

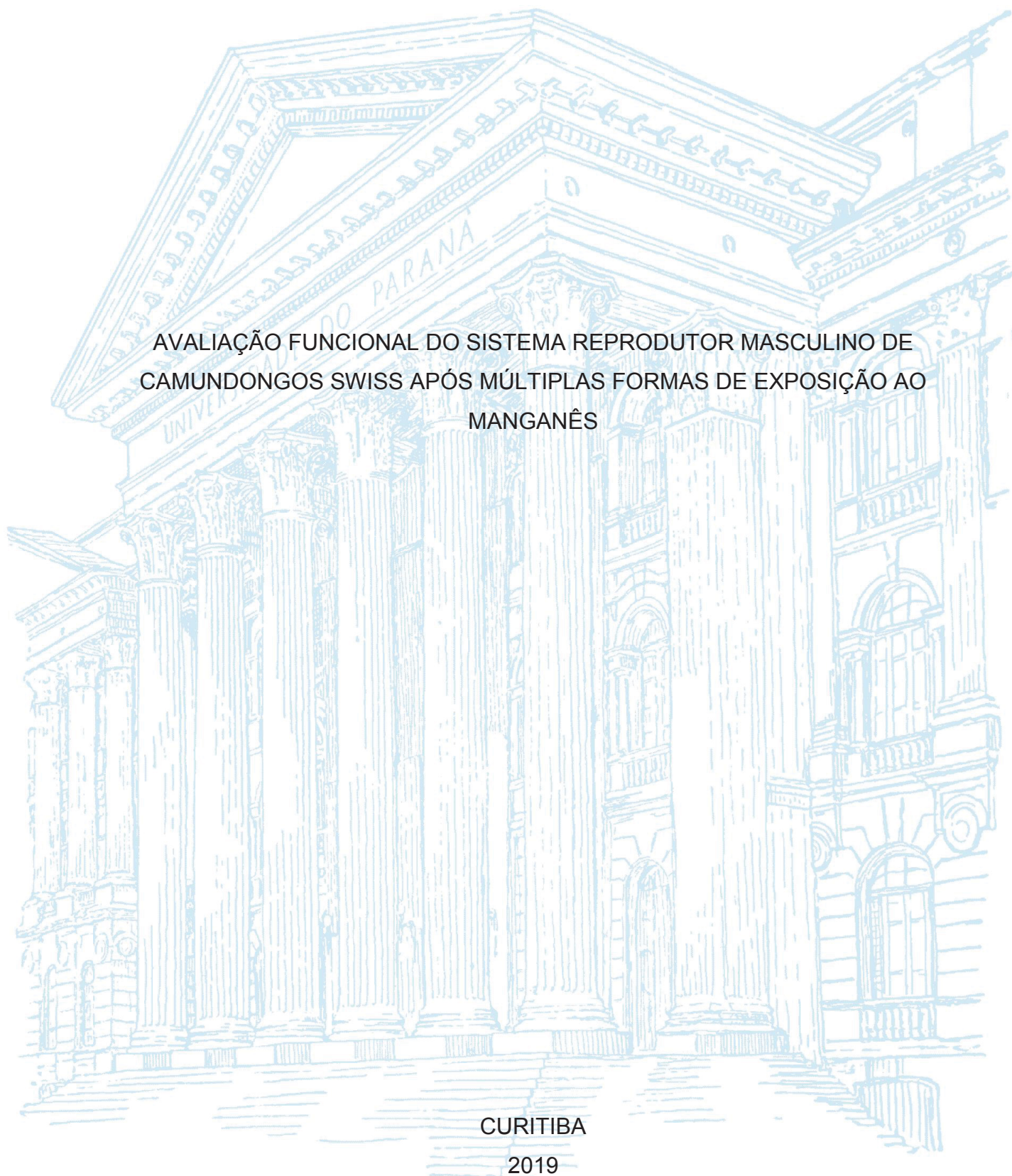
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TUGSTÊNIO LIMA DE SOUZA

AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DE  
CAMUNDONGOS SWISS APÓS MÚLTIPLAS FORMAS DE EXPOSIÇÃO AO  
MANGANÊS

CURITIBA

2019



TUGSTÊNIO LIMA DE SOUZA

AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DE  
CAMUNDONGOS SWISS APÓS MÚLTIPLAS FORMAS DE EXPOSIÇÃO AO  
MANGANÊS

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

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Feijó Ortolani-Machado

Coorientador: Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade

CURITIBA

2019

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

Souza, Tugstênio Lima de  
Avaliação funcional do sistema reprodutor masculino de camundongos  
Swiss após múltiplas formas de exposição ao manganês. / Tugstênio Lima  
de Souza. – Curitiba, 2019.  
137 p.: il.

Orientador: Claudia Feijó Ortolani-Machado  
Coorientador: Anderson Joel Martino Andrade

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Molecular.

1. Manganês. 2. Neurotoxicologia. 3. Toxicologia reprodutiva 4.  
Estresse oxidativo. I. Título II. Ortolani-Machado, Claudia Feijó III.  
Andrade, Anderson Joel Martino IV. Universidade Federal do Paraná.  
Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 546.54



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR - 40001016007P8

### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **TUGSTÊNIO LIMA DE SOUZA** intitulada: **AValiação Funcional do Sistema Reprodutor Masculino de Camundongos Swiss após Múltiplas Formas de Exposição ao Manganês**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

CURITIBA, 11 de Março de 2019.

CLAUDIA FELJÓ ORTOLANI MACHADO  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

LUIS FERNANDO FÁVARO  
Avaliador Externo (UFPR)

JULIANE CENTENO MULLER  
Avaliador Externo (UFPR)



Dedico:

À minha família e aos meus amigos por apoiarem minha caminhada até aqui.

Aos meus professores, por todo o conhecimento compartilhado durante as diferentes etapas da minha formação.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia Feijó Ortolani-Machado, por abrir as portas do laboratório para um “estranho” e pela oportunidade de ingressar como aluno na pós-graduação. Foi um prazer trabalhar com você! Muito obrigado pela confiança, inúmeras correções de trabalho, paciência, preocupação e ensinamentos compartilhados ao longo do desenvolvimento deste projeto.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade, por todo o auxílio durante o delineamento dos experimentos, dicas, contribuição nas análises realizadas e por sempre estar disposto a me ajudar a entender um pouco mais sobre toxicologia reprodutiva.

Ao Prof. Dr. Luís Fernando Fávoro e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliane Centeno Müller por aceitarem o convite de participar da banca avaliadora e contribuir para o trabalho.

Às meninas do Laboratório de Embriotoxicologia, Mari e Mel, pela ótima recepção ao ingressar no laboratório, por sempre serem solícitas quando precisei de ajuda, por todas as conversas e momentos de descontração durante o trabalho. Em especial, agradeço a Amândia, pelos ensinamentos sobre reprodução e manipulação animal, por sempre estar disposta a me ajudar a enfrentar as minhas dificuldades, por ouvir meus dramas e ser uma excelente amiga de projeto. Por último, mas não menos importante, a IC Milena, pelo auxílio com as análises morfométricas e estereológicas. Muito obrigado!

Aos amigos do grupo de Toxicologia Celular e Ambiental: Patrícia, Joelma, Nilce, Aliciane e Tobias por tornarem meu dia a dia mais leve, além de todo o auxílio durante os experimentos. Agradeço especialmente a Maristela pela enorme ajuda e paciência durante as análises bioquímicas. Aos amigos do laboratório de Cultivo Celular, Jéssica, Michele, Fernanda e Benísio, por todos os momentos de descontração e conversas de corredor.

Ao Prof. Dr. Francisco Filipak Neto por sempre estar disposto a sanar minhas dúvidas sobre as análises bioquímicas.

Agradeço imensamente a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lucélia e as meninas do Laboratório de Biologia Adaptativa por disponibilizarem o leitor de microplacas, sem o qual a realização de parte deste trabalho não seria possível.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Katherine (UFPR – Palotina) pelo auxílio com as dosagens hormonais.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Erika Amano, do departamento de botânica, por disponibilizar o fotomicroscópio para captura das imagens histológicas.

Aos meus amigos de graduação, que mesmo de longe, se fazem presentes na minha vida: Karina, Filipe, Marcílio, Renata, Mayra, Erika, João Vitor. Apesar de serem pessoas estressantes, nosso apoio mútuo é fundamental. Amo vocês!

Aos meus presentes de Curitiba: Thais, Luiza e Carine, por toda a agitação durante o mestrado, hospedagem (rs), festinhas, ressacas e dramas. Por todo o equilíbrio de saber que a vida não se resume a artigos científicos ou currículo Lattes.

Às meninas da república, Bruna e Sthay, pelos inúmeros momentos Masterchef, conversas e diversão.

À minha família, em especial a minha mãe/pai Sirley, e ao meu pai João Batista (*in memoriam*) pelo apoio incondicional para que eu trilhasse esse caminho, por toda a educação, suporte e carinho. A minha irmã, Stefânia, por compreender o meu momento de ausência. Amo vocês!

Agradeço as minhas ex-orientadoras da Universidade Federal do Espírito Santo, Erika Takagi, Adriane Braga e Cristiane Vergílio, por todos os ensinamentos ao longo da minha graduação, que foram de grande valia durante o mestrado.

À Universidade Federal do Paraná pela infraestrutura e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

“E agora José? A festa acabou”  
(Carlos Drummond de Andrade)



## RESUMO

O manganês (Mn) é um elemento essencial amplamente distribuído ao longo do planeta e é utilizado para diversas funções metabólicas. Entretanto, muitos estudos têm demonstrado que este elemento, em determinadas condições de exposição, é neurotóxico. Contudo, pouco se sabe sobre o seu efeito no sistema reprodutor masculino. Para verificar o potencial tóxico do Mn sobre a função do sistema reprodutor foram conduzidos dois experimentos para avaliar o impacto dos diferentes tipos de exposição utilizados nos parâmetros espermáticos, estresse oxidativo e características morfológicas. Para o experimento I (Exp I) foi realizada uma exposição multigeracional aos reprodutores (geração F0) e prole (geração F1), em baixas concentrações, nas doses de 0 (controle), 0,013, 0,13 e 1,3 mg/kg/dia. A geração F1 foi dividida em duas categorias, caracterizando aqueles animais que foram expostos apenas de forma parental (EP) ao Mn e aqueles que foram expostos de forma parental e direta (EPD) até a maturidade sexual. O experimento II (Exp II) consistiu em uma exposição direta e em altas concentrações, sendo utilizada as doses de 0 (controle), 15, 30 e 60 mg/kg/dia. Os resultados foram divididos em três capítulos, com a finalidade de avaliar diferentes aspectos da toxicologia reprodutiva acerca do Mn. O primeiro capítulo corresponde aos resultados obtidos para o Exp I, onde se observou que as diferentes doses utilizadas foram capazes de alterar os parâmetros espermáticos avaliados, sendo a motilidade progressiva a mais afetada. Além disso, os animais do grupo EP sofreram maiores alterações significativas nos biomarcadores de estresse oxidativo, em especial no testículo. Sendo assim, baseado no maior número de alterações significativas no grupo EP, sugere-se que possivelmente algum mecanismo epigenético de resistência esteja envolvido no menor número de alterações nos animais EPD. No segundo capítulo, referente ao Exp II, foi investigado como o Mn afeta o complexo hipotálamo-gonadal através de uma exposição a altas doses. Os parâmetros espermáticos foram drasticamente afetados e, neste capítulo, através do maior número de biomarcadores avaliados foi possível inferir o possível efeito do Mn na depleção do sistema de defesa antioxidante. Além disso, foi encontrada uma redução da atividade da acetilcolinesterase no hipotálamo, demonstrando potencial neurotóxico e, possivelmente, estando correlacionado com um déficit endócrino na produção de testosterona ao longo do desenvolvimento destes animais. Por fim, no terceiro capítulo foi analisado o impacto das diferentes formas de exposição na morfologia testicular, sendo avaliados parâmetros histopatológicos, morfométricos e estereológicos. Foi possível constatar que todas as formas de exposição foram capazes de reduzir o número total de túbulos seminíferos com morfologia normal. Além disso, aqueles expostos de forma EPD apresentaram maiores alterações estereológicas e morfométricas do que aqueles animais expostos a altas concentrações, demonstrando que o contato com este elemento em fases críticas do desenvolvimento podem promover danos permanentes na estrutura do órgão. Sendo assim, a partir das múltiplas formas de exposição do Mn adotadas no presente trabalho, foi possível concluir que mesmo a exposição a doses com baixas concentrações é capaz de causar injúrias no sistema reprodutor, comprometendo a funcionalidade do mesmo.

Palavras-chave: toxicologia reprodutiva, toxicologia do desenvolvimento, estresse oxidativo, reprodução, parâmetros espermáticos.

## ABSTRACT

Manganese (Mn) is an essential element widely distributed throughout the planet and is used for the several metabolic functions. However, many studies have shown neurotoxic aspects of this element under certain exposure conditions. Nevertheless, little is known about its effect on the male reproductive system. To evaluate the toxic potential of Mn on the function of the reproductive system, two experiments were conducted to evaluate the impact of different types of exposure on sperm parameters, oxidative stress and morphological characteristics. For the experiment I (Exp I) a transgenerational exposure to the breeder (F0 generation) and offspring (F1 generation) was performed at low concentrations at 0 (control), 0.013, 0.13 and 1.3 mg/kg/day. The F1 generation was divided into two categories, characterizing those that were only exposed in a parental way (EP) to Mn and those that were exposed in a parental and direct way (EPD) until sexual maturity. Experiment II (Exp II) consisted of a direct exposure in high concentrations, using doses at 0 (control), 15, 30 and 60 mg/kg/day. The results were divided into three chapters, in order to evaluate different aspects of reproductive toxicology of Mn. The first chapter corresponds to the results obtained for Exp I, in it was possible to notice that the different doses used were able to alter the sperm parameters, being the progressive motility the most affected. In addition, only the animals of the EP grupo suffered significant alteration in some biomarkers of oxidative stress, especially in the testis. Therefore, based on the largest number of significant changes in the EP group, it is suggested that possibly some epigenetic mechanism of resistance is involved in the smaller number of alterations in the EPD animals. In the second chapter, referring to Exp II, it was investigated how Mn affects the hypothalamus-gonadal complex through exposure to high doses. The sperm parameters were drastically affected and in this chapter, through the largest number of biomarkers evaluated, it was possible to infer the possible effect of Mn on the depletion of the antioxidant defense system. In addition, a reduction in acetylcholinesterase activity was found in the hypothalamus, demonstrating neurotoxic potential and possibly being correlated with and endocrine deficit in the production of testosterone throughout the development of these animals. Finally, the third chapter analyzed the impact of different forms of exposure on testicular morphology, with histopathological, morphometric and stereological parameters. It was possible to observe that all forms of exposure were able to reduce the total number of seminiferous tubules with normal morphology. In addition, those exposed in EPD presented higher stereological and morphometric alterations than those exposed to high concentrations of Mn, demonstrating that contact with this element in critical phases of development can promote permanent damage to the structure of the organ. Thus, from the multiple forms of Mn exposure adopted in the present study it was possible to conclude that even exposure to low concentrations is capable of cause injuries to the reproductive system, compromising its functionality.

Keywords: reproductive toxicology, developmental toxicology, oxidative stress, reproduction, spermatogenic parameters.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E METODOLOGIA

FIGURA 1 – MECANISMO TOXICOCINÉTICO DE ABSORÇÃO E EXCREÇÃO DO Mn .....	18
FIGURA 2 – MECANISMO TOXICOCINÉTICO E TRANSPORTADORES ENVOLVIDOS NO INFLUXO E EFLUXO CELULAR DE Mn .....	19
FIGURA 3 – MECANISMO TOXICODINÂMICO DE AÇÃO DO Mn .....	21
FIGURA 4 – ESQUEMA DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE .....	25
FIGURA 5 – ANATOMIA TESTICULAR – MAMÍFERO .....	26
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS COMPARTIMENTOS DO TÚBULO SEMINÍFERO E DA BARREIRA HEMATOTESTICULAR ....	27
FIGURA 7 – ESTÁGIOS DO EPITÉLIO SEMINÍFERO DE CAMUNDONGO .....	28
FIGURA 8 – TIPOS CELULARES ENCONTRADOS NO EPITÉLIO DO EPIDÍDIMO. ....	30
FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DESENHO EXPERIMENTAL E PERÍODO DE TRATAMENTO DOS PROGENITORES E DA PROLE .....	35
FIGURA 10 – CÂMARA DE NEUBAUER E QUADRANTES CONTABILIZADOS ....	36
FIGURA 11 – ESQUEMA DA MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES APÓS O TESTE HIPOSMÓTICO .....	37
FIGURA 12 – PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS.....	41
FIGURA 13 – GRADE DE 266 PONTOS UTILIZADA PARA ANÁLISE ESTEREOLÓGICA .....	42

### CAPÍTULO I

FIGURA 1 – PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DA GERAÇÃO F0 .....	57
FIGURA 2 – PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DA GERAÇÃO F1 .....	58

FIGURA 3 – BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS – TESTÍCULO E VESÍCULA SEMINAL .....	61
FIGURA 4 – BIOMARCADORES NÃO ENZIMÁTICOS – TESTÍCULO E VESÍCULA SEMINAL .....	62
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA E INTEGRADA DOS BIOMARCADORES ANALISADOS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS .....	64

## **CAPÍTULO II**

FIGURA 1 – PESO DOS ANIMAIS DURANTE O PERÍODO EXPERIMENTAL .....	81
FIGURA 2 – MOTILIDADE, VITALIDADE E CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA DE CAMUNDONGOS APÓS EXPOSIÇÃO AO MANGANÊS.....	83
FIGURA 3 – PRODUÇÃO ESPERMÁTICA E TEMPO DE TRÂNSITO ESPERMÁTICO .....	84
FIGURA 4 – METABÓLITOS ANDROGENICOS FECAIS E TESTOSTERONA SÉRICA.....	84
FIGURA 5 – BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO - TESTÍCULO .....	86
FIGURA 6 – BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO – VESÍCULA SEMINAL .....	87
FIGURA 7 – BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO – HIPOTÁLAMO ....	88
FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA E INTEGRADA DOS BIOMARCADORES ANALISADOS.....	90
FIGURA 9 – AÇÃO DO Mn NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE TESTICULAR.....	94

## **CAPÍTULO III**

FIGURA 1 – ANÁLISE DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.....	109
---	-----

FIGURA 2 – MORFOLOGIA ESPÉRMATICA.....	110
FIGURA 3 – CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS.....	111
FIGURA 4 – ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TESTÍCULO.....	112
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA – RIB.....	117

## LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1 – RESULTADOS OBTIDOS PARA OS MACHOS E FÊMEAS DA GERAÇÃO F0 – EXPERIMENTO I ..... 126
- QUADRO 2 – COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS PARA EXPOSIÇÃO PARENTAL E PARENTAL E DIRETA EM BAIXAS DOSES DE Mn (EXPERIMENTO I) ..... 127
- QUADRO 3 – RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DA EXPOSIÇÃO EM ALTAS DOSES DE Mn (EXPERIMENTO II) ..... 128

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 1 – REFERÊNCIA PARA INGESTÃO DIÁRIA DE Mn.....	23
---	----

### CAPÍTULO I

TABELA 1 – DADOS GERAIS SOBRE O GANHO DE MASSA E PESO DOS ÓRGÃOS DOS MACHOS REPRODUTORES DA GERAÇÃO F0.....	55
--	----

TABELA 2 – DADOS GERAIS SOBRE O GANHO DE MASSA E PESO DOS ÓRGÃOS DOS MACHOS DA GERAÇÃO F1 .....	56
--	----

TABELA 3 – ANÁLISE DOS FATORES ESPERMÁTICOS – ANOVA DE DUAS VIAS .....	59
---	----

TABELA 4 – DADOS GERAIS SOBRE O PESO CORPORAL E PESO DOS ÓRGÃOS DAS FÊMEAS REPRODUTORAS (GERAÇÃO F0).....	59
--	----

TABELA 5 – EFEITO DOS FATORES – ANOVA DE DUAS VIAS.....	62
---	----

TABELA 6 – ÍNDICE RIB ( <i>Integrated Biomarker Response</i> ) PARA OS GRUPOS TESTADOS .....	63
---	----

### CAPÍTULO II

TABELA 1 – DADOS GERAIS SOBRE O PESO DOS ÓRGÃOS APÓS A EXPOSIÇÃO EM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE MnCl <sub>2</sub> .....	82
---	----

TABELA 2 – VALORES DO ÍNDICE RIB .....	89
--	----

### CAPÍTULO III

TABELA 1 – PARÂMETROS BIOMÉTRICOS DOS ANIMAIS.....	108
--	-----

TABELA 2 – DADOS HISTOMORFOMÉTRICOS.....	113
--	-----

TABELA 3 – PROPORÇÃO VOLUMÉTRICA (%) DOS COMPONENTES TUBULARES E INTERTÚBULO.....	114
--	-----

TABELA 4 – VOLUME (ML) DOS COMPARTIMENTOS TESTICULARES E ÍNDICE  
ITS.....115

TABELA 5 – RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (RIB).....116



## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

µL	- Microlitro
µm	- Micrômetro
µM	- Micromolar
3β-HSD	- <i>3β-Hydroxysteroid dehydrogenase</i>
AChE	- Acetilcolinesterase
Al	- Alumínio
AL	- Área luminal
ANVISA	- Agência nacional de vigilância sanitária
As	- Arsênio
AT	- Área tubular
ATP	- Adenosina trifosfato
ATSDR	- <i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
Ca	- Cálcio
cAMP	- Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CAT	- Catalase
Cd	- Cádmiio
CDNB	- 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CEUA	- Comitê de ética do uso de animais
Co	- Cobalto
Cr	- Cromo
CTS	- Comprimento total dos túbulos seminíferos
Cu	- Cobre
DMT-1	- Transportador de metal divalente – 1
DTNB	- 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	- <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EP	- Exposição parental
EPD	- Exposição parental e direta
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
Fe	- Ferro
FeSO <sub>4</sub> .NH <sub>4</sub>	- Sulfato ferroso amoniacal
FSH	- Hormônio folículo estimulante

g - Grama  
G6PDH - Glicose-6-fosfato desidrogenase  
Ga - Gálio  
GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofina  
GPx - Glutaciona peroxidase  
GR - Glutaciona redutase  
GSH - Glutaciona reduzida  
GSSG - Glutaciona oxidada  
GST - Glutaciona s-transferase  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - Ácido sulfúrico  
HCl - Ácido clorídrico  
Hg - Mercúrio  
IGS - Índice gonadossomático  
ILC - Immature Leydig cell  
IOM - *Institute of medicine*  
ITS - Índice tubulossomático  
Kg - Quilograma  
L - Litro  
LH - Hormônio luteinizante  
Li - Lítio  
LPO - Peroxidação lipídica  
MAF - Metabólitos androgênicos fetais  
MBLAC - Músculo levantador do ânus/bulbocavernoso  
MDA - Malondialdeído  
mg - Miligrama  
mL - Mililitro  
Mn - Manganês  
Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O - Manganita  
MnCl<sub>2</sub> - Cloreto de manganês  
MnO<sub>2</sub> - Pirulósita  
Mn-SOD - Manganês superóxido dismutase  
NaCl - Cloreto de Sódio  
NADH - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina  
NBT - Azul de nitrotetrazolio  
ng - Nanograma  
Ni - Níquel  
nmol - Nanomolar  
 $O^{2\bullet-}$  - Radical superóxido  
 $OH\bullet$  - Radical hidroxila  
 $ONOO^-$  - Peroxinitrito  
P450ssc - Cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage  
Pb - Chumbo  
PCO - Carbonilação proteica  
PG - Prostaglandina  
PKA - Proteína kinase A  
PKC - Proteína kinase C  
PMSF - Phenylmethylsulfonyl fluoride  
Pv - Proporção volumétrica  
RIB - Resposta Integrada dos Biomarcadores  
RIB - Resposta Integrada dos Biomarcadores  
RL - Raio luminal  
RT - Raio tubular  
Se - Selênio  
SNK - Student Newman Keuls  
SOD - Superóxido dismutase  
SSC - Spermatogonial Stem Cell  
StAR - *Steroidogenic acute regulatory protein*  
TfR - *Transferrin receptor*  
TNP - Tióis não proteicos  
U - Urânio  
UFPR - Universidade Federal do Paraná  
UPR - *Unfolded Protein Response*  
V - Vanádio  
WHO - *World Health Organization*  
ZIP - Transportador de zinco  
 $TNF\alpha$  - Fator de necrose tumoral  $\alpha$

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

® - marca registrada

$\Sigma$  - somatório de números

°C - graus Celsius

$\pi$  - pi

$\pm$  - mais ou menos

$\alpha$  - alfa

$\beta$  - beta

## SUMÁRIO

<b>1 ) INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>16</b>
<b>2 ) REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
2.1 ) MANGANÊS (MN) – ASPECTOS GERAIS.....	17
2.2 ) TOXICOCINÉTICA.....	17
2.3 ) TOXICODINÂMICA.....	19
2.4 ) TOXICIDADE DO MN E A SAÚDE HUMANA.....	21
2.5 ) TOXICOLOGIA REPRODUTIVA DOS METAIS.....	23
2.6 ) SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO.....	26
2.6.1 ) Testículo.....	26
2.6.2 ) Epidídimo .....	29
2.6.3 ) Vesícula Seminal .....	30
<b>3 ) JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>31</b>
<b>4 ) OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
4.1 ) OBJETIVO GERAL .....	31
4.2 ) OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>5 ) MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
5.1 ) EXPERIMENTO I – EXPOSIÇÃO PARENTAL E DIRETA EM BAIXAS CONCENTRAÇÕES .....	33
5.1.1 ) Modelo animal e desenho experimental.....	33
5.1.2 ) Dissecção e coleta dos órgãos .....	35
5.1.3 ) Análises dos parâmetros espermáticos.....	35
5.1.3.1 ) Motilidade espermática.....	36
5.1.3.2 ) Concentração espermática.....	36
5.1.3.3 ) Vitalidade espermática .....	36
5.1.3.4 ) Morfologia espermática .....	37
5.1.4 ) Análises bioquímicas – Estresse oxidativo.....	37
5.1.4.1 ) Atividade da Catalase (CAT) .....	37
5.1.4.2 ) Atividade da Superóxido dismutase (SOD) .....	38
5.1.4.3 ) Atividade da Glutathione S-transferase (GST) .....	38
5.1.4.4 ) Concentração de tióis não proteicos (TNP).....	38
5.1.4.5 ) Peroxidação lipídica (LPO).....	39
5.1.5 ) Resposta Integrada dos Biomarcadores (RIB).....	39

5.1.6 ) Histologia .....	39
5.1.7 ) Histomorfometria.....	40
5.1.8 ) Estereologia .....	41
5.2 ) EXPERIMENTO II – EXPOSIÇÃO DIRETA E EM ALTAS CONCENTRAÇÕES ..	42
5.2.1 ) Modelo animal e desenho experimental.....	42
5.2.2 ) Dissecção e coleta dos órgãos .....	43
5.2.3 ) Análises dos parâmetros espermáticos.....	43
5.2.4 ) Produção espermática diária e trânsito espermático .....	43
5.2.5 ) Dosagem de testosterona sérica e metabólitos androgênicos fecais.....	44
5.2.6 ) Análises bioquímicas – Estresse oxidativo.....	44
5.2.6.1 ) Catalase (CAT).....	45
5.2.6.2 ) Superóxido Dismutase (SOD) .....	45
5.2.6.3 ) Glutathione S-transferase (GST).....	45
5.2.6.4 ) Glutathione peroxidase (GPx) .....	45
5.2.6.5 ) Glutathione dissulfeto redutase (GR) .....	45
5.2.6.6 ) Tiós não proteicos (TNP).....	45
5.2.6.7 ) Peroxidação lipídica (LPO).....	46
5.2.6.8 ) Acetilcolinesterase (AChE).....	46
5.2.7 ) Resposta Integrada dos Biomarcadores (RIB).....	46
5.2.8 ) Histologia .....	46
5.2.9 ) Histomorfometria.....	46
5.2.10 ) Estereologia .....	46
5.3 ) ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
<b>6 ) RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>48</b>
<b>1) INTRODUÇÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>2) MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
2.1) DESENHO EXPERIMENTAL.....	51
2.2) DISSECÇÃO E COLETA DOS ÓRGÃOS .....	52
2.3) ANÁLISES DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS .....	53
2.3.1) Motilidade espermática .....	53
2.3.2) Concentração espermática .....	53
2.3.3) Vitalidade espermática.....	53

2.4) ANÁLISE DA GESTAÇÃO E FERTILIDADE – GERAÇÃO F0.....	53
2.5) ANÁLISES BIOQUÍMICAS – ESTRESSE OXIDATIVO .....	54
2.6) RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (RIB).....	54
2.7) ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
<b>3) RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
3.1) DESENVOLVIMENTO GERAL E PESO DOS ÓRGÃOS.....	55
3.2) PARÂMETROS ESPERMÁTICOS.....	56
3.3) GESTAÇÃO E FERTILIDADE – GERAÇÃO F0.....	59
3.4) ESTRESSE OXIDATIVO.....	60
3.5) ANÁLISE DA RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (RIB).....	63
<b>4) DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>5) REFERENCIAS .....</b>	<b>68</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>74</b>
<b>1) INTRODUÇÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>2) MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>77</b>
2.1) DESENHO EXPERIMENTAL.....	77
2.2) DISSECÇÃO E COLETA DOS ÓRGÃOS .....	77
2.3) ANÁLISES DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS .....	78
2.3.1) Motilidade espermática .....	78
2.3.2) Concentração espermática .....	78
2.3.3) Vitalidade espermática.....	78
2.4) PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA E TRÂNSITO ESPERMÁTICO.....	79
2.5) DOSAGEM DE TESTOSTERONA SÉRICA E METABÓLITOS ANDROGÊNICOS FECALIS.....	79
2.6) ANÁLISES BIOQUÍMICAS – ESTRESSE OXIDATIVO .....	80
2.7) RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (RIB).....	80
2.8) ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	80
<b>3) RESULTADOS .....</b>	<b>81</b>
3.1) DESENVOLVIMENTO GERAL E PESO DOS ÓRGÃOS.....	81
3.2) PARÂMETROS ESPERMÁTICOS.....	82
3.3) DOSAGEM DE METABÓLITOS ANDROGÊNICOS FECALIS E TESTOSTERONA SÉRICA.....	84
3.4) ESTRESSE OXIDATIVO.....	84
3.5) RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (RIB).....	89

<b>4) DISCUSSÃO</b> .....	<b>90</b>
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>100</b>
<b>1) INTRODUÇÃO</b> .....	<b>102</b>
<b>2) MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>103</b>
2.1) DESENHO EXPERIMENTAL .....	103
2.1.1) Experimento I – Exposição direta em baixas concentrações .....	103
2.1.2) Experimento II – Exposição parental e direta em baixas concentrações .....	104
2.1.3) Experimento III – Exposição direta em altas concentrações .....	104
2.2) DISSECÇÃO E ANÁLISE ESPERMÁTICA .....	104
2.3) HISTOPATOLOGIA .....	105
2.4) HISTOMORFOMETRIA .....	105
2.5) ESTEREOLOGIA .....	105
2.6) RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (RIB) .....	106
2.7) ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	106
<b>3) RESULTADOS</b> .....	<b>107</b>
3.1) PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E ESPERMÁTICOS .....	107
3.2) ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	109
3.3) PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS .....	112
3.4) PARÂMETROS ESTEREOLÓGICOS .....	113
3.5) RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (RIB) .....	115
<b>4) DISCUSSÃO</b> .....	<b>117</b>
<b>5) REFERÊNCIAS</b> .....	<b>120</b>
<b>7) DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>124</b>
<b>8) CONCLUSÕES</b> .....	<b>129</b>
<b>9) REFERÊNCIAS</b> .....	<b>130</b>



## 1 ) INTRODUÇÃO GERAL

Com o crescente processo de industrialização a presença de elementos no meio ambiente, como chumbo (Pb), cádmio (Cd), arsênio (As), mercúrio (Hg) e manganês (Mn), aumentaram. A maior disponibilidade destes metais pode ampliar a probabilidade de contaminar uma variedade de formas de vida (RANA, 2007).

O Mn é considerado um elemento traço necessário para o desenvolvimento humano, pois participa de diversas funções metabólicas com a finalidade de manter parâmetros da homeostase corporal. Ele atua no sistema imune e auxilia na metabolização de macromoléculas orgânicas (ASCHNER; ASCHNER, 2005; KEEN et al., 2000), além de atuar como cofator na manganês superóxido dismutase (MnSOD), agindo na defesa antioxidante da célula contra radicais livres (MARTINEZ-FINLEY et al., 2013).

Diversos metais, entre eles o Mn, possuem papéis específicos relacionados ao sistema reprodutor masculino. Contudo, em quantidades elevadas podem causar uma série de complicações (FRAGA, 2005), como redução na fertilidade masculina em modelos animais e humanos, visto que metais tóxicos e xenobióticos promovem danos testiculares ao induzir estresse oxidativo neste órgão (TURNER, LYSIAK, 2008; MURAWSKA-CIALOWICZ et al., 2012; CHANDEL; JAIN, 2014; WANG et al., 2017). Estudos mostram que em aves, altas concentrações de Mn induzem estresse oxidativo, alterações morfológicas e apoptose das células da linhagem espermatogênica (LIU X. et al., 2013a). De maneira semelhante, em camundongos e ratos o Mn também pode afetar a motilidade e o número de espermatozoides (ADEDARA et al., 2017a; 2017b; PONNAPAKAM et al., 2003a), sugerindo uma interferência direta sobre os parâmetros reprodutivos e a fecundidade. Por fim, foi observado que humanos expostos de forma prolongada a este metal essencial podem apresentar quadros de intoxicação, sendo o manganismo, caracterizado por uma série de patologias neurológicas, um dos mais conhecidos (MARTINEZ-FINLEY et al., 2013; O'NEAL; ZHENG, 2015). Entretanto, apesar da literatura pertinente à neurotoxicidade do Mn ser ampla (GERBER et al., 2002; ERIKSON et al., 2007; MARTINEZ-FINLEY et al., 2013; OKADA et al., 2016), pouco se conhece sobre seus possíveis efeitos tóxicos no sistema reprodutor masculino.

Objetivando verificar as alterações na estrutura e funcionamento do sistema reprodutor masculino de camundongos Swiss, após o tratamento com o Mn, esta dissertação está organizada em: 1) Introdução geral; 2) Revisão de literatura; 3) Metodologia geral e 4) Resultados, sendo este tópico dividido em três capítulos de acordo com os objetivos propostos neste trabalho.

## 2 ) REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ) MANGANÊS (MN) – ASPECTOS GERAIS

O Mn pertence ao grupo 7 da tabela periódica, com número atômico 25 e massa molar de 54,94 g/mol. Possui cerca de 11 estados de oxidação, variando de -3 até +7, sendo a sua forma mais estável representada pelo íon  $Mn^{2+}$  (ROCHA; AFONSO, 2012).

É um elemento abundante na terra e encontra-se amplamente distribuído na litosfera, hidrosfera e nos sistemas biológicos, compondo aproximadamente 0,1% da crosta terrestre (*World Health Organization - WHO*, 2004). De acordo com a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry – ATSDR* (2012) e Larini et al. (1997), o Mn não é encontrado em sua forma pura, mas faz parte de mais de 100 minerais, sendo a pirolusita ( $MnO_2$ ), manganita ( $Mn_2O_3 \cdot H_2O$ ) e outras formas sulfatadas/carbonatadas suas principais fontes inorgânicas.

É amplamente empregado na indústria metalúrgica, produção de fertilizantes, fungicidas, pilhas secas, vidros, cerâmicas e alguns produtos farmacêuticos, como o ácido ascórbico (vitamina C) (ROCHA; AFONSO, 2012; RUPPENTHAL, 2013). Sendo assim, as principais fontes antrópicas de liberação do Mn no ambiente são decorrentes de águas residuais, lodo de esgoto, processamento de minérios, emissões industriais e combustão de combustíveis fósseis (WHO, 2004). Desta forma, esta maior disponibilidade de Mn no ambiente aumenta a probabilidade de contaminação das várias formas de vida (MILLALEO et al., 2010; REIS et al., 2010).

O Mn possui grande importância para determinadas funções vitais em animais e plantas, sendo os tipos  $Mn^{2+}$  e  $Mn^{3+}$  as formas mais utilizadas biologicamente (WHO, 2011; RUPPENTHAL, 2013). Ele atua como cofator de diversas enzimas celulares, como quinases, descarboxilases, transferases e hidrolases (WHO, 2011). Além disso, é necessário para o desenvolvimento morfofuncional de ossos, cartilagem (ASCHNER; ASCHNER, 2005; HURLEY, 1981) e do aparelho reprodutor (ASCHNER; ASCHNER, 2005; GREGER, 1999; KEEN, 1999). Contudo, em determinadas condições, este elemento pode promover danos na constituição do esqueleto, cartilagem (GERBER et al., 2002) e testículo (LIU X. et al., 2013a; 2013b).

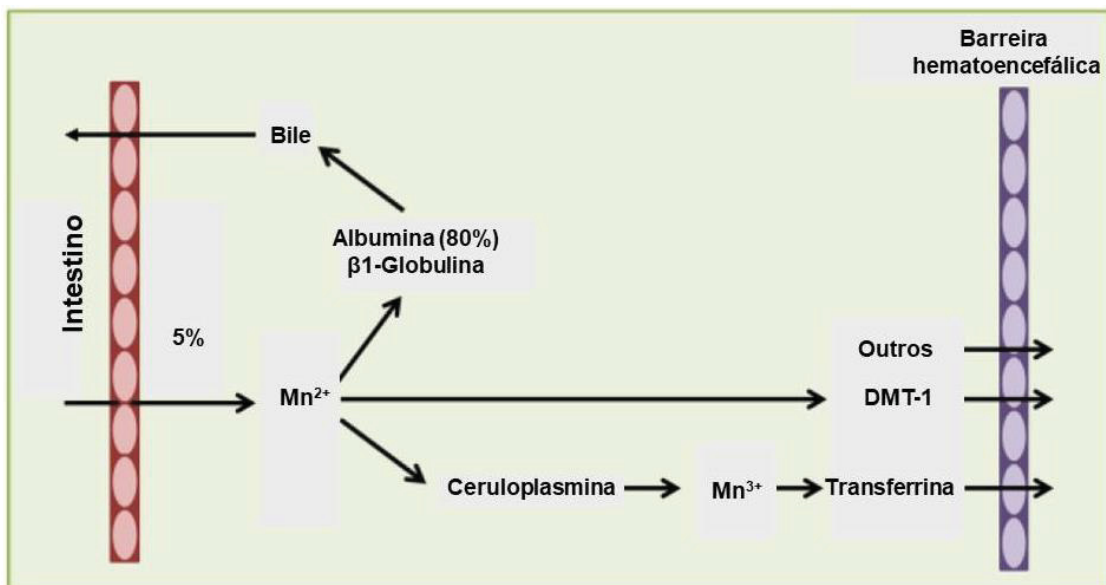
### 2.2 ) TOXICOCINÉTICA

Dentre as formas de exposição ao Mn a inalação e a ingestão são as principais vias de contato com este elemento (ATSDR, 2012). A absorção ocorre, primariamente, através da dieta, pela ingestão de água e alimentos, podendo também ser absorvida pelo pulmão, por meio das vias aéreas, através do contato com aerossóis ou ar contaminado (TOBIASSEN et al., 2003).

Cerca de 3-5% do Mn inorgânico é absorvido pelo trato gastrointestinal em humanos. Entretanto, é válido ressaltar que fatores como idade e o nível de elementos traços no organismo influenciam na quantidade de Mn a ser adquirida (TOBIASSEN et al., 2003). Sendo assim, geralmente neonatos e pessoas com deficiência de ferro (Fe) costumam apresentar uma maior taxa de absorção deste elemento (ASCHNER; ASCHNER, 2005; TOBIASSEN et al., 2003).

Ao ser absorvido pelo sistema digestório o Mn se liga a diversas proteínas séricas como a albumina, transferrina ou ceruloplasmina, sendo transportado pela circulação sanguínea (MARTINZES-FINLEY et al., 2013; CROSSGROVE; ZHENG, 2004; CHEN et al., 2015). Além disso, existe uma série de transportadores celulares específicos que são capazes de carrear o Mn para o interior da célula, possibilitando que este elemento atravesse diferentes barreiras corporais como, por exemplo, a barreira hematoencefálica (CHEN et al., 2015; ASCHNER; ASCHNER, 2005) (FIGURA 1).

FIGURA 1 – MECANISMO TOXICOCINÉTICO DE ABSORÇÃO E EXCREÇÃO DO Mn



FONTE: Adaptado e modificado de RUMSBY et al., 2014.

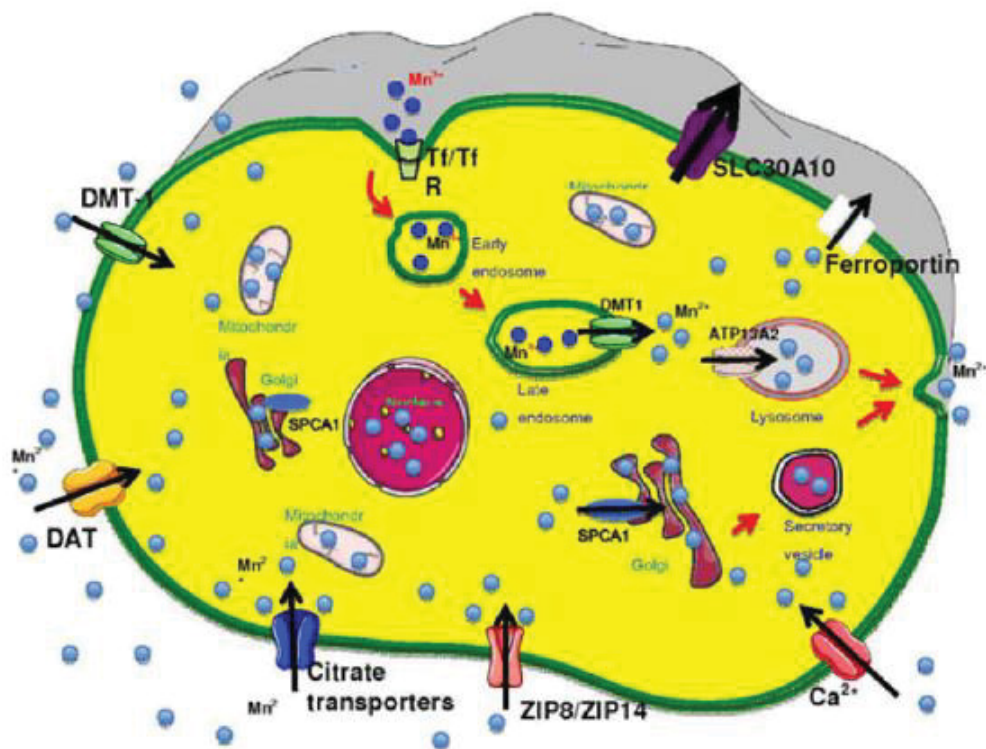
Os transportadores celulares DMT-1 (*Divalent Metal Transporter 1*) e o TfR (*Transferrin Receptor*) são responsáveis, respectivamente, pela importação de  $Mn^{2+}$  e  $Mn^{3+}$  para o meio intracelular, dado que estas são as formas mais utilizadas biologicamente (CHEN et al., 2015; ASCHNER; ASCHNER, 2005; CROSSGROVE; ZHENG, 2004; MARTINEZ-FINLEY et al., 2013). Sendo assim, como o Mn possui homologia molecular com outros metais, em especial na forma  $Mn^{2+}$ , ele pode competir como substrato e utilizar transportadores de zinco (Zn) (ZIP8 e ZIP14) e canais de  $Ca^{2+}$  (CHEN et al., 2015; MARTINEZ-FINLEY et al., 2013).

Já o  $Mn^{3+}$ , que é importado pelo TfR, é transformado em  $Mn^{2+}$  durante este processo através do microambiente ácido dos endossomos (CHEN et al., 2015). Além disso, outros

transportadores secundários como os de dopamina, colina e citrato são capazes de realizar a importação de Mn para o citoplasma (CHEN et al., 2015; MARTINEZ-FINLEY et al., 2013) (FIGURA 2). A exportação do Mn para o meio extracelular é realizada pelas proteínas transportadoras ATPase 13A2, SLC30A10, ferroportina e SPCA1 ( $\text{Ca}^{2+}$  ATPase), que também podem estar associadas com o sistema vesicular de excreção, que envolve o retículo endoplasmático (CHEN et al., 2015). O balanço entre influxo/efluxo de Mn na célula, mediado pelos transportadores citados anteriormente, mantém a homeostase celular e auxilia no controle de situações de toxicidade (CHEN et al., 2015) (FIGURA 2).

A nível sistêmico, a maior parte da excreção de Mn é feita pelas fezes, através da liberação da bile no intestino, gerando um *loop* enterohepático de eliminação e absorção pelo organismo (NEAL; GUILARTE, 2012; RUMSBY et al., 2014; WHO, 2011). Contudo, a excreção deste elemento também pode ocorrer, em menor quantidade, através do sistema renal (WHO, 2011).

FIGURA 2 – MECANISMO TOXICOCINÉTICO E TRANSPORTADORES ENVOLVIDOS NO INFLUXO E EFLUXO CELULAR DE Mn



Esfera azul claro:  $\text{Mn}^{2+}$ . Esfera azul escuro:  $\text{Mn}^{3+}$ . FONTE: CHEN et al., 2015.

### 2.3 ) TOXICODINÂMICA

O mecanismo toxicodinâmico durante o processo de toxicidade do Mn envolve, principalmente, a mitocôndria, promovendo uma série de danos através do estresse oxidativo (NEAL; GUILARTE, 2013; TARALE et al., 2016). O Mn intracelular se acumula

primariamente na mitocôndria por meio da atividade do transportador uniporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , culminando em um rápido acúmulo deste metal na organela, visto que não há mecanismo mitocondrial de exportação de Mn (NEAL; GUILARTE, 2013).

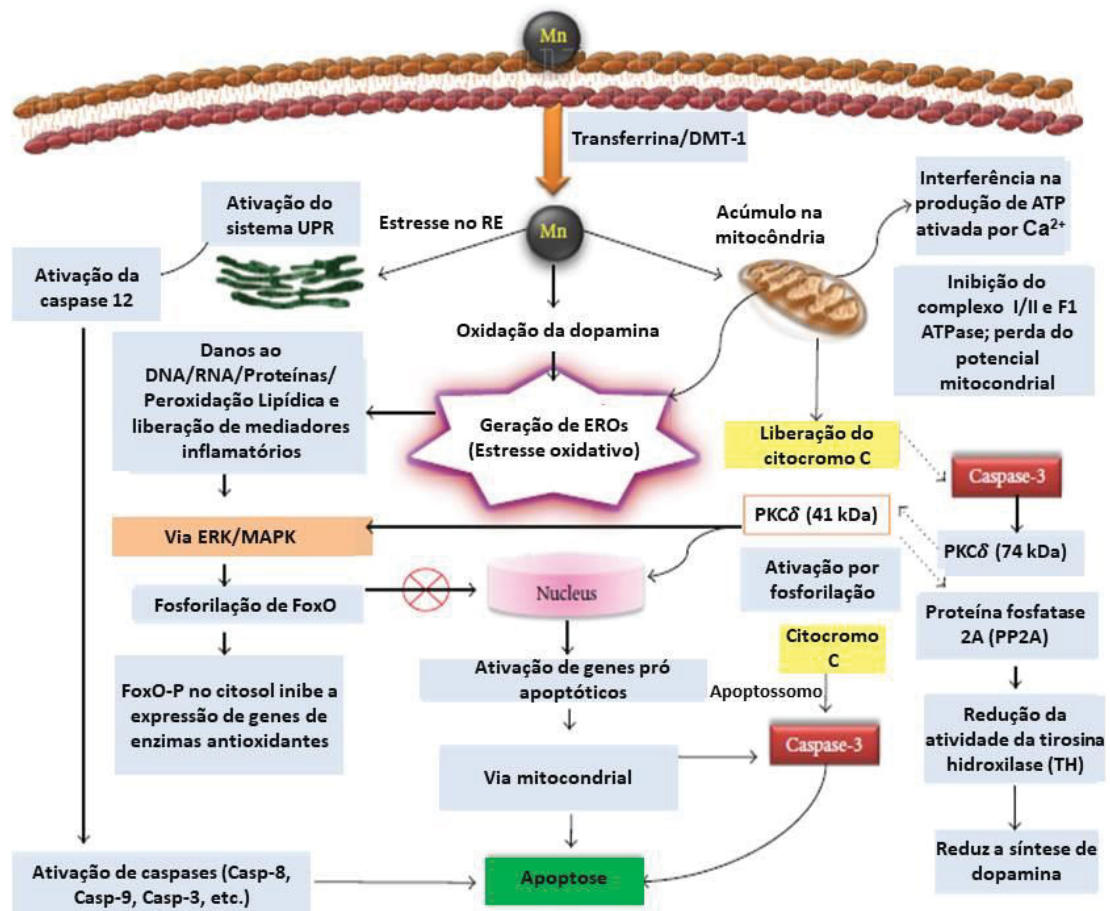
Sendo assim, uma série de proteínas envolvidas, como o complexo I (NADH desidrogenase) e II (succinato desidrogenase) e os domínios  $F_1/F_0$  da ATP sintase, que atuam na cadeia transportadora de elétrons e na produção de ATP, são inibidas (NEAL; GUILARTE, 2013; TARALE et al., 2016). Além disso, a homeostasia dos íons de  $\text{Ca}^{2+}$  é alterada, promovendo modificação na atividade de diversas enzimas (piruvato desidrogenase, isocitrato desidrogenase,  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase) que atuam no ciclo de Krebs (TARALE et al., 2016). Logo, ocorre uma disfunção na produção de energia pela célula devido à perda do potencial da membrana mitocondrial, culminando na produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, gerando uma condição de estresse oxidativo (NEAL; GUILARTE, 2013; TARALE et al., 2016).

