

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MILENA MENDONÇA CAVALIN

**AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA TESTICULAR E OVARIANA DE
CAMUNDONGOS SWISS APÓS EXPOSIÇÃO MULTIGERACIONAL AO
MANGANÊS**

CURITIBA

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MILENA MENDONÇA CAVALIN

**AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA TESTICULAR E OVARIANA DE
CAMUNDONGOS SWISS APÓS EXPOSIÇÃO MULTIGERACIONAL AO
MANGANÊS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Biomedicina da Universidade Federal do
Paraná como requisito à obtenção do título de
obtenção do grau Bacharel.

Orientador: Prof^a Dra. Claudia Feijó Ortolani-
Machado

Co-orientador: M.Sc. Tugstênio Lima de Souza

CURITIBA

2019

TERMO DE APROVAÇÃO

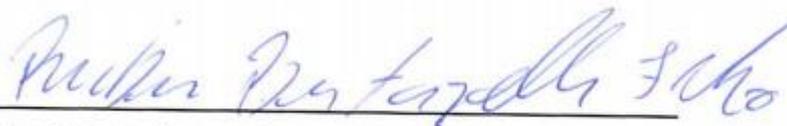
MILENA MENDONÇA CAVALIN

AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA TESTICULAR E OVARIANA DE CAMUNDONGOS SWISS APÓS EXPOSIÇÃO MULTIGERACIONAL AO MANGANÊS

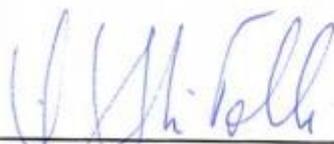
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina da Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do título de obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina, pela seguinte banca examinadora:



Orientadora - Prof(a). Dr(a). Claudia Feijó Ortolani-Machado
Departamento de Biologia Celular, UFPR



Prof. Dr. Rubens Bertazolli Filho
Departamento de Biologia Celular, UFPR



Profª Drª Nilce Mary Turcatti Folle
Faculdade Paranaense

Curitiba, 29 de novembro de 2019.

Dedico este trabalho aos meus pais Henio e Christina,
que sempre me deram suporte, ensinamentos e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre ter sido um bom Pai, me dando forças e me ajudando a continuar. O Senhor é digno de tudo!

Aos meus pais Henio e Christina, por sempre terem me incentivado, me proporcionado as melhores condições possíveis, e, mesmo distantes nesse último ano, sempre estarem presentes. Nada disso seria possível sem vocês! Agradeço em especial a minha irmã Marina, por ser minha melhor amiga e estar do meu lado para tudo. Eu amo vocês demais!

Ao meu noivo Dauber, por cuidar tão bem de mim! Obrigada por toda a paciência e por todo o amor!

À minha orientadora Prof^a Dr^a Claudia Feijó Ortolani-Machado, por ter me recebido no laboratório em 2017 e sempre ter sido tão dedicada, atenciosa, preocupada, sempre disposta a ensinar, corrigir e me capacitar. Muito obrigada por tudo!

Ao meu co-orientador M.Sc. Tugstênio Lima de Souza, por toda a paciência durante esses dois anos, por me ensinar tanto, me cobrar quando necessário, me dar todo o suporte para realizar os experimentos e análises, e sempre ter dado o seu melhor nessa orientação. Tug, aprendi muito com você, você tem a minha admiração!

Às meninas do laboratório Mel e Mari, pelas opiniões nas apresentações e críticas construtivas. Admiro a dedicação de vocês!

Ao grupo Jesus na UFPR, por ter sido a minha segunda família na universidade. Sempre foi muito bom podermos nos reunir e falar do amor de Jesus, fiz amigos que levarei para a vida inteira.

Às minhas amigas de turma Bruna, Beatriz e Isadora, por terem sempre tornado tudo mais leve. Isa, obrigada por sempre termos aguentado os surtos uma da outra, sua amizade foi essencial nesse processo todo. Sobrevivemos!

À Universidade Federal do Paraná pela estrutura para o desenvolvimento da pesquisa e por me permitir estar me formando nesse curso.

Por fim, a todos que de alguma forma participaram desse processo, meu muito obrigada!

*“Não fui Eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso!
Não se apavore nem se desanime, pois o Senhor, o
seu Deus, estará com você por onde você andar.”*

Josué 1:9

RESUMO

O manganês é um metal essencial para o desenvolvimento e diversas funções do organismo. O contato dos seres vivos com esse elemento pode ocorrer através da exposição oral e ocupacional, uma vez que está amplamente presente no ambiente devido a sua grande utilização industrial. Entretanto, apesar de ser fundamental para o organismo, o manganês se torna tóxico em concentrações acima dos níveis fisiológicos e pode afetar diversos sistemas orgânicos, entre eles, o reprodutivo. Baseado nessa toxicidade e em sua capacidade de atravessar a barreira placentária, o presente estudo teve como objetivo verificar o efeito de concentrações realistas de manganês sobre a morfologia do sistema reprodutor após exposição crônica e multigeracional. Sendo assim, sessenta camundongos Swiss (geração F0) foram expostos ao cloreto de manganês ($MnCl_2$) nas doses de 0 (controle), 0,013, 0,13 e 1,3 mg/kg/dia, por 60 dias. Em seguida, foram isolados para acasalamento e a prole (geração F1) foi exposta durante o período intrauterino, de amamentação e por mais 60 dias após o desmame. Ao término do experimento os animais foram eutanasiados e os testículos e ovários passaram por processamento histológico para avaliação de parâmetros histomorfométricos e estereológicos. Além disso, foi realizado esfregaço em lâmina a partir da excisão da cauda do epidídimo para análise da morfologia espermática. Em relação ao sistema reprodutor masculino, a maioria das alterações ocorreu na geração F1, como redução da porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais e alterações nos túbulos seminíferos, sendo que houve aumento do volume e do comprimento tubular nos grupos tratados, como forma de compensar a redução do diâmetro e retomar as condições fisiológicas. Já o sistema reprodutor feminino não apresentou alterações significativas no diâmetro dos folículos ovarianos, porém houve redução do volume do ovário. Dessa forma, é possível concluir que a exposição multigeracional a doses baixas de Mn pode afetar parâmetros morfológicos do sistema reprodutor, sugerindo que esse elemento pode promover uma redução do desempenho reprodutivo e fertilidade.

Palavras-chave: reprodução; histomorfometria; estereologia.

ABSTRACT

Manganese is an essential metal for the development and fulfillment of various organism functions. The contact of living beings with this element may occur through oral and occupational exposure, since it is widely present in the environment due to its large industrial use. However, despite being fundamental to the organism, manganese becomes toxic at concentrations above physiological levels and can affect several organic systems, including the reproductive one. Given such toxicity and the ability of manganese to cross the placental barrier, the present study aims to verify the effect of realistic manganese concentrations on reproductive system morphology after chronic and multigenerational exposure. Therefore, sixty Swiss mice (generation F0) were exposed to manganese chloride (MnCl_2) at doses of 0 (control), 0.013, 0.13 and 1.3 mg/kg/day for sixty days. They were then isolated for mating, and the offspring (generation F1) were exposed during both the intrauterine period and the breastfeeding period, as well as during the following sixty days after weaning. At the end of the experiment, the animals were euthanized and their testicles and ovaries underwent histological processing to evaluate histomorphometric and stereological parameters. Moreover, a slide smear was performed from the epididymis tail excision for sperm morphology analysis. Regarding the male reproductive system, most of the changes occurred in the F1 generation, such as a reduction in the percentage of morphologically normal sperm and changes in the seminiferous tubules, with an increase in their volume and length in order to compensate for their reduction in diameter and thus return to the physiological conditions of yore. On the other hand, the female reproductive system showed no significant changes in the diameter of the ovarian follicles, although a reduction in the volume of the ovarian has occurred. It can be concluded that multigenerational exposure to low doses of Mn may affect the morphological parameters of the reproductive system, suggesting that manganese may reduce both fertility and reproductive performance.

Keywords: reproduction; histomorphometry; stereology.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ANATOMIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO.....	18
FIGURA 2 – ANATOMIA DO TESTÍCULO.....	19
FIGURA 3 – HISTOLOGIA DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS.....	20
FIGURA 4 – ANATOMIA DO ESPERMATOZOIDE.....	21
FIGURA 5 – ANATOMIA DO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO.....	24
FIGURA 6 – ESTRUTURA DO OVÁRIO E FOLÍCULOS OVARIANOS.....	25
FIGURA 7 – ESTÁGIOS DO FOLÍCULO OVARIANO E SUAS ESTRUTURAS..	27
FIGURA 8 – DESENHO EXPERIMENTAL.....	36
FIGURA 9 – HISTOMORFOMETRIA DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS.....	38
FIGURA 10 – ESTEREOLOGIA DOS TESTÍCULOS.....	39
FIGURA 11 – CLASSIFICAÇÃO DOS FOLÍCULOS OVARIANOS.....	42
FIGURA 12 – ESTEREOLOGIA DOS OVÁRIOS.....	43
FIGURA 13 – MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.....	45
FIGURA 14 – ANÁLISE DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.....	46
FIGURA 15 – RESULTADO DA HISTOMORFOMETRIA DO TESTÍCULO.....	47
FIGURA 16 – RESULTADO DA HISTOMORFOMETRIA DAS CÉLULAS DE LEYDIG.....	47
FIGURA 17 – RESULTADO DA ESTEREOLOGIA DO TESTÍCULO.....	48
FIGURA 18 – TIPOS DE FOLÍCULOS OVARIANOS ENCONTRADOS.....	50
FIGURA 19 – RESULTADO DA HISTOMORFOMETRIA DOS FOLÍCULOS OVARIANOS.....	50

FIGURA 20 – RESULTADO DA ESTEREOLOGIA DOS OVÁRIOS.....	51
FIGURA 21 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES.....	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPRIMENTO TOTAL DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS.....	49
TABELA 2 – ÍNDICE DA RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES....	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 MANGANÊS	14
2.1 TOXICIDADE DO MANGANÊS.....	15
3 SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO	18
4 SISTEMA REPRODUTOR FEMININO	23
4.1 ANATOMIA.....	23
4.2 FOLICULOGÊNESE	25
4.3 CICLO REPRODUTIVO	28
4.3.1 Ciclo menstrual.....	28
4.3.2 Ciclo estral.....	29
5 TOXICIDADE REPRODUTIVA DO MANGANÊS	31
5.1 SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO.....	31
5.2 SISTEMA REPRODUTOR FEMININO.....	31
6 JUSTIFICATIVA	33
7 OBJETIVOS	34
7.1 OBJETIVOS GERAIS.....	34
7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
8 MATERIAL E MÉTODOS	35
8.1 ANIMAIS.....	35
8.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	35
8.2.1 Geração F0	35
8.2.1 Geração F1	36
8.3 DISSECÇÃO E COLETA DOS ÓRGÃOS	36
8.4 ANÁLISE DOS ÓRGÃOS MASCULINOS	37
8.4.1 Parâmetros espermáticos.....	37
8.4.1.1 Morfologia espermática	37
8.4.2 Histologia dos testículos.....	37
8.4.3 Parâmetros testiculares.....	37
8.4.3.1 Histomorfometria	38
8.4.3.1.1 Túbulos seminíferos	38
8.4.3.1.2 Células de Leydig.....	38
8.4.3.2 Estereologia	38

8.4.3.3 Comprimento total dos túbulos seminíferos	40
8.5 ANÁLISE DOS ÓRGÃOS FEMININOS	40
8.5.1 Histologia dos ovários	40
8.5.2 Parâmetros ovarianos	40
8.5.2.1 Histomorfometria	40
8.5.2.2 Estereologia	42
8.6 RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES	43
8.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
9 RESULTADOS.....	45
9.1 SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO.....	45
9.1.1 Morfologia espermática	45
9.1.2 Histomorfometria do testículo	46
9.1.2.1 Túbulos seminíferos	46
9.1.2.2 Células de Leydig	47
9.1.3 Estereologia do testículo	48
9.1.4 Comprimento total dos túbulos seminíferos	48
9.2 SISTEMA REPRODUTOR FEMININO.....	49
9.2.1 Histomorfometria dos folículos ovarianos	49
9.2.2 Estereologia do ovário	51
9.3 RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES.....	51
10 DISCUSSÃO.....	54
10.1 SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO.....	54
10.2 SISTEMA REPRODUTOR FEMININO.....	58
11 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

O manganês (Mn) é um metal essencial para o funcionamento do organismo humano, atuando no desenvolvimento e manutenção de diversos sistemas (ASCHNER; ASCHNER, 2005). Nos dias atuais, os seres vivos estão constantemente expostos a esse metal no ambiente, devido a sua ampla utilização no meio industrial (WHO, 2011), o que agrava a possibilidade de contaminação (MILLALEO et al., 2010). Tal exposição pode levar a toxicidade de sistemas como o cardiovascular, o nervoso e o reprodutor (CROSSGROVE; ZHENG, 2004).

Embora a neurotoxicidade provocada pelo Mn seja extensamente estudada (MARTINEZ-FINLEY et al., 2013; NEAL; GUILARTE, 2013; OKADA et al., 2016), a quantidade de informações sobre sua toxicidade reprodutiva ainda é baixa. Entretanto, sabe-se que este metal causa alterações nos níveis dos hormônios sexuais (CHANDEL; JAIN, 2017; SILVA et al., 2018), além de anormalidades morfofuncionais nas gônadas (ELBETIEHA et al., 2001; MOHAMMED et al., 2018; SILVA et al., 2018) e nos gametas (ADEDARA et al., 2017; SENGUPTA et al., 2015).

Além do mais, pouco se sabe sobre os efeitos que doses realistas de Mn, semelhantes às encontradas no ambiente, poderiam provocar sobre a morfologia do sistema reprodutor. Alterações morfológicas nas gônadas podem levar à redução da fertilidade e do desempenho reprodutivo devido ao seu papel funcional, como a produção dos gametas e de hormônios sexuais essenciais para a manutenção da reprodução. O fato do Mn atravessar a barreira placentária (FRASER et al., 2014; ZOTA et al., 2009) é outro fator que evidencia a importância do estudo, uma vez que a exposição materna ao metal pode levar a malformações embrionárias, inclusive no sistema reprodutor. Buscando identificar possíveis efeitos nocivos, o presente trabalho objetivou avaliar o impacto de concentrações realistas de Mn sobre a morfologia do sistema reprodutor, especialmente das gônadas, após exposição crônica e multigeracional.

2 MANGANÊS

O manganês (Mn) é um metal de transição que ocorre naturalmente no solo, água, rochas e alimentos de origem vegetal (IMnI, 2019; WILLIAMS et al., 2012), sendo o 12º elemento mais abundante da crosta terrestre (ROCHA, AFONSO, 2012). É um elemento traço representado pelo símbolo Mn, com número atômico 25, e massa atômica de 54,94. Pode se apresentar em 11 estados de oxidação (-3 ao +7) (GERBER et al., 2002), sendo o íon Mn^{2+} a forma mais estável (ROCHA; AFONSO, 2012). Esse metal pode ser encontrado na forma inorgânica, como cloreto de manganês ($MnCl_2$) e dióxido de manganês (MnO_2), e orgânica, como o MMT (tricarbonil metilciclopentadienil manganês) (WILLIAMS et al., 2012).

O Mn é amplamente utilizado na sociedade contemporânea. Uma de suas mais importantes aplicações se dá na indústria metalúrgica e por isso grande parte do Mn presente no ambiente é resultante de fontes antrópicas de liberação (WHO, 2011). É utilizado na fabricação de aço devido a sua capacidade desoxidante (NASCIMENTO; GONZALEZ, 2018; IMnI, 2019); na produção de ferro, por aumentar sua resistência a corrosão; na produção de ligas de cobre, utilizado para desoxidação e aumento da resistência mecânica; ou juntamente com outros metais, como zinco, magnésio, ouro, prata e bismuto, atuando como elemento de liga (IMnI, 2019). Seu uso não-metalúrgico mais importante é na fabricação de pilhas secas, como despolarizador. Também é utilizado na produção industrial de cosméticos, fertilizantes, fungicidas, vidros, cerâmicas e produtos farmacêuticos (IMnI, 2019; ROCHA; AFONSO, 2012; RUPPENTHAL, 2013), além de ser utilizado na forma de MMT como aditivo na gasolina (WHO, 2011).

O Mn é um elemento traço essencial ao organismo, encontrando-se predominantemente armazenado nos ossos, rins, fígado e pâncreas (SCHROEDER et al., 1966). Fisiologicamente, é requerido para o metabolismo de aminoácidos, proteínas e lipídeos (ASCHNER; ASCHNER, 2005). Entretanto, uma de suas principais funções é atuar no metabolismo de carboidratos, sendo responsável pela ativação de enzimas gluconeogênicas, como a piruvato carboxilase, e a síntese de mucopolissacarídeos (ZLOTKIN et al., 1995). Existem diversas enzimas Mn-dependentes, incluindo certos tipos de transferases, oxidoredutases, hidrolases, isomerases e ligases; há também metaloenzimas que apresentam o Mn como seu constituinte, como arginase, glutamina sintase e Mn superóxido dismutase (MnSOD)

(ASCHNER; ASCHNER, 2005). Além disso, o Mn contribui para o desenvolvimento e funcionamento do tecido ósseo e conjuntivo, e dos sistemas digestório, neural, reprodutivo e imune; auxilia na absorção do cálcio; participa dos mecanismos de defesa antioxidante; e atua no processo de coagulação e hemostasia juntamente com a vitamina K (ASCHNER; ASCHNER, 2005; ASCHNER et al., 2007; ERIKSON; ASCHNER, 2003).

As principais formas de exposição ao Mn ocorrem por inalação e ingestão, sendo que sua absorção se dá principalmente através do trato gastrointestinal e dos pulmões. A absorção do Mn varia de acordo com a quantidade de cálcio e ferro sérico, por compartilharem o mesmo transportador. Uma vez na circulação, o Mn é transportado ligado à transferrina e, em menor proporção, à albumina (BARCELOUX, 1999; MICHALKE et al., 2007; O'NEAL; ZHENG, 2015). Além disso, o Mn também pode ser carregado para o interior das células, o que facilita seu acúmulo em diversos tecidos. Esse carregamento ocorre por transportadores como DMT-1 (*Divalent Metal Transporter 1*), que transporta o Mn^{2+} ; TfR (*Transferrin Receptor*), capaz de transportar Mn^{3+} , que se liga à transferrina no plasma; além do transportador de colina, canais de Ca^{2+} e transportadores de Zn (ZIP8 e ZIP14) (MARTINEZ-FINLEY et al., 2013).

O órgão onde há maior acúmulo desse metal é o fígado, podendo também se acumular nos ossos, cérebro e pâncreas. O Mn é eliminado primariamente pela via fecal, através da liberação da bile no intestino. Em menores quantidades, sua excreção ocorre pela urina, leite e suor (MARTINEZ-FINLEY et al., 2013; O'NEAL; ZHENG, 2015).

2.1 TOXICIDADE DO MANGANÊS

Embora necessário para o organismo, o Mn em excesso pode causar quadros de toxicidade. Por estar abundantemente disponível no ambiente, a probabilidade de contaminação dos seres humanos também se torna grande. A principal forma de intoxicação por esse metal se dá através da exposição ocupacional, seguido da exposição oral, através da água e alimentos (CROSSGROVE; ZHENG, 2004; O'NEAL; ZHENG, 2015).

Primeiramente, a toxicidade do Mn ocorre no sistema nervoso central devido a sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, provocando o

desenvolvimento de síndromes parkinsonianas, como o manganismo (CROSSGROVE; ZHENG, 2004; O'NEAL; ZHENG, 2015; WILLIAMS et al., 2012). Além do mais, o Mn em excesso atinge outros tecidos, podendo causar: efeitos cardiovasculares como hipotensão, por agir como vasodilatador e inibição da contração do miocárdio (BRUROK et al., 1999; JIANG; ZHENG, 2005); insuficiência hepática; modulação de enzimas hepáticas, resultando em aumento do colesterol total e diminuição da síntese de bile (CROSSGROVE; ZHENG, 2004; SILVA et al., 2018); encefalopatia hepática (LONG et al., 2009); disfunção renal (SILVA et al., 2018); irritação dos pulmões; alterações no sistema reprodutor e na performance reprodutiva (ELBETIEHA, 2001; MOHAMMED et al., 2018; SILVA et al., 2018; WILLIAMS et al., 2012); além de efeitos embriotóxicos e fetotóxicos, uma vez que este metal atravessa a barreira placentária (ZOTA et al., 2009).

