

DIEGO CEOLIN

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA DO
MANGANÊS SOBRE CAMUNDONGOS MACHOS
ADULTOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e
Estrutural, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

DIEGO CEOLIN

**Efeitos da exposição crônica do manganês sobre
camundongos machos adultos**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e
Estrutural, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2010.

Prof. Tarcísio Antônio R. de Paula
(Coorientador)

Prof. Juraci Alves de Oliveira
(Coorientador)

Profa. Mariana Machado Neves

Profa. Sirlene de Souza R. Sartori

Prof. Sérgio Luis P. da Matta
(Orientador)

*À minha família,
especialmente ao meu sobrinho Pedro Barros Ceolin.
Aos amigos.*

Ao meu professor e orientador Sérgio Luis Pinto da Matta.

“Eu procuro lembrar a mim mesmo, umas cem vezes por dia, que minha vida privada e profissional depende de outras pessoas, vivas e mortas, e que eu preciso me superar para dar aos outros algo próximo do que recebi e recebo”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e constantes manifestação da sua existência durante a minha trajetória.

Aos meus pais, Jacinto Valentino Ceolin e Mariza Gusmão de Souza Ceolin, pelo amor incondicional e por apoiarem e incentivarem meus estudos, mesmo sem entenderem o que eu faço.

Ao meu irmão, Camilo, e a minha irmã, Amanda pela cumplicidade, companheirismo e por me ensinarem a perceber minhas fraquezas e virtudes.

Ao meu sobrinho, Pedro Barros Ceolin, por ser a maior alegria da minha família e por protagonizar momentos extremamente divertidos. Tio Diego te ama!

À Ana Carolina Cordeiro Soares, minha companheira, por ser um dos motivos para a realização deste mestrado e por estar ao meu lado, em todos os momentos, e saber exatamente como essa conquista foi difícil. Sem ela a realização deste sonho não seria possível!

Ao professor Sérgio Luis Pinto da Matta, pelo exímio professor, pesquisador e orientador que é. Meus sinceros agradecimentos por ter tornado este trabalho possível, e também, por me ensinar a viver com alegria e entusiasmo. Muito obrigado por tudo!

Ao professor Juraci Alves de Oliveira, pela co-orientação, amizade e esforço para que este trabalho acontecesse.

Ao professor Tarcízio Antônio Rêgo de Paula pela co-orientação, amizade e por ser uma das principais referências nesta área de pesquisa. Meus agradecimentos por contribuir com esse trabalho.

Às professoras Mariela Bomtempo Duca de Oliveira e Mariana Machado Neves por aceitarem participar da banca examinadora desta dissertação.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) por fornecer todas as ferramentas necessárias ao meu desenvolvimento intelectual.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural – Universidade Federal de Viçosa – UFV. Agradeço pela oportunidade e conhecimento produzido durante este mestrado.

À secretária de Pós-graduação do programa de Biologia Celular e Estrutural, Beth, pela amizade e empenho para solucionar todas as burocracias durante o mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de bolsa fornecida durante parte deste curso.

Ao laboratório de Anatomia Vegetal do departamento de Biologia Vegetal por disponibilizar os equipamentos de captura de imagens.

À coordenação do Biotério Central da UFV, principalmente ao “Seu Adão”, pela receptividade e por disponibilizar os animais necessários para a realização do experimento.

À Coordenação e responsáveis pelo laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição por disponibilizar a estrutura do laboratório para a realização do experimento.

A todos do Laboratório de Biologia Estrutural (o melhor ambiente de trabalho da UFV), professores, mestrandos, doutorandos, em especial ao responsável técnico Alex!

A todos os colegas que contribuíram para a realização deste trabalho: Whellington, Fabíola, Juliana, Pâmela, Kívia, Carol, Suelen, Karine, Diane, Tarcísio (Zizu) e Regiane. Vocês foram fundamentais para que este trabalho se concretizasse!

Às colegas Daniele Moraes e Ana Paula pela disponibilidade e ajuda preciosa nas análises e pelo apoio na etapa final deste trabalho. Você foram mais do que importante para o sucesso desta pesquisa!

A todos os amigos, companheiros de república e de trabalho pelo prazer a convivência e pelos bons momentos que me proporcionaram.

Ao Colégio Anglo de Viçosa, Ubá, Raul Soares e Manhuaçu pela oportunidade de crescimento profissional como professor e pelo carinho de todos os professores, funcionários e alunos.

Muito obrigado a todos vocês!

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. Revisão de literatura	1
1.1- Aspectos químicos do manganês.....	1
1.2- Manganês como contaminante ambiental.....	2
1.3- Manganês a saúde humana.....	3
1.4- Organização morfofuncional do testículo	6
1.5- Espermatogênese	8
1.6- Células de Sertoli	10
1.7- Célula de Leydig	12
1.8- Biomarcadores séricos de hepatotoxicidade	13
2. Objetivos	14
3. Material e Métodos	14
3.1- Animais, grupos experimentais e tratamento	14
3.2- Preparo de solução de cloreto de manganês.....	15
3.3- Coleta de amostras	15
3.4- Microscopia de luz	15
3.5- Análises histométricas.....	16
3.5.1- Índice gonadossomático.....	16
3.5.2- Proporção volumétrica (%) e volume dos componentes testiculares.....	16
3.5.3-Diâmetro tubular e Altura de epitélio seminífero.. ..	17
3.5.4- Comprimento total de túbulo seminífero	17
3.5.5- Níveis plasmáticos de testosterona e transaminases (ALT e AST).....	18
3.5.6- Espectrofotometria de emissão de plasma.....	18
3.5.7- Índice Hepatossomático.....	18
3.6- Análise estatística.....	18
4. Resultados	19
4.1- Biometria corporal.....	19
4.2- Concentrações de manganês.....	20
4.3- Determinação plasmática das enzimas transaminases	23
4.4- Proporções volumétricas de túbulo seminífero e intertúbulo.....	24

4.5- Volumes tubulares, intertubulares e índice tubulossomático.....	25
4.6- Diâmetros tubulares, Altura de epitélio e Comprimento de túbulos seminíferos....	25
5. Discussão.....	26
5.1- Biometria corporal.....	26
5.2- Concentrações de manganês.....	28
5.3- Determinação plasmática das enzimas transaminases.....	28
5.4- Proporções volumétricas de túbulo seminífero e intertúbulo.....	29
5.5- Volumes tubulares, intertubulares e índice tubulossomático.....	30
5.6- Diâmetros tubulares, Altura de epitélio e Comprimento de túbulos seminíferos.....	30
6. Conclusões.....	32
7. Referências	33

RESUMO

CEOLIN, Diego, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Efeitos da exposição crônica do manganês sobre camundongos machos adultos.** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta. Co-Orientadores: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula e Juraci Alves de Oliveira.

O manganês é um dos metais mais abundantes na crosta terrestre e geralmente ocorre associado ao ferro. Em pequenas quantidades este metal é considerado um nutriente essencial, necessário para muitos eventos fisiológicos de mamíferos, incluindo o crescimento e o desenvolvimento normal dos ossos e cartilagens, bem como do sistema reprodutivo. O manganês também está envolvido no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, além de desempenhar uma importante função como cofator de inúmeras enzimas. Este elemento é considerado um metal pesado e o aumento de sua disponibilidade no ambiente está relacionado a atividades industriais, potencializando o risco de exposição. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da exposição crônica do manganês sobre camundongos Swiss machos adultos. Os parâmetros analisados foram: biometria corporal, índice gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS), concentração de manganês em órgãos reprodutivos de filtração, proporção volumétrica dos elementos do parênquima testicular, índice túbulo somático, diâmetro tubular e altura de epitélio e comprimento de túbulo seminífero. Vinte e quatro camundongos foram divididos igualmente em três grupos: dois tratados que receberam cloreto de manganês na dose de 30mg/Kg/dia via oral por 42 (Mn1) e 84 (Mn2) dias, e um grupo controle que recebeu água destilada. Após 42 e 84 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados sendo retirados os órgãos sexuais, fígado, rins que foram fixados em Karnovsky. Os testículos foram processados, corados em azul de toluidina/borato de sódio, fotografados e analisados com o programa Image-Pro Plus. Para determinação da concentração tecidual de manganês, os órgãos foram processados e analisados por espectrofotometria de emissão em plasma. Níveis plasmáticos de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), foram determinados utilizando kits comerciais. Para a comparação das médias foi utilizado o teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). O peso corporal aumentou significativamente ($p < 0,05$) nos grupos Mn1 (42 dias) e Mn2 (84 dias) em relação ao grupo controle. Houve redução significativa no IGS do grupo Mn2 em relação ao grupo controle. O fígado mostrou aumento significativo de peso nos grupos tratados em relação ao controle, embora o IHS (índice hepatossomático) não tenha

alterado. Observou-se acúmulo de manganês em todos os órgãos analisados. A concentração plasmática de AST aumentou significativamente no grupo Mn2. Houve diminuição na proporção de túbulo seminífero e aumento na proporção de intertúbulo dos animais tratados por 84 dias. O ITS diminuiu significativamente nos grupos tratados em relação ao controle. No grupo Mn2 houve aumento na altura de epitélio e redução no comprimento total de túbulo. O comprimento de túbulo por grama de testículo diminuiu significativamente nos dois grupos tratados, quando comparados com o controle. Adicionalmente, as variações nos parâmetros enzimáticos são fortes indicativos de toxicidade hepática e renal do manganês, motivando assim estudos mais histológicos e morfométricos destes órgãos.

ABSTRACT

CEOLIN, Diego, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2010. **Effects of chronic exposure of manganese on adult male mice.** Adviser: Sérgio Luis Pinto da Matta. Co-Advisers: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula and Juraci Alves de Oliveira.

Manganese is one of the most abundant metals in Earth's crust and is usually occurs associated with iron. In small quantities this metal is considered an essential nutrient, required for many physiological events of mammals, including normal growth and development of bones and cartilages, as well as the reproductive system. Manganese is also involved in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins, and also play an important role as a cofactor of several enzymes. This element is considered a heavy metal and the increase of its availability in the environment is related to industrial activities, powering the risk of exposure. The objective of this study was to evaluate the effects of chronic exposure of manganese on adult male Swiss mice. The parameters analyzed were: body biometrics, gonadosomatic index (GSI) and hepatosomatic (HSI), manganese concentration in the reproductive organs of filtration, volume proportion of the elements of the testicular parenchyma, tubular somatic index, tubular diameter and epithelium height and length of seminiferous tubule. Twenty-four mice were divided into three groups: two treaties that received manganese chloride at a dose of 30mg/kg/day orally for 42 (Mn1) and 84 (Mn2) days, and a control group that received distilled water. After 42 and 84 days of treatment, the animals were euthanized and removed the sexual organs, liver, kidneys, that were fixed in Karnovsky. The testes were processed, stained with toluidine blue / sodium borate, photographed and analyzed with the Image-Pro Plus. To determine the tissue concentration of manganese, the organs were processed and analyzed by spectrometry emission in plasma. Plasma levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were determined using commercial kits. For the comparison of averages Newman-Keuls ($p < 0.05$) test was used. Body weight increased significantly ($p < 0.05$) in the groups MN1 (42 days) and Mn2 (84 days) compared to the control group. Significant reduction of SGI in the group Mn2 compared to the control group was found. The liver showed a significant increase of weight in the treated groups compared to the control group, although the HSI (hepatosomatic index) has not changed. Accumulation of manganese in all organs analyzed was observed. The plasma concentration of AST increased significantly in group Mn2. There was a decrease in the proportion of seminiferous tubule and increase in the proportion of intertubular animals treated for 84 days. TSI decreased significantly in the treated groups compared to control group. In the group Mn2 was

increase in height of epithelium and reduction in the total length of tubule. The length of tubule per gram of testes decreased significantly in both treated groups compared with the control group. Additionally, changes in enzyme parameters are strong indicators of liver and kidney toxicity of manganese, motivating further histological and morphometric studies of these organs.

1. Revisão de literatura

1.1- Aspectos químicos do Manganês

Segundo Martins & Lima, o nome manganês origina-se do latim e significa “magnético”. O manganês é um metal de transição, pertencente à família VIIb da tabela periódica, que possui número e peso atômicos 25 e 54,93, respectivamente. Como os outros elementos de transição, devido a sua configuração eletrônica, o manganês possui algumas propriedades características: apresenta várias formas e estados de oxidação (0 a + 7) e pode formar vários compostos coloridos e paramagnéticos. É um dos mais abundantes na crosta da Terra, geralmente ocorrendo junto com ferro, e está presente em rochas ígneas, metamórficas e sedimentares (MENA 1980). O manganês é um metal que possui estabilidade considerada normal. Geralmente, forma óxidos como produtos de combustão e decomposição térmica e, quando em concentração suficiente, na forma de finas partículas dispersas, tem potencial de incêndio considerado moderado, podendo formar misturas explosivas no ar. O manganês pode formar compostos organometálicos, tais como pentacarbonilmanganato $[(\text{NaMn}(\text{CO})_5)]$. Todavia, os compostos de maior interesse são o manganês tricarbonil metilciclopentadienil (MMT) e o manganês tricarbonil ciclopentadienil (CMT), ambos utilizados como aditivos para combustíveis (agente antidetonante). O dióxido e tetróxido de manganês são as formas tóxicas mais comuns, sendo que estudos com camundongos indicam o poder mutagênico do cloreto de manganês (Martins & Lima et al., 2001).