O retículo endoplasmático rugoso (RER) também pode ser um alvo durante o mecanismo de toxicidade do Mn. Este processo gera um estresse na organela, que ativa o sistema UPR (*Unfolded Protein Response*) devido a grande quantidade de proteínas mal formadas em seu lúmen (TARALE et al., 2016). O terceiro alvo do Mn, a dopamina, está presente apenas em neurônios dopaminérgicos e, em condições de excesso, promove uma autooxidação massiva desta molécula (TARALE et al., 2016).

Todos os alvos intracelulares do Mn, em uma condição de toxicidade, promovem estresse oxidativo, ativam vias de comunicação (ERK/MAPK) através da proteína quinase c ( $\text{PKC}\delta$ ), caspases e outras proteínas que estão relacionadas com uma série de processos que induzem a apoptose (TARALE et al., 2016) (FIGURA 3).

Em um contexto mais atual, sabe-se que o Mn pode apresentar um potencial mecanismo epigenético durante a neurotoxicidade promovida por exposições crônicas. Este mecanismo envolve complexas vias de comunicação celular que promovem a metilação/hipometilação de regiões gênicas, aumentando a expressão de uma proteína denominada  $\alpha$ -sinucleína que, em grandes quantidades, se acumula nos neurônios gerando a fisiopatologia referente à doença de Parkinson/Manganismo (TARALE et al., 2016).

FIGURA 3 – MECANISMO TOXICODINÂMICO DE AÇÃO DO Mn



FONTE: Adaptado e modificado de TARALE et al., 2016.

## 2.4 ) TOXICIDADE DO MN E A SAÚDE HUMANA

Indivíduos que possuem ocupação relacionada com produtos manufaturados a partir deste metal, como soldadores ou trabalhadores de indústrias metalúrgicas, estão diariamente expostos a altos níveis de Mn (ATSDR, 2012). De acordo com Barceloux (1999) e WHO (2011), a concentração aérea neste tipo de ambiente pode variar de 220 a 300  $\text{ng/m}^3$ , enquanto em áreas urbanas e rurais esse valor não ultrapassa 70  $\text{ng/m}^3$ .

Outro fator que deve ser levado em consideração ao contabilizar a exposição diária de Mn é a avaliação da disponibilidade deste elemento na água. De acordo com a Anvisa (2011), para água mineral é estabelecida a quantidade de 0,4 mg/L (400  $\mu\text{g/L}$ ) de Mn. Contudo, segundo WHO (2011), a quantidade de 0,4 mg/L de Mn é maior do que aquela normalmente encontrada na água, sendo um limite superestimado e seguro. Entretanto, a revisão conduzida por Frisbie et al. (2012; 2015) revelam que em várias localidades ao redor do mundo há populações que fazem uso de fontes hídricas com valores superiores a este limiar. O mesmo foi observado por Rahman et al. (2015) ao constatar que em determinadas regiões de Bangladesh a concentração de Mn na água varia de 7,1 à 6336  $\mu\text{g/L}$ .

Este elemento também está presente em uma grande quantidade de alimentos, em especial aqueles de origem vegetal. Legumes e frutas apresentam valores que variam entre 2,24-6,73 e 0,20-10,38 mg/kg, respectivamente (WHO, 2011). Entretanto, vale ressaltar que inúmeros fatores como solubilidade e a quantidade de outros elementos traços afetam a absorção de manganês pelo sistema digestivo, que é cerca de 3-5% (TOBIASSEN et al., 2003).

O Centro de Alimentação e Nutrição do *Institute of Medicine* (IOM) estimou concentrações adequadas de ingestão de Mn para 2,3 e 1,8 mg/dia para homens e mulheres, respectivamente, sendo a quantidade de 11 mg/dia por adulto considerada tolerável (IOM, 2001; WHO, 2011). Para recém-nascidos é recomendado 0,003 mg/dia. O cálculo é realizado de acordo com a concentração de aproximadamente 0,0035 mg/L no leite materno em um consumo de aproximadamente 0,78 litros/dia. Entretanto, é válido ressaltar que pode haver variações em alguns valores (IOM, 2001; WHOM, 2011). Baseado nos diversos documentos já publicados os valores diários de ingestão de Mn para cada classe, separada por sexo e idade, são expressos na tabela 1.

Há uma grande preocupação em relação às quantidades diárias em que gestantes ingerem Mn devido a potencial toxicidade embrionária, visto que alguns metais, incluindo o Mn, são permeáveis à barreira placentária (FRASER et al., 2014; LIU J. et al., 2013; RUDGE et al., 2009; ZOTA et al., 2009).

Um estudo populacional conduzido por Rahman et al. (2015) demonstrou que o Mn interfere no crescimento dos filhos de mulheres que utilizam água contendo altas concentrações para consumo. Grazuleviciene et al. (2009) associam uma redução do peso em recém-nascidos de grávidas que estão sujeitas a essa mesma condição de exposição. Além disso, em um estudo realizado na Carolina do Norte – EUA, efeitos congênitos no sistema cardiovascular foram associados com este elemento (SANDERS et al., 2014).

Outro fator preocupante com a exposição ao Mn, em especial durante o desenvolvimento do indivíduo, está relacionado com sua atividade neurotóxica. O Mn, nas formas  $Mn^{2+}$  e  $Mn^{3+}$ , promovem a oxidação de células dopaminérgicas e acumulação em regiões sensíveis a injúrias oxidativas, como a substância nigra, *globus pallidus* e estriado (MARTINEZ-FINLEY et al., 2013).

Nascimento et al. (2016) observaram, através de biomarcadores, que crianças expostas ao Mn apresentam dificuldades em realizar tarefas relacionadas com atividades psicomotoras. Estes efeitos estão associados com a capacidade deste metal de atravessar a barreira hematoencefálica no sistema nervoso central devido a sua ligação a receptores específicos (ASCHNER; ASCHNER, 1999; ERIKSON et al., 2007).

TABELA 1 – REFERÊNCIA PARA INGESTÃO DIÁRIA DE Mn

<b>Classe</b>	<b>Quantidade (mg/dia)</b>
<b>Adultos</b>	-
Homem	2,3
Mulher	1,8
Gestante	2
Lactante	2,6
<b>Crianças</b>	-
0-6 meses	0,003
7 meses-1 ano	0,6
1-3 anos	1,2
4-13 anos	1,5-1,9

FONTE: IOM, 2001; ANVISA, 2005; WHO, 2011.

Baseado na propriedade do Mn de atravessar a barreira hematoencefálica e placentária, por meio de receptores celulares, é possível que este elemento também seja permeável à barreira hematotesticular e possa provocar danos no sistema reprodutor masculino.

## 2.5 ) TOXICOLOGIA REPRODUTIVA DOS METAIS

Os metais podem ser divididos em quatro grupos: 1) elementos essenciais: cromo (Cr), cobalto (Co), Mn, selênio (Se) e zinco (Zn); 2) metais de interesse biológico: níquel (Ni) e vanádio (V); 3) metais de interesse farmacológico: alumínio (Al), gálio (Ga) e lítio (Li); 4) aqueles com grande potencial toxicológico ao ser humano: arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), mercúrio (Hg) e urânio (U) (GERBER et al., 2002).

O efeito de metais no sistema reprodutor masculino é extensivamente estudado em diversas concentrações. O Cd induz um decréscimo na motilidade espermática, aumento de espermatozoides com morfologia anormal (TELISMAN, 2000) e danos no DNA dos gametas (PANT et al., 2014). Já o Hg afeta a produção diária de espermatozoides, provocando alterações na sua morfologia, motilidade, viabilidade, sendo capaz de induzir estresse oxidativo e lesões histopatológicas nos testículos de ratos (KALENDER et al., 2013; MARTINEZ et al., 2014). O Ni induz malformações no flagelo dos espermatozoides (SLIVIKOVA et al., 2009). Outros metais como Cr (ACHARYA et al., 2006), Zn (KHAN et al., 2007; TURGUT et al., 2003), Co (ELBETIEHA et al., 2008) e Cu (BABAEI; KHEIRANDISH; EBRAHIMI, 2012) também apresentam toxicidade reprodutiva masculina, sendo que as principais análises se concentram em avaliações de características espermáticas e fertilidade. Já o Mn causa distúrbios no sistema reprodutor de forma geral (WEBSTER;



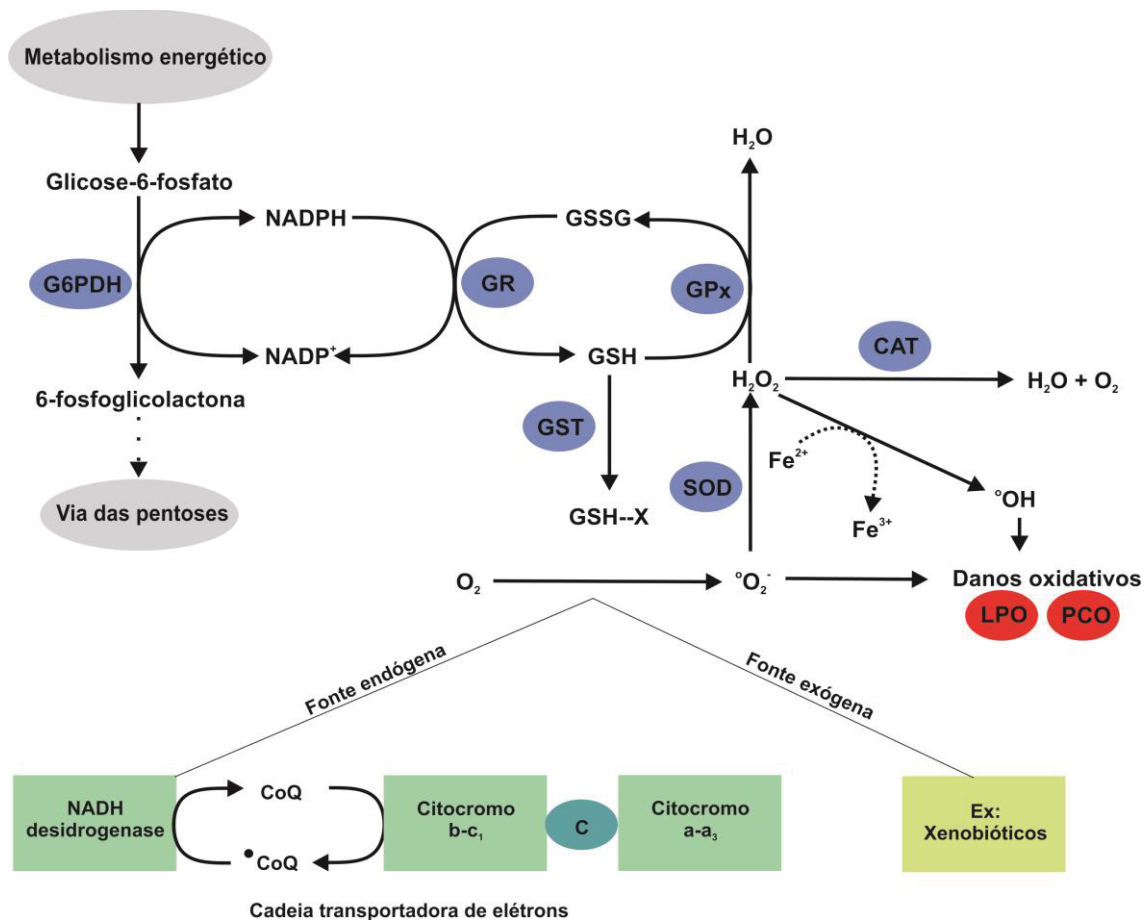
VALOIS, 1987) e, mais especificamente, dano testicular (ADEDARA et al., 2017a; 2017b; KATIRA; BAWA, 1993).

Geralmente, alterações promovidas por contaminantes no sistema reprodutor masculino são decorrentes de modificações na homeostase oxidativa dos órgãos, em especial no testículo. O estresse oxidativo ocorre devido a produção e acúmulo anormal de espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo este um dos maiores fatores etiológicos relacionados com a infertilidade masculina (AGARWAL et al., 2014; AITKEN; ROMAN, 2008). Este desequilíbrio entre a produção e eliminação de EROs está relacionada com processos endógenas ou fontes exógenas de moléculas estressoras, como contaminantes ambientais (AGARWAL, PRABAKARAN, 2005; AGARWAL et al., 2014; JAN et al., 2015; SIES et al., 2017).

A primeira linha de defesa de EROs é constituída pela superóxido dismutase (SOD), que converte radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e, em seguida, o peróxido é metabolizado em água, pela ação da catalase (CAT) (AGARWAL, PRABAKARAN, 2005). A glutathiona peroxidase (GPx), juntamente com a CAT, também promove a reação de eliminação de peróxido de hidrogênio, porém esta enzima utiliza moléculas do tiol não proteico GSH ( $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina) (PISOSCHI; POP, 2015). Além disso, uma importante enzima na fase de detoxificação de xenobióticos, a glutathiona s-transferase (GST), também utiliza a GSH para facilitar a excreção e metabolização de agentes estressores (HUBER et al., 2008). Os níveis celulares de GSH são retomados devido à atividade da glutathiona redutase (GR), que promove a conversão da glutathiona oxidada (GSSG) em glutathiona reduzida (GSH) (AGARWAL; PRABAKARAN, 2005). Esta enzima é dependente do uso do agente redutor NADPH que advém, principalmente, da vida das pentoses fosfato, através da atividade metabólica da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (AGARWAL; PRABAKARAN, 2005; HUBER et al., 2008).

Caso o mecanismo de defesa antioxidante não seja eficaz na eliminação dos EROs, uma condição de estresse oxidativo pode levar ao processo de peroxidação lipídica (LPO) e carbonilação proteica (PCO). A LPO é constituída de três fases: iniciação, propagação e terminação. Este processo ocorre quando radicais, como o radical hidroxila ( $OH\cdot$ ) ou peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), realizam um ataque nucleofílico aos lipídeos de membrana reduzindo a sua fluidez e permeabilidade seletiva (AGARWAL; PRABAKARAN, 2005; HERMES-LIMA, 2004). A PCO, outro tipo de dano promovido pelo excesso de EROs no ambiente celular, é resultante de modificações estruturais e covalentes em proteínas, causando a perda de função (HERMES-LIMA, 2004). O mecanismo de defesa antioxidante é demonstrado na figura 4.

FIGURA 4 – ESQUEMA DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE



FONTE: O autor (2018)

O Mn é capaz de promover aumento nos níveis de biomarcadores de estresse oxidativo como o malondialdeído (MDA), que é utilizado para mensurar a peroxidação lipídica (LPO) de membranas (LIU X et al., 2013a). Além disso, em altas concentrações causa redução na atividade de enzimas do sistema de defesa antioxidante, como a SOD e a GPx (LIU X et al., 2013a). Estudos recentes demonstram que este elemento também é capaz de promover alteração na atividade enzimática da CAT e GST, bem como reduzir os níveis celulares de GSH, sob diferentes condições de exposição (ADEDARA et al., 2017a; 2017b). Efeitos similares também são observados para o Cr (CHANDRA et al., 2007), Cd (EL-SHAHAT et al., 2009) e Hg (KALENDER et al., 2013).

Entretanto, resultados controversos sobre o impacto do Mn na qualidade e produção do sêmen são encontrados na literatura. Lee et al. (2006) descrevem um aumento na produção espermática em ratos, no período de maturidade sexual, tratados com Mn. Entretanto, ele também tem sido majoritariamente relacionado com marcadores de apoptose, decréscimo de concentração e motilidade espermática em modelos animais e humanos (ADEDARA et al., 2017a, 2017b; BOUDOU et al., 2014; PONNAPAKKAM et al., 2003a; WANG et al., 2016; WANG et al., 2017).

Sendo assim, há evidências de que o Mn e outros metais possam afetar a qualidade espermática e provocar uma série de alterações testiculares (EL-SHAHAT et al., 2009; CHANDRA et al., 2007; BABAEI; KHEIRANDISH; EBRAHIMI, 2012; LIU X. et al., 2013a; PONNAPAKKAM et al., 2003b).

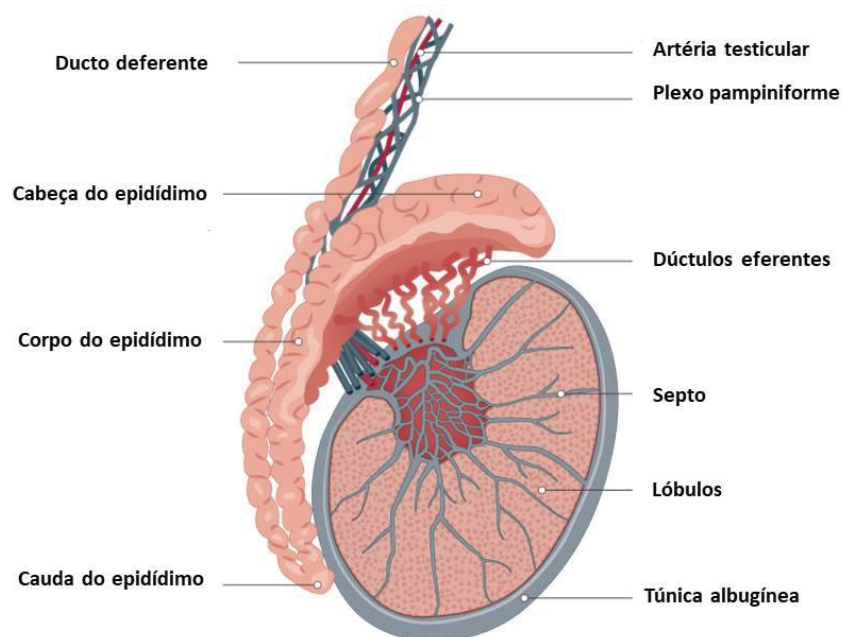
## 2.6 ) SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

### 2.6.1 ) Testículo

O sistema reprodutor masculino é formado, anatomicamente, pelo testículo, epidídimo, ducto deferente, vesícula seminal, próstata e pênis (ROBERTS, 2010).

O testículo é um órgão com formato oval, revestido por uma túnica conjuntiva, denominada albugínea, que emite septos para o interior do órgão dividindo-o em lóbulos e formando o mediastino testicular, região rica em vasos sanguíneos e tecido conjuntivo (FIGURA 5). É o sítio de produção dos gametas masculinos, pois nele ocorre a diferenciação e divisão mitótica e meiótica de células diploides, as espermatogônias e espermatócitos I, para originar células haploides, espermatócitos II e espermátides, sendo que estas últimas passarão por uma maturação gradual denominada espermiogênese, até formarem os espermatozoides (CHENG; MRUK, 2012; ROBERTS, 2010).

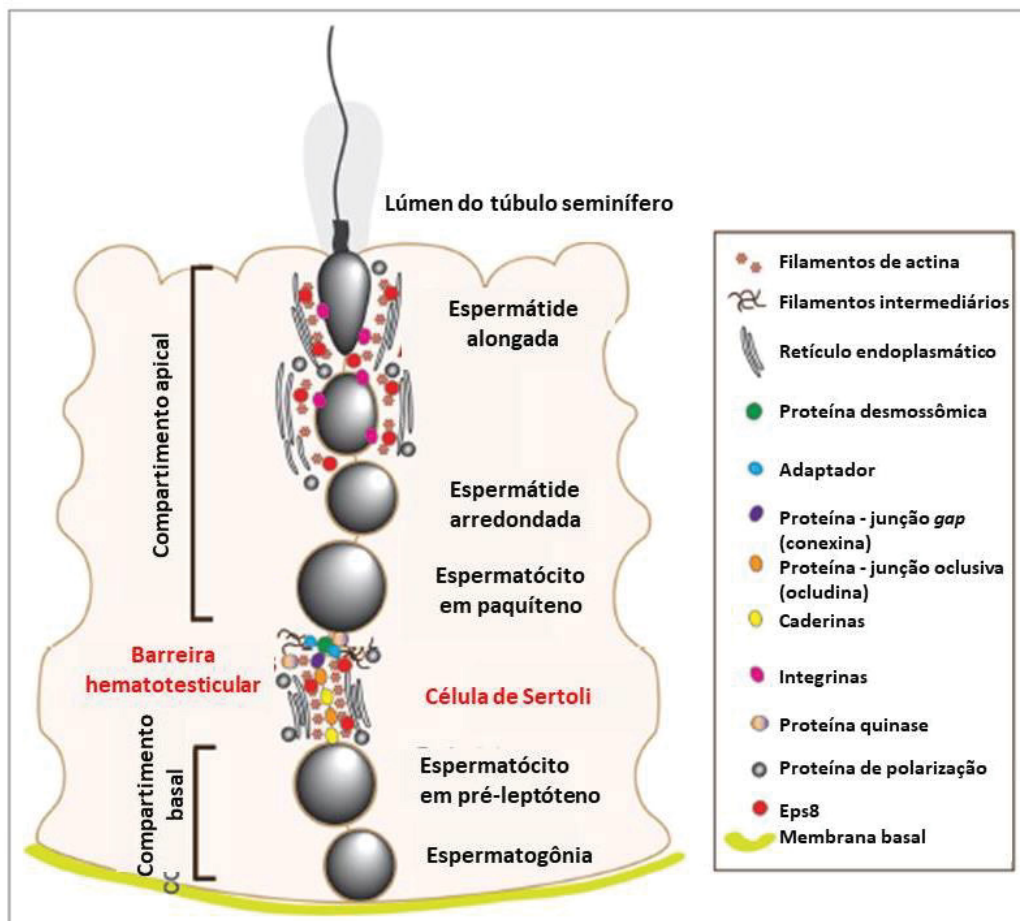
FIGURA 5 – ANATOMIA TESTICULAR – MAMÍFERO



FONTE: Adaptado e modificado de ENCICLOPEADIA BRITANNICA Inc. (2008).

O testículo dos mamíferos é dividido em dois compartimentos principais: o compartimento tubular ou de túbulos seminíferos e o intertubular ou intersticial (RUSSELL et al., 1993). Todo o processo de espermatogênese ocorre no compartimento tubular, especificamente na parede dos túbulos seminíferos, que são delimitados por elementos fibrosos e células mióides. Células de Sertoli, especializadas no suporte físico e nutricional da linhagem germinativa, são encontradas na parede dos túbulos (SETCHELL; BREED, 2006). Estas células se unem por junções oclusivas e formam um compartimento basal, onde se encontram as espermatogônias, e um compartimento apical, protegendo as células em diferenciação através da barreira hematotesticular (CHENG et al., 2011; SU; MRUK; CHENG, 2011) (FIGURA 6).

FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS COMPARTIMENTOS DO TÚBULO SEMINÍFERO E DA BARREIRA HEMATOTESTICULAR



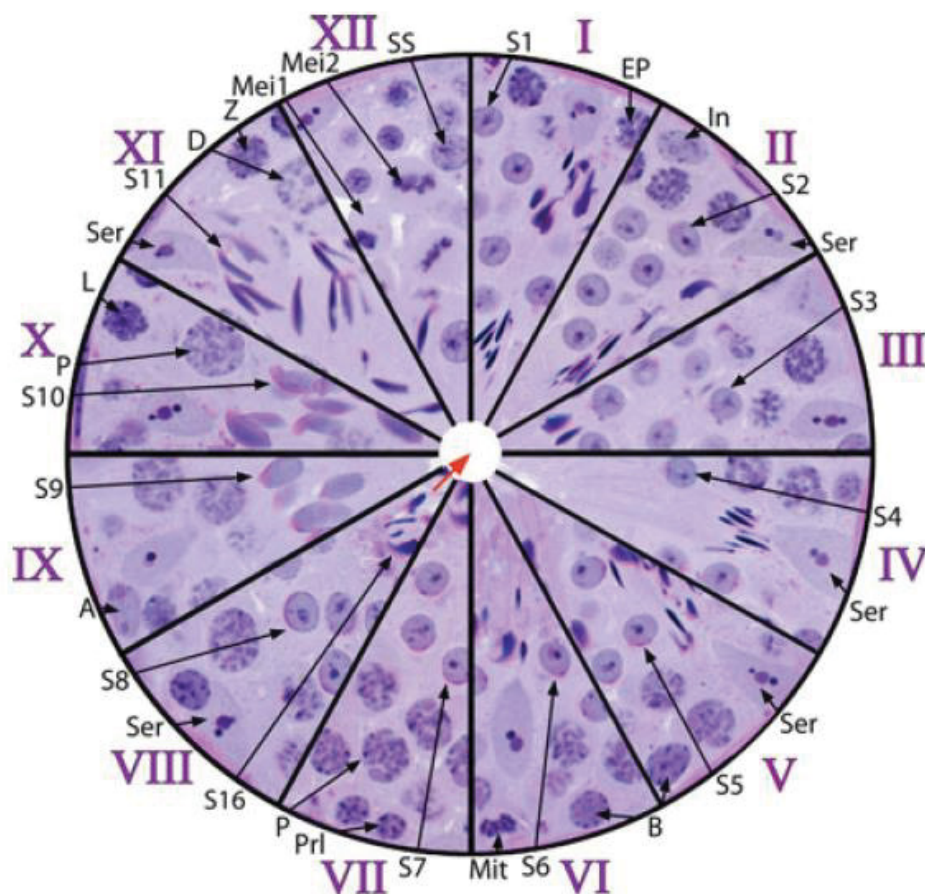
FONTE: Adaptado e modificado de CHENG et al., 2011.

A espermatogênese, em mamíferos, é um processo assíncrono que se renova sempre devido a população de células SSCs (*Spermatogonial Stem Cells*), representadas pela classe das espermatogônias A (POTTER; DeFALCO, 2017). O tempo de diferenciação destas células até a formação do espermatozoide é variável entre as espécies. Em roedores, por exemplo, o desenvolvimento de uma espermatogônia A até o ponto de

espermiacão tem duração de 35 dias, sendo um processo que ocorre geralmente a cada 8,6 dias, em média, devido à assincronia espermatogênica entre as regiões do túbulo seminífero (GRISWOLD, 2016).

Através de análises histológicas é possível categorizar o estágio do epitélio seminífero, isto é, em qual fase ele se encontra, de acordo com a presença, composição e fase da meiose de determinados tipos celulares (GRISWOLD, 2016; POTTER; DeFALCO, 2017; MEISTRICH; HESS, 2013). Em camundongos são classificados 13 estágios e a sua identificação é baseada na presença dos seguintes tipos/fases celulares: espermatogônia A, espermatogônia intermediária, espermatogônia B, espermatócito em pré-leptóteno, espermatócito em leptóteno, espermatócito em zigóteno, espermatócito em paquíteno, espermatócito em diacinese, figuras meióticas, espermatócito secundário, espermátide arredondada, espermátide alongada e espermátides tardias (FIGURA 7).

FIGURA 7 – ESTÁGIOS DO EPITÉLIO SEMINÍFERO DE CAMUNDONGO



**Ser:** célula de Sertoli. **A:** espermatogônia A. **In:** espermatogônia intermediária. **B:** espermatogônia B. **Prl:** espermatócito em pré-leptóteno. **L:** espermatócito em leptóteno. **Z:** espermatócito em zigóteno. **EP:** espermatócito em paquíteno inicial. **P:** espermatócito em paquíteno. **D:** diacinese. **Mei 1 e 2:** primeira e segunda divisão meiótica. **SS:** espermatócito secundário. **S1-8:** espermátide arredondada. **S9-11:** espermátide alongada. **S16:** espermátide tardia. FONTE: MEISTRICH; HESS, 2013.

Já no compartimento intersticial, entre os túbulos seminíferos, se encontram nervos, vasos sanguíneos e linfáticos, além de uma diversidade celular como células de Leydig,

fibroblastos, macrófagos e mastócitos (KERR et al., 2006). A célula de Leydig é o tipo celular mais abundante deste compartimento e atua como sítio de produção de andrógenos esteroides (CHENG; MRUK, 2012; ROBERTS, 2010). Estas células, quando estimuladas pelo hormônio luteinizante (LH), respondem promovendo um aumento do retículo endoplasmático liso e complexo de Golgi para a síntese e secreção de testosterona (CHENG; MRUK, 2012; ROBERTS, 2010). Sendo assim, participam de funções enzimáticas na via de esteroidogênese e catalisam reações que envolvem a produção de diversos compostos importantes para a fisiologia do testículo (CHENG; MRUK, 2012; KEER et al., 2006).

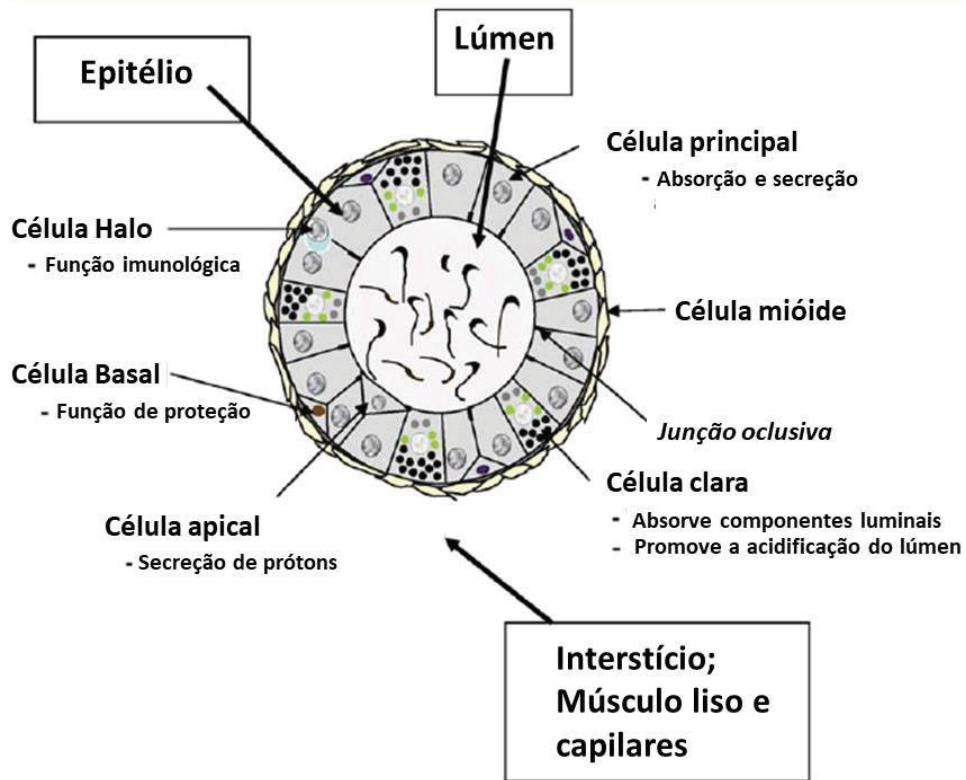
### 2.6.2 ) Epidídimo

Após o término da espermiogênese o espermatozoide é direcionado por uma série de túbulos para o epidídimo. Este órgão é um túbulo altamente enovelado que atua na maturação espermática, promovendo motilidade aos gametas e capacidade de fertilização (ROBERTS, 2010; SULLIVAN; MIEUSSET, 2016). Este processo é de extrema importância, pois grande parte da infertilidade masculina na população, por causas idiopáticas, está relacionada com alguma anormalidade na maturação espermática (CORNWALL, 2009).

Macroscopicamente, o epidídimo é dividido em três regiões: cabeça, corpo e cauda, sendo a última responsável por armazenar os espermatozoides funcionais (CORNWALL, 2009; SULLIVAN; MIEUSSET, 2016) (Figura 5). Microscopicamente, apresenta sua superfície interna revestida por um epitélio pseudoestratificado cilíndrico, com estereocílios nas células principais (CORNWALL, 2009). Além disso, uma série de proteínas espermáticas é modificada durante o trânsito espermático, através do contato com o meio epidimário, contribuindo para a sua motilidade progressiva e capacidade de fertilizar o ovócito (CORNWALL, 2009; SULLIVAN; MIEUSSET, 2016).

De acordo com Cornwall (2009), cinco tipos celulares são classificados no epitélio do epidídimo: células principais, sendo a categoria mais abundante, com função de secretar proteínas no compartimento luminal do epidídimo; células apicais e claras, que atuam no processo de secreção e endocitose; células basais que emitem prolongamentos citoplasmáticos e mantêm interações com as células principais, regulando sua atividade; células Halo, relacionadas com atividades de defesa imunológica (FIGURA 8).

FIGURA 8 – TIPOS CELULARES ENCONTRADOS NO EPITÉLIO DO EPIDÍDIMO.



FONTE: Adaptado e modificado de CORNWALL, 2009.

Após o processo de maturação os espermatozoides receberão secreções contidas nas glândulas acessórias, vesícula seminal e próstata, que irão auxiliar em sua manutenção fisiológica e contribuir com componentes necessários para constituir o sêmen.

### 2.6.3 ) Vesícula Seminal

A vesícula seminal está localizada acima da próstata, sendo responsável pela produção de aproximadamente 70% do volume do ejaculado (ROBERTS, 2010). Este órgão possui um epitélio secretor.

Dentre os seus produtos de secreção a frutose e as prostaglandinas recebem destaque. As moléculas de carboidratos são utilizadas como fonte de energia pelos espermatozoides, através das vias glicolíticas. Já as prostaglandinas (PG), em especial a  $PGF2\alpha$ , atua estimulando a contração do músculo liso durante o processo de ejaculação, bem como a contração do útero e vagina, no sistema reprodutor feminino – facilitando a fertilização (FLINT et al., 2015). Também secretam uma série de enzimas com atividade antioxidante que protegem os gametas contra a ação de espécies reativas de oxigênio (EROS) (ROBERTS, 2010; GONZÁLES, 2001). Além disso, o seu conteúdo secretado tem caráter alcalino, auxiliando a neutralizar o pH ácido do sistema reprodutor feminino (FLINT et al., 2015).

### 3 ) JUSTIFICATIVA

O Mn é um elemento necessário para diversas funções metabólicas e, ainda assim, tem sido associado negativamente com parâmetros espermáticos em modelos animais e humanos (WIRTH et al., 2007; ADEDARA et al., 2017a; 2017b). Considerando que na literatura é relatado que exposição a determinados metais promove danos reprodutivos, o presente estudo teve como objetivo investigar se o Mn é capaz de provocar alterações no sistema reprodutor masculino de camundongos sob diferentes formas de exposição.

Para análise de uma potencial toxicidade reprodutiva foram realizados dois experimentos. O primeiro levou em consideração a capacidade deste metal de atravessar a barreira placentária. Para tal, foi realizada uma exposição multigeracional, com doses realistas ao longo de uma geração, visando investigar se o Mn é capaz de interferir no desenvolvimento reprodutivo da prole de camundongos, por meio de exposição parental e direta.

Além disso, como relatado na literatura, algumas populações estão sujeitas ao consumo, principalmente de água potável, que possuem concentrações altamente superiores aos valores estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011). Sendo assim, o segundo experimento consiste em verificar o efeito de doses elevadas de Mn no sistema reprodutor masculino de camundongos jovens, perante exposição de 45 dias, para elucidar potenciais rotas em que o Mn pode atuar e promover um quadro de toxicidade reprodutiva.

Desta forma, será possível estabelecer se os tratamentos utilizados apresentam riscos aos aspectos da reprodução masculina. Sendo assim, a informação gerada pelo presente trabalho poderá ser agregada às informações já disponibilizadas por órgãos competentes, indicando se as doses utilizadas poderão ser enquadradas em alguma categoria de toxicidade.

### 4 ) OBJETIVOS

#### 4.1 ) OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial tóxico de uma exposição multigeracional de Mn, em doses realistas, sobre o aparelho reprodutor masculino da geração parental e prole de camundongos Swiss (experimento I). Além disso, avaliar o efeito deste metal em altas doses via exposição por 45 dias (experimento II).

#### 4.2 ) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**Capítulo I - Avaliação multigeracional das condições funcionais do sistema reprodutor masculino de camundongos Swiss após exposição ao manganês**



- 1) Avaliar o efeito multigeracional da exposição ao Mn em doses baixas e de relevância para exposição humana;
- 2) Verificar se o Mn, por meio de uma exposição multigeracional, pode interferir no potencial reprodutivo e função testicular dos machos por meio de análises dos parâmetros espermáticos, tais como: motilidade, concentração, vitalidade;
- 3) Avaliar se as doses realistas utilizadas durante o tratamento são capazes de alterar a função enzimática e os níveis dos componentes do sistema de defesa antioxidante no testículo e vesícula seminal;
- 4) Avaliar, de forma comparativa, se há diferença entre os parâmetros avaliados em animais expostos ao Mn apenas pela via parental, em detrimento daqueles expostos de forma parental e direta.

**Capítulo II - Avaliação funcional e da homeostase redox do complexo hipotálamo-gonadal masculino de camundongos Swiss após exposição ao manganês**

- 5) Avaliar o efeito da exposição direta a altas concentrações de Mn, com o objetivo de investigar os efeitos no sistema reprodutor masculino;
- 6) Avaliar a influência desta condição de exposição nos parâmetros espermáticos;
- 7) Avaliar o potencial efeito anti-androgênico do Mn através do peso de órgãos andrógeno-dependentes, quantificação dos níveis séricos de testosterona, bem como o de metabólitos androgênicos fecais ao longo do experimento;
- 8) Avaliar a influência desta condição de exposição nos parâmetros redox e de defesa antioxidante na vesícula seminal, testículo e hipotálamo;
- 9) Propor o mecanismo de ação do Mn no sistema de defesa antioxidante testicular.

**Capítulo III - Efeito de diferentes doses de manganês sobre a morfologia testicular de camundongos Swiss após múltiplas formas de exposição: um estudo comparativo**

- 10) Avaliar, de forma comparativa, a morfologia testicular perante a exposição a diferentes doses de Mn, sob múltiplas formas de exposição;
- 11) Avaliar possíveis alterações morfológicas no testículo através de análises histopatológicas;

- 12) Avaliar alterações morfológicas nos túbulos seminíferos;
- 13) Avaliar alterações estereológicas, como a proporção volumétrica e volume, dos diferentes compartimentos e constituintes testiculares.

## 5 ) MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ) EXPERIMENTO I – EXPOSIÇÃO PARENTAL E DIRETA EM BAIXAS CONCENTRAÇÕES

#### 5.1.1 ) Modelo animal e desenho experimental

Os camundongos utilizados para as análises deste experimento foram provenientes do projeto de mestrado da aluna Amandia Ramos Batschauer, intitulado “Avaliação do efeito neurotóxico do manganês na prole de camundongos após exposição parental e direta” (BATSCHAUER, 2018). O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética de Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), parecer número 1015/2016. O experimento consistiu nas seguintes etapas, representadas na figura 9:

#### 1) Geração F0: exposição dos reprodutores e cópula

Foram utilizados 60 camundongos Swiss adultos, sendo 40 fêmeas e 20 machos, com idade entre 6 a 8 semanas, obtidos no biotério da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, separados por gênero. A temperatura ( $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e o ciclo (12/12 horas, claro e escuro) foram controlados, sendo a ração e a água fornecidas *ad libitum*.

Os animais foram previamente pesados e divididos, aleatoriamente, em 4 grupos, com 10 indivíduos fêmeas e 5 machos. Os grupos foram expostos ao cloreto de manganês ( $\text{MnCl}_2$  - Sigma-Aldrich®) nas doses 0 (grupo controle), 0,013, 0,13 e 1,3 mg/kg/dia, durante 60 dias e os animais pesados semanalmente para ajuste da dose. Para administração oral (via gavagem), esses foram contidos manualmente em posição vertical e a sonda introduzida até o estômago.

A dose intermediária está baseada numa exposição diária para humanos adultos de 70kg consumindo 1,2 mg, ou seja, 0,017 mg/kg/dia. Esta dosagem foi utilizada levando-se em conta a ingestão hídrica máxima permitida pela WHO (2011) e ANVISA (2011) de 0,4 mg/L. Para o cálculo da dose intermediária foi considerado que um adulto de 70 kg toma em média 2 litros de água por dia, o equivalente a 0,8 mg/L de Mn, somado a quantidade de 0,4mg/dia de Mn, a qual inclui a ingestão de outras fontes, obtendo-se a dose de 0,017 mg/kg/dia. A partir disso, foi realizado o cálculo alométrico para extrapolação do valor

equivalente para camundongos, considerando o metabolismo destes animais (SANTANA, 2010), obtendo-se a dose de 0,13mg/kg/dia. Esta dose também foi utilizada por outros trabalhos realizados anteriormente no laboratório (BATSCHAUER, 2018; OKADA et al., 2016).

Após 60 dias de exposição, os animais foram separados, para o acasalamento, em caixas, na proporção 1:2 macho-fêmea, de acordo com seu grupo. Os animais permaneceram nesta distribuição durante 7 dias, com contínua exposição ao  $MnCl_2$ . Foi realizada, diariamente, a observação do tampão seminal (“plug”) na vagina, para confirmação da cópula. Após esta etapa, as fêmeas que não copularam e os machos foram eutanasiados por deslocamento cervical.

## 2) *Gestação e amamentação*

As fêmeas prenhas continuaram sendo expostas ao  $MnCl_2$  durante todo o período gestacional (21 dias) e de amamentação. Após 21 dias de amamentação foi realizada a sexagem e desmame dos filhotes. Durante esta etapa foram obtidos dados sobre a porcentagem de cópula das fêmeas e o número de filhotes, de cada grupo.

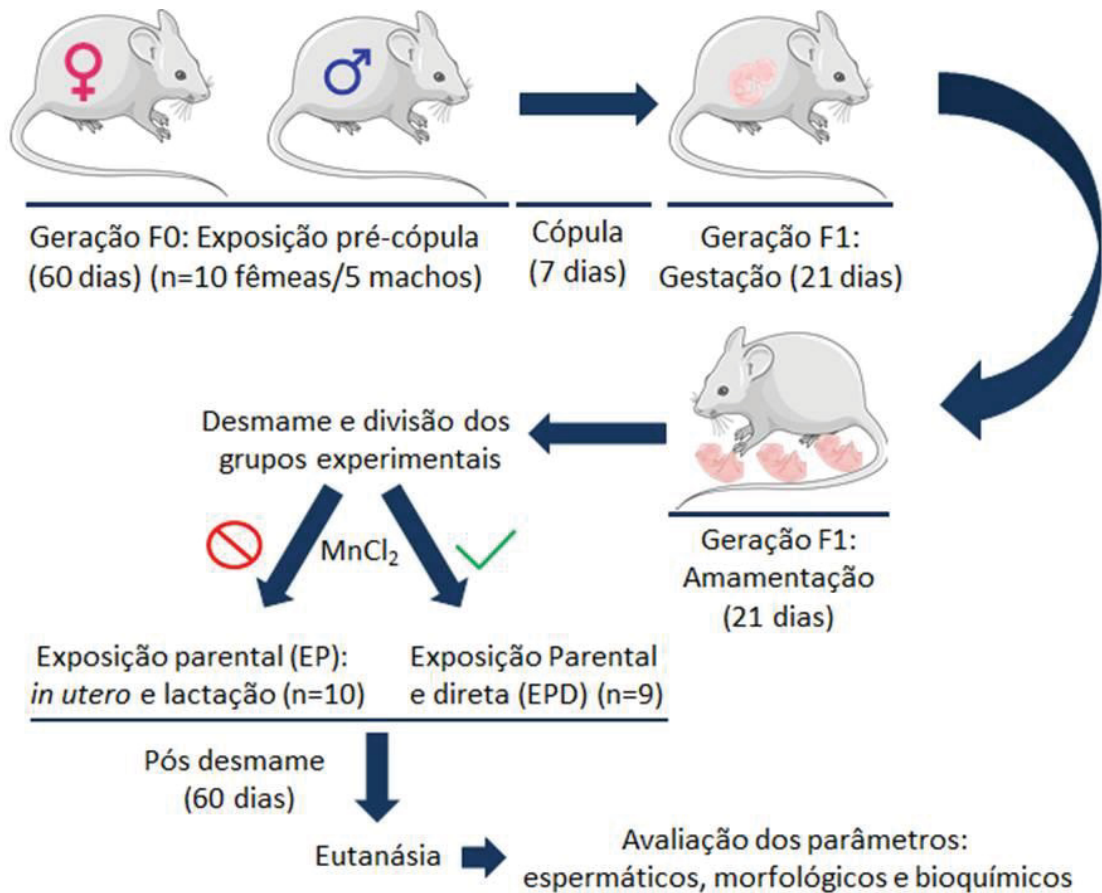
## 3) *Geração F1: Tratamento da prole*

Após o desmame, a prole de cada grupo foi subdividida em dois grupos, categorizando duas condições experimentais. Cada neonato foi utilizado como unidade estatística, de acordo com o método “within-litter design” (FESTING, 2006), considerando que os indivíduos da prole receberam diferentes tratamentos. Além disso, os machos da prole provenientes de cada fêmea da geração F0, de acordo com a dose de tratamento, foram selecionados aleatoriamente das diferentes ninhadas para compor os grupos experimentais utilizados neste estudo, sendo:

Grupo 1 – Exposição parental e direta (EPD): Estes animais foram expostos continuamente por mais 60 dias ao  $MnCl_2$ , na mesma dosagem de seus progenitores (n=10).

Grupo 2 – Exposição parental (EP): Estes animais foram expostos ao  $MnCl_2$  apenas durante o desenvolvimento intrauterino e amamentação. Após o desmame foram mantidos pelo mesmo período de tempo que os do grupo 1, porém sem exposição ao Mn, sendo a gavagem feita apenas com o veículo (n=9).

FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DESENHO EXPERIMENTAL E PERÍODO DE TRATAMENTO DOS PROGENITORES E DA PROLE



FONTE: O autor (2018).

### 5.1.2 ) Dissecção e coleta dos órgãos

Ao final do período experimental, todos os animais foram pesados e eutanasiados por deslocamento cervical. Foram coletados os testículos direito e esquerdo e vesícula seminal repleta para pesagem em balança de precisão (Shimadzu® AU220), além do epidídimo, para análise espermática. Cada material foi tratado de forma específica para os diferentes métodos de análise utilizados.

### 5.1.3 ) Análises dos parâmetros espermáticos

Durante a dissecção dos animais da geração F0 (n=5) e F1 (n=9 – exposição parental e direta; n=10 – exposição parental) a cauda do epidídimo foi seccionada e colocada em 400 µl de meio *Gamete Buffer* (COOK Medical®), a 37°C, por 5 minutos, para dispersão dos espermatozoides. Posteriormente, alíquotas foram retiradas para as análises dos parâmetros espermáticos, de acordo com WHO (2010), como descrito a seguir.

### 5.1.3.1 ) Motilidade espermática

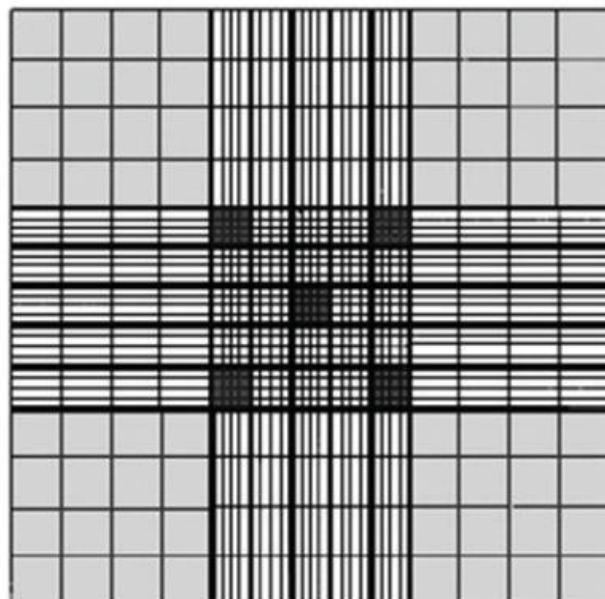
Para avaliar a motilidade espermática foram consideradas três categorias: móveis progressivos, móveis não-progressivos e imóveis, sendo realizada a contagem de 200 espermatozoides por amostra/animal. Para realização deste procedimento 30 µl de amostra foram colocados em lâmina, cobertos por lamínula e observados em microscópio de luz, com objetiva de 40x.