A nível celular, o principal alvo do Mn é a mitocôndria, onde interage com enzimas necessárias para a síntese de ATP, como o complexo I, complexo II e F1ATPase. O Mn também interfere no transporte intramitocondrial de Ca^{2+} , uma vez que se liga aos sítios de ligação do Ca^{2+} de carreadores importantes, como o transportador uniporte de Ca^{2+} . O Ca^{2+} intramitocondrial regula o índice de produção de ATP, através da ligação em sítios enzimáticos específicos, e ativa enzimas envolvidas com o ciclo de Krebs, como a piruvato desidrogenase. O Mn, por seu raio iônico similar ao Ca^{2+} (MARBANIANG, 2012), pode se ligar a esses sítios com mais afinidade do que o próprio Ca^{2+} . Além disso, uma vez que ocorre o influxo de Mn na mitocôndria, não existe um mecanismo eficiente de efluxo, o que leva ao seu acúmulo na organela (O'NEAL; ZHENG, 2015; TARALE et al., 2016). Assim, o Mn pode perturbar o funcionamento da cadeia de fosforilação oxidativa, aumentando a geração de radicais livres, o que provoca estresse oxidativo (CHANDEL; JAIN, 2017); ou ligar-se ao citocromo C, levando a perda do potencial elétrico mitocondrial (TARALE et al., 2016).

Dessa forma, o Mn é essencial ao organismo quando presente em quantidades fisiológicas, porém seu excesso pode ser prejudicial. A Anvisa (2011) determinou que o limite máximo seguro de Mn contido na água mineral é de 0,4 mg/L, sendo que a Organização Mundial da Saúde afirma que tal limite está acima da quantidade realmente encontrada, sendo considerado seguro (WHO, 2011; WHO, 2017). Porém, FRISBIE et al. (2012; 2015) constatou que mais de 50 países apresentam valores acima do recomendado na água. No município de São José do

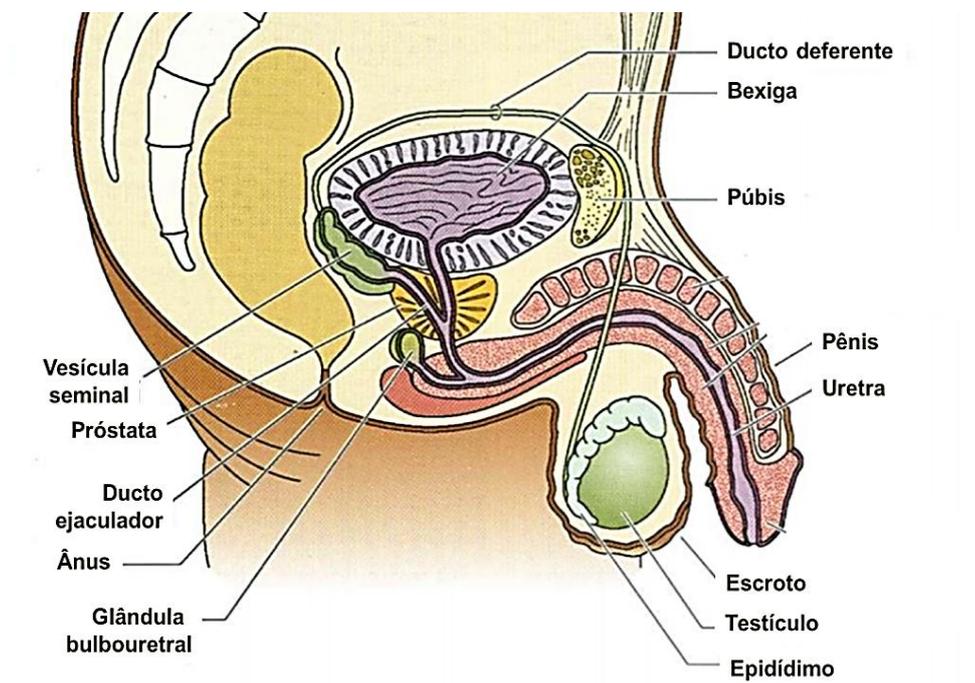
Vale do Rio Preto, Rio de Janeiro, um laudo de um poço artesiano que abastece mais de 1500 pessoas mostrou que a quantidade de manganês presente ultrapassava 1,7 mg/L (SCARINI, 2017).

No Brasil, a contaminação do meio ambiente pelo Mn se tornou ainda mais importante após os acidentes envolvendo rompimento de barragens de rejeitos de mineração em Minas Gerais, Brasil. A Fundação SOS Mata Atlântica (2017) analisou a qualidade da água em 18 pontos da bacia do Rio Doce dois anos após o rompimento da Barragem de Fundão no distrito de Bento Rodrigues, município de Mariana, MG e constatou que em 13 desses pontos a concentração de Mn estava acima dos limites permitidos. Em 2019, um mês após o rompimento da barragem de rejeitos da mineradora Vale, no complexo minerário do Córrego do Feijão, Brumadinho, MG, a Fundação analisou a qualidade da água na bacia hidrográfica do Rio Paraopeba. Em todos os 20 pontos analisados, a concentração de Mn apresentou-se acima dos limites máximos permitidos. Os laudos oficiais da qualidade da água foram elaborados pelo Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM), Agência Nacional de Águas (ANA), Serviço Geológico do Brasil (CPMR) e Companhia de Saneamento de Minas Gerais (Copasa) (SOS Mata Atlântica, 2019). Dessa maneira, a população brasileira, principalmente a que vive nas proximidades das áreas atingidas, está exposta continuamente a elevadas concentrações de Mn.

3 SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

O sistema reprodutor masculino humano (FIGURA 1) é composto pelo testículo, órgão responsável pela produção dos espermatozoides, e órgãos sexuais acessórios, que protegem, nutrem e transportam os gametas após terem deixado as gônadas. Esses são: epidídimo, vesículas seminais, próstata, glândulas bulbouretrais, pênis e os ductos deferente e ejaculatório (VERONEZ, 2012). O camundongo apresenta os mesmos órgãos sexuais e acessórios, além das glândulas ampulárias e prepuciais. São poucas as diferenças anatômicas entre o sistema reprodutor masculino humano e de roedores, sendo uma delas o fato da próstata humana apresentar apenas um lobo, enquanto a murina apresenta quatro lobos distintos. Além disso, o pênis de roedores apresenta estrutura óssea chamada báculo, que permite ao macho penetrar a fêmea antes da ereção (KNOBLAUGH, TRUE, 2012; SOUZA et al., 2014).

FIGURA 1 – ANATOMIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO.

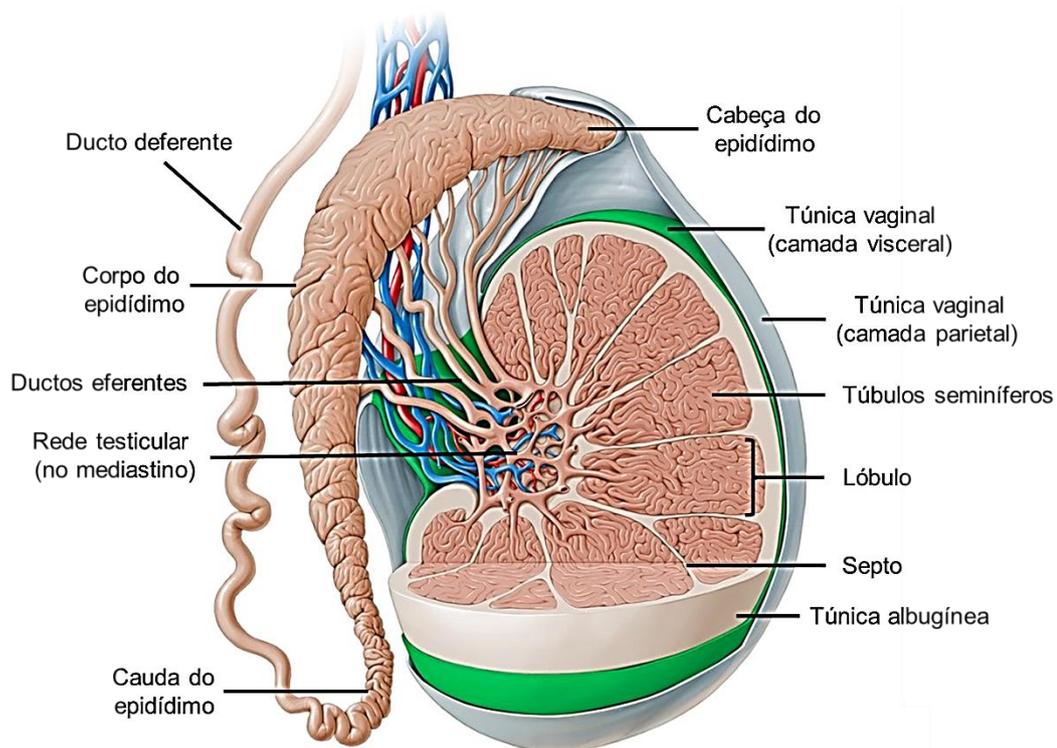


FONTE: Adaptado de Gartner; Hiatt, 2003.

Os testículos localizam-se no saco escrotal, fora da cavidade abdominal, mantendo-se suspensos pelo funículo espermático. São revestidos por túnicas originadas das lâminas que recobrem a parede abdominal, sendo elas a túnica vaginal, composta por lâmina visceral e parietal, e a túnica albugínea, da qual

partem septos que dividem o testículo em lóbulos. Dentro de cada lóbulo, encontram-se túbulos contorcidos responsáveis pela produção dos gametas, os túbulos seminíferos (FIGURA 2) (JOHNSON et al., 2015; VERONEZ, 2012). Assim, em termos morfofuncionais, é possível dividir o testículo dos mamíferos em compartimento tubular e intertubular. O compartimento tubular é constituído pelos túbulos seminíferos, representando a maior parte do parênquima testicular. No compartimento intertubular estão presentes o tecido conjuntivo, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos. Neste espaço também se encontram as células de Leydig, responsáveis pela síntese de testosterona, hormônio essencial para a atividade gametogênica e sexual do macho adulto (RUSSELL et al., 1990; RUSSELL, 1996; VERONEZ, 2013;).

FIGURA 2 – ANATOMIA DO TESTÍCULO.

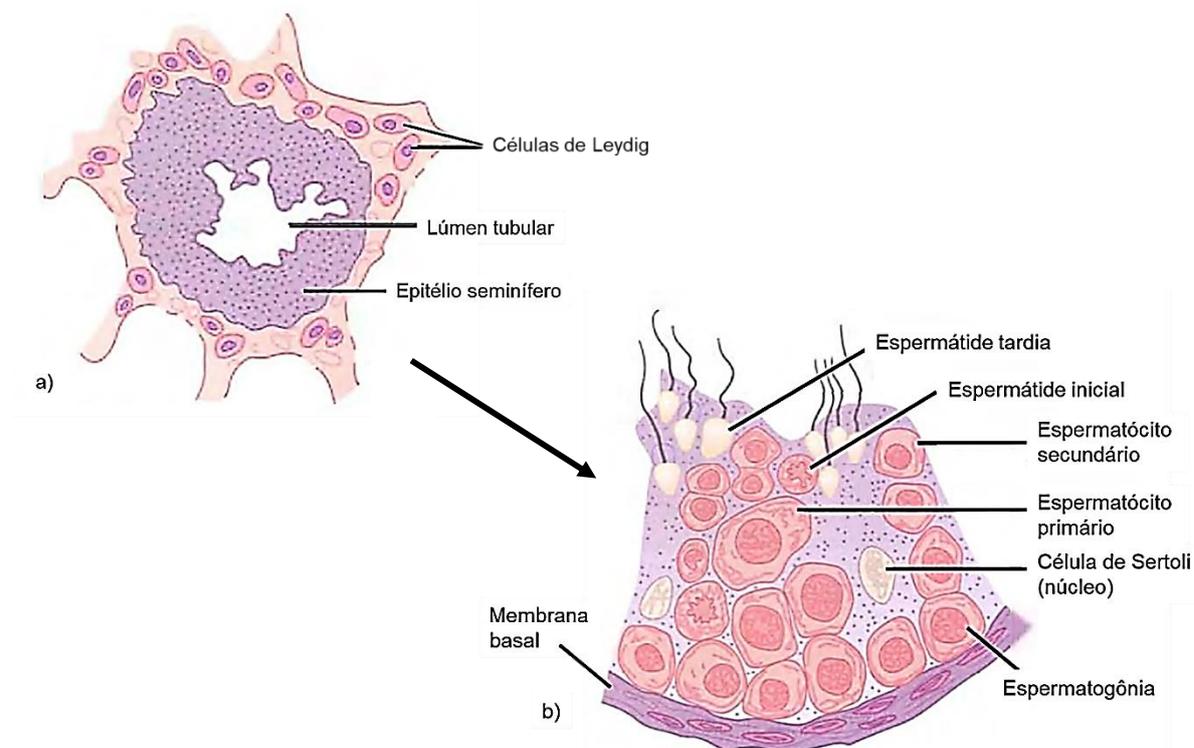


FONTE: Adaptado de Kenhub, 2019.

Os túbulos seminíferos (FIGURA 3a) são compostos pelo epitélio seminífero, lúmen tubular e túnica própria. No epitélio seminífero estão presentes dois tipos celulares: células de Sertoli e células germinativas (RUSSELL et al., 1990). As células de Sertoli possuem várias funções, sendo a principal o estabelecimento da barreira hematotesticular, através de junções de oclusão, especializações

ectoplasmáticas, desmossomos e junções comunicantes, criando um ambiente imunologicamente privilegiado, ideal para a gametogênese (KOPERA et al., 2010). Também nutrem as células germinativas por meio da secreção de lactato, produzido a partir da glicose sérica e polipeptídeos mitogênicos; provêm suporte estrutural e fatores de crescimento para as células em desenvolvimento; realizam a fagocitose de células germinativas em degeneração e do excesso de citoplasma durante a espermiogênese (BALARINI, 2013; FRANÇA; RUSSELL, 1996; JOHNSON et al., 2015), além de apresentarem papel fundamental na formação embrionária dos testículos, sequestrando as células germinativas e impedindo que entrem em meiose (GRISWOLD, 1998). As células germinativas, por sua vez, são as responsáveis pela espermatogênese, processo contínuo e altamente organizado de divisão celular. Nesse processo, as espermatogônias, localizadas no compartimento basal do epitélio seminífero, se diferenciam em espermatócitos primários, espermatócitos secundários, espermatídes e, por fim, em espermatozoides (FIGURA 3b) (BALARINI, 2013; FRANÇA et al., 2005; RODRIGUES, 2010).

FIGURA 3 - HISTOLOGIA DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS.

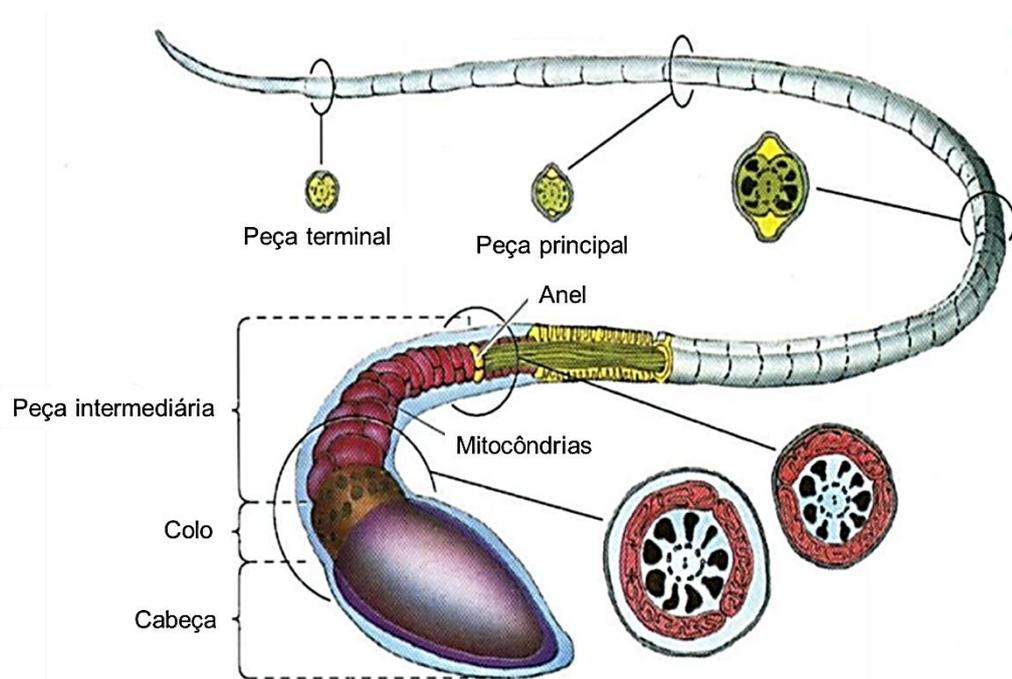


a) Corte transversal do túbulo seminífero. b) Epitélio seminífero.

FONTE: Adaptado de Guyton, Hall, 2011.

Os espermatozoides são os gametas masculinos, células haploides especializadas em uma única atividade funcional: garantir a liberação do material genético masculino dentro do citoplasma do oócito, gameta feminino, visando a formação de um zigoto (JOHNSON et al., 2015; SANTOS, 2017). Estruturalmente são divididos em cabeça, peça principal, peça intermediária, peça terminal e cauda (FIGURA 4). Na cabeça encontra-se o material genético altamente condensado e o acrossomo, estrutura que contém enzimas hidrolíticas envolvidas com o processo de fertilização. Na peça intermediária estão localizadas inúmeras mitocôndrias, responsáveis pelo fornecimento de energia para a motilidade espermática, enquanto a cauda é responsável pela locomoção do espermatozoide a partir do movimento flagelar (GARNER; HAFEZ, 2016; JOHNSON et al., 2015).

FIGURA 4 - ESTRUTURAS DO ESPERMATOZOIDE.



FONTE: Adaptado de Gartner; Hiatt, 2003.

Após sua diferenciação, os espermatozoides são direcionados para o epidídimo, onde passam pelo processo de maturação. Durante o trânsito epididimário ocorre a modificação de múltiplas características, como a condensação da cromatina, remodelagem nuclear, aquisição da motilidade, reestruturação do acrossomo e alterações na composição das proteínas da membrana plasmática. Na maioria dos mamíferos somente os espermatozoides que já alcançaram a cauda do

epidídimo estão efetivamente maduros e possuem o potencial de fertilização (GARNER; HAFEZ, 2016; JOHNSON et al.; 2015; SANTOS, 2017).

O controle hormonal da produção espermática e demais funções reprodutivas do sistema reprodutor masculino se dá através do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. O hipotálamo produz GnRH, responsável pela liberação do hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículoestimulante (FSH) pela hipófise, hormônios que agem diretamente nos testículos. O LH é o principal regulador da estereoidogênese, atuando sobre a síntese de testosterona pelas células de Leydig. O FSH, por sua vez, atua no desenvolvimento e diferenciação das células de Sertoli, promovendo a iniciação e manutenção da espermatogênese (JOHNSON et al., 2015).

