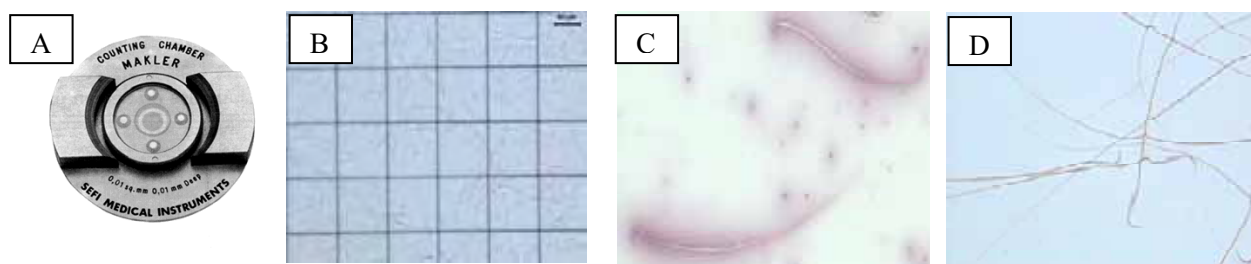


Figura 3. Análise seminal: A) Câmara de Makler; B) Amostra de espermatozóides na câmara de Makler vista ao microscópio (10x); C) Vitalidade espermática (cabeça incolor = vivo e cabeça corada = morto) 40x; D) Análise morfológica 40x.

B) Contagem espermática

O testículo e o epidídimo foram removidos e pesados (conforme item 3.7) e a seguir estocados a -20°C para posterior determinação da concentração de células germinativas.

- **Contagem das cabeças de espermátides no testículo e cálculo da produção diária de espermatozóides:** Para a realização da contagem espermática, os testículos de ratos foram descongelados, a túnica albugínea retirada, o parênquima testicular pesado, homogeneizado com uma mistura de 0,9 % de NaCl, 0,05 % de Triton X100 e 0,01 % de Thimerosal. A contagem das espermátides resistentes à homogeneização foi realizada utilizando hemocitômetros. A contagem de espermatozóides foi realizada em câmara de Neubauer (Figuras 4 A e B). Para cada animal, foi calculado o valor médio de quatro contagens. O número de espermatozóides produzidos pelo testículo por dia foi estimado pela razão entre o número total de espermátides por testículo dividido por 6,1, que é o número de dias que essas espermátides maduras (estágio 19 da espermiogênese) estão presentes no epitélio germinativo (GERARDIN *et al.*, 2006).

- **Contagem do número e cálculo do trânsito de espermatozóides no epidídimo:** O número de espermatozóides na cabeça/corpo e cauda do epidídimo foi estimado segundo a técnica descrita por Robb *et al.* (1978). As porções epididimárias foram separadas logo após a coleta e congeladas até homogeneização. A contagem de espermatozóides foi realizada em câmara de Neubauer. Para cada animal, foi calculado o valor médio de quatro contagens. O tempo de trânsito dos espermatozóides pelo epidídimo foi calculado dividindo-se o número de espermatozóides na cabeça/corpo ou cauda epididimária, pelo valor obtido na produção diária de espermatozóides de cada animal.

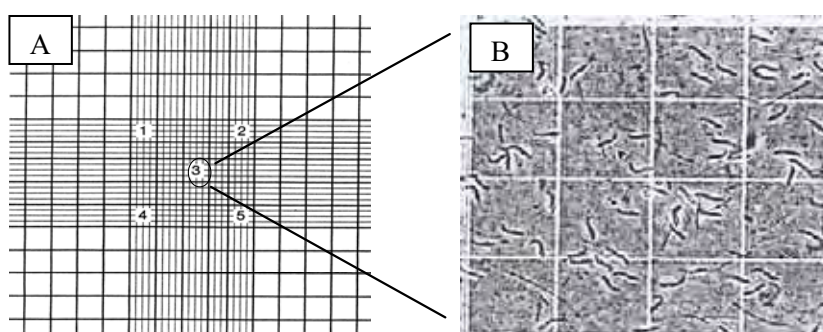


Figura 4. A) Câmara de Neubauer vista ao microscópio com os cinco quadrantes escolhidos para contagem; B) Ampliação do quadrante e visualização das espermátides ou das cabeças de espermatozóides.

3.9. ANÁLISE REPRODUTIVA

A) Teste de fertilidade

Os ratos dos diferentes grupos experimentais foram colocados para acasalar com ratas adultas não tratadas, virgens e com ciclo estral regular. Cada rato foi colocado em uma gaiola

coletiva com duas fêmeas. A partir da manhã seguinte, diariamente e até o 15º dia ou até que tenham acasalado, foi realizado o esfregaço vaginal (conforme item 3.3). O material coletado foi espalhado em uma lâmina histológica para análise ao microscópio óptico (“Zeiss”, aumento 10/0,25x6,3). O dia em que foram encontrados espermatozóides nas lâminas e constatada a fase estro do ciclo estral, foi considerado o primeiro dia da prenhez. No dia anterior ao término da prenhez as ratas foram eutanasiadas com overdose de pentobarbital sódico, i.p., e colocadas em decúbito dorsal. Realizou-se uma incisão longitudinal na parede abdominal para visualização dos cornos uterinos. A partir da análise do conteúdo dos cornos uterinos (Figura 5A) foi determinado o número de implantações (fetos vivos, mortos e sítios de reabsorção-Figura 5B). Quando necessário, foi realizada a técnica de coloração dos cornos uterinos com o reativo de Salewski, uma preparação de sulfeto de amônio a 10 % (SALEWSKI, 1964) que permite a visualização das implantações e de reabsorções precoces. Adicionalmente, os ovários foram isolados e os corpos lúteos separados e contados (Figura 5C) (PEREIRA *et al.*, 2003). A partir da contagem das implantações e dos corpos lúteos foram determinados os seguintes parâmetros:

Taxa de perda pré-implantação =	$\frac{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos} - \text{n}^\circ \text{ de implantações}}{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos}}$	X 100
Taxa de perda pós-implantação =	$\frac{\text{n}^\circ \text{ de implantações} - \text{n}^\circ \text{ de fetos vivos}}{\text{n}^\circ \text{ de implantações}}$	X 100
Taxa de implantação =	$\frac{\text{n}^\circ \text{ de implantações}}{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos}}$	X 100
Viabilidade fetal =	$\frac{\text{n}^\circ \text{ de fetos vivos}}{\text{n}^\circ \text{ de implantações}}$	X 100

A partir do total de fêmeas acasaladas (que apresentaram espermatozóides na lâmina de esfregaço vaginal), fêmeas prenhes (que acasalaram e levarem a prenhez a termo) e fêmeas que apresentaram fetos vivos, foram calculados os seguintes índices:

$$\text{Índice gestacional} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas que apresentaram fetos vivos}}{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas prenhes}} \times 100$$

$$\text{Índice de fertilidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas prenhes}}{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas que acasalaram}} \times 100$$

De posse do número de fetos (machos e fêmeas) obtidos por laparotomia em fêmeas não tratadas acasaladas com machos dos grupos experimentais, foi possível determinar o índice de masculinidade da prole:

$$\text{Índice de masculinidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fetos machos}}{\text{n}^\circ \text{ total de fetos}} \times 100$$

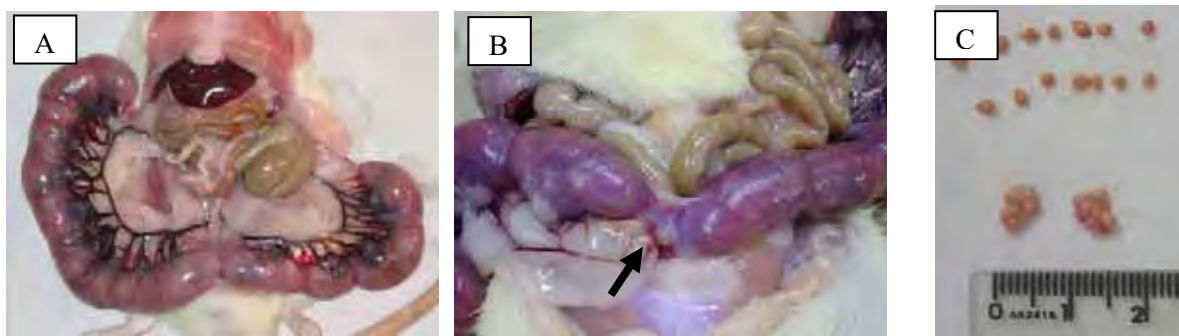


Figura 5. Laparotomia exploratória. A) Visualização dos cornos uterinos; B) Ponto de reabsorção fetal; C) Ovários dissecados e corpos lúteos separados.

B) Comportamento sexual

Após o teste de fertilidade os ratos dos diferentes grupos experimentais, agora sexualmente experientes foram orquiectomizados bilateralmente, após anestesia com pentobarbital sódico na dose 40 mg/Kg (i.p.) e mantidos em biotério com ciclo claro/escuro

invertido. Os experimentos iniciaram-se após um período mínimo de 15 dias para adaptação dos animais ao ciclo claro/escuro invertido e recuperação da cirurgia. Para a avaliação do comportamento sexual os animais foram colocados em gaiolas de observação (acrílico transparente), durante o período escuro do ciclo claro-escuro, sob luz com filtro vermelho.

- **Comportamento sexual masculino:** Os animais orquiectomizados receberam propionato de testosterona 1mg/dia (s.c.), três vezes por semana, durante 15 dias, de modo que a primeira administração foi realizada no dia seguinte à orquiectomia e a última, no dia anterior à avaliação do comportamento sexual masculino (RIBEIRO & PEREIRA, 2005). Desta maneira, os níveis de andrógenos dos animais dos dois grupos experimentais avaliados foram similares, descartando a hipótese de uma deficiência hormonal, quando da ausência de comportamento sexual masculino. No dia do experimento, inicialmente, cada macho foi colocado na gaiola de observação (Figura 6A), onde permaneceram por pelo menos cinco minutos para adaptação. Em seguida, introduziu-se na mesma caixa uma fêmea comprovadamente receptiva (apresentando lordose) em estro natural ou induzido previamente pela administração de benzoato de estradiol, 20µg/Kg, i.p. 24h antes do teste (ARTECHE *et al.*, 1997, GERARDIN *et al.*, 2008). Os animais foram observados por 30 minutos. Contudo, quando não apresentavam comportamento sexual ao final de 10 minutos, a avaliação foi concluída e considerou-se que este não apresentou tal comportamento. Cada animal foi testado uma única vez. Foram avaliados os seguintes parâmetros: latências para 1^a monta, intromissão, ejaculação; latências para 1^a monta e intromissão pós 1^a ejaculação; número de montas (montas sem inserção peniana e intromissões) e intromissões até a 1^a ejaculação, número total de montas (montas sem inserção peniana e intromissões), intromissões e ejaculações durante o teste. A ocorrência de

intromissão peniana foi considerada quando foi observado o seguinte conjunto de sinais: monta com duração superior a dois segundos, lordose (encurvamento característico do dorso da fêmea- Figura 6B) e limpeza da região genital do macho após a monta. A ejaculação foi evidenciada pela observação de intromissão seguida pelo levantar do tronco do macho e parada por alguns segundos.

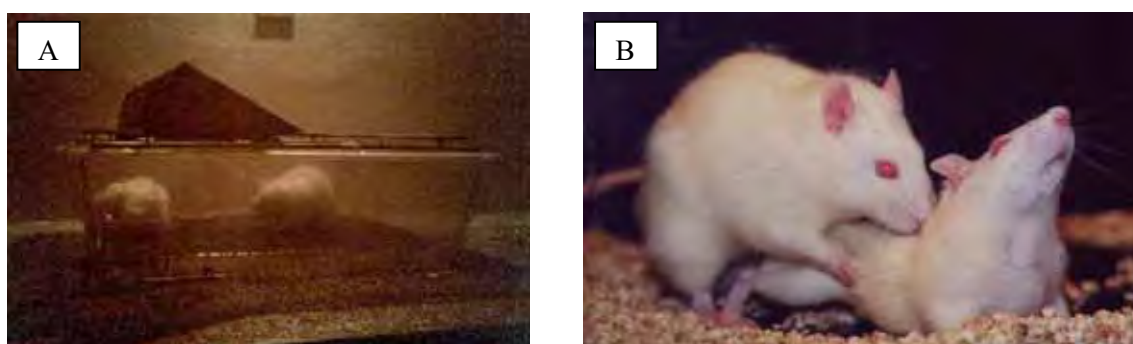


Figura 6. Comportamento sexual. A) Caixa de observação; B) Comportamento sexual masculino de monta com intromissão e fêmeas em lordose.

3.10. PARÂMETROS FARMACOLÓGICOS

Foram analisadas as respostas farmacológicas da musculatura lisa genital acessória masculina (vesícula seminal e/ou ducto deferente) às drogas parassimpatomiméticas (agonista total: acetilcolina e agonista parcial: acetil- β -metilcolina) para estudar o receptor muscarínico e à droga simpatomimética (noradrenalina, na presença de um cocktail contendo propranolol 0,1 μ M, ioimbina 0,1 μ M, corticosterona 10 μ M e cocaína 6 μ M e da incubação com o antagonista prazosin em doses crescentes) para estudar o adrenoceptor α_1 . O cocktail foi utilizado para bloquear β -adrenoceptores, adrenoceptores α_2 , captação extraneuronal e

captação neuronal, respectivamente, registrando assim as respostas induzidas pela noradrenalina em adrenoceptor α_1 .

- **Isolamento e montagem da vesícula seminal e ducto deferente para registro das respostas a drogas autonômicas:** Os ratos foram pesados e sacrificados por overdose de pentobarbital sódico, i.p. Em seguida, a vesícula seminal desprovida de glândula coaguladora e o ducto deferente foram identificados, removidos e isolados. Livres de tecidos conjuntivos, os órgãos foram lavados internamente com líquido nutriente a 30°C. Para estudo das contrações isométricas da musculatura lisa genital acessória isolada foi utilizado um polígrafo de dois canais “Ugo Basile” (modelo 7070, Figura 7A), segundo a técnica descrita por Pereira (1987). A vesícula seminal e o ducto deferente foram montados em câmara muscular de órgão isolado, com capacidade de 10 ml, contendo líquido nutriente aerado, com auxílio de bomba de aquário e mantidos à temperatura de 30° C. O líquido nutriente utilizado foi o Tyrode modificado, segundo Picarelli *et al.* (1962), com pH variando de 7,5 a 7,8, contendo a seguinte composição em mM: NaCl 136,0; KCl 5,6; CaCl₂·2H₂O 1,8; NaH₂PO₄·H₂O 0,36; NaHCO₃ 15,0 e glicose 5,5 diluídos em água destilada. O órgão isolado foi fixado por uma extremidade à terminação S de uma haste de vidro que foi colocada na câmara muscular e pela outra extremidade a um transdutor de força isométrico “Ugo Basile” (modelo 7004) e submetido a uma tensão inicial de um grama. A preparação permaneceu por um período de estabilização de 45 minutos, antes do início do experimento de resposta as drogas, sendo trocado o líquido nutriente a cada 10 minutos. Após o período de estabilização o tecido foi estimulado com KCl 80 mM e a contração registrada em polígrafo.