De acordo com a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR, 2000), com sede nos Estados Unidos, o manganês é um componente de mais de 100 minerais, mas não é encontrado naturalmente em sua forma pura (elementar), sendo o minério pirolusita (MnO_2) a principal fonte desse metal. No solo, suas concentrações dependem das características geotérmicas, das transformações ambientais dos compostos de manganês naturalmente presentes, da atividade de microorganismos e da incorporação pelas plantas (WHO, 1981).

Apesar dos principais minérios serem levemente hidrossolúveis, a gradual conversão em sais solúveis contribui para sua ocorrência em rios e mares, sendo encontrado nos oceanos na forma de nódulos, em concentrações que variam 150 a 500 mg/Kg. Pode ser oxidado e precipitado primariamente pela ação bacteriana e tende a ser transportado em solos

anaeróbicos e águas subterrâneas. Em pH 4-7 há predomínio da forma bivalente enquanto as formas oxidadas ocorrem em valores mais altos de pH (WHO, 1981).

O manganês é usado em várias ligas com o ferro, o cobre, o chumbo e o estanho. Desde a antiguidade o óxido de manganês é utilizado na fabricação de vidro, apesar da forma elementar ter sido isolada somente em 1774. Aproximadamente 90% do manganês produzido no mundo é utilizado na fabricação de ligas ferromanganês e ferrosilíciomanganês. Tais ligas são amplamente utilizadas em indústria metalúrgicas, principalmente na fabricação do aço, onde o manganês atua como agente dessulfurante e redutor, aumentando também a resistência, rigidez e durabilidade do produto. Por isso, o manganês é utilizado nos trilhos dos trens (WHO, 1981).

1.2- O manganês como contaminante ambiental

A expansão industrial aumentou a exploração de certos metais como matéria prima em processos de refinaria e metalurgia. Essa prospecção desenfreada resultou num crescente aumento da concentração ambiental de metais como níquel, chumbo, mercúrio, cádmio, arsênio e manganês. A maior disponibilidade desses e outros contaminantes ambientais aumenta a probabilidade de contaminação de diferentes formas de vida (Waalkes et al., 1992; Rana, 2007). Algumas características são importantes no que diz respeito à toxicidade de algum composto químico. A concentração do elemento ou composto no organismo é um fator primordial para sua ação e por isso há a preocupação com seu acúmulo ao longo do tempo de exposição (Gunn & Gould, 1970; Waalkes et al, 1992a, b; Rana, 2007). A toxicidade também depende da espécie ou mesmo da linhagem animal atingida, assim como com a resposta específica de cada órgão ou tecido à intoxicação. Existe também a relação entre a concentração local do elemento com a forma de exposição a ele, como por exemplo, através do contato com a pele, ingestão, inalação ou injeção intravenosa. Esses fatores influenciam diretamente na capacidade de captação do elemento químico pelas células do organismo (Oldereid et al., 1993) e a susceptibilidade dos órgãos e tecidos afetados (Waalkes et al, 1992a). Uma das maneiras de se avaliar experimentalmente a toxicidade de determinado elemento é manter constante a concentração administrada e variar o tempo de exposição.

Atualmente um dos tópicos mais relevantes na química ambiental é a qualidade da água. Recentemente, houve um grande aumento na preocupação dos potenciais efeitos de vários contaminantes ambientais, muitos deles considerados desreguladores endócrinos ou agentes de ativação hormonal. Esta preocupação se originou, em parte, de observações acerca do desenvolvimento e de alterações no sistema reprodutivo de populações que foram expostas a uma gama de químicos sintéticos e seus subprodutos, lançados em grande quantidade no ambiente desde a Segunda Guerra Mundial. Muitos destes contaminantes estão presentes na água de consumo (Saradha & Mathur, 2006).

Muitos efluentes industriais, frequentemente lançados próximos ou diretamente em corpos d'água sem tratamento prévio, são ricos em metais pesados. Na maioria das vezes esses metais permanecem em suspensão, se solubilizam ou sedimentam, e o acúmulo acarreta problemas a curto e longo prazo (Guerreiro et al., 1999). A presença de metais pesados em ambientes gera sérios impactos negativos, não somente às comunidades biológicas integrantes desses ecossistemas, mas também à saúde humana em razão de seus efeitos tóxicos na cadeia trófica. Os metais pesados são considerados relevantes, principalmente nas áreas onde há ação antropogênica devido a sua alta toxicidade, alta resistência à degradação e, conseqüentemente, persistência no ambiente (Di Topii & Gabrielli, 1999; Zagatto & Bertoletti, 2006).

A contaminação do ambiente aquático pelo manganês e, sua disponibilidade no meio está associada, em grande escala, a ação antrópica. O manganês pode ser encontrado como resíduo das atividades de mineração na água de drenagem das usinas, assim como no esgoto doméstico e resíduos produzidos pela indústria da celulose (Martins & Lima et al., 2001).

1.3 – O manganês e a saúde humana

O manganês é considerado um micronutriente essencial para vários eventos fisiológicos de mamíferos, incluindo o crescimento e desenvolvimento normal de ossos e cartilagens (Hurley, 1981), bem como dos tecidos e do sistema reprodutor (Greger, 1999; Keen et al., 1999). Adicionalmente, esse elemento também está envolvido no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, por ser cofator de inúmeras enzimas como a superóxido dismutase, hexoquinase e piruvato carboxilase (Keen et al., 1984). A dose diária de manganês recomendada para um adulto está entre 2-5 mg e normalmente é excretado juntamente com a secreção biliar (Martins & Lima et al., 2001). Sua absorção é afetada pela idade do indivíduo,

via de exposição, forma química, bem como outros fatores relacionados à dieta. Apenas 3-12% do manganês é absorvido pelo intestino, o que limita sua toxicidade, Cerca de metade do manganês no organismo ocorre nos ossos, o restante é encontrado em órgãos metabolicamente mais ativos e/ou relacionados com sua eliminação como fígado, pâncreas, hipófise, glândulas supra-renais e rins. O transporte é feito por meio de ligação com proteínas plasmáticas e, normalmente, ocorre oxidação da forma Mn^{+2} para Mn^{+3} mediada pela enzima ceruloplasmina, no intestino delgado. Em seguida, parte do manganês trivalente é transportado para os tecidos pelas proteínas plasmáticas transmanganina e β -globulina (WHO, 1981).

O corpo humano contém cerca de 10-20 mg de manganês, dos quais 5-8 mg são transformados diariamente. Os níveis sanguíneos de manganês são 1 μ g/100 ml, concentrando-se nos eritrócitos (Gerber et. al., 2002). A eliminação é um fator importante para a homeostase do manganês no organismo. Estudos realizados com humanos e animais mostram a importância da via gastrointestinal e, principalmente, da secreção biliar na eliminação desse metal. A concentração de manganês na bile é 100 a 200 vezes maior que no plasma, e de 6 a 10 vezes maior que no fígado. Na bile, esse metal pode se apresentar na forma catiônica ou complexada, a qual é mais bem reabsorvida pela mucosa intestinal quando compara aos cátions. Quando ocorre obstrução da via biliar, ou sobrecarga de manganês, as vias auxiliares contribuem mais significativamente para sua eliminação, principalmente a secreção pancreática (Siqueira, 1984).

Embora pequenas quantidades de manganês sejam necessárias e benéficas para o corpo, foi demonstrado que o excesso pode causar graves problemas (Ponnapakkam et al., 2003). Homens que foram expostos ao pó de manganês no trabalho relataram diminuição da libido e impotência (Chandra et al., 1973). Em diversas espécies de ratos a dose letal 50% (DL_{50}) varia de 275 a 804 mg/kg de peso, para o cloreto de manganês fornecido via oral. Além disso, concentrações mais elevadas de manganês são neurotóxicos podendo causar dano ao sistema nervoso central (Donaldson, 1987; Komura & Sakamoto, 1992).

O manganês atravessa a barreira hematoencefálica, provavelmente ligado a transferrina. No cérebro humano, assim como de outros animais, pode se concentrar no gânglio basal. Mas, experimentos com ratos demonstraram maior acúmulo no hipotálamo. Nos tecidos, o manganês não se liga as metalotioneínas, à semelhança de vários metais pesados, e parece apresentar maior afinidade por radicais N-imidazólicos, como os da histidina, de maneira semelhante ao ferro (Siqueira, 1984). A neurotoxicidade do metal é resultado da

acumulação no tecido cerebral, o que culmina numa progressiva desordem semelhante à doença de Parkinson (Crossgrove & Zheng, 2004).

Trabalhadores expostos prolongadamente a altos níveis de manganês podem apresentar intoxicação crônica, conhecida como manganismo. Essa síndrome pode se desenvolver de 2 a 25 anos de exposição prolongada e se caracteriza por deterioração das funções neurológicas, incluindo a degeneração de neurônios e células da glia (Siqueira, 1984; WHO, 1999). Existem outros sintomas como anorexia, apatia, dores de cabeça e fraqueza nas extremidades. Em alguns casos os sintomas do manganismo são semelhantes à doença de Parkinson e por isso foi batizada como “Parkinsonismo induzido pelo manganês”, caracterizado pela rigidez corporal e distúrbios motores, (WHO, 1999). A semelhança com parkinsonismo, e a excelente resposta de pacientes intoxicados ao tratamento com L-dopa, indicam anormalidades bioquímicas que precedem as alterações histológicas no sistema nervoso central e podem ser comuns nos dois casos (Siqueira, 1984). Tal semelhança permite associar as alterações no metabolismo de catecolaminas cerebrais com as manifestações extrapiramidais da intoxicação mangânica. O comprometimento do sistema extrapiramidal no manganismo é corroborado pelo fato de que as principais alterações histopatológicas identificadas no homem se localizarem, principalmente, no gânglio basal, onde ocorre degeneração de neurônios, células satélites e gliais (Siqueira, 1984; WHO, 1999). Outra anormalidade bioquímica típica do parkinsonismo é a diminuição significativa do conteúdo de melanina na substância cinzenta (Siqueira, 1984). O manganês também está relacionado com a alteração da captura de dopamina nas sinapses; alteração da distribuição de outros elementos essenciais, como o zinco, sódio e potássio no cérebro; bloqueio da transmissão sináptica e redução na liberação de acetilcolina; inibição da liberação de neurotransmissor na sinapse neuromuscular (Martins & Lima et al., 2001).

Ainda que o cérebro seja considerado o órgão alvo do manganês nos trabalhadores verificou-se que as disfunções testiculares precedem a encefalopatia. No testículo, a modificação bioquímica inicial seria a inibição da succinato desidrogenase, sendo que a subsequente alteração no metabolismo energético poderia conduzir, posteriormente, à degeneração de túbulos seminíferos (Siqueira, 1985).

A disfunção no sistema reprodutor (Laskey et al., 1985; Webster & Valois, 1987) e dano testicular são importantes distúrbios causados pelo manganês (Seth et al., 1973; Singh et al., 1974; Katira & Bawa, 1993) tendo sido demonstrada a relação dose dependente da interferência do cloreto de manganês na secreção do hormônio luteinizante (LH) (Lee et. al.,

2006). Portanto, a exposição prolongada ao manganês pode causar desregulação no sistema endócrino e prejudicar o funcionamento normal do testículo.

A infertilidade masculina pode ter diversas causas, mas atualmente os fatores ambientais assumem um papel importante nesse processo. As alterações reprodutivas podem incluir toxicidade reprodutiva, que vão desde má formação do sistema genital até baixa qualidade do sêmen. As anomalias ocorridas durante a vida intra-uterina não estão bem documentadas e são mais difíceis de comprovar, mas podem levar a abortos prematuros e aumento das doenças malignas na infância. As funções testiculares, incluindo a secreção de hormônios androgênicos e a produção de espermatozóides, podem ser afetadas por diversos mecanismos como, por exemplo, a perturbação no funcionamento normal do eixo hipotálamo-hipófise-testículo. Assim, as alterações na secreção fisiológica dos hormônios gonadotróficos hipofisários, FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante), podem resultar na falência testicular (Orejuela & Lipshultz, 1998). Porém, as funções testiculares também são afetadas pela ação direta da substância tóxica sobre os vários tipos celulares que compõem o testículo como as células de Leydig, células de Sertoli e as células germinativas. Estas são consideradas as mais sensíveis, especialmente as espermatogônias, pois são as únicas que se desenvolvem na base do epitélio seminífero, fora da barreira hematotesticular (Parada et al., 2004). Existem poucos relatos de toxicidade pós-testicular (Cooper et al., 1999), mas sabe-se que a secreção de fluido pelo epitélio epididimário, o trânsito e o acúmulo de espermatozóides no epidídimo são eventos importantes para a qualidade do sêmen, e, portanto, se tornam potenciais alvos de agentes tóxicos, podendo resultar numa perda parcial ou completa de motilidade dos espermatozóides e conseqüente esterilidade (Wilton et al. 1988).