4 SISTEMA REPRODUTOR FEMININO

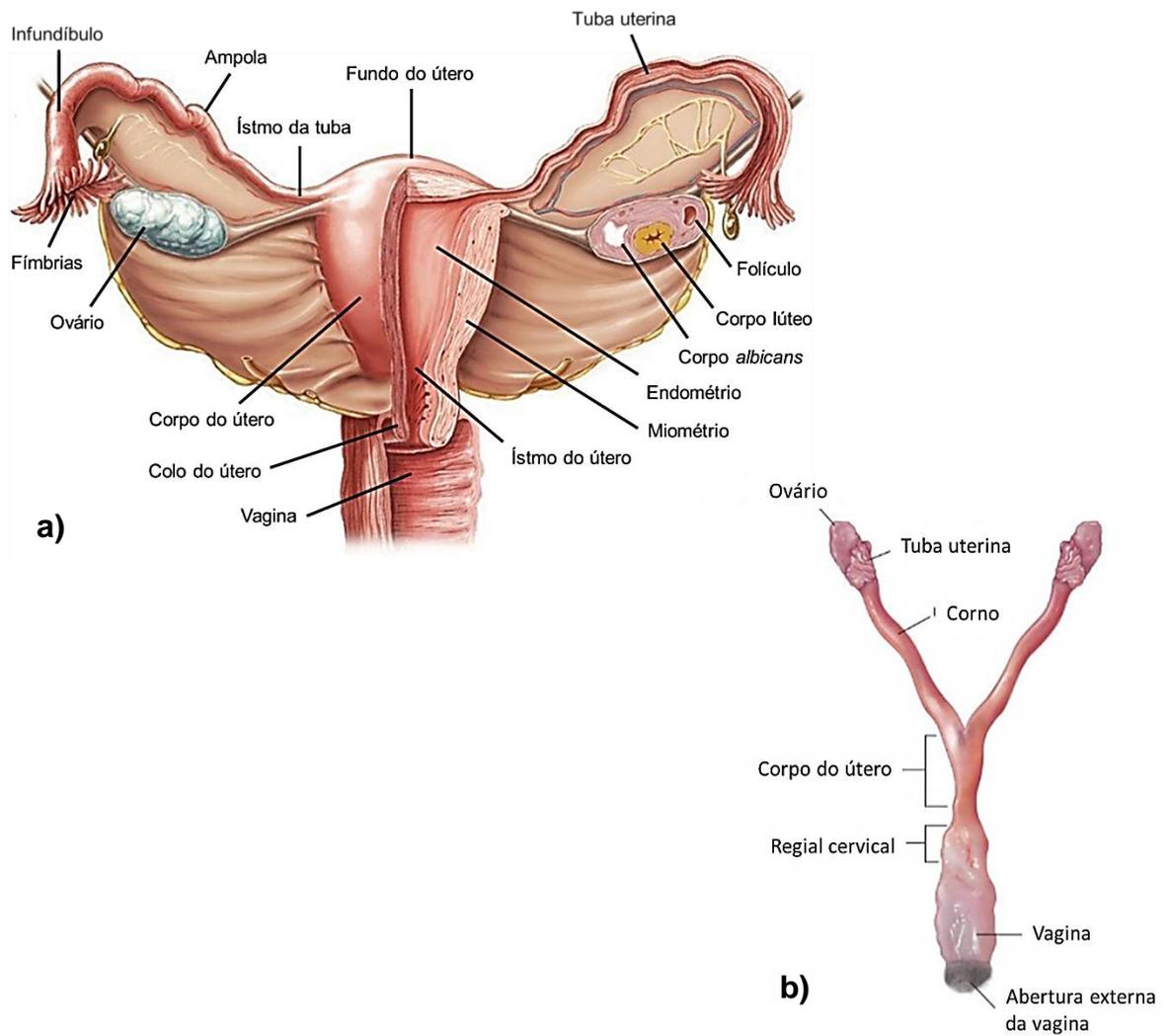
4.1 ANATOMIA

O sistema reprodutor feminino, de maneira geral (FIGURA 5a), é constituído internamente pelo útero, ovários, tubas uterinas, vagina e, externamente, pela vulva. Entretanto, há algumas diferenças anatômicas entre os mamíferos. Em humanos, os órgãos eréteis femininos são o clitóris, análogo do pênis, e os bulbos vestibulares, homólogos do bulbo e do corpo esponjoso do pênis. Há também glândulas anexas, sendo as glândulas vestibulares maiores e menores (BERNARDES, 2011). Os camundongos e os humanos apresentam características morfológicas semelhantes, sendo que as principais divergências são anatômicas (FIGURA 5b), enquanto os parâmetros histológicos e funcionais são mais similares (RENDI et al., 2012). As diferenças mais relevantes estão descritas no texto.

O útero humano localiza-se na pelve, entre a bexiga e o reto; é um órgão muscular, em forma de pera invertida (VERONEZ, 2012), que pode ser dividido em porções: fundo, onde ocorre a implantação do embrião; corpo; istmo; e colo ou cérvix, porção que conecta o útero a vagina. A parede do útero é composta por três estratos: perimétrio, camada serosa mais externa, contínua com o peritônio pélvico e abdominal, sendo a parte remanescente da superfície anterior constituída por uma adventícia; miométrio, camada muscular espessa, subdividida em três estratos de músculo liso; e endométrio, membrana mucosa formada por revestimento epitelial e estroma (BATES; BOWLING, 2013; BERNARDES, 2011; VERONEZ, 2012). Porém, vale ressaltar que roedores possuem útero bicornio, apresentando septo medial e cornos longos que se unem em um pequeno corpo uterino, diferente do observado em humanos (GRAVINA et al., 2014; RUGH, 1968).

As tubas uterinas são tubos musculares compostos por quatro porções, sendo elas: porção intramural, situada na espessura da parede uterina; istmo, porção estreitada; ampola, porção dilatada; e infundíbulo, extremidade distal da tuba. As tubas permitem o transporte dos oócitos para o útero a cada oocitação e propiciam o sítio para a fecundação do oócito pelo espermatozoide (SANTOS, 2009; VERONEZ, 2012).

FIGURA 5 - ANATOMIA DO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO.

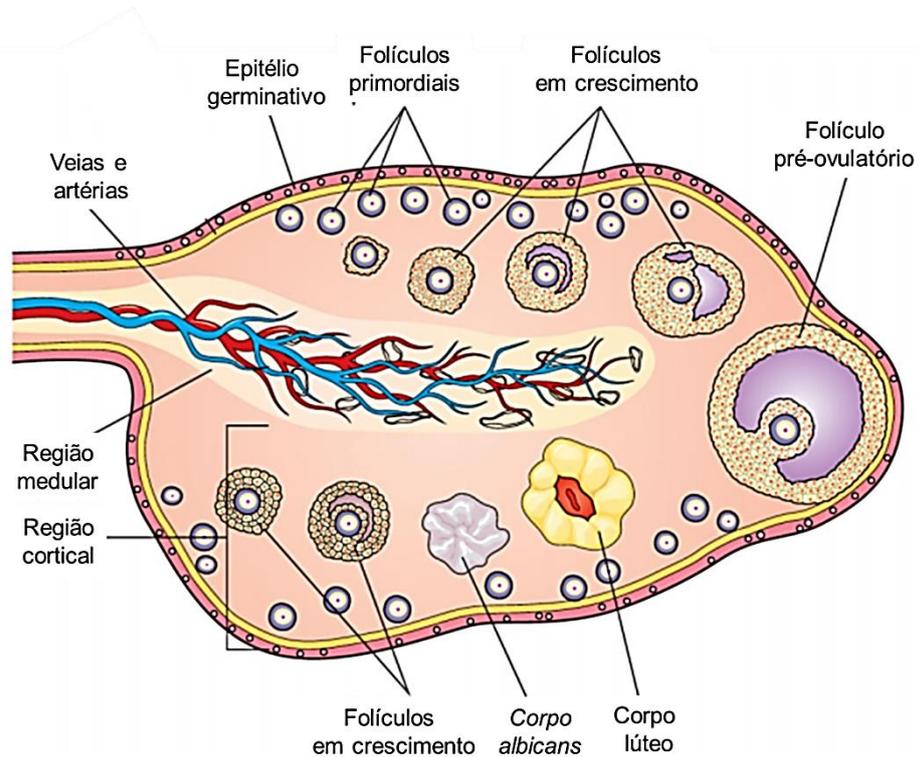


A) Sistema reprodutor feminino humano. B) Sistema reprodutor feminino de camundongo.

FONTE: Adaptado de Kenhub, 2019; adaptado de Rendi et al., 2012.

Os ovários são as gônadas femininas, localizados na fossa ovárica, posteriormente à bexiga, em humanos (VERONEZ, 2012) e lateralmente aos rins nos roedores (RUGH, 1968). São estruturas pares, nodulosas, divididas em 3 regiões (FIGURA 6): córtex, porção delimitada pelo epitélio germinativo, que apresenta o estroma e os folículos ovarianos; medula, local de intensa vascularização e heterogeneidade celular; e hilo, região por onde passam nervos e vasos (FERNANDES et al., 2003; VERONEZ, 2012). Apresentam duas funções principais: a produção dos hormônios sexuais femininos (estrogênio e progesterona) e a liberação dos oócitos, os gametas femininos (BATES; BOWLING, 2013).

FIGURA 6 - ESTRUTURAS DO OVÁRIO E FOLÍCULOS OVARIANOS.



FONTE: Junqueira; Carneiro, 2017.

4.2 FOLICULOGÊNESE

Embora a duração da foliculogênese seja diferente em humanos e camundongos, a maturação dos folículos acontece de maneira similar, sob a influência dos mesmos hormônios. Assim como nos humanos, os folículos ovarianos dos roedores são classificados de acordo com seu diâmetro, quantidade de camadas de células granulosas e presença ou ausência de espaço antral (RENDI et al., 2012).

Os folículos ovarianos são compostos internamente por um antro cheio de líquido, onde estão as oogônias (as células germinativas femininas) e são circundados por uma camada interna de células granulosas e uma de células tecais, mais externa (BATES; BOWLING, 2013).

Assim como no sistema reprodutor masculino, o controle das funções reprodutivas femininas acontece através do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Quando a mulher chega à idade reprodutiva, a liberação pulsátil de FSH e LH dá início ao ciclo sexual feminino. As gonadotrofinas levarão à síntese dos hormônios

sexuais pelo ovário e a determinação do folículo dominante, destinado à oocitação (BAERWALD et al., 2011).

O desenvolvimento dos oócitos em humanos se inicia na vida fetal, enquanto nos roedores, a reserva de folículos primordiais é formada no período neonatal, sendo que após o nascimento, os ovários apresentam apenas oogônias (MCGEE, HSUEH, 2000). Nos humanos, por volta da 7ª semana de gestação, inicia-se a diferenciação das células germinativas primordiais em oogônias. A partir do 3º mês de gestação, as oogônias entram em meiose e se convertem em oócitos primários, permanecendo retidas na fase de prófase até o início da oocitação. Esse oócito fica envolvido por células foliculares pavimentosas chamadas células granulosas, formando a estrutura do folículo primordial, que permanece em repouso até a puberdade. A partir dessa fase, os folículos abandonam o estado quiescente e entram em crescimento folicular, estimulado pelo FSH.

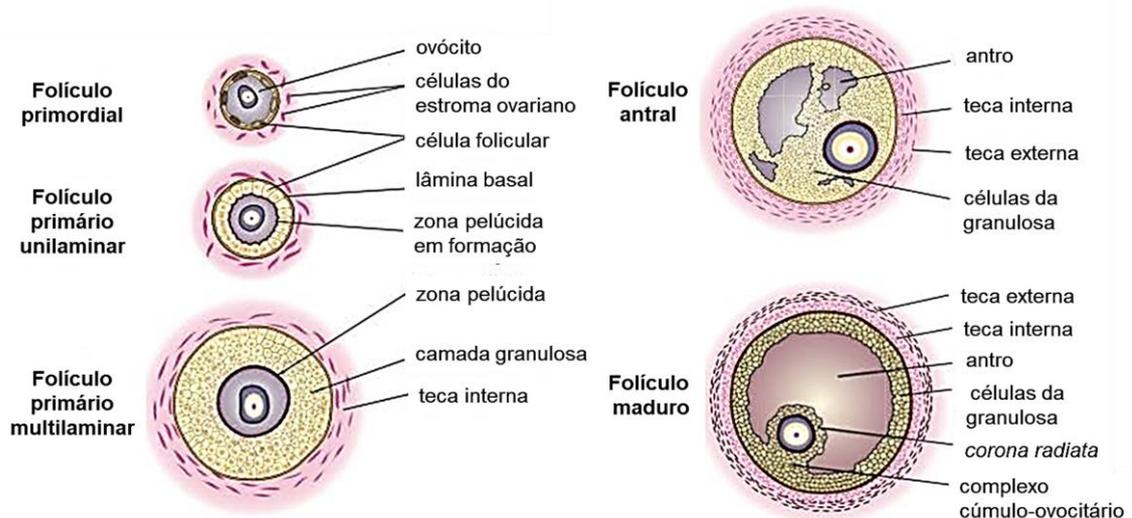
O oócito cresce rapidamente, quadruplicando de tamanho, e as células granulosas formam uma única camada de células cubóides, sendo que o folículo passa a ser classificado como folículo primário unilaminar. Conforme essas células continuam a se dividir, o epitélio simples se espessa, se tornando estratificado, e o folículo se transforma em um folículo primário multilaminar, também chamado de folículo pré-antral. Nessa etapa, desenvolve-se entre as células foliculares e o oócito uma camada glicoproteica denominada zona pelúcida (BATES; BOWLING, 2013; KIERSZENBAUM, 2008). A camada de células da granulosa passa a secretar o líquido folicular, que apresenta altas concentrações de hormônios esteroides e se acumula entre as células, formando pequenas cavidades que, após a reorganização celular, culminam na formação de um antro. Enquanto ocorrem essas modificações, células derivadas do estroma ovariano agrupam-se ao redor das células granulosas, constituindo a camada de células tecais. A teca se diferencia em duas camadas: a teca interna, composta por células produtoras de esteroides; e a teca externa, tecido conjuntivo que encapsula o folículo. Nessa fase, o folículo é considerado um folículo secundário ou antral (GUYTON; HALL, 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; KIERSZENBAUM, 2008).

Durante a reorganização da camada granulosa, algumas células se agrupam próximo à parede folicular; são as células do *cumulus*, que sustentam o oócito formando o complexo cúmulo-ovocitário. Outro pequeno grupo de células se

acumula ao redor do oócito formando a *corona radiata*, firmemente aderida à zona pelúcida, que irá acompanhar o oócito após sua liberação.

O folículo maduro, também chamado de folículo pré-ovulatório ou de Graaf, é aquele que irá passar pelo processo de oocitação. Esse folículo é definido pela presença seguintes características: antro contendo líquido folicular; zona pelúcida revestida pela *corona radiata*; oócito circundado pela corona radiata, desprendido do cumulo-ovocitário; término da meiose I antes da oocitação, resultando no oócito secundário e aparecimento do primeiro corpúsculo polar (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; KIERSZENBAUM, 2008). Os diferentes estágios dos folículos ovarianos são vistos na Figura 7.

FIGURA 7 - ESTÁGIOS DOS FOLÍCULOS OVARIANOS E SUAS ESTRUTURAS.



FONTE: Junqueira; Carneiro, 2017.

A cada mês, uma gama de folículos ovarianos começam a crescer. A quantidade elevada de FSH induz as células da granulosa a aumentarem o número de receptores para FSH em suas membranas, o que as tornam mais sensíveis ao hormônio. As células tecais internas passam a expressar um número crescente de receptores para LH que, ao serem estimulados, resultam na síntese de androstenediona, que é transportada para as células granulosas. Sob a ação do FSH, essas células convertem andrógenos em estrógenos, que irão dar suporte para o desenvolvimento do oócito. O folículo que expressar a maior quantidade de receptores para FSH se torna o folículo dominante, aquele que irá atingir a fase de folículo maduro e sofrer oocitação. O restante dos folículos que iniciou o processo de

maturação sofre involução atrésica e são eliminados. Os folículos atrésicos são identificados por uma espessa membrana basal chamada membrana vítrea, uma zona pelúcida intacta, oócitos e células foliculares degenerados e macrófagos invasores (BATES; BOWLING, 2013; GOUGEON, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; KIERSZENBAUM, 2008; MYERS et al., 2004).

4.3 CICLO REPRODUTIVO

4.3.1 Ciclo menstrual

O ciclo sexual feminino, denominado ciclo menstrual, tem duração média de 28 dias e pode ser dividido didaticamente em três fases: folicular, ovulatória e lútea. A fase folicular é caracterizada pelo crescimento dos folículos. Inicia-se no primeiro dia do ciclo menstrual, quando os níveis baixos de estrogênio e progesterona levam ao desprendimento do endométrio no processo de menstruação. Aproximadamente 6 dias depois, o útero começa a se preparar novamente para receber uma possível gravidez. A secreção de estrógenos é aumentada em resposta ao FSH, como já foi descrito, e o folículo dominante é selecionado (ARAÚJO et al., 2015; SOUZA, 2017). A fase ovulatória é marcada por níveis altos de LH e FSH. O aumento acentuado da secreção de LH (pico de LH) estimula a ruptura da parede do folículo, promovendo a liberação do oócito revestido por células do *cumulus*. O oócito é capturado pelas fimbrias para o interior da tuba uterina, onde reinicia a meiose I. Uma das células originadas retém a menor parte do citoplasma, tornando-se o primeiro corpúsculo polar. O oócito, que reteve a maior parte do citoplasma, inicia a segunda divisão meiótica, bloqueando-a na metáfase; a meiose II só voltará a acontecer se houver a fecundação (ADONA et al., 2015; SANTOS, 2009; SOUZA, 2017).

Durante o pico de LH, os níveis de estrogênio decaem, enquanto os de progesterona continuam a aumentar. Quando a fase lútea se inicia, o folículo dominante forma o corpo lúteo e secreta progesterona de maneira pulsátil, em resposta ao LH. O estrogênio volta a ser secretado, e, juntamente com a progesterona, inibe as gonadotrofinas, impedindo o desenvolvimento dos folículos ovarianos durante essa fase. Se o resultado da oocitação for um oócito fertilizado, o embrião será implantado no endométrio, onde iniciará a secreção de gonadotrofina coriônica, hormônio que dá suporte ao corpo lúteo e sua produção hormonal. Se não

houver fecundação, o corpo lúteo sofre involução cerca de 14 dias após a oocitação, e se converte em *corpo albicans*. Essa degeneração provoca a queda dos níveis de progesterona e estrogênio, o que leva à menstruação, e reinício do ciclo (BATES; BOWLING, 2013; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; KIERSZENBAUM, 2008; SANTOS, 2009; SOUZA, 2017).

4.3.2 Ciclo estral

O ciclo reprodutivo das fêmeas de camundongos é denominado ciclo estral e, apesar de ter duração muito menor, acaba por ser similar ao ciclo menstrual. É didaticamente dividido em quatro fases: proestro, estro, metaestro (ou diestro I) e diestro (ou diestro II) (MARCONDES et al., 2002). Assim como nos seres humanos, a atividade ovariana está sujeita às variações nos níveis dos hormônios sexuais (VILELA et al., 2007). No camundongo a puberdade tem início entre 21 e 28 dias; a abertura vaginal ocorre entre 25 a 40 dias, e entre 6 e 8 semanas se inicia a oocitação (BRAGA, 2017). Ao atingir a idade reprodutiva, a fêmea apresenta aumento nos níveis séricos de estradiol, levando à abertura vaginal e ao primeiro estro. O estradiol provoca o pico de LH, que ocasionará a oocitação (CHORILLI et al., 2009; GUERRA, 2013). Talvez a diferença mais importante entre camundongos e humanos no que diz respeito à oocitação é o fato de vários folículos passarem pelo crescimento simultaneamente em ambas as espécies, porém apenas um folículo dominante é selecionado em humanos, enquanto nos camundongos ocorre a seleção de diversos folículos dominantes (RENDI et al., 2012).

O ciclo estral apresenta duração de 4 a 5 dias, sendo que cada fase dura em média 24 horas. O proestro corresponde ao dia pré-ovulatório, sendo a fase na qual ocorre o crescimento folicular sob a influência do FSH, havendo predominância de corpos lúteos em degeneração e folículos maduros, ocorrendo a secreção de estrógeno e o pico de LH, assim como nos humanos. A oocitação ocorre de 8 a 11 horas após o início do estro, fase na qual a fêmea está sexualmente receptiva, no período do cio. A fase luteínica ocorre no metaestro e diestro. No metaestro há diminuição dos níveis de estrógeno e início da secreção de progesterona pelos corpos lúteos, com grande proporção de folículos pré-antrais em crescimento. O diestro é a fase na qual folículos antrais são predominantes, e são encontradas as maiores concentrações de progesterona, sendo que os corpos lúteos atingem seu maior tamanho; caso ocorra a fecundação, essa fase é prolongada (BRAGA, 2017;

CHORILLI et al., 2009; COSTA, 2010; VIDAL, FILGO, 2017; VILELA et al., 2007; YOSHIDA et al., 2009).