### 5.1.3.2 ) Concentração espermática

A concentração espermática foi estimada em milhões/mL, por meio de análise via câmara hemocitométrica de Neubauer, utilizando a cauda do epidídimo esquerdo para análise, através de uma incisão na região medial do órgão. Para esta contagem foram utilizados 20 µl de amostra diluída 10x em água destilada. Os espermatozoides foram contabilizados em cinco quadrantes, como foi demonstrado na figura 10. Para o cálculo da concentração foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\boxed{[\text{concentração}] = \text{número de espermatozoides} \times 5 \times \text{fator de diluição} \times 10000}$$

FIGURA 10 – CÂMARA DE NEUBAUER E QUADRANTES CONTABILIZADOS



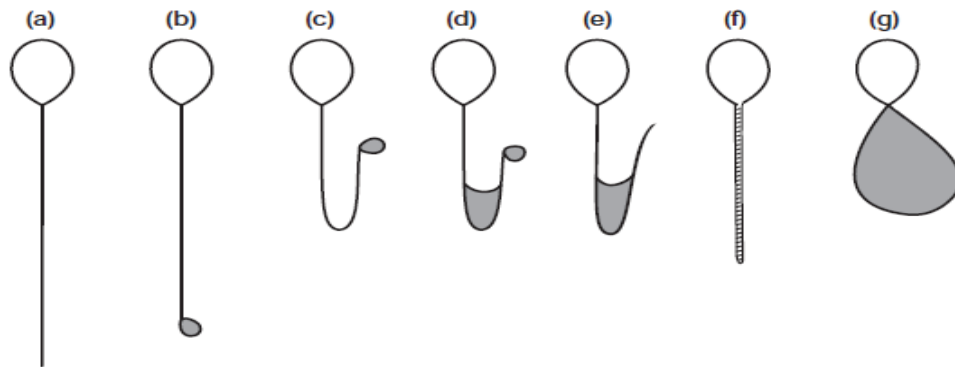
Os quadrantes contabilizados na análise estão destacados em preto. FONTE: modificado de TORRES e PÉREZ (2013)

### 5.1.3.3 ) Vitalidade espermática

A vitalidade espermática foi estimada através do teste hiposmótico, que visa avaliar a integridade de membrana dos espermatozoides e sua vitalidade (WHO, 2010). Alíquotas de 50 µl de amostra foram adicionadas em 100 µl de água destilada por 5 minutos e, em seguida, observadas em microscópio de luz com objetiva de 40x. Foram considerados

mortos os espermatozoides que apresentavam a cauda reta (FIGURA 11a); já os classificados como vivos apresentavam a cauda enrolada (*coiled tail*) (FIGURA 11b-g).

FIGURA 11 – ESQUEMA DA MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES APÓS O TESTE HIPOSMÓTICO



a) Espermatozoide considerado morto. b-g) Espermatozoides com a cauda enrolada - considerados vivos. FONTE: WHO (2010).

#### 5.1.3.4 ) Morfologia espermática

Para o teste de anormalidades na morfologia espermática foi realizado um esfregaço, posteriormente corado com o corante comercial Single Prov® (Newprov). A avaliação da morfologia foi realizada em microscópio de luz, com objetiva de 40X, para caracterizar os defeitos de cabeça, peça intermediária e cauda. Ao total foram avaliados 200 espermatozoides íntegros por amostra/indivíduo e classificados em normais e anormais.

#### 5.1.4 ) Análises bioquímicas – Estresse oxidativo

Para avaliar se os tratamentos foram capazes de promover uma condição de estresse oxidativo na geração F1, os testículos e as vesículas seminais (n=9/10) foram analisados por diferentes testes. Para tal, os órgãos foram preservados à -80°C, homogeneizados em tampão Tris-HCl 20 mM, EDTA 1,0 mM, PMSF (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*) 1mM (pH 7.6) e centrifugados a 12000g por 20 minutos a 4°C. O conteúdo proteico do sobrenadante foi mensurado pelo método de Bradford (1976), em triplicata, com leitura em 595 nm (EPOCH Microplate Spectrophotometer, BioTek®), seguido de normalização para o uso nas técnicas bioquímicas a seguir.

##### 5.1.4.1 ) Atividade da Catalase (CAT)

A CAT atua como enzima antioxidante, responsável por degradar o peróxido de hidrogênio. O método utilizado para a mensuração de sua atividade se baseia nesta propriedade enzimática, como estabelecido pelo método de Aebi (1984). Brevemente, o meio de reação foi preparado com 2,5 mL de tampão Tris-HCl 1,0 M, EDTA 5,0 mM, pH 8,0,

47,32 mL de água destilada e, por último, 180 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30%. Feito isso, 20 µl de amostra normalizada para 1mg/proteína/mL, em triplicata, foi pipetada em microplaca de 96 poços, seguido da adição de 180 µl do meio de reação preparado previamente. A leitura foi realizada, imediatamente, em leitor de microplacas a 240 nm.

#### 5.1.4.2 ) Atividade da Superóxido dismutase (SOD)

A atividade enzimática foi analisada de acordo com o método proposto por Kono (1978), o qual é baseado na capacidade da SOD em inibir a redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) para azul de formazan. Foram utilizados 30 µl de amostra normalizada para 1mg/proteína/mL, pipetados em triplicata, em placas de 96 poços. Em seguida foram adicionados 70 µl de NBT e 100 µl de hidroxilamina, obtendo as concentrações finais de 100 µM e 36,85 mM, respectivamente. Após, foi realizada a leitura em leitor de placas no tempo de 0, 2, 4, e 6 horas de incubação.

#### 5.1.4.3 ) Atividade da Glutathione S-transferase (GST)

A GST é uma enzima importante no sistema de defesa antioxidante, em especial na fase II do metabolismo de xenobióticos. Para a análise de sua atividade o método utilizado foi baseado em Keen et al. (1976), que estima a capacidade da GST em catalisar a reação do CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) com o GSH. Para o preparo do meio de reação foi utilizado 0,0093 g de GSH e 0,0081 g de CDNB que foram diluídos em 19 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,5. Logo após, 20 µl das amostras normalizadas para 1 mg/proteína/mL foram adicionadas, em triplicata, em microplacas de 96 poços, seguido da adição de 180 µl do meio de reação. Para mensuração da cinética enzimática a leitura foi realizada, imediatamente, a 340 nm, em leitor de microplacas.

#### 5.1.4.4 ) Concentração de tióis não proteicos (TNP)

Este método quantifica a concentração de TNP, em especial a glutathione, por meio da precipitação de proteínas através do uso do ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (SEDLAK; LINDSAY, 1968). Para esta análise foi preparado um meio de reação contendo 10 mL de ácido tricloroacético a 50%, que foi adicionado a 200 µl de amostra congelada e não normalizada, seguido de centrifugação a 5000 g.

Em seguida, 20 µl dos sobrenadantes obtidos a partir da centrifugação foram pipetados, em triplicata, em placas de 96 poços. Além disso, para comparação com os resultados obtidos, também foi preparada uma curva padrão de GSH, nas concentrações de 160, 80, 40, 20, 10, 5 e 0 µM. Logo após, 230 µl de tampão Tris-base 0,4M, pH 8,9 foi adicionado aos poços, seguido do acréscimo de 20 µl DTNB a 2,5 mM. A quantificação de TNP's foi realizada através da leitura de microplacas em 415 nm.

#### 5.1.4.5 ) Peroxidação lipídica (LPO)

A técnica LPO foi empregada para mensuração de dano aos lipídios celulares, em especial de membranas. Para tal, foi utilizado o método de FOX, que se baseia na oxidação de  $\text{Fe}^{2+}$  e formação de  $\text{Fe}^{3+}$  para análise (JIAG et al., 1991, 1992).

Para o preparo do meio de reação foi necessário 0,0038 g de laranja de xilenol, 0,0049 g sulfato ferroso amoniacal ( $\text{FeSO}_4 \cdot \text{NH}_4$ ) e 0,0441g de hidroxitolueno butilado. Todos estes reagentes foram diluídos em 47,37 mL de metanol PA acrescido de 125  $\mu\text{l}$  de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a 98%. Em seguida, 800  $\mu\text{l}$  do meio de reação foram adicionados aos 200  $\mu\text{l}$  de sobrenadante das amostras, ainda congeladas e não normalizadas, e mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos. Logo após, foi realizada uma centrifugação a 9.000 g por 10 minutos, sendo que 200  $\mu\text{l}$  dos sobrenadantes obtidos nesta etapa foram pipetados em placas de 96 poços, em triplicata. A quantificação dos produtos de reação foi realizada através de leitura em 570 nm.

#### 5.1.5 ) Resposta Integrada dos Biomarcadores (RIB)

Para avaliar a resposta integrada dos biomarcadores foi utilizada a metodologia descrita por Beliaeff e Burgeot (2002) e modificada por Sanchez et al. (2013). Os resultados obtidos através da análise dos biomarcadores de cada dose utilizada são divididos pelo o do seu grupo controle correspondente, seguido de uma logaritimização para redução da variância. A partir dos dados logaritimizados ( $Y_i$ ) foi calculado a média ( $\mu$ ) e o desvio padrão ( $s$ ) para todas as análises. Em seguida, foi aplicada a fórmula  $Z_i = (Y_i - \mu)/s$  para cada tratamento, sendo a diferença entre o grupo tratado e controle utilizada para obter o valor de A – que corresponde ao resultado integrado para cada biomarcador utilizado. Após, estes resultados foram plotados em um gráfico do tipo radar, onde valores acima ou abaixo de zero (controle) indicam o estímulo ou inibição de determinado biomarcador. Por fim, para o cálculo do índice RIB de cada grupo, os valores de A foram convertidos em números absolutos (S) e somados (SEVERO, 2017).

#### 5.1.6 ) Histologia

Após pesagem do testículo esquerdo ( $n = 6$ ) foram feitas perfurações na túnica albugínea do órgão, seguido de fixação por imersão em ALFAC (85% de álcool etílico 80%, 10% de formol 40% e 5% de ácido acético glacial), por 24 horas. Logo após, o material foi desidratado em soluções crescentes de álcool etílico (70-100%), diafanizado e emblocado em Paraplast Plus (Leica®). Os processos de desidratação e diafanização foram realizados no processador de tecidos Micron STP 120 (Thermo Scientific®). Em seguida, as amostras foram emblocadas em Paraplast na mesa de inclusão Micron EC 350 (Thermo Scientific®) e



seccionadas em micrótomo (Leica® RM 2145). Os cortes de 6 µm de espessura foram dispostos em lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram montadas em Bálsamo do Canadá (BIOTEC® reagente analíticos) e os cortes observados e fotografados em microscópio de luz (Olympus BX41), com câmara acoplada para captura de imagem (Olympus DC030) para as análises histopatológicas.

Para a avaliação histopatológica foi utilizado o método descrito por Jhonsen (1970), modificado por Dias et al. (2019), que descreve um *score* morfológico de 8 níveis, sendo: **1)** túbulos íntegros, com poucos vacúolos; **2)** túbulos com vacúolos na base do epitélio germinativo; **3)** túbulos com vacúolos no ápice do epitélio; **4)** túbulos com vacúolos na base e ápice do epitélio; **5)** presença de células germinativas no interior do lúmen ou em processo de degeneração; **6)** túbulos contendo apenas células basais; **7)** túbulos apenas com células de Sertoli; **8)** túbulos degenerados, sem a presença de células germinativas ou de Sertoli.

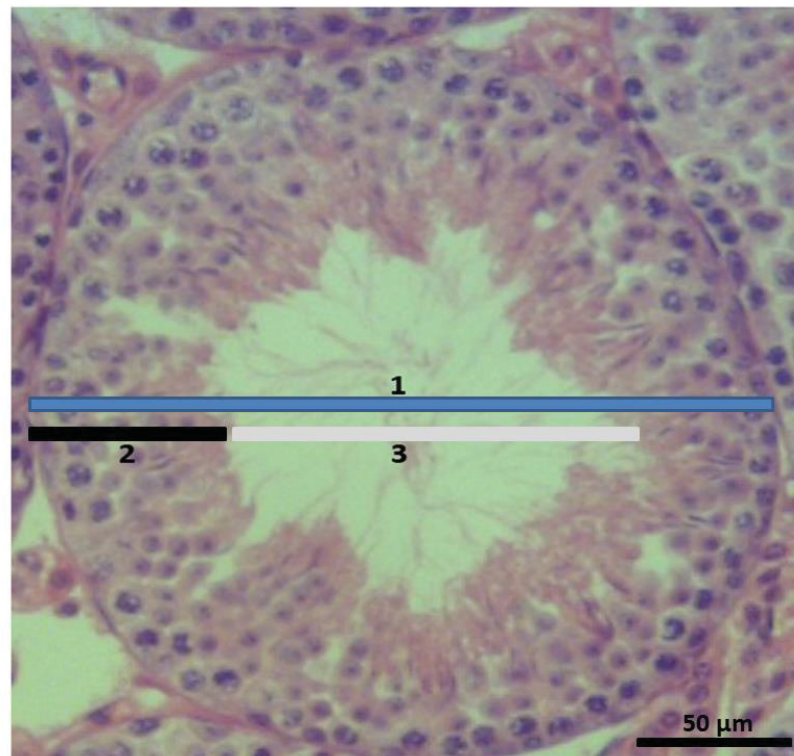
Foram contabilizados 200 túbulos seminíferos em campos aleatórios por animal e os scores obtidos agrupados da seguinte forma: túbulos normais (1), alterações leves (2 e 3), alterações moderadas (4 e 5) e alterações severas (6, 7 e 8) (DIAS et al., 2019).

#### 5.1.7 ) Histomorfometria

As imagens das lâminas histológicas foram capturadas em fotomicroscópio Olympus BX41, com objetiva de 10x e as medições realizadas utilizando-se o software para análises de imagem *Image Pro Plus 4.5®* (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Para a análise morfométrica foi obtido o diâmetro tubular médio por animal, através da mensuração de 20 secções transversais de túbulos seminíferos, independente do estágio do epitélio seminífero, em um plano de corte que estes apresentassem morfologia circular. Nestas mesmas secções foram obtidos outros parâmetros morfométricos, como: diâmetro luminal e altura do epitélio (FIGURA 12).

Além disso, por meio das fórmulas  $AT = \pi \cdot RT^2$  e  $AL = \pi \cdot RL^2$ , onde AT= área tubular, RT= raio tubular, AL= área luminal e RL= raio luminal, foi calculada a área tubular e luminal dos túbulos seminíferos (DIAS et al., 2019).

FIGURA 12 – PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS



1) Diâmetro tubular. 2) Altura do epitélio seminífero. 3) Diâmetro luminal. Coloração de HE.  
 FONTE: O autor (2018)

### 5.1.8 ) Estereologia

A proporção volumétrica dos túbulos seminíferos e da região de intertúbulo foram obtidas de acordo com a metodologia empregada por Lima et al. (2018), utilizando-se uma grade de 266 pontos sobreposta às imagens fotografadas do parênquima testicular em objetiva de 10x (FIGURA 13). Utilizou-se 10 imagens por amostra, totalizando 2660 pontos por animal.

Foram contabilizados os pontos coincidentes sobre o túbulo seminífero e seus constituintes – epitélio seminífero, lúmen e túnica própria – e intertúbulo. Em seguida, foi avaliado o percentual de pontos sobre cada componente, obtendo-se a proporção volumétrica de cada compartimento, através da fórmula:

$$\%Pv \text{ (proporção volumétrica)} = \frac{\text{número de pontos no túbulo ou intertúbulo}}{2660}$$

O volume dos diferentes constituintes do testículo, em mL, foi calculado a partir da fórmula:

$$\text{Volume} = \frac{\%Pv \text{ túbulo (ou constituinte)}}{100} \times \text{volume total do parênquima testicular}$$

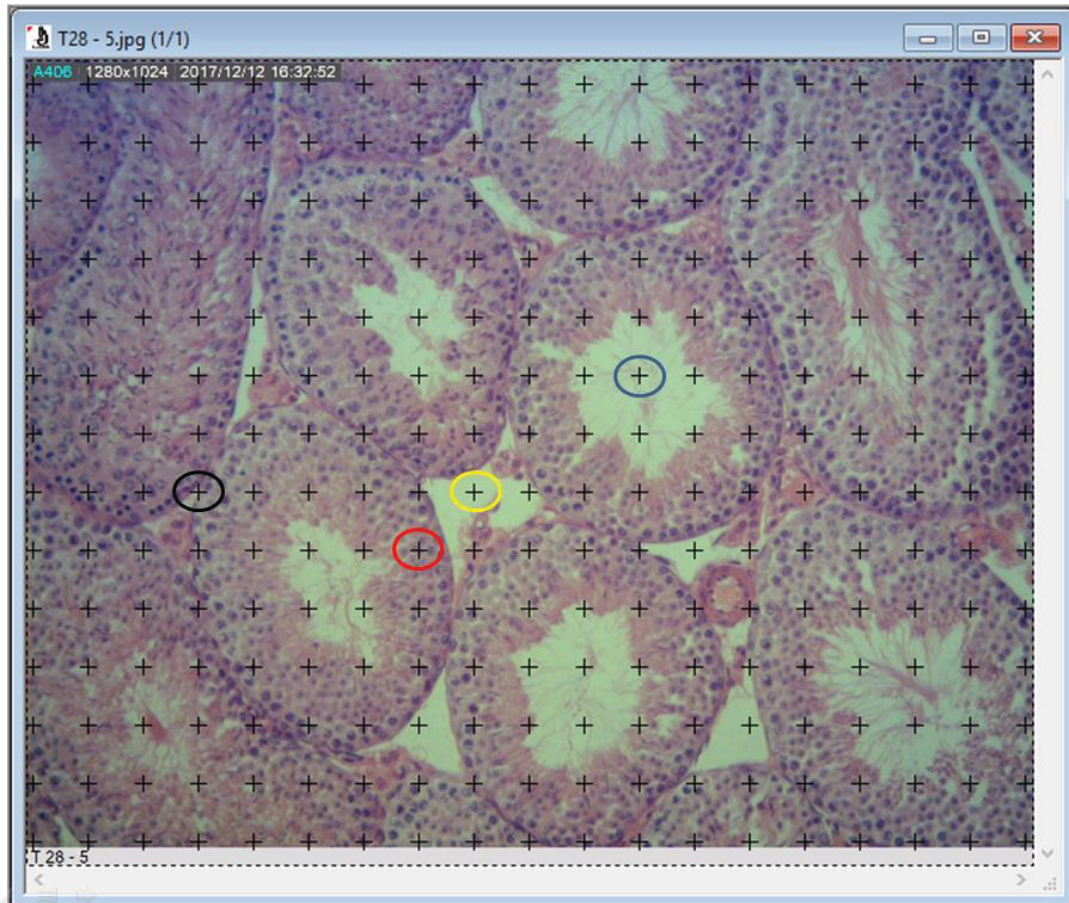
A densidade do testículo de mamíferos é em torno de 1, por isso a massa do testículo foi considerada igual ao seu volume (MORAIS et al., 2014). Além disso, para a obtenção do

índice tubulossomático (ITS) e o comprimento do total dos túbulos seminíferos (CTS), em metros, foram utilizadas as seguintes fórmulas (ATTAL, COUROT, 1963):

$$\text{ITS} = \frac{\text{Volume do túbulo seminífero}}{\text{peso corporal}}$$

$$\text{CTS} = \frac{\text{Volume do túbulo seminífero}}{\pi R^2}$$

FIGURA 13 – GRADE DE 266 PONTOS UTILIZADA PARA ANÁLISE ESTEREOLÓGICA



Círculo azul: lúmen. Círculo amarelo: intertúbulo. Círculo vermelho: epitélio germinativo. Círculo preto: túnica própria. Coloração: HE. FONTE: O autor (2018)

## 5.2 ) EXPERIMENTO II – EXPOSIÇÃO DIRETA E EM ALTAS CONCENTRAÇÕES

### 5.2.1 ) Modelo animal e desenho experimental

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-BIO; número 1085/2017).

Para este experimento foram utilizados 64 camundongos Swiss jovens, recém-desmamados ( $22 \pm 1$  dias), obtidos no biotério da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno com temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e o ciclo (12/12 horas, claro e escuro) controlado, sendo a ração e água fornecidas *ad libitum*. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais ( $n = 16$ ) recebendo, via gavagem, doses de  $\text{MnCl}_2$  (Sigma-Aldrich®) nas doses de 0 (grupo controle), 15, 30 e 60 mg/kg/dia por um

período de 45 dias. O peso de cada animal foi aferido diariamente, ao longo de todo o experimento, para o ajuste da quantidade da dose a ser recebida.

O teste em altas concentrações visa indiciar possíveis alterações reprodutivas provocadas por uma exposição ao Mn neste tipo de condição. Optou-se por utilizar doses elevadas, pois de acordo com Frisbie et al. (2012; 2015) e Rhaman et al. (2015), diversas localidades ao redor do mundo estão sujeitas ao uso de fontes hídricas com doses superiores ao estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011).

De acordo com o estudo de Rhaman et al. (2015) há regiões com água potável apresentando uma concentração 15,84 vezes maior de Mn do que a recomendada pela WHO (2011). Desta forma, a maior dose utilizada no experimento com concentrações realistas (1,3 mg/kg/dia), a qual representa a menor dose de efeito adverso observado (NOAEL) para o Mn, foi multiplicada por 15,84, obtendo-se um valor aproximado da menor dose utilizada neste experimento (15 mg/kg/dia).

Além disso, estudos prévios já utilizaram doses similares às outras duas concentrações escolhidas e demonstraram toxicidade em diferentes sistemas do organismo (PONNAPAKKAM et al., 2003a; OKADA et al., 2016). Sendo assim, estas doses foram escolhidas de forma a demonstrar quais os efeitos deste tipo de exposição ao sistema reprodutor masculino.

### 5.2.2 ) Dissecção, coleta e peso dos órgãos

Ao fim do experimento os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, seguido de exsanguinação, via punção cardíaca, para coleta de amostras de sangue, e finalizando com a dissecção para a retirada dos órgãos.

Durante a dissecção foram retirados e pesados os testículos, vesícula seminal e o epidídimo, utilizado para análise espermática. Além disso, a próstata, glândula do pênis, músculo bulbocavernoso/levantador do ânus foram coletados e pesados com a finalidade de identificar se o Mn apresenta potencial anti-androgênico, dado que estes órgãos se desenvolvem em resposta a presença de andrógenos. Cada material foi tratado de forma específica para os diferentes métodos de análise utilizados.

### 5.2.3 ) Análises dos parâmetros espermáticos

O processamento para essas análises foi o mesmo descrito no item 5.1.3.

### 5.2.4 ) Produção espermática diária e trânsito espermático

Para o cálculo da produção espermática diária foi realizada a contagem de espermátides resistentes à homogeneização (estágio 14-16 da espermatogênese)

utilizando-se o testículo esquerdo (n=14), seguindo o procedimento descrito por Oakberg (1956) e Kyjvoska et al. (2013).

Durante a dissecação, o testículo esquerdo foi decapsulado e seu parênquima imerso em 1 mL de solução de NaCl 0.9% contendo 0.05% Triton x100, seguido de homogeneização. Logo após, a amostra foi diluída em água destilada na proporção de 1:10 e transferida para câmara de Neubauer, para a contagem das células, em objetiva de 40x. Para calcular a produção espermática diária o número obtido foi dividido por 4.84, que corresponde ao número de dias que as espermátides em desenvolvimento permanecem no estágio 14-16 durante a espermatogênese, em camundongos.

Da mesma forma que o testículo, a cabeça/corpo e a cauda do epidídimo (n=14) foram homogeneizados para a contagem de espermatozoides. O trânsito espermático, em dias, foi calculado através da divisão do número de espermatozoides em cada região pela produção espermática diária.

#### 5.2.5 ) Dosagem de testosterona sérica e metabólitos androgênicos fecais

Durante a eutanásia o sangue foi coletado por punção cardíaca, sendo centrifugado a 400 g por 15 min. O soro obtido foi transferido e armazenado em microtubos, à -20 °C, até o momento das análises.

Para a quantificação de metabólitos androgênicos fecais (MAF) os animais de cada grupo foram subdivididos em três caixas (n=3), nas quais foram feitas coletas de um *pool* de fezes, por caixa/tratamento, nos dias 1, 14, 28 e 42 de exposição.

As amostras foram desidratadas em estufa a 60°C, por 3 dias. Em seguida, foram maceradas e pesadas, sendo utilizado aproximadamente 0,5 g de cada *pool*. Logo após, para a extração dos metabólitos, o material foi colocado em suspensão em tubo de ensaio contendo 5 mL de álcool etílico 80%, o qual foi agitado em vórtex por 30 min. Após, as amostras foram centrifugadas a 1.000xg por 15 minutos, seguido da retirada do sobrenadante para análise.

A concentração de testosterona sérica e de MAF nas amostras foram quantificadas através do ensaio ELISA com anticorpo policlonal anti-testosterona, sendo as concentrações expressas em nmol/L e ng/g, respectivamente, considerando um coeficiente de variação (CV) <10%. Todos os procedimentos adotados foram realizados de acordo com Brown et al. (2004).

#### 5.2.6 ) Análises bioquímicas – Estresse oxidativo

O processamento para esta análise foi o mesmo descrito no item 5.1.4.

#### 5.2.6.1 ) Catalase (CAT)

O processamento para esta análise foi o mesmo descrito no item 5.1.4.1.

#### 5.2.6.2 ) Superóxido Dismutase (SOD)

O processamento para esta análise foi o mesmo descrito no item 5.1.4.2.

#### 5.2.6.3 ) Glutathione S-transferase (GST)

O processamento para esta análise foi o mesmo descrito no item 5.1.4.3.

#### 5.2.6.4 ) Glutathione peroxidase (GPx)

Para a análise da atividade da GPx foi utilizado o protocolo descrito por Wendel (1981). Este método é baseado no decréscimo da absorbância a 340 nm durante a redução da GSSG, promovida pela GR, na presença de fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH). A oxidação do NADPH é equivalente a produção de GSSG a partir da GSH, na presença de peróxido de hidrogênio, sendo essa reação catalisada pela GPx.

Em triplicata foi adicionado 20 µL da amostra, normalizadas para 1 mg/mL de proteína, em microplaca de 96 poços. Foram utilizados dois meios de reação: o primeiro foi preparado em 14,45 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7) contendo azida sódica (2mM), NADPH (0,2 mM), GSH (2mM) e 45 µL de GR. Já o segundo meio continha tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7) e peróxido de hidrogênio 0,5mM. Primeiro, foi adicionado 140 µl do primeiro meio de reação, seguido da adição de 40 µl do segundo meio. A leitura foi realizada em leitor de microplacas, imediatamente, a 340 nm.

#### 5.2.6.5 ) Glutathione dissulfeto redutase (GR)

A atividade da GR foi analisada de acordo com o método proposto por SIES et al. (1979), sendo baseado na capacidade de catálise da redução de GSSG em GSH, através da oxidação de NADPH, sendo o decréscimo de absorbância medido em espectrofotômetro a 340 nm. Em placa de 96 poços foi pipetado, em triplicata, 50 µl das amostras normalizadas. Em seguida foi adicionada 150 µl do meio de reação, contendo 16 mL de tampão fosfato de potássio (0,1M pH 7,6), NADPH 0,5mM e GSSG 5,0 mM. Após a adição do meio de reação foi realizada a leitura imediata da placa para obtenção da cinética enzimática.

#### 5.2.6.6 ) Tiós não proteicos (TNP)

O processamento para esta análise foi o mesmo descrito no item 5.1.4.4.

#### 5.2.6.7 ) Peroxidação lipídica (LPO)

O processamento para esta análise foi o mesmo descrito no item 5.1.4.5.

#### 5.2.6.8 ) Acetilcolinesterase (AChE)

Foi utilizado o sobrenadante da homogeneização do hipotálamo para realizar esta análise. A atividade da acetilcolinesterase foi determinada de acordo com Ellmann et al. (1961), que utiliza a detecção do 2-nitrobenzoato-5-mercaptopicolina e o 5-tio-2-nitrobenzoato produzida pela tiocolina e o DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico). Em placas de 96 poços foram pipetados 20 µL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,5), utilizados como branco da reação, e 20 µL de amostra a 1 mg/mL de proteína, em triplicata, seguido da adição de 130 µL de DTNB nos poços. Posteriormente, foi adicionado 50 µL de iodeto de acetiltiocolina e medida a absorbância, imediatamente, a 405 nm, por 5 minutos.

#### 5.2.7 ) Resposta Integrada dos Biomarcadores (RIB)

O processamento para esta análise foi o mesmo descrito no item 5.1.5.

#### 5.2.8 ) Histologia

O processamento para esta análise foi o mesmo descrito no item 5.1.6.

#### 5.2.9 ) Histomorfometria

O processamento para esta análise foi o mesmo descrito no item 5.1.7.

#### 5.2.10 ) Estereologia

O processamento para esta análise foi o mesmo descrito no item 5.1.8.

### 5.3 ) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram testados quanto à normalidade, sendo analisados por meio do teste ANOVA de uma via ou duas vias, seguido do teste *post hoc* de Dunnett ou SNK (Student Newman Keuls). Contudo, os dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *post hoc* de Dunn's. Todas as análises foram feitas pelo programa GraphPad Prism 6.0.

## **6 ) RESULTADOS**

Os resultados obtidos a partir dos experimentos realizados foram divididos de acordo com os objetivos específicos e separados em três capítulos:

Capítulo I: Avaliação multigeracional das condições funcionais do sistema reprodutor masculino de camundongos Swiss após exposição ao manganês

Capítulo II: Avaliação funcional e da homeostase redox do complexo hipotálamo-gonadal masculino de camundongos Swiss após exposição ao manganês

Capítulo III: Efeito de diferentes doses de manganês sobre a morfologia testicular de camundongos Swiss após múltiplas formas de exposição ao manganês: um estudo comparativo

Cada capítulo será utilizado como base para originar um artigo científico, que será enviado para periódicos específicos da área de toxicologia.



## **CAPÍTULO I**

Avaliação multigeracional das condições funcionais do sistema reprodutor masculino de camundongos Swiss após exposição ao manganês

## RESUMO

O Manganês (Mn) é um elemento essencial para o organismo, sendo utilizado como cofator para enzimas envolvidas em diversos processos metabólicos. Entretanto, em determinadas concentrações este metal pode promover quadros de toxicidade. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo analisar o efeito da exposição ao Mn em doses realistas, ao longo de uma geração, na qualidade funcional do sistema reprodutor masculino de camundongos Swiss. Quarenta fêmeas e 20 machos (geração F0) foram tratados por 60 dias com cloreto de manganês ( $MnCl_2$ ), via gavagem, nas doses de: 0, 0,013, 0,13 e 1,3 mg/kg/dia, sendo as doses estabelecidas de acordo com a exposição diária humana, via ingestão. Em seguida, foi realizada a cópula para obtenção da geração F1. O tratamento com  $MnCl_2$  foi contínuo durante o período de gestação e amamentação da prole. No momento do desmame a prole foi dividida em duas categorias, respeitando as mesmas doses utilizadas nos progenitores: animais que receberam Mn apenas via parental (EP), durante a gestação e amamentação; e aqueles que foram expostos via parental e direta (EPD), na mesma condição que os progenitores. Após 60 dias os animais foram eutanasiados e os parâmetros espermáticos e de estresse oxidativo, do testículo e vesícula seminal, foram avaliados. Houve um aumento do número de espermatozoides imóveis e móveis não progressivos nos animais 0,13 e 1,3 mg/kg/dia, na condição EP e EPD. Já a concentração espermática foi reduzida em todas as doses e condições de exposição, incluindo a geração F0. A atividade enzimática da catalase (CAT), glutathione s-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD) foram reduzidas significativamente no grupo EP, podendo ser correlacionado com o aumento de estresse oxidativo nestes animais dado o aumento da peroxidação lipídica (LPO). Assim, foi possível constatar que os danos bioquímicos no sistema reprodutor foram maiores nos indivíduos EP, como demonstrado pelo índice de análise integrada de biomarcadores (RIB). Nossos resultados mostram que o Mn, mesmo em baixas concentrações, é capaz de promover uma redução na qualidade espermática ao longo de uma geração. Além disso, a maior concentração de danos significativos no grupo EP sugere que mecanismos epigenéticos possam estar envolvidos em uma possível resistência aos danos promovidos pelo Mn nos animais EPD.

Palavras-chaves: estresse oxidativo, toxicologia reprodutiva, toxicologia do desenvolvimento, análise espermática.

## 1) INTRODUÇÃO

Devido ao aumento da exploração e manufatura de vários compostos industriais uma série de componentes tóxicos é liberada no meio ambiente, aumentando o risco de exposição de diversos organismos e da população humana a esses agentes. Dentre esses, destaca-se o manganês (Mn), um metal traço essencial encontrado na litosfera, hidrosfera e sistemas biológicos (WHO, 2004; 2011). Esse elemento, na forma inorgânica, é amplamente utilizado na produção de fertilizantes, vidro, indústria têxtil, aço e derivados. Já as suas formas orgânicas, como metilciclopentadienil manganês tricarbonil (MMT), podem ser utilizadas como aditivos em combustíveis e fungicidas (ATSDR, 2012; GERBER et al., 2002).

De maneira natural, este elemento é encontrado na água e alimentos, como vegetais e carnes. De acordo com o *Institute of Medicine* (IOM) (2001) e WHO (2011), as doses adequadas de ingestão diária de Mn são de 2,3 e 1,8 mg/dia para homens e mulheres, respectivamente, sendo a quantidade máxima de 11 mg/dia considerada tolerável. Porém, atividades antrópicas como mineração, queima de combustíveis e o despejo de resíduos urbanos e industriais aumentam as concentrações ambientais deste elemento, bem como as chances de exposição a altas doses de Mn através do meio hídrico e aéreo (ATSDR, 2012; GERBER et al., 2002; WHO, 2004; WHO, 2011). Segundo WHO (2011), a quantidade estabelecida de 0,4 mg/L de Mn na água potável é maior do que aquela normalmente encontrada, sendo um limite seguro. Entretanto, a revisão conduzida por Frisbie et al. (2015) revela que em várias localidades ao redor do mundo há populações que fazem uso de fontes hídricas com valores superiores a este limiar.

O Mn, apesar de ser um metal essencial, em quantidades excessivas pode ocasionar efeitos deletérios e patológicos aos sistemas orgânicos (GERBER et al., 2002; MARTINEZ-FINLEY et al., 2013; OKADA et al., 2016; SANDERS et al., 2014). É um elemento conhecido por seu potencial neurotóxico, principalmente em exposições prolongadas e/ou em altas concentrações, podendo provocar problemas cognitivos e uma condição similar à doença de Parkinson, denominada manganismo (ERIKSON et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2016; ROELS et al., 2012). Contudo, os danos promovidos pelo Mn não são limitados ao sistema nervoso e também podem afetar o desenvolvimento embrionário em modelos animais e humanos (GRAZULEVICIENE et al., 2009; RUDGE et al., 2009; SANCHÉZ et al., 1993). Por isso, há uma grande preocupação em relação às quantidades diárias de Mn ingeridas por gestantes, visto que alguns metais são permeáveis à barreira placentária e podem afetar o desenvolvimento intrauterino (AGRAWAL, 2012; FRASER et al., 2014; LIU J. et al., 2013; RUDGE et al., 2009; ZOTA et al., 2009). Estudos populacionais demonstraram que o Mn interfere no peso de recém-nascidos (GRAZULEVICIENE et al., 2009) e no crescimento

(RAHMAN et al., 2015) dos filhos de mulheres que utilizam água contendo altas concentrações desse elemento. Também é relatado na literatura resultados sobre o efeito do Mn no desenvolvimento de modelos animais (HERNANDEZ et al., 2015; TU et al., 2017).

É provável que a ingestão de níveis não adequados de Mn durante períodos críticos do desenvolvimento, em uma exposição multigeracional, possa promover danos no sistema reprodutor masculino, alterando seus parâmetros reprodutivos. Animais adultos expostos de forma direta ao Mn apresentam danos testiculares e espermáticos, como perda de motilidade e concentração espermática (PONNAPAKKAM et al., 2003; ADEDARA et al., 2017a; 2017b), alterações histopatológicas e aumento de apoptose testicular (LIU X. et al., 2013a), redução dos níveis de hormônios sexuais (ADEDARA et al., 2017a; 2017b; LIU X. et al., 2013b) e perda da homeostase do sistema de defesa antioxidante (ADEDARA et al., 2017a; 2017b; LIU X. et al., 2013a). Além disso, em humanos, concentrações de Mn e de outros metais no sangue e urina têm sido correlacionadas com apoptose e decréscimo de motilidade espermática (WANG et al., 2016; WANG et al., 2017; WIRTH et al., 2007).

Apesar dos vários estudos sobre o Mn, seus efeitos sobre os parâmetros reprodutivos de animais expostos durante o desenvolvimento intrauterino é pouco conhecido, sendo o único estudo multigeracional envolvendo exposição ao Mn realizado por McGough e Jardine (2017), via inalação, em doses que variam de 5 à 20 µg/L. Nosso estudo tentou entender os efeitos de uma exposição multigeracional do Mn, em doses realistas - via exposição oral, englobando as diversas fases do desenvolvimento do organismo, sobre os parâmetros funcionais e as condições óxido-redutoras do sistema reprodutor masculino.

## **2) MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1) DESENHO EXPERIMENTAL**

Os camundongos utilizados para as análises deste trabalho foram provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética de Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), parecer número 1015/2016. O experimento foi dividido em três etapas:

#### *1) Geração F0: exposição dos reprodutores e cópula*

Foram utilizados 60 camundongos Swiss adultos, sendo 40 fêmeas e 20 machos, com aproximadamente 7 semanas. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, separados por sexo. A temperatura ( $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e o ciclo (12/12 horas, claro e escuro) foram controlados, sendo a ração e a água fornecidas *ad libidum*.

Os animais foram previamente pesados e divididos em 4 grupos, com 10 indivíduos fêmeas e 5 machos. Os grupos foram expostos ao  $\text{MnCl}_2$  (Sigma-Aldrich®) nas doses 0

(grupo controle), 0,013, 0,13 e 1,3 mg/kg/dia, durante 60 dias, sendo a dose intermediária baseada numa exposição diária para humanos adultos (ASCHNER et al., 1999; OKADA et al., 2016).

Após 60 dias de exposição, os animais foram separados em caixas na proporção 1:2 macho-fêmeas, de acordo com seu grupo, para o acasalamento, com contínua exposição ao  $MnCl_2$ . A partir do momento em que foi observado o tampão seminal (“plug”), na vagina das fêmeas, considerou-se o dia 0 da gestação. Após essa etapa, as fêmeas que não copularam e os machos foram eutanasiados por deslocamento cervical.

## 2) *Gestação e amamentação*

As fêmeas prenhas continuaram sendo expostas ao  $MnCl_2$  durante todo o período gestacional (21 dias) e de amamentação (21 dias). Após o período de amamentação foi realizada a sexagem e desmame dos filhotes, além de serem obtidos dados sobre a porcentagem de cópula das fêmeas e o número de filhotes, por cada grupo.

## 3) *Geração F1: Tratamento da prole*

Após o desmame, a prole de cada grupo foi subdividida em dois grupos, categorizando duas condições experimentais. Cada neonato foi utilizado como unidade estatística, de acordo com o método “within-litter design” (FESTING, 2006), considerando que os indivíduos da prole receberam diferentes tratamentos. Além disso, os machos da prole provenientes de cada fêmea da geração F0, de acordo com a dose de tratamento, foram selecionados aleatoriamente das diferentes ninhadas para compor os grupos experimentais utilizados neste estudo, sendo:

Grupo 1 – Exposição parental e direta (EPD): os animais foram expostos continuamente por 60 dias ao  $MnCl_2$ , na mesma dosagem de seus progenitores (n=10).

Grupo 2 – Exposição parental (EP): os animais foram expostos ao  $MnCl_2$  apenas durante o desenvolvimento intrauterino e amamentação, sendo mantidos, depois, pelo período de 60 dias, porém sem exposição contínua ao Mn (n=9).

## 2.2) DISSECÇÃO E COLETA DOS ÓRGÃOS

Ao final do período experimental todos os animais foram pesados e eutanasiados por deslocamento cervical. Os testículos e vesícula seminal foram coletados para pesagem, e o epidídimo, para análise espermática. Cada material foi tratado de forma específica para os diferentes métodos de análise utilizados.

## 2.3) ANÁLISES DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS

A cauda do epidídimo dos animais da geração F0 (n=5) e F1 (n=9/10) foi seccionada e colocada em 400 µl de meio *Gamete Buffer* (COOK Medical®), a 37°C, por 5 minutos, para dispersão dos espermatozoides. Posteriormente, alíquotas foram retiradas para as análises dos parâmetros espermáticos, baseado em WHO (2010), descrito a seguir.

### 2.3.1) Motilidade espermática

Duzentos espermatozoides por amostra/animal foram avaliados e classificados para motilidade em três categorias: móveis progressivos, móveis não-progressivos e imóveis. Para isso, 30 µl de amostra foram colocados em lâmina, cobertos por lamínula e observados em microscópio de luz, com objetiva de 40x.

### 2.3.2) Concentração espermática

A concentração espermática foi estimada em milhões/mL, por meio de análise via câmara hemocitométrica de Neubauer, utilizando a cauda do epidídimo esquerdo para análise, através de uma incisão na região medial do órgão. Para esta contagem foram utilizados 20 µl de amostra diluída 10x em água destilada. Os espermatozoides foram contabilizados em cinco quadrantes e, para o cálculo da concentração, foi utilizada a fórmula: [concentração] = número de espermatozoides x 5 x fator de diluição x 10000.

### 2.3.3) Vitalidade espermática

O teste hiposmótico visa avaliar a vitalidade espermática por meio do diferencial osmótico entre a célula e o meio. Alíquotas de 50 µl de amostra foram adicionadas em 100 µl de água destilada por 5 minutos e, em seguida, observadas em microscópio de luz com objetiva de 40x. Foram considerados vivos somente os espermatozoides que apresentavam a cauda enrolada (*coiled tail*).

## 2.4) ANÁLISE DA GESTAÇÃO E FERTILIDADE – GERAÇÃO F0

O peso das fêmeas foi monitorado durante todo o período pré-gestacional, gestacional e pós-gestacional. Após o período de gestação foi avaliado o número de fêmeas copuladas, a taxa de cópula [(número de fêmeas copuladas/ número de fêmeas) x 100], número de filhotes por fêmea e o número total de filhotes por grupo.

## 2.5) ANÁLISES BIOQUÍMICAS – ESTRESSE OXIDATIVO

Para avaliar se os tratamentos foram capazes de promover uma condição de estresse oxidativo na geração F1, os testículos e as vesículas seminais (n=9/10) foram analisados por diferentes testes. Para tal, os órgãos foram preservados à -80°C, homogeneizados em tampão Tris-HCl 20 mM, EDTA 1,0 mM, PMSF (*Phenylmethanesulfonyl fluoride*) 1mM (pH 7.6), seguido de centrifugação a 12000g por 20 minutos a 4°C. O conteúdo proteico dos sobrenadantes foi mensurado pelo método de Bradford (1976), em triplicata, com leitura em 595 nm. Para a análise de enzimas do sistema de defesa antioxidante foi realizado o teste para catalase (CAT) (AEBI, 1984), superóxido dismutase (SOD) (KONO, 1978) e glutathione S-transferase (GST) (KEEN et al., 1976). A concentração de moléculas antioxidantes, os tióis não proteicos (TNP), foi realizada de acordo com Sedlak e Lindsay (1968). Já para a mensuração de danos oxidativos foi utilizado o protocolo de Jiang et al. (1991, 1992) para peroxidação lipídica (LPO).

## 2.6) RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (RIB)

Para avaliar a resposta integrada dos biomarcadores foi utilizada a metodologia descrita por Beliaeff e Burgeot (2002) e modificada por Sanchez et al. (2013). Os resultados obtidos através da análise dos biomarcadores de cada dose utilizada são divididos pelo o do seu grupo controle correspondente, seguido de uma logaritimização para redução da variância. A partir dos dados logaritimizados ( $Y_i$ ) foi calculado a média ( $\mu$ ) e o desvio padrão ( $s$ ) para todas as análises. Em seguida, foi aplicada a fórmula  $Z_i = (Y_i - \mu)/s$  para cada tratamento, sendo a diferença entre o grupo tratado e controle utilizada para obter o valor de A – que corresponde ao resultado integrado para cada biomarcador utilizado. Após, estes resultados foram plotados em um gráfico do tipo radar, onde valores acima ou abaixo de zero (controle) indicam o estímulo ou inibição de determinado biomarcador. Por fim, para o cálculo do índice RIB de cada grupo, os valores de A foram convertidos em números absolutos (S) e somados (SEVERO, 2017).

## 2.7) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram testados quanto à normalidade e avaliados pelo teste de ANOVA de uma ou duas vias, quando aplicável, seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett ou de comparações múltiplas SNK (Student Newman Keuls), respectivamente. Todos os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão/erro padrão e valores de  $p < 0,05$  considerados significativos.

### 3) RESULTADOS

#### 3.1) DESENVOLVIMENTO GERAL E PESO DOS ÓRGÃOS

Os machos reprodutores, geração F0, não apresentaram diferenças significativas quanto ao ganho de peso ao longo do período de tratamento de 60 dias e nem sinais de toxicidade como piloereção, frequência respiratória e perda de atividade locomotora. Além disso, não houve alteração no peso absoluto e relativo do testículo (TABELA 1).

TABELA 1 – DADOS GERAIS SOBRE O GANHO DE MASSA E PESO DOS ÓRGÃOS DOS MACHOS REPRODUTORES DA GERAÇÃO F0

Geração F0	MnCl <sub>2</sub> (mg/kg/dia)			
	0 (controle)	0.013	0.13	1.3
<b>Ganho de peso (g)</b>				
Peso inicial (PND 49)	30,8 ± 1,78	29,2 ± 2,04	29,2 ± 1,78	29,8 ± 1,78
Peso final (PND 116)	43,2 ± 2,95	42,2 ± 2,49	40,2 ± 2,58	40,6 ± 1,94
<b>Peso absoluto (g)</b>				
Testículo	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,008
<b>Peso relativo (%)</b>				
Testículo	0,24 ± 0,03	0,25 ± 0,04	0,23 ± 0,02	0,23 ± 0,01

Média ± Desvio padrão. (ANOVA – teste *post hoc* Dunnet) n = 5. PND: dia pós-natal. FONTE: O autor (2018)

Para a prole, correspondente a geração F1, também não foi verificado alteração do peso inicial e final dos animais nas condições de exposição parental (EP) e parental e direta (EPD), em todas as doses utilizadas (TABELA 2). Entretanto, foi observada, na vesícula seminal, uma redução no peso absoluto na dose de 0,013 mg/kg/dia e um aumento do peso relativo na dose de 1,3 mg/kg/dia, ambos no grupo EPD (fator dose: p<0,05) (TABELA 2).



TABELA 2 – DADOS GERAIS SOBRE O GANHO DE MASSA E PESO DOS ÓRGÃOS DOS MACHOS DA GERAÇÃO F1

Geração F1	Exposição parental (EP)			
	MnCl <sub>2</sub> (mg/kg/dia)			
	0 (controle)	0.013	0.13	1.3
<b>Ganho de peso (g)</b>				
Peso inicial (PND 21)	32,2 ± 1,22	31,8 ± 3,85	30,3 ± 2,79	30,1 ± 1,4
Peso final (PND 81)	38,3 ± 3,31	39,4 ± 3,08	36,4 ± 2,35	36,4 ± 2,16
<b>Peso absoluto (g)</b>				
Testículo	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01
Vesícula Seminal	0,34 ± 0,09	0,33 ± 0,05	0,38 ± 0,04	0,41 ± 0,05
<b>Peso relativo (%)</b>				
Testículo	0,31 ± 0,04	0,30 ± 0,05	0,29 ± 0,04	0,31 ± 0,05
Vesícula Seminal	0,98 ± 0,11	0,75 ± 0,31	0,70 ± 0,12	0,92 ± 0,17
Geração F1	Exposição parental e direta (EPD)			
	MnCl <sub>2</sub> (mg/kg/dia)			
	0 (controle)	0.013	0.13	1.3
<b>Ganho de peso (g)</b>				
Peso inicial (PND 21)	32,1 ± 2,33	29,6 ± 1,50	30,7 ± 1,70	31,0 ± 2,00
Peso final (PND 81)	39,4 ± 2,36	38,1 ± 2,23	39,9 ± 2,18	37,6 ± 2,29
<b>Peso absoluto (g)</b>				
Testículo	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01
Vesícula Seminal	0,37 ± 0,04	0,29 ± 0,11	<b>0,25 ± 0,05*</b>	0,33 ± 0,05
<b>Peso relativo (%)</b>				
Testículo	0,30 ± 0,04	0,28 ± 0,4	0,28 ± 0,02	0,31 ± 0,04
Vesícula Seminal	0,87 ± 0,23	0,88 ± 0,13	<b>0,71 ± 0,13*</b>	<b>1,09 ± 0,14*</b>

Média ± Desvio padrão. \* em negrito= estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ), quando comparado com o grupo controle (0 mg/kg/dia) (ANOVA de duas vias – teste *post hoc* Student Newman Keuls). Exposição parental: n = 9; Exposição parental e direta: n = 10. PND: dia pós-natal. FONTE: o autor (2018).