Em relação ao aparelho reprodutor masculino, dados obtidos a partir da morfometria testicular podem preencher algumas dessas lacunas e tal investigação se faz necessária devido a algumas pesquisas sobre a infertilidade humana. Dentre os vários fatores que vêm contribuindo para este quadro podem ser incluídos os efeitos de muitos poluentes ambientais sobre o processo espermatogênico (Dallinga et al., 2002).

1.4 – Organização Morfofuncional do Testículo

O testículo é um órgão com funções exócrina e endócrina, geralmente localizado no escroto e envolvido por uma espessa cápsula de tecido conjuntivo, a albugínea testicular. Esta

túnica, de maneira variada nas diferentes espécies de mamíferos, emite septos para o interior do órgão até a região do mediastino testicular, dividindo o testículo em lóbulos, muitas vezes incompletos. As células germinativas formam os espermatozóides no processo espermatogênico, enquanto as células somáticas, de Leydig e de Sertoli, fornecem suporte para ambas as funções (Russell e França, 1995; Kerr et al., 2005).

Funcionalmente o testículo dos mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos principais: o compartimento intertubular ou intersticial, também chamado de espaço intertubular, e o compartimento de túbulos seminíferos (Russell et al., 1990). Os elementos componentes do compartimento intertubular são as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável, constituída principalmente de fibroblastos, macrófagos e mastócitos (Russell et al., 1990; Setchell, 1991; Kerr et al., 2005). Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies quanto à proporção volumétrica dos diferentes componentes do compartimento intertubular (Godinho, 1999; Paula et al., 1999), de maneira geral a célula de Leydig é o tipo celular mais abundante deste compartimento, com função importante na produção de testosterona.

O compartimento tubular constitui a maior parte do testículo, ocupando, na maioria dos mamíferos, de 70% a 90% do parênquima testicular (França e Russell, 1998). Estes túbulos formam alças bastante contorcidas, que possuem suas duas extremidades conectadas à rede testicular (*rete testis*), que se encontra localizada numa região bastante rica em vasos e tecido conjuntivo, denominada de mediastino testicular. A partir desta região, a rede testicular encontra-se conectada ao epidídimo através dos ductos eferentes (Kerr et al., 2005).

Os túbulos seminíferos não apresentam vascularização ou inervação e são constituídos por túnica própria, epitélio seminífero e lume. A túnica própria reveste o túbulo externamente, sendo composta de células mióides, fibras colágenas e a membrana basal. As células mióides são contráteis, sendo consideradas responsáveis pela movimentação de fluidos e propulsão dos espermatozóides através do lume dos túbulos seminíferos. No epitélio seminífero são encontrados dois tipos celulares de origem embriológica distinta: as células germinativas, originárias do epiblasto, e as células de Sertoli provenientes do epitélio celomático (Karl e Capel, 1998). Juntamente com as células mióides, as células de Sertoli compõem a membrana basal, que serve de suporte estrutural para a própria célula de Sertoli e para as células germinativas que se encontram na porção basal do epitélio seminífero. As células de Sertoli, através de junções de oclusão, dividem o epitélio seminífero em dois ambientes: o ambiente

basal, onde se localizam as espermatogônias e os espermatócitos primários na fase inicial da prófase meiótica (pré-leptóteno), e o ambiente adluminal, no qual se encontram os espermatócitos primários a partir da fase de zigóteno, espermatócitos secundários e espermátides. Desta forma, o ambiente adluminal está totalmente sob o controle das células de Sertoli, propiciando um microambiente isolado do sistema imune, essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (Russell et al., 1990; Setchell, 1991; Poccia, 1994; Sharpe, 1994; Hess e França, 2005). Um terceiro ambiente é criado transitoriamente quando ocorre a mudança do pré-leptóteno, do ambiente basal para o adluminal. A célula geralmente encontrada nesse local transitório é o espermatócito primário, na fase de leptóteno (Russell et al., 1990).

Existe grande variação no número e nas dimensões (diâmetro e comprimento) dos túbulos seminíferos nas diferentes espécies de mamíferos (França e Russell, 1998). O camundongo, por exemplo, possui aproximadamente 20 túbulos seminíferos por testículo perfazendo no total cerca de 2 metros de comprimento tubular por testículo (Bascom e Ostrud, 1925). No suíno doméstico existem de várias centenas a alguns poucos milhares de túbulos seminíferos por testículo e aproximadamente 3000 metros de túbulos no total (França e Russell, 1998).

Há também variação considerável no diâmetro dos túbulos seminíferos entre as diferentes espécies. De maneira geral, o valor observado para o diâmetro tubular na grande maioria das espécies de mamíferos está em torno de 180 μm a 300 μm (Roosen-Runge, 1977, França e Russell, 1998).

1.5 - Espermatogênese

O processo espermatogênico pode ser dividido em três fases, baseado em considerações funcionais: 1) a fase proliferativa (espermatogônia), no qual as células sofrem sucessivas divisões, 2) a fase meiótica (espermatócitos) em que o material genético é recombinado e segregado, e 3) a fase de diferenciação ou espermiogênica (espermátides) em que espermátides se transformam em células estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar o ovócito, os espermatozoides (Russell et al., 1990; Kerr et al., 2006). Este processo é controlado por duas principais regulações: endócrina, LH e FSH hipofisários, e comunicações intercelulares locais, através de efetores parácrinos tais como testosterona,

fatores de crescimento e citocinas (Weinbauer & Wessels, 1999; Fiorini et al., 2004) ou por contato diretos entre células adjacentes (Fiorini *et al.*, 2004; O'Donnell et al., 2006).

A organização geral da espermatogênese é basicamente a mesma em todos os mamíferos. A espermatogênese é um processo sincrônico, no qual uma espermatogônia (célula diplóide) se divide várias vezes e se diferencia gradativamente em uma célula haplóide altamente especializada, o espermatozóide.

As espermatogônias podem ser classificadas em duas categorias básicas: indiferenciadas e diferenciadas. As espermatogônias isoladas (A_{is}), pareadas (A_{pr}) e alinhadas (A_{al}) pertencem à primeira categoria. As espermatogônias do tipo A, espermatogônia intermediária (In) e espermatogônia do tipo B pertencem à segunda categoria e estão comprometidas com a formação de espermatozoides (De Rooij, 1998). As espermatogônias podem ser identificadas com base na morfologia, dinâmica e volume do núcleo, número de nucléolos por núcleo, posição topográfica em relação a outras células e a lâmina basal, e a disposição dos cromossomos durante a divisão (Clermont & Antar, 1973; Kerr et al., 2006). A espermatogênese inicia-se com a célula germinativa primitiva, a espermatogônia A, que é a célula fonte, localizada junto à membrana basal. As espermatogônias se dividem por mitose e as células neoformadas podem continuar a dividir e originar novas espermatogônias ou cessar a divisão e crescer, originando os espermatócitos, células que entram em meiose (Kierszenbaum, 2008; Junqueira e Carneiro, 2008). A meiose compreende duas divisões: as células da primeira divisão são chamadas de espermatócitos primários (I) e as da segunda, espermatócitos secundários (II). Os espermatócitos I são as maiores células da linhagem espermatogênica e caracterizam-se pela presença de cromossomos em diferentes fases de condensação. Os espermatócitos II, que formam a primeira população de células haplóides do epitélio seminífero, ficam mais próximos do lume tubular, sendo difícil observá-los em cortes histológicos, pois entram logo na segunda divisão meiótica. Desta divisão resultam as espermátides, células que são caracterizadas pelo pequeno tamanho, núcleos com zona de cromatina condensada e por sua localização mais próxima à luz dos túbulos seminíferos (Kierszenbaum, 2008). Estas células possuem a forma inicialmente arredondada (Clermont, 1972; Russell et al., 1990; Kerr et al., 2006). Depois que as espermátides arredondadas são formadas, uma série de mudanças morfológicas, histoquímicas e bioquímicas vão ocorrer em seu núcleo e componentes do citoplasma (Guraya, 1987). Esta fase de mudanças é denominada espermiogênese, e vai culminar com a formação de células haplóides altamente

diferenciadas e especializadas que são os espermatozóides (Menezes, 2006). Em seguida, ocorre a espermição, quando os espermatozóides formados são liberados pela célula de Sertoli para o lume dos túbulos seminíferos.

Durante o processo espermatogênico, as células de Sertoli e as células germinativas interagem de maneira bastante complexa, tanto física quanto bioquimicamente. Existem diversas formas de junções intercelulares entre estes dois tipos de células, incluindo-se os desmossomos, as junções do tipo “gap”, as junções à base de actina, conhecidas como especializações ectoplasmáticas e os complexos túbulo-bulbares. Apesar de serem postuladas várias funções para estes componentes juncionais, existem ainda poucas evidências experimentais para apoiar o papel preciso dos mesmos (Skinner & Griswold, 2005). No entanto, fica bastante evidente a necessidade da interação das células germinativas com os componentes somáticos do testículo, principalmente células de Sertoli, células de Leydig e células mióides, para que o processo espermatogênico transcorra de maneira normal e eficiente (França & Russell, 1998; Skinner, 2005).

1.6 - Células de Sertoli

A célula de Sertoli, descrita originalmente por Enrico Sertoli na Itália em 1865, é uma célula somática residente entre as células germinativas no túbulo seminífero (Russell et al, 1990; Hess & França, 2005). Estudos utilizando microscopia eletrônica de transmissão, em cortes seriados do epitélio seminífero, mostraram que a célula de Sertoli apresenta um perfil irregularmente colunar, estendendo-se da base do epitélio seminífero até o lúmen tubular (Russell et al., 1990). Estas células possuem extensões citoplasmáticas que contornam os espermatócitos e espermátides e apresentam estreita interação com as células germinativas durante todo o seu desenvolvimento (Russell e Griswold, 1993; Stanbenfeld & Edqvist, 1996). O citoesqueleto é responsável por manter a forma celular e os movimentos ativos no citoplasma, sendo essencial para a acomodação dos constantes movimentos das células germinativas (Dadoune e Demuolin, 1993; Russell e Griswold, 1993). Durante o desenvolvimento testicular, as células de Sertoli multiplicam-se por mitose, porém após a puberdade não sofrem mais divisões, mantendo sua população estável (Courot et al., 1970; Russell & Griswold, 1993). O seu número total por testículo, estabelecido durante o

desenvolvimento testicular, está relacionado com o tamanho do testículo e com a produção espermiática do animal (Russell & Griswold, 1993; Sharpe, 1994).

Além das funções já citadas das células de Sertoli, elas também são responsáveis pela manutenção da integridade do epitélio seminífero, pela secreção de fluido para formar o lume, pelo processo de espermição, realizam fagocitose, permitem a movimentação de células no epitélio, secretam proteínas e regulam o ciclo espermatogênico, através das junções com as demais células do túbulo seminífero. As células de Sertoli desempenham papel fundamental na regulação da espermatogênese (Russell & Griswold, 1993; Hess & França, 2004), já que intermedeiam a ação da testosterona e do FSH nos testículos, sendo responsáveis pelo início, manutenção e regulação deste processo (Sharpe, 1994). As células de Sertoli apresentam capacidade relativamente fixa de suporte das células germinativas de maneira espécie-específica, além de outras funções que incluem a compartimentalização do túbulo seminífero, pelas junções oclusivas entre as células de Sertoli, propiciando um ambiente isolado do sistema imunitário e especializado para as células germinativas em desenvolvimento, o sustento e suporte nutricional especiais das células germinativas em diferenciação, a translocação destas células em direção ao lúmen tubular, a secreção de fluidos e proteínas e a eliminação fagocítica de células germinativas em degeneração e do citoplasma excedente resultante da espermiogênese (Russell et al., 1990).

A atividade secretória da célula de Sertoli é controlada pelo FSH. Os receptores de membrana para FSH e os receptores nucleares e citoplasmáticos para andrógenos estão presentes nessas células. Nas células de Sertoli é realizada a conversão de testosterona em diidrotestosterona, andrógeno de maior potência biológica, que se desloca para o ambiente adluminal, onde sofre ação da proteína ligadora de andrógenos (ABP), produzida pelas células de Sertoli. A ABP se une aos andrógenos dentro desse ambiente parecendo ser uma proteína que estabiliza a concentração de androgênios nos túbulos seminíferos, para utilização na espermatogênese, atuando também na função das células de Sertoli. A célula de Sertoli também converte a testosterona produzida pelas células de Leydig em estrogênios. Esses estrogênios passam para o ambiente adluminal e o basal dos túbulos seminíferos e a partir deste último para o sistema vascular sanguíneo (Stabenfeldt & Edqvist, 1996).

As células de Sertoli são afetadas por diversos agentes químicos tóxicos (Fiorini et al., 2004). Por exercer também papel vital na regulação da espermatogênese, qualquer disfunção

das células de Sertoli pode resultar em alterações e/ou degenerações das células germinativas e infertilidade (Boekelheide et al., 2005).