5 TOXICIDADE REPRODUTIVA DO MANGANÊS

5.1 SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

O sistema reprodutor é muito sensível às quantidades excessivas de Mn, e sua toxicidade pode levar a consequências como: impotência sexual e perda de libido (BATAINEH et al., 1998); diminuição da produção de hormônios do eixo hipófise-hipotalâmico (FSH e LH) (CHANDEL; JAIN, 2017); queda dos níveis de testosterona (ADEDARA et al., 2017; MOHAMMED et al., 2018; ZENG et al., 2015); redução da massa de órgãos reprodutores andrógeno-dependentes (como epidídimo e próstata); anormalidades celulares no epitélio seminífero; alterações histológicas nos testículos, como diminuição do diâmetro e comprimento dos túbulos seminíferos (MOHAMMED et al., 2018; SILVA et al., 2018).

A toxicidade provocada pelo Mn prejudica a defesa antioxidante dos órgãos, tornando-os vulneráveis ao estresse oxidativo, o que pode causar disfunções mitocondriais e, conseqüentemente, deformações espermáticas (PAHUNE et al., 2013). Animais expostos ao Mn apresentam diminuição da produção de espermatozoides; alterações na motilidade e morfologia espermática (ADERARA et al., 2017); e perda de potencial reprodutivo, através da redução da fecundidade e fertilidade (ELBETIEHA, 2001).

Embora os estudos citados acima revelem os efeitos tóxicos do Mn sobre o sistema reprodutor de animais, já é comprovado que o mesmo acontece em humanos, quando expostos às concentrações desse metal presentes no ambiente. Jain et al. (2016) encontraram níveis séricos elevados de metais, entre eles o Mn, em homens que apresentam azoospermia e oligospermia. Além disso, esse elemento também tem sido correlacionado com fatores de diminuição da motilidade (YANG et al., 2018) e apoptose em espermatozoides (WANG et al., 2016). Wirth et al. (2007) e Yuyan et al. (2012) demonstraram a diminuição da qualidade do sêmen e potencial de fertilização de espermatozoides após exposição ocupacional ao manganês.

5.2 SISTEMA REPRODUTOR FEMININO

A grande maioria dos estudos sobre a toxicidade reprodutiva do Mn é focada no sistema reprodutor masculino. Entretanto, sabe-se que o Mn pode afetar o

sistema reprodutor feminino de diversas maneiras. A exposição crônica a doses altas de Mn leva ao aumento do peso dos ovários e do útero (ELBETIEHA et al., 2001); redução da fertilidade (LASKEY et al., 1982); redução do número de folículos ovarianos; indução de corpos lúteos persistentes e atraso no dia da abertura vaginal em ratas (SENGUPTA et al., 2015). A administração intraventricular do Mn em fêmeas no período pré-puberal pode estimular a liberação de LH, antecipando o início da puberdade. Ocorre, também, o aumento dos níveis séricos de FSH e estradiol (LEE et al., 2007; PINE et al., 2005).

Além disso, a exposição de fêmeas prenhas ao Mn pode reduzir significativamente o número de implantações e a quantidade de fetos viáveis (ELBETIEHA et al., 2001). Neste sentido, o estudo conduzido por Sanchez et al. (1993) demonstrou que a exposição ao Mn durante a gestação leva ao aumento do número de natimortos, além de provocar retardos no crescimento e anencefalia. Entretanto, ainda assim, a literatura acerca dos efeitos da exposição ao Mn na funcionalidade do sistema reprodutor feminino é escassa.

Pesquisas realizadas com outros metais também mostraram efeitos nocivos sobre o sistema reprodutor feminino. Fêmeas expostas ao cádmio (Cd) apresentaram acúmulo deste metal no tecido endometrial (RZYIMSKI et al., 2014); aumento do risco de câncer endometrial e endometriose (BORJA-ABURTO, 1999; RZYIMSKI et al., 2014); alterações hemorrágicas no útero e ovários; e persistência do processo ovulatório (BARANSKI, 1987). Já a exposição ao chumbo (Pb) pode levar a abortos espontâneos, uma vez que é um potencial agente teratogênico (RZYIMSKI et al., 2015). Silberstein et al. (2006) relacionaram a presença de altos níveis de chumbo nos folículos ovarianos com baixos índices de gravidez. Também foi observado aumento do número de folículos antrais que sofreram atresia, os quais apresentavam células granulosas com núcleos picnóticos e hipertrofia das células tecais (TAUPEAU et al., 2001). Outro metal danoso para o sistema reprodutor feminino é o mercúrio (Hg), cuja exposição crônica é prejudicial à implantação de embriões e ao desenvolvimento folicular, além de provocar malformações congênitas, infertilidade e inibição da oocitação (SCHUURS, 1999).

6 JUSTIFICATIVA

Como foi apresentado, o Mn encontra-se naturalmente presente no ambiente, sendo que a exposição a esse metal, tanto aguda quanto crônica, pode levar a disfunções nos sistemas orgânicos. A OMS estabeleceu a quantidade hídrica limite de Mn considerada segura, afirmando que as quantidades reais encontradas estão abaixo desses valores. Porém, há estudos que mostram locais onde as quantidades do metal extrapolam esses limites (FRISBIE et al., 2015; 2017). Já foi comprovado que exposição não somente a quantidades elevadas de Mn, mas também a concentrações baixas, pode causar toxicidade ao organismo, como mostram estudos em relação ao sistema nervoso (BATSCHAUER, 2018; OKADA et al., 2016), sendo indicado que o mesmo ocorra com o sistema reprodutor (SOUZA et al., 2019a).

Existe na literatura grande escassez de trabalhos que utilizem doses realistas de Mn para avaliar os efeitos deste metal sobre a morfologia das gônadas e dos gametas, que, quando afetada, acarreta em alterações no sistema como um todo, uma vez que está diretamente ligada à função celular. Além disso, o presente trabalho também avalia os impactos do Mn através da exposição multigeracional, o que expõe a prole em períodos críticos de seu desenvolvimento.

Sendo assim, foi possível esclarecer se as doses realistas de Mn, às quais a população está exposta através do meio ambiente, exercem efeitos tóxicos sobre os parâmetros morfológicos do sistema reprodutor por meio da exposição ao longo de uma geração. As informações obtidas através deste trabalho poderão ser acrescentadas àquelas já existentes sobre a toxicidade do Mn como forma de mostrar que a presença desse metal, mesmo em concentrações baixas, pode ser prejudicial à saúde reprodutiva do ser humano, utilizando camundongos como organismo teste.

7 OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição crônica e multigeracional a doses realistas de manganês sobre a morfologia do sistema reprodutor de camundongos Swiss.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar o impacto do Mn sobre a morfologia testicular através de análises morfométricas e estereológicas.
2. Investigar as alterações causadas pelo Mn sobre a morfologia espermática.
3. Analisar as consequências da exposição ao Mn sobre a morfologia ovariana, através de análises morfométricas e estereológicas.
4. Comparar se existem diferenças entre as possíveis alterações encontradas entre machos e fêmeas nas diferentes gerações.

8 MATERIAL E MÉTODOS

8.1 ANIMAIS

O modelo animal utilizado para as análises desta pesquisa foi o camundongo Swiss. Os camundongos, fornecidos pelo biotério da Universidade Federal do Paraná, foram provenientes do projeto de mestrado de Amandia Ramos Batschauer, intitulado “Avaliação do efeito neurotóxico do manganês na prole de camundongos após exposição parental e direta”.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), parecer número 1015/2016.

8.2 DESENHO EXPERIMENTAL

8.2.1 Geração F0

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

Os animais foram pesados e divididos, randomicamente, em 4 grupos com 10 fêmeas cada, e 4 grupos com 5 machos cada. Os grupos foram expostos ao cloreto de manganês (MnCl_2 - Sigma-Aldrich®) por 60 dias, via gavagem, para a qual foi realizada contenção manual dos animais, com a sonda introduzida até o estômago. As doses utilizadas foram 0 (grupo controle), 0,013, 0,13 e 1,3 mg/kg/dia, e os animais foram pesados semanalmente para o ajuste da dose.

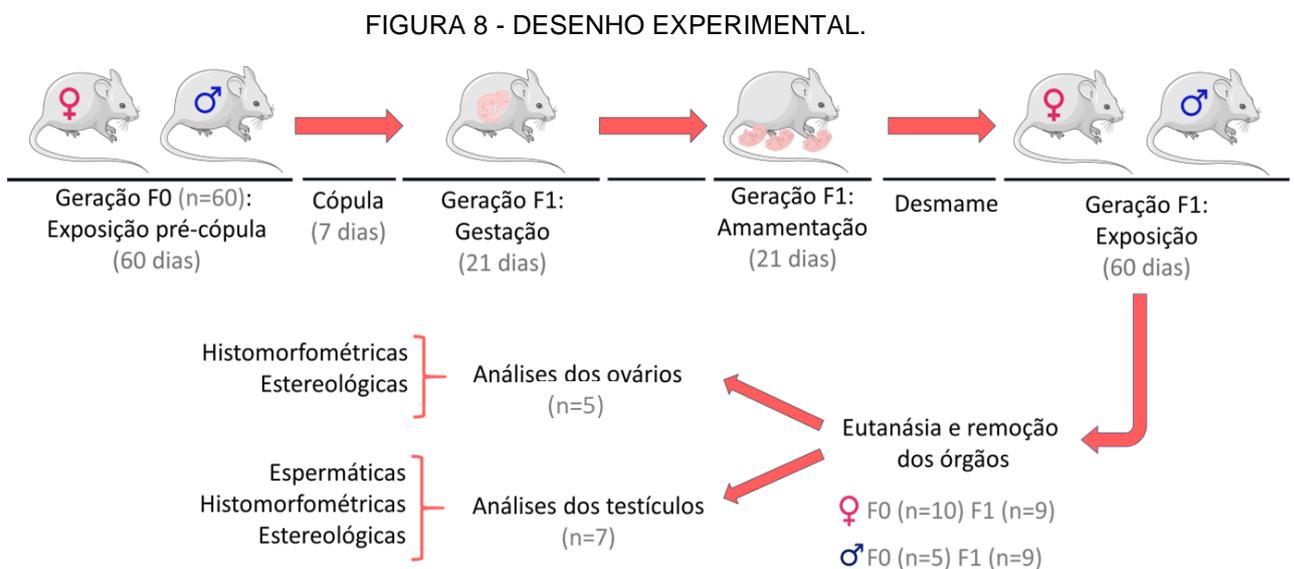
A dose intermediária (0,13 mg/kg/dia) foi escolhida baseando-se no valor máximo de ingestão hídrica de Mn permitido pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011) e ANVISA (2011) de 0,4 mg/L. Foi considerado que um adulto de 70 kg toma em média 2 litros de água por dia, o que equivale a 0,8 mg/L de Mn, somado a 0,4 mg/dia que corresponde a ingestão por outras fontes, obtendo-se 1,2 mg/dia, ou seja, 0,017 mg/kg/dia. Assim, foi realizado o cálculo alométrico para extrapolar esse valor para os camundongos, considerando seu metabolismo (SANTANA, 2010), obtendo-se a dose de 0,13 mg/kg/dia. A mesma dose foi utilizada por outros autores em trabalhos realizados anteriormente (ASCHNER et al., 1999; BATSCHAUER, 2018; SOUZA, 2019; OKADA et al., 2016).

Após 60 dias de exposição, os animais, dentro de seus respectivos grupos, foram separados em caixas para o acasalamento, na proporção 1 macho para 2 fêmeas. Essa distribuição foi mantida por 7 dias, com exposição contínua ao $MnCl_2$. Diariamente, foi realizada a observação do tampão seminal (“*plug*”) na vagina para confirmação da cópula. Em sequência, as fêmeas que não copularam foram anestesiadas com sevoflurano e eutanasiadas por deslocamento cervical.

A exposição ao $MnCl_2$ foi mantida durante todo o período gestacional (21 dias) e de amamentação (21 dias).

8.2.2 Geração F1

Foi realizada a sexagem dos filhotes e, após o desmame, a prole foi separada em grupos para continuar a ser exposta ao $MnCl_2$ por mais 60 dias, na mesma dosagem de seus progenitores. O esquema do desenho experimental está representado na Figura 8.



FONTE: A Autora, 2019.

8.3 DISSECÇÃO E COLETA DOS ÓRGÃOS

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com sevoflurano e eutanasiados por deslocamento cervical. Dos machos, foram coletados os testículos e o epidídimo para análise espermática; das fêmeas, os ovários. Os órgãos foram pesados em balança de precisão (Shimadzu® AUY220), e cada material recebeu tratamento de acordo com o método de análise a ser utilizado.

8.4 ANÁLISE DOS ÓRGÃOS MASCULINOS

8.4.1 Parâmetros espermáticos

Durante a dissecação, os animais das gerações F0 (n=5) e F1 (n=9) tiveram a cauda do epidídimo seccionada e colocada em 400 µl de meio *Gamete Buffer* (COOK Medical®), a 37°C, por 5 minutos, para dispersão dos espermatozoides.

8.4.1.1 Morfologia espermática

Foi feito esfregaço corado com o corante Single Prov® (Newprov) para análise das anormalidades na morfologia espermática, cuja avaliação foi realizada em microscópio de luz, com objetiva de 40x. Foram contabilizados 200 espermatozoides por lâmina/animal, onde foram avaliadas as alterações morfológicas da cabeça, peça intermediária e cauda. Os espermatozoides foram classificados em normais e anormais.

8.4.2 Histologia dos testículos

Os testículos (n=7), após remoção e pesagem, foram fixados em ALFAC (85% de álcool etílico 80%, 10% de formol 40% e 5% de ácido acético glacial), por 24 horas. Em seguida, foram desidratados e diafanizados no processador de tecidos Micron STP 120 (Thermo Scientific®). A desidratação foi feita em soluções crescentes de álcool etílico (70-100%). O material foi emblocado em Paraplast Plus (Leica®), na mesa de inclusão Micron EC 350 (Thermo Scientific®).

Foi realizada a secção das amostras em micrótomo em cortes de 6 µm, que foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e montadas em bálsamo do Canadá (BIOTEC® reagente analíticos).

8.4.3 Parâmetros testiculares

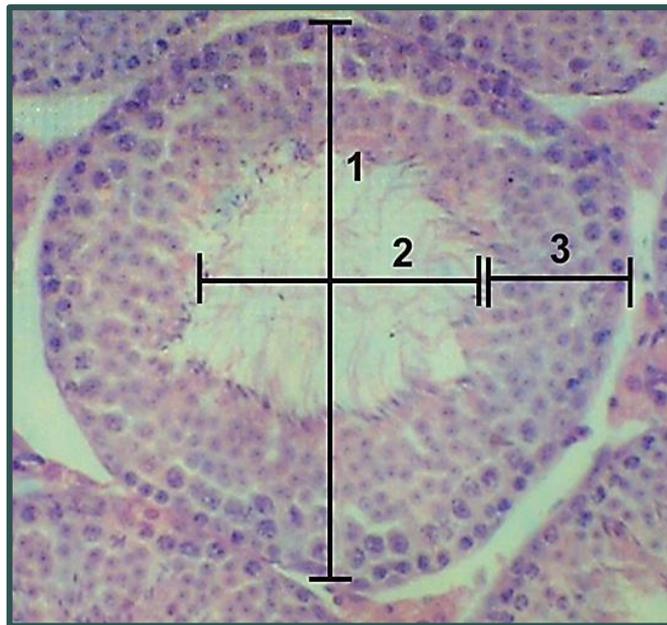
As lâminas histológicas foram examinadas no microscópio de luz Olympus BX41, para realização das análises histomorfométricas e estereológicas dos compartimentos tubular e intertubular, conforme proposto por Lima et al. (2018). Para realização das medições foram capturadas imagens com objetiva de 10x, utilizando-se o *software* para análise de imagem *Image Pro Plus 4.5*® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

8.4.3.1 Histomorfometria

8.4.3.1.1 Túbulos seminíferos

Para a morfometria, foram mensuradas 15 secções transversais de túbulos seminíferos visando obter o diâmetro tubular, diâmetro luminal e altura no epitélio (FIGURA 9) médio por animal. Foram escolhidos os túbulos com morfologia mais circular possível, e o estágio do epitélio seminífero não foi levado em conta.

FIGURA 9 – HISTOMORFOMETRIA DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS.



1) Diâmetro tubular. 2) Diâmetro luminal. 3) Altura do epitélio.

FONTE: A Autora, 2019.

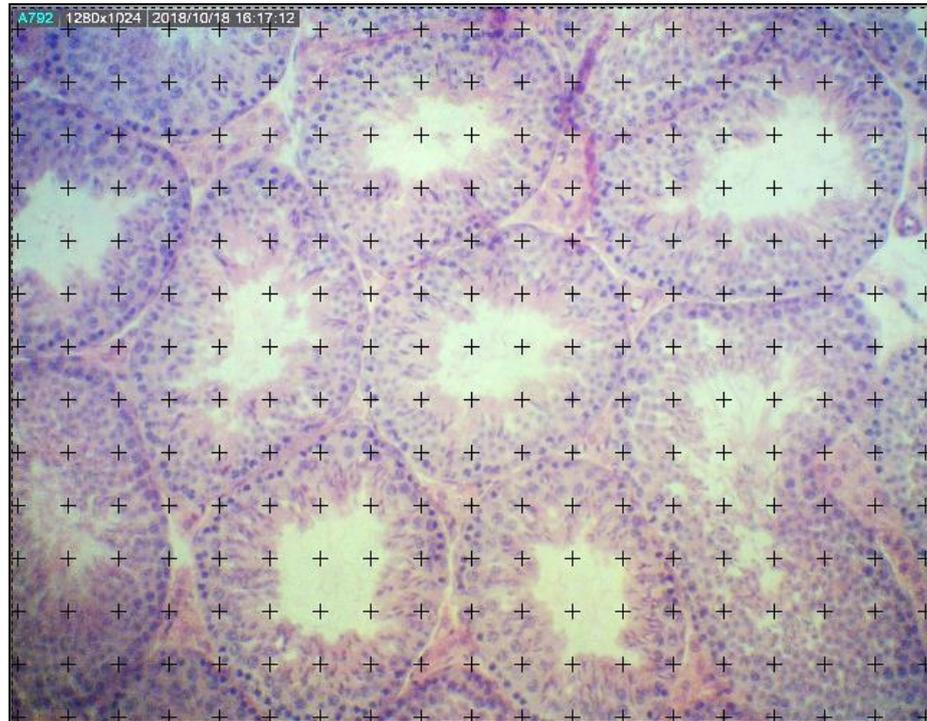
8.4.3.1.2 Células de Leydig

Foi realizada a medição de 150 núcleos de células de Leydig por testículo a partir de 10 secções diferentes do órgão, a fim de avaliar indiretamente alterações fisiológicas nessas células, como a produção de testosterona, conforme realizado por Predes et al. (2010).

8.4.3.2) Estereologia

Para a estereologia, foi obtida a proporção volumétrica e a densidade dos túbulos seminíferos e da região de intertúbulo a partir da sobreposição de uma grade de 266 pontos às imagens fotografadas, em aumento de 10x (Figura 10). Foram utilizadas 10 imagens por amostra, totalizando 2660 pontos por animal.

FIGURA 10 – ESTEREOLOGIA DOS TESTÍCULOS.



FONTE: A Autora, 2019.

A partir disso, os pontos coincidentes com os túbulos e região intertubular foram contabilizados, sendo avaliado o percentual de pontos sobre cada componente. Dessa forma, foi obtida a proporção volumétrica (Pv) de cada compartimento, a partir da fórmula (COSTA, 2013; MORAIS et al., 2014):

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

O volume dos constituintes do testículo, em mL, foi calculado através da fórmula:

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

Sabendo-se que a densidade do testículo de mamíferos é em torno de 1 (COSTA, 2013; MORAIS et al., 2014), a massa do testículo foi considerada igual ao seu volume. O intervalo entre os cortes foi de 60 µm.