- **Curvas concentração-resposta:** As drogas acetilcolina, acetil- β -metilcolina e noradrenalina foram preparadas a 10^{-1} M em solução de HCl 0,01 N e mantidas à temperatura de -20° C. Imediatamente antes de sua utilização a noradrenalina foi diluída em solução de NaCl 0,9 %, contendo ácido ascórbico 0,005 % (PEREIRA *et al.*, 1998) e as drogas colinérgicas em solução de NaCl 0,9 %. Foram realizadas curvas concentração-resposta completas pela técnica das doses cumulativas descritas por Van Rossum (1963), onde a concentração da droga no líquido que banha o órgão vai aumentando geometricamente (Figura 7B). As curvas iniciaram-se com baixas concentrações dos agonistas, incapazes de provocar efeito mensurável, até atingirem concentrações altas, às quais não se segue aumento de efeito. As curvas concentração-resposta para as drogas colinérgicas (acetilcolina e acetil- β -metilcolina) foram realizadas nas vesículas seminais. As curvas concentração-resposta para a noradrenalina foram realizadas em vesículas seminais e ductos deferentes. Seguiu-se com pelo menos um par de curvas concentração-resposta de noradrenalina até a verificação da estabilidade da preparação, refletida pela obtenção de curvas semelhantes. A seguir foram realizadas curvas concentração-resposta de noradrenalina na presença (incubado por 15 minutos) do antagonista prazosin em concentrações crescentes (10^{-8} , 3×10^{-8} e 10^{-7} M) e do cocktail contendo propranolol (0,1 μ M), ioimbina (0,1 μ M), corticosterona (10 μ M) e cocaína (6 μ M). Foi observado um intervalo de tempo de 30 minutos entre uma curva concentração-resposta e outra.
- **Parâmetros de sensibilidade a drogas:** Após a obtenção das curvas concentração-resposta, foi estimada a potência dos agonistas através da determinação do parâmetro pD_2 , expresso como o negativo do logaritmo da concentração do agonista, a qual produz 50 % do seu efeito máximo (MILLER *et al.*, 1948), determinado pelo método gráfico de interpolação de cada curva concentração-resposta obtida, empregando-se o *software*

Prisma 3.0. Para o agonista parcial foi determinada também a atividade intrínseca (α), resultado da comparação do efeito máximo do agonista parcial acetil- β -metilcolina e o efeito máximo produzido pelo agonista total acetilcolina (ARIENS, 1954). A potência do antagonista prazosin (pA_2) em antagonizar as respostas ao agonista noradrenalina foi determinada por análise de regressão linear, utilizando a equação: $-\log K_B = -\log [B] + \log (DR-1)$, onde DR é a relação de concentração do agonista encontrada para obtenção de efeitos iguais na ausência e na presença do antagonista; [B] é a concentração molar do antagonista e K_B é a constante de afinidade do antagonista pelo receptor em estudo. A concentração do antagonista que promove um deslocamento à direita na curva concentração-resposta do agonista de duas vezes corresponde ao pA_2 (KENAKIN, 1997).

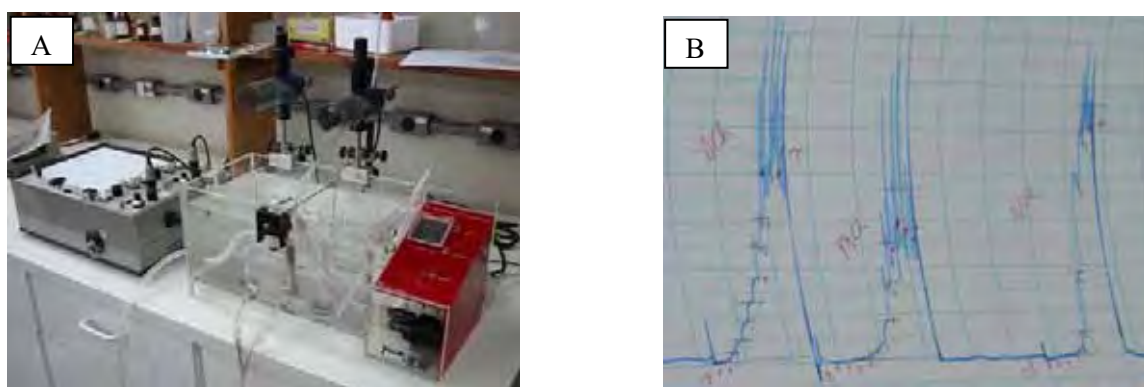


Figura 7. A) Polígrafo - transdutor de força isométrico e câmara muscular de órgão isolado; B) Curvas concentração-resposta.

3.11. DETERMINAÇÃO DE DANOS OXIDATIVOS NO DNA

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), provenientes de diversos componentes presentes no cigarro pode levar a indução de danos oxidativos no DNA. Estes danos podem ser mensurados através do **Ensaio Cometa**, o qual detecta quebras de fita simples, quebras de fita dupla e sítios lábeis alcalinos.

O ensaio foi conduzido de acordo com a metodologia adaptada de Singh *et al.* (2003) que utilizou células humanas. Todas as etapas foram realizadas sob luz indireta. Uma alíquota de 20 µL da suspensão de espermatozóides foi embebida em 100 µL agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% e difundida sobre uma lâmina de microscópio recoberta com agarose normal a 1,5%. As lâminas foram cobertas com lamínulas e deixadas por 10 minutos, à 4°C. Após esse período, as lamínulas foram retiradas e as lâminas imersas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 1% sal de sódio, N-lauril sarcosinato, pH 10, com 1% de Triton X-100 e 10mM DTT-Ditiotreitol) por 24h, à 4°C. Após esse período, as lâminas foram deixadas 15 minutos em estufa a 37°C e acrescidas de proteinase K (0,5 mg/mL) e deixadas mais 22h em estufa a 37°C. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de MOPS (10x) por 1h e 20 minutos, à temperatura ambiente e abrigadas da luz. Posteriormente, as células foram expostas a um tampão (solução de eletroforese: 500mM EDTA, 2 ml de DMSO, 500 mM NaCl e 100 mM tris, pH 9), a 4°C, por 30 minutos, para permitir a expressão das quebras de fita simples e dos sítios lábeis alcalinos (“alkali unwinding”). A eletroforese foi conduzida, na mesma solução, a 4°C, por 30 min, a 25 V e 300 mA (Figura 8A). Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas (0,4 M Tris, pH 7,5) por 15 minutos, fixadas em etanol absoluto por 5 minutos e armazenadas. Posteriormente, as lâminas foram coradas com 50 µL de Brometo de etídio (EtBr: 20 µg/mL) e analisadas em microscópio de fluorescência acoplado a um sistema de análise de imagem (Comet Assay II – Perceptive Instruments - Figura 8B). Foram analisadas, em aumento de 400x, 100 células (50 células por lâmina). Os parâmetros utilizados para avaliação de danos no DNA foram a média do “*tail moment*” e do “*tail intensity*”. Segundo o fabricante (Perceptive Instruments) “*tail moment*” é definido como “quantidade de DNA da cauda x distância de migração da cauda e “*tail intensity*” é a porcentagem de DNA na cauda do cometa. Estes parâmetros refletem o nível de danos no DNA da cauda em cada célula.

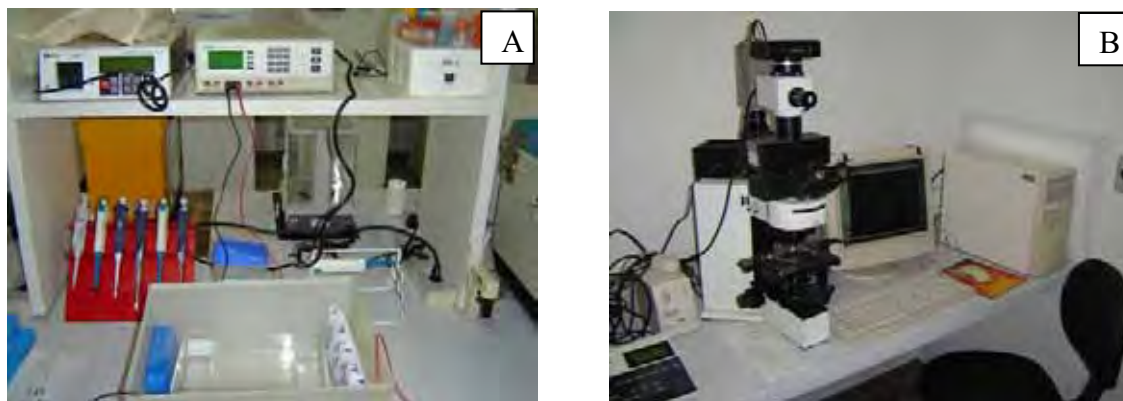


Figura 8. A) Equipamentos para a corrida de eletroforese: cuba de eletroforese com banho de gelo e fonte de eletroforese; B) Microscópio de Fluorescência acoplado ao software Comet Assay II.

3.12. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Foram determinadas as médias \pm erro padrão ou desvio padrão da média e/ou medianas e intervalos interquartis dos resultados obtidos nos quatro grupos experimentais. Os resultados foram comparados entre si por testes estatísticos específicos (Técnica para análise de variância não-paramétrica, para modelo com dois fatores, complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey). Foram consideradas significantes as diferenças associadas à probabilidade $p < 0,05$ (ZAR, 1999).



Resultados



4 RESULTADOS

4.1. MASSA CORPORAL E DE ÓRGÃOS DA REPRODUÇÃO, DA GLÂNDULA ADRENAL E CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TESTOSTERONA

A massa corporal e o peso úmido de órgãos da reprodução, da adrenal e concentração de testosterona estão apresentados na Tabela 1. Não houve diferença entre os grupos com relação à massa corporal, peso úmido do testículo, vesícula seminal, secreção vesicular, próstata e adrenal. Entretanto, houve aumento significativo no peso úmido do epidídimo do grupo zinco quando comparado com o grupo controle e aumento significativo no peso úmido do ducto deferente do grupo tabaco + zinco quando comparado com os grupos tabaco e zinco. Apesar de um aparente aumento na secreção vesicular no grupo tabaco e zinco quando comparado aos grupos controle e tabaco + zinco, não se observou diferença estatisticamente significativa. Adicionalmente constatamos uma diminuição significativa do nível plasmático de testosterona no grupo de tabaco em relação ao grupo controle e tabaco + zinco.

Tabela 1. Massa corporal, peso úmido de órgãos da reprodução, da glândula adrenal e testosterona plasmática dos ratos dos grupos controle, tabaco, zinco e tabaco+zinco.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	Tabaco	Zinco	Tabaco + Zinco
Massa Corporal (g)	400,02±47,65	369,91±30,83	383,10±39,25	415,40±78,21
Testículo (g)	1,72±0,24	1,77±0,13	1,71±0,25	1,76±0,16
Epidídimo (g)	0,50 (0,47-0,55)	0,54 (0,50-0,56)	0,58 (0,55-0,58)*	0,59 (0,56-0,62)
Vesícula seminal (g)	0,15 (0,14-0,16)	0,14 (0,13-0,17)	0,14 (0,11-0,18)	0,15 (0,13-0,19)
Secreção vesicular (g)	0,41±0,03	0,47±0,09	0,50±0,01	0,40±0,09
Ducto deferente (mg)	74,60 (67,30-84,30)	71,10 (68,00-73,10)	70,10 (65,50-80,00)	82,65 (75,10-94,70)#Δ
Próstata (g)	0,34 (0,31-0,38)	0,33 (0,25-0,44)	0,37 (0,33-0,45)	0,32 (0,23-0,47)
Adrenal (mg)	28,22±4,50	26,72±4,00	23,04±5,86	24,49±5,44
Testosterona (ng/dl)	158,50(102,30-604,00)	82,50(53,20-99,50)§	364,00(110,90-711,00)	235,00(130,00-461,50)Δ

Valores expressos em média ± DP ou mediana e intervalo interquartil (IQ_{25%}-IQ_{75%}) (10 ratos/grupo), $p < 0,05$, teste análise de variância não-paramétrica para o modelo com dois fatores complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey.

§ $p < 0,05$ (controle x tabaco); * $p < 0,05$ (controle x zinco); Δ $p < 0,05$ (tabaco x tabaco + zinco)

$p < 0,05$ (zinco x tabaco + zinco).

O índice gônado-somático não apresentou diferença significativa entre os grupos [Controle= 0,86% (0,84-1,27); tabaco= 0,99% (0,83-1,40); zinco= 0,87% (0,82-1,34); tabaco + zinco= 0,84% (0,80-1,37)].

4.2. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO TESTICULAR

Os resultados da análise seminal da secreção contida no ducto deferente estão apresentados na Tabela 2. Os ratos do grupo tabaco apresentaram reduções significativas nas porcentagens de espermatozóide vivos e morfologicamente normais, bem como na concentração espermática, em relação ao grupo controle e tabaco + zinco. Observou-se no grupo zinco um aumento significativo na concentração, assim como na vitalidade e motilidade dos espermatozóides quando comparado aos grupos controle e tabaco + zinco. A morfologia e a vitalidade apresentaram-se diminuídas significativamente no grupo tabaco quando comparados com o grupo controle.

Tabela 2. Análise seminal (vitalidade, motilidade, morfologia e concentração) dos ratos dos grupos controle, tabaco, zinco e tabaco+zinco.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	Tabaco	Zinco	Tabaco + Zinco
Vitalidade (%) Sptz Vivos	98,00 (97,00-98,00)	91,00 (89,50-92,50) §	100,00 (99,00-100,00) *	97,50 (97,00-98,75) Δ#
Motilidade (%) Sptz Móveis A+B	26,00 (14,00-34,00)	17,50 (14,00-19,00)	35,50 (34,00-43,00)	22,00 (19,00-24,00) Δ
Morfologia (%) Sptz Normais	98,00 (97,25-98,75)	96,00 (93,00-97,00) §	97,00 (97,00-98,75)	98,00 (97,25-98,75) Δ
Concentração (x 10⁶)	66,20 ± 15,56	56,00 ± 46,43	144,60 ± 17,90*	127,30 ± 27,03Δ#

Sptz= espermatozóides

Valores expressos em mediana e intervalo interquartil (IQ_{25%}-IQ_{75%}) ou média ± DP de 10 ratos/grupo. $p < 0,05$, teste análise de variância não-paramétrica para o modelo com dois fatores complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey.