1.7 - Células de Leydig

As células de Leydig estão localizadas no compartimento intertubular dos testículos, constituindo o principal componente endócrino deste órgão. Essas células são responsáveis pela produção de cerca de 95% da testosterona circulante no homem adulto. A síntese de testosterona ocorre a partir da molécula de colesterol e envolve várias enzimas na sua via sintética (Bardin, 1996). Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies quanto à proporção volumétrica (%) dos diferentes componentes do compartimento intertubular de maneira geral, a célula de Leydig é o tipo celular mais abundante neste compartimento (Setchell & Breed, 2006). As células de Leydig são relativamente grandes, poliédricas e limitadas por uma membrana plasmática que contém microvilos. Seu núcleo está localizado excentricamente no citoplasma, apresenta um a três nucléolos e usualmente tem forma arredondada ou oval. Grânulos de heterocromatina formam uma camada intimamente associada ao envoltório nuclear, sendo uma característica universal destas células (Setchell, 1991).

As células de Leydig se encontram em contato íntimo com o sistema de capilares e são responsáveis pela síntese e armazenamento de testosterona, importante para promover o comportamento sexual normal (libido) e a ocorrência do processo espermatogênico, juntamente com os hormônios FSH e LH, além de manter a função das glândulas acessórias (Dellmann & Wrobel, 1982; Russell, 1996).

A produção de testosterona pelas células de Leydig é controlada pelo LH que se une especificamente às membranas das células de Leydig e ativa a adenosina-monofosfato cíclica (cAMP). Este processo dá início à ativação das proteínas cinases que catalisam a fosforilação das proteínas intracelulares e a mobilização de precursores dos esteróides, principalmente através da conversão do colesterol para pregnenolona. O LH também tem efeito trófico sobre as células de Leydig, estimulando-as a se hipertrofiar. A remoção do LH cessa a produção de testosterona e leva a uma grande redução no tamanho das células de Leydig (Stanbenfeld & Edqvist, 1996).

A testosterona produzida pelas células de Leydig tem uma ação parácrina ao se difundir para os túbulos seminíferos, atravessando facilmente a barreira hematotesticular (Stanbenfeld & Edqvist, 1996; Goodman, 2000). Altas concentrações são necessárias para a espermatogênese e especialmente para o processo de meiose. A ação dos andrógenos na espermatogênese acontece via células de Sertoli, já que as células germinativas não possuem receptores para andrógenos (Liu & Handelsman, 2003). Particularmente, a diidrotestosterona é responsável pela manutenção funcional das glândulas sexuais acessórias e do epidídimo (Luke e Coffey, 1994; Fan e Robaire, 1998; Goyal et al., 1999).

1.8 - Biomarcadores séricos de hepatotoxicidade

A alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima encontrada predominante no fígado, em concentração moderada nos rins e em menores quantidades no coração e músculos esqueléticos. Na célula hepática, ela localiza-se no citoplasma (90%) e na mitocôndria (10%). Qualquer lesão ou doença afetando o parênquima hepático liberará uma maior quantidade dessa enzima para a corrente sanguínea, elevando sua concentração sérica. Em geral, as causas mais comuns de elevação da ALT no sangue são decorrentes de disfunção hepática. Desta maneira, além de bom indicador, ela é também bastante específica para o diagnóstico de doença hepatocelular (Dufour et al., 2000).

A aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima encontrada em concentração muito alta no músculo cardíaco, músculos esqueléticos e em menor concentração nos rins e pâncreas, sendo encontrada também no fígado. Na maioria das vezes, a dosagem de AST é realizada juntamente com ALT e a relação AST/ALT pode ser determinada para auxiliar no diagnóstico diferencial das doenças (Panteghini, 1990). Por exemplo, o aumento na concentração sérica de AST é associado com danos ao fígado, mas também pode estar elevada em associação com injúria de músculo esquelético ou cardíaco (Burhop et al., 2004; Nathwani et al., 2005). Hepatócitos danificados liberam seus conteúdos, incluindo ALT e AST, no espaço extracelular. As enzimas liberadas entram na circulação e aumentam as suas concentrações séricas.

2 – Objetivos

2.1- Objetivos gerais

Analisar os efeitos do manganês nos testículos de camundongos adultos, avaliando, qualitativa e quantitativamente, através de análises histométricas, possíveis alterações no processo espermatogênico, bem como nas estruturas testiculares.

2.1- Objetivos específicos

Avaliar o efeito da exposição crônica do manganês quanto à (ao):

- Índices gonadossomático (IGS), tubulossomático (ITS) e hepatossomático (IHS);
- Proporção volumétrica e volume dos componentes do parênquima testicular;
- Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero;
- Comprimento total dos túbulos seminíferos (CTT) e comprimento por grama de testículo (CT/g);
- Teor de manganês em alguns órgãos (testículo, epidídimo, fígado, rim, músculo e osso);
- Determinação de enzimas séricas;

3 - Material e Métodos

3.1 - Animais, Grupos Experimentais e Tratamento

Foram utilizados 24 camundongos *Swiss* em idade reprodutiva, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Este trabalho foi submetido ao comitê de ética da Universidade de Brasília (protocolo: 95790/2009). Os animais foram divididos em três grupos de 8 indivíduos cada, pesados e colocados em gaiolas individuais. O grupo controle recebeu apenas água e os outros dois tratamentos receberam uma dose de 30 mg/Kg/dia de cloreto de manganês dissolvido na água de consumo. Os animais de um grupo do tratamento foram eutanasiados após 42 dias e os animais do outro grupo após 84 dias. Considerando que o processo espermatogênico desses

camundongos é 42 dias, este trabalho permitiu avaliar a influência do manganês durante 2 processos espermatogênicos.

Todo o regime líquido foi fornecido *ad libitum* assim como a alimentação sólida (ração). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura de 24°C e luminosidade de 12 horas.

3.2 - Preparo da solução de cloreto de manganês

A solução foi preparada utilizando cloreto de manganês tetra hidratado ($MnCl_2 \cdot 4 H_2O$). O cálculo da concentração foi baseado na média de peso dos grupos tratados, assim como no consumo médio diário de 10 ml água feito pelos animais. Desse modo, a concentração da solução padrão foi ajustada afim de que houvesse um consumo diário de 30 mg/kg de peso corporal animal. Como os animais pesavam, aproximadamente, 40 gramas cada animal tratado ingeriu 1,2 mg de manganês diariamente.

3.3 - Coleta de Amostras

Os animais foram contidos, anestesiados com cloridrato de quetamina (10mg/kg de peso corporal) e xilazina (2mg/g de peso corporal) e pesados. Foi feita punção cardíaca para retirada de sangue, usado nas análises de enzimas plasmáticas. Houve então aprofundamento da anestesia com éter etílico seguido de incisão abdominal para retirada dos testículos e órgãos acessórios como epidídimo, glândula vesicular e próstata. Os órgãos foram pesados e colocados em solução de Karnovsky, por 24 horas, sendo então transferidos para álcool 70%. Foram retirados também os rins, o fígado e o fêmur direito utilizados, juntamente com fragmentos dos órgãos reprodutivos, nas análises da concentração o manganês.

3.4 - Microscopia de luz

Fragmentos de cada órgão foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (80%, 90% e 100%), com trocas a cada trinta minutos. Após a desidratação, procedeu-se a pré-inclusão e inclusão em hidroxietil metacrilato (Historesin[®] Leica). Obtiveram-se cortes de 3µm em micrótomo rotativo (Reichert Jung 2045, Leica), com utilização de navalhas de vidro.

As secções obtidas foram coradas com azul de toluidina-borato de sódio 1%, montadas com Entellan (Merck) e analisadas em microscópio de luz (Olympus BX-50). Foram obtidas imagens testiculares, para proceder às análises morfométricas, utilizando-se objetiva de 20 x combinada com zoom de 1,25.

3.5 - Análise histométrica dos testículos e índice hepatossomático

3.5.1 - Índice Gonadossomático (%)

O índice gonadossomático (IGS) representa a proporção (%) do peso corporal alocado em testículo. Com base nos pesos corporais e testiculares obtidos após o sacrifício do animal, pode-se obter o IGS, calculado a partir da fórmula:

$$\text{IGS} = \frac{\text{PG}}{\text{PC}} \times 100 \text{ onde,}$$

PG = peso total das gônadas

PC = peso corporal

3.5.2 - Proporções volumétricas (%) e volume dos componentes do testículo

Estas análises tiveram como objetivo determinar o volume das estruturas que compõem o testículo. Uma vez que este órgão pode ser dividido em dois compartimentos, tubular e intertubular, as proporções volumétricas foram estimadas utilizando-se um retículo com 266 intersecções (pontos) montado com base no programa Image Pro Plus e utilizando as imagens obtidas conforme a metodologia vista no item 3.4.

O peso líquido testicular (massa do parênquima) foi obtido subtraindo-se do peso bruto do testículo, o peso da albugínea. Como a densidade do testículo é em torno de 1 (Johnson e Neaves, 1981; França, 1991; Paula, 1999; Tae *et al.*, 2005), a massa do testículo foi considerado igual ao seu volume.

3.5.3 - Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero

Estes parâmetros tiveram como objetivo a obtenção de dados relevantes para a avaliação da eficiência espermatogênica. Foi obtido o diâmetro tubular médio por animal a partir da mensuração, ao acaso, de 20 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentem contorno o mais circular possível, independente do estágio em que se encontravam. Estas medidas foram realizadas utilizando-se programa de análise de imagem (Image Pro Plus), em imagens aumentadas em 200x.

Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi mensurada a altura do epitélio seminífero, que foi tomada da túnica própria até o início do lume tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio, em cada túbulo, representou a média de duas medidas diametralmente opostas.

3.5.4 - Comprimento total dos túbulos seminíferos e índice tubulossomático

O comprimento total (CT) dos túbulos seminíferos por testículo, expresso em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal, empregando-se a fórmula (Attal & Courot, 1963; Dorst & Sajonski, 1974):

$$CT = \frac{VTS}{\pi R^2} \text{ onde,}$$

VTS = Volume total de túbulos seminíferos;

πR^2 = Área da secção transversal dos túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2).

O comprimento total por grama de testículo é calculado empregando-se a fórmula:

CT/g = comprimento total de túbulos (m) / peso bruto dos testículos.

Baseado nos volumes de túbulos seminíferos e nos pesos corporais, foi calculado o índice tubulossomático (ITS) a partir da fórmula **ITS** = VT/PCx100, onde VT = volume de túbulo seminífero (ml) e PC = peso corporal.

3.5.5 - Níveis plasmáticos de transaminases (ALT e AST)

A dosagem das transaminases foi feita por kits colorimétricos, utilizando-se processador bioquímico multiparamétrico.

3.5.6 – Quantificação do manganês: Espectrofotometria de Emissão em plasma

Os órgãos analisados (testículo, epidídimo, vesícula seminal, osso, fígado e rim) foram secas em estufa e submetidas à mineralização úmida com 3,0 ml de uma mistura nítrico-perclórica 2:1, em temperatura de 90 °C até a completa oxidação da matéria orgânica. Amostras mineralizadas foram filtradas e diluídas para 5,0 ml com água deionizada e, então analisadas por espectrofotometria de emissão em plasma indutivamente acoplado para determinação dos teores de manganês, num espectrofotômetro Perkin Elmer Optima 3300DV.

3.5.7 – Índice hepatossomático

O índice hepatossomático (IHS) representa a proporção (%) do peso corporal alocado em fígado. Com base nos pesos corporais e do fígado obtidos após o sacrifício do animal, pode-se obter o IHS, calculado a partir da fórmula:

$$\mathbf{IHS} = \frac{\mathbf{PF}}{\mathbf{PC}} \times 100 \text{ onde,}$$

PF = peso do fígado

PC = peso corporal

3.6 - Análises estatísticas

As médias dos parâmetros estudados foram comparadas entre os grupos por meio de análise de variância (ANOVA) utilizando-se o teste de Newman-Keuls. Foi utilizado o software STATISTICA for WINDOWS 3.11, sendo o nível de significância considerado de $p < 0,05$.

4 – Resultados

4.1 – Biometrias corporais

O peso corporal aumentou significativamente ($p < 0,05$) nos grupos Mn1 (42 dias) e Mn2 (84 dias) em relação ao grupo controle. Os pesos testiculares, líquido e bruto, não apresentaram diferença significativa. Porém, houve redução significativa no IGS do grupo Mn2 em relação ao grupo controle. O peso de outras estruturas e órgãos como os rins, os epidídimos, glândulas vesiculares e os ductos deferentes não apresentou variação significativa. Por outro lado, o peso do fígado aumentou significativamente nos grupos tratados em relação ao controle, embora o IHS (índice hepatossomático) não tenha mostrado alterações significativas entre os três grupos analisados. As alterações relativas à biometria corporal encontram-se na tabela 1:

Tabela 1 – Biometria corporal e testicular de camundongos em idade reprodutiva, após tratamento com manganês [30mg/Kg/dia] (Média \pm desvio-padrão).