### 3.2) PARÂMETROS ESPERMÁTICOS

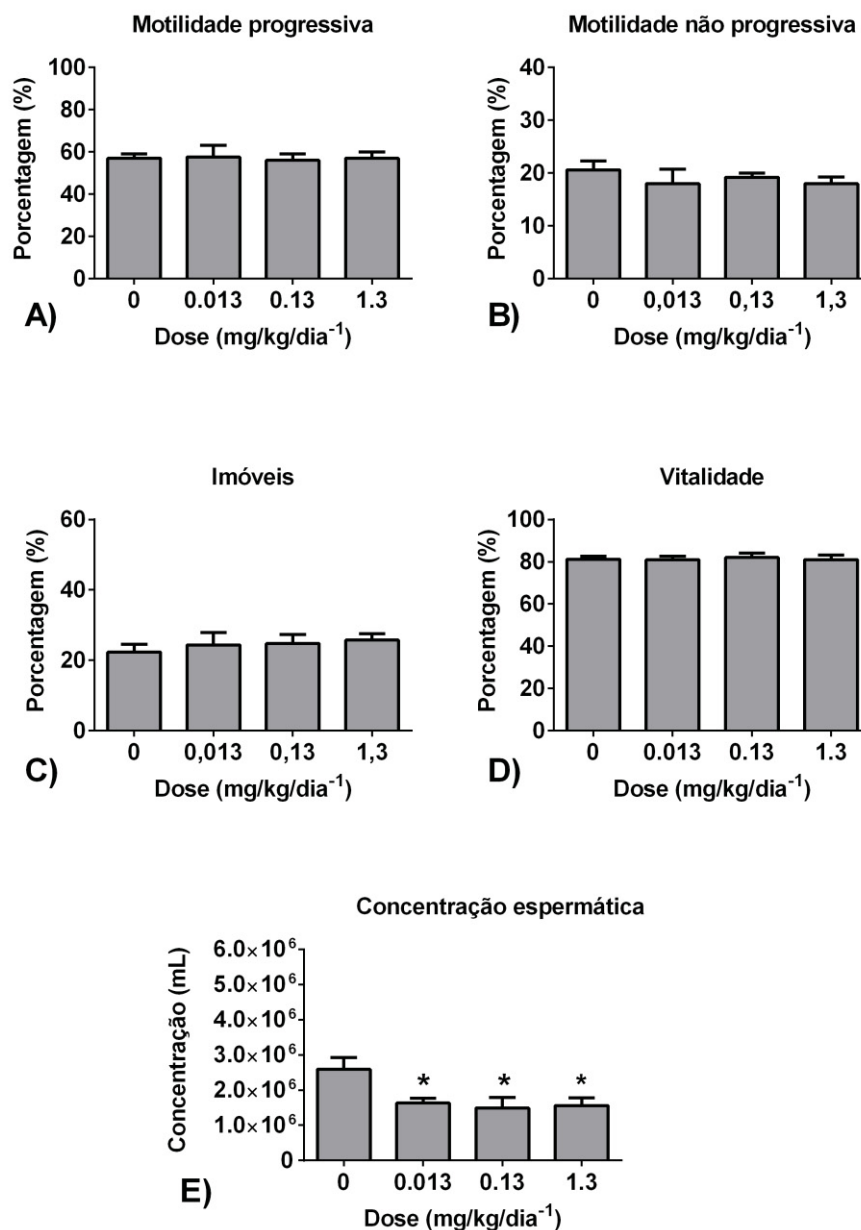
Os parâmetros de motilidade e vitalidade espermática da geração F0, em todas as doses testadas, não sofreram mudanças significativas (FIGURA 1A-D). Porém, a concentração foi reduzida em aproximadamente 50% em todos os grupos tratados com Mn (FIGURA 1E). Entretanto, na geração F1 foram observadas alterações drásticas na motilidade espermática, em especial o efeito dose-dependente nos gametas móveis progressivos (FIGURA 2A-C), tanto na exposição parental (EP) quanto parental e direta

(EPD). Essa redução, em aproximadamente 40% em relação ao grupo controle, foi significativa ( $p < 0,05$ ) nas doses de 0,13 e 1,3 mg/kg/dia.

A vitalidade foi reduzida significativamente apenas no grupo 1,3 mg/kg/dia EP (FIGURA 2D). A concentração espermática também foi alterada na geração F1 nas doses de 0,13 e 1,3 mg/kg/dia (FIGURA 2E).

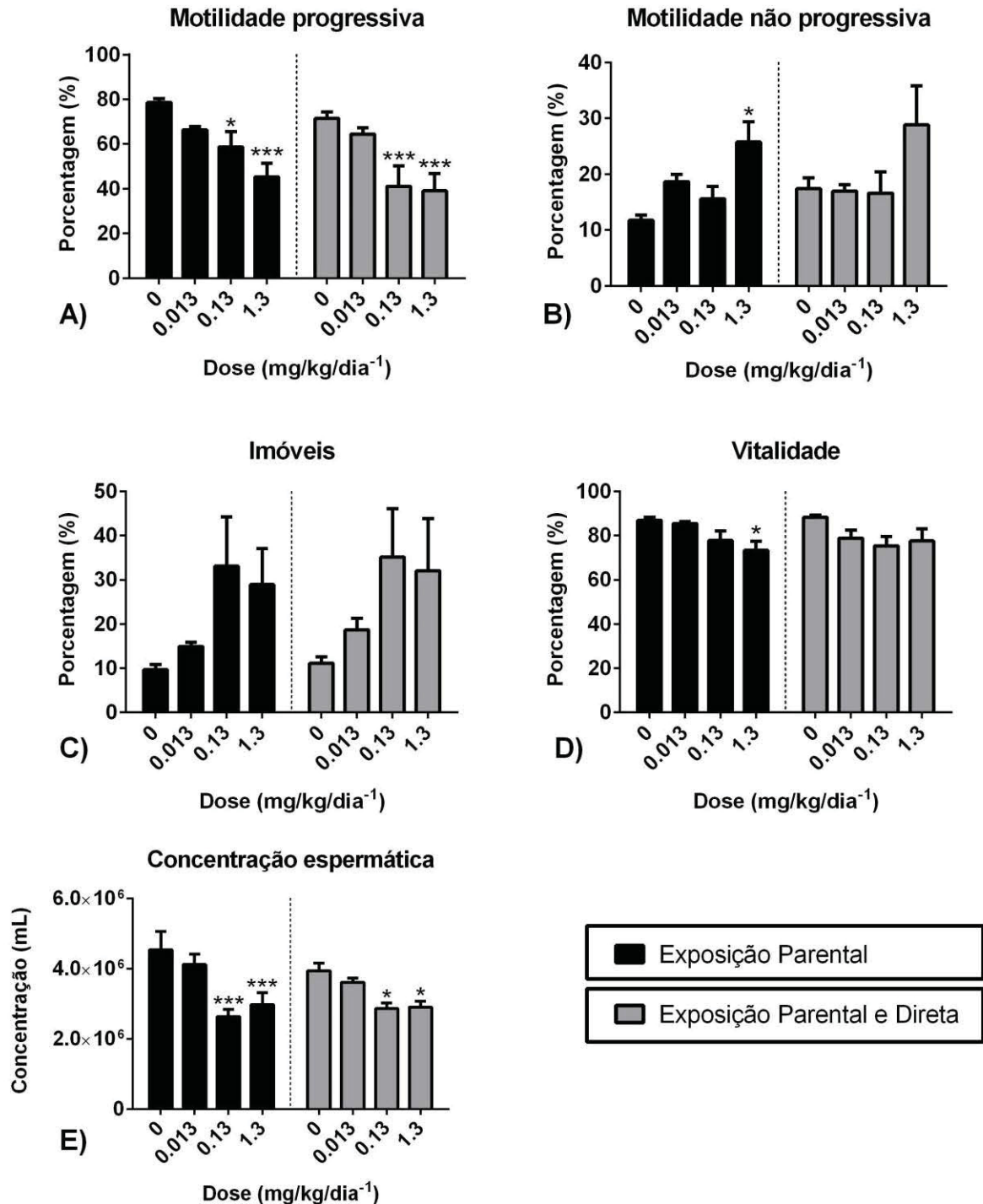
De maneira geral, dentre os efeitos observados para a geração F1 foi possível determinar, através da ANOVA de duas vias, que a dose foi o principal fator responsável pela variação dos dados obtidos no presente estudo (TABELA 3).

FIGURA 1 – PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DA GERAÇÃO F0



A) Espermatozoides móveis progressivos; B) Móveis não progressivos; C) Imóveis; D) Vitalidade; E) Concentração espermática.  $n = 5$ . \* =  $p < 0,05$  (ANOVA teste *post hoc* de Dunnet). Barra: erro padrão. FONTE: o autor (2018).

FIGURA 2 – PARÂMETROS ESPERMATICOS DA GERAÇÃO F1



A) Espermatozoides móveis progressivos; B) Móveis não progressivos; C) Imóveis; D) Vitalidade; E) Concentração espermática. Exposição Parental (EP): n = 10; Exposição Parental e Direta (EPD): n = 9. \* = p < 0,05; \*\*\* = p < 0,0001 (os asteriscos indicam diferença significativa entre o grupo com mesmo tipo de exposição). (ANOVA teste *post hoc* de Student Newman Keuls). Barra: erro padrão. FONTE: o autor (2018).

TABELA 3 – ANÁLISE DOS FATORES ESPERMÁTICOS – ANOVA DE DUAS VIAS

Parâmetros	Exposição	Dose	Interação
<b>Motilidade progressiva</b>	<b>0,0408</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	0,5589
<b>Motilidade ñ progressiva</b>	0,394	<b>0,0012</b>	0,7251
<b>Imotilidade</b>	0,6287	<b>0,007</b>	0,9988
<b>Vivos (%)</b>	0,7455	<b>0,0031</b>	0,4423
<b>Concentração</b>	0,4322	<b>0,0001</b>	0,2427

negrito = significância estatística ( $p < 0,05$  - ANOVA). FONTE: o autor (2019)

### 3.3) GESTAÇÃO E FERTILIDADE – GERAÇÃO F0

O peso das fêmeas durante a fase pré-gestacional, gestacional e pós-gestacional (amamentação) não diferiu significativamente entre as doses testadas, como apresentado na tabela 4. Além disso, apesar das diferenças em relação ao grupo controle e os tratados, na geração F0, nenhum dos parâmetros de fecundidade e fertilidade foi estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ).

TABELA 4 – DADOS GERAIS SOBRE O PESO CORPORAL E PESO DOS ÓRGÃOS DAS FÊMEAS REPRODUTORAS (GERAÇÃO F0)

Parâmetro	MnCl <sub>2</sub> (mg/kg/dia)			
	0 (controle)	0,013	0,13	1,3
<b>Peso (g) pré-gestacional</b>				
Inicial (PND 49)	26,4 ± 2,6	26,1 ± 2,4	25,4 ± 1,5	25,5 ± 1,9
Final (PND 109)	36,6 ± 4,6	35,8 ± 3,2	37,1 ± 2,7	34,8 ± 1,4
<b>Peso (g) gestacional</b>				
Inicial (GD 0)	35,7 ± 4,0	34,1 ± 2,8	35,8 ± 2,6	34,1 ± 2,3
Final (GD 21)	52,4 ± 9,5	50,7 ± 6,6	49,6 ± 7,3	44,5 ± 6,8
<b>Peso (g) pós-gestacional</b>				
Inicial (PGD 1)	41,1 ± 4,6	38,0 ± 3,4	44,8 ± 6,9	40,1 ± 5,0
Final (PGD 21)	39,5 ± 3,6	39,0 ± 2,8	39,4 ± 3,7	36,1 ± 2,2
<b>Gestação e fecundidade</b>				
Nº de fêmeas	8	10	10	10
Nº de fêmeas copuladas	6	9	9	7
% de cópula	75	90	90	70
Nº de filhotes/fêmea	9,0 ± 3,0	8,55 ± 2,1	7,55 ± 3,2	7,8 ± 2,0
Nº total de filhotes	54	77	68	55

Média ± Desvio padrão. n = 10. (ANOVA teste *post hoc* de Dunnet). PND: dia pós-natal; GD: dia gestacional; PGD: dia pós-gestacional FONTE: o autor (2018).

### 3.4) ESTRESSE OXIDATIVO

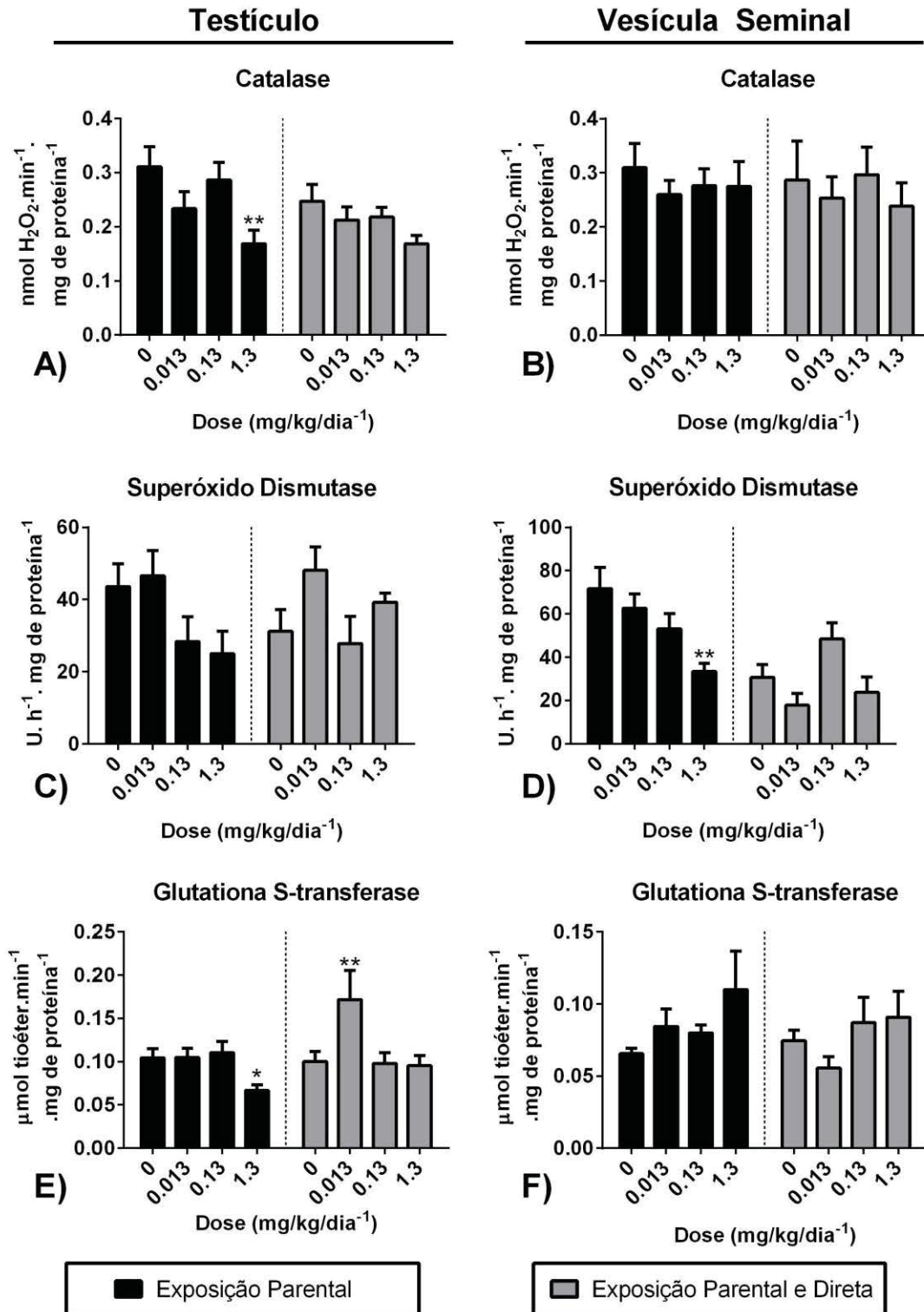
Os resultados obtidos para os biomarcadores de estresse oxidativo no testículo e vesícula seminal são demonstrados nas figuras 3 e 4. A atividade da catalase (CAT) foi reduzida, significativamente, apenas no testículo dos animais expostos de forma parental ao Mn na dose de 1,3 mg/kg/dia (FIGURA 3A-B).

A superóxido dismutase (SOD) não apresentou atividade alterada no testículo em nenhuma das formas de exposição ao Mn (FIGURA 3C). Entretanto, foi observada redução dose dependente para essa enzima na vesícula seminal dos animais do grupo EP, sendo significativa na dose de 1,3 mg/kg/dia (FIGURA 3D). Para a glutathione S-transferase (GST) não houve resultados significativos na maioria dos tratamentos utilizados, bem como nos diferentes órgãos avaliados (FIGURA 3E-F). As exceções ocorreram no testículo, nos tratamentos 1,3 mg/kg/dia EP e 0,013 mg/kg/dia EPD, que apresentaram uma redução e aumento, respectivamente, da atividade desta enzima (FIGURA 3E).

Para os biomarcadores não enzimáticos foi possível observar alterações na quantidade de tióis não proteicos (TNP) e um aumento da concentração de hidroperóxidos, advindos da peroxidação lipídica (LPO), na vesícula seminal dos animais que receberam as doses de 0,013 e 1,3 mg/kg/dia EP, respectivamente, diferentemente do observado para o testículo (FIGURA 4A-D). Contudo, apesar do nível de LPO testicular não apresentar diferença significativa entre os grupos EP, nota-se uma elevação na produção média de hidroperóxidos nas doses de 0,013 e 1,3 mg/kg/dia do grupo EPD (FIGURA 4C).

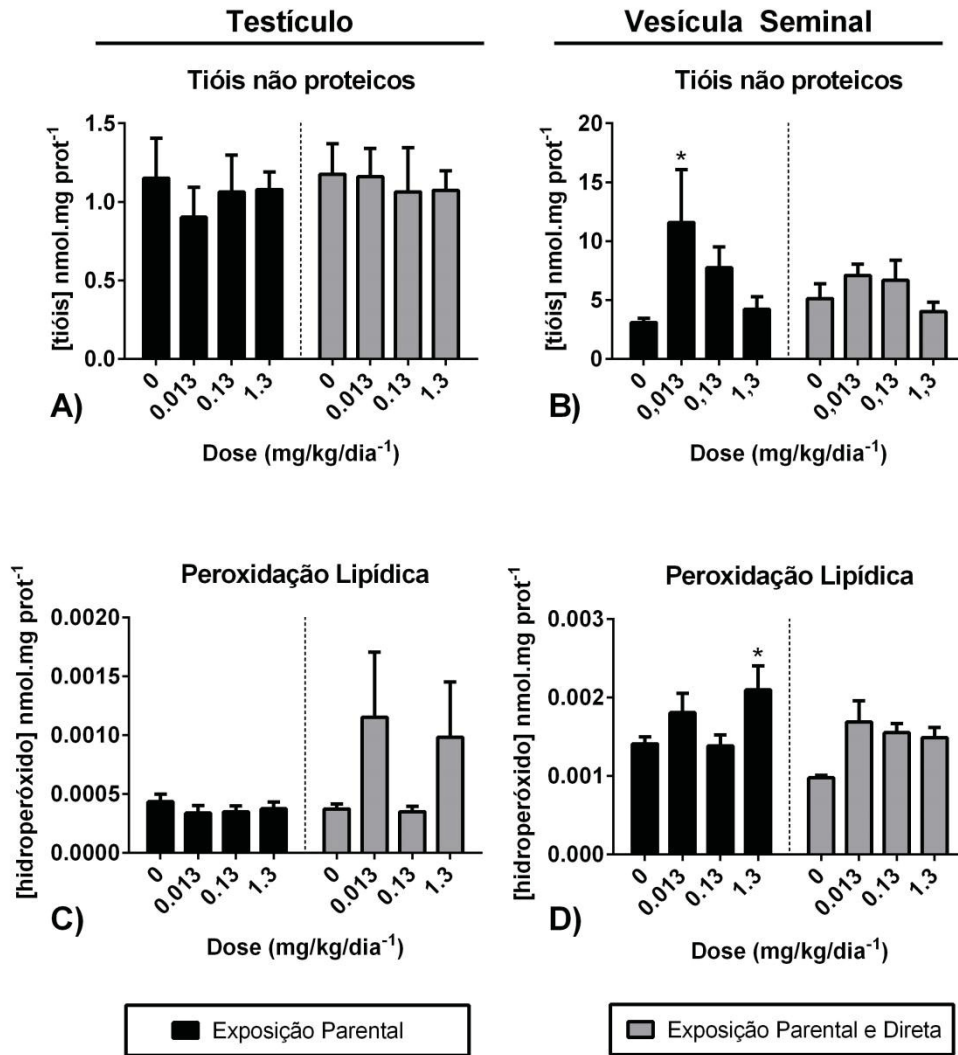
Dentre os efeitos encontrados através da análise dos biomarcadores, foi possível estabelecer, via análise estatística, que o principal fator responsável pela variação dos dados foi a dose utilizada (TABELA 5), assim como observado para os parâmetros espermáticos. Entretanto, a atividade da SOD, na vesícula seminal, é afetada tanto pela dose quanto pelo tipo de exposição e a interação entre esses dois fatores.

FIGURA 3 – BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS – TESTÍCULO E VESÍCULA SEMINAL



A-B) Catalase (CAT); C-D) Superóxido dismutase (SOD); E-F) Glutaciona S-transferase (GST). Exposição Parental (EP): n = 10; Exposição Parental e Direta (EPD): n=9. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01 (os asteriscos indicam diferença significativa entre o grupo com mesmo tipo de exposição). (ANOVA teste *post hoc* de Student Newman Keuls). Barra: erro padrão. FONTE: o autor (2018).

FIGURA 4 – BIOMARCADORES NÃO ENZIMATICOS – TESTÍCULO E VESÍCULA SEMINAL



A-B) Tióis não proteicos (TNP); C-D) Peroxidação Lipídica (LPO). Exposição Parental (EP): n = 10; Exposição Parental e Direta (EPD): n = 9. \* = p < 0,05 (os asteriscos indicam diferença significativa entre o grupo com mesmo tipo de exposição). (ANOVA teste *post hoc* de Student Newman Keuls). Barra: erro padrão. FONTE: o autor (2018).

TABELA 5 – EFEITO DOS FATORES – ANOVA DE DUAS VIAS

Parâmetros	Testículo			Vesícula Seminal		
	Exposição	Dose	Interação	Exposição	Dose	Interação
CAT	0,0556	<b>0,0013</b>	0,5439	0,7274	0,7409	0,9344
SOD	0,8793	<b>0,0311</b>	0,269	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,0051</b>	<b>0,0061</b>
GST	0,0713	<b>0,0037</b>	<b>0,0468</b>	0,4402	0,1264	0,47
GSH	0,6314	0,9268	0,9041	0,5318	<b>0,037</b>	0,4818
LPO	0,0675	0,3385	0,2501	0,0734	<b>0,0092</b>	0,1978

negrito = significância estatística (p < 0,05 - ANOVA). FONTE: o autor (2019)

### 3.5) ANÁLISE DA RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (RIB)

Os dados da RIB são demonstrados na tabela 6. Ao avaliar a resposta testicular dos animais EP foi possível observar que a dose de 1,3 mg/kg/dia promove uma maior alteração dos biomarcadores e, conseqüentemente, um maior índice RIB (10,74), quando comparado com os animais EPD (7,96). Já para a vesícula seminal, nesta mesma condição de exposição, os valores da RIB são expressivos nas doses de 0,013 e 1,3 mg/kg/dia, sendo 8,05 e 8,15, respectivamente (TABELA 6).

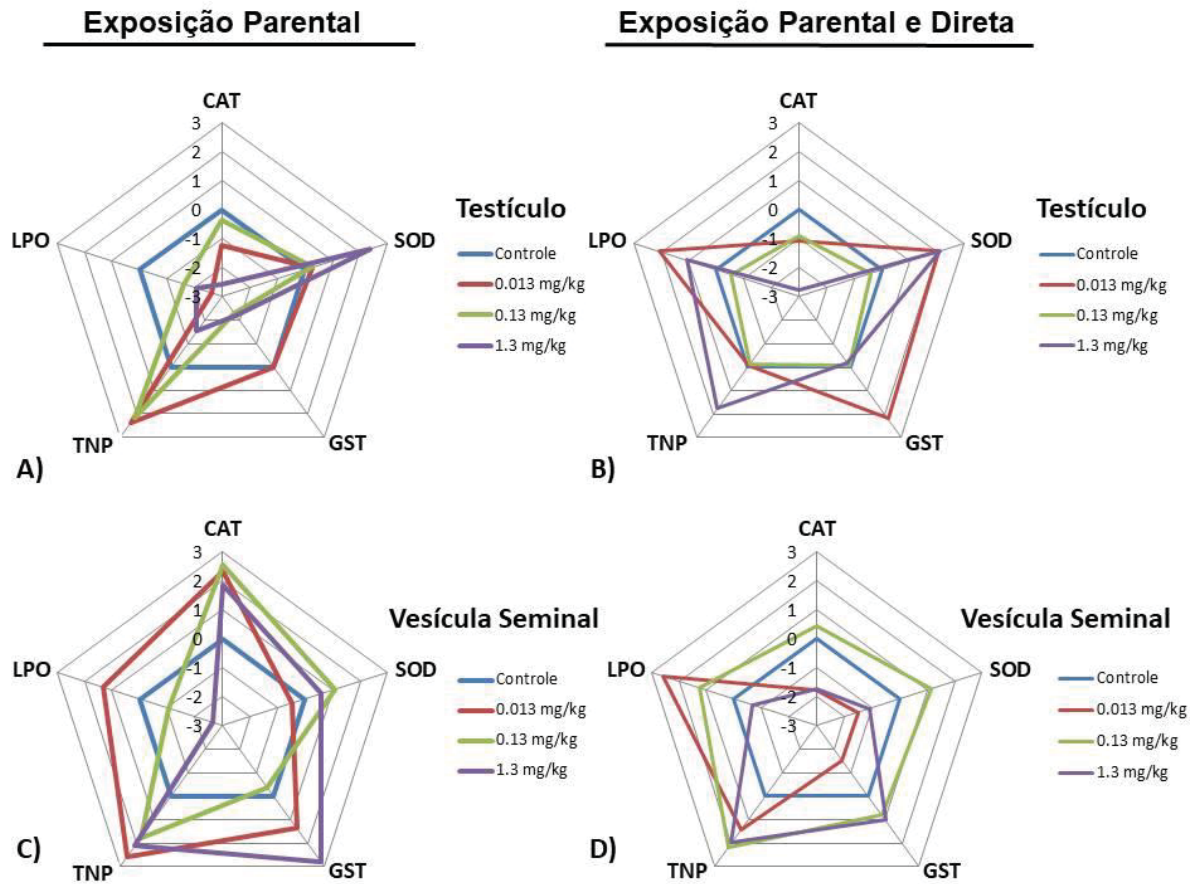
Os indivíduos EPD apresentaram índices similares para os dois órgãos avaliados, sendo as doses de 0,013 e 1,3 mg/kg/dia as mais representativas. Os valores da RIB para o testículo são de 7,48 e 7,46, enquanto para a vesícula seminal estes valores são de 8,78 e 6,59, para a menor e maior dose, respectivamente. Ao realizar um comparativo global dos diferentes grupos, envolvendo o somatório dos índices obtidos para a vesícula seminal e o testículo, é possível observar que os animais EP possuem um maior índice em quase todas as doses testadas, quando comparado com aqueles do grupo EPD, exceto em 0,013 mg/kg/dia. Sendo assim, conseqüentemente, estes animais estão mais suscetíveis a mudanças dos níveis dos biomarcadores bioquímicos em relação ao EPD. A forma como os tratamentos e doses utilizadas modificaram a dinâmica de aumento e diminuição dos biomarcadores é demonstrada na figura 5.

TABELA 6 – ÍNDICE RIB PARA OS GRUPOS TESTADOS

<b>Exposição Parental (EP)</b>			
<b>Dose (mg/kg/dia)</b>	<b>Testículo</b>	<b>Vesícula Seminal</b>	<b>Σ (soma)</b>
<b>0</b>	0	0	0
<b>0,013</b>	6,45	8,05	14,5
<b>0,13</b>	6,63	6,77	13,4
<b>1,3</b>	10,74	8,15	18,89
<b>Exposição Parental e Direta (EPD)</b>			
<b>Dose (mg/kg/dia)</b>	<b>Testículo</b>	<b>Vesícula Seminal</b>	<b>Σ (soma)</b>
<b>0</b>	0	0	0
<b>0,013</b>	7,48	8,78	16,26
<b>0,13</b>	2,06	5,87	7,93
<b>1,3</b>	7,96	6,59	14,55



FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA E INTEGRADA DOS BIOMARCADORES ANALISADOS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS



A-B) Testículo; C-D) Vesícula Seminal. Exposição Parental (EP): n = 10; Exposição Parental e Direta (EPD): n = 9. O gráfico demonstra a oscilação dos biomarcadores nos grupos tratados em relação ao grupo controle (linha base – azul). A área abaixo do zero indica redução do biomarcador, enquanto os valores acima do zero indicam indução do biomarcador. Linha vermelha: 0,013 mg/kg/dia; Linha verde: 0,13 mg/kg/dia; Linha roxa: 1,3 mg/kg/dia; CAT: Catalase; SOD: Superóxido dismutase; GST: Glutathione s-transferase; TNP: Tióis não proteicos; LPO: Peroxidação lipídica. FONTE: o autor (2018)

#### 4) DISCUSSÃO

Mesmo sendo considerado um elemento essencial pouco se sabe sobre o efeito do Mn no sistema reprodutor masculino, em especial, durante uma exposição multigeracional. O presente estudo utilizou doses e rotas relevantes para exposição humana, buscando identificar possíveis efeitos reprodutivos. Nenhuma das doses utilizadas no trabalho foi capaz de alterar o peso dos animais da geração F0 e F1, diferente do observado para animais tratados com compostos arsênicos (BOURGUIGNON et al., 2017) ou cromo (Cr) (CHANDRA et al., 2007). Apesar das poucas alterações no ganho de massa corporal e peso dos órgãos, constatou-se que o sistema reprodutor, em termos funcionais, foi bastante afetado. Foram encontrados resultados multigeracionais relevantes de redução na qualidade espermática e nas condições de estresse oxidativos no sistema reprodutor desses animais.

No presente estudo, para os machos da geração F0, a motilidade espermática não foi afetada. Porém, a prole (geração F1), em ambas as condições de exposição, apresentaram grandes alterações nos parâmetros espermáticos. A motilidade espermática foi substancialmente alterada, pois o Mn é capaz de bloquear proteínas motoras e filamentos do citoesqueleto (TOWLER et al., 2000), explicando parte dos resultados encontrados. Além disso, esse elemento afeta a mitocôndria, causando alteração no potencial de membrana mitocondrial, homeostase dos níveis de  $Ca^{2+}$  e depleção na produção de ATP (CHENG et al., 2003; CHENG et al., 2005; TARALE et al., 2016). Consequentemente, dado as alterações celulares no citoesqueleto e na fisiologia mitocondrial, a motilidade espermática é alterada após o tratamento com Mn. Logo, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o uso de doses baixas, o principal diferencial deste trabalho, foi o fator responsável por quase todas as alterações encontradas, sendo capaz de modificar significativamente características essenciais para a fertilidade masculina.

Durante o desenvolvimento fetal ocorre a maturação celular para o processo espermatogênico. Desta forma, agentes estressores podem interferir no desenvolvimento e diferenciação das células de Sertoli ou células tronco espermatogênicas, prejudicando diretamente a espermatogênese durante a fase adulta (ESTILL; KRAWETZ, 2016; SHARPE, 2010), reduzindo, assim, a concentração espermática. As células de Leydig, responsáveis pela síntese de andrógenos, também podem ser afetadas após a exposição a metais como o Cd (TIAN et al., 2018) e o Mn (CHENG et al., 2003; CHENG et al., 2005), comprometendo a fisiologia testicular. Sendo assim, é possível compreender o porquê mesmo os animais expostos apenas durante o período de gestação e lactação apresentaram uma redução nos parâmetros espermáticos na fase adulta, demonstrando que o Mn pode afetar diversos tipos celulares e promover uma disfunção testicular. Portanto, é necessário levar em consideração a capacidade dos metais, essenciais ou não, de serem transferidos para a prole via barreira placentária ou leite materno (AGRAWAL, 2012; GRAWÉ; OSKARSSON, 2000; LIU J. et al., 2013; RUDGE et al., 2009; TIAN et al., 2018).

Baseada na análise espermática da geração F0 nota-se que o único parâmetro significativamente alterado foi a concentração espermática. Porém, as características de fertilidade e fecundidade destes animais não foram afetadas. Além disso, roedores podem ser modelos resistentes a alterações reprodutivas, dado que a redução drástica em parâmetros espermáticos como, por exemplo, a produção espermática diária, não altera a fertilidade destes indivíduos (ANDRADE et al., 2002). Entretanto, alterações com baixo grau de severidade podem ser prejudiciais em humanos (ANDRADE et al., 2002; ZENICK; CLEGG, 1989). Elbetieha et al. (2001) demonstraram que a ingestão de Mn em altas concentrações (1000-8000 mg/L) afeta negativamente a taxa de fertilização e o número de fetos viáveis em camundongos. Além disso, espermatozoides expostos *in vitro* ao Cd

possuem menor capacidade de sucesso durante a fertilização e formação de blastocistos viáveis (ZHAO et al., 2017). Apesar dos parâmetros de fertilidade dos animais da geração F1 não terem sido testados é possível indicar que, baseado na análise espermática, poderia haver alguma alteração na fertilidade ou fecundidade destes animais, diferente do encontrado para a geração F0.

Os efeitos deletérios observados nos parâmetros espermáticos da geração F1 podem ser decorrentes de alterações no estado oxidativo do sistema reprodutor, dado que as características seminais e espermáticas também são biomarcadores de alterações redox (BERGAMO et al., 2016). Embora não tenha sido notada diferença significativa entre muitos parâmetros bioquímicos analisados nos grupos EP e EPD, em relação ao controle, foi possível observar alterações em algumas atividades enzimáticas, como CAT e GST. Não há resultados descritos na literatura sobre a influência do Mn nas condições de estresse oxidativo na vesícula seminal. Porém, nossos resultados demonstraram uma redução dose-dependente da atividade da SOD nos animais EP, resultando em déficit da eliminação de radicais superóxidos. Segundo Adedara et al. (2017a), em animais tratados com uma mistura de As e Mn é observada uma redução da CAT e aumento na quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no testículo e epidídimo, indicando perda da capacidade de eliminação de EROs. Além disso, de acordo com Goodrich e Basu (2012), metais como Pb, Cd, Se, As e Mn podem inibir a atividade enzimática de diversas variantes da GST. Sendo assim, o Mn causa um déficit no sistema de defesa antioxidante, reduzindo a capacidade de eliminar EROs e detoxificar xenobióticos, promovendo condições patofisiológicas que afetam negativamente a espermatogênese.

Os níveis dos outros biomarcadores bioquímicos mensurados, TNP e LPO, no testículo, não variaram significativamente entre os grupos. Porém, mesmo em baixas doses, nota-se que no testículo dos animais EPD, na dose de 0,013 e 1,3 mg/kg/dia, há uma alta concentração de hidroperóxidos quando comparados com o grupo controle. Isto pode indicar que, apesar dos resultados não serem significativos, é possível que esteja ocorrendo danos nos lipídios celulares do testículo, evidenciando que uma longa exposição a níveis baixos de Mn pode ser tão danosa quanto um quadro de superexposição. Já na vesícula seminal ocorre aumento de TNP e de LPO nos grupos de 0,013 e 1,3 mg/kg/dia EP, respectivamente. Entretanto, o efeito contrário é observado no sistema reprodutor em exposições a altas doses (variação: 15-1800 mg/kg) de Mn (ADEDARA et al., 2017a; 2017b; LIU X. et al., 2013a). A partir desses dados é possível sugerir que as alterações desses biomarcadores indicam perda da homeostase redox e podem influenciar negativamente na qualidade espermática.

O índice RIB é um método amplamente empregado para estudos ecotoxicológicos (BAUDOU et al., 2019; MARINS et al., 2018) pois avalia o comportamento de aumento e

redução dos biomarcadores bioquímicos. Através deste índice foi possível avaliar como as diferentes doses e aplicações afetaram as condições óxido-redutoras do sistema reprodutor masculino no presente trabalho. Os resultados mostraram que o testículo, na dose de 1,3 mg/kg/dia EP e EPD, apresentou os maiores valores de RIB, sugerindo a maior suscetibilidade do órgão a variações oxidativas, o que pode ser prejudicial à espermatogênese. Além disso, ao comparar os índices entre os diferentes tipos de exposição nota-se que aqueles animais EP apresentaram maiores valores de RIB. Conseqüentemente, estes indivíduos estão predispostos a um maior distúrbio e estresse no sistema de defesa antioxidante do que aqueles EPD, frente ao tratamento com Mn.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo é importante ressaltar que, ao comparar ambas as condições de exposição, os animais que receberam Mn apenas pela via parental apresentaram um maior número de alterações significativas nos parâmetros espermáticos e bioquímicos, quando comparados com aqueles expostos de forma parental e direta, podendo sugerir duas hipóteses explicativas. Sabe-se que o Mn é capaz de promover alterações epigenéticas no sistema nervoso (TARALE et al., 2016), enquanto outros compostos, como ftalatos (MANIKKAM et al., 2013) e Cd (ANGELIS et al., 2017; TIAN et al., 2014) também causam este efeito no sistema reprodutor. Ao longo do desenvolvimento do organismo ocorre uma série de reprogramações epigenéticas (MCSWIGGIN; O'DOHERTY, 2018) e, durante o processo espermatogênico, há a reorganização da cromatina (ESTILL; KRAWETZ, 2016), o que poderia ser considerado um *hot-spot* para essas modificações. Desta forma, é possível propor que os animais EPD adquiriram, através de herança epigenética, uma maior resistência ao Mn do que os pertencentes ao grupo EP, especialmente quando é levada em consideração a exposição multigeracional. Por outro lado, também é possível que os animais EP sejam mais sensíveis as alterações devido a exposição apenas no período intrauterino, sendo as alterações mantidas até a vida adulta. Entretanto, aqueles expostos diretamente (EPD) apresentam essa maior resistência aos danos devido a tentativa do organismo de retomar a homeostase perante o estresse continuamente causado pelo Mn.

Além disso, há uma grande preocupação quanto ao risco da exposição ao Mn e os seus efeitos no sistema reprodutor e alteração dos parâmetros seminais em humanos. O presente estudo utilizou doses realistas, referentes aos valores recomendados de ingestão diária, e ao limite máximo tolerado para população humana (IOM, 2001; WHO, 2011). Mesmo assim, foram encontrados efeitos tóxicos no sistema reprodutor, perante uma exposição oral ao longo de uma geração, corroborando com o estudo de neurotoxicidade realizado por Okada et al. (2016). Em contrapartida, McGough e Jardine (2017) não encontraram alterações reprodutivas ao expor ratos ao Mn por duas gerações, através da via aérea, demonstrando que a rota oral pode ser uma importante via de exposição. A dose, no presente estudo, foi o

principal fator responsável pela variação dos dados obtidos, demonstrando que a exposição oral e prolongada a baixas concentrações de Mn também é capaz de causar danos ao sistema reprodutor e potenciais riscos à saúde humana.

Em humanos, o sêmen é utilizado como um biomarcador para ambientes poluídos (BERGAMO et al., 2016; LI et al., 2015; LI et al., 2016; WANG et al., 2017) e características como motilidade, volume e concentração podem indicar o efeito de contaminantes ambientais na qualidade seminal. Desta forma, baseado em análises de estudos populacionais, o efeito do Mn na qualidade seminal tem sido relacionado com marcadores de apoptose em espermatozoides e apontado como prejudicial à motilidade espermática (LI et al., 2012; WANG et al., 2016; WIRTH et al., 2007). Além disso, em populações humanas pode haver uma relação entre os níveis de Mn com a redução de peso e comprimento de recém-nascidos (RAHMAN et al., 2015; XIA et al., 2016;). Estes achados demonstram que o Mn pode ser prejudicial a aspectos reprodutivos tanto em modelos animais quanto humanos.

Sendo assim, é possível concluir que o Mn, mesmo em doses realistas, é capaz de promover alterações reprodutivas em uma exposição multigeracional, modificando os parâmetros espermáticos e o status oxidativo do testículo e vesícula seminal. Além disso, considerando as formas de exposição utilizadas no experimento – parental e parental e direta – é possível sugerir que mecanismos epigenéticos podem estar envolvidos no processo de toxicidade, sendo necessários maiores estudos nesta vertente.

## 5) REFERENCIAS

ADEDARA, I. A.; ABOLAJI, A. O.; AWOGBINDIN, I. O.; FAROMBI, E. O. Suppression of the brain-pituitary-testicular axis function following acute arsenic and manganese co-exposure and withdrawal in rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 39, p. 21-29, 2017a.

ADEDARA, I. A.; SUBAIR, T. I.; EGO, V. C.; OYEDIRAN, O.; FAROMBI, E. O. Chemoprotective role of quercetin in manganese-induced toxicity along the brain-pituitary-testicular axis in rats. **Chemico-biological interactions**, v. 263, p. 88-98, 2017b.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p.121-126, 1984.

AGRAWAL, A. Toxicity and fate of heavy metals with particular reference to developing foetus. **Advances in Life Sciences**, v. 2, n. 2, p. 29-38, 2012.

ANDRADE, A. J.; ARAÚJO, S.; SANTANA, G. M.; OHI, M.; DALSENTER, P. R. Reproductive effects of deltamethrin on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 310-317, 2002.

ANGELIS, C.; GLADIERO, M.; PIVONELLO, C.; SALZANO, C.; GIANFRILLI, D.; PISCITELLI, P.; LENZI, A.; COLAO, A.; PIVONELLO, R. The environment and male reproduction: The effect of cadmium exposure on reproductive function and its implication in fertility. **Reproductive Toxicology**, v. 73, p. 105-127, 2017.

ASCHNER, M.; VRANA, K. E.; ZHANG, W. Manganese uptake and distribution in the central nervous system (cns). **Neurotoxicology**, v. 20, p. 173–180, 1999.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for manganese. **U.S. Department Of Health And Human Services**. Set. 2012.

BAUDOU, F. G.; OSSANA, N. A.; CASTAÑÉ, P. M.; MASTRÁNGELO, M. M.; NÚÑEZ, A. A. G.; PALACIO, M. J.; FERRARI, L. Use of integrated biomarker indexes for assessing the impact of receiving waters on a native neotropical teleost fish. **Science of The Total Environment**, v. 650, p. 1779-1786, 2019.

BELIAEFF, B.; BURGEOT, T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 1316-1322, 2002.

BERGAMO, P.; VOLPE, M. G.; LORENZETTI, S.; MANTOVANI, A.; NOTARI, T.; COCCA, E.; CERULLO, S.; STASIO, M. D.; CERINO, P.; MONTANO, L. Human semen as an early, sensitive biomarker of highly polluted living environment in healthy men: A pilot biomonitoring study on trace elements in blood and semen and their relationship with sperm quality and RedOx status. **Reproductive Toxicology**, v. 66, p. 1-9, 2016.

BOURGUIGNON, N. S.; BONAVENTURA, M. M.; RODRÍGUEZ, D.; BIZZOZZERO, M.; VENTURA, C.; NUÑEZ, M.; LUX-LANTOS, V. A.; LIBERTUN, C. Evaluation of sodium arsenite exposure on reproductive competence in pregnant and postlactational dams and their offspring. **Reproductive Toxicology**, v. 69, p. 1-12, 2017.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHANDRA, A. K.; CHATTERJEE, A.; GOSH, R.; SARKAR, M. Effect of curcumin on chromium-induced oxidative damage in male reproductive system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 24, n. 2, p. 160–166, 2007.

CHENG, J.; FU, J. L.; ZHOU, Z. C. The inhibitory effects of manganese on steroidogenesis in rat primary Leydig cells by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Toxicology**, v. 187, n. 2-3, p. 139-148, 2003.

CHENG, J.; FU, J. L.; ZHOU, Z. C. The mechanism of manganese-induced inhibition of steroidogenesis in rat primary Leydig cells. **Toxicology**, v. 211, n. 1-2, p. 1-11, 2005.

ELBETIEHA, A.; BATAINEH, H.; DARMANI, H.; AL-HAMOOD, M. H. Effects of long-term exposure to manganese chloride on fertility of male and female mice. **Toxicology letters**, v. 119, n. 3, p. 193-201, 2001.

ERIKSON, K. M., THOMPSON, K., ASCHNER, J., ASCHNER, M. Manganese neurotoxicity: a focus on the neonate. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, p. 369-377, 2007.

ESTILL, M. S.; KRAWETZ, S. A. The epigenetic consequences of paternal exposure to environmental contaminants and reproductive toxicants. **Current environmental health reports**, v. 3, n. 3, p. 202-213, 2016.

FRASER, M.; VIAU, M.; LAFOND, J.; MERGLER, D.; SURETTE, C.; VAILLANCOURT, C. Effects of cadmium, lead and manganese on the serotonin system in human placenta. **Placenta**, v. 35, n. 9, p. A112, 2014.

FRISBIE, S. H.; MITCHELL, E. J.; SARKAR, B. Urgent need to reevaluate the latest World Health Organization guidelines for toxic inorganic substances in drinking water. **Environmental health : a global access science source**, v. 14, n. 1, p. 63, 2015.

GERBER, G. B.; LEONARD, A.; HANTSON, P. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 42, n. 1, p. 25–34, 2002.

GOODRICH, J. M.; BASU, N. Variants of glutathione s-transferase pi 1 exhibit differential enzymatic activity and inhibition by heavy metals. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 4, p. 630-635, 2012.

GRAWÉ, K. P.; OSKARSSON, A. Cadmium in milk and mammary gland in rats and mice. **Archives of toxicology**, v. 73, n. 10-11, p. 519-527, 2000.

GRAZULEVICIENE, R.; NADISAUSKIENE, R.; BUINAUSKIENE, J.; GRAZULEVICIUS, T. Effects of Elevated Levels of Manganese and Iron in Drinking Water on Birth Outcomes. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 18, n. 5, 2009.

HERNANDEZ, R. B.; NISHITA, M. I.; ESPÓSITO, B. P.; SCHOLZ, S.; MICHALKE, B. The role of chemical speciation, chemical fractionation and calcium disruption in manganese-induced developmental toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 32, p. 209-217, 2015.

IOM - Institute of Medicine. **Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc**. Washington, DC, National Academy Press. 2001.

JIANG, Z-Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v.202, p.384-389, 1992.

JIANG, Z-Y.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of  $Fe^{2+}$  in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, p. 853-856, 1991.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.*, v.251, p.6183–6188, 1976.

KONO, Y. Generation of Superoxide Radical during Autoxidation of Hydroxylamine and an Assay for Superoxide-Dismutase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 186, p. 189-195, 1978.

LI, C. J.; YEH, C. Y.; CHEN, R. Y.; TZENG, C. R.; HAN, B. C.; CHIEN, L. C. Biomonitoring of blood heavy metals and reproductive hormone level related to low semen quality. **Journal of hazardous materials**, v. 300, p. 815-822, 2015.

LI, Y.; WU, J.; ZHOU, W.; GAO, E. Effects of manganese on routine semen quality parameters: results from a population-based study in China. **BMC public health**, v. 12, n. 1, p. 919, 2012

LI, Y.; WU, J.; ZHOU, W.; GAO, E. Association between environmental exposure to cadmium and human semen quality. **International journal of environmental health research**, v. 26, n. 2, p. 175-186, 2016

LIU, J.; JIN, L.; ZHANG, L.; LI, Z.; WANG, L.; YE, R.; ZHANG, Y.; REN, A. Placental concentrations of manganese and the risk of fetal neural tube defects. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 27, n. 4, p. 322–325, 2013.

LIU, X. F., ZHANG, L. M., GUAN, H. N., ZHANG, Z. W., XU, S. W. Effects of oxidative stress on apoptosis in manganese-induced testicular toxicity in cocks. **Food and chemical toxicology**, v. 60, p. 168-176, 2013a.

LIU, X. F.; ZHANG, L. M.; ZHANG, Z.; LIU, N.; XU, S. W.; LIN, H. J. Manganese-induced effects on testicular trace element levels and crucial hormonal parameters of Hyline cocks. **Biological trace element research**, v. 151, n. 2, p. 217-224, 2013b.

MANIKKAM, M.; TRACEY, R.; GUERRERO-BOSAGNA, C.; SKINNER, M. K. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. **PloS one**, v. 8, n. 1, 2013.

MARINS, A. T.; RODRIGUES, C. C. R.; MENEZES, C. C.; GOMES, J. D. L. C.; COSTA, M. D.; NUNES, M. E. M.; VIEIRA, M. S.; DONATO, F. F.; ZANELLA, R.; SILVA, L. P.; LORO, V. L. Integrated biomarkers response confirm the antioxidant role of diphenyl diselenide against atrazine. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 151, p. 191-198, 2018.

MARTINEZ-FINLEY, E. J.; GAVIN, C. E.; ASCHNER, M.; GUNTER, T. E. Manganese neurotoxicity and the role of reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 65-75, 2013.

MCGOUGH, D.; JARDINE, L. A two-generation inhalation reproductive toxicity study upon the exposure to manganese chloride. **Neurotoxicology**, v. 58, p. 194-202, 2017.

MCSWIGGIN, H. M.; O'DOHERTY, A. M. Epigenetic reprogramming during spermatogenesis and male factor infertility. **Reproduction**, v. 156, p. R9-R21 n. 2, 2018.