§ $p < 0,05$ (controle x tabaco); * $p < 0,05$ (controle x zinco); Δ $p < 0,05$ (tabaco x tabaco + zinco) # $p < 0,05$ (zinco x tabaco + zinco).

Na Tabela 3 encontram-se os resultados da contagem espermática. Os ratos do grupo tabaco apresentaram reduções significativas no número de espermátides em relação ao grupo controle. Observamos também aumento no número de espermatozoides nas porções cabeça-corpo e cauda do epidídimo no grupo zinco quando comparado com o grupo controle. Para o tempo de trânsito espermático na cabeça-corpo do epidídimo verificou-se um aumento significativo do grupo zinco em relação ao grupo controle. O tempo de trânsito espermático na cauda do epidídimo apresentou-se diminuída no grupo zinco quando comparado com o grupo controle. Para todos os parâmetros da contagem espermática realizada observou-se recuperação dos parâmetros no grupo tabaco + zinco quando comparados com o grupo tabaco.

Tabela 3. Contagem espermática (Número de espermátides, Produção diária de espermatozóides, Número de espermatozóides na cabeça/corpo e cauda do epidídimo e tempo de trânsito espermático) de ratos dos grupos controle, tabaco, zinco e tabaco+zinco.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	Tabaco	Zinco	Tabaco + Zinco
Número de espermátides (10 ⁶ /testículo)	219,52 ± 18,54	201,89± 12,67§	227,53±19,75	236,05±21,36Δ
Número de espermátides (10 ⁶ /g/testículo)	1511,60 ± 50,76	1346,40 ± 70,45§	1623,30±80,71	1541,50±80,65Δ
DSP (nº de espermátides ×10 ⁶ /testículo/dia)	35,98 ± 3,04	33,13 ± 2,08	36,10 ± 5,10	38,84 ± 3,50Δ
DSP (nº de espermátides ×10 ⁶ /rato/dia)	71,96±6,02	66,26±4,06	72,20±9,75	77,68±6,89Δ
Número de sptz ×10 ⁶ /g/cabeça-corpo do epidídimo	337,48 (324,98-347,46)	293,78 (288,74-298,75)	980,00 (970,00-1056,00)*	945,00 (930,00-970,00)Δ
Número de sptz ×10 ⁶ /g/cauda do epidídimo	845,75 (812,50-898,36)	772,50 (730,14-826,20)	1200,00(1060,00-1250,00)*	1180,00 (1070,00-1210,00)Δ
Tempo de trânsito espermático na cabeça-corpo do epidídimo (dias)	2,76 ± 0,40	2,56 ± 0,39	3,85±0,31*	3,95±0,40Δ
Tempo de trânsito espermático na cauda do epidídimo (dias)	4,56 ± 0,29	4,97 ± 0,67	2,65±0,16*	2,91±0,14Δ

Sptz= espermatozóides; DSP: produção diária de espermatozóides. Valores expressos em média ± DP 10 ratos/grupo. $p < 0,05$, teste análise de variância não-paramétrica para o modelo com dois fatores, complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey.

§ $p < 0,05$ (controle x tabaco); * $p < 0,05$ (controle x zinco); Δ $p < 0,05$ (tabaco x tabaco + zinco).

4.3. ANÁLISE REPRODUTIVA

A Tabela 4 apresenta os dados do teste de fertilidade de ratas controles não tratadas e que foram acasaladas com ratos dos grupos controle, tabaco, zinco e/ou tabaco + zinco. Apesar de 100% dos ratos do grupo tabaco acasalarem com as ratas controle, após 15 dias de coabitação, somente 75% das ratas ficaram prenhes. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao número de corpos lúteos, sítios de reabsorção e sítios de implantação, bem como nos índices gestacional e de masculinidade nas ratas prenhes dos diferentes grupos. No 21º dia de

prenhez, as ratas que acasalaram com ratos do grupo tabaco apresentaram redução significativa no número de fetos vivos quando comparado com o grupo controle, essa redução também foi observada no grupo tabaco + zinco quando comparado ao grupo zinco. As ratas que acasalaram com os ratos do grupo tabaco também apresentaram uma diminuição significativa da taxa de fertilidade quando comparadas com as ratas que acasalaram com os ratos do grupo controle e tabaco + zinco.

Tabela 4. Número de ratas acasaladas e prenhes, corpos lúteos, fetos vivos, sítios de reabsorção, pontos de implantação, índices gestacional, de fertilidade e de masculinidade, obtidos a partir do teste de fertilidade com machos dos grupos controle, tabaco, zinco e tabaco + zinco.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	Tabaco	Zinco	Tabaco + Zinco
Fêmeas acasaladas	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)
Fêmeas prenhes	20 (100%)	15 (75%)§	20 (100%)	19 (95%)
Corpos lúteos	10,50 (9,50-11,50)	9,00 (7,50-10,50)	12,00 (11,00-13,00)	11,75 (10,50-13,00)
Fetos vivos	12,25 (7,00-14,50)	9,00 (7,50-10,50) §	11,75(11,50-12,00)	9,75 (9,00-11,00) #
Sítios de reabsorção	1,00 (0,50-1,50)	1,25 (0,00-2,50)	0,00 (0,00-1,00)	0,50 (0,00-1,00)
Sítios de implantação	11,25 (10,50-11,50)	8,75 (6,00-11,50)	10,00 (10,00-11,50)	9,50 (8,50-11,00)
Índice gestacional (%)	100,00	93,33	100,00	100,00
Índice de fertilidade (%)	100,00	75,00§	100,00	95,00Δ
Índice de masculinidade (%)	55,55	53,95	52,75	52,80

Valores expresso em mediana (IQ_{25%}-IQ_{75%}) ou % de 10machos/grupo (2 fêmeas/macho). $p < 0,05$, teste análise de variância não-paramétrica para o modelo com dois fatores, complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey.

§ $p < 0,05$ (controle x tabaco); Δ $p < 0,05$ (tabaco x tabaco + zinco); # $p < 0,05$ (zinco x tabaco + zinco).

A partir dos dados da Tabela 4 foram calculadas as taxas de perda pré- e pós-implantação, implantação e viabilidade fetal (Figura 9). Apesar das ratas que acasalaram com ratos do grupo tabaco apresentarem um aumento aparente na taxa de perda pré-implantação e diminuição na taxa de implantação quando comparada com as ratas dos outros grupos, não houve diferença estatisticamente significativa. Observou-se, entretanto uma diminuição

significativa (27%) na viabilidade fetal nas ratas que acasalaram com os ratos do grupo tabaco quando comparado as ratas que acasalaram com os ratos dos grupos controle (G1= 98,13%; G2=73,75%*; G3= 95,00%; G4= 92,41%).

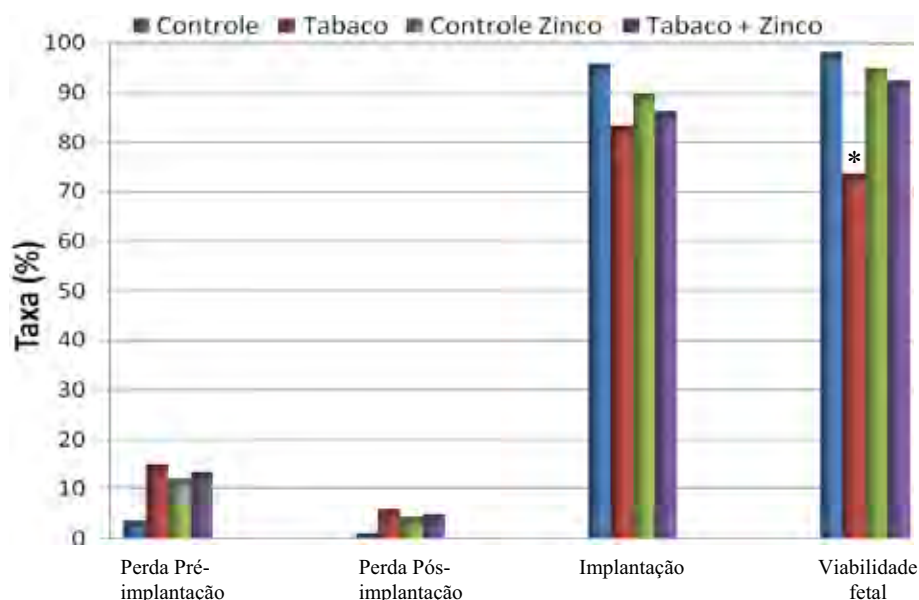


Figura 9. Taxas de perda pré- e pós-implantação, implantação e viabilidade fetal, de ratas que acasalaram com machos dos grupos controle, tabaco, zinco e tabaco + zinco. Valores expressos em porcentagem. * $p < 0,05$ (grupo controle x tabaco), teste análise de variância não-paramétrica para o modelo com dois fatores, complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey.

A avaliação do comportamento sexual masculino encontra-se na Tabela 5. O grupo tabaco apresentou uma demora significativa na latência para a 1ª intromissão. No entanto, verificou-se um aumento na latência para a 1ª ejaculação, com diminuição no número de intromissões quando comparado ao grupo controle. Reduções no número total de intromissões, no número total de ejaculações e no número de intromissões pós-ejaculação foram também observadas nos ratos do grupo tabaco quando comparado ao grupo controle. Já

no grupo tabaco + zinco verificou-se uma redução significativa para a latência para 1ª ejaculação, latência para intromissão pós-ejaculação, número de intromissões, número de ejaculações e número de intromissões pós-ejaculação quando comparado com o grupo zinco. Observamos ainda um aumento significativo no número de intromissões pós-ejaculação no grupo tabaco + zinco quando comparado com o grupo tabaco.

Tabela 5. Comportamento sexual (latência para a 1ª intromissão, número de intromissões, latência para a 1ª ejaculação, latência para intromissão pós-ejaculação, número de intromissões pós-ejaculação, número total de intromissões e número total de ejaculações) dos ratos dos grupos controle, tabaco, zinco e tabaco + zinco.

Parâmetros	Grupos Experimentais n=10			
	Controle	Tabaco Ø	Zinco	Tabaco + Zinco
Latência para 1ª intromissão (s)	36,50 (4,00-80,00)	115,00 (71,00-193,00)§	54,50 (43,00-59,00)	75,50 (37,00-102,00)
Nº de intromissões até 1ª ejaculação	26,00 (20,50-28,75)	18,50 (13,00-29,00)	23,00 (14,50-30,50)	22,00 (19,25-23,00)
Latência para 1ª ejaculação (s)	1138,00 (1092,00-1360,00)	389,50 (216,00-541,00)§	1332,00 (756,00-1800,00)	5422,50 (353,00-637,00) #
Latência para intromissão pós-ejaculação (s)	1580,50 (1430,00-1708,00)	270,00 (256,00-316,00) §	1639,50 (1147,00-1800,00)	2275,00 (229,00-305,00) #
Nº de intromissões pós-ejaculação	33,50 (23,00-53,00)	6,00 (2,00- 13,00) §	18,50 (7,00-29,00) *	13,50 (10,00-8,00) Δ#
Nº total de intromissões	60,50 (49,00-67,00)	33,50 (25,00-38,00) §	51,00 (25,00-69,00)	35,00 (30,00-41,00) #
Nº total de ejaculações	3,10 ± 0,73	1,50±0,70§	2,80 ± 1,75	1,60±1,17#

Valores expressos em média ± DP ou mediana (IQ_{25%}-IQ_{75%}). *p*<0,05, teste análise de variância não-paramétrica para o modelo com dois fatores, complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey.

Ø Dois animais do grupo tabaco não apresentaram comportamento sexual.

§ *p*<0,01 (controle x tabaco); * *p*<0,05 (controle x zinco); Δ *p*<0,05 (tabaco x tabaco + zinco)

p<0,05 (zinco x tabaco + zinco).

4.4. PARÂMETROS FARMACOLÓGICOS

As curvas concentração resposta às drogas colinérgicas da vesícula seminal estão apresentadas nas Figuras 10 e 11. Na Tabela 6 encontram-se os valores dos parâmetros de sensibilidade obtidos a partir destas curvas. Observou-se uma diminuição significativa da potência do agonista total - acetilcolina (pD_2 ACh) no grupo zinco quando comparada com o grupo tabaco + zinco e um aumento significativo da potência do agonista parcial- acetil- β -metilcolina (pD_2 MCh) no grupo tabaco quando comparado com o grupo controle e tabaco + zinco. Para a atividade intrínseca (α), resultado da comparação do efeito máximo do agonista parcial acetil- β -metilcolina e o efeito máximo produzido pelo agonista total acetilcolina, verificou-se uma redução significativa no grupo tabaco quando comparado com o grupo tabaco+ zinco. Não houve diferença significativa entre os grupos para a resposta contrátil máxima da ACh.

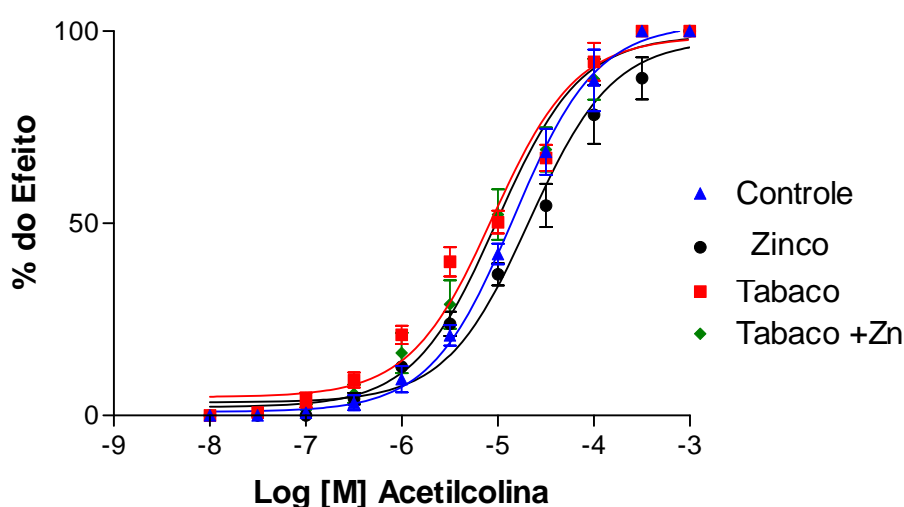


Figura 10. Curvas concentração-resposta para ACh= Acetilcolina de vesícula seminal isolada de ratos dos grupos controle, tabaco, zinco e tabaco + zinco (n=5 ratos/grupo).