Biometrias	Grupo Controle	Grupo Mn1	Grupo Mn2
Peso Corporal (g)	36,05 \pm 2,01 ^a	43,70 \pm 3,02 ^b	45,23 \pm 5,51 ^b
Peso Testicular líquido (g)	0,23 \pm 0,02 ^a	0,24 \pm 0,04 ^a	0,22 \pm 0,04 ^a
Peso testicular bruto (g)	0,26 \pm 0,02 ^a	0,27 \pm 0,05 ^a	0,24 \pm 0,04 ^a
IGS (%)	0,72 \pm 0,08 ^a	0,62 \pm 0,12 ^{ab}	0,54 \pm 0,10 ^b
Peso dos Epidídimos (g)	0,10 \pm 0,01 ^a	0,10 \pm 0,02 ^a	0,10 \pm 0,01 ^a
Peso da Glândula Vesicular(g)	0,41 \pm 0,21 ^a	0,37 \pm 0,08 ^a	0,36 \pm 0,05 ^a
Peso do Ducto Deferente (g)	0,03 \pm 0,01 ^a	0,03 \pm 0,003 ^a	0,03 \pm 0,004 ^a
Peso do Fígado (g)	1,39 \pm 0,21 ^a	1,70 \pm 0,16 ^b	1,84 \pm 0,25 ^b
IHS (%)	0,38 \pm 0,05 ^a	0,39 \pm 0,02 ^a	0,41 \pm 0,02 ^a
Peso dos Rins (g)	0,46 \pm 0,04 ^a	0,44 \pm 0,16 ^a	0,49 \pm 0,04 ^a

Letras iguais nas colunas não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). Média \pm desvio-padrão.

Mn1: animais eutanasiados aos 42 dias; Mn2: animais eutanasiados aos 84 dias.

4.2 - Concentrações de manganês

Os resultados relativos à concentração de manganês nos órgãos analisados estão mostrados nas Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Observou-se que em todos os órgãos analisados (epidídimo, testículo, fígado, rim, músculo e osso) ocorreu acúmulo significativo de manganês nos grupos tratados, quando comparados ao grupo controle. Contudo, apenas nos testículos a concentração de manganês aumentou significativamente entre os grupos Mn1 e Mn2, sendo este aumento ocorreu de maneira gradativa e diretamente proporcional ao tempo de exposição.

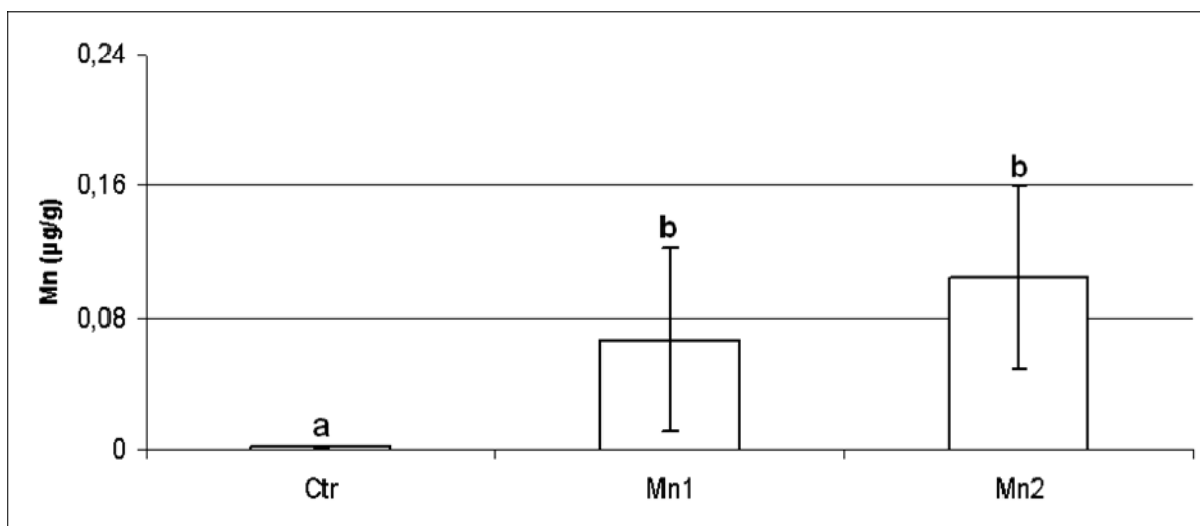


Figura 1: Concentração de manganês em micrograma por grama ($\mu\text{g/g}$) no epidídimo de camundongos adultos após administração de cloreto de manganês. Mn1 = 42 dias; Mn2 = 84 dias de tratamento.

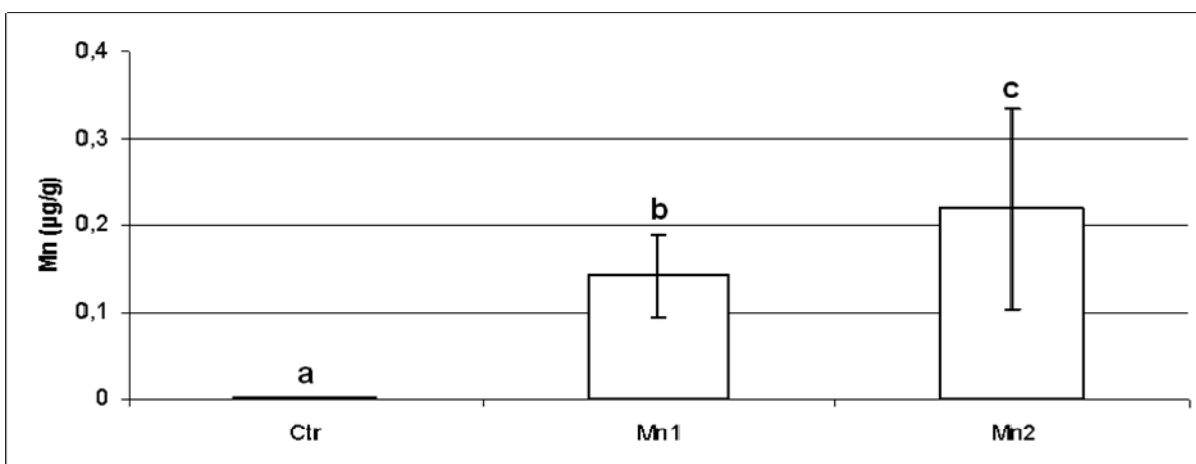


Figura 2: Concentração de manganês em micrograma por grama ($\mu\text{g/g}$) no testículo de camundongos adultos após administração de cloreto de manganês. Mn1 = 42 dias; Mn2 = 84 dias de tratamento.

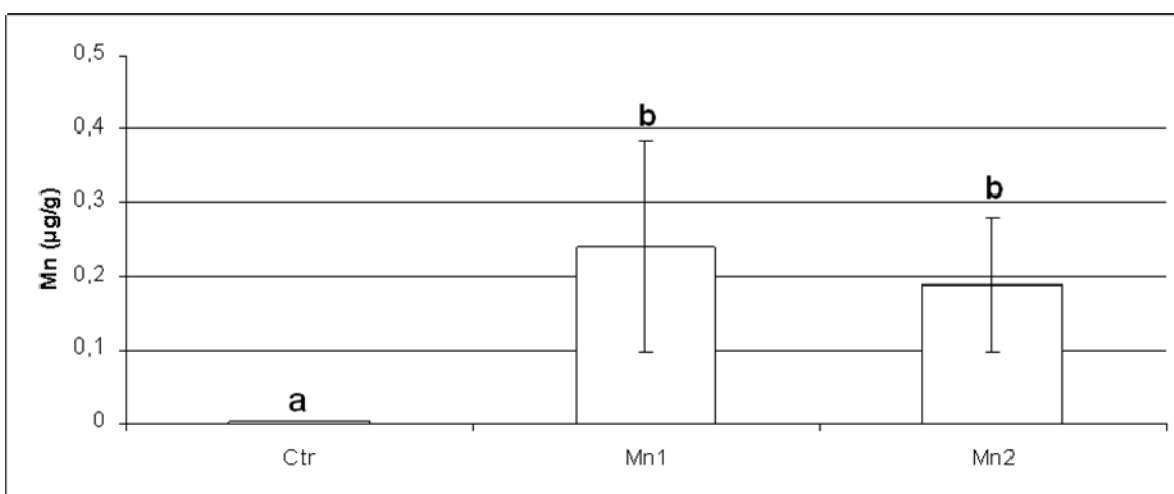


Figura 3: Concentração de manganês em micrograma por grama ($\mu\text{g/g}$) no fígado de camundongos adultos após administração de cloreto de manganês. Mn1 = 42 dias; Mn2 = 84 dias de tratamento.

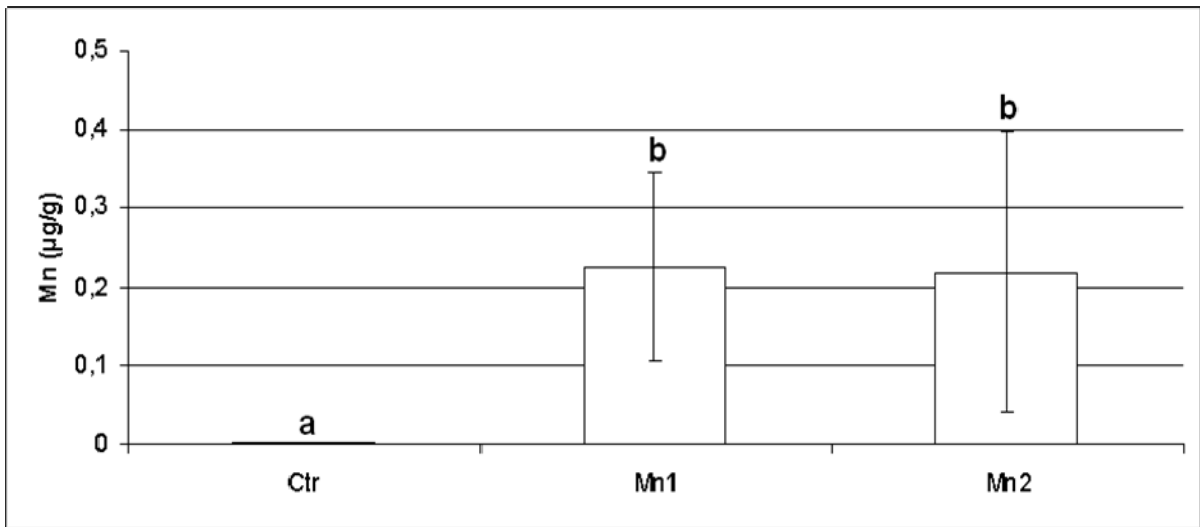


Figura 4: Concentração de manganês em micrograma por grama ($\mu\text{g/g}$) no rim de camundongos adultos após administração de cloreto de manganês. Mn1 = 42 dias; Mn2 = 84 dias de tratamento.

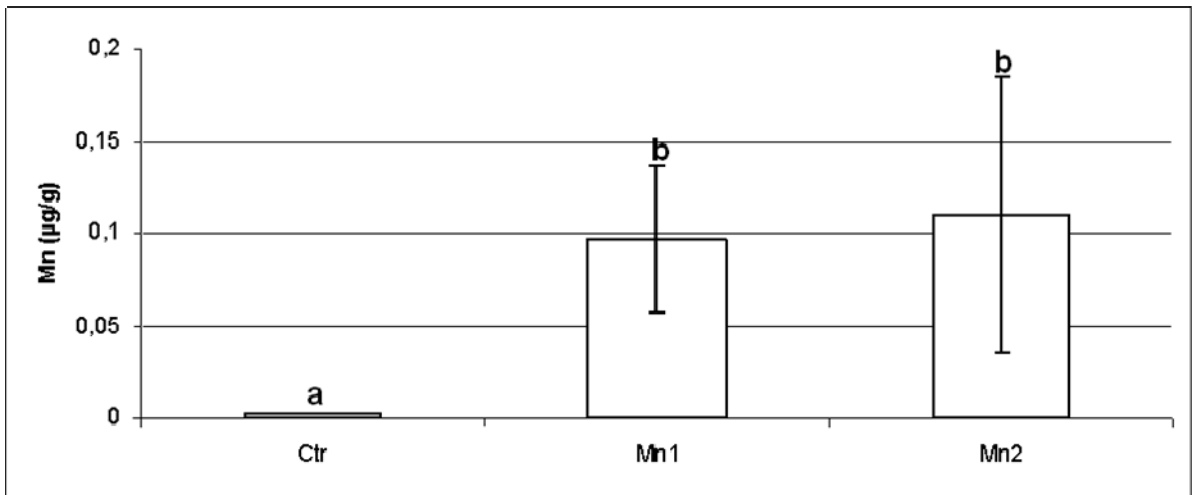


Figura 5: Concentração de manganês em micrograma por grama ($\mu\text{g/g}$) no músculo de camundongos adultos após administração de cloreto de manganês. Mn1 = 42 dias; Mn2 = 84 dias de tratamento.