NASCIMENTO, S.; BAIERLE, M.; GÖETHEL, G.; BARTH, A.; BRUCKER, N.; CHARÃO, M.; SAUER, E.; GAUER, B.; ARBO, M. D.; ALTKNECHT, L.; JAGER, M.; DIAS, A. C. G.; SALLES, J. F. de; PIERRE, T. S.; GIODA, A.; MORESCO, R.; GARCIA, S. C. Associations among environmental exposure to manganese, neuropsychological performance, oxidative damage and kidney biomarkers in children. **Environmental Research**, v. 147, p. 32–43. 2016.

OKADA, M. A.; FILIPAK NETO, F.; NOSO, C. H.; VOIGT, C. L.; CAMPOS, S. X.; RIBEIRO, C. A. de O. Brain effects of manganese exposure in mice pups during prenatal and breastfeeding periods. **Neurochemistry International**, v. 97, p. 109-116, 2016.

PONNAPAKKAM, T. P.; BAILEY, K. S.; GRAVES, K. A.; ISZARD, M. B. Assessment of male reproductive system in the CD-1 mice following oral manganese exposure. **Reproductive Toxicology**, v. 17, n. 5, p. 547–551, 2003.

RAHMAN, S. M.; KIPPLER, M.; AHMED, S.; PALM, B.; EI ARIFEEN, S.; VAHTER, M. Manganese exposure through drinking water during pregnancy and size at birth: A prospective cohort study. **Reproductive Toxicology**, v. 53, p. 68-74, 2015.

RAO, M. V.; SHARMA, P. S. N. Protective effect of vitamin E against mercuric chloride reproductive toxicity in male mice. **Reproductive Toxicology**, v. 15, n. 6, p. 705-712, 2001.

ROELS, H. A.; BOWLER, R. M.; KIM, Y.; HENN, B. C.; MERGLER, D.; HOET, P.; GOCHEVA, V. V.; BELLINGER, D. C.; WRIGHT, R. O.; HARRIS, M. G.; CHANG, Y.;



BOUCHARD, M. F.; RIOJAS-RODRIGUEZ, H.; MENEZES-FILHO, J. A.; TÉLLEZ-ROJO, M. M. Manganese exposure and cognitive deficits: a growing concern for manganese neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 4, p. 872-880, 2012.

RUDGE, C. V.; RÖLLIN, H. B.; NOGUEIRA, C. M.; THOMASSEN, Y.; RUDGE, M. C.; ODLAND, J. O. The placenta as a barrier for toxic and essential elements in paired maternal and cord blood samples of South African delivering women. **Journal of environmental monitoring**, v. 11, n. 7, p. 1322-1330, 2009.

SÁNCHEZ, D. J.; DOMINGO, J.; LLOBET, J. M.; KEEN, C. L. Maternal and developmental toxicity of manganese in the mouse. **Toxicology letters**, v. 69, n. 1, p. 45-52, 1993.

SANCHEZ, W.; BURGEOT, T.; PORCHER, J. M. A novel "Integrated Biomarker Response" calculation based on reference deviation concept. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 5, p. 2721-2725, 2013.

SANDERS, A. P.; DESROSIERS, T. A.; WARREN, J. L.; HERRING, A. H.; ENRIGHT, D.; OLSHAN, A. F.; MEYER, R. E.; FRY, R. C. Association between arsenic, cadmium, manganese, and lead levels in private wells and birth defects prevalence in North Carolina: a semi-ecologic study. **BMC public health**, v. 14, n. 1, p. 955, 2014.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, v.25, p.192-205, 1968.

SHARPE, R. M. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1546, p. 1697-1712, 2010.

TARALE, P.; CHAKRABARTI, T.; SIVANESAN, S; NAOGHARE, P.; BAFANA, A.; KRISHNAMURTHI, K. Potential role of epigenetic mechanism in manganese induced neurotoxicity. **BioMed research international**, v. 2016, n. 2016, p. 1-18, 2016.

TIAN, H.; CHEN, S.; LENG, Y.; LI, T.; LI, Z.; CHENG, H.; ZHANG, Q. Exposure to cadmium during gestation and lactation affects development and function of Leydig cells in male offspring. **Environmental toxicology**, v. 33, n. 3, p. 351-360, 2018.

TIAN, M.; BAO, H.; MARTIN, F. L.; ZHANG, J.; LIU, L.; HUANG, Q.; SHEN, H. Association of DNA methylation and mitochondrial DNA copy number with human semen quality. **Biology of reproduction**, v. 91, n. 4, 2014.

TOWLER, M. C.; PRESCOTT, A. R.; JAMES, J.; LUCOOG, J. M.; PONNAMBALAM, S. The manganese cation disrupts membrane dynamics along the secretory pathway. **Experimental cell research**, v. 259, n. 1, p. 167-179, 2000.

TU, H.; FAN, C.; CHEN, X.; LIU, J.; WANG, B.; HUANG, Z.; ZHANG, Y.; MENG, X.; ZOU, F. Effects of cadmium, manganese, and lead on locomotor activity and neurexin 2a expression in zebrafish. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 36, n. 8, p. 2147-2154, 2017.

WANG, Y. X.; SUN, Y.; HUANG, Z.; WANG, P.; FENG, W.; LI, J.; YANG, P.; WANG, M.; SUN, L.; CHEN, Y. J.; LIUC.; YUE, J.; GU, L. J.; ZENG, Q.; LU, W. Q. Associations of urinary metal levels with serum hormones, spermatozoa apoptosis and sperm DNA damage in a Chinese population. **Environment International**, v. 94, p. 177-188, 2016.

WANG, Y. X.; WANG, P.; FENG, W.; LIU, C.; YANG, P.; CHEN, Y. J.; SUN, L.; SUN, Y.; YUE, J.; GU, L. J.; ZENG, Q.; LU, W. Q. Relationships between seminal plasma

metals/metalloids and semen quality, sperm apoptosis and DNA integrity. **Environmental Pollution**, v. 224, p. 1–11, 2017.

WIRTH, J. J.; ROSSANO, M. G.; DALY, D. C.; PANETH, N.; PUSCHECK, E.; POTTER, R. C.; DIAMOND, M. P. Ambient manganese exposure is negatively associated with human sperm motility and concentration. **Epidemiology**, v. 18, n. 2, p. 270-273, 2007.

WHO (World Health Organization). **Manganese and its compounds: environmental aspects**. Geneva, 2004.

WHO (World Health Organization). **Manganese in Drinking-water. Background document for development of WHO guidelines for drinking water quality**. Geneva, 2011.

WHO (World Health Organization). **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**. Switzerland, 2010.

XIA, W.; ZHOU, Y.; ZHENG, T.; ZHANG, B.; BASSIG, B. A.; LI, Y.; SR, J. P. W.; ZHOU, A.; WAN, Y.; WANG, Y.; XIONG, C.; ZHAO, J.; LI, Z.; YAO, Y.; HU, J.; PAN, X.; XU, S. Maternal urinary manganese and risk of low birth weight: a case–control study. **BMC public health**, v. 16, n. 1, p. 142, 2016.

ZENICK, H.; CLEGG, E. D. **Assessment of male reproductive toxicity: A risk assessment approach**. In Principles and Methods of Toxicology (W. Hayes, Ed.), pp. 275–309. Raven Press, New York, 1989.

ZHAO, L. L.; RU, Y. F.; LIU, M.; TANG, J. N.; ZHENG, J. F.; WU, B.; GU, Y.; SHI, H. J. Reproductive effects of cadmium on sperm function and early embryonic development *in vitro*. **PloS one**, v. 12, n. 11, p.1-12, 2017.

ZOTA, A. R.; ETTINGER, A. S.; BOUCHARD, M.; AMARASIRIWARDENA, C. J.; SCHAWARTZ, J.; HU, H.; WRIGHT, R. O. Maternal Blood Manganese Levels and Infant Birth Weight. **Epidemiology**, v. 20, n. 3, p. 367–373, 2009.

## **CAPÍTULO II**

Avaliação funcional e da homeostase redox do complexo hipotálamo-gonadal masculino de camundongos Swiss após exposição ao manganês

## RESUMO

O Manganês (Mn) é um metal essencial, necessário para o desenvolvimento do metabolismo animal, e encontra-se amplamente distribuído ao longo do planeta Terra. Porém, atividades antrópicas como mineração e o despejo de resíduos industriais podem aumentar a concentração deste metal no ambiente, causando o risco de exposição a doses elevadas. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar qual o efeito da exposição do Mn, em altas doses, no sistema reprodutor masculino de camundongos. Os animais foram divididos em quatro grupos, que receberam doses de  $MnCl_2$  nas seguintes concentrações: 0 (controle), 15, 30 e 60 mg/kg/dia, via gavagem diária, por 45 dias. Ao término do experimento os animais foram eutanasiados e os parâmetros espermáticos, hormonais e de estresse oxidativo foram avaliados no testículo, vesícula seminal e hipotálamo. Os resultados indicam que, nas diferentes doses utilizadas, o Mn foi capaz de promover a redução do peso de órgãos andrógeno-dependentes, bem como alteração nos níveis de metabólitos androgênicos fecais, sugerindo um potencial anti-androgênico. Além disso, parâmetros espermáticos como motilidade progressiva, concentração e produção espermática diária foram drasticamente afetados em todos os grupos experimentais. A atividade de todas as enzimas antioxidantes avaliadas no testículo foram reduzidas, exceto a glutathione peroxidase. No entanto, para a vesícula seminal poucos biomarcadores foram alterados. Além disso, para o hipotálamo, houve redução da atividade da glutathione S-transferase e acetilcolinesterase, demonstrando potencial neurotóxico o qual, possivelmente, interfere nas redes neurais e na fisiologia do complexo hipotálamo-gonadal. Sendo assim, a partir dos dados obtidos foi possível demonstrar e sugerir vias pelas quais o Mn pode afetar o sistema endócrino e, conseqüentemente, o seu efeito sobre diversos parâmetros da funcionalidade do sistema reprodutor.

Palavras-chaves: estresse oxidativo, toxicologia reprodutiva, análise espermática, esteroidogênese

## 1) INTRODUÇÃO

O Manganês (Mn) é considerado um elemento traço necessário para o desenvolvimento humano, sendo essencial para diversas funções metabólicas, com a finalidade de manter os parâmetros da homeostase corporal (ASCHNER; ASCHNER, 2005; KEEN et al., 2000). Alguns metais têm um papel importante nos sistemas biológicos, pois se conjugam com proteínas, formando metaloproteínas, que possuem funções estruturais, enzimáticas e de transporte (FRAGA, 2005). Uma das principais atividades do Mn no organismo é constituir a manganês superóxido dismutase (MnSOD), auxiliando na defesa antioxidante da célula contra radicais livres (MARTINEZ-FINLEY et al., 2013).

Órgãos competentes, como a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011) e o Instituto de Medicina (IOM, 2001), estipulam valores de referência de ingestão diária de 2,3 e 1,8 mg/kg/dia de Mn para homens e mulheres, respectivamente, sendo a dose de 11 mg/dia a *No Observed Adverse Effect Level* (NOAEL). Entretanto, esses valores são elevados em pessoas que possuem uma ocupação trabalhista relacionada a esse elemento ou consomem recursos hídricos com valores maiores do que os recomendados por agências de regulamento, podendo, assim, apresentar quadros de superexposição (FRISBIE et al., 2012; 2015; GE et al., 2018; O'NEAL; ZHENG, 2015; RAHMAN et al., 2015; WHO, 2011). Assim como o ferro (Fe), cobre (Cu) e zinco (Zn), o Mn pode apresentar toxicidade caso a concentração corporal seja maior do que aquela necessária para a sua função biológica (FRAGA, 2005), como ocorre no manganismo, provocando uma série de danos neurológicos no indivíduo (MARTINEZ-FINLEY et al., 2013; O'NEAL; ZHENG, 2015).

Apesar de diversos metais possuírem papéis importantes na fisiologia do sistema reprodutor masculino, em quantidades tóxicas podem causar redução na fertilidade masculina e uma série de outras complicações (CHANDEL; JAIN, 2014), visto que estes promovem danos testiculares ao induzir estresse oxidativo (TURNER; LYSIAK, 2008). Elementos como níquel (Ni) e o cádmio (Cd) são capazes de provocar alterações na atividade de enzimas com importantes funções antioxidantes e nos níveis de biomarcadores de estresse oxidativo (KHERADMAND et al., 2013; MURAWSKA-CIALOWICZ et al., 2012). Portanto, alterações provocadas no sistema de defesa antioxidante podem promover a modificação dos parâmetros seminais, causando infertilidade masculina (PATRICIO et al., 2016; WAGNER et al., 2018).

Além disso, sabe-se que modelos animais expostos ao Mn apresentam uma série de danos testiculares, espermáticos, alterações na fisiologia redox do sistema nervoso central e, conseqüentemente, redução nos níveis de hormônios sexuais (ADEDARA et al., 2017a; 2017b; LIU et al., 2013; OKADA et al., 2016). Já em humanos, o Mn e outros metais estão relacionados com a ocorrência de apoptose, baixa motilidade e concentração espermática

(WANG et al., 2016; 2017; WIRTH et al., 2007; WIRTH; MIJAL, 2010; ZENG et al., 2015), podendo interferir diretamente sobre os parâmetros reprodutivos e de fecundidade. Apesar disso, pouco se conhece sobre os possíveis efeitos tóxicos e o mecanismo de ação do Mn no complexo hipotálamo-gonadal. Desta forma, se faz necessário conhecer os efeitos promovidos por este elemento e qual o seu impacto nas condições funcionais e oxidativas do sistema reprodutor masculino. Portanto, este estudo teve como objetivo investigar o efeito da exposição a altas doses de Mn nos parâmetros espermáticos e na homeostase redox do complexo hipotálamo-gonadal, visando compreender como este metal altera o sistema de defesa antioxidante e o processo espermato gênico.

## 2) MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1) DESENHO EXPERIMENTAL

Neste estudo foram utilizados 64 camundongos Swiss machos, recém-desmamados ( $22 \pm 1$  dias), obtidos no biotério da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno com temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo (12/12 horas, claro e escuro) controlados, sendo a ração e água fornecidas *ad libitum*. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais ( $n=16$ ) recebendo, via gavagem, doses de cloreto de manganês ( $\text{MnCl}_2$  - Sigma-Aldrich®) nas doses de 0 (grupo controle), 15, 30 e 60 mg/kg/dia, pelo período de 45 dias. O peso de cada animal foi aferido diariamente, para o ajuste da quantidade da dose a ser recebida. O protocolo experimental e cuidados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Pesquisa e Ética em Animais da Universidade Federal do Paraná (CEUA-BIO 1085/2017), que está de acordo com as diretrizes nacionais e internacionais de bem-estar animal.

O teste em altas doses visa indicar alterações reprodutivas provocadas pelo Mn, bem como sua via de ação. De acordo com Frisbie et al. (2012 e 2015) e Rhaman et al. (2015), diversas localidades ao redor do mundo estão sujeitas ao uso de fontes hídricas com doses superiores ao estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011). Além disso, estudos prévios empregaram doses similares às concentrações escolhidas e demonstraram toxicidade em diferentes sistemas do organismo (PONNAPAKKAM et al., 2003; OKADA et al., 2016). Sendo assim, as concentrações utilizadas neste estudo foram escolhidas de forma a demonstrar quais parâmetros reprodutivos são afetados a partir da exposição ao Mn em altas concentrações.

### 2.2) DISSECÇÃO E COLETA DOS ÓRGÃOS

Ao fim do experimento os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o sangue coletado, via punção cardíaca, seguido de dissecação. Os testículos, vesícula

seminal e o epidídimo, utilizado para análise espermática, foram retirados e pesados. A próstata, glândula do pênis, músculo levantador do ânus/bulbocavernoso (MLABC) foram coletados e pesados com a finalidade de identificar se o Mn apresenta potencial anti-androgênico, dado que esses órgãos se desenvolvem em resposta a presença de andrógenos. Cada material foi tratado de forma específica para os diferentes métodos de análise utilizados.

### 2.3) ANÁLISES DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS

Os espermatozoides foram obtidos da cauda do epidídimo, que foi seccionada ao meio, e colocada em 400 µl de meio *Gamete Buffer* (COOK Medical®), a 37°C, por 5 minutos, para dispersão dos espermatozoides. Posteriormente, alíquotas com diferentes volumes foram retiradas para as análises dos parâmetros espermáticos, de acordo com WHO (2010), como descrito a seguir.

#### 2.3.1) Motilidade espermática

Duzentos espermatozoides por amostra/animal foram avaliados e classificados para motilidade em três categorias: móveis progressivos, móveis não-progressivos e imóveis. Para isso, 30 µl de amostra foram colocados em lâmina, cobertos por lamínula e observados em microscópio de luz (Leica® DME), com objetiva de 40x.

#### 2.3.2) Concentração espermática

A concentração espermática foi estimada em milhões/mL, por meio de análise via câmara hemocitométrica de Neubauer. Para esta contagem foram utilizados 20 µl de amostra diluída 10x em água destilada. Os espermatozoides foram contabilizados em cinco quadrantes e, para o cálculo da concentração, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\boxed{[\text{concentração}] = \text{número de espermatozoides} \times 5 \times \text{fator de diluição} \times 10000}$$

#### 2.3.3) Vitalidade espermática

O teste hiposmótico visa avaliar a vitalidade espermática por meio do diferencial osmótico entre a célula e o meio. Alíquotas de 50 µl de amostra foram adicionadas em 100 µl de água destilada por 5 minutos e, em seguida, observadas em microscópio de luz com objetiva de 40x. Foram considerados vivos somente os espermatozoides que apresentavam a cauda enrolada (*coiled tail*).

## 2.4) PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA E TRÂNSITO ESPERMÁTICO

Para avaliar a produção espermática diária foi realizada a contagem de espermátides resistentes à homogeneização (estágio 14-16 da espermatogênese), utilizando o testículo esquerdo (n=14), seguindo o procedimento descrito por Oakberg (1956) e Kyjvoska et al. (2013).

Brevemente, durante a dissecação o testículo esquerdo foi pesado, decapsulado e seu parênquima imerso em 1 mL de solução de NaCl 0.9% contendo Triton x100 a 0.05%, seguido de homogeneização até a dissolução do tecido. Logo após, a amostra foi diluída na proporção de 1:10 e transferida para câmara de Neubauer, para a contagem das células em microscópio de luz com objetiva de 40x. Para calcular a produção espermática diária o número de espermátides resistentes à homogeneização obtido foi dividido por 4,84, que corresponde ao número de dias que as espermátides em desenvolvimento permanecem no estágio 14-16 durante a espermatogênese, em camundongos.

Da mesma forma que o testículo, a cabeça/corpo e a cauda do epidídimo (n=14) foram homogeneizados para a contagem de espermatozoides. O trânsito espermático, em dias, foi calculado através da divisão do número de espermatozoides em cada região pela produção espermática diária.

## 2.5) DOSAGEM DE TESTOSTERONA SÉRICA E METABÓLITOS ANDROGÊNICOS FECAIS

Após a eutanásia, o sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca, e o soro obtido por centrifugação (400 g, por 15 min a 4°C). Logo após, o soro foi armazenado à -20°C para posterior análise.

Para a quantificação de metabólitos androgênicos fecais (MAF) os animais de cada grupo foram subdivididos, aleatoriamente, em três caixas (n=3), nas quais foram feitas coletas de um *pool* de fezes, por caixa/tratamento, nos dias 1; 14; 28 e 42 de exposição. As fezes coletadas foram secas em estufa, a 60°C, e maceradas. Em seguida, as amostras foram colocadas em tubos de ensaio contendo etanol 80% em agitador magnético, por 30 minutos, para extração dos metabólitos androgênicos.

A concentração de testosterona sérica e de MAF nas amostras foi quantificada através do imunoenensaio ELISA com anticorpo policlonal anti-testosterona, sendo as concentrações expressas em nmol/L e ng/g, respectivamente. Todos os procedimentos adotados foram realizados de acordo com Brown et al. (2004).



## 2.6) ANÁLISES BIOQUÍMICAS – ESTRESSE OXIDATIVO

Para avaliar se os tratamentos foram capazes de promover uma condição de estresse oxidativo o hipotálamo, testículos e vesículas seminais (n=10) foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 20 mM, EDTA 1,0 mM, PMSF (*Phenylmethanesulfonyl fluoride*) 1mM (pH 7.6), seguido de centrifugação a 12000g, por 20 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes tiveram seu conteúdo proteico mensurado pelo método de Bradford (1976), em triplicata, com leitura em 595 nm. Para a análise de enzimas do sistema de defesa antioxidante foi realizado o teste para catalase (CAT) (AEBI, 1984), superóxido dismutase (SOD) (KONO, 1978; CROUCH et al., 1981); glutathione peroxidase (GPx) (WENDEL, 1981); glutathione S-transferase (GST) (KEEN et al., 1976) e glutathione disulfide reductase (GR) (SIES et al., 1979). A concentração de moléculas antioxidantes, os tióis não proteicos (TNP), foi realizada de acordo com Sedlak e Lindsay (1968). Já para a mensuração de danos oxidativos foi utilizado o protocolo de Jiang et al. (1991, 1992) para peroxidação lipídica (LPO). Além disso, para avaliação do potencial de neurotoxicidade hipotalâmica foi avaliada a atividade da acetilcolinesterase (AChE), de acordo com Ellman et al. (1961). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## 2.7) RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (RIB)

Para avaliar a resposta integrada dos biomarcadores foi utilizada a metodologia descrita por Beliaeff e Burgeot (2002) e modificada por Sanchez et al. (2013). Os resultados obtidos através da análise dos biomarcadores de cada dose utilizada são divididos pelo o do seu grupo controle correspondente, seguido de uma logaritimização para redução da variância. A partir dos dados logaritimizados ( $Y_i$ ) foi calculado a média ( $\mu$ ) e o desvio padrão ( $s$ ) para todas as análises. Em seguida, foi aplicada a fórmula  $Z_i = (Y_i - \mu)/s$  para cada tratamento, sendo a diferença entre o grupo tratado e controle utilizada para obter o valor de A – que corresponde ao resultado integrado para cada biomarcador utilizado. Após, estes resultados foram plotados em um gráfico do tipo radar, onde valores acima ou abaixo de zero (controle) indicam o estímulo ou inibição de determinado biomarcador. Por fim, para o cálculo do índice RIB de cada grupo, os valores de A foram convertidos em números absolutos (S) e somados (SEVERO, 2017).

## 2.8) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram testados quanto à normalidade e avaliados pelo teste de ANOVA, seguido pelo teste *post hoc* de Dunnet (controle vs tratado). Os dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis, seguido do teste *post hoc* de Dunn's. Todos os

dados são apresentados como média  $\pm$  desvio/erro padrão e valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

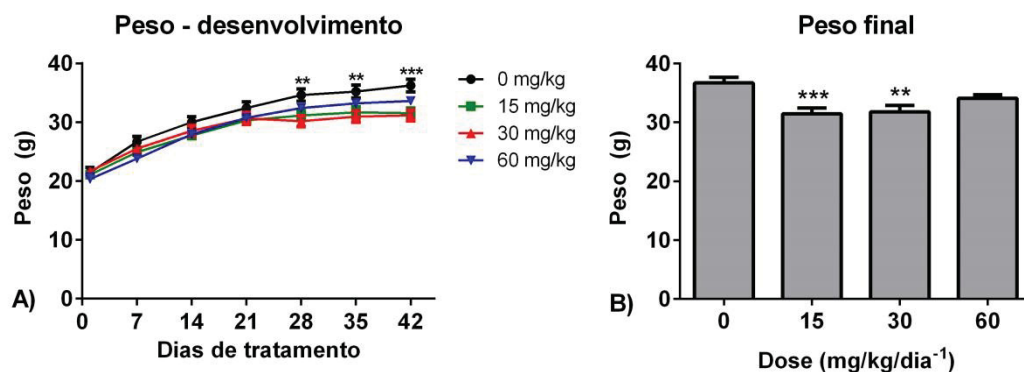
### 3) RESULTADOS

#### 3.1) DESENVOLVIMENTO GERAL E PESO DOS ÓRGÃOS

O ganho de peso dos animais ao longo do experimento é demonstrado na figura 1. Conforme o tempo de tratamento aumenta nota-se uma redução de peso entre os grupos tratados e o controle (FIGURA 1A). Ao mensurar o peso final, com 45 dias de tratamento, é possível perceber uma redução significativa nas doses de 15 e 30 mg/kg/dia em relação ao grupo controle (FIGURA 1B).

Além disso, as concentrações de 15 e 30 mg/kg/dia promoveram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no peso, absoluto e relativo, de diversos órgãos (TABELA 1). Este efeito é destacado no epidídimo, vesícula seminal, peso relativo do testículo e MLABC. A dose de 60 mg/kg/dia causou a redução de peso no epidídimo e glândula do pênis.

FIGURA 1 – PESO DOS ANIMAIS DURANTE O PERÍODO EXPERIMENTAL



A) Peso durante o desenvolvimento; B) Peso final.  $n = 16$ . \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$  (ANOVA de duas vias/ uma via – teste *post hoc* Newman Keuls/Dunnet). PND: dia pós-natal. Barra: erro padrão.  
 FONTE: o autor (2018)

TABELA 1 – DADOS GERAIS SOBRE O PESO DOS ÓRGÃOS APÓS A EXPOSIÇÃO EM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE  $MnCl_2$ 

	$MnCl_2$ (mg/kg/dia)			
	0 (controle)	15	30	60
<b>Peso absoluto (g)</b>				
Testículo	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01
Epidídimo	0,04 ± 0,008	<b>0,04 ± 0,006*</b>	<b>0,03 ± 0,007*</b>	<b>0,03 ± 0,004*</b>
Vesícula Seminal	0,32 ± 0,07	<b>0,19 ± 0,06*</b>	<b>0,19 ± 0,05*</b>	0,25 ± 0,06
Próstata	0,014 ± 0,006	0,011 ± 0,005	0,010 ± 0,003	0,010 ± 0,003
MLABC	0,12 ± 0,03	<b>0,09 ± 0,03*</b>	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,02
Glande do pênis	0,010 ± 0,004	0,007 ± 0,002	0,007 ± 0,001	<b>0,006 ± 0,001*</b>
<b>Peso relativo (%)</b>				
Testículo	0,27 ± 0,03	<b>0,32 ± 0,04*</b>	0,31 ± 0,03*	0,29 ± 0,04
Epidídimo	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01
Vesícula Seminal	0,89 ± 0,18	<b>0,60 ± 0,15*</b>	<b>0,61 ± 0,16*</b>	0,75 ± 0,17
Próstata	0,038 ± 0,016	0,035 ± 0,019	0,031 ± 0,010	0,030 ± 0,010
MLABC	0,35 ± 0,09	0,30 ± 0,11	0,35 ± 0,05	0,32 ± 0,07
Glande do pênis	0,028 ± 0,009	0,025 ± 0,006	0,023 ± 0,005	0,020 ± 0,005

\* =  $p < 0,05$  – valores destacados em negrito. (ANOVA de uma via – teste *post hoc* de Dunnett). Média ± Desvio padrão. n = 16. FONTE: o autor (2018).

### 3.2) PARÂMETROS ESPERMÁTICOS

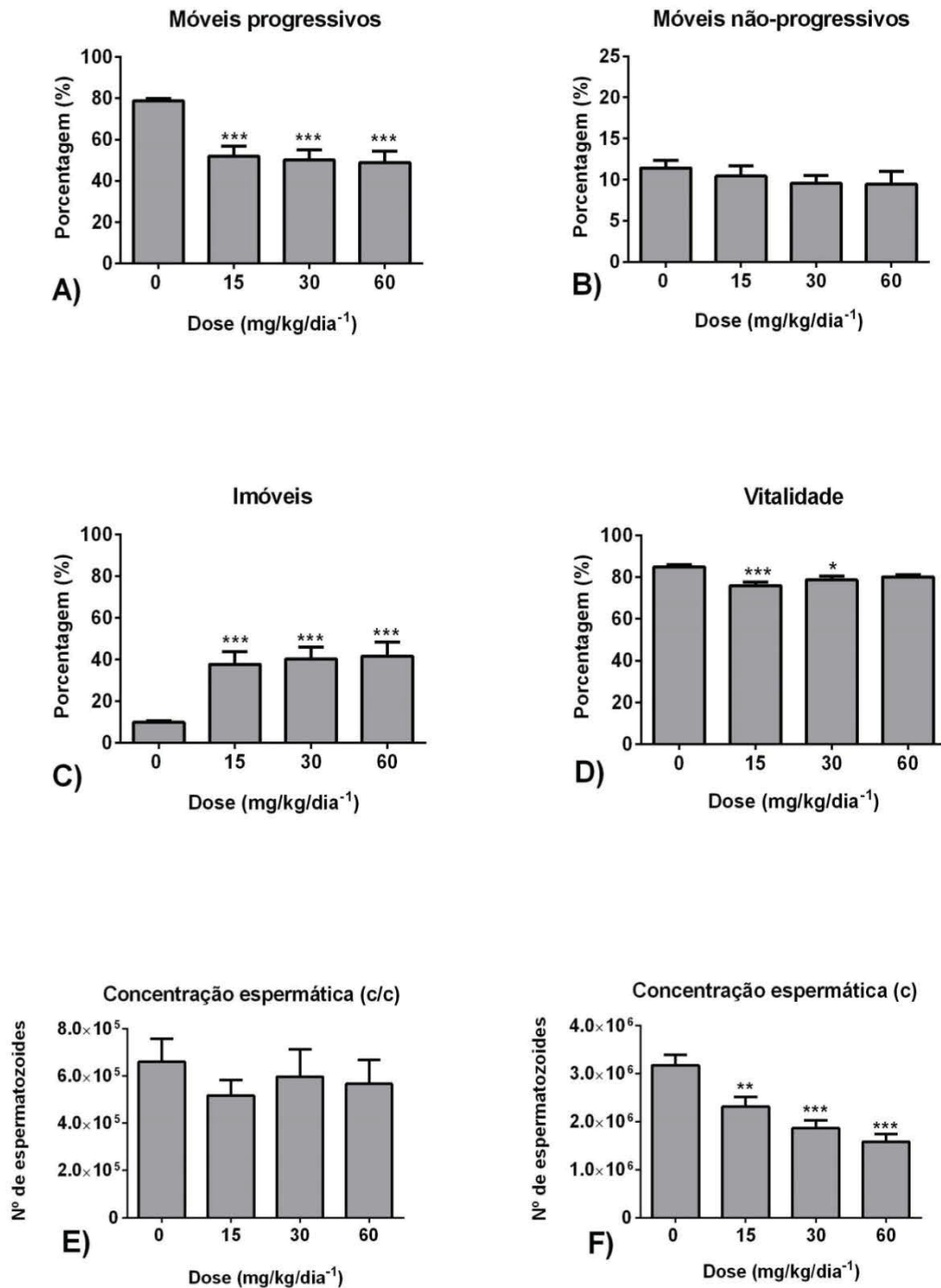
A motilidade espermática foi drasticamente afetada por todas as doses testadas, havendo redução significativa ( $p < 0,05$ ) de aproximadamente 20% na quantidade de espermatozoides com motilidade progressiva (FIGURA 2A). Não foram observados efeitos no número de espermatozoides móveis não-progressivos (FIGURA 2B) porém, houve aumento expressivo na porcentagem de espermatozoides imóveis nos grupos tratados (FIGURA 2C).

A vitalidade espermática foi afetada com o tratamento na dose de 15 e 30 mg/kg/dia, havendo uma redução de espermatozoides vivos, em relação ao grupo controle (FIGURA 2D). As concentrações espermáticas nos diferentes segmentos do epidídimo também sofreram uma diminuição (FIGURA 2E-F), em especial na porção da cauda, onde houve uma redução significativa de acordo com o aumento da dose ( $p < 0,05$ ) (FIGURA 2F).

A produção espermática diária foi drasticamente reduzida em, aproximadamente, 50% em todas as doses testadas ( $p < 0,05$ ) (FIGURA 3A). Ao analisar o tempo de trânsito espermático na cabeça/corpo do epidídimo é possível observar um aumento dose-dependente de acordo com o aumento da dose, sendo a de 60 mg/kg/dia estatisticamente significante em relação ao grupo controle (FIGURA 3B). Além disso, apesar de ocorrer reduções no tempo de trânsito para a cauda do epidídimo os valores não diferem estatisticamente. Contudo, nota-se uma tendência de aumento no tempo na dose de 15

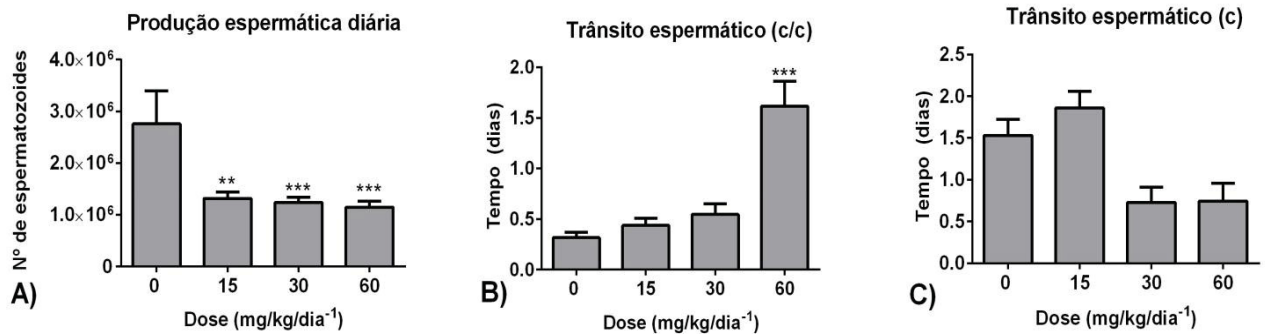
mg/kg/dia em relação ao controle, contrário às doses de 30 e 60 mg/kg/dia onde houve um decréscimo (FIGURA 3C).

FIGURA 2 – MOTILIDADE, VITALIDADE E CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA DE CAMUNDONGOS APÓS EXPOSIÇÃO AO MANGANÊS



A) Móveis progressivos; B) Móveis não progressivos; C) Imóveis; D) Vitalidade; E) Concentração espermática – cauda do epidídimo (c); F) Concentração espermática – cabeça e corpo do epidídimo (c/c). \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . (ANOVA de uma via – teste *post hoc* de Dunnet).  $n = 16$ . Barra: erro padrão. FONTE: O autor (2018).

FIGURA 3 – PRODUÇÃO ESPERMÁTICA E TEMPO DE TRÂNSITO ESPERMÁTICO

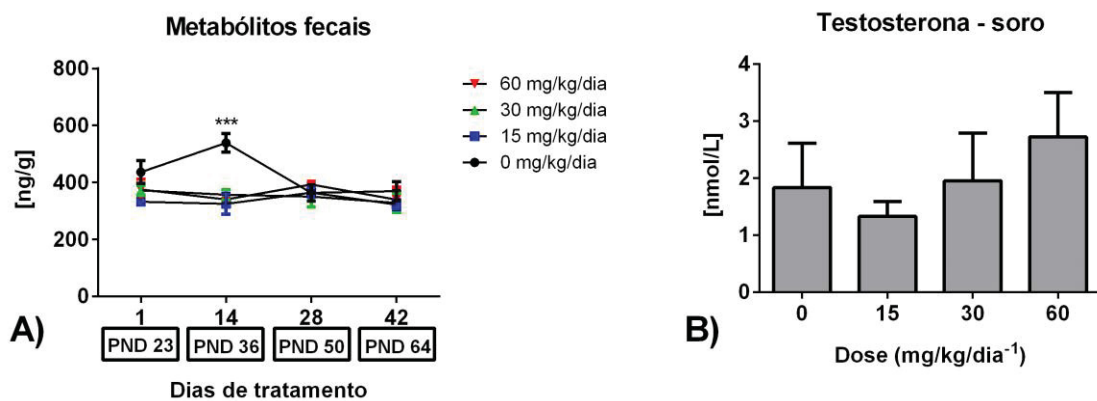


A) Produção espermática diária; B) Tempo de trânsito espermático – cabeça e corpo do epidídimo (c/c); C) Tempo de trânsito espermático – cauda do epidídimo (c). \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . (ANOVA de uma via – teste *post hoc* de Dunnett).  $n = 16$ . Barra: erro padrão. FONTE: O autor (2018).

### 3.3) DOSAGEM DE METABÓLITOS ANDROGÊNICOS FECAIS E TESTOSTERONA SÉRICA

Durante o monitoramento do nível de andrógenos fecais foi possível observar que a curva permanece igual para todos os grupos, exceto no dia 14 onde ocorreu um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do grupo controle em relação aos tratados (FIGURA 4A). A concentração de testosterona sérica, mensurada após os 45 dias de tratamento, não apresentou valores estatisticamente significativos (FIGURA 4B).

FIGURA 4 – METABÓLITOS ANDROGENICOS FECAIS E TESTOSTERONA SÉRICA



A) Metabólitos fecais androgênicos ( $n = 3$ ); B) Testosterona sérica ( $n = 15$ ). \* =  $p < 0,05$  (ANOVA teste *post hoc* Newman Keuls/ Dunnett). Barra: erro padrão. FONTE: o autor (2018)

### 3.4) ESTRESSE OXIDATIVO

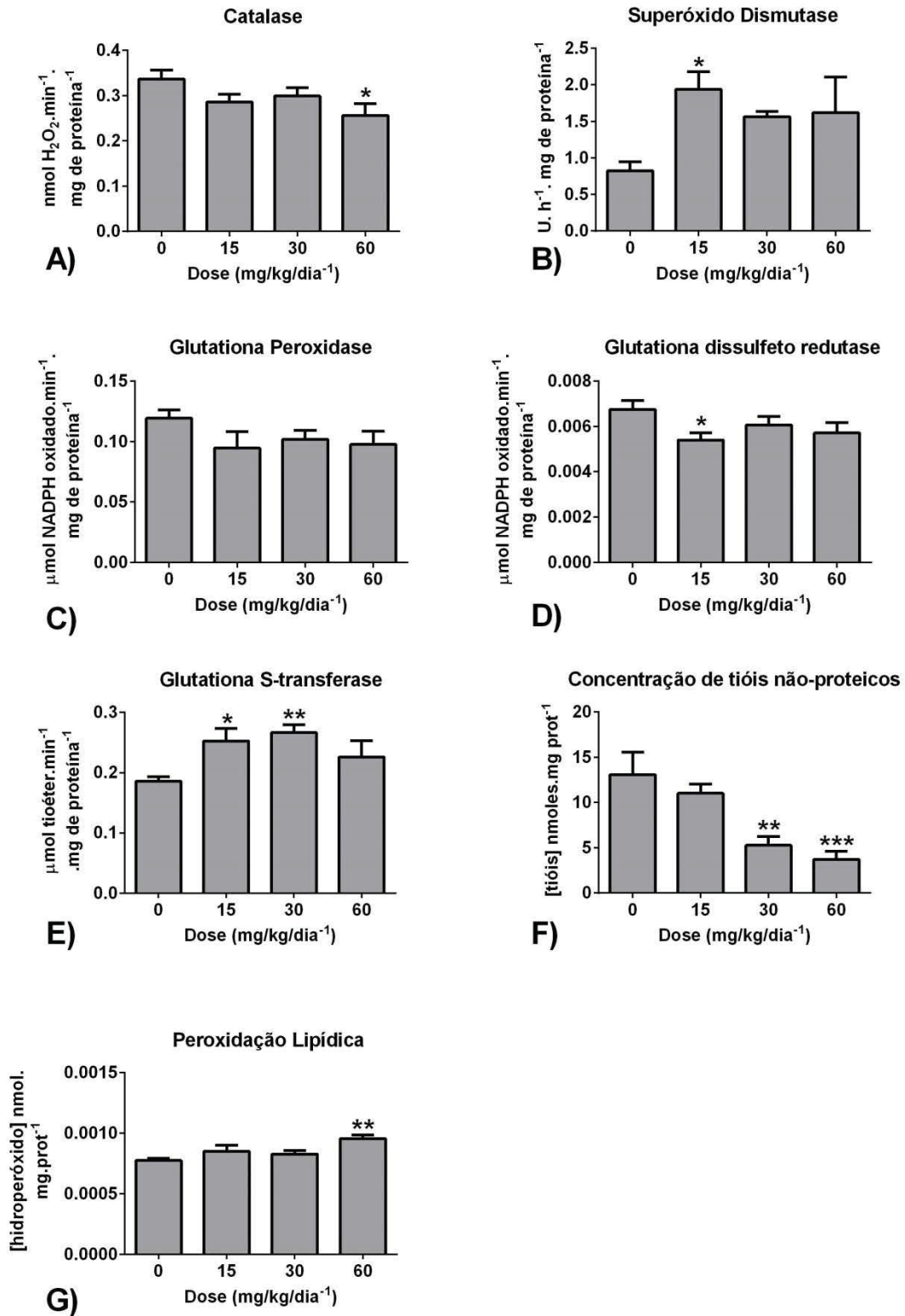
Os resultados obtidos dos marcadores enzimáticos e não enzimáticos de estresse oxidativo, no testículo, são demonstrados na figura 5. A atividade da catalase (CAT) é reduzida em todos os grupos, sendo significativa apenas na maior dose (60 mg/kg/dia) (FIGURA 5A). Já para a superóxido dismutase (SOD) é possível notar um aumento

significativo da atividade no grupo de 15 mg/kg/dia (FIGURA 5B). A enzima glutathiona peroxidase (GPx) não sofreu alterações significativas (FIGURA 5C). Entretanto, a glutathiona dissulfeto redutase (GR) teve sua atividade reduzida na dose de 15 mg/kg/dia (FIGURA 5D). Em contrapartida, a glutathiona S-transferase (GST), enzima de metabolização de fase II, apresentou um aumento significativo de atividade nas doses de 15 e 30 mg/kg/dia (FIGURA 5E). Além disso, para os marcadores não enzimáticos é possível notar que há um decréscimo dose dependente dos níveis testiculares de tióis não proteicos (TNP), nas doses de 30 e 60 mg/kg/dia, e um aumento significativo no nível de peroxidação lipídica (LPO) no tratamento com 60 mg/kg/dia (FIGURA 5F e G, respectivamente).

O sistema de defesa antioxidante da vesícula seminal foi afetado de maneira branda em comparação com o testículo. Dentre os marcadores enzimáticos não foi observada diferença significativa na atividade da CAT (FIGURA 6A) quando comparado com o grupo controle. Contudo, houve um aumento e redução na atividade da SOD nas doses de 30 e 60 mg/kg/dia, respectivamente (FIGURA 6B). A dose de 60 mg/kg/dia promoveu um aumento da atividade GPx (FIGURA 6C), enquanto para a GR nenhum dos tratamentos foi capaz de causar alterações (FIGURA 6D). Porém, houve redução significativa na atividade da GST (FIGURA 6E) na dose de 30 mg/kg/dia. Além disso, não foram observadas diferenças significativas para os marcadores não enzimáticos (TNP e LPO) em todas as doses testadas (FIGURA 6F e G, respectivamente), apesar de um aumento na concentração de TNP na dose de 60 mg/kg/dia.

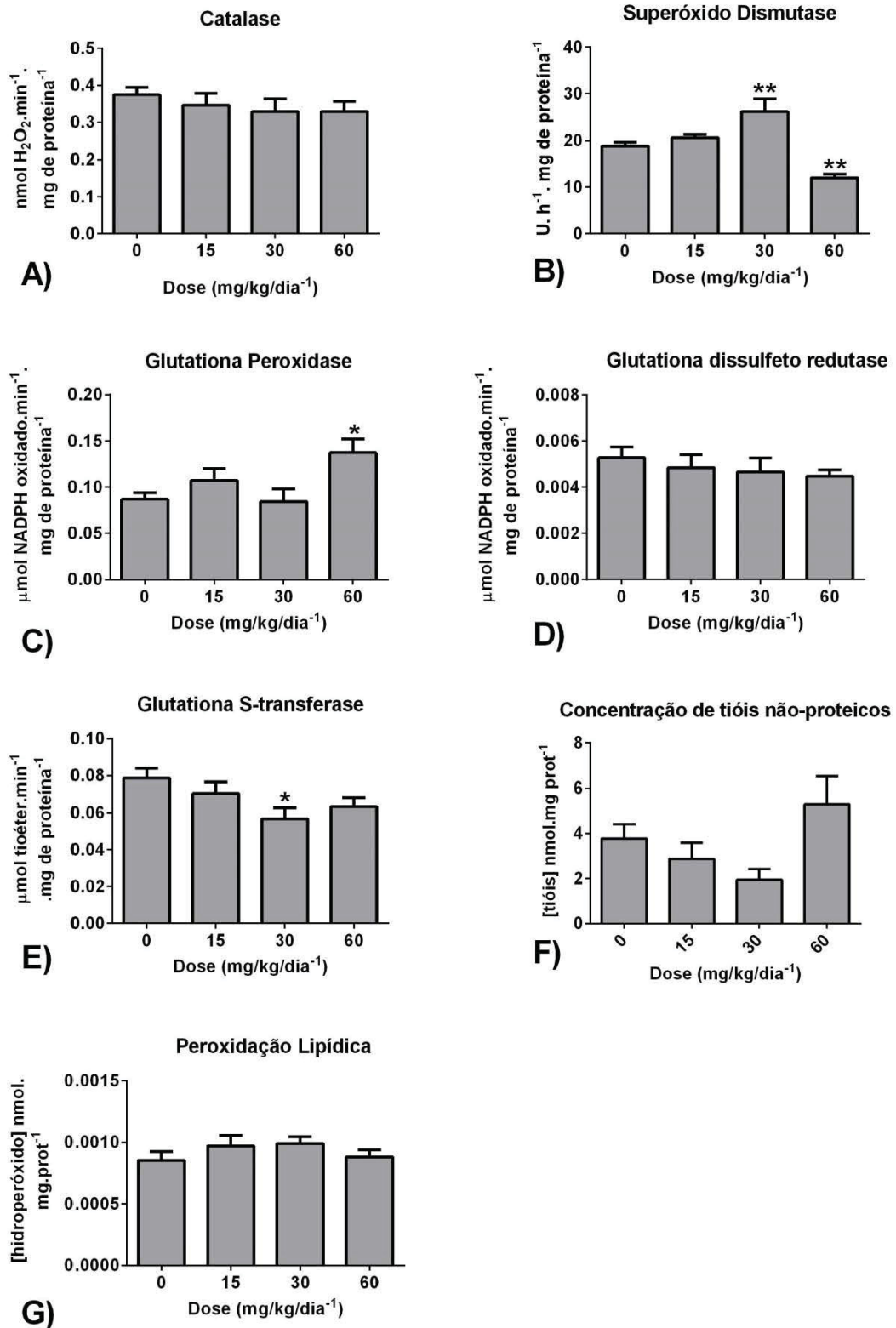
O hipotálamo não sofreu redução de atividade nas enzimas CAT e SOD (FIGURA 7A-B), respectivamente, sendo observado o efeito oposto para a GST, nas doses de 30 e 60 mg/kg/dia (FIGURA 7C). Além disso, os níveis de TNP também não sofreram alterações nos diferentes grupos (FIGURA 7D). Por fim, nota-se que em todas as doses testadas há uma redução similar na atividade da acetilcolinesterase (AChE), sendo os grupos de 15 e 30 mg/kg/dia estatisticamente significantes (FIGURA 7E).