8.4.3.3 Comprimento total dos túbulos seminíferos

O comprimento total dos túbulos seminíferos foi calculado de acordo com a seguinte fórmula (DIAS, 2019; GOMES et al., 2011):

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

onde πR^2 é a área de secção do túbulo seminífero, e R é o diâmetro do túbulo/2.

8.5 ANÁLISE DOS ÓRGÃOS FEMININOS

8.5.1 Histologia dos ovários

As fêmeas das gerações F0 e F1 tiveram seus ovários removidos e pesados. Os ovários (n=5) foram submetidos aos processos de fixação, desidratação, diafanização e emblocagem de acordo com o descrito no item 5.4.2. Em seguida, foi realizada a secção das amostras em micrótomo em cortes de 6 μm , as quais foram coradas com HE e montadas em bálsamo do Canadá (BIOTEC® reagente analíticos).

8.5.2 Parâmetros ovarianos

As lâminas histológicas a serem utilizadas para a realização da histomorfometria e da estereologia foram examinadas no microscópio de luz Olympus BX41. Foram capturadas imagens com objetiva de 10x, utilizando-se o *software* para análise de imagem *Image Pro Plus 4.5®* (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) para realização das medições.

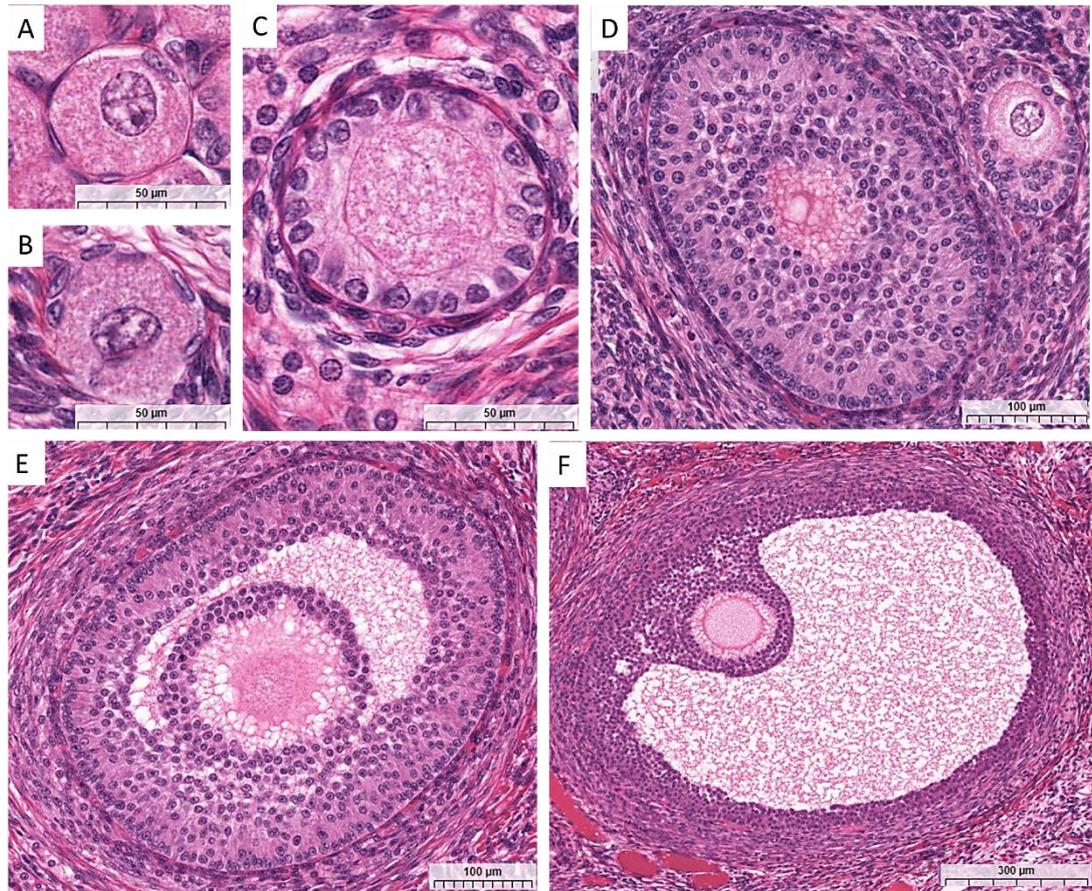
8.5.2.1 Histomorfometria

Para a análise histomorfométrica, foi necessário realizar a classificação dos folículos ovarianos (Figura 9). De acordo com Rendi et al. (2012), os folículos ovarianos de camundongo são classificados da mesma maneira que os humanos. Considerando a variedade morfológica e de terminologias encontradas na literatura, foi utilizada a classificação de acordo com Junqueira e Carneiro (2017) e Kierszenbaum (2008). Classificações muito parecidas foram utilizadas por outros autores para camundongos (CLARKE, 2017; SOUZA et al., 2019b), sendo que, apesar da nomenclatura diferir, existe similaridade dos caracteres morfológicos. A classificação utilizada neste trabalho foi:

- a. Folículo primordial: oócito revestido por única camada de células foliculares, constituindo um epitélio escamoso simples.
- b. Folículo primário unilaminar: oócito revestido por única camada de células foliculares, constituindo um epitélio cúbico simples.
- c. Folículo primário multilaminar/pré-antral: oócito revestido por múltiplas camadas de células granulosas e tecais, constituindo um epitélio cúbico estratificado, podendo apresentar pequenas áreas de fluido folicular.
- d. Folículo secundário/antral: oócito revestido por epitélio cúbico estratificado com antro bem definido.
- e. Folículo maduro: oócito circundado por camada de células da *corona radiata* revestido por epitélio cúbico estratificado; presença de células do *cumulus*; antro grande e bem definido.

A classificação folicular pode ser observada na Figura 11. Os folículos foram mensurados visando obter a morfometria folicular média de cada fase.

FIGURA 11 - CLASSIFICAÇÃO DOS FOLÍCULOS OVARIANOS.



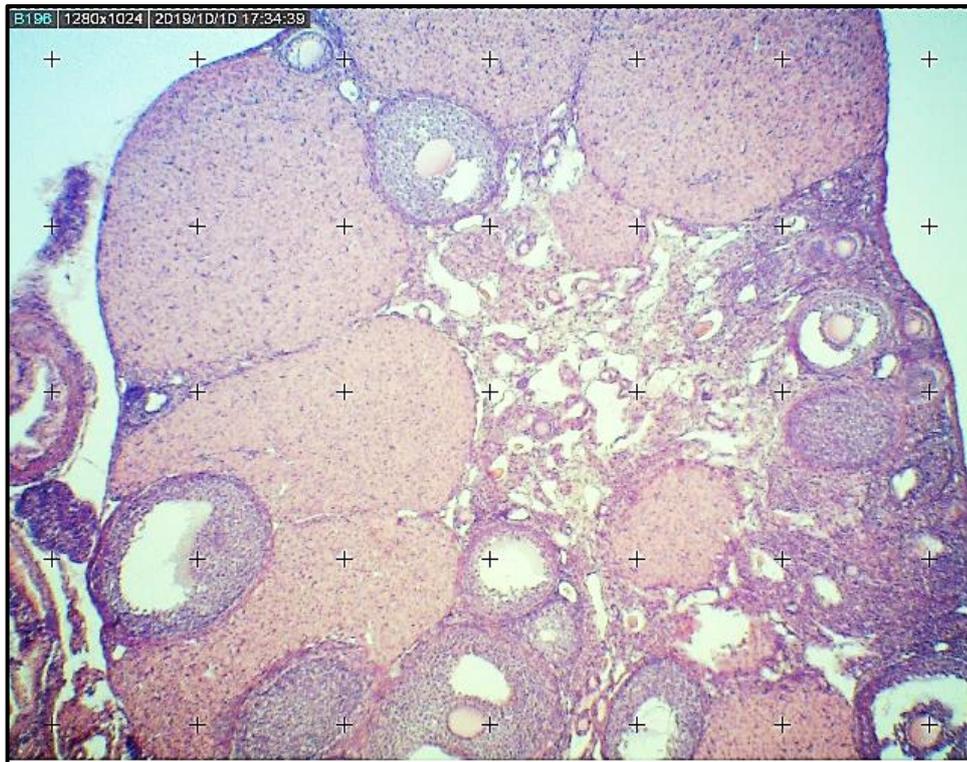
A e B) Folículo primordial. C) Folículo primário unilaminar. D) Folículos primários multilaminar/pré-antrais. E) Folículo secundário/antral. F) Folículo maduro.

FONTE: Adaptado de Histology Guide, 2019.

8.5.2.2 Estereologia

Para a estereologia dos ovários, de maneira semelhante à técnica utilizada para os machos, foi realizada a sobreposição de uma grade de 35 pontos sobre as imagens capturadas, totalizando 350 pontos por animal/tratamento (Figura 12). Foram estimados os volumes do córtex e medula ovarianos, bem como dos folículos, conforme proposto por Altunkayanak et al. (2016).

FIGURA 12 – ESTEREOLOGIA DOS OVÁRIOS.



FONTE: A Autora, 2019.

Foi utilizado o princípio de Cavalieri (ALTUNKAYANAK et al., 2016; BORECKI et al., 2009; MAYHEW, 1991) para calcular o volume, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Volume} = t \times a(p) \times (\Sigma P)$$

Onde t é a espessura do corte, $a(p)$ a área de cada ponto na grade de contagem, e ΣP o total de ponto que caíram sobre o compartimento analisado. Para esta análise, não foi feita a distinção entre o ovário esquerdo ou direito, sendo empregado o princípio estabelecido por Myers et al. (2004). O intervalo entre cada corte utilizado foi de no mínimo 40 μm .

8.6 RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (RIB)

Utilizou-se 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 seu grupo controle correspondente. Foi feita logaritimização para redução da variância e, a partir dos dados logaritimizados (Y_i), calcula-se a média (μ) e o desvio padrão (s) para todas

as análises. Aplica-se então a fórmula $Z_i = (Y_i - \mu)/s$ para cada tratamento, sendo a diferença entre o grupo tratado e controle ($Z_i - Z_0$) utilizada para obter o valor de A – que corresponde ao resultado integrado para cada biomarcador utilizado.

Em seguida, os resultados obtidos foram plotados em um gráfico do tipo radar, onde valores acima ou abaixo de zero (controle) indicaram 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.

8.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram testados quanto a normalidade e avaliados através de ANOVA de uma via ou Kruskal Wallis, seguido pelo pós teste de Dunnet ou Dunn's quando aplicável, todos os tratamentos foram comparados com o seu grupo controle correspondente. Todos os dados foram apresentados como média \pm erro padrão e valores de $p < 0,05$ considerados significativos. Todas as análises foram feitas pelo programa *GraphPad Prism 6.0*.

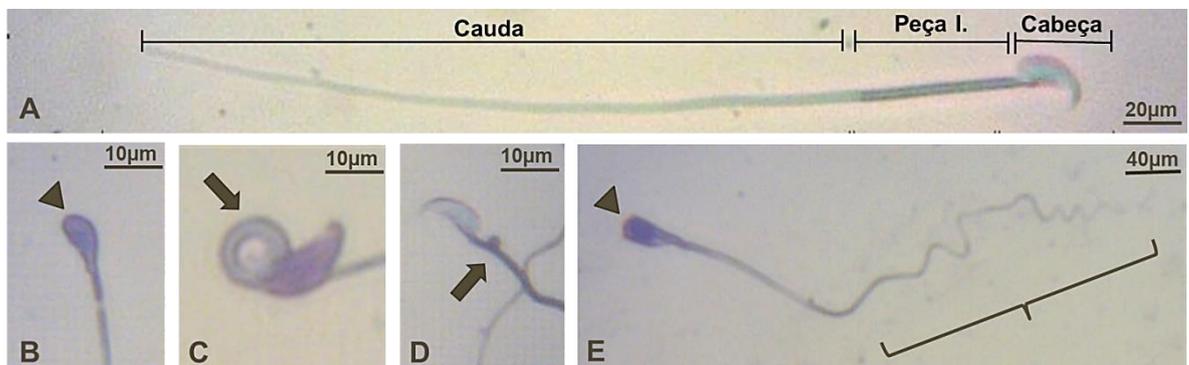
9 RESULTADOS

9.1 SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

9.1.1 Análise de morfologia espermática

A partir das análises espermáticas, foi possível observar alterações na morfologia dos espermatozoides, nas regiões da cabeça, peça intermediária e cauda nos diferentes tratamentos utilizados (Figura 13).

FIGURA 13 - MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.

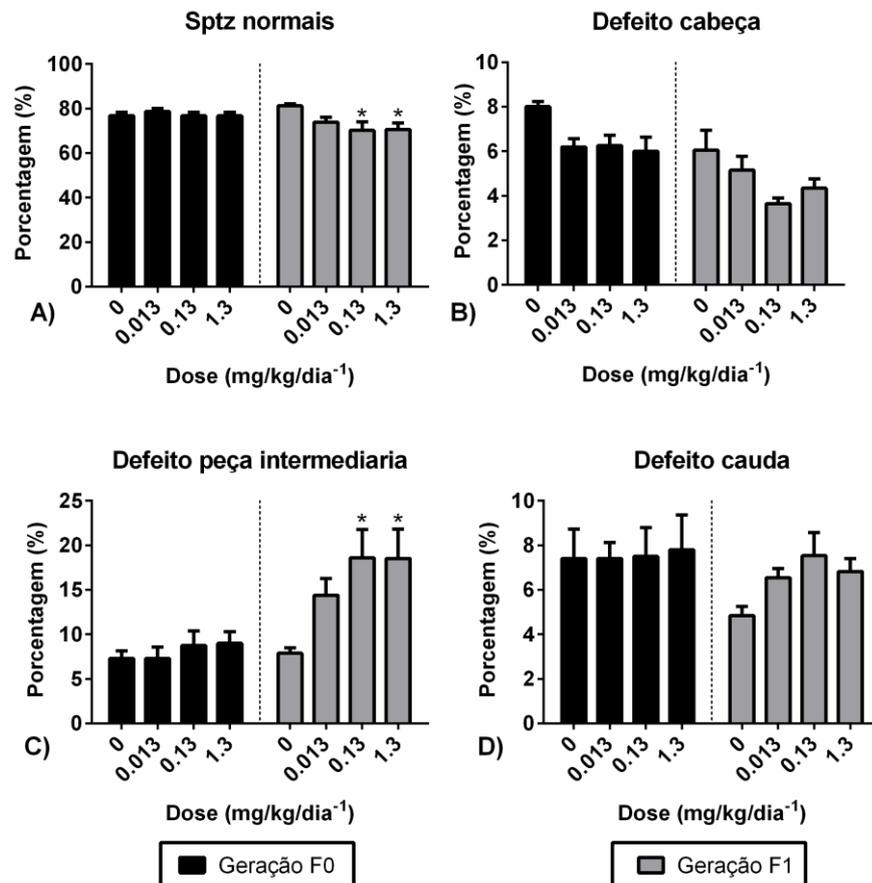


A) Espermatozoide normal, com suas partes indicadas. B) Defeito na cabeça (cabeça de seta). C-D) Defeito na peça intermediária (seta) E) Defeito na cabeça (cabeça de seta) e na cauda (colchete).

FONTE: A Autora, 2018.

Na geração F0 não foram observadas alterações significativas na morfologia espermática em relação ao grupo controle (Figura 14). Na geração F1, por sua vez, foi encontrada menor porcentagem de espermatozoides com morfologia normal nas doses de 0,13 e 1,3 mg/kg/dia, e maior quantidade de espermatozoides com defeito na peça intermediária nas mesmas doses (Figura 14A-C). Em relação à cabeça e cauda, não foram encontradas alterações (Figura 14B-D).

FIGURA 14 – ANÁLISE DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.



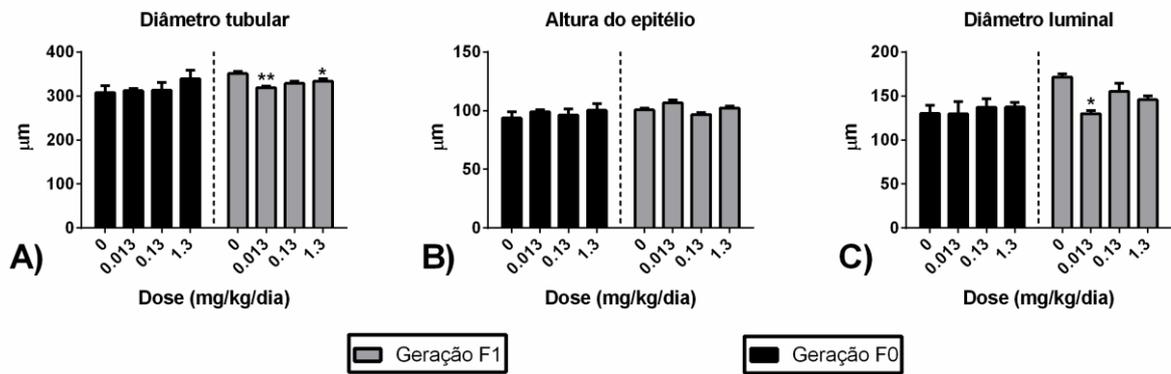
A: Espermatozoides com morfologia normal. B: Defeito de cabeça. C: Defeito de peça intermediária. D: Defeito de cauda. n = 5 (geração F0); 7 (geração F1). *p < 0,05 (ANOVA de uma via – teste post hoc de Dunnet).

9.1.2 Histomorfometria do testículo

9.1.2.1 Túbulos seminíferos

A partir da análise histomorfométrica foi possível obter os resultados demonstrados na Figura 15. Os animais da geração F0 não apresentaram diferenças significativas entre os parâmetros e doses avaliadas. Entretanto, para os animais da geração F1, houve diminuição do diâmetro tubular nas doses 0,013 e 1,3 mg/kg (Figura 15A), enquanto o diâmetro luminal foi reduzido somente na dose de 0,13 mg/kg (Figura 15C), e a altura do epitélio permaneceu inalterada (Figura 15B).

FIGURA 15 – RESULTADOS DA HISTOMORFOMETRIA DO TESTÍCULO.



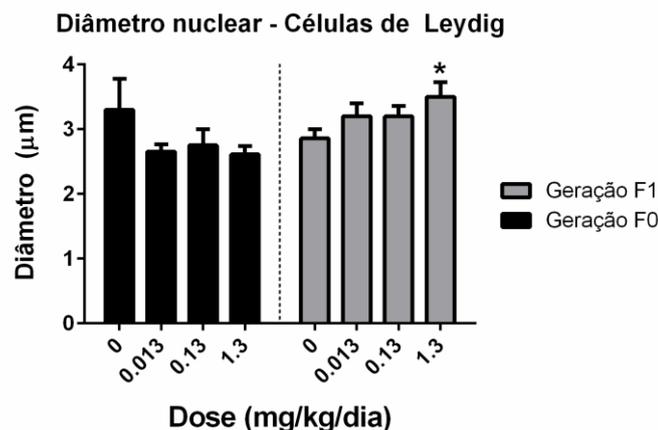
A: Diâmetro tubular. B: Altura do Epitélio. C: Diâmetro Luminal. n = 5 (geração F0); 7 (geração F1). *p<0,05; **p<0,01 (ANOVA de uma via – teste post hoc de Dunnet).

FONTE: A Autora, 2019.

9.1.2.2 Células de Leydig

É possível observar que na geração F0, embora as alterações não sejam significativas, a tendência do diâmetro nuclear das células de Leydig foi diminuir, enquanto na geração F1 houve aumento do diâmetro, sendo significativo somente na dose mais alta (Figura 16).

FIGURA 16 – RESULTADO DA HISTOMORFOMETRIA DAS CÉLULAS DE LEYDIG.