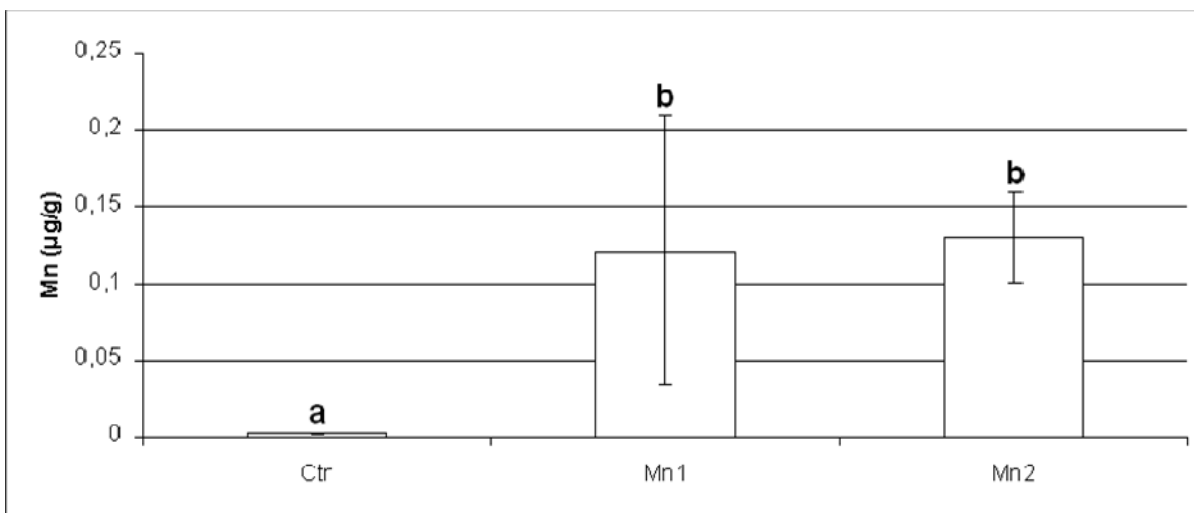


Figura 6: Concentração de manganês em micrograma por grama ($\mu\text{g/g}$) no osso de camundongos adultos após administração de cloreto de manganês. Mn1 = 42 dias; Mn2 = 84 dias de tratamento.

4.3 – Determinação plasmática das enzimas transaminases

Os resultados da determinação plasmática da enzima aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) estão representados nos Figuras 7 e 8, respectivamente. A concentração plasmática da AST aumentou significativamente apenas no grupo Mn2 em relação ao controle.

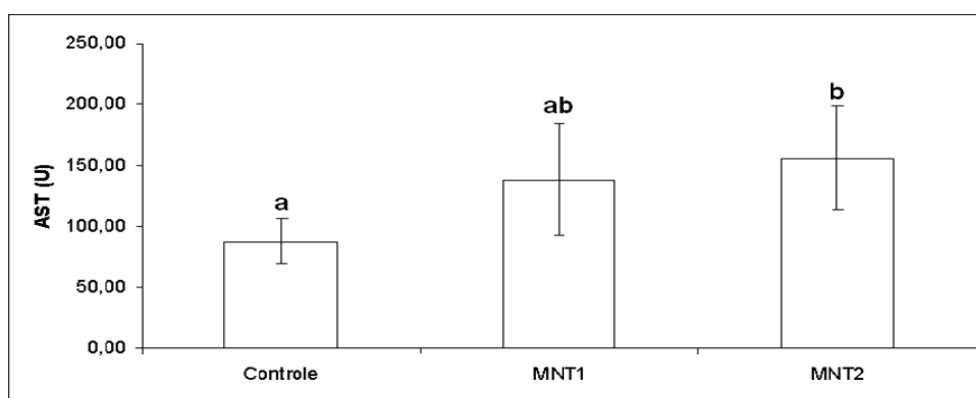


Figura 7: Concentração sérica da enzima AST (aspartato aminotransferase) no plasma em unidade por mL (U/mL) de camundongos adultos após administração de manganês. MNT1 = 42 dias; MNT2 = 84 dias.

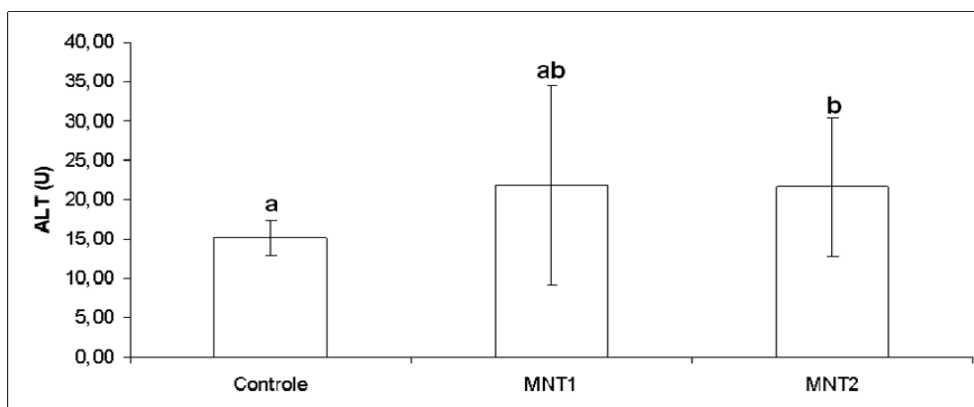


Figura 8: Concentração da enzima ALT (alanina aminotransferase) no plasma em unidade por mL (U/mL) de camundongos adultos após administração de manganês. MNT1 = 42 dias; MNT2 = 84 dias.

4.4 - Proporções volumétricas de túbulo seminífero e intertúbulo

No presente trabalho foi verificada a diminuição na proporção de túbulo seminífero e aumento na proporção de intertúbulo apenas no grupo Mn2 em relação aos controle. Essas variações foram significativas entre somente no grupo Mn2. Esses dados encontram-se na tabela 2.

Tabela 2: Proporção volumétrica (%) de Túbulo seminífero e Intertúbulo de camundongos em idade reprodutiva, após tratamento com cloreto de manganês (Média \pm desvio-padrão).

Proporções (%)	Controle	Mn1	Mn2
Túbulo Seminífero	91,87 \pm 1,38 ^a	91,20 \pm 1,51 ^a	89,26 \pm 1,63 ^b
Intertúbulo	8,13 \pm 1,38 ^a	8,80 \pm 1,51 ^a	10,74 \pm 1,63 ^b

Letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Mn1 = 42 dias; Mn2 = 84 dias.

4.5 - Volumes tubulares, intertubulares e índice tubulossomático

Os volumes tubulares e intertubulares não apresentaram variação estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o controle. Porém, o ITS diminuiu significativamente nos grupos tratados em relação ao controle, conforme a tabela 3.

Tabela 3: Volume dos compartimentos do parênquima testicular (ml) e índice tubulossomático – ITS (%) de camundongos em idade reprodutiva, após tratamento com cloreto de manganês (Média \pm desvio-padrão).

Parâmetros	Grupo Controle	Mn1	Mn2
Volume Tubular	0,11 \pm 0,010 ^a	0,11 \pm 0,02 ^a	0,10 \pm 0,020 ^a
Volume Intertubular	0,01 \pm 0,001 ^a	0,01 \pm 0,002 ^a	0,010 \pm 0,003 ^a
ITS	0,30 \pm 0,030 ^a	0,25 \pm 0,050 ^b	0,22 \pm 0,040 ^b

Letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Mn1 = 42 dias; Mn2 = 84 dias.

4.6 - Diâmetros tubulares, Altura de epitélio e Comprimento de túbulos seminíferos

Em relação ao diâmetro tubular, observou-se aumento significativo nos dois grupos tratados, comparado ao controle. Já a altura de epitélio aumentou e o comprimento total de túbulo (m) diminuiu significativamente apenas no grupo Mn2 em relação ao controle. O comprimento de túbulo por grama de testículo diminuiu significativamente nos dois grupos tratados, quando comparados com o controle (Tabela 4).

Tabela 4: Diâmetro tubular (μm), altura do epitélio seminífero (μm), comprimento total dos túbulos seminíferos (m) e comprimento dos túbulos por grama de testículo (m/g) de camundongos em idade reprodutiva, após tratamento com cloreto de manganês (Média \pm desvio-padrão).

Parâmetros	Grupo Controle	Mn1	Mn2
Diâmetro Tubular	161,59 \pm 13,14 ^a	194,55 \pm 34,46 ^b	209,85 \pm 37,36 ^b
Altura do Epitélio	58,61 \pm 3,94 ^a	71,03 \pm 19,24 ^{ab}	81,60 \pm 19,43 ^b
Comprimento Total de Túbulos (m)	5,28 \pm 0,58 ^a	4,01 \pm 1,50 ^{ab}	3,22 \pm 1,95 ^b
Comprimento de Túbulo/ grama de testículo	20,42 \pm 3,23 ^a	15,08 \pm 5,70 ^b	12,93 \pm 6,03 ^b

Letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). Mn1 = 42 dias; Mn2 = 84 dias.

5 – Discussão

5.1 - Biometrias corporais

Na literatura não há muitos trabalhos relacionando acúmulo de manganês e análises morfométricas mais aprofundadas, principalmente em se tratando de manganês que, em pequenas doses, é considerado um micronutriente.

Segundo França e Russell (1998), o peso testicular ou o tamanho do testículo pode ser utilizado como indicador quantitativo da produção espermática, uma vez que o principal componente testicular é o túbulo seminífero. Mudanças nos pesos absolutos e relativos dos órgãos reprodutivos indicam o potencial tóxico de uma substância sobre o sistema reprodutivo masculino (Zenick and Clegg, 1994). Neste trabalho, os animais tratados apresentaram ganho de peso em relação ao controle, sendo que a massa testicular não acompanhou este aumento. Consequentemente, o IGS reduziu nos animais tratados e essa alteração foi significativa nos animais do grupo Mn2, quando comparados ao grupo controle. Num trabalho realizado com o inseticida fenverelato, um piretróide sintético considerado desregulador endócrino, Arena

(2006) administrou uma dose de $40,0 \text{ mg/kg}^{-1}$ por dia, via gavagem, em ratos adultos e constatou uma diminuição significativa nos pesos absolutos do testículo e epidídimo nos animais tratados em relação ao controle. Num outro experimento, animais foram tratados com cádmio na dose de $10,0 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$ durante 83 dias e observou-se uma perda acentuada de peso testicular (Cabral, 1996). Já uma dose de $3,0 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$ fornecida durante 56 dias, não provocou alterações nos pesos testiculares e corporais e IGS dos animais tratados em relação ao controle (Predes, 2007). Comparando esses dois últimos trabalhos nota-se uma possível relação entre a dose fornecida juntamente com o tempo de exposição ao cádmio e perda de massa testicular. Ratos albinos que receberam arsenito de sódio na concentração de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ por dia administrado na água de consumo durante 28 dias, detectou-se uma redução significativa no peso testicular dos animais tratados em relação ao controle, indicando uma atrofia testicular. Já em relação ao peso corporal, não houve variação significativa entre os grupos. Carvalho (2009), detectou aumento significativo do peso corporal de camundongos tratados com arsenato de sódio na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ fornecida na água de consumo durante 42 e 84 dias. No mesmo trabalho o peso gonadal, IGS, peso da albugínea e do parênquima testicular, não apresentou diferença significativa entre os grupos analisados.

Vários autores concordam que existe uma relação direta entre a redução no peso de órgãos reprodutivos acessórios (vesícula seminal, próstata e epidídimo) com a redução na disponibilidade de andrógenos (Mukerjee et al., 1992; Gupta et al., 1993; Lohiya e Ansari, 1999; Chauhan et al., 2007). A função secretória desses órgãos acessórios é andrógeno-dependente e varia sensivelmente com as concentrações circulantes de testosterona (Creasy, 2001). Outros autores afirmam ainda que a redução no peso das glândulas vesiculares pode indicar quadros de infertilidade, como foi demonstrado nos trabalhos realizados por Malini et al. (1999). No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas no peso de epidídimo, glândula vesicular e ducto deferente, entre os três grupos de camundongos. Monteiro et al. (2008) reforçam estes resultados em estudo feito com a ciclosporina A, onde não foram observadas variações significativas entre o grupo tratado e o controle no que diz respeito aos pesos do epidídimo, vesícula seminal e próstata. Resultados semelhantes foram obtidos por Predes (2007), ao testar o efeito de cádmio ($3,0 \text{ } \mu\text{mol Kg}^{-1}$) em ratos Wistar, e por Pant et al. (2001) após o fornecimento de arsenito de sódio (4,0 ppm) em água de consumo para camundongos durante 365 dias. Porém, França et al. (2000), forneceram cimetidina a camundongos em duas doses diferentes e observaram diminuição significativa nos pesos do

epidídimo, vesícula seminal e próstata no grupo de maior dose (250,0 mg). Em outro estudo, com sulfato de níquel administrado oralmente em camundongos machos adultos nas doses de 5,0 e 10,0 mg Kg⁻¹ por 35 dias, observou-se redução dos pesos dos órgãos acessórios tais como epidídimos, vesícula seminal e próstata (Pandey et al., 1999).

O fígado é o órgão mais vulnerável aos efeitos tóxicos de substâncias, o que condiciona maior concentração celular dos compostos a serem transformados e também dos metabólitos resultantes (Mendes, 1988; Vasconcelos et al., 2007). A excreção biliar é a principal via de eliminação de manganês, representando 95% do total. Conseqüentemente, qualquer dano existente no fígado pode retardar ou diminuir a sua eliminação e aumentar a quantidade relativa de manganês no plasma (Crossgrove & Zheng, 2004). Gerber et. al. (2002) relatam o efeito tóxico do metilciclopentadienil tricarbonil manganês (MMT) e do ciclopentadienil tricarbonil manganês (CMT) sobre os pulmões, os rins e o fígado de ratos Sprague-Dawley. Neste trabalho observou-se aumento significativo nos pesos de fígado nos grupos tratados em relação ao controle. Este fato pode indicar maior atividade desse órgão na desintoxicação sugerindo maior acúmulo de manganês hepático. Contudo, não houve variação significativa no IHS, provavelmente, devido ao ganho de peso dos animais tratados em relação ao controle. Em estudo onde camundongos foram tratados com arsenato de sódio, na concentração de 1,0 mg fornecida na água de consumo durante 42 e 84 dias, também de observou-se aumento de peso hepático (Carvalho, 2009).