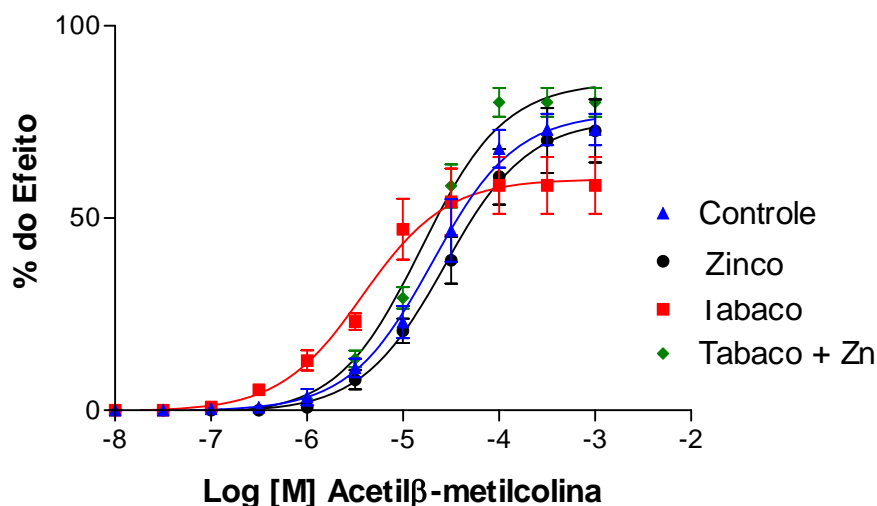


Figura 11. Curvas concentração-resposta para a MCh= Acetil-β-metilcolina de vesícula seminal isolada de ratos dos grupos controle, tabaco, zinco e tabaco + zinco (n=5 ratos/grupo).

Tabela 6. Respostas farmacológicas dos agonistas total Acetilcolina (ACh) e parcial Acetil-β-metilcolina (MCh) em vesícula seminal isolada de ratos adultos dos grupos controle, tabaco, zinco e tabaco + zinco.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	Tabaco	Zinco	Tabaco + zinco
pD₂ ACh	4,81 ± 0,18	5,08 ± 0,15	4,65 ± 0,24#	5,01 ± 0,37
pD₂ MCh	4,67 ± 0,29	5,41 ± 0,32§	4,60 ± 0,36	4,82 ± 0,16Δ
Atividade intrínseca (α) da MCh	0,73 ± 0,09	0,65 ± 0,09	0,80 ± 0,08	0,80 ± 0,09Δ
Resposta contrátil máxima da ACh (g)	1,98 ± 0,10	2,02 ± 0,26	1,53 ± 0,20	1,41 ± 0,14

pD₂ = -log[EC₅₀]; **α** = razão entre resposta máxima do agonista parcial em relação ao agonista total.

Valores expressos em média ± DP, 5 animais/grupo. *p*<0,05, teste análise de variância não-paramétrica para o modelo com dois fatores, complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey.

§ *p*<0,05 (controle x tabaco); Δ *p*<0,05 (tabaco x tabaco + zinco); # *p*<0,05 (zinco x tabaco + zinco).

As respostas farmacológicas da vesícula seminal e do ducto deferente à Noradrenalina estão apresentadas na Tabela 7. Não foi observado diferença estatisticamente significativa na sensibilidade (pD_2) à Noradrenalina na vesícula seminal, entretanto observou-se uma diminuição significativa na resposta contrátil máxima no grupo zinco quando comparado com o grupo controle. Todavia, no ducto deferente uma diminuição significativa foi observada no grupo zinco em relação ao grupo controle na sensibilidade à Noradrenalina, porém não se verificou diminuição significativa na resposta contrátil máxima para o grupo zinco, mas sim para o grupo tabaco quando comparado ao grupo controle.

Tabela 7. Resposta farmacológica do agonista total Noradrenalina (NOR) em vesícula seminal e ducto deferente isolados de ratos adultos dos grupos controle, tabaco, zinco e tabaco + zinco.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	Tabaco	Zinco	Tabaco + zinco
pD_2 NOR (VS)	5,40 ± 0,14	5,13 ± 0,03	5,10 ± 0,18	5,18 ± 0,06
Resposta contrátil máxima da NOR (g) (VS)	2,88 ± 0,14	2,84 ± 0,39	1,96 ± 0,17*	1,92 ± 0,20
pD_2 NOR (DD)	6,02 ± 0,08	5,94 ± 0,20	5,70 ± 0,11*	5,76 ± 0,08
Resposta contrátil máxima da NOR (g) (DD)	2,92 ± 0,08	2,52 ± 0,18§	2,90 ± 0,16	2,48 ± 0,19

VS: Vesícula seminal; DD: Ducto deferente; $pD_2 = -\log[EC_{50}]$.

Valores expressos em média ± DP, 5 animais/grupo. $p < 0,05$, teste de análise de variância não-paramétrica para o modelo com dois fatores, complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey.

§ $p < 0,05$ (controle x tabaco); * $p < 0,05$ (controle x zinco)

Para o ducto deferente que apresentou diminuição significativa a sensibilidade (pD_2) à Noradrenalina do grupo zinco em relação ao controle foram realizadas curvas concentração-resposta de noradrenalina na presença do antagonista prazosin em concentrações crescentes e do cocktail contendo propranolol, ioimbina, corticosterona e cocaína. A partir desses dados determinou-se a potência do antagonista prazosin (pA_2) em antagonizar as respostas ao agonista noradrenalina por análise de regressão linear (pA_2 Ducto Deferente): grupo controle $7,85 \pm 0,11$ e grupo zinco $7,90 \pm 0,06$) e através da análise da regressão de Schild verificou-se que a diminuição da sensibilidade encontrada no ducto deferente à Noradrenalina não se deve a uma alteração dependente exclusivamente dos adrenocetores α_1 .

4.5. DETERMINAÇÃO DE DANOS OXIDATIVOS NO DNA

A avaliação dos danos oxidativos do DNA nos espermatozoides dos ratos dos diferentes grupos experimentais, através do teste do COMETA, encontram-se na Tabela 8. O grupo tabaco apresentou um aumento significativo na quantidade de danos no DNA da cauda x distância de migração da cauda (*tail moment*) quando comparado ao grupo controle e tabaco + zinco. Também foi observado um aumento significativo na porcentagem de DNA lesado na cauda do cometa (*tail intensity*) no grupo tabaco quando comparado ao grupo controle e tabaco zinco. As lâminas contendo as células analisadas estão ilustradas na figura 12.

Tabela 8. Análise dos danos oxidativo do DNA nos espermatozóides dos grupos controle, tabaco, zinco e tabaco + zinco, através do teste do COMETA.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	Tabaco	Zinco	Tabaco + zinco
<i>Tail moment</i>	0,15 (0,08-2,51)	1,38 (0,01- 2,77)	0,50 (0,13-0,97)	0,49 (0,01-1,95) Δ
<i>Tail Intensity</i>	3,79 (1,77-6,75)	15,21(8,89-20,01) \S	5,38 (4,10-9,35)	7,57(5,64-12,48) Δ

Tail moment: é definido como “quantidade de DNA da cauda x distância de migração da cauda; *Tail intensity*: é a porcentagem de DNA na cauda do cometa.

Valores expressos em mediana (IQ_{25%}-IQ_{75%}). $P < 0,05$, teste análise de variância não-paramétrica para o modelo com dois fatores, complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey. \S $p < 0,05$ (controle x tabaco); * $p < 0,05$ (controle x zinco); Δ $p < 0,05$ (tabaco x tabaco + zinco)

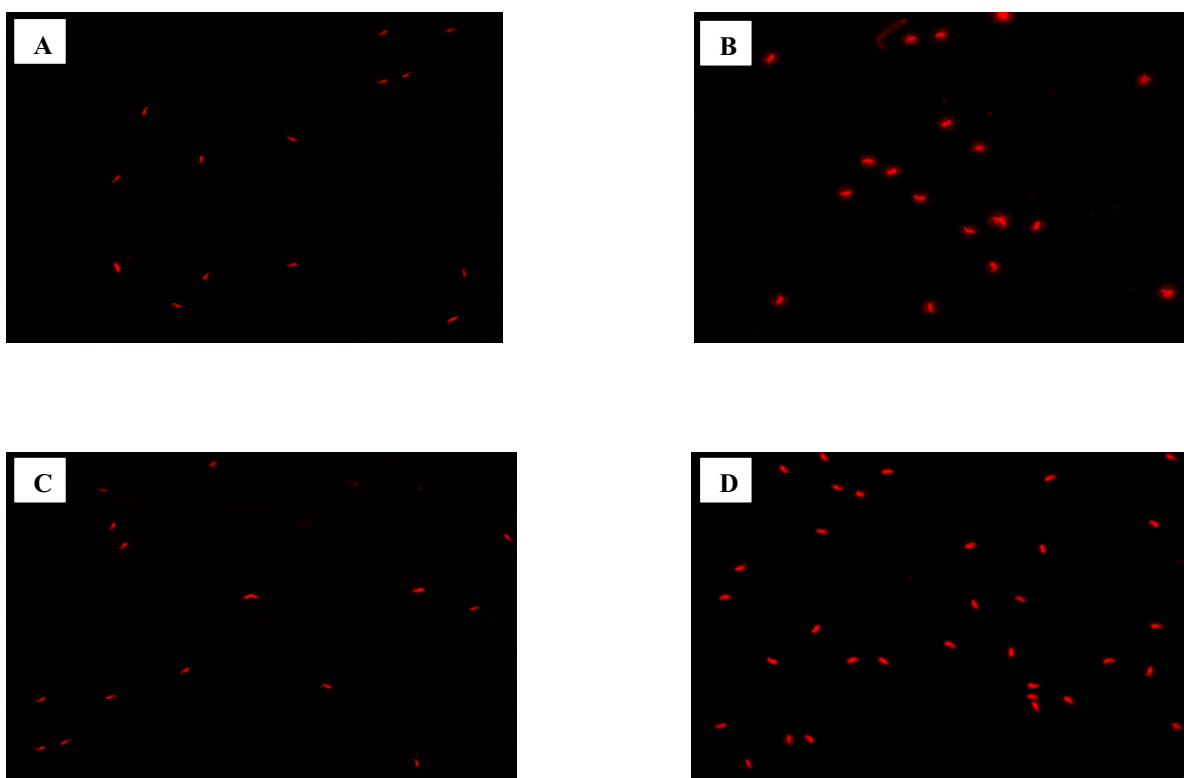


Figura 12. Lâminas contendo os espermatozóides dos diferentes grupos experimentais analisadas pelo Software do Teste do COMETA para danos oxidativos no DNA. Os pontos vermelhos representam as cabeças dos espermatozóides e os halos (dispersão dos fragmentos) são proporcionais aos danos no DNA; A) espermatozóides dos ratos do grupo controle; B) espermatozóides dos ratos do grupo tabaco; C) espermatozóides dos ratos do grupo zinco; D) espermatozóides dos ratos do grupo tabaco + zinco.



Discussão



5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, estudos sobre o estilo de vida, hábitos alimentares e/ou exposição a determinadas substâncias tem sido associadas como possíveis contribuintes para o declínio na concentração de espermatozóides e subsequente infertilidade masculina (BECKER & BERHANE, 1997). Tais estudos são interessantes, principalmente pela possibilidade de se utilizar medidas preventivas, pois os tratamentos atualmente indicados para infertilidade em reprodução assistida possuem custos elevados.

No presente estudo, foi observada uma diminuição significativa na concentração plasmática de testosterona no grupo tabaco. Este hormônio é essencial para os caracteres secundário e a completa competência reprodutiva no adulto (SELMANOFF *et al.*, 1977; FRANÇA *et al.*, 1993; RUSSEL & FRANÇA, 1995). Nossos resultados corroboram com aqueles encontrados por Yamamoto *et al.* (1998) que verificaram que ratos que inalavam a fumaça do tabaco, possuíam baixos níveis de testosterona, associado à diminuição no número de espermatozóides e baixa motilidade. Já a suplementação com zinco aumentou em duas vezes a concentração plasmática de testosterona em relação à concentração do grupo controle, mas ambos dentro da normalidade. Todavia, Omu *et al.* (1998) não observaram diferenças nas concentrações dos hormônios sexuais (FSH, LH, Testosterona e Prolactina) após tratamento com zinco em homens saudáveis.

O aumento significativo na concentração de testosterona nos ratos dos grupos suplementados com zinco pode ter sido responsável pelo aumento na concentração de espermatozóides no ducto deferente e no epidídimo desses animais. Por outro lado, a diminuição da concentração de testosterona no grupo tabaco pode ter sido responsável pela diminuição na concentração de espermátides observada no testículo. Além disso, estavam

prejudicadas a morfologia (% normais) e a vitalidade (% vivos) dos espermatozóides dos ratos do grupo tabaco. Neste sentido, os resultados de vários trabalhos associaram o tabagismo com a diminuição da qualidade seminal (MAK *et al.*, 2000; SALEH *et al.*, 2002; KAPAWA *et al.*, 2004; GAUR *et al.*, 2007; RAMLAU-HANSEN *et al.*, 2007). Os efeitos prejudiciais na qualidade dos espermatozóides de ratos (vitalidade, motilidade e concentração) foram prevenidos no presente estudo, pela suplementação com o zinco, melhorando inclusive a motilidade espermática dos animais tabaco + zinco em relação ao grupo tabaco. Li *et al.* (2008) também observaram um aumento da concentração e motilidade espermática em homens suplementados com zinco. A motilidade espermática depende diretamente da produção de energia sob a forma de ATP pelas mitocôndrias presentes na peça intermediária do espermatozóide. Assim, os espermatozóides podem apresentar uma diminuição na motilidade devido a dois fatores: uma diminuição na produção de energia pelas mitocôndrias da peça intermediária ou a ocorrência de lesão nas proteínas do axonema (AITKEN & SAWYER, 2003; TURNER, 2003). Estudos realizados por De Lamirande & Gagnon (1992a, 1992b) indicaram que a motilidade espermática pode ser o indicador mais sensível de estresse oxidativo, pois os altos níveis de EROs inibem as enzimas da fosforilação oxidativa e/ou da glicólise, limitando a geração de ATP (BAUMBER *et al.*, 2000; HUANG *et al.*, 2000; HUANG *et al.*, 2001). Devido à abundância de ácidos graxos poliinsaturados nas membranas das células germinativas e sua susceptibilidade à oxidação pela presença de grupos metilenos entre duplas ligações, tornam-se alvos mais prováveis para ação dos oxidantes (WAGNER *et al.*, 1994; DIX & AIKENS, 1993). Shen *et al.* (1997) relataram altos níveis de 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) nos espermatozóides de tabagistas, sendo este a maior forma de dano oxidativo, associado com presença de cotinina no plasma seminal. Nesse sentido, um dos prováveis mecanismos envolvidos na diminuição da qualidade espermática

observada nos ratos do grupo tabaco pode ser decorrente da formação de EROs. O zinco provavelmente tenha protegido desses danos devido à sua ação antioxidante. Corroborando com os efeitos antioxidantes do zinco, encontraram-se evidências de dano oxidativo em proteínas, lipídios e DNA em ratos e camundongos zinco - deficientes (OTEIZA *et al.*, 1995; BAGCHI *et al.*, 1998). Evidenciou-se também um efeito protetor do zinco contra o dano oxidativo e na depleção da glutathiona em camundongos (BAGCHI *et al.*, 1998). É importante considerar que contrariamente ao esperado o zinco bem como outros metais, em altas concentrações, podem também catalisar as reações que levam à formação de EROs (LLOYD *et al.*, 1998).