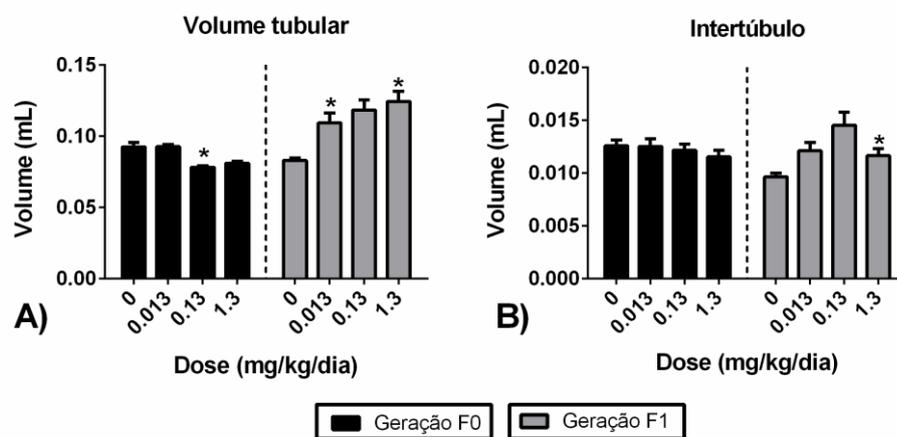
n = 5 (geração F0); 7 (geração F1). *p<0,05 (ANOVA de uma via – teste post hoc de Dunnet).

FONTE: A Autora, 2019.

9.1.3 Estereologia do testículo

Na geração F0, houve redução significativa do volume tubular apenas na dose de 0,13 mg/kg/dia de Mn (Figura 17A), não havendo alterações no volume intertubular (Figura 17B). Na geração F1, por sua vez, houve aumento do volume tubular nas doses de 0,013 e 1,3 mg/kg/dia (Figura 17A) e aumento do volume intertubular somente na dose 1,3 mg/kg/dia (Figura 17B).

FIGURA 17 – RESULTADOS DA ESTEREOLOGIA DO TESTÍCULO.



A: Volume tubular. B: Volume intertubular. n = 5 (geração F0); 7 (geração F1). *p<0,05 (ANOVA de uma via – teste post hoc de Dunnet).

FONTE: A Autora, 2019.

9.1.4 Comprimento total dos túbulos seminíferos

É possível observar na Tabela 1 que, apesar de não haver resultados estatisticamente significativos, existe uma considerável diferença dos parâmetros em relação ao valor médio. Tanto na geração F0 como na geração F1 houve aumento do comprimento em todas as doses.

TABELA 1 – COMPRIMENTO TOTAL DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS

Comprimento total dos túbulos semíferos (m)				
Grupo experimental	Dose (mg/kg/dia)			
	0	0,013	0,13	1,3
Geração F0	1,19 ± 0,04	1,29 ± 0,15	1,33 ± 0,35	1,23 ± 0,12
Geração F1	0,91 ± 0,06	1,23 ± 0,27	1,26 ± 0,77	1,41 ± 0,20

Média ± Erro padrão. ANOVA – teste post hoc de Dunnet/ Kruskal Wallis teste post hoc de Dunn's. n = 5 (geração F0); 7 (geração F1)

FONTE: A Autora, 2019.

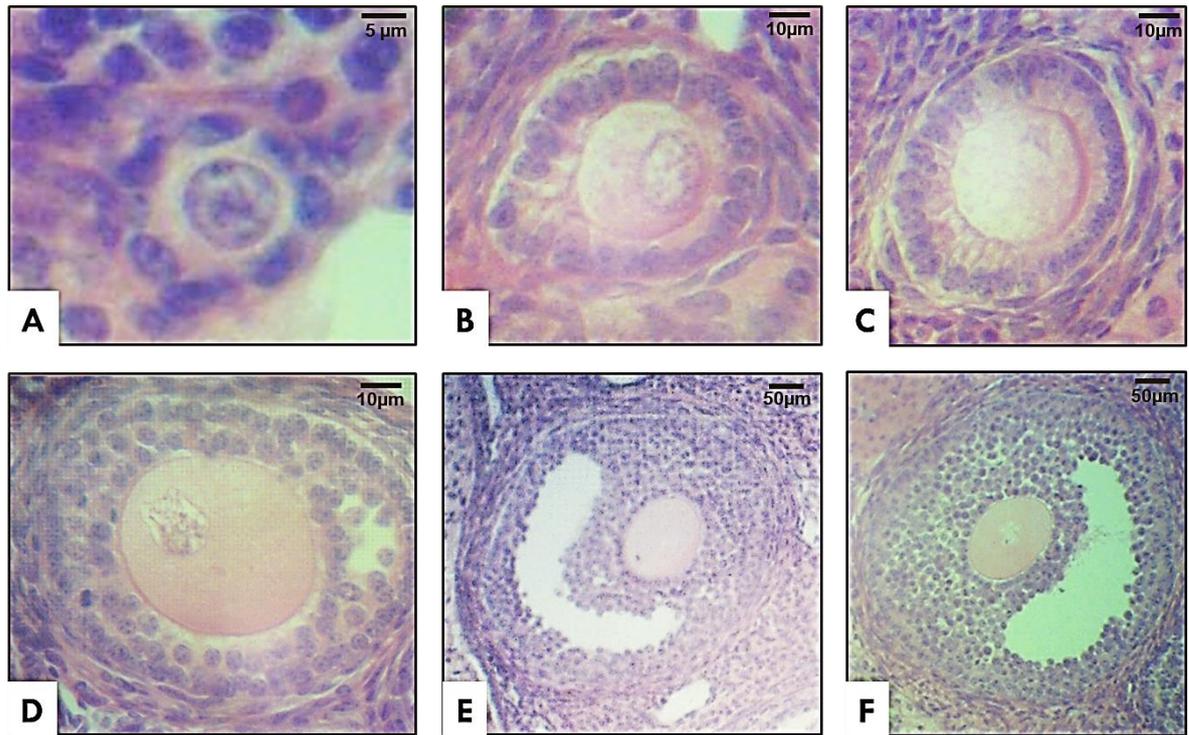
9.2 SISTEMA REPRODUTOR FEMININO

9.2.1 Histomorfometria dos folículos ovarianos

Foram encontrados todos os tipos de folículos ovarianos de acordo com a classificação utilizada (FIGURA 18), sendo que os folículos pré-ovulatórios apresentaram-se em menor quantidade, o que se deve ao fato de as fêmeas terem sido eutanasiadas em diestro.

Não foram observadas alterações significativas em relação à morfometria folicular, como apontam os gráficos abaixo (FIGURA 19). Não houve um padrão de alteração do diâmetro dos folículos, embora perceba-se que, na geração F1, os folículos primordiais, primários e secundários demonstram uma leve alteração no diâmetro médio quando comparado com o controle.

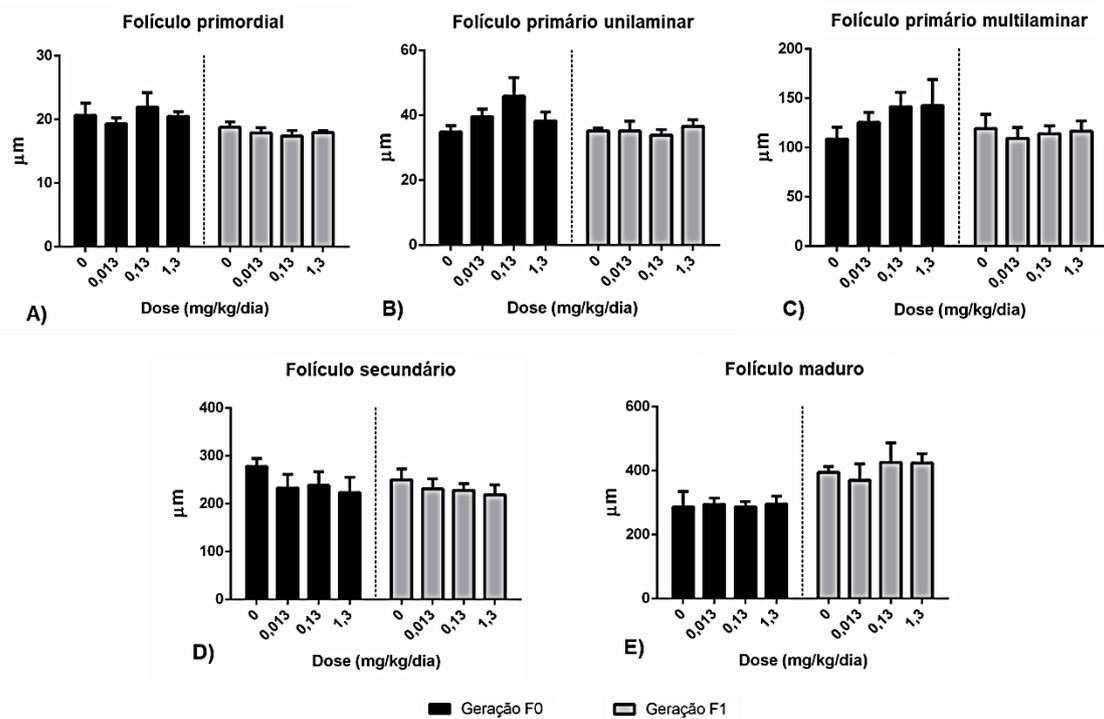
FIGURA 18 – TIPOS DE FOLÍCULOS OVARIANOS ENCONTRADOS.



A: Foliculo primordial. B-C: Foliculos primários unilaminares. D: Foliculo primário multilaminar. E-F: Foliculos antrais.

FONTE: A autora, 2019.

FIGURA 19 - RESULTADOS DA HISTOMORFOMETRIA DOS FOLÍCULOS OVARIANOS.



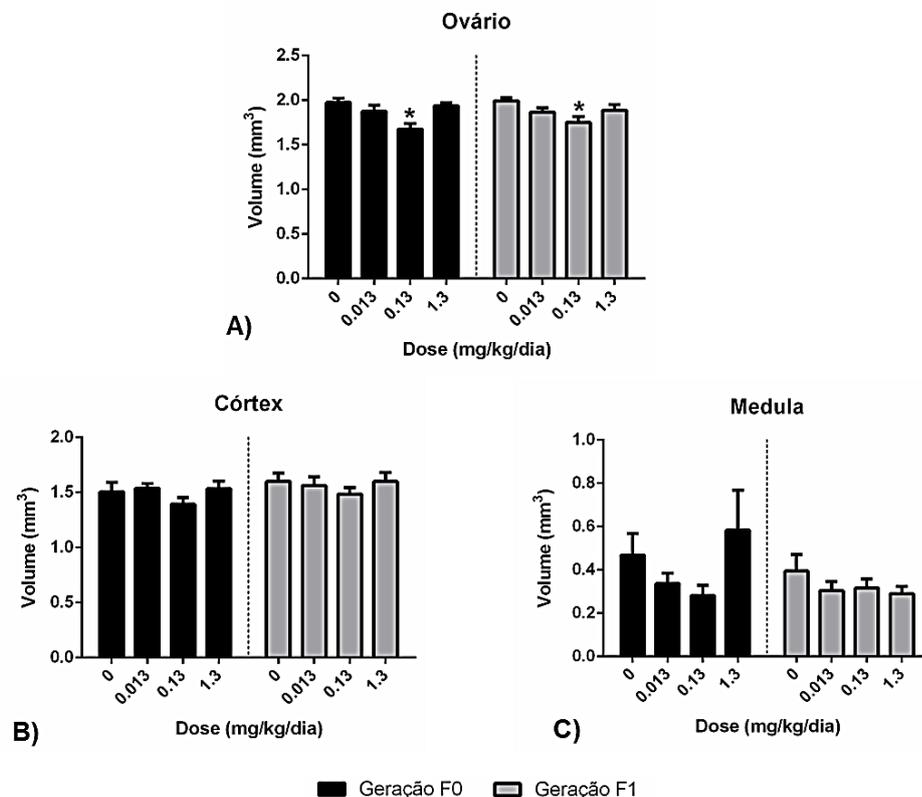
A: Folículo primordial. B: Folículo primário unilaminar. C: Folículo primário multilaminar. D: Folículo secundário. E: Folículo maduro. n = 5 (geração F0); 5 (geração F1). *p<0,05 (ANOVA de uma via – teste post hoc de Dunnet).

FONTE: A Autora, 2019.

9.2.2 Estereologia do ovário

O volume do ovário como um todo diminuiu significativamente apenas na dose intermediária, em ambas as gerações (FIGURA 20A). Não houve alterações significativas no volume quando a medula e o córtex do ovário são observados de maneira isolada (FIGURA 20B-C).

FIGURA 20 – RESULTADO DA ESTEREOLOGIA DO OVÁRIO.



A) Ovário. B) Córtex do ovário. C) Medula do ovário. n = 5 (geração F0); 5 (geração F1). *p<0,05 (ANOVA de uma via – teste post hoc de Dunnet).

FONTE: A Autora, 2019.

9.3 RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (RIB)

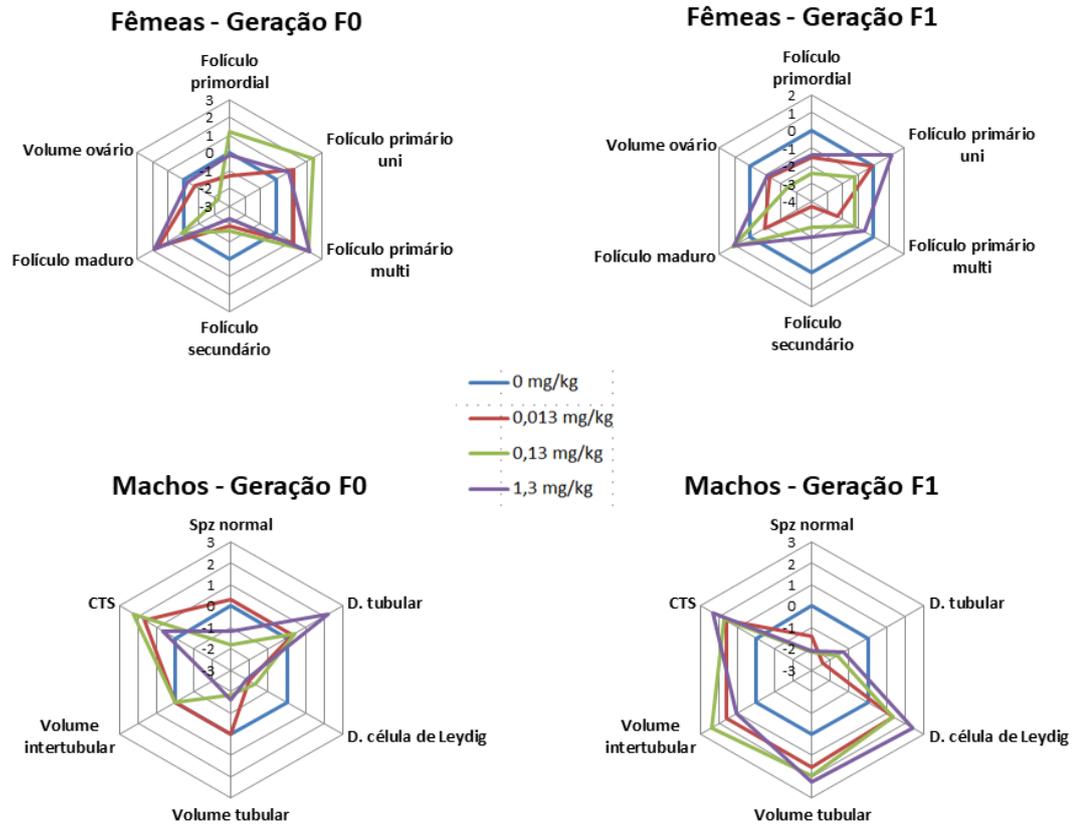
Foram selecionados 6 parâmetros avaliados em cada sexo para realizar a resposta integrada dos biomarcadores. Para os machos, foi escolhido o número de espermatozoides normais; diâmetro tubular; diâmetro nuclear das células de Leydig; volume tubular; volume intertubular e comprimento total dos túbulos seminíferos. Já

para as fêmeas, foi selecionado os resultados da morfometria folicular (folículo primordial; primário unilaminar; primário multilaminar; secundário e maduro), além do volume do ovário. Dessa forma, é possível avaliar que quanto maior o índice, maior é a alteração da dinâmica dos parâmetros, como demonstrado na tabela 2. Sendo assim, foi possível determinar que não há grandes variações entre os índices encontrados nas fêmeas da geração F0 e F1, exceto para a dose de 0,13 mg/kg/dia. Entretanto, há uma grande variação entre os machos ao comparar as diferentes gerações e doses utilizadas. A representação gráfica da dinâmica desses parâmetros é demonstrada na figura 21.

TABELA 2 – INDICE DA RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES

	Fêmeas		Machos	
	Geração F0	Geração F1	Geração F0	Geração F1
0 mg/kg	0	0	0	0
0,013 mg/kg	7,73	7,61	4,26	9,92
0,13 mg/kg	9,61	10,09	8,03	11,24
1,3 mg/kg	7,52	7,77	9,78	11,45

FIGURA 21 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES.



Análise das fêmeas e machos da geração F0 e F1. 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; Spz normal: espermatozoides normais; CTS: comprimento total dos túbulos seminíferos.

FONTE: A Autora, 2019.

10 DISCUSSÃO

10.1 SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

De forma geral, as alterações morfológicas que ocorreram nos espermatozoides podem ser explicadas levando-se em conta que a exposição ao Mn afeta o citoesqueleto (TOWLER, 2000; PARSONS-WHITE, 2008). Conseqüentemente, essa interação pode modificar a morfologia celular e reduzir o número de espermatozoides com morfologia normal, como observado nos animais da geração F1.

O Mn também pode interagir com outras organelas celulares, como a mitocôndria. O espermatozoide é uma célula repleta de mitocôndrias, localizadas principalmente na peça intermediária, devido ao seu grande requerimento de energia para o movimento flagelar (DUTTA et al., 2018). Ao adentrar na célula, o Mn, na forma de Mn^{2+} , entra na mitocôndria pelo transportador uniporte de Ca^{2+} , para onde tende a ser direcionado por atuar como constituinte da enzima MnSOD (GUNTER et al., 2009). Entretanto, o efluxo de Mn pelo mecanismo independente de sódio (GAVIN et al., 1990; GUNTER et al., 2009) não parece ser eficaz o suficiente para manter os níveis desse metal em quantidades não tóxicas, gerando alterações mitocondriais e defeitos na morfologia da peça intermediária. O Mn^{2+} , na matriz mitocondrial, se liga aos sítios de ligação do Ca^{2+} , que é responsável pela ativação e controle da fosforilação oxidativa através de sua ligação à diversas desidrogenases participantes do ciclo do ácido cítrico e à ATP sintase (BALABAN, 2002; TERRITO et al., 2001). O Mn^{2+} tem mais afinidade pelos sítios sensíveis ao Ca^{2+} do que o próprio íon Ca e, ao se ligar, perturba a fosforilação oxidativa, reduzindo drasticamente a produção de ATP (GUNTER et al., 2006). A diminuição do ATP intracelular leva à danos no axonema, perda da fluidez e integridade da membrana e aumento dos defeitos morfológicos de peça intermediária (SIKKA, 1996).

Além disso, o aumento do número de espermatozoides disfuncionais no sêmen induz ainda mais a produção de radicais livres (DUTTA et al., 2018). A principal espécie reativa de oxigênio produzida no espermatozoide é o radical superóxido (O_2^-), o qual forma peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através das reações de dismutação. Na presença de metais de transição, como Fe, Cu e, provavelmente, Mn, o radical O_2^- reage com o H_2O_2 através da reação de Haber-Weiss, resultando

no radical hidroxila (OH⁻), extremamente tóxico e reativo (DUTTA et al., 2018). Esse radical pode iniciar uma cascata de lipoperoxidação, à qual o espermatozoide é muito suscetível devido a composição de sua membrana, rica em ácidos graxos poli-insaturados (SIKKA, 1996; BISHT et al., 2017).

O estresse oxidativo também acomete a integridade do DNA nuclear e mitocondrial. A fragmentação do DNA está inversamente relacionada com a qualidade do sêmen, contagem, morfologia e motilidade espermática (AITKEN et al., 1998; AITKEN; KRAUSZ, 2001). Sendo assim, ao associar essas informações é possível sugerir que o Mn também possa promover alterações nucleares e modificar a morfologia da cabeça dos espermatozoides. Além do mais, a estabilidade do DNA espermático correlaciona-se com sua capacidade de fertilização e sobrevivência do embrião (AITKEN et al., 1998; AITKEN; KRAUSZ, 2001; AITKEN, ROMAN, 2008).