FIGURA 5 – BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO - TESTÍCULO



A) Catalase (CAT); B) Superóxido dismutase (SOD); C) Glutaciona peroxidase (GPx); D) Glutaciona dissulfeto redutase (GR); E) Glutaciona S-transferase (GST); F) Concentração de tióis não proteicos (TNP); G) Peroxidação lipídica (LPO). n = 10. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,001; \*\*\* = p < 0,0001 (ANOVA teste *post hoc* Dunnet). Barra: erro padrão. FONTE: o autor (2018)

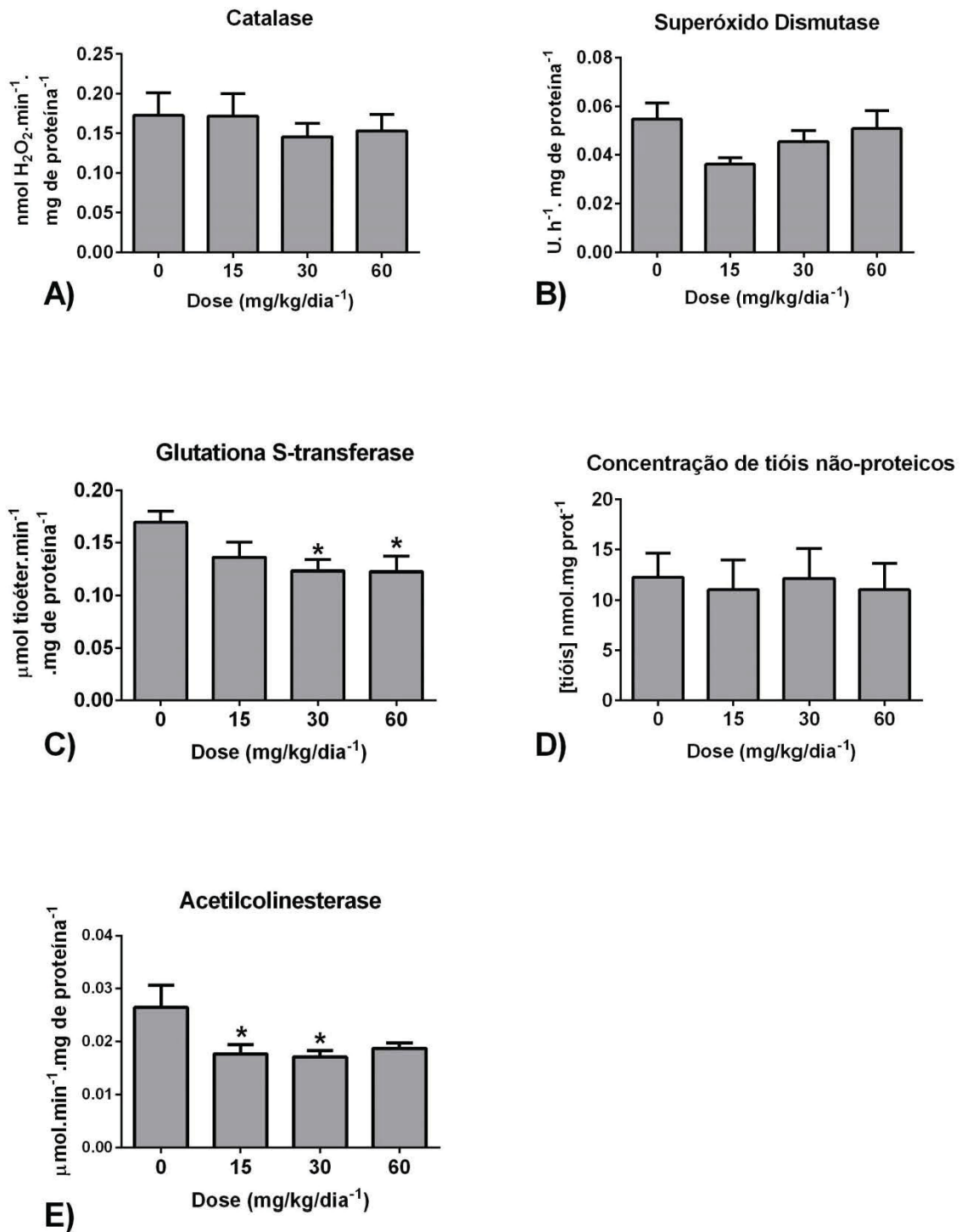
FIGURA 6 – BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO – VESÍCULA SEMINAL



A) Catalase (CAT); B) Superóxido dismutase (SOD); C) Glutationa peroxidase (GPx); D) Glutationa dissulfeto redutase (GR); E) Glutationa S-transferase (GST); F) Concentração de tiois não proteicos (TNP); G) Peroxidação lipídica (LPO). n = 10. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,001 (ANOVA teste *post hoc* Dunnet). Barra: erro padrão. FONTE: o autor (2018)



FIGURA 7 – BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO – HIPOTÁLAMO



A) Catalase (CAT); B) Superóxido dismutase (SOD); C) Glutathiona S-transferase (GST); D) Concentração de tióis não proteicos (TNP); E) Acetilcolinesterase (AChE). n = 10. \* = p < 0,05 (ANOVA teste *post hoc* Dunnet). Barra: erro padrão. FONTE: o autor (2018)

### 3.5) RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (RIB)

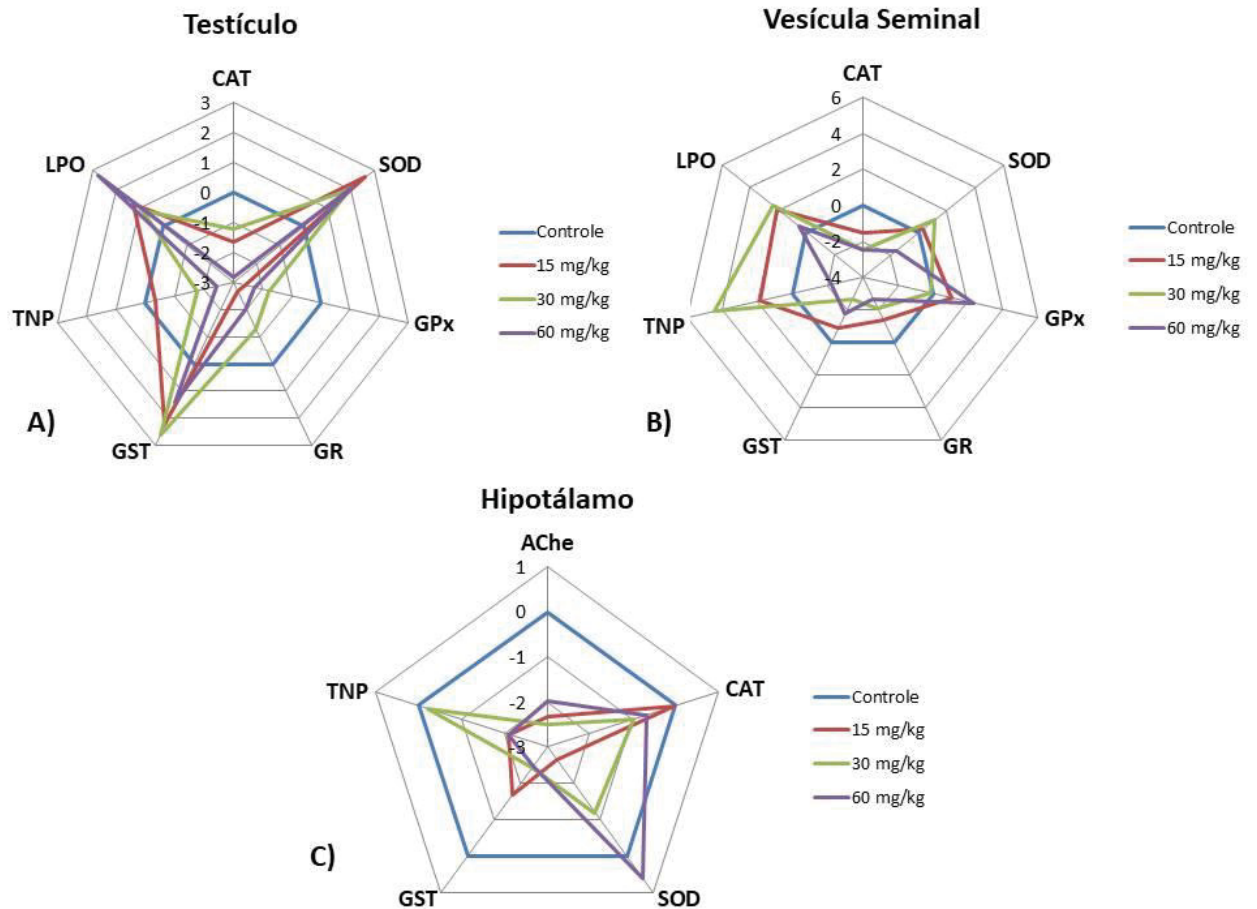
Os dados obtidos para o índice RIB são apresentados na tabela 2. Ao analisar os diferentes órgãos é possível notar que os maiores valores estão concentrados no testículo, nas doses de 15 e 60 mg/kg/dia. A vesícula seminal também apresenta valores mais altos para as doses de 30 e 60 mg/kg/dia.

Em contrapartida, o hipotálamo possui valores reduzidos quando comparado com os outros dois órgãos utilizados nas análises, devido ao menor número de biomarcadores avaliados. Contudo, nota-se que a dose de 15 mg/kg/dia possui um maior índice RIB quando comparada com as demais doses, neste órgão. Além disso, a partir do somatório dos resultados individuais de cada órgão foi possível notar que há um aumento do índice RIB em relação à concentração da dose utilizada. O modo como os diferentes tratamentos utilizados afetam a dinâmica de indução e supressão dos biomarcadores, para cada órgão, é demonstrada na figura 8.

TABELA 2 – VALORES DO ÍNDICE RIB

<b>Dose (mg/kg/dia)</b>	<b>Testículo</b>	<b>Vesícula Seminal</b>	<b>Hipotálamo</b>	<b>Σ (soma)</b>
<b>0</b>	0	0	0	0
<b>15</b>	13,38	9,05	8,77	31,2
<b>30</b>	11,47	15,28	7,32	34,07
<b>60</b>	15,76	13,6	7,7	37,06

FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA E INTEGRADA DOS BIOMARCADORES ANALISADOS



A) Testículo; B) Vesícula Seminal; C) Hipotálamo. O gráfico demonstra a oscilação dos biomarcadores nos grupos tratados em relação ao grupo controle (linha base – azul). A área abaixo do zero indica redução do biomarcador, enquanto os valores acima do zero indicam indução do biomarcador. CAT: Catalase; SOD: Superóxido dismutase; GPx: Glutathione peroxidase; GR: Glutathione reductase; GST: Glutathione S-transferase; TNP: Tióis não proteicos; LPO: Peroxidação lipídica. FONTE: o autor (2018)

#### 4) DISCUSSÃO

Existe uma ampla variedade de efeitos benéficos de diversos metais sobre o sistema reprodutor masculino (JUYENA; STELLETTA, 2012). Entretanto, estudos experimentais e epidemiológicos demonstraram que a exposição a estes elementos, como o Mn, em determinadas concentrações, pode levar a disfunções reprodutivas, como alterações na qualidade espermática e morfofisiologia testicular (CHANDEL; JAIN, 2014; ANGELIS et al., 2017; WANG et al., 2016; WANG et al., 2017; WIRTH et al., 2007).

Ponnappakkan et al. (2003) demonstraram que o Mn, isolado, nas doses de 15 e 30 mg/kg/dia não influenciam no peso de camundongos CD-1. Em contrapartida, nossos resultados mostraram uma redução de peso nos animais que receberam as mesmas doses citadas anteriormente corroborando Adedara et al. (2017a), ao realizar uma co-exposição de Mn e arsênio (As) na concentração de 30 mg/L. Isso sugere que o Mn pode ter seu efeito

tóxico potencializado no desenvolvimento corporal, de forma aditiva ou sinérgica, na presença de outros contaminantes.

Neste trabalho, as diferentes doses de Mn promoveram redução no peso de diversos órgãos, assim como observado para metais como cádmio (Cd) (CUPERTINO et al., 2017), alumínio (Al) (MOURO et al., 2018) e As em co-exposição com Mn (ADEDARA et al, 2017a). Estes dados podem indicar que o Mn atua como um potencial elemento anti-androgênico, refletindo diretamente sobre os parâmetros espermáticos e comprometendo o desempenho reprodutivo. Segundo Adedara et al. (2017a; 2017b) e Ponnappakkam et al. (2003), o Mn afeta a motilidade, concentração e produção espermática, assim como o observado para o As (LIMA et al., 2018) e o Cd (ELEAWA et al., 2014). Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com a literatura, confirmando que o Mn é capaz de modular negativamente os parâmetros espermáticos.

Após a produção, no testículo, o espermatozoide realiza o trânsito espermático para o epidídimo, onde ocorrem modificações em suas características celulares, como ganho de motilidade (FERNANDEZ et al., 2008). Este processo é regulado por uma série de fatores, entre eles os níveis de testosterona (KLINEFELTER; SUAREZ, 1997). A alteração observada no tempo de trânsito espermático após a exposição ao Mn reflete na perda de motilidade, podendo acarretar em perda do potencial reprodutivo. Logo, os dados obtidos a partir da análise espermática podem ser correlacionados com um déficit funcional do epidídimo, dada a redução do seu peso após o tratamento com Mn. Considerando que o desenvolvimento espermático é dependente de testosterona, não foram observadas alterações significativas nas concentrações séricas desse hormônio no presente estudo. Possivelmente, a ausência de efeitos significativos, nas diferentes doses, possa estar relacionada com uma resposta compensatória, para amenizar os danos promovidos pela exposição crônica a altas doses de Mn. Além disso, a amostragem pontual também pode ser considerada um problema, devido a grande variação das medidas hormonais.

As células de Leydig, localizadas no espaço intertubular do testículo, são as responsáveis pela síntese de hormônios andrógenos através da via esteroidogênica. Estas células apresentam diversas fases de diferenciação durante o desenvolvimento pós-natal (CHEN et al., 2009; CHEN et al., 2017). Ao observar o efeito do Mn sobre a modulação dos metabólitos androgênicos fecais (MAF), ao longo do experimento, é possível perceber que com 14 dias de exposição os animais tratados apresentam uma redução significativa em relação ao grupo controle. Este período coincide com a fase em que as ILCs (*Immature Leydig Cells*) se encontram em proliferação (28-56 dias pós-natal). Portanto, a diferença na concentração de MAF encontrada nos animais expostos no dia de tratamento 14 (dia pós-natal 36) pode indicar alguma disfunção fisiológica deste tipo celular, comprometendo a sua maturação e o desenvolvimento do sistema reprodutor. Assim como o Cd (TIAN et al.,

2018), o Mn é capaz de interferir na via esteroidogênica reduzindo os níveis de enzimas importantes para este processo, como a  $3\beta$ -HSD e a proteína StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory*) (CHENG et al., 2003; 2005).

A produção de hormônios sexuais é regulada pelo hipotálamo, através do hormônio liberados de gonadotrofina (GnRH), promovendo a liberação de gonadotrofinas, LH e FSH, pela hipófise (MUSUMECI et al., 2015). Sabe-se que o Mn é um elemento neurotóxico capaz de provocar estresse oxidativo no sistema nervoso através da oxidação da dopamina (TARALE et al., 2016). Neste estudo, a condição redox do hipotálamo foi alterada após a exposição ao Mn, causando redução na atividade enzimática da GST, corroborando Adedara et al. (2017a) ao analisar esta enzima no cérebro de ratos. De acordo com Okada et al. (2016), este metal também é capaz de alterar a atividade enzimática da AChE no cérebro, o que pode causar uma hiperestimulação neuronal e problemas patológicos através de neurodegeneração e estresse oxidativo (BOELSTERLI, 2007; MILATOVIC et al., 2006). Resultados similares foram encontrados no presente estudo, confirmando o efeito neurotóxico do Mn, ao reduzir a atividade da AChE no hipotálamo. Além disso, a desregulação do sistema colinérgico pode causar disfunções endócrinas, devido ao comprometimento das redes neurais desta região. Portanto, a homeostase do eixo hipotálamo-gonadal é alterada, causando a redução de liberação de GnRH, como observado em animais tratados com As (BOURGUIGNON et al., 2017). Logo, os níveis no organismo de gonadotrofinas podem ser reduzidos após o tratamento com Mn (ADEDARA et al., 2017a; 2017b) afetando, conseqüentemente, a produção de testosterona. Sendo assim, a partir desta análise é possível estabelecer potenciais rotas pelas quais o Mn pode afetar os caracteres reprodutivos, através da desregulação do eixo hipotálamo-gonadal, alterando o peso de órgãos andrógeno-dependentes e as características de motilidade e produção espermática.

Outra via pela qual o Mn pode afetar o sistema reprodutor é através da sua característica pró-oxidante. No testículo, a atividade da enzima CAT e SOD foi, respectivamente, reduzida e aumentada. Sendo assim, a SOD sofreu uma estimulação para eliminar radicais superóxidos ( $\bullet\text{O}^{2-}$ ), porém a redução na atividade da CAT afeta a detoxificação do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), produto gerado pela ação metabolizadora da SOD. Nesta condição, a eliminação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fica a cargo da GPx, a qual não apresentou alteração significativa em sua atividade. No entanto, com a baixa capacidade de eliminação das EROs, pela CAT, o nível celular de  $\text{H}_2\text{O}_2$  provavelmente será elevado. A partir disso, pode ocorrer o aumento da reação de Fenton, que utiliza  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^+$  para formar radicais hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ), que são altamente reativos (AGARWAL; PRABAKARAM, 2005). De acordo com Huang et al. (2012), as formas biologicamente utilizadas do Mn,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{3+}$ , também podem participar da reação de Fenton e gerar radicais  $\bullet\text{O}^{2-}$  e  $\bullet\text{OH}$  através da interação com

O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Entretanto, na vesícula seminal, a atividade da CAT não foi afetada significativamente. Porém, nota-se alterações controversas na atividade da SOD e um aumento significativo da atividade da GPx na dose de 60 mg/kg/dia. Possivelmente, diferente do encontrado para o testículo, neste órgão os danos oxidativos podem ser gerados através de outros tipos radicais.

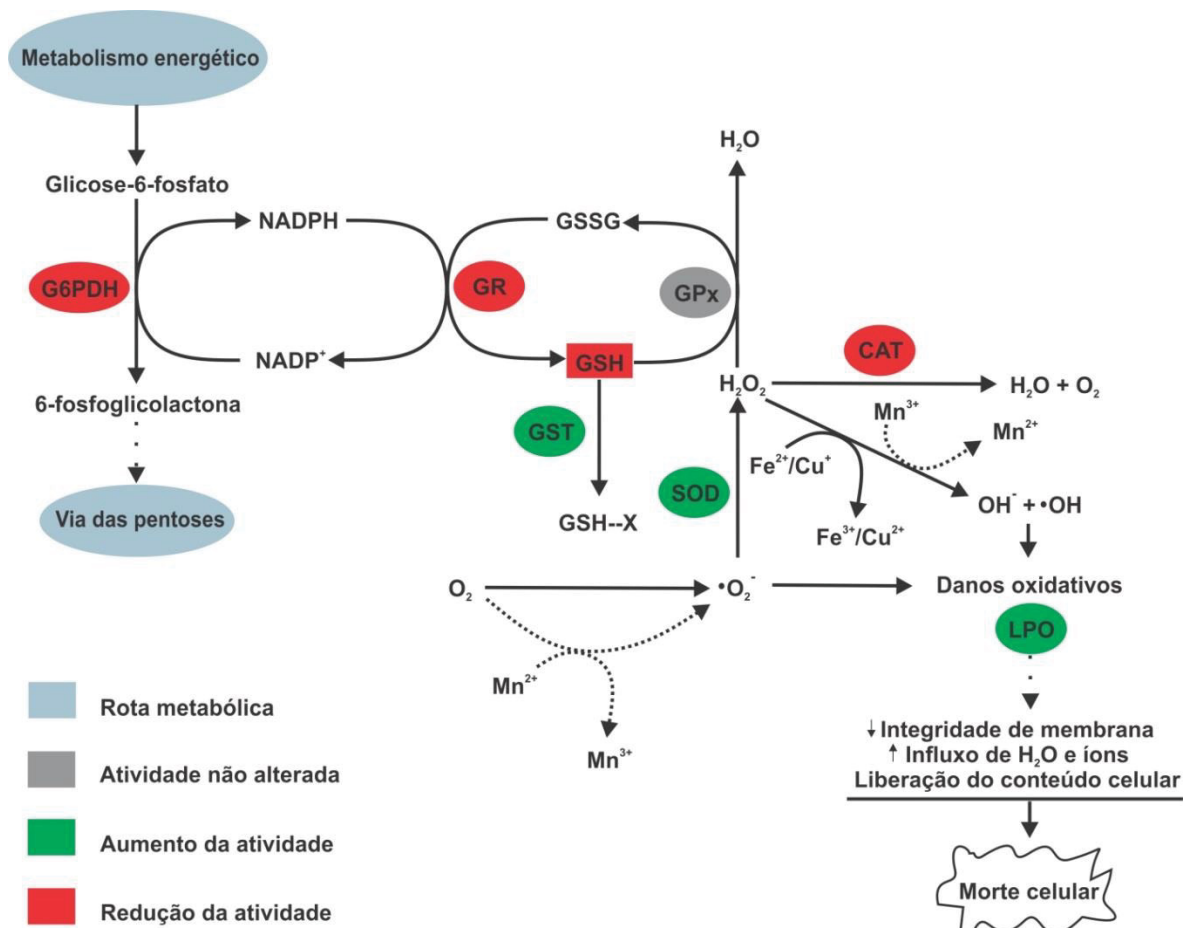
A atividade da GST, enzima de fase II na metabolização de xenobióticos, foi aumentada no testículo. Esta enzima utiliza a glutathiona reduzida (GSH), o principal tipo TNP, para tornar metabólitos tóxicos mais solúveis (HUBER et al., 2008). Devido ao aumento da atividade da GST testicular é possível perceber uma redução dose dependente dos níveis de TNP neste órgão. O contraste entre estes biomarcadores indica um aumento na defesa antioxidante, na tentativa de minimizar danos promovidos pela exposição ao Mn. Por outra via, talvez este sistema de defesa, através do aumento da GST, não esteja sendo totalmente eficaz devido a baixa taxa de reciclagem de GSH. Esta observação é feita baseada na redução da atividade da GR, uma enzima responsável por catalisar a redução da glutathiona oxidada (GSSG), utilizada pela GPx ou GST, em GSH (HUBER et al., 2008). Uma possível explicação para a redução da atividade da GR pode estar relacionada com o decréscimo dos níveis celulares de NADPH, por meio da baixa atividade metabólica da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Esta enzima, apesar de não ter sido avaliada no presente trabalho, é responsável por reciclar o NADP<sup>+</sup>, gerado pela atividade da GR, em NADPH (LUSHCHAK, 2012). Possivelmente, com o decréscimo da atividade da GR e a baixa disponibilidade de NADPH não seria possível reestabelecer os níveis adequados de GSH, interferindo diretamente na atividade da GST e GPx. Além disso, assim como o Cd e o Pb (ANGELIS et al., 2017; JAN et al., 2015), talvez o Mn também tenha afinidade pelo grupamento sulfidril da GSH, promovendo danos oxidativos através do distúrbio na razão celular de GSH/GSSG.

Desta forma, substâncias geradas durante a LPO, através da disfunção da defesa antioxidante, não serão neutralizadas e provocarão diversos danos celulares, justificando o aumento significativo deste biomarcador, como observado no testículo na dose de 60 mg/kg/dia. Com o aumento da produção de hidroperóxidos, por meio do aumento de estresse oxidativo, ocorrem mudanças estruturais na membrana plasmática das células e alterando a sua integridade, podem causar efeitos como a redução da motilidade espermática (AGARWAL; PRABAKARAN, 2005; ANGELIS et al., 2017; HUANG et al., 2012). A partir da análise do status redox do testículo, após o tratamento com Mn, o possível mecanismo de interferência na defesa antioxidante é demonstrado na figura 9. Entretanto, para a vesícula seminal, a relação entre todos os biomarcadores de estresse oxidativo não é tão clara. Além disso, ao realizar a análise do índice RIB, foi possível notar que as diferentes doses utilizadas no presente estudo afetam o mesmo órgão de maneira quase homogênea

na variação dos biomarcadores. Porém, ao comparar entre os diferentes órgãos, é possível inferir que o testículo é mais suscetível às variações bioquímicas por meio do tratamento com o Mn. Assim, essa maior alteração da dinâmica do ambiente redox testicular compromete a espermatogênese e ocasiona em disfunções espermáticas, como avaliado no presente estudo.

A partir deste trabalho foi possível concluir que a exposição ao Mn pode acarretar diversas alterações dos aspectos reprodutivos de camundongos Swiss. Os parâmetros espermáticos foram os mais afetados, em especial a motilidade e produção espermática. As diferentes vias pelas quais o Mn pode afetar o processo espermatogênico também foram avaliadas, sendo a interferência na esteroidogênese e a alteração do status redox do sistema reprodutor masculino e complexo hipotálamo-gonadal as principais causas apontadas.

FIGURA 9 – AÇÃO DO Mn NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE TESTICULAR



As setas pontilhadas indicam as reações em que podem ocorrer a participação do Mn. FONTE: o autor (2019)

## 5) REFERÊNCIAS

- ADEDARA, I. A.; ABOLAJI, A. O.; AWOGBINDIN, I. O.; FAROMBI, E. O. Suppression of the brain-pituitary-testicular axis function following acute arsenic and manganese co-exposure and withdrawal in rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 39, p. 21-29, 2017a.
- ADEDARA, I. A.; SUBAIR, T. I.; EGO, V. C.; OYEDIRAN, O.; FAROMBI, E. O. Chemoprotective role of quercetin in manganese-induced toxicity along the brain-pituitary-testicular axis in rats. **Chemico-biological interactions**, v. 263, p. 88-98, 2017b.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p.121-126, 1984.
- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 43, p. 963-974, 2005.
- ANDRADE, A. J.; GRANDE, S. W.; TALSNESS, C. E.; GERICKE, C.; GROTE, K.; GOLOMBIEWSKI, A.; STERNER-KOCK, A.; CHAHOUD, I. A dose response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): reproductive effects on adult male offspring rats. **Toxicology**, v. 228, n. 1, p. 85-97, 2006.
- ANGELIS, C.; GLADIERO, M.; PIVONELLO, C.; SALZANO, C.; GIANFRILLI, D.; PISCITELLI, P.; LENZI, A.; COLAO, A.; PIVONELLO, R. The environment and male reproduction: The effect of cadmium exposure on reproductive function and its implication in fertility. **Reproductive Toxicology**, v. 73, p. 105-127, 2017.
- ASCHNER, J. L.; ASCHNER, M. Nutritional aspects of manganese homeostasis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 4–5, p. 353–362, 2005.
- ASCHNER, M.; VRANA, K.E.; ZHANG, W. Manganese uptake and distribution in the central nervous system (cns). **Neurotoxicology**, v. 20, p. 173–180. 1999.
- BARCELOUX, D. G. Manganese. **Clinical Toxicology**, v. 37, n. 2, p. 293-307. 1999.
- BELIAEFF, B.; BURGEOT, T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 1316-1322, 2002.
- BOELSTERLI, U. A. **Mechanistic toxicology: the molecular basis of how chemicals disrupt biological targets**. CRC Press, 2007.
- BOTELHO, G. G.; BUFALO, A. C.; BOARETO, A. C.; MULLER, J. C.; MORAIS, R. N.; MARTINO-ANDRADE, A. J.; LEMOS, K. R.; DALSENTER, P. R. Vitamin C and resveratrol supplementation to rat dams treated with di (2-ethylhexyl) phthalate: impact on reproductive and oxidative stress end points in male offspring. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 57, n. 4, p. 785-793, 2009.
- BOURGUIGNON, N. S.; BONAVENTURA, M. M.; RODRÍGUEZ, D.; BIZZOZZERO, M.; VENTURA, C.; NUÑEZ, M.; LUX-LANTOS, V. A.; LIBERTUN, C. Evaluation of sodium arsenite exposure on reproductive competence in pregnant and postlactational dams and their offspring. **Reproductive Toxicology**, v. 69, p. 1-12, 2017.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.



BROWN, J.; WALKER, S.; STEINMAN, K. Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species. **Endocrine Research Laboratory, Department of Reproductive Sciences, Conservation and Research Center, National Zoological Park, Smithsonian Institution, Handbook**, p. 1-93, 2004.

CUPERTINO, M. C.; NOVAES, R. D.; SANTOS, E. C.; NEVES, A. C.; SILVA, E.; OLIVEIRA, J. A.; MATTA, S. L. Differential Susceptibility of Germ and Leydig Cells to Cadmium-Mediated Toxicity: Impact on Testis Structure, Adiponectin Levels, and Steroidogenesis. **Oxidative medicine and cellular longevity**, p. 1-11, 2017.

CHANDEL, M.; JAIN, G. Toxic effects of transition metals on male reproductive system: A review. **Journal of Environmental and Occupational Science**, v. 3, n. 4, p. 1, 2014.

CHEN, H.; GE, R. S.; ZIRKIN, B. R. Leydig cells: from stem cells to aging. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 306, n. 1-2, p. 9-16, 2009.

CHEN, H.; WANG, Y.; GE, R.; ZIRKIN, B. R. Leydig cell stem cells: identification, proliferation and differentiation. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 445, p. 65-73, 2017.

CHENG, J.; FU, J. L.; ZHOU, Z. C. The inhibitory effects of manganese on steroidogenesis in rat primary Leydig cells by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Toxicology**, v. 187, n. 2-3, p. 139-148, 2003.

CHENG, J.; FU, J. L.; ZHOU, Z. C. The mechanism of manganese-induced inhibition of steroidogenesis in rat primary Leydig cells. **Toxicology**, v. 211, n. 1-2, p. 1-11, 2005.

CROUCH, R.K.; GANDY, S.C.; KIMSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 30, p. 235-241, 1981.

ELEAWA, S. M.; ALKHATEEB, M. A.; ALHASHHEM, F. H.; BIN-JALIAH, I.; SAKR, H. F.; ELREFAEY, H. M.; ELKARIB, A. O.; ALESSA, R. M.; HAIDARA, M. A.; SHATOOR, A. S.; KHALIL, M. A. Resveratrol reverses cadmium chloride-induced testicular damage and subfertility by downregulating p53 and Bax and upregulating gonadotropins and Bcl-2 gene expression. **Journal of reproduction and development**, v. 60, n. 2, p. 115-127, 2014.

ELLMANN, G.L.; COUTNEY, K.O.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M.A. New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** v. 7, p. 88-95, 1961.

FERNANDEZ, C. D. B.; PORTO, E. M.; ARENA, A. C.; KEMPINAS, W. D. G. Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. **International journal of andrology**, v. 31, n. 4, p. 427-437, 2008.

FRAGA, C. G. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 4-5, p. 235-244, 2005.

FRISBIE, S. H.; MITCHELL, E. J.; DUSTIN, H.; MAYNARD, D. M.; SARKAR, B. World health organization discontinues its drinking-water guideline for manganese. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 6, p. 775-778, 2012.

FRISBIE, S. H.; MITCHELL, E. J.; SARKAR, B. Urgent need to reevaluate the latest World Health Organization guidelines for toxic inorganic substances in drinking water. **Environmental health : a global access science source**, v. 14, n. 1, p. 63, 2015.

GE, X. WANG, F.; ZHONG, Y.; LV, Y.; JIANG, C.; ZHOU, Y.; LI, D.; XIA, B.; SU, C.; CHENG, H.; MA, Y.; XIONG, F.; SHEN, Y.; ZOU, Y.; YANG, X. Manganese in blood cells as an exposure biomarker in manganese-exposed workers healthy cohort. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 45, p. 41-47, 2018.

HUANG, P.; LI, G.; CHEN, C.; WANG, H.; HAN, Y.; ZHANG, S.; XIAO, Y.; ZHANG, M.; LIU, N.; CHU, J.; ZHANG, L.; SUN, Z. Differential toxicity of Mn<sup>2+</sup> and Mn<sup>3+</sup> to rat liver tissues: oxidative damage, membrane fluidity and histopathological changes. **Experimental and toxicologic pathology**, v. 64, n. 3, p. 197-203, 2012.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. D. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p.1170-1179, 2008.

IOM - Institute of Medicine. **Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc**. Washington, DC, National Academy Press. 2001.

JAN, A. AZAM, M.; SIDDIQUI, K.; ALI, A.; CHOI, I.; HAG, Q. Heavy metals and human health: mechanistic insight into toxicity and counter defense system of antioxidants. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 12, p. 29592-29630, 2015.

JIANG, Z-Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v.202, p.384-389, 1992.

JIANG, Z-Y.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, p. 853-856, 1991.

JUYENA, N. S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. **Journal of andrology**, v. 33, n. 4, p. 536-551, 2012.

KEEN, C.L, ENSUNSA, J. L, CLEGG, M. S. Manganese metabolism in animals and humans including the toxicity of manganese. **Metal Ions in Biological Systems**. v. 37, p. 89-121, 2000.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. **J. Biol. Chem.**, v.251, p.6183–6188, 1976.

KHERADMAND, A., ALIREZAEI, M., DEZFOULIAN, O. Cadmium-induced oxidative stress in rat testes: protective effects of Betaine. **International journal of peptide research and therapeutics**, v. 19, n. 4, p. 337-344, 2013.

KLINFELTER, G. R.; SUAREZ, J. D. Toxicant-induced acceleration of epididymal sperm transit: androgen-dependent proteins may be involved. **Reproductive toxicology**, v. 11, n. 4, p. 511-519, 1997.

KONO, Y. Generation of Superoxide Radical during Autoxidation of Hydroxylamine and an Assay for Superoxide-Dismutase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 186, p. 189-195, 1978.

KYJOVSKA, Z. O.; BOISEN, A. M. Z.; JACKSON, P.; WALLIN, H.; VOGEL, U.; HOUGAARD, K. S. Daily sperm production: application in studies of prenatal exposure to nanoparticles in mice. **Reproductive Toxicology**, v. 36, p. 88-97, 2013.

LIMA, G. D. A.; SERTORIO, M. N.; SOUZA, A. C. F.; MENEZES, T. P.; MOURO, V. G. S.; GONÇALVES, N. M.; OLIVEIRA, J. M.; HENRY, M.; MACHADO-NEVES, M. Fertility in male rats: Disentangling adverse effects of arsenic compounds. **Reproductive Toxicology**, v. 78, p. 130-140, 2018.

LIU, X. F.; ZHANG, L. M.; ZHANG, Z.; LIU, N.; XU, S. W.; LIN, H. J. Manganese-induced effects on testicular trace element levels and crucial hormonal parameters of Hyline cocks. **Biological trace element research**, v. 151, n. 2, p. 217-224, 2013.

LUSHCHAK, V. I. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. **Journal of amino acids**, v. 2012, p. 1-26, 2012

MARTINEZ-FINLEY, E. J.; GAVIN, C. E.; ASCHNER, M.; GUNTER, T. E. Manganese neurotoxicity and the role of reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 65-75, 2013.

MILATOVIC, D.; GUPTA, R. C.; ASCHNER, M. Anticholinesterase toxicity and oxidative stress. **The Scientific World Journal**, v. 6, p. 295-310, 2006.

MURAWSKA-CIALOWICZ, E., BAL, W., JANUSZEWSKA, L., ZAWADZKI, M., RYCHEL, J., ZUWALA-JAGIELLO, J. Oxidative stress level in the testes of mice and ratas during nickel intoxication. **Scientific world journal**, v. 2012, p. 1-5, 2012.

MUSUMECI, G.; CASTORINA, S.; CASTROGIOVANNI, P.; LORETO, C.; LEONARDI, R.; AIELLO, F. C.; MAGRO, G.; IMBESI, R. A journey through the pituitary gland: Development, structure and function, with emphasis on embryo-foetal and later development. **Acta histochemica**, v. 117, n. 4-5, p. 355-366, 2015.

MOURO, V. G. S.; MENEZES, T. P.; LIMA, G. D.; DOMINGUES, R. R.; SOUZA, A. C. F.; OLIVEIRA, J. A.; MATTA, S. L. P.; MACHADO-NEVES, M. How Bad Is Aluminum Exposure to Reproductive Parameters in Rats? **Biological trace element research**, v. 183, n. 2, p. 314-324, 2018.

O'NEAL, S. L.; ZHENG, W. Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review. **Current environmental health reports**, v. 2, n. 3, p. 315-328, 2015.

OAKBERG, E. F. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. **Developmental Dynamics**, v. 99, n. 3, p. 507-516, 1956.

OKADA, M. A.; FILIPAK NETO, F.; NOSO, C. H.; VOIGT, C. L.; CAMPOS, S. X.; RIBEIRO, C. A. de O. Brain effects of manganese exposure in mice pups during prenatal and breastfeeding periods. **Neurochemistry International**, v. 97, p. 109-116, 2016.

PATRICIO, A.; CRUZ, D. F.; SILVA, J. V.; PADRÃO, A.; CORRERIA, B. R.; KORRODI-GREGÓRIO, L.; FERREIRA, R.; MAIA, N.; ALMEIDA, S.; LOURENÇO, J.; SILVA, V.; FARDILHA, M. Relation between seminal quality and oxidative balance in sperm cells. **Acta Urologica Portuguesa**, v. 33, n. 1, p. 6-15, 2016.

PONNAPAKKAM, T. P.; BAILEY, K. S.; GRAVES, K. A.; ISZARD, M. B. Assessment of male reproductive system in the CD-1 mice following oral manganese exposure. **Reproductive Toxicology**, v. 17, n. 5, p. 547-551, 2003.

RAHMAN, S. M.; KIPPLER, M.; AHMED, S.; PALM, B.; EI ARIFEEN, S.; VAHTER, M. Manganese exposure through drinking water during pregnancy and size at birth: A prospective cohort study. **Reproductive Toxicology**, v. 53, p. 68-74, 2015.

SANCHEZ, W.; BURGEOT, T.; PORCHER, J. M. A novel "Integrated Biomarker Response" calculation based on reference deviation concept. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 5, p. 2721-2725, 2013.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v.25, p.192-205, 1968.

SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Letters**, v.103, p.287-290, 1979.

TARALE, P.; CHAKRABARTI, T.; SIVANESAN, S; NAOGHARE, P.; BAFANA, A.; KRISHNAMURTHI, K. Potential role of epigenetic mechanism in manganese induced neurotoxicity. **BioMed research international**, v. 2016, n. 2016, p. 1-18, 2016.

TIAN, H.; CHEN, S.; LENG, Y.; LI, T.; LI, Z.; CHENG, H.; ZHANG, Q. Exposure to cadmium during gestation and lactation affects development and function of Leydig cells in male offspring. **Environmental toxicology**, v. 33, n. 3, p. 351-360, 2018.

TURNER, T. T., LYSIAK, J. J. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. **Journal of andrology**, v. 29, n. 5, p. 488-498, 2008.

WAGNER, H.; CHENG, J. W.; KO, E. Y. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. **Arab journal of urology**, v. 16, n. 1, p. 35-43, 2018.

WANG, Y. X.; SUN, Y.; HUANG, Z.; WANG, P.; FENG, W.; LI, J.; YANG, P.; WANG, M.; SUN, L.; CHEN, Y. J.; LIUC.; YUE, J.; GU, L. J.; ZENG, Q.; LU, W. Q. Associations of urinary metal levels with serum hormones, spermatozoa apoptosis and sperm DNA damage in a Chinese population. **Environment International**, v. 94, p. 177-188, 2016.

WANG, Y. X.; WANG, P.; FENG, W.; LIU, C.; YANG, P.; CHEN, Y. J.; SUN, L.; SUN, Y.; YUE, J.; GU, L. J.; ZENG, Q.; LU, W. Q. Relationships between seminal plasma metals/metalloids and semen quality, sperm apoptosis and DNA integrity. **Environmental Pollution**, p. 1-11, 2017.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 325-333, 1981.

WHO (World Health Organization). **Manganese in Drinking-water. Background document for development of WHO guidelines for drinking water quality**. 4<sup>th</sup> ed., Geneva, p. 1-21, 2011.

WHO (World Health Organization). **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**. 5<sup>th</sup> ed, Switzerland, 2010.

WIRTH, J. J.; MIJAL, R. S. Adverse effects of low level heavy metal exposure on male reproductive function. **Systems biology in reproductive medicine**, v. 56, n. 2, p. 147-167, 2010.

WIRTH, J. J.; ROSSANO, M. G.; DALY, D. C.; PANETH, N.; PUSCHECK, E.; POTTER, R. C.; DIAMOND, M. P. Ambient manganese exposure is negatively associated with human sperm motility and concentration. **Epidemiology**, v. 18, n. 2, p. 270-273, 2007.

ZENG, Q.; FENG, W.; ZHOU, B.; WANG, Y. X.; HE, X. S.; YANG, P.; YUE, J.; LI, Y. F.; LU, W. Q. Urinary metal concentrations in relation to semen quality: a cross-sectional study in China. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 8, p. 5052-5059, 2015.

### **CAPÍTULO III**

Efeito de diferentes doses de manganês sobre a morfologia testicular de camundongos Swiss após múltiplas formas de exposição: um estudo comparativo

## RESUMO

O manganês (Mn), apesar de ser um elemento traço essencial que possui grande importância para o metabolismo corporal, também pode ocasionar danos aos sistemas orgânicos. Embora inúmeros trabalhos constatarem a neurotoxicidade do Mn, os dados sobre o efeito desse metal no sistema reprodutor masculino são muito limitados, principalmente utilizando concentrações realistas. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição do Mn, sob variadas formas e doses, na morfologia testicular de camundongos Swiss. Foram conduzidos três experimentos: I) exposição direta a doses realistas (0,013; 0,13 e 1,3 mg/kg/dia de  $MnCl_2$ ), relevantes para humanos; II) exposição parental e direta, nas mesmas doses do experimento I, onde os animais foram expostos durante o desenvolvimento intrauterino e de lactação até a maturidade reprodutiva; III) exposição direta a altas doses (15; 30 e 60 mg/kg/dia de  $MnCl_2$ ). Foram avaliados parâmetros biométricos, histopatológicos, histomorfométricos e estereológicos do testículo, além da morfologia espermática. Apesar dos resultados mostrarem que o Mn não interfere na biometria corporal, foi encontrado um menor número de túbulos seminíferos com morfologia normal em todas as condições experimentais testadas. Além disso, houve aumento da proporção volumétrica e volume do compartimento tubular nos animais tratados, bem como redução no diâmetro tubular. Esses resultados podem ser correlacionados com falhas na função do testículo, culminando no aumento do número de espermatozoides com morfologia alterada, em especial na exposição direta a altas doses (experimento III). Ao avaliar o índice de resposta integrada de biomarcadores (RIB) foi possível concluir que a exposição parental e direta (experimento II) tem um efeito negativo mais expressivo na morfologia testicular devido a exposição desse metal a períodos sensíveis do desenvolvimento dos animais. De forma geral, os dados obtidos sugerem que o Mn tem o potencial de alterar os parâmetros morfológicos do testículo, influenciando a espermatogênese em camundongos.

Palavras-Chave: toxicologia reprodutiva, histopatologia, morfometria, reprodução.

## 1) INTRODUÇÃO

Há uma crescente preocupação com o aumento de processos industriais e a influência da atividade antrópica sobre o ambiente devido às alterações nos níveis de compostos potencialmente tóxicos à saúde humana. Dentre estes, destacam-se os metais pesados como arsênio (As), chumbo (Pb), cádmio (Pb) e mercúrio (Hg). Estes elementos não possuem funções fisiológicas conhecidas e podem bioacumular em diversos sistemas orgânicos, promovendo uma série de disfunções fisiológicas (LIMA et al., 2018; NAGGAR et al., 2018).

Contrário aos metais pesados existem aqueles considerados essenciais, como o manganês (Mn), o qual é adquirido principalmente através da dieta e ingestão de água (WHO, 2011). Esse elemento é naturalmente distribuído ao longo de todo o globo terrestre, sendo as suas principais fontes antropogênicas derivadas da produção de defensivos agrícolas e atividades de mineração (TOBIASSEN et al., 2003; WHO, 2011). O Mn está envolvido em diversos processos metabólicos do organismo, atuando como cofator em metaloenzimas, como a Mn superóxido dismutase (Mn-SOD), sendo as formas  $Mn^{2+}$  e  $Mn^{3+}$  as mais utilizadas biologicamente (ASCHNER; ASCHNER, 2005; GERBER et al., 2002; WHO, 2004).

Entretanto, apesar de ser considerado essencial para o organismo, em determinadas condições de exposição o Mn também pode promover danos neurológicos (OKADA et al., 2016), hepáticos (HUANG et al., 2012) e reprodutivos (ADEDARA et al., 2017a; PONAPAKKAM et al., 2003). Durante o mecanismo de toxicidade do Mn um dos principais alvos é a mitocôndria (TARALE et al., 2016). Esse metal pode provocar o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), redução da produção de ATP, distúrbio na homeostase do cálcio e apoptose (CHENG et al., 2005; ERIKSON et al., 2004; MARTINEZ-FINLEY et al., 2013). Além disso, o Mn e alguns compostos derivados podem causar danos ao DNA (GERBER et al., 2002).

Sendo assim, há uma grande preocupação em relação a como os metais afetam o sistema reprodutor masculino devido aos seus efeitos tóxicos e pró-oxidantes. O Mn, assim como outros metais, altera a atividade de enzimas do sistema de defesa antioxidante e o status redox do testículo (LIMA et al., 2018; ADEDARA et al., 2017a), epidídimo (ADEDARA et al., 2017a; 2017b) e reduz a atividade esteroidogênica das células de Leydig (CHENG et al., 2003; CHENG et al., 2005). Estas modificações na fisiologia reprodutiva, promovida pela exposição aos metais, também podem se manifestar na forma de alterações histopatológicas, morfométricas e estereológicas em modelos animais (LIMA et al., 2018; ADEDARA et al., 2017a; MOURO et al., 2018). Desta forma, é possível que a exposição

exacerbada de metais, a doses acima dos valores recomendados, também possa afetar os aspectos reprodutivos e espermáticos em humanos.

Tem-se observado uma queda considerável na qualidade seminal do homem nos últimos anos (LEVINE et al., 2017), além da associação negativa de metais pesados e essenciais com alguns parâmetros espermáticos, como motilidade (WANG et al., 2016; WANG et al., 2017; WIRTH et al., 2007). Sendo assim, se faz necessário investigar quais os potenciais danos promovidos pela exposição a metais e xenobióticos sobre a reprodução masculina. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a morfologia testicular e espermática de camundongos após a exposição a diferentes doses de Mn sob múltiplas formas de exposição.

## 2) MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1) DESENHO EXPERIMENTAL

Os experimentos I e II foram aprovados pelo Comitê de Ética de Utilização de Animais (CEUA/BIO), sob o parecer número 1015/2016 e o experimento III sob o parecer 1085/2017.

#### 2.1.1) Experimento I – Exposição direta em baixas concentrações

Foram utilizados 20 camundongos machos da linhagem Swiss, com idade entre 6-8 semanas, provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em 4 grupos (n=5) em caixas de polipropileno com temperatura ( $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo (12/12 horas, claro e escuro) controlados, sendo a ração e água fornecidas *ad libidum*. Os grupos foram expostos, via gavagem diária, ao cloreto de manganês ( $\text{MnCl}_2$  - Sigma-Aldrich®) na doses de 0 (controle), 0,013, 0,13 e 1,3 mg/kg/dia durante 60 dias. A dose intermediária (0,13 mg/kg/dia) utilizada no trabalho corresponde aproximadamente ao valor baseado na ingestão diária recomendada pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011) pela dieta, via alimentação e água, para um indivíduo adulto de 70kg (0,017 mg/kg/dia). A partir deste valor foi realizado o cálculo alométrico para conversão equivalente da dose, ajustando para o metabolismo do organismo modelo utilizado. Sendo assim, este experimento teve como principal objetivo avaliar o efeito da exposição direta de baixas doses de Mn a indivíduos adultos.

Concomitantemente a exposição dos machos, 40 fêmeas também foram expostas durante 60 dias, nas mesmas doses. Ao término do período de tratamento os animais foram divididos em caixas, na proporção de 1:2 (macho: fêmea) correspondente ao seu grupo, por 7 dias, para cópula e obtenção dos animais utilizados no experimento II.



### 2.1.2) Experimento II – Exposição parental e direta em baixas concentrações

Este experimento teve como objetivo avaliar o impacto da exposição a baixas doses de Mn via parental, ao longo de uma geração, durante o desenvolvimento da maturidade sexual da prole. Sendo assim, as fêmeas copuladas no experimento I foram continuamente expostas ao MnCl<sub>2</sub> durante o período de prenhez (21 dias) e lactação (21 dias). Nessa fase, a prole (n = 6) de cada grupo recebeu a quantidade de Mn advindas de suas progenitoras. Após este período, foi realizado o desmame e a prole continuou o tratamento, via gavagem, por mais 60 dias.

### 2.1.3) Experimento III – Exposição direta em altas concentrações

O experimento III teve como objetivo avaliar como o Mn, em altas doses, pode alterar a morfologia testicular. Para este experimento foram utilizados 24 machos (22 ± 1 dias), mantidos nas mesmas condições dos pertencentes aos experimentos I e II, porém com doses de 0 (controle), 15, 30 e 60 mg/kg/dia (n=6), por 45 dias. Estas doses foram escolhidas, pois existem populações que fazem uso de recursos hídricos com valores superiores aos limiares propostos por órgãos competentes (FRISBIE et al., 2012; FRISBIE et al., 2015; RHAMAN et al., 2015).

## 2.2) DISSECÇÃO E ANÁLISE ESPERMÁTICA

Ao término dos tratamentos os animais foram pesados, eutanasiados por deslocamento cervical e dissecados. Durante a dissecação foi feita a análise biométrica, através da pesagem do testículo em balança analítica para obtenção do índice gonadossomático [(peso testicular/peso corporal) x 100].

O epidídimo também foi retirado para análise espermática. Para avaliar a morfologia espermática a cauda do epidídimo foi seccionada e transferida para um microtubo de 1,5 mL contendo meio nutritivo *Gamete Buffer* (COOK Medical®), a 37°C, por 5 minutos. Uma alíquota foi retirada para o teste de anormalidades por meio de esfregaço em lâmina que, posteriormente, foi corado com o corante comercial Single Prov® (Newprov). Logo após, foi feita a avaliação em microscópio de luz para caracterizar os defeitos de cabeça, peça intermediária e cauda (BRUNER-TRAN et al., 2014). Ao total foram avaliados 200 espermatozoides por amostra/indivíduo.

### 2.3) HISTOPATOLOGIA

Após a remoção, dissecação e pesagem o testículo esquerdo (n=6) foi fixado em ALFAC (85% de álcool etílico 80%, 10% de formol 40% e 5% de ácido acético glacial), por 24 horas. Logo após, o material foi desidratado em soluções crescentes de álcool etílico (70-100%), diafanizado e embocado em Paraplast Plus (Leica®). Os processos de desidratação e diafanização foram realizados no processador de tecidos Micron STP 120 (Thermo Scientific®) e a embocagem em Paraplast na mesa de inclusão Micron EC 350 (Thermo Scientific®). As amostras foram seccionadas em cortes com 6 µm de espessura, respeitando um intervalo de 40-60 µm. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e observadas em microscopia de luz.