O epidídimo é formado por ductos altamente contorcidos que conecta o ducto eferente ao ducto deferente (HERMO & ROBAIRE, 2002; SULLIVAN *et al.*, 2005). Os espermatozóides de mamíferos ao sair do testículo são funcionalmente imaturos e necessitam do processo de maturação que ocorre durante a passagem pelo epidídimo (CUASNICÚ *et al.*, 2002; OLSON *et al.*, 2002). Em ratos a partir do momento que os espermatozóides atingem a parte proximal da cauda do epidídimo, adquirem o potencial para a motilidade progressiva, garantindo a sobrevivência e o sucesso na fertilização (ZENICK *et al.*, 1994). Sabe-se também que alterações no tempo de trânsito através do epidídimo têm uma importante função na maturação dos espermatozóides. Assim, tais alterações, acelerando ou retardando, podem alterar os parâmetros seminais como a quantidade, a morfologia e a motilidade dos gametas (FERNANDEZ *et al.*, 2007). No presente estudo o tabaco não interferiu no tempo de trânsito dos espermatozóides, porém nos animais suplementados com zinco verificou-se um aumento no tempo de transito da cabeça e corpo do epidídimo e uma diminuição na cauda do epidídimo. Essas alterações no tempo de trânsito apresentaram um efeito benéfico para os espermatozóides, uma vez que a permanência por mais tempo na cabeça e corpo do epidídimo

provavelmente tenha melhorado a maturação dos espermatozoides. Assim, observou-se uma melhora nos grupos zinco e tabaco + zinco nos parâmetros qualitativos seminais (concentração, vitalidade e motilidade). Dessa forma, a saída mais rápida da cauda do epidídimo não comprometeu a motilidade, pelo contrário melhorou. Esses resultados sugerem que talvez essa parte final do epidídimo esteja apenas funcionando como armazenamento dos espermatozoides já viáveis, em ratos. No presente estudo a exposição ao tabaco ocasionou também efeitos tóxicos na espermatogênese, uma vez que as contagens espermáticas reduzidas são usualmente consideradas indicadores para detectar quantitativamente os efeitos adversos na espermatogênese (BAN *et al.*, 1995). Os parâmetros espermáticos incluindo motilidade e morfologia podem também fornecer informações do potencial de toxicidade reprodutiva (SEED *et al.*, 1996). Todavia a suplementação com zinco conseguiu prevenir e até melhorar a função testicular dos animais expostos ao tabaco. Adicionalmente Chia *et al.* (2000) relataram que as concentrações de zinco seminal estão baixas em pacientes inférteis. Por outro lado, do ponto de vista reprodutivo, observa-se que a deficiência de zinco induz a oligozoospermia, disfunção erétil e hipogonadismo em ratos e homens (SANSTEAD *et al.*, 1967; PRASAD & COSSACK, 1984; EBISCH *et al.* 2007).

No presente estudo, os ratos dos diferentes grupos experimentais foram capazes de acasalar ratas controles. Porém, somente 75% das fêmeas acasaladas com ratos do grupo tabaco ficaram prenhes. Todavia apresentaram redução no número de fetos vivos. Como conseqüências observaram-se taxas reduzidas de fertilidade e viabilidade fetal. Como foram encontrados espermatozoides no trato genital feminino dessas ratas, estes resultados sugerem que os prejuízos observados na fertilidade podem estar relacionados com alterações na qualidade dos espermatozoides. A diminuição na qualidade seminal tem sido então associada com diminuição na fertilidade (OVERSTREET & KATZ, 1987). De fato, alterações nas

análises seminais foram observadas no presente trabalho, incluindo reduções na concentração espermática, vitalidade, motilidade e morfologia normal dos espermatozóides obtidos do ducto deferente no grupo tabaco. Além disto, os ratos do grupo tabaco apresentaram reduções na produção diária de espermátides. O número de espermátides presentes no testículo e a produção diária espermática são então indicadores importantes da fertilidade masculina. Como consequência das alterações nos parâmetros seminais observou-se uma subfertilidade/infertilidade dos ratos expostos ao tabaco, reforçando estudos anteriores de Kapawa *et al.* (2004) e Gaur *et al.* (2007) que já associavam tabagismo com diminuição da fertilidade. Esses prejuízos no processo de fertilização podem ser decorrentes de alterações na espermatogênese e na maturação espermática ou por uma toxicidade direta nos espermatozóides (YAMAMOTO *et al.*, 1998). Por outro lado, a suplementação com zinco foi capaz de proteger os danos tóxicos que o tabaco provocou nos espermatozóides. Observou-se então no presente estudo a recuperação de todos os parâmetros seminais e um aumento de duas vezes no número de espermatozóides no epidídimo no grupo zinco, explicando um significativo aumento no peso desse órgão em relação ao grupo controle. Nossos resultados corroboram com aqueles encontrados por Ebisch *et al.* (2006) que sugeriram que um dos prováveis mecanismos de proteção pelo zinco seria por atuar sobre parâmetros endócrinos, aumentando a espermatogênese através da estimulação das células de Sertoli e de Leydig.

Uma importante fonte exógena de radicais livres é o tabaco, um aerossol heterogêneo composto de mais de 4000 elementos incluindo elevadas concentrações de EROs e do nitrogênio (STEDMAN, 1968). Em tabagistas se faz obrigatório o uso das reservas corporais de antioxidantes para neutralizar o elevado nível de EROs que são produzidas. Como consequência ocorre uma depleção de antioxidantes, predispondo os tabagistas ao desenvolvimento de doenças degenerativas (ANBARASI *et al.*, 2006). Além disso, essa

deficiência de antioxidantes em tabagistas pode ser agravada por uma nutrição pobre em antioxidantes (ZONDERVAN *et al.*, 1996). Quando o nível normal do sistema de defesa de antioxidantes não é suficiente para erradicar as EROs livres em excesso, a administração ou suplementação com antioxidantes exógenos tem um importante papel de proteção (REKHA *et al.*, 2001). Desta forma, o zinco provavelmente por sua ação antioxidante tenha sido capaz de prevenir danos em vários parâmetros reprodutivos, no presente estudo. Neste sentido, tem sido experimentalmente demonstrado que vários micronutrientes com propriedades antioxidantes podem agir como efetivos agentes de proteção contra o estresse oxidativo induzido pelos componentes do tabaco (SOHN *et al.*, 1993; DILSIZ *et al.*, 1999; HELEN *et al.*, 1999; KOUL *et al.*, 2001; EBISCH *et al.*, 2006; EBISCH *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008). Adicionalmente o cádmio, um metal pesado também presente no tabaco, diminui a biodisponibilidade do selênio e do zinco, levando a uma depleção do *status* de antioxidação (PRESTON, 1991). Dessa forma a terapia com zinco e selênio mostrou-se efetiva em tabagistas (AL-BADER *et al.*, 1999; DILSIZ *et al.*, 1999). Em adição, o tabagismo induz doenças crônicas que secundariamente levam a alterações na cinética/metabolismo mineral, agravando assim os danos causados pelo tabaco (ANBARASI *et al.*, 2006).

Em relação ao comportamento sexual, no presente estudo, 80% dos ratos expostos ao tabaco apresentaram comportamento sexual masculino associado a uma demora na latência para a primeira intromissão, uma redução na latência para a primeira ejaculação, assim como redução no número de intromissões pós-ejaculação, no número total de intromissões e ejaculações, indicando uma possível diminuição na libido, associada à ejaculação precoce e/ou disfunção erétil. Nossos resultados foram também semelhantes aos resultados encontrados em vários estudos, que demonstraram efeitos prejudiciais do tabaco sobre o comportamento sexual (diminuição da libido e disfunção erétil) em humanos (VIRAG *et al.*,

1985; GOSSIAN *et al.*, 1986; MIKHAILIDIS *et al.*, 1998; ELHANBLY *et al.*, 2004; PASQUALOTTO *et al.*, 2004). Por outro lado, a suplementação com zinco melhorou o comportamento sexual dos animais. Todavia esta suplementação não conseguiu melhorar o número de intromissões pós-ejaculação. O mecanismo para essas alterações provavelmente nesse estudo não estavam relacionadas à redução no nível de testosterona observado em tabagistas, uma vez que nesse estudo os níveis de testosterona plasmática foram normalizados, antes da avaliação do comportamento sexual, sugerindo que outros fatores podem também estar interferindo nesses parâmetros.

É interessante ressaltar que em roedores a fertilidade (capacidade de gerar descendentes) não é um parâmetro muito sensível para estudos toxicológicos, visto que há uma excessiva produção de espermatozoides nessa espécie, provavelmente desnecessários para a fertilidade basal. Em humanos, porém, a produção espermática é bem reduzida (SHARPE, 1994). Dessa forma, o potencial de um agente tóxico afetar a reprodução masculina é provavelmente maior para humanos que para animais, já que em ratos uma redução de 50 ou 90% no número de espermatozoides férteis durante o acasalamento não diminui a fertilidade (AMANN, 1989). Mesmo assim, no presente estudo, o modelo experimental de exposição ao tabaco em ratos foi capaz de induzir alterações prejudiciais nos parâmetros espermáticos e conseqüentemente na fertilidade dos ratos, mostrando o potencial prejuízo do tabagismo para a reprodução, em homens. Porém, a suplementação com zinco mostrou-se efetiva em prevenir danos na reprodução. Assim, considerando que a suplementação com zinco foi capaz de prevenir os efeitos prejudiciais do tabaco em espécies menos sensíveis, especula-se que este tratamento apresente também um efeito potencialmente benéfico em humanos.

Os hormônios da reprodução são também de fundamental importância para o desenvolvimento, para a manutenção do padrão de respostas e pela plasticidade dos receptores autonômicos da musculatura lisa genital acessória, essenciais para a ereção e ejaculação. Neste sentido, observamos, desde os trabalhos pioneiros de Wilcke (1937) que mudanças nos níveis de hormônios da reprodução resultam em alterações na excitabilidade e contratilidade da musculatura lisa genital acessória masculina. No presente estudo, a exposição ao tabaco, induziu redução na concentração plasmática de testosterona e com isso pôde-se observar um aumento na sensibilidade da vesícula seminal ao agonista parcial (MCh). A exposição ao tabaco ocasionou prejuízos na contratilidade máxima da musculatura lisa genital acessória do ducto deferente ao mediador NOR, provavelmente trazendo comprometimento na liberação dos espermatozoides. Este prejuízo corrobora com o aumento no tempo de trânsito na cauda do epidídimo que serve como um reservatório, bem como diminuição na concentração de espermatozoides, observado no presente estudo.

Portanto, a redução da fertilidade observada nos animais do grupo tabaco provavelmente tenha sido ocasionada pela diminuição da qualidade e quantidade espermática, agravada pelas alterações na resposta contrátil da vesícula seminal e ducto deferente, às drogas autonômicas, importantes no processo ejaculatório. Todavia, na vesícula seminal a suplementação com zinco na dose utilizada, diminuiu a resposta contrátil, enquanto no ducto deferente diminuiu a sensibilidade da musculatura lisa genital acessória à noradrenalina, porém sem prejuízos na resposta contrátil. Isso provavelmente tenha acontecido como consequência do aumento de duas vezes na concentração de testosterona. Nesse sentido, vários autores observaram o aparecimento de contrações espontâneas e rítmicas e/ou aumento de sensibilidade, a várias drogas, tanto no ducto deferente quanto na vesícula seminal isolados de ratos após depressão androgênica (PICARELLI & VALLE, 1969; ABREU *et al.*, 1980;

PORTO *et al.*, 1981; PEREIRA *et al.*, 1991). Desta forma, níveis plasmáticos fisiológicos de androgênios são realmente importantes para o desenvolvimento dos órgãos acessórios da reprodução bem como para a manutenção do padrão de respostas da musculatura lisa genital acessória masculina (PEREIRA *et al.*, 1998), participando assim da manutenção da homeostase reprodutiva.

Na análise dos danos oxidativos do DNA, através do ensaio COMETA padronizado para espermatozóide de rato, no presente trabalho, pode-se observar um aumento de DNA lesado no grupo tabaco. A suplementação com zinco também conseguiu evitar esses danos ocasionados no DNA dos espermatozoides, sugerindo que um agente antioxidante pode ser indicado como um tratamento promissor na proteção de dano oxidativo ao DNA. A ocorrência da fragmentação de DNA em espermatozoides pode ser explicada por três possíveis mecanismos: apoptose abortiva, falhas na compactação da cromatina e estresse oxidativo (SAKKAS *et al.*, 1999; SAILER *et al.*, 1995; HUGHES *et al.*, 1996; KODAMA *et al.*, 1997).

A liberação das EROs, sustentada por meio do alcatrão e de gases do cigarro, leva a um estresse oxidativo promovendo a peroxidação do lipídio e, conseqüentemente, a perturbações no sistema de defesa de antioxidantes no sangue e tecidos de tabagistas (PRYOR & STONE, 1993; LU & MORIMOTO, 2008). A modulação no *status* de antioxidação pelo aumento da peroxidação dos lipídios durante a exposição ao tabaco tem sido relatada em vários órgãos (BASKARAN *et al.*, 1999; CHITRA *et al.*, 2000; DELIBAS *et al.*, 2003). Esses dados se somam aos demais resultados do presente estudo ao demonstrar também efeitos prejudiciais do tabaco sobre a fertilidade, bem como em prevenir esses danos através da suplementação com zinco que age como um antioxidante. Estes resultados sugerem que um

dos mecanismos de dano causado pelo tabaco sobre a reprodução é mediado por ação das EROs que levam ao estresse oxidativo.