Em relação à histomorfometria dos túbulos seminíferos, Ceolin (2010), constatou que os parâmetros histomorfométricos estão intimamente relacionados com a atividade funcional do testículo, bem como o comprimento total dos túbulos seminíferos. Na geração F1 foi possível observar diminuição do diâmetro tubular, sendo tal medida uma abordagem tradicionalmente utilizada como indicador da atividade espermatogênica (FRANÇA; RUSSELL, 1998; PAULA et al., 2002). A redução do diâmetro dos túbulos seminíferos também foi observada após a exposição a outros metais, como cádmio (Cd) (CABRAL, 1996; SAKR; NOOH, 2013), chumbo (Pb) (AKINOLA et al., 2015), alumínio (Al) (PANDEY; JAIN, 2017) e arsênio (As) (CARVALHO, 2009; LIMA et al., 2018).

Já é constatado que o tratamento com doses altas de Mn diminui o diâmetro tubular, como ocorreu no estudo de Chandel e Jain (2017); porém, não existem estudos comprovando tal alteração utilizando doses baixas de Mn, como no presente trabalho. Sendo assim, é possível estimar que o tratamento com Mn promoveu a modificação de parâmetros morfométricos, como o diâmetro tubular e luminal, o que pode interferir na capacidade espermatogênica do órgão. A perturbação na espermatogênese também pode estar diretamente relacionada à produção de espermatozoides morfologicamente disfuncionais, como foi encontrado no trabalho.

A análise histomorfométrica das células de Leydig mostrou que houve aumento do tamanho nuclear, o que pode indicar maior atividade de síntese e processos fisiológicos, podendo-se sugerir um possível aumento, por exemplo, na

produção de testosterona por essas células. Entretanto, o Mn, em experimentos *in vitro*, afeta diretamente as células de Leydig (CHENG et al., 2003; CHENG et al., 2005), levando à diminuição da síntese de testosterona, como também foi visto em outros estudos utilizando doses altas do metal (BOUDOU et al., 2014; CHANDEL, JAIN, 2017; LASKEY et al., 1985). As doses de Mn utilizadas neste trabalho parecem não ter sido suficientes para afetar de maneira negativa a síntese do hormônio, sendo que esse possível aumento de sua produção na dose 1,3 mg/kg/dia pode indicar uma resposta do testículo às perturbações sofridas nos espermatozoides e no diâmetro tubular, numa tentativa de estimular a espermatogênese e amenizar os danos promovidos devido a exposição prolongada ao Mn.

Os parâmetros estereológicos mostraram que houve diminuição do volume tubular somente na dose intermediária na geração F0, sendo que esses animais foram pouco afetados. Porém, o aumento do volume tubular e intertubular na geração F1 pode indicar a ocorrência de uma hipertrofia compensatória (DIAS, 2019; KOSCO et al., 1998). Esse mecanismo normalmente ocorre quando há ausência, descida incompleta ou dano a um dos testículos, sendo que o testículo saudável consegue compensar a espermatogênese e produção hormonal (KOFF, 1999). No caso deste estudo, o tempo longo de exposição ao Mn pode ter levado ao desenvolvimento de um mecanismo parecido: o aumento do volume das células testiculares pode ter sido uma tentativa de retomar as condições de homeostasia fisiológica, na tentativa de reduzir os danos provocados pelo estresse contínuo da exposição ao Mn. Tanto as células do epitélio seminífero quanto do espaço intertubular podem sofrer hipertrofia compensatória, como foi mostrado por Lunstra et al., 2003. Tais resultados corroboram com o aumento do diâmetro nuclear das células de Leydig, que foi encontrado na geração F1.

O aumento do comprimento dos túbulos seminíferos é mais um parâmetro associado ao mecanismo de hipertrofia compensatória (LEIDL et al., 1980). Na geração F1, o aumento do comprimento parece ter sido, juntamente com o aumento do volume, uma forma de compensar a redução do diâmetro (DIAS, 2019; GOMES et al., 2011). A exposição desses animais ao Mn, além de ter sido longa, aconteceu durante fases críticas para o desenvolvimento das gônadas e da função reprodutiva, tanto no período intrauterino quanto na puberdade. Tal mecanismo de recuperação

da homeostasia é uma tentativa de recuperar a funcionalidade do órgão e diminuir os danos à espermatogênese.

O índice RIB mostra claramente como a geração F1 foi mais afetada do que a F0, visto que quando maior o número, maior a quantidade de alterações provocada pela exposição. Além disso, ao comparar as diferentes doses, nota-se que 0,13 e 1,3 mg/kg/dia apresentam maiores efeitos na alteração da dinâmica dos marcadores avaliados, indicando que os animais da geração F1 exposto a essas doses acumulam maiores devido o tratamento com Mn.

Em resumo, foi possível constatar que a exposição direta ao manganês de camundongos já na fase adulta não provocou alterações significativas dos parâmetros reprodutivos avaliados, como ocorreu com a geração F0. Já na geração F1, a exposição prolongada durante os períodos da embriogênese, morfogênese do sistema reprodutor e puberdade causou alterações nos parâmetros espermáticos, histomorfométricos e estereológicos dos testículos. O aumento do volume testicular devido ao aumento do comprimento total dos túbulos seminíferos, bem como do diâmetro nuclear das células de Leydig indicaram uma maneira de compensar a diminuição do volume tubular, tentando retomar as condições normais da espermatogênese.

Não foi observada resposta dose-dependente em nenhuma das características avaliadas, o que pode se dever justamente ao fato de as concentrações utilizadas serem muito baixas, não havendo a formação de uma curva dose-resposta. Em contrapartida, é possível pressupor que o resultado obtido está de acordo com o princípio de Hormesis. De acordo com Mattson (2008) e Calabrese, Blain (2005) a resposta de um organismo a uma dose baixa de um xenobiótico é considerada um processo compensatório adaptativo após uma perturbação inicial da homeostase, sendo que o princípio prediz que um agente normalmente nocivo em doses altas induz um efeito benéfico ao organismo em doses menores, como observado para alguns parâmetros. Embora o Mn tenha provocado danos na espermatogênese, ficou evidente que houve uma resposta compensatória do testículo para diminuir o prejuízo causado pelo metal após a exposição prolongada. Além disso, com a análise da resposta integrada dos biomarcadores foi possível determinar que a geração F1 apresentou maiores índices que a geração F0. Conseqüentemente, esses animais foram submetidos a uma

maior variação nos parâmetros avaliados, devido as fases de desenvolvimento em que foram expostos ao Mn, evidenciando maiores danos morfológicos.

10.2 SISTEMA REPRODUTOR FEMININO

Yoshida et al. (2009) afirma que qualquer anormalidade nos ovários pode estar diretamente ligar ao prejuízo da capacidade reprodutiva feminina. Já é bem descrito que metais podem atingir os ovários, afetando os folículos ovarianos e a produção hormonal. Sabe-se que o cádmio se acumula nos ovários, podendo alterar sua morfogênese e inibir o crescimento dos folículos ovarianos (PIASEK, LASKEY, 1999; WAN et al., 2010, ZHANG, JIA, 2007), além de reduzir o volume do ovário (BEKHEET, 2011). O chumbo interrompe o desenvolvimento e maturação folicular, além de aumentar a quantidade de folículos atresícos (JUNAID et al., 1997; OUARDA, ABDENNOUR, 2008) e diminuir o número de folículos primordiais (HILDERBRAND et al., 1973). A exposição ao crômio provoca diminuição do peso dos ovários, redução do número de folículos e de corpos lúteos (MURTHY et al., 1996; KANOJIA et al., 1998). O mercúrio é responsável pela redução do volume ovariano, como mostrou Altunkaynak et al. (2016). Todos estes estudos utilizaram doses altas dos metais, o que pode ter sido responsável pelos efeitos deletérios encontrados.

Entretanto, há grande escassez de literatura que avalie a exposição do sistema reprodutor feminino ao Mn, principalmente utilizando parâmetros histomorfométricos e estereológicos durante exposições crônicas e seus efeitos diferem daqueles encontrados sobre o sistema reprodutor de machos. Kim et al. (2012) mostraram que o Mn reduz significativamente o peso dos ovários e a concentração sérica de LH e FSH, enquanto Pine et al. (2005) e Lee et al. (2007) concluíram que o Mn, quando administrado de maneira aguda diretamente no cérebro, aumenta a secreção de GnRH e das gonadotrofinas, podendo ocasionar um início precoce da puberdade. Batschauer (2017) utilizou doses de Mn iguais às utilizadas no presente estudo e constatou que o metal se acumula principalmente no hipotálamo, enquanto Dorman et al. (2006) observaram acúmulo preferencial de Mn na hipófise. Com base nesses resultados encontrados na literatura, é possível que o Mn seja capaz de interferir no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Considerando que esse metal se acumula preferencialmente no hipotálamo e hipófise pode ocorrer

a indução da morte de neurônios (TARALE et al., 2016) e desregulação das funções reprodutivas.

Porém, neste estudo, houve redução do volume ovariano apenas na dose intermediária, em ambas as gerações, apesar de nas demais doses o volume também ter diminuído de maneira não significativa. Sabendo da atuação do Mn sobre o eixo hipotálamo-hipófise, a redução do volume ovariano, bem como a redução do diâmetro dos folículos, pode indicar que o Mn agiu de forma a diminuir a secreção das gonadotrofinas, o que pode ter, de certa maneira, atrofiado os ovários por diminuição do estímulo. Nesse caso, o mecanismo de feedback negativo não atuaria de maneira eficiente, uma vez que o hipotálamo já estaria prejudicado.

Além disso, já foi visto que o manganês provoca um ambiente pró-oxidante na célula. As espécies reativas de oxigênio apresentam uma função regulatória na maturação dos oócitos, na foliculogênese, estereidogênese e lúteolise, havendo um equilíbrio delicado com as enzimas antioxidantes (AGARWAL et al., 2005). Dessa maneira, qualquer perturbação desse balanço pode afetar a maturação dos folículos e a produção hormonal. As células granulosas e do corpo lúteo respondem à presença de radicais livres anulando a ação das gonadotrofinas e inibindo a secreção de progesterona (BEHRMAN et al., 2001), provavelmente como um mecanismo de defesa para proteger os gametas. Tal comportamento também altera os estímulos hormonais sobre os ovários, podendo explicar a redução do volume. Apesar desses efeitos, não foram encontrados resultados significativos para a alteração na morfometria dos folículos. Além disso, ao realizar a análise para a resposta integrada dos biomarcadores foi possível notar que não houve grandes variações nos parâmetros entre as gerações e as diferentes doses testadas, como encontrado para os machos. Entretanto, dentre as doses utilizadas, a dose de 0,13 mg/kg/dia, correspondente ao valor de exposição para humanos, promoveu uma maior oscilação dos marcadores avaliados, podendo representar um potencial risco à reprodução feminina.

Dessa forma, fica claro que são necessários maiores estudos sobre os efeitos do Mn sobre o sistema reprodutor feminino, uma vez que os existentes ainda são escassos (DEPARTMENT OF HEALTH, 2018). Não se sabe ao certo quais são as alterações causadas pela exposição ao Mn, mas é provável que a dose ou o tempo de exposição utilizados no trabalho não tenham sido suficientes para que seja possível observar efeitos nocivos. Além disso, pode ser que os parâmetros avaliados

no presente trabalho não sejam tão sensíveis e responsivos aos aspectos toxicológicos do Mn, como encontrado no sistema reprodutor masculino.

11 CONCLUSÃO

No presente estudo foi possível observar que o Mn leva a alterações morfológicas no sistema reprodutor masculino e, de maneira mais discreta, no feminino.

O Mn age nos espermatozoides, modificando sua morfologia, além de afetar parâmetros testiculares como o diâmetro, volume e comprimento dos túbulos seminíferos. De maneira geral, os resultados mais significativos apareceram na geração F1.

Em relação aos ovários, observou-se apenas um resultado significativo, sendo a redução do volume ovariano. Não foram encontradas diferenças entre as alterações presentes na geração F0 e F1.

Dessa forma, pode-se concluir que a exposição multigeracional ao Mn, mesmo em doses baixas, pode levar a alterações da morfologia testicular e espermática, tanto dos progenitores quanto da prole, o que podem ser fatores contribuintes para a infertilidade masculina. Em relação ao sistema reprodutor feminino, são necessários maiores estudos sobre o impacto do metal sobre a morfologia ovariana, bem como sobre a maneira como os hormônios sexuais femininos são afetados.

REFERÊNCIAS

- 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, 2017.
- ADONA, P. R.; MONZANI, P. S.; GUEMRA, S.; DOS SANTOS MIRANDA, M.; OHASHI, O. M. Ovogênese e foliculogênese em mamíferos. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n. 3, p. 245-250, 2015.
- AITKEN, R. J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J. P.; MILNE, P.; JENNINGS, Z.; IRVINE, D. S. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**. v. 59, p. 1037–1046. 1998.
- AITKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction Cambridge**, v. 122, n. 4, p. 497-506. 2001.
- AITKEN, R. J.; ROMAN, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 1, n. 1, p. 15-24. 2008.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 3, n. 1, p. 28, 2005.
- ALTUNKAYNAK, B. Z.; AKGÜL, N.; YAHYAZADEH, A.; ALTUNKAYNAK, M. E.; TURKMEN, A. P.; AKGÜL, H. M.; ÜNAL, B. effect of mercury vapor inhalation on rat ovary: stereology and histopathology. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 42, n. 4, p. 410-416, 2016.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. SVS/MS - Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária **Portaria nº 2.914**. Brasil, 12 de Dezembro de 2011.
- ARAÚJO, G. S.; MACHADO, A. F. P.; TACANI, P. M.; TACANI, R. E.; ALBERO, P. J. F.; LIEBANO, R. E. Massa corporal, imagem corporal e desejo por tratamentos estéticos nas diferentes fases do ciclo menstrual. **Saúde (Santa Maria)**, v. 41, n. 1, p. 77-84, 2015.
- 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.
- ASCHNER, M., GUILARTE, T. R., SCHNEIDER, J. S., & ZHENG, W. Manganese: Recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 221, n. 2, p. 131-147, 2007.

- BAERWALD, A. R.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. **Human reproduction update**, v. 18, n. 1, p. 73-91, 2011.
- BALABAN, R. S. Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. **J Mol Cell Cardiol.** v. 34, n.112, p. 59–71. 2002.
- BALARINI, M. K. **Avaliação Morfofuncional do Testículo e do Processo Espermatogênico dos Roedores Silvestres *Akodon cursor* e *Oligoryzomys nigripes* (Rodentia: Cricetidae)**. 94 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.
- BARANSKI, B. Effect of cadmium in prenatal development and on tissue cadmium, copper, and zinc concentrations in rats. **Environ Res.** v. 42, n. 1, p. 54–62. 1987.
- BARCELOUX, D.G. Manganese. **Clinical Toxicology.** v. 37, n. 2, p. 293-307. 1999.
- BATES, G. W.; BOWLING, M. Physiology of the female reproductive axis. **Periodontology 2000**, v. 61, n. 1, p. 89-102, 2013.
- 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). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.
- BATAINEH, H.; AL-HAMOOD, M. H.; ELBETIEHA, A. M. Assessment of aggression, sexual behaviour and fertility in adult male rat following long-term ingestion of four industrial metal salts. **Hum. Exp. Toxicol.** v. 17, p. 570–576. 1998.
- BEHRMAN, H. R.; KODAMAN, P. H.; PRESTON, S. L.; GAO, S. Oxidative stress and the ovary. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 8, n. 1, p. 40-42, 2001.
- BEKHEET, S. H M. Comparative effects of repeated administration of cadmium chloride during pregnancy and lactation and selenium protection against cadmium toxicity on some organs in immature rats' offsprings. **Biological trace element research**, v. 144, n. 1-3, p. 1008-1023, 2011.
- 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.
- BERNARDES, A. Anatomia cirúrgica do aparelho genital feminino. In: OLIVEIRA, C. F. **Manual de Ginecologia**. Permanyer, Portugal. 2011. Disponível em: <http://www.fspog.com/fotos/editor2/cap_01.pdf>
- BISHT, S.; FAIQ, M.; TOLAHUNASE, M.; DADA, R. Oxidative stress and male infertility. **Nature Reviews Urology.** v. 14, n. 8, p. 470–485. 2017.
- BOREKCI, B.; GUNDOGDU, C.; ALTUNKAYNAK, B. Z.; CALIK, M.; ALTUNKAYNAK, M. E.; UNAL, D.; UNAL, B. The protective effect of dehydroepiandrosterone on ovarian tissues after torsion-detorsion injury: a stereological and histopathological study. **The Eurasian Journal of Medicine**, v. 41, n. 1, p. 22, 2009

BORJA-ABURTO V.; HERTZ-PICCIOTTO, I.; ROJAS LOPEZ, M.; FARIAS, P.; CAMILO RIOS; BLANCO, J. Blood lead levels measured prospectively and risk of spontaneous abortion. **Am J Epidemiol.** v. 150, n. 6, p. 590–597, 1999.

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

BRAGA, L. M. G. M. Controle reprodutivo em biotérios de criação de animais de laboratório com ênfase em roedores. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.105-109, 2017.

BRUROK, H.; BERG, K.; SNEEN, L.; GRANT, D.; KARLSSON, J.O.; JYNGE, P. cardiac metal contents after infusions of manganese: An experimental evaluation in the isolated rat heart. **Invest. Radiol**, v. 34, n. 7, p. 470–476, 1999.

CABRAL, F. H. C. **Alterações morfológicas testiculares provocadas pelo cádmio, paracetamol e ao cádmio associado ao paracetamol, em ratos.** 176f. Dissertação (Pós-Graduação em Biologia Celular). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

CALABRESE, E. J.; BLAIN, R. The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. **Toxicol. Appl. Pharmacol**, v. 202 p. 289–301. 2005.

CARVALHO, F. A. R. **Morfologia e morfometria testicular de camundongos adultos submetidos a exposição crônica ao arsenato.** 89f. Dissertação (Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

CEOLIN, D. **Efeito da exposição crônica ao manganês sobre camundongos machos adultos.** 57f. Dissertação (Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

CHANDEL, M.; JAIN, G. Effects of manganese exposure on testicular histomorphology, serum hormones level and biochemical marker parameters in Wistar rats. **Journal of Biological Sciences and Medicine**, v. 3, n. 3, p. 1-14, 2017.

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

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.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 11-23, 2009.

CLARKE, H. J. Control of mammalian oocyte development by interactions with the maternal follicular environment. In: KLOC, M. **Oocytes: maternal information and functions (Results and problems in cell differentiation).** 1ª ed. Cham: Springer. 2017.

COSTA, K. L. C. **Danos testiculares em ratos submetidos a diferentes doses de chumbo: avaliação histomorfométrica, ultraestrutural e bioquímica.** 101f. Tese (Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

COSTA, M. C. **Ciclo estral, histomorfometria ovariana e uterina de camundongas após tratamento prolongado com acetato de medroxiprogesterona.** 80 f. Tese (Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

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

DEPARTMENT OF HEALTH. Toxicological summary for: Manganese. Health Based **Guidance for Water Health Risk Assessment Unit, Environmental Health Division.** 2018. Disponível em: <<https://www.health.state.mn.us/communities/environment/risk/docs/guidance/gw/manganese.pdf>>. Acesso em: 17 out 2019.

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.

DORMAN, D. C.; STRUVE, M. F.; MARSHALL, M. W.; PARKINSON, C. U.; JAMES, R. A.; WONG, B. A. Tissue manganese concentrations in young male rhesus monkeys following subchronic manganese sulfate inhalation. **Toxicological sciences**, v. 92, n. 1, p. 201-210. 2006.

DUTTA, S.; MAJZOUB, A.; AGARWAL, A. Effects of oxidative stress on different sperm functions: How to evaluate and manage. In: MUKHERJEE, G. G.; KHASTGIR, G.; CHATTOPADHYAY, R. **Practical Guide in Andrology and Embryology.** 1 ed. Nova Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, p. 76-88. 2018.