Para a avaliação histopatológica foi utilizado o método descrito por Jhonsen (1970) e modificado por Dias et al. (2019), que descrevem um *score* morfológico de 8 níveis, sendo: **1)** túbulos íntegros, com poucos vacúolos; **2)** túbulos com vacúolos na base do epitélio germinativo; **3)** túbulos com vacúolos no ápice do epitélio; **4)** túbulos com vacúolos na base e ápice do epitélio; **5)** presença de células germinativas no interior do lúmen ou em processo de degeneração; **6)** túbulos contendo apenas células basais; **7)** túbulos apenas com células de Sertoli; **8)** túbulos degenerados, sem a presença de células germinativas ou de Sertoli. Foram contabilizados 200 túbulos seminíferos em campos aleatórios por animal e os scores obtidos foram agrupados, segundo Dias et al. (2019), em túbulos normais (1), alterações leves (2 e 3), alterações moderadas (4 e 5) e alterações severas (6, 7 e 8).

### 2.4) HISTOMORFOMETRIA

As imagens foram capturadas em aumento de 10x e as medições foram realizadas utilizando-se o software Image-Pro Plus® 4.5 (Media Cybernetics). Para a análise morfométrica foi obtido o diâmetro tubular médio por animal, através da mensuração de 20 secções transversais de túbulos seminíferos, independente do estágio do epitélio seminífero, em um plano de corte que estes apresentassem morfologia circular. Nestas mesmas secções foram obtidos outros parâmetros morfométricos, como: diâmetro luminal e altura do epitélio. Além disso, por meio das fórmulas  $AT = \pi \cdot RT^2$ , AT= área tubular e RT= raio tubular e  $AL = \pi \cdot RL^2$ , AL= área luminal e RL= raio luminal, foi calculada a área tubular e luminal dos túbulos seminíferos (DIAS et al., 2019).

### 2.5) ESTEREOLOGIA

A proporção volumétrica dos túbulos seminíferos e da região de intertúbulo foram obtidas de acordo com a metodologia empregada por Lima et al. (2018), utilizando uma grade de 266 pontos sobreposta às imagens fotografadas do parênquima testicular em

aumento de 100x. Desta forma, utilizou-se 10 imagens por amostra, totalizando 2660 pontos por animal.

Foram contabilizados os pontos coincidentes sobre o túbulo seminífero e seus constituintes – epitélio seminífero, lúmen e túnica própria – e intertúbulo. Em seguida, foi avaliado o percentual de pontos sobre cada componente, obtendo-se a proporção volumétrica de cada compartimento, através da fórmula:

$$\%Pv \text{ (proporção volumétrica)} = \text{número de pontos no túbulo ou intertúbulo}/2660$$

O volume dos diferentes constituintes do testículo, em mL, foi calculado a partir da fórmula:

$$\text{Volume} = \%Pv \text{ túbulo (ou constituinte)}/100 \times \text{volume total do parênquima testicular}$$

A densidade do testículo de mamíferos é em torno de 1 e, por isso, a massa do testículo foi considerada igual ao seu volume (MORAIS et al., 2014). Além disso, para a obtenção do índice tubulossomático (ITS) e o comprimento do total dos túbulos seminíferos (CTS), em metros, foram utilizadas as seguintes fórmulas (DIAS et al., 2019):

$$\text{ITS} = \text{Volume do túbulo seminífero}/\text{peso corporal}$$

$$\text{CTS} = \text{Volume do túbulo seminífero}/\pi R^2$$

## 2.6) RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (RIB)

Para avaliar a resposta integrada dos biomarcadores foi utilizada a metodologia descrita por Beliaeff e Burgeot (2002) e modificada por Sanchez et al. (2013). Os resultados obtidos através da análise dos biomarcadores de cada dose utilizada são divididos pelo o do seu grupo controle correspondente, seguido de uma logaritimização para redução da variância. A partir dos dados logaritimizados ( $Y_i$ ) foi calculado a média ( $\mu$ ) e o desvio padrão ( $s$ ) para todas as análises. Em seguida, foi aplicada a fórmula  $Z_i = (Y_i - \mu)/s$  para cada tratamento, sendo a diferença entre o grupo tratado e controle utilizada para obter o valor de  $A$  – que corresponde ao resultado integrado para cada biomarcador utilizado. Após, estes resultados foram plotados em um gráfico do tipo radar, onde valores acima ou abaixo de zero (controle) indicam o estímulo ou inibição de determinado biomarcador. Por fim, para o cálculo do índice RIB de cada grupo, os valores de  $A$  foram convertidos em números absolutos ( $S$ ) e somados (SEVERO, 2017).

## 2.7) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram testados quanto à normalidade e avaliados pelo teste de ANOVA, seguido pelo teste *post hoc* de Dunnet (controle vs tratado) ou de comparações múltiplas

SNK (Student Newman Keuls). Os dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis, seguido do teste *post hoc* de Dunn's. Todos os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão e valores de  $p < 0,05$  considerados significativos.

### 3) RESULTADOS

#### 3.1) PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E ESPERMÁTICOS

Dentre os parâmetros biométricos analisados, não foram encontradas diferenças significativas no peso corporal, peso do testículo e índice gonadossomático (IGS%) entre os diferentes experimentos e condições de exposição adotadas no presente estudo (tabela 1).

TABELA 1 – PARÂMETROS BIOMÉTRICOS DOS ANIMAIS

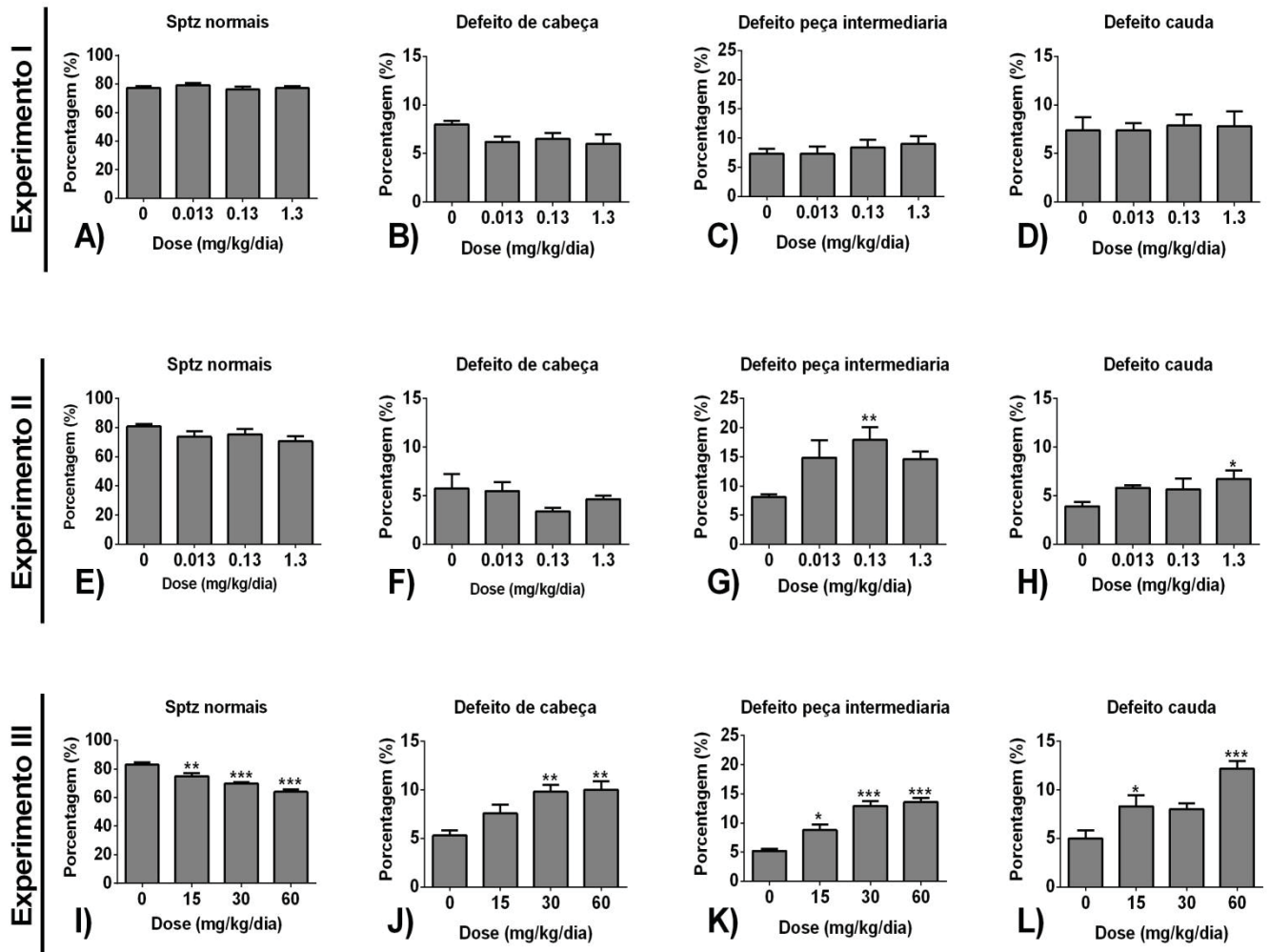
Parâmetro		Dose (mg/kg/dia)				
		Experimento I-II	0	0.013	0.13	1.3
		Experimento III	0	15	30	60
Peso corporal (g)	I	42,60 $\pm$ 1,12	41,40 $\pm$ 0,60	40,00 $\pm$ 1,04	40,20 $\pm$ 0,80	
	II	37,83 $\pm$ 1,44	38,50 $\pm$ 1,64	36,50 $\pm$ 1,02	35,67 $\pm$ 1,05	
	III	34,98 $\pm$ 1,79	33,42 $\pm$ 1,49	31,83 $\pm$ 1,98	34,07 $\pm$ 0,83	
Testículo (g)	I	0,104 $\pm$ 0,009	0,104 $\pm$ 0,006	0,092 $\pm$ 0,003	0,092 $\pm$ 0,003	
	II	0,094 $\pm$ 0,005	0,115 $\pm$ 0,021	0,117 $\pm$ 0,025	0,140 $\pm$ 0,026	
	III	0,098 $\pm$ 0,003	0,103 $\pm$ 0,003	0,106 $\pm$ 0,004	0,101 $\pm$ 0,004	
IGS (%)	I	0,24 $\pm$ 0,016	0,25 $\pm$ 0,015	0,22 $\pm$ 0,010	0,23 $\pm$ 0,010	
	II	0,25 $\pm$ 0,015	0,30 $\pm$ 0,054	0,32 $\pm$ 0,071	0,40 $\pm$ 0,092	
	III	0,28 $\pm$ 0,014	0,31 $\pm$ 0,018	0,33 $\pm$ 0,014	0,29 $\pm$ 0,014	

Média  $\pm$  Erro padrão. ANOVA – teste *post hoc* de Dunnet/ Kruskal Wallis teste *post hoc* de Dunn's. n = 5/6. FONTE: o autor (2018);

Ao analisar os parâmetros espermáticos nota-se que a morfologia espermática dos animais expostos diretamente ao Mn, em doses com baixas concentrações (experimento I), não apresentaram alterações (FIGURA 1A-D). Aqueles expostos de forma parental e direta (experimento II) também não apresentaram alterações significativas na morfologia normal e defeitos de cabeça (FIGURA 1E-F). Entretanto, nessa condição de tratamento, houve um

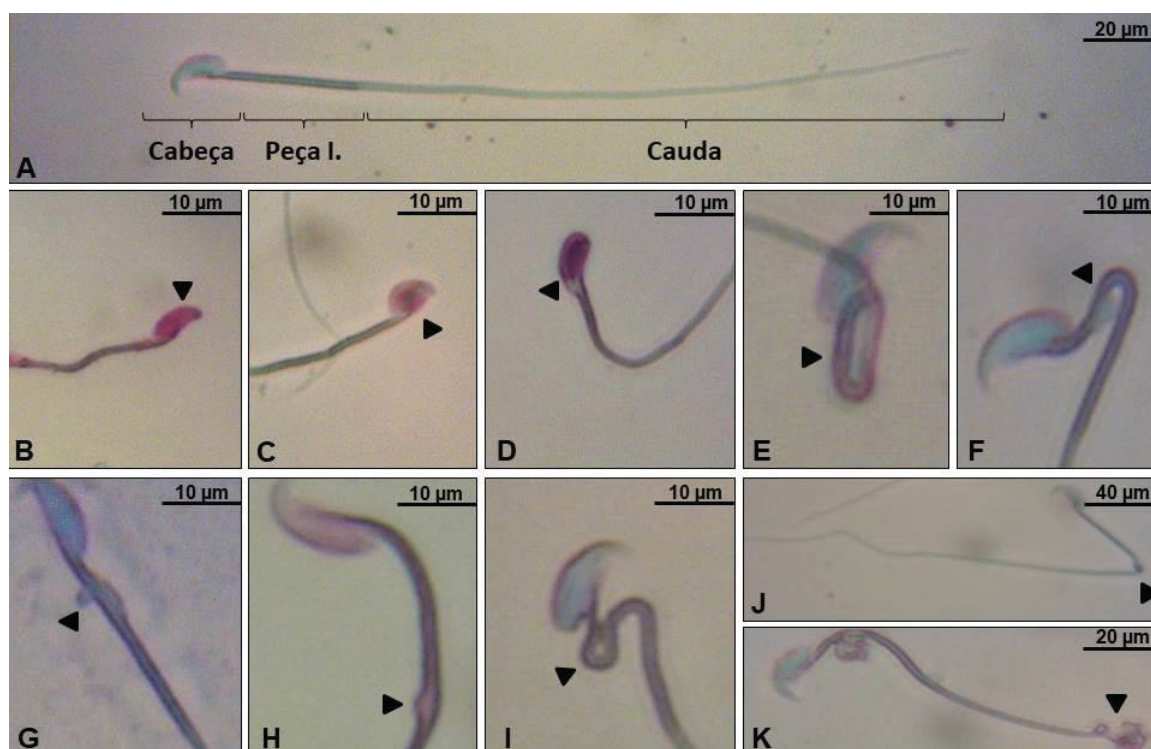
aumento na percentagem de defeitos de peça intermediária e cauda, para as doses de 0,13 e 1,3 mg/kg/dia, respectivamente (FIGURA 1G-H). Já os animais expostos de forma direta ao Mn, em altas doses (experimento III), apresentaram uma resposta dose dependente para a redução do número de espermatozoides normais e aumento de defeitos na cabeça, peça intermediária e cauda (FIGURA I-L). A representação geral das principais alterações encontradas nas diferentes regiões dos espermatozoides é demonstrada na figura 2.

FIGURA 1 – ANÁLISE DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA



**Experimento I.** Exposição direta a baixas concentrações. **Experimento II.** Exposição parental e direta a baixas concentrações. **Experimento III.** Exposição direta a altas concentrações. (n = 5/6). \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,001; \*\*\* = p < 0,0001 (ANOVA – teste *post hoc* de Dunnet). Barra: erro padrão. FONTE: o autor (2018)

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA



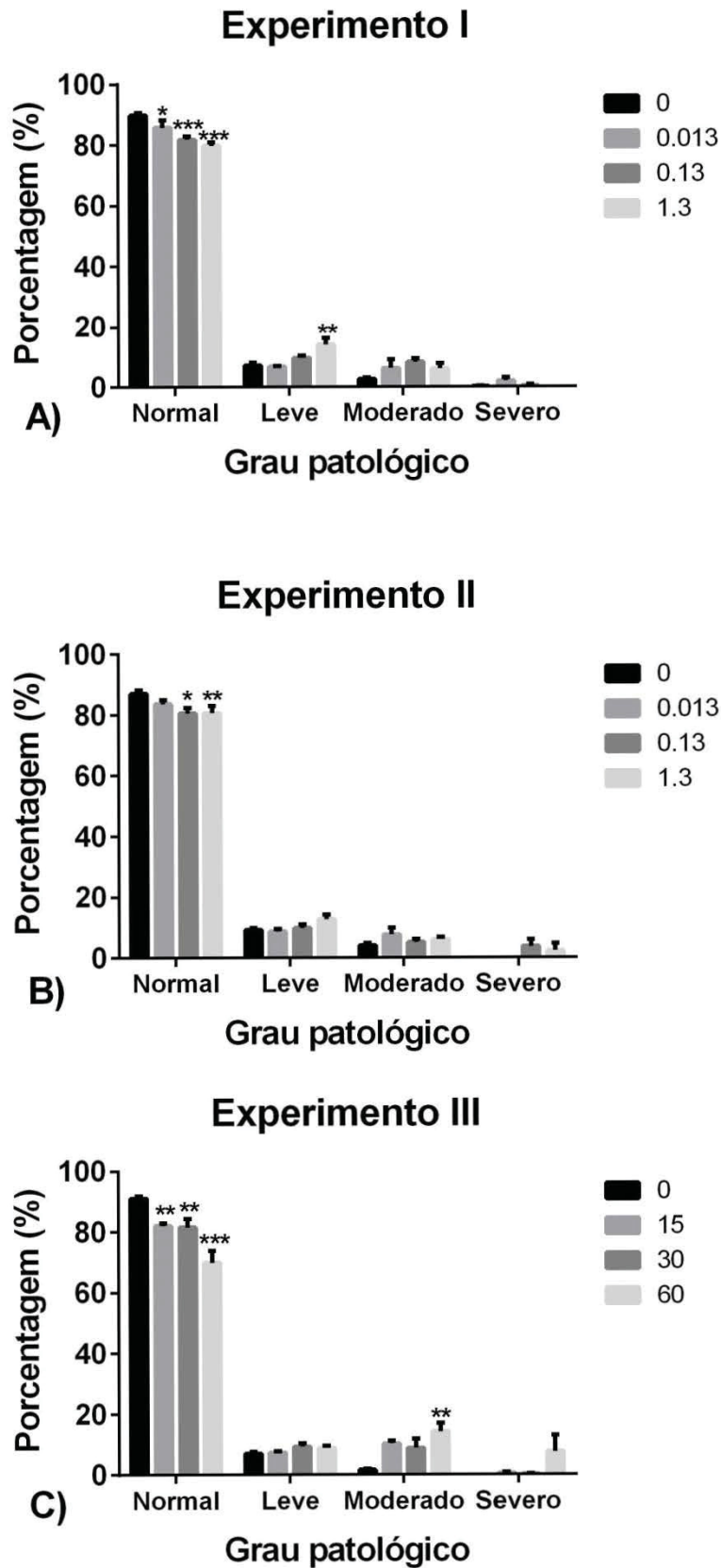
A) Espermatozoide normal. B-D) Alterações de cabeça. E-I) Alterações de peça intermediária. J-K) Alterações de cauda. Cabeça da seta: defeito. Coloração: corante comercial Single prove® FONTE: o autor (2018)

### 3.2) ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os resultados quantitativos para as alterações patológicas são demonstrados na figura 3. Para os animais expostos de forma direta a baixas concentrações de Mn (experimento I) todas as doses foram capazes de promover uma redução na porcentagem do número de túbulos seminíferos com morfologia normal (FIGURA 3A). Porém, apenas os animais tratados com 1,3 mg/kg/dia apresentaram um aumento significativo no número de túbulos com alterações leves (FIGURA 3A). Resultados similares são observados para os indivíduos expostos de forma parental e direta (experimento II). Entretanto, nessa condição, houve redução significativa apenas no número de túbulos normais nos grupos de 0,13 e 1,3 mg/kg/dia (FIGURA 3B). Para o experimento III, correspondente à exposição a doses com altas concentrações de Mn, também houve uma redução de túbulos com morfologia normal em todos os grupos tratados, além de um aumento dos túbulos com patologias de grau moderado na dose de 60 mg/kg/dia (FIGURA 3C).

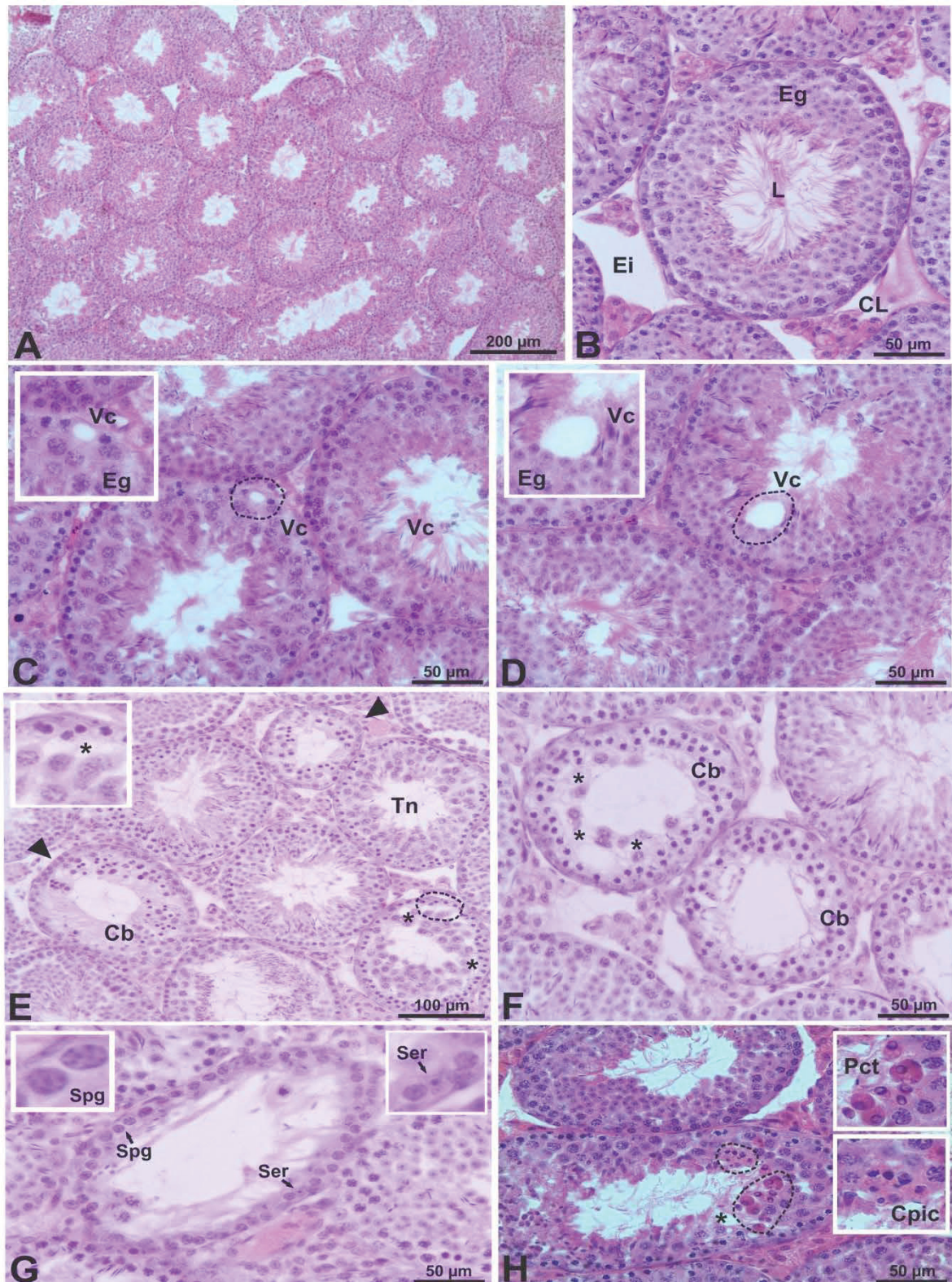
Os resultados das alterações encontradas para categorizar a morfologia dos túbulos seminíferos, para a análise quantitativa, são demonstrados com detalhes na figura 4A-G. Curiosamente, pelo menos um animal dos grupos tratados com Mn apresentou uma alteração histopatológica atípica: a presença de plasmócitos no epitélio germinativo (FIGURA 4H).

FIGURA 3 – CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS



A) Experimento I - exposição direta a baixas concentrações. B) Experimento II - exposição parental e direta a baixas concentrações. C) Experimento III - exposição direta a altas concentrações. (n = 5/6). \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,001; \*\*\* = p < 0,0001 (ANOVA – teste *post hoc* SNK). Barra: erro padrão. FONTE: o autor (2018).

FIGURA 4 – ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TESTÍCULO



A) Visão geral do testículo. B) Morfologia do túbulo seminífero sem alterações. C-D) Vacúolos (Vc) de diferentes tamanhos em regiões distintas do epitélio germinativo (Eg). E-F) Túbulos contendo apenas células basais (Cb) e com pontos de perda de adesão celular (\*). G) Túbulo com ausência de epitélio germinativo, contendo apenas espermatogônias (Spg) e células de Sertoli (Ser). H) Túbulo seminífero com infiltrado de plasmócitos (Pct) e células com núcleo picnótico (Cpic). Ei: espaço intertubular. L: Lúmen. CL: Célula de Leydig. Tn: Túbulo normal. Aumento: A) 100x. B-D; F-H) 400x. E) 200x. Coloração: HE. FONTE: o autor (2018).



### 3.3) PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS

O diâmetro e a área tubular foram reduzidos significativamente nas doses de 0,013 e 0,13 mg/kg/dia apenas nos animais submetidos ao experimento II (TABELA 2). Nesse mesmo experimento todas as doses promoveram redução do diâmetro luminal, alterando, conseqüentemente, a área luminal nos animais que receberam Mn a 0,013 e 1,3 mg/kg/dia (TABELA 2). Nenhuma das condições experimentais foi capaz de induzir alterações na altura do epitélio e comprimento dos túbulos seminíferos (CTS).

TABELA 2 – DADOS HISTOMORFOMÉTRICOS

Parâmetro	Dose (mg/kg/dia)				
	Experimento I-II	0	0.013	0.13	1.3
	Experimento III	0	15	30	60
Diâmetro tubular ( $\mu\text{m}$ )	I	324,54 $\pm$ 2,72	301,61 $\pm$ 3,45	315,66 $\pm$ 1,96	309,53 $\pm$ 3,74
	II	350,86 $\pm$ 4,77	<b>318,85 <math>\pm</math> 3,90*</b>	<b>328,79 <math>\pm</math> 4,21*</b>	333,40 $\pm$ 5,87
	III	299,1 $\pm$ 4,04	309,4 $\pm$ 3,99	304,0 $\pm$ 3,46	304,4 $\pm$ 3,60
Área tubular ( $\mu\text{m}^2$ )	I	0,081 $\pm$ 0,012	0,081 $\pm$ 0,011	0,079 $\pm$ 0,019	0,082 $\pm$ 0,018
	II	0,098 $\pm$ 0,002	<b>0,080 <math>\pm</math> 0,001*</b>	<b>0,086 <math>\pm</math> 0,002*</b>	0,089 $\pm$ 0,002
	III	0,071 $\pm$ 0,018	0,076 $\pm$ 0,019	0,073 $\pm$ 0,016	0,073 $\pm$ 0,016
Diâmetro luminal ( $\mu\text{m}$ )	I	120,31 $\pm$ 3,81	118,2 $\pm$ 4,64	125,6 $\pm$ 2,42	119,43 $\pm$ 3,95
	II	171,43 $\pm$ 3,72	<b>129,73 <math>\pm</math> 3,51*</b>	<b>155,18 <math>\pm</math> 9,12*</b>	<b>145,91 <math>\pm</math> 4,01*</b>
	III	112,43 $\pm$ 3,64	119,3 $\pm$ 3,66	123,3 $\pm$ 3,42	114,3 $\pm$ 2,94
Área luminal ( $\mu\text{m}^2$ )	I	0,018 $\pm$ 0,0002	0,016 $\pm$ 0,0005	0,019 $\pm$ 0,0008	0,017 $\pm$ 0,0005
	II	0,024 $\pm$ 0,001	<b>0,014 <math>\pm</math> 0,0008</b>	0,025 $\pm$ 0,007	<b>0,017 <math>\pm</math> 0,0009</b>
	III	0,010 $\pm$ 0,0006	0,012 $\pm$ 0,0007	0,012 $\pm$ 0,0006	0,010 $\pm$ 0,0005
Altura do epitélio ( $\mu\text{m}$ )	I	99,68 $\pm$ 1,69	98,23 $\pm$ 1,47	96,13 $\pm$ 1,64	99,08 $\pm$ 1,26
	II	101,48 $\pm$ 1,58	105,92 $\pm$ 2,29	98,90 $\pm$ 1,90	102,01 $\pm$ 1,52
	III	92,48 $\pm$ 1,63	95,02 $\pm$ 1,74	90,31 $\pm$ 1,50	95,07 $\pm$ 1,48
CTS (m)	I	1,19 $\pm$ 0,04	1,20 $\pm$ 0,15	1,33 $\pm$ 0,35	1,23 $\pm$ 0,12
	II	0,91 $\pm$ 0,06	1,23 $\pm$ 0,27	1,26 $\pm$ 0,77	1,41 $\pm$ 0,20
	III	1,26 $\pm$ 0,07	1,21 $\pm$ 0,03	1,33 $\pm$ 0,10	1,26 $\pm$ 0,07

\* =  $p < 0,05$  – valores destacados em negrito. Média  $\pm$  Erro padrão. ANOVA – teste *post hoc* de Dunnet/ Kruskal Wallis teste *post hoc* de Dunn's. CTS: comprimento total do túbulo seminífero. n = 5/6. FONTE: o autor (2018)

### 3.4) PARÂMETROS ESTEREOLÓGICOS

As diferentes doses e formas utilizadas para exposição nos animais do experimento II e III foram capazes de aumentar a proporção volumétrica do epitélio. Estes experimentos também promoveram decréscimo na proporção da túnica própria e lúmen (TABELA 3). Em contrapartida, no experimento I somente foi observada redução da túnica própria em relação ao grupo controle (TABELA 3). Apenas o tratamento utilizado no experimento III, na dose de 30 e 60 mg/kg/dia, foi capaz de promover aumento e redução da região tubular e intertubular, respectivamente (TABELA 3).

TABELA 3 – PROPORÇÃO VOLUMÉTRICA (%) DOS COMPONENTES TUBULARES E INTERTÚBULO

Parâmetro		Dose (mg/kg/dia)				
		Experimento I-II	0	0.013	0.13	1.3
		Experimento III	0	15	30	60
Epitélio (%)	I	57,05 ± 0,66	58,59 ± 0,65	57,64 ± 0,53	56,04 ± 0,71	
	II	62,68 ± 0,52	<b>65,58 ± 0,49*</b>	64,81 ± 0,59	<b>65,88 ± 0,64*</b>	
	III	67,13 ± 0,45	63,76 ± 0,78	67,95 ± 0,59	<b>68,92 ± 0,49*</b>	
Túnica Própria (%)	I	10,51 ± 0,23	<b>8,43 ± 0,28*</b>	<b>8,16 ± 0,26*</b>	9,89 ± 0,23	
	II	5,78 ± 0,31	<b>4,76 ± 0,24*</b>	5,62 ± 0,17	5,65 ± 0,25	
	III	5,57 ± 0,11	<b>5,08 ± 0,14*</b>	5,53 ± 0,11	5,58 ± 0,10	
Lúmen (%)	I	20,70 ± 0,44	21,16 ± 0,52	20,67 ± 0,51	20,97 ± 0,54	
	II	21,24 ± 0,54	<b>18,83 ± 0,51*</b>	<b>18,8 ± 0,61*</b>	<b>18,21 ± 0,63*</b>	
	III	17,59 ± 0,42	<b>20,79 ± 0,57*</b>	17,4 ± 0,45	16,87 ± 0,37	
Túbulo (%)	I	87,55 ± 0,49	88,19 ± 0,59	86,82 ± 0,47	87,28 ± 0,71	
	II	89,29 ± 0,29	89,19 ± 0,40	89,32 ± 0,37	90,75 ± 0,33	
	III	89,87 ± 0,29	90,12 ± 0,29	<b>90,8 ± 0,32*</b>	<b>90,8 ± 0,27*</b>	
Intertúbulo (%)	I	12,42 ± 0,48	11,76 ± 0,61	13,37 ± 0,48	12,76 ± 0,70	
	II	10,28 ± 0,29	10,80 ± 0,40	10,67 ± 0,37	9,24 ± 0,33	
	III	10,13 ± 0,29	9,87 ± 0,28	<b>9,11 ± 0,32*</b>	<b>9,13 ± 0,27*</b>	

\* =  $p < 0,05$  – valores destacados em negrito. Média ± Erro padrão. ANOVA – teste *post hoc* de Dunnet/ Kruskal Wallis teste *post hoc* de Dunn's.  $n = 5/6$ . FONTE: o autor (2018);

Todos os experimentos realizados provocaram alterações no volume tubular, como demonstrado na tabela 4. Para o experimento I as doses de 0,013 e 1,3 mg/kg/dia aumentaram o volume tubular, enquanto no experimento II apenas a de 0,13 mg/kg/dia causou esse efeito. Já no experimento III essa alteração é observada nas doses de 15 e 30 mg/kg/dia.

Além disso, a maior dose utilizada no experimento II promoveu aumento do volume intertubular e o tratamento do experimento III (30 mg/kg/dia) foi o único capaz de alterar o índice tubulossomático (ITS).

TABELA 4 – VOLUME (mL) DOS COMPARTIMENTOS TESTICULARES E ÍNDICE ITS

Parâmetro	Experimento	Dose (mg/kg/dia)			
		I-II		III	
		0	0.013	0.13	1.3
	III	0	15	30	60
Túbulo (mL)	I	0,08 ± 0,003	0,09 ± 0,001	<b>0,07 ± 0,006*</b>	0,08 ± 0,001
	II	0,08 ± 0,001	<b>0,10 ± 0,005*</b>	0,10 ± 0,006	<b>0,12 ± 0,006*</b>
	III	0,088 ± 0,0009	<b>0,092 ± 0,0009*</b>	<b>0,096 ± 0,0012*</b>	0,092 ± 0,0011
Intertúbulo (mL)	I	0,012 ± 0,0005	0,012 ± 0,0007	0,012 ± 0,0005	0,011 ± 0,0006
	II	0,009 ± 0,003	0,011 ± 0,0006	0,012 ± 0,001	<b>0,012 ± 0,0006*</b>
	III	0,009 ± 0,0002	0,01 ± 0,0003	0,009 ± 0,0003	0,009 ± 0,0002
Índice Tubulossomático (ITS)	I	0,22 ± 0,027	0,21 ± 0,013	0,20 ± 0,009	0,20 ± 0,013
	II	0,22 ± 0,014	0,27 ± 0,050	0,24 ± 0,078	0,37 ± 0,086
	III	0,25 ± 0,013	0,27 ± 0,015	<b>0,30 ± 0,013*</b>	0,27 ± 0,013

\* =  $p < 0,05$  – valores destacados em negrito. Média ± Erro padrão. ANOVA – teste *post hoc* de Dunnet/ Kruskal Wallis teste *post hoc* de Dunn's. n = 5/6. FONTE: o autor (2018);

### 3.5) RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (RIB)

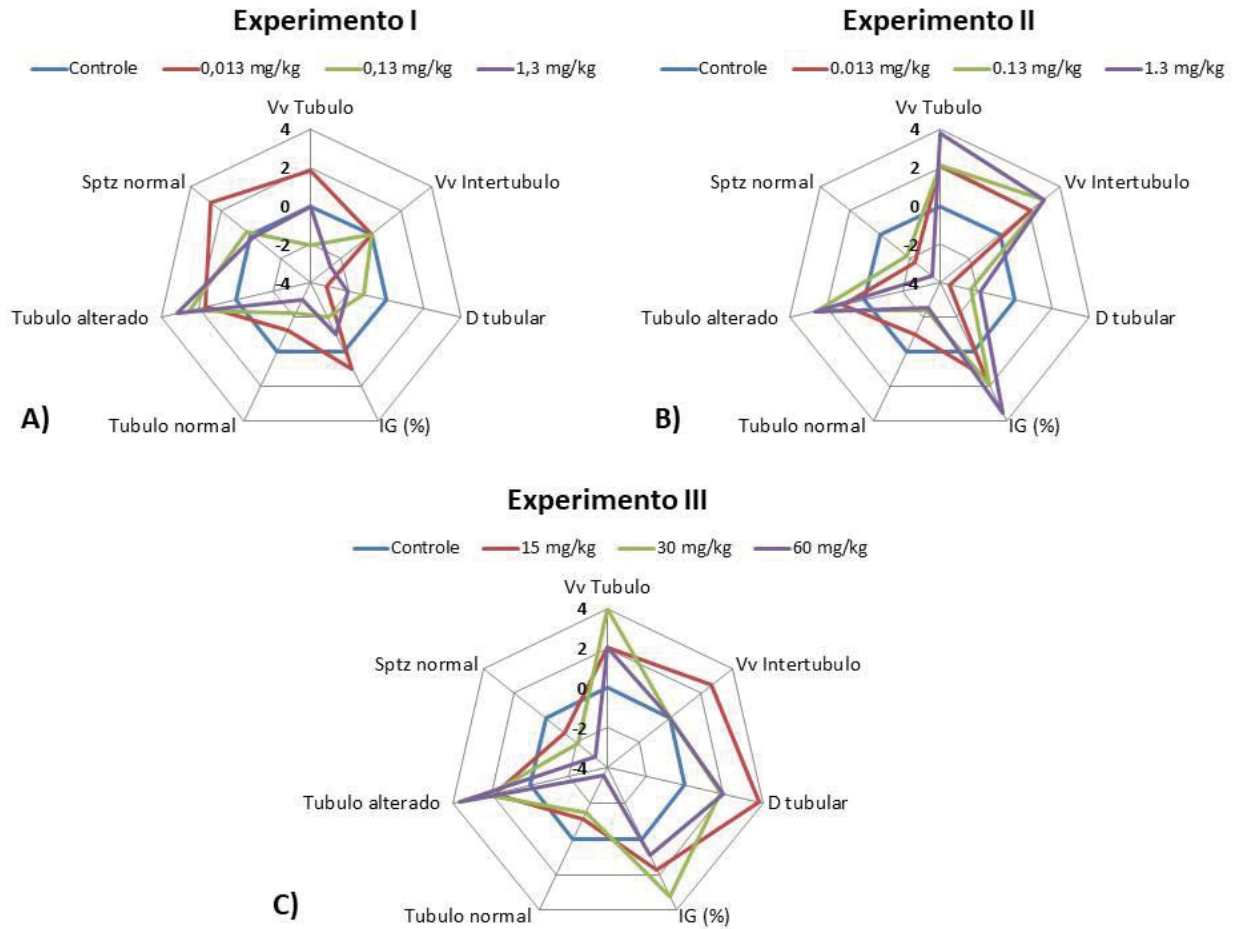
A partir dos parâmetros avaliados para verificar as alterações causadas após as diferentes doses e formas de exposição, foram selecionados os caracteres morfológicos mais comumente analisados na literatura para o cálculo da RIB, como: volume tubular, volume intertubular, diâmetro tubular, índice gonadossomático, (%) de túbulos normais, (%) de túbulos alterados e espermatozoides com morfologia normal.

A partir da RIB foi possível constatar que as formas de exposição utilizadas no experimento I e III possuem valores similares, além de não apresentarem grandes variações entre as diferentes doses (TABELA 5). No entanto, o experimento II apresentou os maiores valores de RIB, sendo crescente de acordo com a dose utilizada. A representação gráfica de como as doses e exposições influenciaram nos caracteres morfológicos é demonstrada na figura 5.

TABELA 5 – RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (RIB)

Experimento (I-II)	Dose (mg/kg)			
	0	0,013	0,13	1,3
Experimento (III)	0	15	30	60
I	0	11,52	10,31	9,35
II	0	16,99	18,28	22,45
III	0	14,46	14,75	15,28

FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA RIB



A) Experimento I - exposição direta a baixas concentrações. B) Experimento II - exposição parental e direta a baixas concentrações. C) Experimento III - exposição direta a altas concentrações. O gráfico demonstra a oscilação dos caracteres morfológicos nos grupos tratados em relação ao grupo controle (linha base – azul). A área abaixo do zero indica redução do caractere, enquanto os valores acima do zero indicam aumento do caractere. Vv túbulo: Volume do túbulo seminífero; Vv intertúbulo: Volume intertubular; D tubular: Diâmetro do túbulo seminífero; IG (%): Índice gonadossomático; Túbulo normal: Túbulo com morfologia normal; Túbulo alterado: túbulo com morfologia alterada; Sptz normal: Espermatozoides com morfologia normal. FONTE: o autor (2018)

#### 4) DISCUSSÃO

Estudos anteriores já demonstraram o efeito de metais, como cádmio (Cd) (LAMAS et al., 2015), arsênio (As) (SILVA et al., 2017), chumbo (Pb) (EL-MAGD et al., 2017) e Mn (ADEDARA et al., 2017a) sobre a morfologia do sistema reprodutor masculino. Entretanto, este é o primeiro estudo a investigar o impacto de diferentes formas de exposição ao Mn na morfologia testicular, onde foi possível observar que esse elemento pode interferir negativamente na morfologia espermática e alterar características estruturais do testículo a nível morfométrico, estereológico e causar danos histopatológicos.

As múltiplas doses de Mn e os métodos de exposição, direto ou multigeracional, utilizados no presente trabalho, não foram capazes de causar alterações nos parâmetros biométricos dos camundongos, diferente do observado por Mohammad et al (2018). O tratamento com metais pode causar efeitos diversos sobre os parâmetros biométricos do organismo, dependendo das doses utilizadas e rotas de exposição, como observado para o cádmio (Cd) (LAMAS et al., 2015), alumínio (Al) (MOURO et al., 2018) e chumbo (Pb) (EL-MAGD, et al., 2017). Apesar da ausência de efeitos na biometria reprodutiva, alterações significativas na morfologia espermática foram observadas. A exposição direta ao Pb pode causar aumento no número de espermatozoides anormais (EL-MAGD et al., 2017), enquanto ratos tratados com compostos de As (10 mg/L) não possuem estes parâmetros afetados (LIMA et al., 2018). Da mesma forma, a exposição direta a baixas doses de Mn (experimento I – geração F0) não causou alterações morfológicas nas diferentes regiões do espermatozoide. Porém, os animais da geração F1 (experimento II) expostos de forma multigeracional, na mesma dose que a F0, apresentaram significância quanto ao aumento de defeitos na peça intermediária. Esse efeito multigeracional corrobora com o descrito por Bruner-Tran et al. (2014), demonstrando que a exposição a contaminantes ambientais interfere na morfologia espermática das gerações subsequentes. Logo, a prole é mais suscetível a modulações negativas nesses parâmetros do que a geração parental, considerando que estes animais foram expostos em janelas críticas do desenvolvimento, diferenciação sexual e puberdade. A exposição nas fases citadas anteriormente podem promover efeitos graves e permanentes nos parâmetros reprodutivos destes animais na fase adulta.

A exposição isolada ao Mn (50 mg/kg) (MOHAMMAD et al., 2018), As (3 mg/kg) (SILVA et al., 2017), e sua mistura, As+Mn (60; 30 mg/L) (ADEDARA et al., 2017a) alteram significativamente o número de espermatozoides com morfologia normal, corroborando com os resultados encontrados para a exposição em doses elevadas (experimento III). Diferente do experimento I e II, nota-se que no experimento III há uma grande alteração na morfologia da peça intermediária e cauda, regiões com função de grande importância para a fisiologia espermática. Sabe-se que a peça intermediária é responsável pelo fornecimento de energia

para o movimento do flagelo do espermatozoide, sendo repleta de mitocôndrias. O Mn é essencial nessas organelas, pois atua como cofator da enzima antioxidante Mn-Superóxido dismutase (MnSOD) (CANDAS; LI, 2014). Entretanto, em determinadas condições, esse elemento tende a se acumular nas mitocôndrias, podendo causar depleção na produção de ATP devido ao aumento de estresse oxidativo (NEAL; GUILARTE, 2013; TARALE et al., 2016). Além disso, esse metal pode afetar proteínas motoras e do citoesqueleto (TOWLER et al., 2000) e, provavelmente, essas interações levam às anomalias observadas na cauda e peça intermediária, resultando em efeitos deletérios para a integridade de membrana e motilidade espermática.

De acordo com Silva et al. (2018), o sistema reprodutor pode ser um potencial alvo primário para a toxicidade causada pelo Mn, alterando a morfologia do testículo, epidídimo e a motilidade espermática. Foi demonstrado que a exposição a alguns metais, em diferentes doses, podem causar alterações morfológicas no testículo (ADEDARA et al., 2017a; EL-MAGD et al., 2017; LAMAS et al., 2015, SILVA et al., 2017; SILVA et al., 2018), que refletem negativamente na qualidade espermática. Também são capazes de induzir apoptose nas células germinativas (CUPERTINO et al., 2017; LIU et al., 2013), reduzir a imunomarcagem de receptores andrógenos (AR) em células de Sertoli e Leydig (SILVA et al., 2017) e alterar vias-chave de processos importantes para a espermatogênese (TIAN et al., 2018; RENU et al., 2018). As malformações espermáticas encontradas no presente trabalho podem estar relacionadas com uma disfunção testicular, devido a processos patológicos que ocorreram no órgão, prejudicando o processo espermático. Dentre as alterações encontradas na morfologia dos túbulos seminíferos destacam-se as vacuolizações, descamação epitelial devido à perda de aderência celular, túbulos com células basais que não progridem para a diferenciação espermática e degeneração tubular.

O arranjo estrutural do sistema reprodutor, a nível morfométrico e estereológico, também é afetado após exposição a metais (LIMA et al., 2018; MOURO et al., 2018; SOUZA et al., 2016a). Nesse estudo, apenas os animais do experimento II, após exposição multigeracional, apresentaram alterações significativas nos parâmetros morfométricos, indicando que os túbulos seminíferos dos animais sofreram danos no seu desenvolvimento, interferindo em seus aspectos funcionais. Em todos os experimentos também foram observadas modificações estereológicas como, por exemplo, a redução da proporção volumétrica da túnica própria. Por outro lado, doses de compostos arsênicos a 0,01 mg/L (LIMA et al., 2018; SOUZA et al., 2016b) promovem o aumento da proporção deste componente. Além disso, metais como Cd (ANGELIS et al., 2017) e As (RENU et al., 2018) podem afetar as proteínas e a estrutura da barreira hematotesticular, modificando a adesão e permeabilidade de contaminantes no túbulo seminífero (MARETTOVÁ et al., 2015). Sendo assim, a partir das alterações provocadas pela exposição ao Mn na túnica própria e barreira hematotesticular é

possível correlacionar estas informações com a presença de plasmócitos no interior dos túbulos seminíferos, como encontrado no presente trabalho. O testículo é um órgão que apresenta privilégio imunológico, embora essa característica possa ser alterada em determinadas condições (MENG et al., 2011). Porém, alguns metais são capazes induzir a maior atividade de células do sistema imune em órgãos do sistema reprodutor masculino, causando infiltrados inflamatórios, aumentando os níveis de óxido nítrico, TNF- $\alpha$  e mieloperoxidase (ADEDARA et al., 2017b; CUPERTINO et al., 2017). Logo, a modificação nas barreiras testiculares, associadas com a maior atividade do sistema imune no órgão, fragiliza a proteção das células germinativas e compromete a formação dos espermatozoides.

O túbulo seminífero é um dos principais alvos durante o tratamento com alguns tipos de metais, modificando suas características morfológicas (LAMAS et al., 2015; LIMA et al., 2018; SOUZA et al., 2015b), comprometendo seus aspectos funcionais e a espermatogênese. Apesar de apenas a exposição às doses do experimento II e III terem promovido alterações na proporção volumétrica dos túbulos e do epitélio germinativo, em todos os experimentos realizados alguns tratamentos modificaram o volume da região tubular, em relação ao controle. É provável que o aumento volumétrico do compartimento tubular e do epitélio esteja relacionado com uma hipertrofia epitelial, na tentativa de minimizar os danos e as perdas causadas pelo Mn, refletindo no aumento do índice tubulossomático.

Através da análise RIB, dos caracteres selecionados, foi possível comparar as múltiplas formas de exposição e as doses utilizadas, de maneira global. Entre as três condições experimentais adotadas, a exposição multigeracional a baixas doses (experimento II) foi a que apresentou maiores valores de RIB, os quais respondem de forma dose-dependente. O maior distúrbio promovido nos caracteres morfológicos do experimento II é atribuído à exposição ao Mn em períodos críticos do desenvolvimento do organismo, modificando uma série de parâmetros morfofisiológicos, como observado para o Cd (CHEMEK et al., 2016; THOMPSON, BANNIGAN, 2008).

Apesar das três condições de exposição testadas promoverem danos na morfologia testicular, foi possível avaliar que uma exposição crônica e a baixas doses, em períodos críticos do desenvolvimento, é capaz de promover maior distúrbio nos caracteres morfológicos do que uma exposição direta. Considerando que as doses utilizadas nos experimentos I e II são relevantes a exposição humana, maiores investigações são necessárias, dado que o Mn e outros metais possuem capacidade de atravessar a barreira placentária e alterar a qualidade seminal em humanos (LIU et al., 2013; WANG et al., 2016; WIRTH et al., 2007).