Como mencionado anteriormente o zinco, também possui propriedades anti-apoptóticas. Os efeitos inibitórios do zinco têm sido postulados como envolvendo dois mecanismos: inicialmente nas vias apoptóticas, onde o zinco inibe as caspases (proteases envolvidas na morte celular programada), e mais tarde, nos eventos da cadeia apoptótica na qual o zinco pode anular as proteases cálcio e magnésio dependentes que causam a fragmentação apoptótica do DNA (PERRY *et al.*, 1997; CHAI *et al.*, 1999; TRUONG-TRAN *et al.*, 2000; CHIMIANTI *et al.*, 2003; SAID *et al.*, 2004). É importante ressaltar que concentrações altas de zinco podem ser tóxicas, induzir a apoptose e até mesmo a necrose (TRUONG-TRAN *et al.*, 2000; CHIMIANTI *et al.*, 2003). Outras evidências sobre o envolvimento do zinco na apoptose ocorreu pela observação de que a depleção do zinco pode induzir apoptose em vários tipos celulares, enquanto que a suplementação com zinco pode proteger as células contra diversas moléculas pró-apoptóticas prevenindo a morte celular programada (SUNDERMAN-JR, 1995; CHIMIANTI *et al.*, 2003). A apoptose induzida pelas EROS pode ser inibida por vários antioxidantes (HOCKENBERY *et al.*, 1993; KANE *et al.*, 1993). A administração de antioxidantes como o zinco, como demonstrado no presente estudo pode melhorar o equilíbrio redox nas células. Todavia, Halliwell (1999) demonstrou que o uso de antioxidantes como a vitamina C sem a precisa necessidade/indicação, pode paradoxalmente induzir o dano ao DNA. Adicionalmente, os espermatozóides com dano no DNA podem apresentar uma redução na capacidade de fertilização e implantação, porém podem ocasionar conseqüências desconhecidas na saúde da próxima geração (LEWIS & AGBAJE, 2008). Há um crescente número de estudos que associam riscos mutacionais elevados em certas ocupações paternas (como a exposição a metais, solventes, pesticidas e

principalmente o tabaco) a um aumento no número de defeitos ao nascimento e de câncer na infância (OLSHAN & MATTISON, 1994; JI *et al.*, 1997; SORAHAN *et al.*, 1997; SMITH *et al.*, 2000). Novos relatos também mostram aumento de esquizofrenia, acondroplasia e na Síndrome de Apert em filhos de homens mais velhos com elevados índices de dano no DNA dos espermatozoides (AITKEIN & LULIIS, 2007). Esses dados sugerem que os danos no DNA dos espermatozoides podem ter impacto negativo na saúde da prole, justificando uma maior necessidade de estudos nesta linha para avaliar o real impacto do tabagismo na saúde reprodutiva. Finalmente, o aumento do dano ao DNA dos espermatozoides dos ratos expostos ao tabaco pode ser decorrente, ao menos em parte, do aumento dos níveis de estresse oxidativo. Isso é suportado por estudos mostrando que o estresse oxidativo não somente resulta em dano à membrana plasmática como também ao DNA nuclear do espermatozoide, causando aumento de quebras nas fitas simples e duplas do DNA (TWIGG *et al.*, 1998; AITKEN, 1999; SALEH *et al.*, 2002; AGARWAL *et al.*, 2006; LU & MORIMOTO, 2008).

Frente aos dados acima discutidos, verificou-se que a exposição ao tabaco (fatores ambientais e/ou estilo de vida) está relacionada a uma diminuição na fertilidade e que a suplementação com zinco foi capaz de prevenir a maioria dos danos causados pelo tabaco, mostrando-se como uma alternativa promissora no tratamento de homens com infertilidade provocada pelos componentes do tabaco.




Conclusões



6 CONCLUSÕES

- A exposição ao tabaco diminuiu a testosterona plasmática, sugerindo comprometimento do eixo hipotálamo – hipófise – gônadas. A suplementação com zinco aumentou em duas vezes a concentração de testosterona, sugerindo um possível mecanismo protetor.
- O tabaco comprometeu a quantidade e a qualidade espermática e subsequente capacidade de gerar descendentes viáveis. Entretanto, a suplementação com zinco protegeu os espermatozóides dos efeitos do tabaco.
- Alterações observadas no comportamento sexual dos animais do grupo exposto ao tabaco sugerem uma redução na libido com subsequente ejaculação precoce e/ou disfunção erétil. O zinco não foi capaz de prevenir estas alterações, entretanto melhorou a libido.
- No ducto deferente a exposição ao tabaco levou a uma diminuição na resposta contrátil máxima à noradrenalina sem comprometer a sensibilidade, sugerindo um provável mecanismo compensatório de liberação dos espermatozóides. Entretanto o zinco diminuiu a sensibilidade do ducto deferente à noradrenalina sem comprometer a resposta contrátil.
- A exposição ao tabaco levou a danos oxidativos no DNA dos espermatozóides indicando que o prejuízo à reprodução pode ter decorrido do estresse oxidativo. A suplementação com zinco conseguiu prevenir esses danos ao agir como um antioxidante.
- A exposição ao tabaco está relacionada a uma diminuição na qualidade seminal, demonstrando assim uma correlação entre o tabagismo e a infertilidade/subfertilidade.
- A suplementação com zinco protegeu a maioria dos danos provocados pelo tabaco, mostrando que este agente antioxidante e estimulante de divisão celular pode ser uma alternativa promissora em homens com infertilidade provocada pelos componentes do tabaco.



*Referências
Bibliográficas*



7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABREU, L.C.; PICARELLI, Z.P.; VALLE, J.R. Contractile capacity of seminal vesicles from rats in different hormonal conditions. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, v.27, p.57-71, 1980.

AGARWAL, A.; IKEMOTO, I.; LOUGHLIN, K.R.; Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. **J. Urol.**, v.152, p.107-110, 1994.

AGARWAL, A.; SALEH, R.A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. **Urol. Clin. North Am.**, v.29, p.817-827, 2002.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Curr. Opin. Obstet. Gynecol.**, v.18, p.325-332, 2006.

AITKEN, R.J.; IRVINE, D.S.; WU, F.C. Prospective analyses of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.164, p.542-551, 1991.

AITKEN, R.J. A free radical theory of male infertility. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.6, p.19-24, 1994.

AITKEN, R.J. The amoroso lecture. The human spermatozoon – a cell in crisis? **J. Reprod. Fertil.**, v.115, p.1-7, 1999.

AITKEN, R.J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and Y chromosome. **Reproduction**, v.122, p. 497-506, 2001.

AITKEN, R.J.; SAWYER, D. The human spermatozoon-not waving but drowning. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.518, p.518-585, 2003.

AITKEN, R.J.; DE LULLIIS, G.N. Value of DNA integrity assays for fertility evaluation. **Soc. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.65, p.81-92, 2007.

AL-BADER, A.; OMU, A.E.; DASHTI, H.M. Chronic cadmium toxicity to sperm of heavy cigarette smokers: immunomodulation by zinc. **Arch. Androl.**, v.43, p.135-140, 1999.

ALI, M.M.; FREI, E.; STRAUB, J.; BREUER, A.; WIESSLER, M. Induction of metallothionein by zinc protects daunorubicin toxicity in rats. **Toxicology**, v.179, p.85-93, 2002.

ALVAREZ, J.G.; TOUCHSTONE, J.C.; BLASCO, L.; STOREY, B.T. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. **J. Androl.**, v.8, p.338-348, 1987.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e Documentação - Referências-Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **List of journals indexed in Index Medicus**. Washington, 1997. 240p.

AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **J. Androl.**, v. 10, n.2, p.89-98, 1989.

ANBARASI, K.; VANI, G.; BALAKRISHNA, K.; SHYAMALA, D. Effect of bacoside A on brain antioxidant status in cigarette smoke exposed rats. **Life Sci.**, v.78, p.1378-1384, 2006.

ARIENS, E.J. Affinity and intrinsic activity in the theory of competitive inhibition. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v.99, p.32-49, 1954.

ARTECHE, E.; STRIPPOLI, G.; LOIRAND, G.; PACAUD, P.; CANDENAS, L.; MOLTÓ, J.C.; SOUTO, L.; FERNANDEZ, J.; NORTE, M.; MARTÍN, J.D.; SAVINEAU, J.P. An analysis of the mechanisms involved in the okadaic acid induced contraction of the estrogen-primed rat uterus. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.282, p.201-207, 1997.

ASAMI, S.; MANABE, H.; MIYAKE, J.; TSURUDOME, Y.; YAMAGUCHI, R.; ITOH, H.; KASAI, H. Cigarette smoking induces an increase in oxidative damage, 8-hydrodeoxyguanosine, in central site of the human lung. **Carcinogenesis**, v.18, p.1763-1766, 1997.

BAGCHI, D.; VUCHETICH, P.J.; BAGCHI, M.; TRAN, M.X.; KROHN, R.L.; RAY, S.D.; STOHS, S.J. Protective effects of zinc salts on TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation, glutathione depletion, DNA damage and peritoneal macrophage activation in mice. **Gen. Pharmacol.**, v.30, p.43-50, 1998.

BAN, Y.; KOMATSU, T.; KEMI, M.; INAGAKI, S.; NAKATSUKA, T.; MATSUMOTO, H. Testicular spermatid and epididymal sperm head counts as an indicator for reproductive toxicity in rats. **Exp. Anim.**, v.44, p.315-322, 1995.

BASKARAN, S.; LAKSHMI, S.; PRASAD, P.R. Effect of cigarette smoke and lipid peroxidation and antioxidant enzymes in albino rat. **Ind. J. Exp. Biol.**, v.37, p.1196-2000, 1999.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C.G.; The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **J. Androl.**, v.21, p. 895-902, 2000.

BECKER, S.; BERHANE, K. A meta-analysis of 61 sperm count studies revisited. **Fertil. Steril.**, v.67, p.1103-1108, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Prevalência de Tabagismo no Brasil.** Dados dos inquéritos epidemiológicos em capitais brasileiras. Rio de Janeiro: O Instituto; 2004.

BRAY, T.M.; BETTGER, W.J. Physiological role of zinc as an antioxidant. **Free Radic. Biol. Med.**, v.8, p.281-291, 1990.

CARLSEN, E.; GIWERCMAN, A.; KEIDING, N.; SKAKKEBAEK, N.E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. **Br. Med. J.**, v.305, n.6854, p.609-613, 1992.

- CASTARDELI, É.; PAIVA, S.A.R.; MATSUBARA, B.B.; MATSUBARA, L.S.; MINICUCCI, M.F.; AZEVEDO, P.S.; CAMPANA, Á.O.; ZORNOFF, L.A.M. A exposição crônica à fumaça do cigarro resulta em remodelação cardíaca e prejuízo da função ventricular em ratos. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 84, p. 320-324, 2005.
- CHAI, F.; TRUONG-TRAN, A.Q.; HO, L.H.; ZALEWSKI, P.D. Regulation of caspase activation and apoptosis by cellular zinc fluxes and zinc deprivation: a review. **Immunol. Cell Biol.**, v.77, p.272-278, 1999.
- CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. An introduction to free radical biochemistry. **Br. Med. Bull.**, v.49, p.481-493, 1993.
- CHIA, S.E ; CHIA, S.E.; ONG, C.N.; CHUA, L.H.; HO, L.M.; TAY, S.K. Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and various sperm parameters between fertile and infertile men. **J. Androl.**, v.21, p.53-57, 2000.
- CHIMIENTI, F.; AOUFFEN, M.; FAVIER, A.; SEVE, M. Zinc homeostasis-regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate. **Curr. Drug Targets**, v.4, p.323-328, 2003.
- CHITRA, S.; SEMMALAR, R.; DEVI, C.S.S. Effect of fish oil on cigarette smoking induced dyslipidemia in rats. **Ind. J. Pharmacol.**, v.32, p.114-119, 2000.
- CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. **Biol. Reprod.**, v.52, p.982-988, 1995.
- CIESLIK, K.; KLENK-MAJEWKA, B.; DANILCZUK., Z.; WROBEL, A.; LUPINA, T.; OSSOWSKA, G. Influence of zinc supplementation on imipramine effect in a chronic unpredictable stress (CUS) model in rats. **Pharmacol. Rep.**, v.59, p.46-52, 2007.
- COMHAIRE, F.H.; CHRISTOPHE, A.B.; ZALATA, A.A.; DHOOGHE, W.S.; MAHMOUD, A.M.; DEPUYDT, C.E. The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v.63,p.159-165, 2000.
- CUASNICÚ, P. S.; COHEN, D.J.; ELLERMAN, D.A.; BUSO, D.; DAROS, V.G. Changes in specific sperm proteins during epididymal maturation. In: ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. (Eds). **The epididymis – from molecules to clinical practice**. New York: Kluwer Academic, 2002. p. 389-403.
- DAVIS, R.M. Passive smoking: history repeats itself. **Br. Med. J.**, v.316, p.961-962, 1997.
- DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. **J. Androl.**, v.13, p.368-378, 1992a.
- DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. **J. Androl.**, v.13, p. 379-389, 1992b.

- DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Hum. Reprod.**, v.10, p.15-21, 1995.
- DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Rev. Reprod.**, v.2, p.48-54, 1997.
- DELIBAS, N.; OZCANKAYA, R.; ALTUNTAS, I.; SUTCU, R. EFFECT of cigarette smoke on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and NMDA receptor subunits 2A and 2B concentration in rat hippocampus. **Cell Biochem. Funct.**, v.21, p.69-73, 2003.
- DILSIZ, N.; OLCUCU, A.; CAY, M.; NAZIROGLU, M. Protective effects of selenium, vitamin C and vitamin E against oxidative stress of cigarette smoke in rats. **Cell Biochem. Funct.**, v.17, p.01-07, 1999.
- DIX, T.A.; AIKENS, J. Mechanism and biological relevance of lipid peroxidation initiation. **Chem. Res. Toxicol.**, v.6, p. 02-18, 1993.
- DUNKEL-SCHETTER, C.; LOBEL, M. Psychological reactions to infertility. In STANTON, A. L.; DUNKEL-SCHETTER, C. (Eds.). **Infertility: perspectives from stress and coping research**. New York: Plenum Press, 1991. p. 29-57.
- EBISCH, I.M.W.; PIERIK, F.H.; DE JONG, F.H.; THOMAS, C.M.G.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M. Does folic acid and zinc sulphate intervention affect endocrine parameters and sperm characteristics in men? **Int. J. Androl.**, v.29, p.339-345, 2006.
- EBISCH, I.M.W.; THOMAS, C.M.G.; PETERS, W.H.M.; BRAAT, D.D.M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. **Hum. Reprod. Update**, v.13, p.163-174, 2007.
- ELHANBLY, S.; ABDEL-GABER, S.; FATHY, H.; EL-BAYOUMI, Y.; WALD, M.; NIEDERBERGER, R.S. Erectile dysfunction in smokers: a penile dynamic and vascular study. **J. Androl.**, v. 25, p. 991-995, 2004.
- ELIASSON, R.; JOHNSEN, O.; LINDHOLMER, C. Effects of zinc on human sperm respiration. **Life Sci. I.**, v.10, p.1317-1320, 1971.
- FAVIER, A.E. The role of zinc in reproduction. Hormonal mechanisms. **Biol. Trace Elem. Res.**, v.32, p.363-382, 1992.
- FERNANDEZ, C.D.B.; PORTO, E.M.; ARENA, A.C.; KEMPINAS, W.G. Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. **Int. J. Androl.**, v.31, p. 427-437, 2007.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 43, p. 61-68, 1997.
- FRAGA, C.G.; MOTCHIK, P.A.; WYROBEK, A.J.; REMPEL, D.M.; AMES, B.N. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. **Mutat. Res.**, v.35, p. 1999-2003, 1996.
- FRANÇA, L.R.; GHOSH, S.; YE, S.J.; RUSSELL, L.D. Surface and surface-to-volume relationships of the sertoli cell during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Biol. Reprod.**, v.49, p. 1215-1228, 1993.