5.2 - Concentrações de manganês

Neste trabalho foi observado um aumento da concentração diretamente proporcional ao tempo de exposição no testículo, sendo que os animais tratados durante 84 dias (Mn2) apresentaram variação significativa em relação ao grupo tratado por 42 dias (Mn1) e ao controle.

5.3 – Determinação plasmática das enzimas transaminases

Sabe-se que as transaminases ou aminotransferases são provas de função hepática, pois avaliam a função do fígado, podendo ser de dois tipos: aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). A ALT é mais específica para doenças hepáticas visto que é

quase exclusiva do fígado. Já a AST pode ser encontrada em outros órgãos além do fígado, porém em menor quantidade, como no músculo cardíaco, músculo esquelético, rim, pâncreas, cérebro e eritrócitos. As dosagens das transaminases são estão indicadas na avaliação das doenças hepáticas e das vias biliares, sendo considerados marcadores sensíveis de lesão hepática e, portanto, úteis para rastrear lesões mínimas e iniciais no fígado. É importante ressaltar que não existem correlações entre os valores de normalidade e o grau de lesão hepática. Estes valores são influenciados por diversos fatores dentre os quais estão raça, sexo, idade e peso corporal (McIntyre, 2005) A dosagem das enzimas ALT e AST é utilizada comumente como indicadores bioquímicos de hepatotoxicidade. Neste trabalho houve aumento significativo de AST no grupo Mn2 em relação aos grupos Mn1 e controle. Porém, não houve alteração significativa nos valores de ALT.

Não foram encontrados trabalhos que relacionassem alta dosagem de manganês e provas hepáticas de aminotransferases. Em trabalho utilizando complexo Mn-porfirina houve redução de AST e ALT (Wu et al., 2007). Modi et al. (2006), trabalhando com ratos Wistar machos expostos ao arsenito de sódio (2mg/kg), encontraram aumento das transaminases AST e ALT no soro quando comparado o grupo tratado com o grupo controle e associaram este aumento com danos hepáticos devido à toxicidade do arsênio. Carvalho (2009), trabalhando com adição de arsênio em água de beber de camundongos suíços durante 42 e 84 dias, não verificou alteração significativa em ALT. Porém, houve aumento da AST no grupo de 84 dias, semelhante ao que aconteceu neste trabalho. Mata (2009) observou aumento significativo de ALT em animais tratados com 100 mg/L-1 de arsenato durante 42 dias, o que, segundo o autor, indica comprometimento hepático em consequência da ação do arsênio.

5.4 - Proporções volumétricas de túbulo seminífero e intertúbulo

A proporção volumétrica de túbulos seminíferos em mamíferos é bastante variável, sendo este, um dos principais fatores responsáveis pela diferença observada para a eficiência na produção espermática nas diversas espécies (Russell et al., 1990; França e Russell, 1998). No presente trabalho houve a redução significativa do compartimento tubular foi acompanhada aumento do compartimento intertubular. Porém, as médias encontradas entre animais dos grupos controle e tratados com cloreto de manganês situam-se próximos das médias relatadas para roedores, como camundongos (85%), hamster dourado (85%), cobaio (90%) e degu

(93%) (Russell et al., 1990). Camundongos tratados com $1,0 \text{ mg/L}^{-1}$ de arsenato de sódio não apresentaram alterações nos dois compartimentos testiculares (Carvalho, 2009) Por outro lado, o aumento da dose para 100 mg/L^{-1} de arsenato provocou redução da proporção do compartimento tubular e aumento do compartimento intertubular (Mata, 2009)

5.5 - Volumes tubulares, intertubulares e índice tubulossomático

Alterações no volume dos compartimentos testiculares muitas vezes refletem a proporção volumétrica, embora necessariamente o aumento de um parâmetro não signifique o aumento do outro. Neste trabalho não houve alteração significativa nos volumes de túbulo e de intertúbulo, apesar do grupo Mn2 ter apresentado alterações significativa nos volumes de túbulo e intertúbulo. Carvalho (2009), trabalhando com camundongos que receberam arsenato de sódio ($1,0 \text{ mg/L}^{-1}$), também não encontrou diferença significativa nesses parâmetros. Por outro lado, Mata (2009), que ofertou 100 mg/L^{-1} de arsenato para camundongos suíços detectou, nestes animais, redução do volume de túbulos seminíferos que não foi acompanhada pela redução do volume do intertúbulo.

O ITS é um dado que visa quantificar o investimento em túbulos seminíferos em relação à massa corporal. Araújo (2008) afirma que a redução do ITS sugere um prejuízo na produção espermática. Portanto, a redução significativa do ITS dos animais tratados neste trabalho indicam, inicialmente, um déficit na produção de espermatozóides. Porém, a redução do ITS pode ter acontecido, apenas, devido ao aumento no peso corporal sem variação no peso testicular, conforme os dados da biometria corporal. O ITS também não variou em camundongos que receberam $1,0 \text{ mg/L}^{-1}$ de arsenato de sódio (Carvalho, 2009), mas reduziu drasticamente em camundongos que receberam 100 mg/L^{-1} dessa mesma substância, sendo que neste caso houve prejuízo de espermatogênese comprovado pela redução da população celular constituinte dos túbulos seminíferos (Mata, 2009).

5.6 - Diâmetros tubulares, Altura de epitélio e Comprimento de túbulos seminíferos

Parâmetros estruturais como tamanho do testículo, diâmetro tubular e volume dos túbulos seminíferos, estão intimamente relacionados com o comprimento total dos túbulos

seminíferos (França e Russell, 1998). Em investigações envolvendo a função testicular, a medida do diâmetro tubular é uma abordagem classicamente utilizada como indicador da atividade espermatogênica (França e Russell, 1998; Paula et al., 2002). No presente estudo, ocorreu aumento significativo do diâmetro tubular dos animais tratados, em relação ao controle, concomitantemente com a redução do comprimento de túbulo por grama de testículo. Adicionalmente, animais do grupo Mn2 apresentaram redução significativa do comprimento total de túbulo seminífero. Essas alterações sugerem que houve uma compensação da atividade espermatogênica aumentando diâmetro tubular e a altura de epitélio em detrimento do comprimento dos túbulos seminíferos. Análises mais detalhadas, como contagens das populações celulares dos túbulos seminíferos, cálculo da produção espermática diária e obtenção dos índices mitóticos, meióticos e de células de Sertoli poderão confirmar se houve comprometimento da espermatogênese nesses animais. Bustos-Obregón et al. (2007) num estudo feito com camundongos machos que ingeriram boro ($12,0 \text{ mg L}^{-1}$) em água de consumo, observaram aumento no diâmetro tubular e na altura do epitélio seminífero no grupo tratado, comparado ao controle que recebeu água com boro na concentração permitida pela legislação. Por outro lado, animais que receberam arsênio na dose de $1,0 \text{ mg/L}^{-1}$ e 100 mg/L^{-1} apresentaram redução do diâmetro tubular e da altura do epitélio seminífero (Carvalho, 2009; Mata, 2009). Porém, Mata (2009) não observou redução no comprimento total por testículo e por grama de testículo, enquanto Carvalho (2009) registrou redução apenas no comprimento por grama de testículo.

6 - Conclusões

O manganês mostrou-se cumulativo em todos os órgãos e tecidos analisados sendo que os animais tratados apresentaram aumento da massa corporal e hepática. Dos três índices calculados o ITS apresentou redução nos grupos tratados e o IGS reduziu nos animais que ficaram mais tempo em contato com o manganês.

As análises morfométricas mostram alterações significativas no compartimento tubular dos animais tratados com manganês, sendo relevante foi o aumento do diâmetro tubular e altura do epitélio nos grupos tratados, acompanhado da redução do comprimento de túbulo por grama de testículo. O comprimento total de túbulos seminíferos reduziu após 84 dias de tratamento com manganês.

Os dados relativos ao aumento da AST sugerem possíveis danos no fígado e rins, motivando estudos histológicos e patológicos destes órgãos posteriormente.

Entende-se que as alterações que ocorreram no peso corporal, no peso do fígado e nos túbulos seminíferos sejam decorrentes da ação do manganês. Adicionalmente, estudos mais detalhados do compartimento intertubular e das células de Leydig, assim como das células espermatogênicas poderão ajudar a entender melhor a ação do manganês no aparelho reprodutor masculino de camundongos.

7– Referências Bibliográficas

ARAÚJO, B.M. Morfometria testicular em ratos Wistar adultos tratados com paracetamol (acetaminofeno). (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural),UFV, 65p, 2008.

ATSDR. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for manganese*. Atlanta, GA, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2000.

ATTAL, J.; COUROT, M. Developpement testiculaire et etablisement de la spermatogeneses chez le taureau. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 3: 219-241, 1963.

BARDIN CW. Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man. In: Payne, AH., Hardy, MP., Russell, LD. Cap 2. (Eds). *The Leydig cell*. Vienna, Cache River Press, 231-42, 1996.

BASCOM, K.F.; OSTRUD, H.L. Quantitative studies of testicle. II. Pattern and total tubule length in the testicles of certain common mammals. *Anat. Rec.*, 31: 159-169, 1925.

BURHOP, K., GORDON, D., ESTEP, T. Review of hemoglobin induced myocardial lesions. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*; 32: 353-374, 2004.

BUSTOS-OBREGÓN, E.; CARVALHO, M.; HARTLEY-BELMAR, R.; SARAIBA, L.; PONCE, C. Histological and histometrical assessment of boron exposure effects on mouse spermatogenesis. *Int. J. Morphol.*, 25: 919-925, 2007.

CABRAL, F.H.C. Alterações morfológicas testiculares provocadas pelo cádmio, paracetamol e ao cádmio associado ao paracetamol, em ratos. (Dissertação de mestrado), 176p. UNICAMP,1996.

CARVALHO, F. A. R., Morfologia e morfometria testicular de camundongos adultos submetidos à exposição crônica de arsenato. (Mestrado em biologia celular e estrutural), 99 p., UFV, 2009.

COUROT, M.; HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: Johnson, A.D.; Gomes, W.R.; Vandenmark, N.L. Ed. The testis. New York: Academic Press, v.1, cap.6, p. 339-432, 1970.

COOPER, T.G.; YEUNG, C.H. Recent biochemical approaches to post-testicular, epididymal contraception. Hum. Reprod. Update., 5: 141-152,1999.

CHANDRA, S.V.; ARA R., NAGAR, N.; SETH, P.K. Sterility in experimental manganese toxicity. Acta. Biol. Med. Geriatr., 30: 857– 62, 1973.

CHAUHAN, A., AGARWAL, M., KUSHWAHA, S., MUTREJA, A. Suppression of fertility in male albino rats following the administration of 50% ethanolic extract of *Aegle marmelos*. Contracept., 76: 474-481, 2007.

CLERMONT, Y., ANTAR, M. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and the spermatogonial renewal in the monkey (*Macaca arctoides*). Am. J. Anat., 136:153-166, 1973.

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol. Rev. 52: 198–236, 1972.

CREASY, D.M. Pathogenesis of male reproductive toxicity. Toxicol Pathol., 29: 64-76, 2001.

CROSSGROVE, J.; ZHENG, W. Review: Manganese toxicity upon overexposure. NMR Biomed.; 17: 544–553, 2004.

DADOUNE, J. P.; DEMOULIN, A. Structure and functions of the testis. In: Thibault, C., Levasseur, M. & Hunter, R. H. F. (Eds). Reproduction in mammals and man. Paris: Ellipses, Cap.13, pp: 227-250, 1993.

DALLINGA, J.W.; MOONEN, E.J.C.; DUMOULIN, J.C.M.; EVERS, J.L.H.; GERAEDTS, J.P.M.; KLEINJANS, J.C.S. Decreased human semen quality and organochlorine compounds in blood. *Hum. Reprod.*, 17:1973-1979, 2002.

DE ROOIJ, D.G. Stem cells in the testis. *Int. J. Exp. Path.*, 79: 67-80, 1998.

DELLMANN, H.; WROBEL, K. Sistema reprodutor masculino, In: Dellmann, H., Brown, E. M. *Histologia Veterinária*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 12, pp.: 232-253, 1982.

DI TOPPI, L. S.; GABBRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. *Environm. Exp. Bot.*, 41: 105-130, 1999.

DONALDSON, J. The physiopathologic significance of manganese in brain its relation to schizophrenia and neurodegenerative disorders. *Neurotoxicol.*, 36:1584-7, 1987.

DORST, V. J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchunhen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. *Monotsh. Ver. Med.*, 29: 650-652, 1974.

DUFOUR DR.; LOTT JA, NOLTE FS.; GRETCH DR.; KOFF RS.; SEEFF LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin. Chem.*, 46: 2027-2049, 2000.