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.; ASCHNER, M. Manganese neurotoxicity and glutamate-gaba interaction. **Neurochemistry international**, v. 43, n. 4-5, p. 475-480, 2003.

FERNANDES, J. S.; FORTUNATO, J.M.S.; CORREIA-PINTO, J. Fisiologia do sistema reprodutor feminino. Braga: Universidade do Minho, 2003.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestical animals. In: MARTINEZ, F. **Male Reproduction: a multidisciplinary overview.** 1ª ed. p. 197-219, Madrid: Churchill Liningstone. 1998.

FRANÇA, L. R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA, F. F. L Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v.63, p.300-318, 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.

GARTNER, L. P.; HIATT, J.L. **Tratado de histologia em cores**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GARNER, D. L., HAFEZ, E. S. E. Spermatozoa and seminal plasma. **Reproduction in Farm Animals**, p. 96–109. 2016

GAVIN; C. E.; GUNTER, K. K.; GUNTER, T. E. Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria. Relevance to manganese toxicity. **Biochem J**, v. 266, p. 329– 334.1990.

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.

GOMES, M.L.M.; MONTEIRO, J.C.; FREITAS, K.M.; SBERVELHERI, M.M.; DOLDER, H. Association of the infusion of *Heteropterys aphrodisiaca* and endurance training brings spermatogenetic advantages. **Biol. Res.** v. 44, p. 235–241. 2011.

GOUGEON, A. Dynamics of human follicular growth: morphologic, dynamics, and functional aspects. **The ovary**, 2004.

GRAVINA, F. S.; VAN HELDEN, D. F.; KERR, K. P.; DE OLIVEIRA, R. B.; JOBLING, P. Phasic contractions of the mouse vagina and cervix at different phases of the estrus cycle and during late pregnancy. **PloS one**, n. 9, v. 10. 2014.

GRISWOLD, M. D. The central role of sertoli cells in spermatogenesis. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, v. 9, n. 4, p. 411–416.1998.

GUERRA. M.T. **Estrutura do trato genital e função reprodutiva da prole masculina e feminina de ratos expostos ao propionato de testosterona in utero e durante a lactação**. 199f. Tese (Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

GUNTER, T. E.; GAVIN, C. E.; ASCHNER, M.; GUNTER, K. K. Speciation of manganese in cells and mitochondria: a search for the proximal cause of manganese neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 27, n. 5, p. 765-776. 2006.

GUNTER; T. E.; GAVIN; C. E.; GUNTER; K. K. The case for manganese interaction with mitochondria. **Neurotoxicology**, v. 30, n. 4, p. 727. 2009.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. 12ª Edição. Editora Elsevier, 2011

HILDERBRAND, D. C.; DER, R.; GRIFFIN, W. T.; FAHIM, M. S. Effect of lead acetate on reproduction. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 115, n. 8, p. 1058-1065, 1973.

HISTOLOGY GUIDE. **Female Reproductive System**. Disponível em: <<http://www.histologyguide.com/slidebox/18-female-reproductive-system.html>>. Acesso em: 19 nov 2019.

IMnl. **International Manganese Institute**. Applications. Disponível em: <<http://www.manganese.org/about-mn/applications/>>. Acesso em: 20 mar 2019.

JAIN, M.; KALSI, A. K.; SRIVASTAVA, A.; GUPTA, Y. K.; HALDER, A. High serum estradiol and heavy metals responsible for human spermiation defect-a pilot study. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**. v. 10, n. 12, p. 9, 2016.

JIAN, Y.; ZHENG, W. Cardiovascular toxicities upon manganese exposure. **Cardiovasc Toxicol**, v. 5, n. 3, p. 45–54. 2005.

JOHNSON, L.; ING, N.H.; CURLEY, K.O.; GRAHAM, J.; WELSH, T.H. Anatomy and physiology of the male reproductive system and potential targets of toxicants. **Reference Module in Biomedical Sciences**, Elsevier, 2015.

JUNAID, M.; CHOWDHURI, D. K.; SAXENA, R.; NARAYAN, R.; SHANKER, D.K. Lead-induced changes in ovarian follicular development and maturation in mice. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, v. 50, n. 1, p. 31-40, 1997.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor Feminino. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: texto e atlas**. 13ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. p. 427-446.

KANOJIA, R. K.; JUNAID, M.; MURTHY, R. C. Embryo and fetotoxicity of hexavalent chromium: a long-term study. **Toxicol Lett**, v. 95, n. 3, p.165–172. 1998.

KENHUB. Disponível em: <<https://www.kenhub.com/pt/library/anatomia/testiculos>>. Acesso em: maio 2019.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

KIM, S. I.; JANG, Y. S.; HAN, S. H.; CHOI, M. J.; GO, E. H.; CHEON, Y.; LEE, JUNG, S.; LEE, S. Effect of manganese exposure on the reproductive organs in immature female rats. **Dev. Reprod**, v. 16, n. 4, p. 295-300. 2012.

KNOBLAUGH, S.; TRUE, L. Male reproductive system. In: TREUTING, P. M.; DINTZIS, S. M. **Comparative anatomy and histology – A mouse and human atlas**. 1ª ed. Boston: Elsevier, 2012.

KOFF, S. A. Does compensatory testicular enlargement predict monorchism? The **Journal of urology**, v. 146, n. 2, p. 632-633, 1991.

KOPERA, I. A.; BILINSKA, B.; CHENG, C. Y.; MRUK, D. D. Sertoli-germ cell junctions in the testis: A review of recent data. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1546, p. 1593-1605, 2010.

KOSCO, M. S.; LOSETH, K. J.; CRABO, B. G. Development of the seminiferous tubules after neonatal hemicastration in the boar. **Reproduction**, v. 87, n. 1, p. 1-11, 1989.

LASKEY, J. W.; REHNBERG, G. L.; HEIN, J. F.; CARTER, S. D. effects of chronic manganese (Mn_3O_4) exposure on selected reproductive parameters in rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues**, v. 9, n. 4, p. 677-687, 1982.

LASKEY, J. W.; REHNBERG, G. L.; HEIN, J. F.; LAWS, S. C.; EDENS, F. W. Assessment of the male reproductive system in the preweanling rat following Mn_3O_4 exposure. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues**, v. 15, n. 2, p. 339-350, 1985.

LEE, B.; HINEY, J. K.; PINE, M. D.; SRIVASTAVA, V. K.; DEES, W. L. Manganese stimulates luteinizing hormone releasing hormone secretion in prepubertal female rats: Hypothalamic site and mechanism of action. **The Journal of Physiology**, v. 578, n. 3, p. 765-772, 2007.

LEIDL, W.; BRAUN, U.; STOLLA, R.; SCHAMS, D. Effects of hemicastration and unilateral vasectomy on the remaining gonad and on FSH, LH and testosterone blood concentrations in bulls. **Theriogenology**, v. 14, p. 173–183. 1980.

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.

LONG L.L.; LI, X.R.; HUANG, Z.K.; JIAN, Y.M.; FU, S.X.; ZHENG, W. Relationship between changes in brain mri and 1h-mrs, severity of chronic liver damage, and recovery after liver transplantation. **Exp Biol Med**, v. 234, n. 10, p. 75–85. 2009.

LUNSTRA, D. D.; WISE, T. H.; FORD, J. J. Sertoli cells in the boar testis: changes during development and compensatory hypertrophy after hemicastration at different ages. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 1, p. 140-150, 2003.

MARBANIANG, D.G. Spectrophotometric determination of manganese in ground water in shillong city using bismuthate oxidation method. **International Journal of Environmental Protection**, n. 2, p 22-26. 2012.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian journal of biology**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.

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.

MATTSON, M. P. Hormesis defined. **Ageing research reviews**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2008.

MAYHEW, T. M. The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. **Experimental Physiology: Translation and Integration**, v. 76, n. 5, p. 639-665, 1991.

MCGEE, E. A.; HSUEH, A.J. W. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocr. Rev.**, v. 21, n. 2, p. 200-214. 2000.

MICHALKE, B.; HALBACH, S.; NISCHWITZ, V. Speciation and toxicological relevance of manganese in humans. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 9, n. 7, p. 650-656, 2007.

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.

MOHAMMED, A.T.; EBRAHEIM, L. LM; METWALLY, 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.

MURTHY, R.C.; JUNAID, M.; SAXENA, D.K. Ovarian dysfunction in mice following chromium (VI) exposure. **Toxicol Lett**, v. 89, n. 2, p.147–154. 1996.

MYERS, M.; BRITT, K. L.; WREFORD, N. G. M.; EBLING, F. J. P.; KERR, J. B. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. **Reproduction**, v. 127, n. 5, p. 569-580, 2004.

NASCIMENTO, T. F. V. O.; GONZALEZ, F. G. Impactos do manganês na saúde pública. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 11, n. 3, 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.

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.

OUARDA, M.; ABDENNOUR, C. Influence of sudden cystine supplementation and suppression on adrenal and ovary of lead exposed rat. **European Journal of Scientific Research**, v. 23, n. 4, p. 548-558, 2008.

PAHUNE, P. P.; CHOUDHARI, A. R.; MULEY, P. A. The total antioxidant power of semen and its correlation with the fertility potential of human male subjects. **J. Clin. Diagn. Res.**, v. 7, n. 6, p. 991–995. 2013.

PANDEY, G.; JAIN, G. C. Aluminium chloride-induced testicular effects in rats: A histomorphometrical study. **Asian Journal of Applied Science and Technology (AJAST)**, v. 1, n. 9, p. 46-52. 2017.

PARSONS-WHITE, A. B.; SPITZER, N. Environmentally relevant manganese overexposure alters neural cell morphology and differentiation in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 50, p. 22-28. 2018.

PAULA; T. A. R.; COSTA, D. S.; MARRA, S. L. P. Avaliação histológica quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas. **Biosc. J**, v. 18, n. 1, p. 121- 136. 2002.

PIASEK, M.; LASKEY, J. W. Effects of in vitro cadmium exposure on ovarian steroidogenesis in rats. **Journal of applied toxicology**, v. 19, n. 3, p. 211-217, 1999.

PINE, M.; LEE, B.; DEARTH, R.; HINEY, J. K.; DEES, W. L. Manganese acts centrally to stimulate luteinizing hormone secretion: a potential influence on female pubertal development. **Toxicological Sciences**, v. 85, n. 2, p. 880-885, 2005.

PREDES, F. S.; MONTEIRO, J. C.; MATTA, S. L. P.; GARCIA, M. C.; DOLDER, H. Testicular histomorphometry and ultrastructure of rats treated with cadmium and Ginkgo biloba. **Biological trace element research**, v. 140, n. 3, p. 330-341, 2011.

RENDI, M. H.; MUEHLENBACHS, A.; GARCIA, R.L.; BOYD, K.L. Female reproductive system. In: TREUTING, P. M.; DINTZIS, S. M. **Comparative anatomy and histology** – A mouse and human atlas. 1^a ed. Boston: Elsevier, 2012.

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

RODRIGUES, M. H. **Análise morfométrica e funcional do desenvolvimento testicular de caprinos da raça Alpina criados em condições semi-intensivas**. 159f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campo dos Goytacases, 2010.

RUGH, R. **The mouse - reproduction and development**. Minneapolis: Burgess Publishing Company. 1968.

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

RUSSELL, L. D. Mammalian Leydig cell structure. In: PAYNE, A. H.; HARDY, M. P.; RUSSELL, L. D. **The Leydig Cell**. Cache River Press, p. 218-222. 1996.

RUSSELL, L. D.; ETTILIN, L. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEED, E. D. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, L. D.; ETTILIN, L. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEED,

E. D. **Histological and Histopathological Evaluation of the Testis**. 1^a ed, p. 1-40. Cache River Press, Clearwater. 1990.

RZYMSKI, P.; RZYMSKI, P.; TOMCZYK, K.; NIEDZIELSKI, P.; JAKUBOWSKI, K.; PONIEDZIAŁEK, B.; OPALA, T. Metal status in human endometrium: Relation to cigarette smoking and histological lesions. **Environmental Research**, v. 132, p. 328–333. 2014.

RZYMSKI, P.; TOMCZYK, K.; PONIEDZIAŁEK, B.; OPALA, T.; WILCZAK, M. Impact of heavy metals on the female reproductive system. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 22, n. 2, 2015.

SAKR, S. A., NOOH, H. Z. Effect of Ocimum basilicum extract on cadmium-induced testicular histomorphometric and immunohistochemical alterations in albino rats. **Anat Cell Biol**. v. 46, n. 2, p. 122-130. 2013

SANCHEZ, D. J.; DOMINGO, J. L.; LLOBET, J. M. Maternal and developmental toxicity of manganese in the mouse. **Toxicol Lett**, V. 69, p.45–52. 1993.

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.

SANTOS, F. C. C. D. **Sêmen da cauda do epidídimo de garanhões submetido à centrifugação com coloide**. 98 f. Tese (Doutorado em Medicina Animal: Equinos) – Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

SANTOS, T. A. **Fisiologia do ovário e da fecundação**. Em: Oliveira, C.F. Manual de Ginecologia, 2009.

SCARINI, J. Laudo aponta urânio e manganês acima do limite permitido em água de poço na Serra do RJ. **Globo**. 11 nov 2017. Disponível em: <<https://g1.globo.com/rj/regiao-serrana/noticia/laudo-aponta-uranio-e-manganes-acima-do-limite-permitido-em-agua-de-poco-na-serra-do-rj.ghtml>>. Acesso em: 10 out 2019.

SCHUURS, A. H. Reproductive toxicity of occupational mercury. A review of the literature. **Journal of Dentistry**, v. 27, n. 4, p. 249–256. 1999.

SCHROEDER, H. A.; BALASSA, J. J.; TIPTON, I. H. Essential trace metals in man: Manganese. **J. Chron. Dis**, v. 19, p. 545-571, 1966.

SENGUPTA, P.; BANERJEE, R.; NATH, S.; DAS, S.; BANERJEE, S. Metals and female reproductive toxicity. **Human & Experimental Toxicology**, v. 34, n. 7, p. 679-697, 2015.

SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers Biosci**. v. 1, p. 78- 86. 1996.

SILBERSTEIN, T.; SAPHIER, O.; PAZ-TAL, O.; TRIMARCHI, J. R.; GONZALEZ, L.; KEEFE, D. L. Lead concentrates in ovarian follicle compromises pregnancy. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 20, n. 3, p. 205–207. 2006.

SILVA, A. P. G.; SANTIAGO, M. D. S. A.; MARANHO, L. A.; DE OLIVEIRA, R. P.; CONSTANTINO, D. H. J.; PEREIRA, C. D. S.; 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.

SOS Mata Atlântica. **Observando os rios**: o retrato da qualidade da água na bacia do rio Doce após dois anos do rompimento da barragem de Fundão. 2017. Disponível em: <<https://www.sosma.org.br/quem-somos/publicacoes>>. Acesso em: 21 maio 2019.

SOS Mata Atlântica. **Observando os rios**: O retrato da qualidade da água na bacia do rio Paraopeba após o rompimento da barragem Córrego do Feijão – Minas Gerais, 2019. Disponível em: <https://www.sosma.org.br/wp-content/uploads/2019/03/Expedicao-Paraopeba_Relatorio.pdf>. Acesso em: 21 maio 2019.

SOUZA, A. F.; DA COSTA, S. G. A. L.; MORAIS, D. B.; MOLINA, W. F. Diversidade morfológica dos órgãos copulatórios dos vertebrados: uma revisão. **Biota Amazônia**, v. 4, n. 4, p. 115-123. 2014.

SOUZA, A. C. F.; ERVILHA, L. O. G.; COIMBRA, J. L. P.; BASTOS, D. S. S.; GUIMARÃES, S. E. F.; MACHADO-NEVES, M. Reproductive disorders in female rats after prenatal exposure to sodium arsenite. **Journal of Applied Toxicology**, p. 1-10. 2019b.

SOUZA, B. R. **Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica dos ovários de ratas tratadas com o esteroide decanoato de nandrolona associado à melatonina**. 135f. Dissertação (Pós-Graduação em Biociências). Universidade Estadual Paulista, Assis, 2017.

SOUZA, T. L. **Avaliação funcional do sistema reprodutor masculino de camundongos Swiss após múltiplas formas de exposição ao manganês**. 147f. Dissertação (Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

SOUZA, T. L.; BATSCHAUER, A. R.; BRITO, P. M.; RIBEIRO, C. A. O.; MARTINO-ANDRADE, A. J.; ORTOLANI-MACHADO, C. F. Multigenerational analysis of the functional status of male reproductive system in mice after exposure to realistic doses of manganese. **Food and Chemical Toxicology**, v. 133, p. 110763 2019a.

TAUPEAU, C.; TAUPEAU, K.; NOMÉ, F.; LEFÈVRE, B. Lead accumulation in the mouse ovary after treatment-induced follicular atresia. **Reprod. Toxicol**, v. 15, p. 385–39. 2011

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.

TERRITO, P.R.; FRENCH, S. A.; DUNLEAVY, M.C.; EVANS, F.J.; BALABAN, R.S. Calcium activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation. **J Biol Chem**. v. 276, n. 25, p. 86–99. 2001.

TOWLER, M. C.; PRESCOTT, A. R.; JAMES, J.; LUCOCQ, 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.

VERONEZ, D. A. D. L. **Abordagem morfofuncional do sistema reprodutor masculino e feminino**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2012. Disponível em: < <https://e-radiologia.org/2012/11/16/abordagem-morfofuncional-do-sistema-reprodutor-masculino-e-feminino/>>. Acesso em: 12 mar 2019.

VIDAL, J. D.; FILGO, A. J. Evaluation of the estrous cycle, reproductive tract, and mammary gland in female mice. **Current Protocols in Mouse Biology**, n. 7, p. 306–325. 2017.

VILELA, M. G.; JÚNIOR, S.; SILVA, J. G. D. C. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. **Femina**, v. 35, n. 10, p. 667-670, 2007.

WAN, X.; ZHU, J.; ZHU, Y.; ZHU, Y.; MA, X.; ZHENG; ZHANG, T. Rat ovarian follicle bioassay reveals adverse effects of cadmium chloride (CdCl₂) exposure on follicle development and oocyte maturation. **Toxicology and industrial health**, v. 26, n. 9, p. 609-618, 2010

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.

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

WHO (World Health Organization). **Guidelines for drinking-water quality**: fourth edition incorporating the first addendum. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 2017.

WILLIAMS, M.; TODD, G. D.; RONEY, N.; CRAWFORD, J.; COLES, C.; MCCLURE, P. R.; GAREY, J.D.; ZACCARIA, K.; CITRA, M. Toxicological profile for manganese. **Toxicological Profiles**, Set 2012.

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, p. 270–273. 2007.

YANG, H.; WANG, J.; YANG, X.; WU, F.; QI, Z.; XU, B.; LIU, W.; DENG, Y. Occupational manganese exposure, reproductive hormones, and semen quality in male workers: a cross-sectional study. **Toxicology and Industrial Health**, v. 35, n. 1, p. 53-64, 2018.

YOSHIDA, M.; SANBUISSYO, A.; HISADA, S.; TAKAHASHI, M.; OHNO, Y.; NISHIKAWA, A. Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. **The Journal of toxicological sciences**, n. 34, p.189-197. 2009.

YUYAN, L.; JUNQING, W.; WEIJIN, Z.; ERSHENG, G. Effects of manganese on routine semen quality parameters: results from a population-based study in china. **BMC Public Health** 12, 919. 2012.

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.

ZHANG, Wenchang; JIA, Haimei. Effect and mechanism of cadmium on the progesterone synthesis of ovaries. **Toxicology**, v. 239, n. 3, p. 204-212, 2007.

ZLOTKIN, S. H.; ATKINSON, S.; LOCKITCH, G. Trace elements in nutrition for premature infants. **Clin Perinatol**, v. 22, p. 223–240. 1995.

ZOTA, A. R., ETTINGER, A. S., BOUCHARD, M., AMARASIRIWARDENA, C. J., SCHWARTZ, J., HU, H., WRIGHT, R. O. Maternal blood manganese levels and infant birth weight. **Epidemiology**, v. 20, n. 3, p. 367–373, 2009.