- FRANÇA, L.R.; OGAWA, T.; AVARBOCK, M.R.; BRINSTER, R.L.; RUSSELL, L.D. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. **Biol. Reprod.**, v.59, p. 1371-1377, 1998.
- FREEDMAN, L.P. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. **Endocr. Rev.**, v.13, p.129-145, 1992.
- GARCIA, P.C.; RUBIO, E.M.; COLAUTO, C.E.R.; RUBINI, A.S; QUIEZI, R.G.; PEREIRA, O.C.M.; PONTES, A. Relation between seminal quality and chronic tobacco smoke consumption. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v.18, p.85, 2004.
- GAUR, D.S.; TALEKAR, M.; PATHAK, V.P. Effect of cigarette smoking on semen quality of infertile men. **Singapore Med. J.**, v.48, p.119-123, 2007.
- GERARDIN, D.C.C.; PEREIRA, O.C.M.; KEMPINAS, W.G.; FLORIO, J.C.; MOREIRA, E.G.; BERNARDI, M.M. Sexual behaviour, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress. **Physiol. Behav.**, v.84, p.97-104, 2005.
- GERARDIN, D.C.C.; BERNARDI, M.M.; MOREIRA, E.G.; PEREIRA, O.C.M. Neuroendocrine and reproductive aspects of adult male rats exposed neonatally to an antiestrogen. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.83, p.618-623, 2006.
- GERARDIN, D.C.C.; PIFFER, R.C.; GARCIA, P.C.; MOREIRA, E.G.; PEREIRA, O.C.M. Effects of maternal exposure to an aromatase inhibitor on sexual behavior and neurochemical and endocrine aspects of adult male rat. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.20, p.557-562, 2008.
- GOSSIAN, V.V.; SHERMA, N.K.; STRIVASTAVA, L.; MICHELAKIS, A.M.; ROVNER, D.R. Hormonal effects of smoking. II Effects on plasma cortisol, growth hormone, and prolactine. **Am. J. Med. Sci.**, v.291, p.325-327, 1986.
- Haidl, G. Management strategies for male factor infertility. **Drugs**, v.62, n.12, p.1741-1753, 2002.
- HALLIWELL, B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? **Trends Biochem. Sci.**, v.24, p.255-259, 1999.
- HAMDI, S.A.; NASSIF, O.I.; ARDAWI, M.S. Effect of marginal or severe dietary zinc deficiency on testicular development and functions of the rat. **Arch. Androl.**, v.38, p.243-253, 1997.
- HANSELL, P. E.; THORN, B. E.; PRENTICE-DUNN, S.; FLOYD, D. L. The relationship of primary appraisals of infertility and other gynecological stressors of coping. **J. Clin. Psychol. Med. Settings**, v.5, p.133-145, 1998.
- HAUSER, R.; SINGH, N.P.; CHEN, Z.; POTHIER, L.; ALTSHUL, L. Lack of an association between environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p,p'-DDE and DNA damage in human sperm measured using the neutral comet assay. **Hum. Reprod.**, v.18, p.2525-2533, 2003.
- HELEN, A.; RAJASREE, C.R.; KRISHNAKUMAR, K.; AUGUST, K.T.; VIJAYAMMAL, P.L. Antioxidant role of oils isolated from garlic (*Allium sativum* Linn) and onion (*Allium*

- cepa* Linn) on nicotine-induced lipid peroxidation. **Vet. Hum. Toxicol.**, v.41, p.316-319, 1999.
- HERMO, L.; ROBAIRE, B. Epididymal cell types and their functions. In: ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. (Eds). **The Epididymis: from molecules to clinical practice**. New York: Kluwer Academic, 2002. p. 81-102.
- HOCKENBERY, D.M.; OLTVAI, Z.N.; YIN, X.M.; MILLIMAN, C.L.; KORSMEYER, S.J. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. **Cell**, v.75, p.241-251, 1993.
- HOIDAS, S.; WILLIAMS, A.E.; TOCHER, J.; HARGREAVE, T.B. Scoring sperm morphology from fertile and infertile cigarette smokers using the scanning electron microscope and image analysis. **Fertil. Steril.**, v.43, p.596-598, 1985.
- HUACUJA, L.; SOSA, A.; DELGADO, N.M.; ROSADO, A. A kinetic study of the participation of zinc in human spermatozoa metabolism. **Life Sci.**, v.13, p.1383-1394, 1973.
- HUANG, Y.L.; TSENG, W.C.; CHENG, S.Y.; LIN, T.H. Trace elements and lipid peroxidation in human seminal plasma. **Biol. Trace Elem. Res.**, v.76, p.207-215, 2000.
- HUANG, Y.L.; TSENG, W.C.; LIN, T.H. In vitro effect of metal ions (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+}) on sperm motility and lipid peroxidation in human semen. **J. Toxicol. Environ. Health**, v.62, p.259-267, 2001.
- HUGHES, C.M.; LEWIS, S.E.M.; MCKELVERY-MARTIN, V.J.; THOMPSON, W.A. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men using a modified comet assay. **Mol. Hum. Reprod.**, v.2, p.613-619, 1996.
- HULL, M.G.R.; NORTH, K.; TAYLOR, H.; FARROW, A.; FORD, W.; CHRISTOPHER, L. Delayed conception and active and passive smoking. **Fertil. Steril.**, v.74, p.725-733, 2000.
- JI, B.T.; SHU, X.O.; LIMET, M.S.; SHENG, W.; WACHOLDER, S.; GAO, Y.T.; YING, D.M.; JIN, F. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.89, p.238-244, 1997.
- KANE, D.J.; SARAFIAN, T.A.; ANTON, R.; HAHN, H.; GRALLA, E.B.; VALENTINE, J.S.; ORD, T.; BREDESEN, D.E. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. **Science**, v.262, p.1274-1277, 1993.
- KAPAWA, A.; GIANNAKIS, D.; TSOUKANELIS, K.; KANAKAS, N.; BALTOGIANNIS, D.; AGAPITOS, E.; LOUTRADIS, D.; MIYAGAWA, I.; SOFIKITIS, N. Effects of paternal cigarette smoking on testicular function, sperm fertilizing capacity, embryonic development, and blastocyst capacity for implantation in rats. **Andrologia**, v.36, p.57-68, 2004.
- KENAKIN, T. Competitive antagonism. In: KENAKIN, T. (Ed). **Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. p.331-373.
- KOCA Y.; ÖZDAL Ö.L.; ÇELİK M.; ÜNAL S.; BALABAN N. Antioxidant activity of seminal plasma in fertile and infertile men. **Arch. Androl.**, v.49, p.355-359, 2003.

- KODAMA, H.; YAMAGUCHI, R.; FUKUDA, J.; KASAI, H.; TANAKA, T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. **Fertil. Steril.**, v.68, p.519-524, 1997.
- KOUL, A.; BHATIA, V.; BANSAL, M.P. Effect of alpha-tocopherol on pulmonary antioxidant defense system and lipid peroxidation in cigarette smoke inhaling mice. **BMC Biochem.**, v.2, p.14, 2001.
- KVIST, U.; KJELLBERG, S.; BJÖRNDAHL, L.; SOUFIR, J.C.; ARVER, S. Seminal fluid from men with agenesis of the Wolffian ducts: zinc-binding properties and effects on sperm chromatin stability. **Int. J. Androl.**, v.13, p.245-252, 1990.
- KWIECINSKI, G.C.; PETRIE, G.I.; DELUCA, H.F. Vitamin D is necessary for reproductive functions of the male rat. **J. Nutr.**, v.119, p.741-744, 1989.
- LEAKE, A.; CHISHOLM, G.D.; HABIB, F.K. The effect of zinc on the 5 alpha-reduction of testosterone by hyperplastic human prostate gland. **J. Steroid Biochem.**, v.20, p.651-655, 1984.
- LEWIS, S.E.M.; AGBAJE, I.M. Using the alkaline comet assay in prognostics tests for male infertility and assisted reproductive technology outcomes. **Mutagenesis**, v.23, p.163-170, 2008.
- LI, Y.; WU, J.; YUAN, W.; ZHOU, W.; GAO, E. Are serum zinc and copper levels related to semen quality? **Fertil. Steril.**, v.89, p.1008-1011, 2008.
- LINDER, R.E.; SLOTT, V.L.; SUAREZ, J. Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposure to fourteen reproductive toxicants. **Reprod. Toxicol.**, v.6, p.491-505, 1992.
- LLOYD, D.R.; CARMICHAEL, P.L.; PHILLIPS, D.H. Comparison of the formation of 8-hydroxy-29-deoxyguanosine and single- and double-strand breaks in DNA mediated by fenton reactions. **Chem. Res. Toxicol.**, v.11, p.420-427, 1998.
- LU, Y.; MORIMOTO, K. Exposure level to cigarette tar or nicotine is associated with leukocyte DNA damage on male Japanese smokers. **Mutagenesis**, v.23, p.451-455, 2008.
- MAK, V.; JARVI, K.; BUCKSPAN, M.; FREEMAN, M.; HECHTER, S.; ZINI, A. Smoking is associated with the retention of retention of cytoplasm by human spermatozoa. **Urology**, v.56, p.463-466, 2000.
- MANN, T. **The biochemistry of semen and of the male reproductive tract**. 2. ed. London: Methuen, 1964. p.493.
- MERINO, G.; LIRA, S.C.; MARTINEZ-CHEQUER, J.C. Effects of cigarette smoking on semen characteristics of a population in Mexico. **Arch. Androl.**, v.41, p.11-15, 1998.
- MIKHAILIDIS, D.P.; GANOTAKIS, E.S.; PAPADAKIS, J.A.; JEREMY, J.Y. Smoking and urological disease. **J. R. Soc. Health**, v.118, p.210-212, 1998.

- MILLER, L.C.; BECKER, T.J.; TAINTER, M.L. Quantitative evaluation of spasmolytic drug "in vitro". **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.92, p.260-268, 1948.
- NETTER, A.; HARTOMA, R.; NAHOUL, K. Effect of zinc administration on plasma testosterone, dihydrotestosterone, and sperm count. **Arch. Androl.**, v.7, p.69-73, 1981.
- OLSHAN, A.; MATTISON, D. **Male mediated developmental toxicity**. New York: Plenum Press.1994. 418p.
- OLSON, G.E.; NAGDAS, S.K.; WINFREY, V.P. Structural differentiation of spermatozoa during post-testicular maturation. In: ROBAIRE, B.; HINTON, B.T. (Eds). **The Epididymis: from molecules to clinical practice**. New York: Kluwer Academic, 2002, p.371-387.
- OMU, A.E.; DASHTI, H.; AL-OTHMAN, S. Treatment of asthenozoospermia with zinc sulphate: andrological, immunological and obstetric outcome. **Eur. J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol.**, v.79, p.179-184, 1998.
- OTEIZA, P.I.; OLIN, K.L.; FRAGA, C.G.; KEEN, C.L. Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes. **J. Nutr.**, v.125, p.823-829, 1995.
- OVERSTREET, J.W.; KATZ, D.F. Semen analysis. **Urol. Clin. North Am.**, v.14, p.441-449, 1987.
- PAIVA, S.A.R.; ZORNOFF, L.A.M.; OKOSHI, M.P.; OKOSHI, K.; CICOGNA, A.C.; CAMPANA, A.O. Behavior of cardiac variables in animals exposed to cigarette smoke. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.81, p.225-228, 2003.
- PAKSY, K.; VARGA, B.; LAZAR, P. Zinc protection against cadmium-induced infertility in female rats. Effect of zinc and cadmium on the progesterone production of cultured granulose cells. **BioMetals**, v.10, p.27-35, 1996.
- PATTERSON, T.R.; STRINGHAM, J.D.; MEIKLE, A.W. Nicotine and cotinine inhibit steroidogenesis in mouse Leydig cells. **Life Sci.**, v.46, p.265-271, 1990.
- PASQUALOTTO, F.F.; SHARMA, R.K.; NELSON, D.R.; THOMAS, A.J.; AGARWAL, A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. **Fertil. Steril.**, v.73, p.459-464, 2000.
- PASQUALOTTO, F.F.; LUCON, A.M.; SOBREIRO, B.P.; PASQUALOTTO, E.B.; ARAP, S. Effects of medical therapy, alcohol, smoking, and endocrine disruptors on male infertility. **Rev. Hosp. Clin.**, v. 59, p. 375-282, 2004.
- PASQUALOTTO, F.F.; SUNDARAM, A.; SHARMA, R.K.; BORGES-JR, E.; PASQUALOTTO, E.B.; AGARWAL, A. Semen quality and oxidative stress scores in fertile and infertile patients with varicocele. **Fertil. Steril.**, v.89, p.602-607, 2008.
- PEREIRA, O.C.M. Some effects of cimetidine on the reproductive organs of rat. **Gen. Pharmacol.**, v.18, p.197-199, 1987.
- PEREIRA, O.C.M.; PICARELLI, Z.P.; ABREU, L.C. Cryptorchidism versus morphological and pharmacological aspects of reproductive organs. **Arq. Med.**, v.4, p.199-203, 1991.