No presente estudo foram utilizadas três condições experimentais, sendo avaliados os efeitos de múltiplas doses e meios de exposição. Os resultados mostram que a morfologia testicular e espermática é alterada após o tratamento com Mn. Dessa forma, é possível concluir que o Mn, tanto em doses baixas quanto altas, promove alterações histopatológicas,



morfométricas e estereológicas no testículo, além de afetar negativamente a morfologia espermática.

## 5) REFERÊNCIAS

- ADEDARA, I. A.; ABOLAJI, A. O.; AWOGBINDIN, I. O.; FAROMBI, E. O. Suppression of the brain-pituitary-testicular axis function following acute arsenic and manganese co-exposure and withdrawal in rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 39, p. 21-29, 2017a.
- ADEDARA, I. A.; SUBAIR, T. I.; EGO, V. C.; OYEDIRAN, O.; FAROMBI, E. O. Chemoprotective role of quercetin in manganese-induced toxicity along the brain-pituitary-testicular axis in rats. **Chemico-biological interactions**, v. 263, p. 88-98, 2017b.
- ANGELIS, C.; GLADIERO, M.; PIVONELLO, C.; SALZANO, C.; GIANFRILLI, D.; PISCITELLI, P.; LENZI, A.; COLAO, A.; PIVONELLO, R. The environment and male reproduction: The effect of cadmium exposure on reproductive function and its implication in fertility. **Reproductive Toxicology**, v. 73, p. 105-127, 2017.
- ASCHNER, J. L.; ASCHNER, M. Nutritional aspects of manganese homeostasis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 4-5, p. 353-362, 2005.
- BELIAEFF, B.; BURGEOT, T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 1316-1322, 2002.
- BRUNER-TRAN, K. L.; DING, T.; YEOMAN, K. B.; ARCHIBONG, A.; AROSH, J. A.; OSTEEN, K. G. Developmental exposure of mice to dioxin promotes transgenerational testicular inflammation and an increased risk of preterm birth in unexposed mating partners. **PLoS one**, v. 9, n. 8, p. e105084, 2014.
- CANDAS, D.; LI, J. J. MnSOD in oxidative stress response-potential regulation via mitochondrial protein influx. **Antioxidants & redox signaling**, v. 20, n. 10, p. 1599-1617, 2014.
- CHEMEK, M.; MIMOUNA, S. B.; BOUGHAMMOURA, S.; DELBÉS, G.; MESSAOUDI, I. Protective role of zinc against the toxicity induced by exposure to cadmium during gestation and lactation on testis development. **Reproductive Toxicology**, v. 63, p. 151-160, 2016.
- CHENG, J.; FU, J. L.; ZHOU, Z. C. The inhibitory effects of manganese on steroidogenesis in rat primary Leydig cells by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Toxicology**, v. 187, n. 2-3, p. 139-148, 2003.
- CHENG, J.; FU, J. L.; ZHOU, Z. C. The mechanism of manganese-induced inhibition of steroidogenesis in rat primary Leydig cells. **Toxicology**, v. 211, n. 1-2, p. 1-11, 2005.
- CUPERTINO, M. C.; NOVAES, R. D.; SANTOS, E. C.; NEVES, A. C.; SILVA, E.; OLIVEIRA, J. A.; MATTA, S. L. Differential Susceptibility of Germ and Leydig Cells to Cadmium-Mediated Toxicity: Impact on Testis Structure, Adiponectin Levels, and Steroidogenesis. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2017.
- DIAS, F. C. R.; MARTINS, A. L. P.; MELO, F. C. S. A.; CUPERTINO, M. C.; GOMES, M. L. M.; OLIVEIRA, J. M.; DAMASCENO, E. M.; SILVA, J. OTONI, W. C.; MATTA, S. L. P. Hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* alters the organization of the seminiferous tubules

by modulating the oxidative state and the microstructural reorganization of the mice testes. **Journal of ethnopharmacology**, v. 233, p. 179-189, 2019.

EL-MAGD, M. A.; KAHILLO, K. A.; NASR, N. E.; KAMAL, T.; SHUKRY, M.; SALEH, A. A. A potential mechanism associated with lead-induced testicular toxicity in rats. **Andrologia**, v. 49, n. 9, p. e12750, 2017.

ERIKSON, K. M.; DOBSON, A. W.; DORMAN, D. C.; ASCHNER, M. Manganese exposure and induced oxidative stress in the rat brain. **Science of the total environment**, v. 334, p. 409-416, 2004.

FRISBIE, S. H.; MITCHELL, E. J.; DUSTIN, H.; MAYNARD, D. M.; SARKAR, B. World health organization discontinues its drinking-water guideline for manganese. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 6, p. 775-778, 2012.

FRISBIE, S. H.; MITCHELL, E. J.; SARKAR, B. Urgent need to reevaluate the latest World Health Organization guidelines for toxic inorganic substances in drinking water. **Environmental health : a global access science source**, v. 14, n. 1, p. 63, 2015.

GERBER, G. B.; LEONARD, A.; HANTSON, P. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 42, n. 1, p. 25-34, 2002.

HUANG, P.; LI, G.; CHEN, C.; WANG, H.; HAN, Y.; ZHANG, S.; XIAO, Y.; ZHANG, M.; LIU, N.; CHU, J.; ZHANG, L.; SUN, Z. Differential toxicity of Mn<sup>2+</sup> and Mn<sup>3+</sup> to rat liver tissues: oxidative damage, membrane fluidity and histopathological changes. **Experimental and toxicologic pathology**, v. 64, n. 3, p. 197-203, 2012.

JOHNSEN, S. G. Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 1, n. 1, p. 2-25, 1970.

LAMAS, C. A.; GOLLÜCKE, A. P. B.; DOLDER, H. Grape juice concentrate (G8000®) intake mitigates testicular morphological and ultrastructural damage following cadmium intoxication. **International journal of experimental pathology**, v. 96, n. 5, p. 301-310, 2015.

LEVINE, H.; JØRGENSEN, N.; MARTINO-ANDRADE, A.; MENDIOLA, J.; WEKSLER-DERRI, D.; MINDLIS, I.; PINOTTI, R.; SWAN, S. H. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. **Human Reproduction Update**, v. 23, n. 6, p. 646-659, 2017.

LIMA, G. D. A.; SERTORIO, M. N.; SOUZA, A. C. F.; MENEZES, T. P.; MOURO, V. G. S.; GONÇALVES, N. M.; OLIVEIRA, J. M.; HENRY, M.; MACHADO-NEVES, M. Fertility in male rats: Disentangling adverse effects of arsenic compounds. **Reproductive Toxicology**, v. 78, p. 130-140, 2018.

LIU, J.; JIN, L.; ZHANG, L.; LI, Z.; WANG, L.; YE, R.; ZHANG, Y.; REN, A. Placental concentrations of manganese and the risk of fetal neural tube defects. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 27, n. 4, p. 322-325, 2013.

MARETTOVÁ, E.; MARETTA, M.; LEGÁTH, J. Toxic effects of cadmium on testis of birds and mammals: a review. **Animal reproduction science**, v. 155, p. 1-10, 2015.

MARINS, A. T.; RODRIGUES, C. C. R.; MENEZES, C. C.; GOMES, J. D. L. C.; COSTA, M. D.; NUNES, M. E. M.; VIEIRA, M. S.; DONATO, F. F.; ZANELLA, R.; SILVA, L. P.; LORO, V.

- L. Integrated biomarkers response confirm the antioxidant role of diphenyl diselenide against atrazine. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 151, p. 191-198, 2018.
- MARTINEZ-FINLEY, E. J.; GAVIN, C. E.; ASCHNER, M.; GUNTER, T. E. Manganese neurotoxicity and the role of reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 65-75, 2013.
- MENG, J.; GREENLEE, A. R.; TAUB, C. J.; BRAUN, R. E. Sertoli cell-specific deletion of the androgen receptor compromises testicular immune privilege in mice. **Biology of reproduction**, v. 85, n. 2, p. 254-260, 2011.
- MOHAMMED, A. T.; EBRAHEIM, L. L. M.; METWALLY, M. M. M. Ebselen can Protect Male Reproductive Organs and Male Fertility from Manganese Toxicity: Structural and Bioanalytical Approach in a Rat Model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 739-748, 2018.
- MORAIS, A. C. T.; BALARINI, M. K.; LOPES, E. O.; MENEZES, T. P.; QUINTELA, F. M.; MORAIS, D. B.; GOMES, M. L. M.; MATTA, S. L. P. The tubular compartment and the spermatogenic dynamics of the wild rodent *Oxymycterus nasutus* (Rodentia: Cricetidae). **Animal reproduction science**, v. 149, n. 3-4, p. 249-258, 2014.
- MOURO, V. G. S.; MENEZES, T. P.; LIMA, G. D.; DOMINGUES, R. R.; SOUZA, A. C. F.; OLIVEIRA, J. A.; MATTA, S. L. P.; MACHADO-NEVES, M. How Bad Is Aluminum Exposure to Reproductive Parameters in Rats?. **Biological trace element research**, v. 183, n. 2, p. 314-324, 2018.
- NAGGAR, Y. A.; KHALIL, M. S.; GHORAB, M. A. Environmental pollution by heavy metals in the aquatic ecosystems of Egypt. **Open Access Journal of Toxicology**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2018.
- NEAL, A. P.; GUILARTE, T. R. Mechanisms of lead and manganese neurotoxicity. **Toxicology research**, v. 2, n. 2, p. 99-114, 2013.
- OKADA, M. A.; FILIPAK NETO, F.; NOSO, C. H.; VOIGT, C. L.; CAMPOS, S. X.; RIBEIRO, C. A. de O. Brain effects of manganese exposure in mice pups during prenatal and breastfeeding periods. **Neurochemistry International**, v. 97, p. 109-116, 2016.
- PONNAPAKKAM, T. P.; BAILEY, K. S.; GRAVES, K. A.; ISZARD, M. B. Assessment of male reproductive system in the CD-1 mice following oral manganese exposure. **Reproductive Toxicology**, v. 17, n. 5, p. 547-551, 2003.
- RAHMAN, S. M.; KIPPLER, M.; AHMED, S.; PALM, B.; EI ARIFEEN, S.; VAHTER, M. Manganese exposure through drinking water during pregnancy and size at birth: A prospective cohort study. **Reproductive Toxicology**, v. 53, p. 68-74, 2015.
- RENU, K.; MADHYASTHA, H.; MADHYASTHA, R.; MARUYAMA, M.; SATHISHKUMA, V.; ABILASH, V. G. Review on molecular and biochemical insights of arsenic-mediated male reproductive toxicity. **Life sciences**, 2018.
- SANCHEZ, W.; BURGEOT, T.; PORCHER, J. M. A novel "Integrated Biomarker Response" calculation based on reference deviation concept. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 5, p. 2721-2725, 2013.
- SILVA, A. P. G.; SANTIAGO, M. D. S. A.; MARANHO, L. A.; OLIVEIRA, R. P.; CONSTANTINO, D. H. J.; PEREIRA, C. D. S.; SILVA, R. C. B.; PEROBELLI, J. E. Could male reproductive system be the main target of subchronic exposure to manganese in adult animals?. **Toxicology**, v. 409, p. 1-12, 2018.

SILVA, R. F.; BORGES, C. S.; LAMAS, C. A.; CAGNON, V. H. A.; KEMPINAS, W. G. Arsenic trioxide exposure impairs testicular morphology in adult male mice and consequent fetus viability. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 80, n. 19-21, p. 1166-1179, 2017.

SOUZA, A. C. F.; MARCHESI, S. C.; FERRAZ, R. P.; LIMA, G. D. D. A.; OLIVEIRA, J. A.; MACHADO-NEVES, M. Effects of sodium arsenate and arsenite on male reproductive functions in Wistar rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 79, n. 6, p. 274-286, 2016a.

SOUZA, A. C. F.; MARCHESI, S. C.; LIMA, G. D. A.; FERRAZ, R. P.; SANTOS, F. C.; MATTA, S. L. P.; MACHADO-NEVES, M. Effects of sodium arsenite and arsenate in testicular histomorphometry and antioxidants enzymes activities in rats. **Biological trace element research**, v. 171, n. 2, p. 354-362, 2016b.

TARALE, P.; CHAKRABARTI, T.; SIVANESAN, S.; NAOGHARE, P.; BAFANA, A.; KRISHNAMURTHI, K. Potential role of epigenetic mechanism in manganese induced neurotoxicity. **BioMed research international**, v. 2016, n. 2016, p. 1-18, 2016.

THOMPSON, J.; BANNIGAN, J. Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. **Reproductive toxicology**, v. 25, n. 3, p. 304-315, 2008.

TIAN, H.; CHEN, S.; LENG, Y.; LI, T.; LI, Z.; CHENG, H.; ZHANG, Q. Exposure to cadmium during gestation and lactation affects development and function of Leydig cells in male offspring. **Environmental toxicology**, v. 33, n. 3, p. 351-360, 2018.

TOBIASSEN, L. S.; NIELSEN, E.; NØRHEDE, P.; LADEFOGED, O. Report on the health effects of selected pesticide cofomulants. **Pesticides Research**, v. 30, n. 51, p. 1-66, 2003.

TOWLER, M. C.; PRESCOTT, A. R.; JAMES, J.; LUCOOG, J. M.; PONNAMBALAM, S. The manganese cation disrupts membrane dynamics along the secretory pathway. **Experimental cell research**, v. 259, n. 1, p. 167-179, 2000.

WANG, Y. X.; SUN, Y.; HUANG, Z.; WANG, P.; FENG, W.; LI, J.; YANG, P.; WANG, M.; SUN, L.; CHEN, Y. J.; LIUC.; YUE, J.; GU, L. J.; ZENG, Q.; LU, W. Q. Associations of urinary metal levels with serum hormones, spermatozoa apoptosis and sperm DNA damage in a Chinese population. **Environment International**, v. 94, p. 177-188, 2016.

WANG, Y. X.; WANG, P.; FENG, W.; LIU, C.; YANG, P.; CHEN, Y. J.; SUN, L.; SUN, Y.; YUE, J.; GU, L. J.; ZENG, Q.; LU, W. Q. Relationships between seminal plasma metals/metalloids and semen quality, sperm apoptosis and DNA integrity. **Environmental Pollution**, p. 1-11, 2017.

WHO (World Health Organization). **Manganese and its compounds: environmental aspects**. Geneva, 2004.

WHO (World Health Organization). **Manganese in Drinking-water. Background document for development of WHO guidelines for drinking water quality**. 4<sup>th</sup> ed., Geneva, p. 1-21, 2011.

WIRTH, J. J.; ROSSANO, M. G.; DALY, D. C.; PANETH, N.; PUSCHECK, E.; POTTER, R. C.; DIAMOND, M. P. Ambient manganese exposure is negatively associated with human sperm motility and concentration. **Epidemiology**, v. 18, n. 2, p. 270-273, 2007.

## 7) CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitos estudos são realizados com a finalidade de investigar a toxicologia reprodutiva dos mais diversos tipos de substâncias orgânicas, visto que estes compostos são capazes de interferir negativamente na qualidade espermática de humanos e modelos animais (BERGAMO et al., 2016; BRUNER-TRAN et al., 2014). O objetivo deste trabalho foi avaliar como o sistema reprodutor responde perante a exposição a variadas formas e doses de Mn, um elemento essencial que é necessário para o desenvolvimento do organismo, sendo utilizado em inúmeras atividades metabólicas (ASCHNER; ASCHNER, 2005; GERBER et al., 2002). Apesar disso, esse elemento, assim como outros tipos de metais, são associados negativamente com a qualidade espermática (WANG et al., 2017; WIRTH et al., 2010) e podem modular o potencial reprodutivo e as características de fertilidade dos seres vivos.

No capítulo I foi investigado o efeito do Mn após uma exposição multigeracional a doses relevantes para população humana, sendo analisados os parâmetros espermáticos e de fertilidade da geração F0, após uma exposição direta. Para a prole, geração F1, foi avaliado o impacto do tratamento nos parâmetros espermáticos e bioquímicos após exposição parental (EP) e parental e direta (EPD) no período de maturidade sexual. Os resultados demonstraram que, nestas condições de tratamento, a geração F0 não apresenta muitos efeitos negativos. Entretanto, na geração F1, foi demonstrado que o testículo é o órgão mais sensível às alterações do sistema de defesa antioxidante, refletindo em perda de qualidade espermática como, por exemplo, motilidade e concentração. Além disso, os animais expostos apenas durante o desenvolvimento intrauterino e de lactação (EP) foram mais suscetíveis às alterações promovidas pelo Mn, sugerindo que pode haver uma herança epigenética de resistência nos animais EPD.

O capítulo II teve como principal objetivo analisar o efeito de uma exposição direta a altas doses de Mn no funcionamento do sistema reprodutor, especialmente quanto ao estresse oxidativo, aliado a função endócrina do hipotálamo. Assim como já descrito na literatura para exposição em altas doses de Mn (ADEDARA et al., 2017a; 2017b), os parâmetros espermáticos foram modulados negativamente, destacando a motilidade, concentração e a produção espermática diária. O decréscimo da qualidade espermática pode ser correlacionado com as análises bioquímicas, onde foi possível estabelecer, nesta condição de tratamento, como o Mn promoveu a depleção da defesa antioxidante do testículo. Outra via pela qual a função testicular pode ter sido afetada foi através do aumento do estresse oxidativo e redução da atividade da acetilcolinesterase no hipotálamo, prejudicando a sua função endócrina, como observado ao avaliar os metabólitos androgênicos fecais ao longo do período de tratamento. Logo, sugere-se que o Mn pode

afetar o desenvolvimento e atividade das células de Leydig, como ocorre após exposição ao Cd (TIAN et al., 2018). Esses resultados refletem, diretamente, na perda de qualidade espermática e redução do peso de órgãos andrógeno-dependentes, demonstrando que o Mn pode afetar o desenvolvimento do sistema reprodutor através da sua ação em diferentes locais.

Por fim, a partir dos resultados obtidos no capítulo I e II, foi investigada a morfologia testicular, de forma comparativa, após as múltiplas formas de exposição e doses adotadas neste estudo. No capítulo III foi demonstrado como o Mn pode interferir em diversos aspectos morfológicos do testículo, relacionando-se com os resultados encontrados anteriormente, dado que os danos oxidativos podem refletir em alterações estruturais no órgão. Foi possível observar que o Mn promove o aumento de defeitos morfológicos na peça intermediária e na cauda dos espermatozoides, explicando o porquê a motilidade progressiva foi substancialmente alterada nos animais expostos a baixas e altas doses. Por outro lado, a redução na concentração espermática observada no capítulo I e II pode ser relacionada com as alterações patológicas, morfométricas e estereológicas encontradas no testículo. É possível propor que as modificações na histoarquitetura testicular reduziram a capacidade espermatogênica dos túbulos seminíferos, diminuindo a produção espermática e, conseqüentemente, a sua concentração nos compartimentos testiculares e epididimários. Parte das alterações encontradas também pode ser oriunda da alteração do status redox do órgão, onde os danos oxidativos podem ter promovido essas alterações estruturais. O principal resultado obtido no capítulo III foi que a exposição multigeracional, em baixas concentrações, promove um maior distúrbio nos marcadores morfológicos, como evidenciado após a análise de resposta integrada de biomarcadores (RIB), do que uma exposição direta a doses com altas concentrações.

Sendo assim, a partir de todos os experimentos realizados e resultados obtidos, foi possível demonstrar que a exposição multigeracional a doses relevantes para a saúde humana, em longo prazo, promove uma disfunção testicular e afeta o sistema reprodutor masculino no mesmo nível que animais expostos diretamente a altas doses por um curto período de tempo. Os resultados apresentados no presente trabalho estão resumidos e organizados de acordo com o tipo de exposição, experimento e análise realizada, nos quadros a seguir.

QUADRO 1 – RESULTADOS OBTIDOS PARA OS MACHOS E FÊMEAS DA GERAÇÃO F0

Parâmetro	Dose (mg/kg/dia)			
	0	0.013	0.13	1.3
<b>Geração F0 (machos)</b>				
<b>Biometria</b>				
Peso inicial				
Peso final				
Testículo (g)				
Vesícula Seminal (g)				
<b>Análise espermática</b>				
Motilidade progressiva				
Motilidade não progressiva				
Imóveis				
Concentração		32,9 %	38,6 %	35,8 %
Vitalidade				
Morfologia espermática				
<b>Análise morfológica</b>				
Morfometria				
Estereologia		x	x	
Histopatologia		3,7 %	7,7 %	9,7 %
<b>Geração F0 (fêmeas)</b>				
Peso pré-gestacional				
Peso gestacional				
Peso pós-gestacional				
Nº de fêmeas copuladas				
% Cópula				
Nº de filhotes/fêmea				
Nº total de filhotes				

Cinza: alteração não estatisticamente significante; Vermelho: redução estatisticamente significante. x: diversos parâmetros afetados. FONTE: o autor (2019).

QUADRO 2 – COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS PARA EXPOSIÇÃO PARENTAL E PARENTAL E DIRETA EM BAIXAS DOSES DE Mn

Parâmetro	Exposição parental (EP)				Exposição parental e direta (EPD)			
	Dose (mg/kg/dia)				Dose (mg/kg/dia)			
	0	0.013	0.13	1.3	0	0.013	0.13	1.3
<b>Biometria</b>								
Peso final								
Testículo (g)								
Vesícula Seminal (g)							32,4 %	
<b>Análise espermática</b>								
Motilidade progressiva		12,2 %	18,4 %	33,3 %			30,3 %	32,4 %
Motilidade não progressiva				14,5 %				
Imóveis								
Concentração			37,9 %	34,5 %			27,3 %	26,3 %
Vitalidade				9,1 %				
Morfologia espermática			7,56 %	6,4 %				
<b>Análise morfológica</b>								
Morfometria		x	x					
Estereologia		x	x	x				
Histopatologia			6,5 %	6,4 %				
<b>Análise bioquímica - Testículo</b>								
Catalase				45,9 %				
Superóxido Dismutase								
Glutathione S-transferase				36,5 %	71 %			
[Tióis não proteicos]								
Peroxidação lipídica								
<b>Análise bioquímica – Vesícula Seminal</b>								
Catalase								
Superóxido Dismutase				46,5 %				
Glutathione S-transferase								
[Tióis não proteicos]		275 %						
Peroxidação lipídica				42 %				

Cinza claro: alteração não estatisticamente significativa; Cinza escuro: parâmetro não avaliado; Vermelho: redução estatisticamente significativa; Verde: aumento estatisticamente significativo; x: diversos parâmetros alterados. FONTE: o autor (2019).



QUADRO 3 – RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DA EXPOSIÇÃO EM ALTAS DOSES DE Mn

Parâmetro	Dose (mg/kg/dia)			
	0	15	30	60
<b>Experimento II</b>				
<b>Biometria</b>				
Peso final		14,3 %	13,3 %	
Testículo (g)				
Epidídimo (g)		14,5 %	14,7 %	14,7 %
Vesícula Seminal (g)		41,1 %	40,8 %	
MLABC (g)		25,5 %		
Glande do pênis (g)				24,2 %
<b>Análise espermática</b>				
Motilidade progressiva		26,9 %	28,6 %	29,8 %
Imóveis		27,8 %	30,4 %	31,7 %
Vitalidade		8,9 %	6,1 %	
Morfologia espermática		8,1 %	13,1 %	19 %
Concentração (c)		27,4 %	41,3 %	50,1 %
Produção espermática diária		52,3 %	55,2 %	58,5 %
Trânsito espermático (c/c)				407 %
<b>Análise morfológica</b>				
Morfometria				
Estereologia		x	x	x
Histopatologia		9 %	9,1 %	21,1 %
<b>Análise Hormonal</b>				
Metabólitos androgênicos fecais		39,7 %	33,8 %	36,8 %
Testosterona sérica				
<b>Análise bioquímica - Testículo</b>				
Catalase				23,8 %
Superóxido Dismutase		135,7 %		
Glutaciona dissulfeto redutase		20,8 %		
Glutaciona peroxidase				
Glutaciona S-transferase		36,2 %	43,5 %	
[Tióis não proteicos]			59,7 %	71,6 %
Peroxidação lipídica				23,3 %
<b>Análise bioquímica - Vesícula Seminal</b>				
Catalase				
Superóxido Dismutase			38,2 %	36,1 %
Glutaciona dissulfeto redutase				
Glutaciona peroxidase				57,8 %
Glutaciona S-transferase			27,7 %	
[Tióis não proteicos]				
Peroxidação lipídica				
<b>Análise bioquímica - Hipotálamo</b>				
Acetilcolinesterase		33,3 %	35,2 %	
Catalase				
Superóxido Dismutase				
Glutaciona S-transferase			27,2 %	27,6 %
[Tióis não proteicos]				

Cinza: sem alteração; Vermelho: redução significativa; Verde: aumento significativo; x: vários parâmetros alterados. Fonte: o autor (2019)

## 8) CONCLUSÕES

- 1) O Mn, mesmo em doses baixas via exposição direta, foi capaz de reduzir a concentração espermática dos animais da geração F0;
- 2) A exposição multigeracional a doses com baixas concentrações de Mn foi capaz de reduzir os parâmetros espermáticos da geração F1, dentre eles a motilidade e concentração;
- 3) O testículo e vesícula seminal dos animais expostos apenas de forma parental foram mais suscetíveis a alterações do que aqueles expostos de forma parental e direta;
- 4) A menor quantidade de efeitos significativos nos animais expostos de forma parental e direta sugere que possa existir um possível mecanismo de resistência epigenética;
- 5) Animais expostos de forma direta e em altas doses de Mn apresentaram os parâmetros espermáticos reduzidos de forma homogênea;
- 6) O Mn apresentou potencial anti-androgênico, dado a sua interferência no desenvolvimento de órgãos andrógeno-dependentes, bem como alteração na concentração de metabólitos androgênicos fecais;
- 7) O potencial neurotóxico do Mn, demonstrado através da alteração da atividade da acetilcolinesterase no hipotálamo pode estar relacionado com disfunção endócrina;
- 8) O Mn promoveu uma depleção em cadeia no sistema de defesa antioxidante no sistema reprodutor masculino;
- 9) O Mn aumentou o número de malformações na morfologia espermática;
- 10) A exposição direta e multigeracional a doses com baixas e altas concentrações de Mn alteraram os parâmetros morfológicos, morfométricos e estereológicos do testículo;
- 11) A exposição multigeracional a concentrações realistas de Mn, relevante para exposição humana, promoveu danos equivalentes e/ou com maior severidade do que a exposição direta a altas concentrações.

## 9) REFERÊNCIAS

- Introdução, revisão de literatura e material e métodos

ACHARYA, U. R.; MISHRA, M. TRIPATHY, R. R.; MISHRA, I. Testicular dysfunction and antioxidative defense system of Swiss mice after chromic acid exposure. **Reproductive toxicology**, v. 22, p. 87-91, 2006.

ADEDARA, I. A.; ABOLAJI, A. O.; AWOGBINDIN, I. O.; FAROMBI, E. O. Suppression of the brain-pituitary-testicular axis function following acute arsenic and manganese co-exposure and withdrawal in rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 39, p. 21-29, 2017a.

ADEDARA, I. A.; SUBAIR, T. I.; EGO, V. C.; OYEDIRAN, O.; FAROMBI, E. O. Chemoprotective role of quercetin in manganese-induced toxicity along the brain-pituitary-testicular axis in rats. **Chemico-biological interactions**, v. 263, p. 88-98, 2017b.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p.121-126, 1984.

AGARWAL, A.; DURAIRAJANAYAGAM, D.; HALABI, J.; PENG, J.; VAZQUEZ-LEVIN, M. Proteomics, oxidative stress and male infertility. **Reproductive biomedicine online**, v. 29, n. 1, p. 32-58, 2014.

AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 43, p. 963-974, 2005.

AITKEN, R. J.; ROMAN, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 636, n. December, p. 154–171, 2008.

ATTAL, J.; COUROT, M.; RICHETIN, C.; PISSELET, C. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**. v. 3, n. 3, pp. 219-241, 1963.

ANVISA – AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. SVS/MS - Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária **RDC Nº 269**. Brasil, 22 de Setembro de 2005.

ANVISA – AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. SVS/MS - Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária **Portaria nº 2.914**. Brasil, 12 de Dezembro de 2011.

ASCHNER, J. L.; ASCHNER, M. Nutritional aspects of manganese homeostasis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 4–5, p. 353–362, 2005.

ASCHNER, M.; VRANA, K. E.; ZHANG, W. Manganese uptake and distribution in the central nervous system (cns). **Neurotoxicology**. v. 20, p. 173–180. 1999.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for manganese. **U.S. Department Of Health And Human Services**. Set. 2012.

BABAEI, H., KHEIRANDISH, R., EBRAHIMI, L. The effects of copper toxicity on histopathological and morphometrical changes of the rat testes. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, p. 1615-1619. 2012.

BATSCHAUER, A. R. **Avaliação do efeito neurotóxico na prole de camundongos após exposição parental e direta**. 84f. Dissertação (Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular). Curitiba, 2018.

BARCELOUX, D. G. Manganese. **Clinical Toxicology**, v. 37, n. 2, p. 293-307. 1999.

BOUDOU, F.; ALDI, D. E. H.; SLIMANI, M.; BERROUKCHE, A. The impact of chronic exposure to manganese on testiculaire tissue and sperm parameters in rat Wistar. **International Journal of Natural Sciences Research**, v. 3, p. 12-19, 2014.

BELIAEFF, B.; BURGEOT, T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 1316-1322, 2002.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROWN, J.; WALKER, S.; STEINMAN, K. Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species. **Endocrine Research Laboratory, Department of Reproductive Sciences, Conservation and Research Center, National Zoological Park, Smithsonian Institution, Handbook**, p. 1-93, 2004.

CHANDEL, M.; JAIN, G. Toxic effects of transition metals on male reproductive system: A review. **Journal of Environmental and Occupational Science**, v. 3, n. 4, p. 1, 2014.

CHANDRA, A. K.; CHATTERJEE, A.; GOSH, R.; SARKAR, M. Effect of curcumin on chromium-induced oxidative damage in male reproductive system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 24, n. 2, p. 160-166, 2007.

CHEN, P.; CHAKRABORTY, S.; MUKHOPADHYAY, S.; LEE, E.; PAOLIELLO, M.; BOWMAN, A. B.; ASCHNER, M. Manganese homeostasis in the nervous system. **Journal of neurochemistry**, v. 134, n. 4, p. 601-610, 2015.

CHENG, C. Y.; MRUK, D. D. The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 1, p. 16-64, 2012.

CHENG, C. Y.; WONG, E. W. P.; LIE, P. P. Y.; LI, M. W. M.; MRUK, D. D.; YAN, H. H. N.; MOK, K. W.; MANNU, J.; MATHUR, P. P.; LUI, W.; LEE, W. M.; BONANOMI, M.; SILVESTRINI, B. Regulation of blood-testis barrier dynamics by desmosome, gap junction, hemidesmosome and polarity proteins: An unexpected turn of events. **Spermatogenesis**, v. 1, n. 2, p. 105-115, 2011.

CORNWALL, G. A. New insights into epididymal biology and function. **Human reproduction update**, v. 15, n. 2, p. 213-227, 2009.

CROSSGROVE, J.; ZHENG, W. Manganese toxicity upon overexposure. **NMR in Biomedicine**, v. 17, n. 8, p. 544-553, 2004

DIAS, F. C. R.; MARTINS, A. L. P.; MELO, F. C. S. A.; CUPERTINO, M. C.; GOMES, M. L. M.; OLIVEIRA, J. M.; DAMASCENO, E. M.; SILVA, J. OTONI, W. C.; MATTA, S. L. P. Hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* alters the organization of the seminiferous tubules by modulating the oxidative state and the microstructural reorganization of the mice testes. **Journal of ethnopharmacology**, v. 233, p. 179-189, 2019.

ELBETIEHA, A.; AL-TTHANI, A. S.; AL-TTHANI, R. K.; DARMANI, H.; OWAIS, W. Effect of chronic exposure to cobalt chloride on the fertility and testes in mice. **Journal of Applied Biological Sciences**, v. 2, p. 1-6, 2008.

ELLMANN, G. L.; COUTNEY, K. O.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A. New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** v. 7, p. 88-95, 1961.

EL-SHAHAT, A. E. R. et al. Altered Testicular Morphology and Oxidative Stress Induced by Cadmium in Experimental Rats and Protective Effect of Simultaneous Green Tea Extract. **International Journal of Morphology**, v. 27, n. 3, p. 757–764, 2009.

ERIKSON, K. M.; THOMPSON, K.; ASCHNER, J.; ASCHNER, M. Manganese neurotoxicity: a focus on the neonate. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, p. 369-377, 2007.

FLINT, M.; McALISTER, D. A.; AGARWAL, A.; PLESSIS, S. S. Male accessory sex glands: Structure and function. **Mammalian Endocrinology and Male Reproductive Biology**, p. 245, 2015.

FRAGA, C. G. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 4–5, p. 235–244, 2005.

FRASER, M.; VIAU, M.; LAFOND, J.; MERGLER, D.; SURETTE, C.; VAILLANCOURT, C. Effects of cadmium, lead and manganese on the serotonin system in human placenta. **Placenta**, v. 35, n. 9, p. A112, 2014.

FRISBIE, S. H.; MITCHELL, E. J.; DUSTIN, H.; MAYNARD, D. M.; SARKAR, B. World health organization discontinues its drinking-water guideline for manganese. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 6, p. 775–778, 2012.

FRISBIE, S. H.; MITCHELL, E. J.; SARKAR, B. Urgent need to reevaluate the latest World Health Organization guidelines for toxic inorganic substances in drinking water. **Environmental health : a global access science source**, v. 14, n. 1, p. 63, 2015.

GERBER, G. B.; LEONARD, A.; HANTSON, P. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 42, n. 1, p. 25–34, 2002.

GONZÁLEZ, G. F. Function of seminal vesicles and their role on male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 24, p. 255-260, 2001.

GRAZULEVICIENE, R.; NADISAUSKIENE, R.; BUINAUSKIENE, J.; GRAZULEVICIUS, T. Effects of Elevated Levels of Manganese and Iron in Drinking Water on Birth Outcomes. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 18, n. 5, 2009.

GRISWOLD, M. D. Spermatogenesis: the commitment to meiosis. **Physiological reviews**, v. 96, n. 1, p. 1-17, 2015.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In: Kenneth B. Storey (Ed). **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. Wiley- Liss, NY: John Wiley & Sons, pp. 319-368, 2004

HURLEY, L. S. Teratogenic aspects of manganese, zinc, and copper nutrition. **Physiological reviews**, v. 61, n. 2, p. 249-295, 1981.

IOM - Institute of Medicine. **Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc.** Washington, DC, National Academy Press. 2001.

JAN, A. AZAM, M.; SIDDIQUI, K.; ALI, A.; CHOI, I.; HAG, Q. Heavy metals and human health: mechanistic insight into toxicity and counter defense system of antioxidants. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 12, p. 29592-29630, 2015.

JIANG, Z-Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v.202, p.384-389, 1992.

JIANG, Z-Y.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of  $Fe^{2+}$  in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, p. 853-856, 1991.

JOHNSEN, S. G. Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 1, n. 1, p. 2-25, 1970.

KALENDER, S.; UZUN, F. G.; DEMIR, F.; UZUNHISARCIKLI, M.; ASLANTURK, A. Mercuric chloride-induced testicular toxicity in rats and the protective role of sodium selenite and vitamin E. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 456–462, 2013.

KATIRA, V.; BAWA, P. Histopathological changes induced by manganese in the rat testes. **Uttar Pradesh Journal of Zoology**, v. 13, p. 60–2, 1993.

KEEN, C. L; ENSUNSA, J. L; CLEGG, M. S. Manganese metabolism in animals and humans including the toxicity of manganese. **Metal Ions in Biological Systems**. v. 37, p. 89-121, 2000.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. **J. Biol. Chem.**, v.251, p.6183–6188, 1976.

KERR, J. B.; LOVELAND, K. L.; O'BRYAN, M. K.; DE KRETSEK, D. M. Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. In: Neill, J. D. (Ed.), **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. Londres: Elsevier, 2006. pp. 827-947.

KHAN, A. T.; GRAHAM, T. C.; OGDEN, L.; ALI, S.; SALWA; THOMPSON, S. J., SHIREEN, K. F.; MAHBOOB, M. A two-generational reproductive toxicity study of zinc in rats. **Journal of environmental science and healthy, part B**, v. 42, p. 403-415, 2007.

KONO, Y. Generation of Superoxide Radical during Autoxidation of Hydroxylamine and an Assay for Superoxide-Dismutase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 186, p. 189-195, 1978.

LARINI, L; SALGADO, P. E. T.; LEPERA, J. S. **Toxicologia**. São Paulo: Manole, p. 138-140, 1997.

KYJOVSKA, Z. O.; BOISEN, A. M. Z.; JACKSON, P.; WALLIN, H.; VOGEL, U.; HOUGAARD, K. S.. Daily sperm production: application in studies of prenatal exposure to nanoparticles in mice. **Reproductive Toxicology**, v. 36, p. 88-97, 2013.

LIMA, G. D. A.; SERTORIO, M. N.; SOUZA, A. C. F.; MENEZES, T. P.; MOURA, V. G. S.; GONÇALVES, N. M.; OLIVEIRA, J. M.; HENRY, M.; MACHADO-NEVES, M. Fertility in male

rats: Disentangling adverse effects of arsenic compounds. **Reproductive Toxicology**, v. 78, p. 130-140, 2018.

LEE, B.; PINE, M.; JOHNSON, L.; RETTORI, V.; HINEY, J. K.; LES DEES, W. Manganese acts centrally to activate reproductive hormone secretion and pubertal development in male rats. **Reproductive Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 580-585, 2006.

LIU, J.; JIN, L.; ZHANG, L.; LI, Z.; WANG, L.; YE, R.; ZHANG, Y.; REN, A. Placental concentrations of manganese and the risk of fetal neural tube defects. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 27, n. 4, p. 322–325, 2013.

LIU, X. F.; ZHANG, L. M.; GUAN, H. N.; ZHANG, Z. W.; XU, S. W. Effects of oxidative stress on apoptosis in manganese-induced testicular toxicity in cocks. **Food and chemical toxicology**, v. 60, p. 168-176, 2013a.

MARTINEZ, C. S.; ESCOBAR, A. G.; TORRES, J. G.; BRUM, D. S.; SANTOS, F. W.; ALONSO, M. J.; SALAICES, M.; VASSALLO, D. V.; PEÇANHA, F. M.; LEIVAS, F. G.; WIGGERS, G. A. Chronic exposure to low doses of mercury impairs sperm quality and induces oxidative stress in rats. **Journal of toxicology and environmental health, part A**, v. 77, p. 143-154, 2014.

MARTINEZ-FINLEY, E. J.; GAVIN, C. E.; ASCHNER, M.; GUNTER, T. E. Manganese neurotoxicity and the role of reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 65-75, 2013.

MEISTRICH, M. L.; HESS, R. A. Assessment of spermatogenesis through staging of seminiferous tubules. In: **Spermatogenesis**. Humana Press, Totowa, NJ, p. 299-307, 2013.

MILLALEO, R.; REYES-DÍAZ, M.; IVANOV, A. G.; MORA, M. L.; ALBERDI, M. Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 10, p. 470–481, 2010.

MORAIS, A. C. T.; BALARINI, M. K.; LOPES, E. O.; MENEZES, T. P.; QUINTELA, F. M.; MORAIS, D. B.; GOMES, M. L. M.; MATTA, S. L. P. The tubular compartment and the spermatogenic dynamics of the wild rodent *Oxymycterus nasutus* (Rodentia: Cricetidae). **Animal reproduction science**, v. 149, n. 3-4, p. 249-258, 2014.

MURAWSKA-CIALOWICZ, E.; BAL, W.; JANUSZEWSKA, L.; ZAWADZKI, M.; RYCHEL, J.; ZUWALA-JAGIELLO, J. Oxidative stress level in the testes of mice and rats during nickel intoxication. **Scientific world journal**, v. 2012, p. 1-5, 2012.

NASCIMENTO, S.; BAIERLE, M.; GÖETHEL, G.; BARTH, A.; BRUCKER, N.; CHARÃO, M.; SAUER, E.; GAUER, B.; ARBO, M. D.; ALTKNECHT, L.; JAGER, M.; DIAS, A. C. G.; SALLES, J. F. de; PIERRE, T. S.; GIODA, A.; MORESCO, R.; GARCIA, S. C. Associations among environmental exposure to manganese, neuropsychological performance, oxidative damage and kidney biomarkers in children. **Environmental Research**, v. 147, p. 32–43, 2016.

NEAL, A. P.; GUILARTE, T. R. Mechanisms of lead and manganese neurotoxicity. **Toxicology research**, v. 2, n. 2, p. 99-114, 2013.

O'NEAL, S. L.; ZHENG, W. Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review. **Current environmental health reports**, v. 2, n. 3, p. 315–328, 2015.

OAKBERG, E. F. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. **Developmental Dynamics**, v. 99, n. 3, p. 507-516, 1956.

OKADA, M. A.; FILIPAK NETO, F.; NOSO, C. H.; VOIGT, C. L.; CAMPOS, S. X.; RIBEIRO, C. A. de O. Brain effects of manganese exposure in mice pups during prenatal and breastfeeding periods. **Neurochemistry International**, v. 97, p. 109-116, 2016.

PANT, N.; KUMAR, G.; UPADHYAY, A.D.; PATEL, D.K.; GUPTA, Y.K.; CHATURVEDI, P.K. Reproductive toxicity of lead, cadmium, and phthalate exposure in men. **Environmental science and pollution research international**, v. 21, p. 11066-11074, 2014.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

PONNAPAKKAM, T. P.; BAILEY, K. S.; GRAVES, K. A.; ISZARD, M. B. Assessment of male reproductive system in the CD-1 mice following oral manganese exposure. **Reproductive Toxicology**, v. 17, n. 5, p. 547-551, 2003a.

PONNAPAKKAM, T. P.; SAM, G. H.; ISZARD, M. B. Histopathological Changes in the Testis of the Sprague Dawley Rat Following Orally Administered Manganese. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 71, n. 6, p. 1151-1157, 2003b.

POTTER, S. J.; DEFALCO, T. Role of the testis interstitial compartment in spermatogonial stem cell function. **Reproduction**, v. 153, n. 4, p. R151-R162, 2017.

RAHMAN, S. M.; KIPPLER, M.; AHMED, S.; PALM, B.; EI ARIFEEN, S.; VAHTER, M. Manganese exposure through drinking water during pregnancy and size at birth: A prospective cohort study. **Reproductive Toxicology**, v. 53, p. 68-74, 2015.

RANA, S.V.S. **Environmental Pollution. Health and Toxicology**. Oxford: Alpha Science, 2007.

REIS, L. L. S. L. S.; PARDO, P. E.; CAMARGOS, A. S.; OBA, E. Mineral element and heavy metal poisoning in animals. **Journal of medicine and medical sciences**, v. 1, n. 12, p. 560-579, 2010.

ROBERTS, K.P. What are the components of the male reproductive system?. In ROBAIRE, R.; CHAN, P. (Co-Eds.). **Handbook of andrology**. Lawrence: Allen Press, Inc., p. 1-5, 2010.

ROCHA, R. A. DA; AFONSO, J. C. Manganês. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 2, p. 103-105, 2012.

RUDGE, C. V.; RÖLLIN, H. B.; NOGUEIRA, C. M.; THOMASSEN, Y.; RUDGE, M. C.; ODLAND, J. O. The placenta as a barrier for toxic and essential elements in paired maternal and cord blood samples of South African delivering women. **Journal of environmental monitoring**, v. 11, n. 7, p. 1322-30, 2009.

RUMSBY, P.; CLEGG, H.; JONSSON, J.; BENSON, V.; HARMAN, M.; DOYLE, T.; RUSHTON, L.; WARWICK, P.; WILKINSON, D. Speciation of manganese in drinking water. **WRc (Ref UC9780)**, p. 1-30, 2014.

RUPPENTHAL, J. E. **Toxicologia dos metais**. In RUPPENTHAL, J. E. (Ed), Toxicologia. Santa Maria: Rede e-Tec Brasil, 2013. p. 47.



RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; HIKIM, A. P. S.; CLEGG, E. D. Histological and histopathological evaluation of the testis. **International journal of andrology**, v. 16, n. 1, p. 83-83, 1993.

SANCHEZ, W.; BURGEOT, T.; PORCHER, J. M. A novel "Integrated Biomarker Response" calculation based on reference deviation concept. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 5, p. 2721-2725, 2013.

SANDERS, A. P.; DESROSIERS, T. A.; WARREN, J. L.; HERRING, A. H.; ENRIGHT, D.; OLSHAN, A. F.; MEYER, R. E.; FRY, R. C. Association between arsenic, cadmium, manganese, and lead levels in private wells and birth defects prevalence in North Carolina: a semi-ecologic study. **BMC public health**, v. 14, n. 1, p. 955, 2014.

SANTANA, T. B. **Extrapolação alométrica para imobilização farmacológica: avaliação de sua eficácia em sete estudos de caso em animais silvestres**. 48 f. Tese (Pós-Graduação Clínica Médica e Cirúrgica em Animais Selvagens e Exóticos). Clínica Médica e Cirúrgica em Animais Selvagens e Exóticos, Campinas, 2010.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v.25, p.192-205, 1968.

SETCHELL, B. P.; BREED, W.G. Anatomy, vasculature, and innervation of the male reproductive tract. NEIL, J. D. et al (Ed.). **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. San Diego: Elsevier, p. 771-825, 2006.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. **Annual review of biochemistry**, v. 86, p. 715-748, 2017.

SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Letters**, v.103, p.287-290, 1979.

SEVERO, E. S. Análise de biomarcadores em Jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos *in situ* como ferramenta de avaliação ambiental. Dissertação (mestrado), Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Universidade Federal de Santa Maria, 2017.

SLIVKOVA, J.; POPELKOVA, M.; MASSANY, P.; TOPORCEROVA, S.; STAWARZ, R.; FORMICKI, G.; LUKAC, N.; PUTALA, A.; GUZIK, M. Concentration of trace elements in human and relation to spermatozoa quality. **Journal of environmental science and healthy part A**, V. 44, p. 370-375, 2009.

SU, L.; MRUK, D. D.; LEE, W. M.; CHENG, C. Y. Drug transportes and blood-testis barrier function. **Journal of endocrinology**, v. 209, n. 3, p. 337-351, 2011.

SULLIVAN, R.; MIEUSSET, R. The human epididymis: its function in sperm maturation. **Human reproduction update**, v. 22, n. 5, p. 574-587, 2016.

TARALE, P.; CHAKRABARTI, T.; SIVANESAN, S; NAOGHARE, P.; BAFANA, A.; KRISHNAMURTHI, K. Potential role of epigenetic mechanism in manganese induced neurotoxicity. **BioMed research international**, v. 2016, n. 2016, p. 1-18, 2016.

TELISMAN, S.; CVITKOVIC, P.; JURASOVIC, J.; PIZENT, A.; GAVELLA, M.; ROCIC, B. Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, p. 45-53, 2000.

TOBIASSEN, L. S.; NIELSEN, E.; NØRHEDE, P.; LADEFOGED, O. Report on the health effects of selected pesticide coformulants. **Pesticides Research**, v. 30, n. 51, p. 1-66, 2003.

TURGUT, G., ABBAN, G., TUGRUGT, S., TAKE, G. Effect of overdose zinc on mouse testis and its relation with sperm count and motility. **Biological trace element research**, v. 96, p. 271-279, 2003.

TURNER, T. T., LYSIAK, J. J. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. **Journal of andrology**, v. 29, n. 5, p. 488-498, 2008.

WANG, Y. X.; SUN, Y.; HUANG, Z.; WANG, P.; FENG, W.; LI, J.; YANG, P.; WANG, M.; SUN, L.; CHEN, Y. J.; LIUC.; YUE, J.; GU, L. J.; ZENG, Q.; LU, W. Q. Associations of urinary metal levels with serum hormones, spermatozoa apoptosis and sperm DNA damage in a Chinese population. **Environment International**, v. 94, p. 177–188, 2016.

WANG, Y. X.; WANG, P.; FENG, W.; LIU, C.; YANG, P.; CHEN, Y. J.; SUN, L.; SUN, Y.; YUE, J.; GU, L. J.; ZENG, Q.; LU, W. Q. Relationships between seminal plasma metals/metalloids and semen quality, sperm apoptosis and DNA integrity. **Environmental Pollution**, p. 1–11, 2017.

WEBSTER, W. S.; VALOIS, A. A. Reproductive toxicology of manganese in rodents including exposure during the postnatal period. **Neurotoxicology**, 8: 437–44, 1987.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 325-333, 1981.

WHO (World Health Organization). **Manganese and its compounds: environmental aspects**. Geneva, 2004.

WHO (World Health Organization). **Manganese in Drinking-water. Background document for development of WHO guidelines for drinking water quality**. Geneva, 2011.

WHO (World Health Organization). **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**. Switzerland, 2010.

ZOTA, A. R.; ETTINGER, A. S.; BOUCHARD, M.; AMARASIRIWARDENA, C. J.; SCHAWARTZ, J.; HU, H.; WRIGHT, R. O. Maternal Blood Manganese Levels and Infant Birth Weight. **Epidemiology**, v. 20, n. 3, p. 367–373, 2009.