- PEREIRA, O.C.M.; DEGA, M.R.; SOUZA, M.S.S. Noradrenergic response in vas deferens from rats submitters to acute and reated stress. **Gen. Pharmacol.**, v.30, p.417-421, 1998.
- PEREIRA, O.C.M.; CONEGLIAN-MARISE, M.S.P.; GERARDIN, D.C.C. Effects of neonatal clomiphene citrate on fertility and sexual behavior in male rats. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.134, p.545-550, 2003.
- PERRY, D.K.; SMYTH, M.J.; STENNICKE, H.R.; SALVESEN, G.S.; DURIEZ, P. POIRIER, G.G.; HANNUN, Y.A. Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.18530-18533, 1997.
- PICARELLI, Z.P.; HYPOLITO, N.; VALLE, J.R. Synergistic effects of 5-hidroxytryptamine on the response of rats seminal vesicle to adrenaline and noradrenaline. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v.138, p.354-363, 1962.
- PICARELLI, Z.P.; VALLE, J.R. Hormonal regulation of the rat seminal vesicle sensitivity to adrenaline, noradrenaline, acetylcholine and acetyl-beta-methylcholine. **Br. J. Pharmacol.**, v.35, p.468-475, 1969.
- POLANSKA, J.; WIDLAK, P. Bulky DNA adducts in human sperm: relationship with fertility, semen quality, smoking, and environmental factors. **Mutat. Res.**, v.537, p.53-65, 2003.
- PORTO, C.S.; ABREU, L.C; PICARELLI, Z.P. Influence of castration upon the seminal vesicle response to parassymphomimetic drug. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v.47, p.349-355, 1981.
- POTTS, R.J.; NEWBURY, C.J; SMITH, G.; NOTARIANNI, L.J.; JEFFERIES, T.M. Sperm chromatin damage associated with male smoking. **Mutation Res.**, v.403, p.103-111, 1999.
- PRASAD, A.S.; COSSACK, Z.T. Zinc supplementation and growth in sickle cell disease. **Ann. Intern. Med.**, v.100, p.367-371, 1984.
- PRESTON, A.M. Cigarette smoking-nutritional implications. **Prog. Food Nutr. Sci.**, v.15, p.103-127, 1991.
- PRYOR, W.A.; STONE, K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.686, p.12-27, 1993.
- RAMLAU-HANSEN, C.H.; THULSTRUP, A.M.; AGGERHOLM, A.S.; JENSEN, M.S.; TOFT, G.; BONDE, J.P. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. **Hum. Reprod.**, v.22, p.188-196, 2007.
- REKHA, P.S.; KUTTAN, G.; KUTTAN, R. Antioxidant activity of brahma rasayana. **Indian J. Exp. Biol.**, v.39, p.447-452, 2001.
- REQUENA, J.R.; FU, M.X.; AHMED, M.U.; JENKINS, A.J.; LYONS, T.J.; BAYNES, J.W.; THORPE, S.R. Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein. **Biochem. J.**, v.322, p.317-325, 1997.

- RIBEIRO, C.M.; PEREIRA, O.C.M. 5alpha-reductase 2 inhibition impairs brain defeminization of male rats: reproductive aspects. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.82, p.228-235, 2005.
- RIFFO, M.; LEIVA, S.; AUSTUDILLO, J. Effect of zinc on human sperm motility and the acrosome reaction. **Int. J. Androl.**, v.15, p.229-237, 1992.
- ROBB, G.W.; AMANN, R.P.; KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **J. Reprod. Fertil.**, v.54, p.103-107, 1978.
- ROBBINS, W.A.; ELASHOFF, D.A.; XUN, L.; JIA, J. ; LI, N. ; WU, G. ; WEI, F. Effect of lifestyle exposures on sperm aneuploidy. **Cytogenet. Genome Res.**, v.111, p.371-377, 2005.
- RUBES, J.; LOWE, X.; MOORE, D.; PERREAULT, S.; SLOTT, V.; EVENSON, D.; SELEVAN, S.G.; SHERRY, G.; WYROBEK, A.J. Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men. **Fertil. Steril.**, v.70, p.715-723, 1998.
- RUSSELL, L.D.; FRANÇA, L.R. Building a testis. **Tissue Cell**, v.27, p.129-147, 1995.
- RUSSELL, L.D.; BRINSTER, R.L. Ultrastructural observations of spermatogenesis following transplantation of rat testis cells into mouse seminiferous tubules. **J. Androl.**, v. 17, p. 615-627, 1996.
- SAID, T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. **Hum. Reprod.**, v.9, p.331-345, 2003.
- SAID, T.M.; PAASCH, U. ; GLANDER, H.J. ; ARGAWAL, A. Role of caspases in male infertility. **Hum. Reprod. Update**, v.10, p.39-51, 2004.
- SAILER, B.L. ; JOST, L.K. ; EVENSON, D.P. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. **J. Androl.**, v.16, p.80-87, 1995.
- SAKKAS, D.; MARIETHOZ, E.; MANICARDI, G.; BIZARRO, D.; BIANCHI, P.G.; BIANCHI, U. Origin DNA damage in ejaculated human spermatozoa. **Rev. Reprod.**, v.4, p.31-37, 1999.
- SAKKAS, D.; MOFFAT, O.; MANICARDI, C.G.; MARIETHOZ, E.; TAROZZI, N.; BIZARRO, D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. **Biol. Reprod.**, v.66, p.1061-1067, 2002.
- SALEH, R.A.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.K.; NELSON, D.R.; TOMAS-JR, A.J. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in fertile men: a prospective study. **Fertil. Steril.**, v.78, p.491-499, 2002.
- SALEWSKY, E. Farbemethode zum markroskopischen nachweis von implantat cosstellen am uterus de ratter naunyn schmuderbeys. **Arch. Pharmacol.**, v.247, p.367, 1964.
- SANDSTEAD, H.H.; PRASAD, A.S.; SCHULERT, A.R.; FARID, Z.; MIALE-JR, A.; BASSILLY, S.; DARBY, W. Human zinc deficiency, endocrine manifestations and response to treatment. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.20, p.422-442, 1967.

- SCHMIDT, F. Smoking damages male fertility. **Andrologia**, v.18, p.445-454, 1986.
- SEED, J.; CHAPIN, R.E.; CLEGG, E.D.; DOSTAL, L.A.; FOOTE, R.H.; HURTT, M.E.; KLINEFELTER, G.R.; MAKRIS, S.L.; PERREAULT, S.D.; SCHRADER, S.; SEYLER, D.; SPRANDO, R.; TREINEN, K.A.; VEERAMACHANENI, D.N.; WISE, L.D. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. **Reprod. Toxicol.**, v.10, p.237-244, 1996.
- SELMANOFF, M.K.; BRODKIN, L.D.; WEINER, R.I. Aromatization and 5 α -reduction of androgens in discrete hypothalamic and limbic regions of the male and female rat. **Endocrinology**, v.101, p.841-848, 1977.
- SERGERIE, M.; OUHILAL, S.; BISSONNETTE, F.; BROFEURAND, J.; BLEAU, G. Lack of association between smoking and DNA fragmentation in spermatozoa of normal men. **Hum. Reprod.**, v.15, p.1314-1321, 2000.
- SHAMSI, M.B.; KUMAR, R.; DADA, R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. **Indian J. Med. Res.**, v.127, p.115-123, 2008.
- SHARMA, R.K.; PASQUALOTTO, F.F.; NELSON, D.R.; THOMAS, A.J.; AGARWAL, A. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. **Hum. Reprod.**, v.14, p.2801-2807, 1999.
- SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D.(Eds). **The physiology of reproduction**. 2nd ed. New York: Raven, 1994. p.1363-1434.
- SHARPE, R.M.; MILLAR, R.P.; BAIRD, D.T. Lifestyle and environmental contribution to male infertility. **Br. Med. Bull.**, v.56, p.630-642, 2000.
- SHARPE, R.M.; FRANKS, S. Environment, lifestyle and infertility-an inter-generational is. **Nat. Cell. Biol.**, v.4, p.33-40, 2002.
- SHEN, H.M.; CHIA, S.E.; NI, Z.Y.; NEW, A.L.; LEE, B.L.; ONG, C.N. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and the association with cigarette smoking. **Reprod. Toxicol.**, v.11, p.675-680, 1997.
- SHI, Q.; KO, E.; BARCLAY, L.; HOANG, T.; REDEMAKER, A.; MARTIN, R. Cigarette smoking and aneuploidy in human sperm. **Mol. Reprod. Dev.**, v.59, p.417-421, 2001.
- SINGH, N.P.; MULLER, C.H.; BERGER, R.E. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. **Fertil. Steril.**, v.80, p.1420-1430, 2003.
- SMITH, C.J.; PERFETTI, T.A.; MULLENS, M.A.; RODGMAN, A.; DOOTITTLE, D.J. "IARC group 2B carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. **Food Chem. Toxicol.**, v.38, p.825-848, 2000.
- SOFIKITIS, N.; MIYAGAWA, I.; DIMITRIATIDIS, D.; ZAVOS, P.; SIKKA, S.; HELLSTROM, W. Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. **J. Urol.**, v.154, p.1030-1034, 1995.

- SOHN, H.O.; LIM, H.B.; LEE, Y.G.; LEE, D.W.; KIM, Y.T. Effect of subchronic administration of antioxidants against cigarette smoke exposure in rats. **Arch. Toxicol.**, v.67, p.667-673, 1993.
- SORAHAN, T.P Childhood cancer and parental use of alcohol and tobacco. **Ann. Epidemiol.**, v.5, p.354-359, 1995.
- SORAHAN, T.P.; LANCASHIRE, R.J.; HULTEN, M.A.; PECK, I.M.; STEWART, A.M. Childhood cancer and parental use of tobacco. Deaths from 1953 to 1955. **Br. J. Cancer**, v.75, p.134-138, 1997.
- STEDMAN, R.L. The chemical composition of tobacco and tobacco smoke. **Chem. Rev.**, v.68, p.153-207, 1968.
- SULLIVAN, R.; SAEZ, I.; GIROUARD, J.; FRENETTE, G. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 35, p. 01-10, 2005.
- SUN, J.Y.; JING, M.Y; WANG, J.F.; ZI, N.T.; FU, L.J.; LU, M.Q.; PAN, L. Effect of zinc on biochemical parameters and changes in related gene expression assessed by cDNA microarrays in pituitary of growing rats. **Nutrition**, v.22, p.187-196, 2006.
- SUNDERMAN-JR, F.W. The influence of zinc on apoptosis. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, v.25, p.1503-1512, 1995.
- TRINDADE, Z.A.; ENUMO, S.R.F. Triste e incompleta: uma visão feminina da mulher infértil. **Psicol. USP**, v.13, p.1-18, 2002.
- TRUMMER, H.; HABERMANN, H.; HAAS, J.; PUMMER, K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. **Hum. Reprod.**, v.17, p.1554-1559, 2002.
- TRUONG-TRAN, A.Q.; HO, L.H.; CHAI, F.; ZALEWSKI, P.D. Cellular zinc fluxes and the regulation of apoptosis/gene-directed cell death. **J. Nutr.**, v.130, p.1459S-1466S, 2000.
- TURNER, R.M. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? **J. Androl.**, v. 24, p.790-803, 2003.
- TWIGG, J.; FULTON, N.; GOMEZ, E.; IRVINE, D.S.; AITKEN, R.J. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. **Hum. Reprod.**, v.13, p.1429-1436, 1998.
- VAN PELT, A.M.; DE ROOIJ, D.G. Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vitamin A-deficient rats and high replicate doses support the full development of spermatogenic cells. **Endocrinology**, v.128, p.697-704, 1991.
- VAN ROSSUM, J.M. Cumulative dose-response curves. Technique for the making of dose-response curves in isolated and the evaluation of drug parameters. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v.143, p.299-330, 1963.

- VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; BENFATO, V.M.M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v. 30, p.1323-1338, 2007.
- VINE, M.F. Smoking and male reproduction: a review. **Int. J. Androl.**, v.19, p.323-337, 1996.
- VINE, M.F.; TSE, C.K.J.; HU, P.C.; TRUONG, K.Y. Cigarette smoking and semen quality. **Fertil. Steril.**, v. 65, p.835-842, 1996.
- VIRAG, G.; BOUILLY, P.; FRYDAMAN, D. Is impotence an arterial disorder? A study of arterial risk factors in 400 impotent men. **Lancet**, v.26, p.181-184, 1985.
- VOGT, H.J.; HELLER, W.D.; BORELLI, S. Sperm quality of healthy smokers, ex-smokers, and never smokers. **Fertil. Steril.**, v.45, p.106-110, 1986.
- WAGNER, B.A.; BUETTNER, G.A.; BURNS, C.P. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. **Biochemistry**, v.33, p. 4449-4453, 1994.
- WILCKE, J. The mobility of the seminal vesicle under the influence of hormones. **Acta Brevia. Neerl. Physiol. Pharmacol. Microbiol. E.A.**, v.7, p.122-123, 1937.
- WONG, W.Y.; THOMAS, C.M.; MERKUS, J.M.; ZIELHUIS, G.A; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P. Male factor subfertility: possible causes and the impact so nutritional factors. **Fertil. Steril.**, v.73, p.435-442, 2000a.
- WONG, W.Y. ; THOMAS, C.M. ; MERKUS, H.M. ; ZIELHUIS, G.A. ; DOESBURG, W.H. ; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P. Cigarette smoking and the risk of male factor subfertility: minor association between cotinine in seminal plasma and semen morphology. **Fertil. Steril.**, v.74, p.903-935, 2000b.
- WONG, W.Y.; MERKUS, H.M.W.M.; THOMAS, C.M.G.; MENKVELD, R.; ZIELHUIS, G.A.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M. Effects of acid folic and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind randomized, placebo-controlled trial. **Fertil. Steril.**, v.77, p.491-498, 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction**. 4. ed. Australian: Cambridge University Press, 1999. 128 p.
- YACH, D.; BETTCHER, D. Globalization of tobacco industry influence and new global responses. **Tob. Control**, v. 9, p.206-216, 2000.
- YAGI, K. Lipid peroxidation and human diseases. **Chem. Phys. Lipids**, v.45, p.337-351, 1987.
- YAMAMOTO, Y.; ISOYAMA, E.; SOFIKITIS, N.; MIYAGAWA, I. Effects of smoking on testicular function and fertilizing potential in rats. **Urol. Res.**, v.26, p.45-48, 1998.

- YOUNGLAI, E.V.; COLLINS, J.A.; FOSTER, W.G. Canadian semen quality: an analysis of sperm density among eleven academic fertility centers. **Fertil. Steril.**, v.70, p.76-80, 1998.
- ZAGO, M.P.; OTEIZA, P.I. The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. **Free Radic. Biol. Med.**, v.31, p.266-274, 2001.
- ZAR JH. **Biostatistical analysis**. 4. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 663p.
- ZAVOS, P.M.; CORREA, J.R.; ANTYPAS, S.; ZARMAKOUPIIS-ZAVOS, P.N.; ZARMAKOUPIIS, C.N. Effects of seminal plasma from cigarette smokers on sperm viability and longevity. **Fertil. Steril.**, v.3, p.542-549, 1998.
- ZENICK, H.; CLEGG, E.D.; PERREAULT, S.D.; KLINEFELTER, G.R.; GRAY, L.E. Assessment of male reproductive toxicology. In: HAYES, A.W. (Eds). **Principles and methods of toxicology**. New York: Raven Press, 1994. 949p.
- ZENZES, M.T.; BIELECKI, R.D.V.M.; REED, T.E. Detection of benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in sperm of men exposed to cigarette smoke. **Fertil. Steril.**, v.72, p.330-335, 1999.
- ZENZES, M.T. Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. **Hum. Reprod. Update**, v.6, p.122-31, 2000.
- ZHANG, J.; SAVITZ, D.A.; SCHWINGL, P.J.; CAI, W.W. A case-control study of paternal smoking and birth defects. **Int. J. Epidemiol.**, v.21, p.273-278, 1992.
- ZONDERVAN, K.T.; OCKÉ, M.C.; SMIT, H.A.; SEIDELL, J.C. Do dietary and supplementary intakes of antioxidants differ with smoking status? **Int. J. Epidemiol.**, v.25, p.70-79, 1996.



Anexos