ELBETIEHA, A.; BATAINEH, H.; DARMANI, H.; AL-HAMOOD, MH. Effects of long-term exposure to manganese chloride on fertility of male and female mice. *Toxicol. Lett.*, 119: 193-201, 2001.

FAN, X.; ROBAIRE, B. Orchidectomy Induces a Wave of Apoptotic Cell Death in the Epididymis. *Endocrinol.*, 139: 2128-2136, 1998.

FIORINI, C.; TILLOY-ELLUL, A.; CHEVALIER, S.; CHARUEL, C.; POINTIS, G. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reprod. Toxicol.*, 18: 413- 421. 2004

FRANÇA, L.R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. 1991. 180p. Tese (Doutorado em Morfologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1991.

FRANÇA. L.R., RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: *Male reproduction; a multidisciplinary overview*. Ed. Madrid: Churchill Communications Europe España, cap 16: p.198-219, 1998.

GERBER,G.B; LEONARD, A.; HANTSON, PH. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese Compounds. *Crit. Rev. in Oncol./Hematol.*, 42: 25–34, 2002.

GODINHO, C.L. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros. 1999. 74 p. Tese (mestrado em Biologia Celular) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1999.

GOODMAN, H. M. Controle Hormonal da Reprodução Masculina. In: Johnson, L.R. *Fundamentos de Fisiologia Médica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 45, 2000.

GOYAL, H.O., WILLIAMS, C.S.; KHALIL, M.K., VIG, M.M., MALONEY, M.A. Postnatal differentiation of ductus deferents, tail of the epididymis, and distal body of epididymis in goats occurs independently of rete testis fluid. *Anat. Records.*, 254, 508-520, 1999.

GUERREIRO, D.A.N.S.; CURRAIS, J.P.M.; ALLEN, N.A.L.C. Efluentes industriais e seu impacto ambiental. 1999. Disponível: <http://www.fmv.utl.pt/democ/sft/sem9899/G007.htm>>. Acesso em 01/12/2009.em:

GUNN,S.A.; GOULD, T.C. Cadmium and other mineral element. In: The testis. Influencing factors. Eds. Johnson, A.D.; Gomes, W.R.; VanDemark, N.L.; New York Academ. Pred., p.337, 1970.

GURAYA, S. S. Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals. Spring-Verlag Berlin, 430 p., 1987.

GREGER JL. Nutrition versus toxicology of manganese in humans: evaluation of potential biomarkers. *Neurotoxicol.*, 20: 205–12, 1999.

GUPTA, G., SRIVASTAVA, A.K., SETTY, B.S. Androgenic regulation of glycolytic and HMP pathway in epididymides and vas deferens of rhesus monkey. *Ind. J. of Experim. Biol.*, 31: 305–311, 1993.

HESS, R.A.; FRANÇA, L. R. Structure of the Sertoli cell. In: Skinner, M.K.; Griswold, M.D. Eds., *The Sertoli Cell Biology*, Elsevier Academic Press, San Diego, California. pp. 19-40, 2005.

HURLEY, L. Teratogenic aspects of manganese, zinc and copper nutrition. *Physiol. Rev.*, 61:249–95, 1981.

JOHNSON, L.; NEAVES, W.B. Age-Related Changes in the Leydig Cell Population, Seminiferous Tubules, and Sperm Production in Stallions. *Biol. Reprod.*, 24: 703-712, 1981.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor masculino. IN: Junqueira, L.C.; Carneiro, J. *Histologia Básica*, Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 11 ed., cap 21, pp.323-334, 2008.

KATIRA V, BAWA P. Histopathological changes induced by manganese in the rat testes. *Uttar. Pradesh. J. Zool.*, 13: 60–2, 1993.

KARL, J., CAPEL, B. Sertoli cells of mouse testis originate from the celomic epithelium. *Dev. Biol.*, 203: 323-333, 1998.

KEEN, C. L., LONNERDAL, B., AND HURLEY, L. S. Manganese in Biochemistry of the essential ultratrace elements. Plenum Publishing Co., pp. 89-132, New York, 1984.

KEEN, C.L.; ENSUNSA J.L.; WATSON, M.H.; BALY, D.L.; DONAVAN, S.M.; MONACO, M.H.; ET AL. Nutritional aspects of manganese from experimental studies. *Neurotoxicol.*, 20:213–24, 1999.

KERR, J. B.; LOVELAND, K.L.; O'BRYAN, M.K.; DE KRETZER, D.M. Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. In: Neill, J. D. Ed., Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 3rd Ed., Elsevier. pp. 827-947, 2006.

KIERSZENBAUM, A.L. *Histologia e Biologia Celular. Uma introdução à Patologia.* Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 654p, 2008.

KOMURA J.; SAKAMOTO M. Effects of manganese forms on biogenic amines in the brain and behavioral alterations in the mouse; long-term oral administration of several manganese compounds. *Environ. Res.*, 57:34–44, 1992.

LASKEY J.W.; REHNBERG GL.; HEIN FJ.; LAWS S.C. Assessment of the male reproductive system in the preweanling rat following Mn₃O₄ exposure. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 15:339–50, 1985.

LEE, B.; PINE, M.; JOHNSON, L.; RETTORI, V.; HINEY, J. K.; DEES, W. L. Manganese acts centrally to activate reproductive hormone secretion and pubertal development in male rats. *Reprod. Toxicol.*, 22: 580–585, 2006.

LIU, P. Y.; HANDELSMAN, D. J. The present and the future state of hormonal treatment for male infertility. *Human reproduction update*, v. 9, 1:9-23, 2003.

LOHIYA, N.K.; ANSARI, A.S. Male contraceptive agents. In: Joy, K.P. Krishna, A. Krishna, C. Haldar, (Eds.), Comparative endocrinology and reproduction, Narosa Publishing House, New Dehli, 260-77, 1999.

LUKE, M. C.; COFFEY, D. S. Human androgen receptor binding to the androgen response element of prostate specific antigen. *J. Androl.*, 15: 41-51, 1994.

MALINI, T.; MANIMARAN, R. R.; ARUNAKARAN, J.; ARULDHAS, M. M.; GOVINDARAJULU, P. Effects of piperine on testis of albino rats. *J. Ethnopharmacol.*, 64: 219-225, 1999.

MATA, W.S. Toxicidade do arsenate e efeito protetor do guaraná e da vitamina E no aparelho reprodutor de camundongos machos adultos. (Tese de Doutorado). *Biologia Celular e Estrutural*, UFV, Viçosa, 2009. 135p

MARTINS, I.; LIMA, I. Ecotoxicologia do manganês e seus compostos. *Série Cadernos de Referência Ambiental*, v. 7, 121p., 2001.

McINTYRE, N. Clinical biochemistry of the liver. In: *The liver in Biology and Disease*, Bittar E.E (Ed.), Elsevier. pp. 291-315, 2004.

MENA, I. Metals in the environment 1st Ed. Manganese. In: WALDRON, H. A. (Ed.). *London Academic Press*, p. 199-220, 1980.

MENDES, F.T. Fígado e drogas. In: R. Dani, L.P. Castro (Eds), *Gastroenterologia clínica*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 1035-1042, 1988.

MENEZES, C. M. C. Análise morfofuncional da espermatogênese de queixadas (*Tayassu pecari* LINK, 1975), (Dissertação de mestrado) - Programa de Pós-graduação em Produção Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Campos dos Goytacazes-RJ, 96p., 2006.

MODI, M.; KAUL, R.K.; KANNAN,G.M.; FLORA,S.J.S. Co-administration of Zinc and n-acetylcysteine prevents arsenic-induced tissue oxidative stress in male rats. J. Trace Elem. in Med. and Biol., 20, 197-204, 2006.

MONTEIRO, J.C.; PREDES, F.S.; MATTA, S.L.P.; DOLDER, H. *Heteropterys aphrodisiaca* infusion reduces the collateral effects of Cyclosporine A on the testis. Anat. Rec., 291: 809-817, 2008.

MUKHERJEE, M., CHATTOPADHYAY, S.; MATHUR, P. P. Effect of flutamide on the physiological status of epididymis and epididymal sperms. Androl., 24:113 – 116, 1992.

NATHWANI, R.A.; PAIS, S.; REYNOLDS,T.B., KAPLOWITZ,N. Serum alanine-aminotransferases in skeletal muscle diseases. Hepatol., 41: 380-382, 2005.

OREJUELA, F.; LIPSHULTZ, L.I. Effects of working environment on reproductive health. Contemp. Urol., 10: 86-92, 1998.

PANT, N.; KUMAR, R.; MURTHY, R.C.; SRIVASTAVA, S.P. Male reproductive effect of arsenic in mice. Biometals., 14: 113-117, 2001.

PANDEY, R.; KUMAR, R.; SINGH, S.P.; SAXENA, D.K.; SRIVASTAVA, S.P. Male reproductive effect of nickel sulphate in mice. Biometals., 12: 339-346, 1999.

PANTEGHINI M. Aspartate aminotransferase isoenzymes. Clin. Biochem., 23: 311-319, 1990.

PAULA, T.A.R. Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). 1999. 84f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1999.

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

PARADA, B.; REQUIXA, A.; FIGUEIREDO, A.; MOTA, A. Infertilidade Masculina e fatores ambientais. *Act. Urol.*, 21: 9-15, 2004.

POCCIA, D. Molecules of the somatic cells. In: Poccia, D. *Molecular biology intelligence unit; molecular aspects of spermatogenesis*. Austin, R. G., Landes Company. Cap. 4, pp. 75-90, 1994.

PONNAPAKKAM, T.P.; KAREN, S. B.; KAREN, A.G.; MARCUS B. I. Assessment of male reproductive system in the CD-1 mice following oral manganese exposure. *Reprod. Toxicol.*, 17: 547-551, 2003.

PREDES, F.S. Associação de cádmio e *Ginkgo biloba* em ratos: avaliação do testículo quanto a modificações de estrutura, ultraestrutura e morfometria. (Dissertação de mestrado), UNICAMP, 64p, 2007.

RANA, S.V.S. *Environmental Pollution. Health and Toxicology*. Alpha Science, Oxford, 269p, 2007.

ROOSEN-RUNGE, E.C. *The process of spermatogenesis in animals*. Cambridge: Academic Press, 123p., 1977.

RUSSELL, L.D., ETTLIN, R.A., SINHA HIKIM, A.P., CLEGG, E.D. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, D.L., ETTLIN, R.A., SINHA HIKIM, A.P., CLEGG, E.D., (eds). *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Bolesta: Cache River Press, cap. 1, pp. 1-40, 1990.

RUSSELL, L. D.; GRISWOLD, M. D. The Sertoli cell. (ed) Clearwater, Florida: Cache River Press, p. 1-37, 1993.

RUSSELL, L. D. ; FRANÇA, L. R. Building a testis. *Tiss. Cell.*, 27:129-147, 1995.

RUSSELL, L. D. Mammalian Leydig cell structure. In: Payne, A. H., Hardy, M. P. & Russell, L. D. (eds) *The Leydig cell*. Vienna: Cache River Press, Cap. 10, p. 218-222, 1996.

SARADHA, B.; MARTHUS, P.P. Effect of environmental contaminants on male reproduction. *Environm.Toxicol. Pharmacol.*, 21: 34-41, 2006.

SETCHELL, B.P. Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P.T. *Reproduction in Domestic Animals*. 4th Ed. San Diego: Academic Press, Inc., cap. 6, pp. 221-250, 1991.

SETCHELL, B.P.; BREED, W.G. Anatomy, vasculature and innervation of the male reproductive tract. In: Neill JD eds, *Physiol. Reprod.*, 18: 771-825, 2006.

SETH, P.K.; NAGAR, N., HUSAIN, R. Effects of manganese on rat testes. *Environ. Physiol. Biochem.*, 3:263–7, 1973.

SKINNER, M. Cell-cell interactions in the testis. *Endoc. Rev.*, 12: 45-77, 2005.

SINGH, J.; HUSAIN, R.; TANDON, S.K.; SETH, P.K.; CHANDRA, S.V. Biochemical and histopathological alterations in early manganese toxicity in rats. *Environ. Physiol. Biochem.*, 4:16–23, 1974.

SIQUEIRA, M. E. P.B. Avaliação do ácido homovalínico urinário e da adenosina plasmática como índice de exposição ocupacional ao manganês. (Tese do Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêutica – USP, São Paulo, 1984.

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil. E, Neill, J.D. (Eds.). *The physiology of reproduction*, New York: Raven Press, ed.2, v.1, cap 22, pp.1363-1434, 1994.

STANBENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. In: Swenson, M. J.; Reece, W. O. *Dukes: Fisiologia dos animais domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., Cap. 35, p. 603-614, 1996.

TAE, H.J., JANG, B.G., AHN, D.C., CHOOI, E.Y., KANG, H.S., KIM, N.S., LEE, J.H., PARK, S.Y., YANG, H.H., KIM, I.S. Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus* Karpowi) during the breeding and non-breeding seasons. *Vet. Res. Commun.*, 29: 629-643, 2005.

THIBAUT, C.; KENNEDY, G., GAREAU, L., ZAYED, J. Preliminary assessment of atmospheric manganese tricarbonyl and particulate manganese in selected urban sites. *J. Toxicol. Environ. Heal. A.*, 65:503–11, 2002.

VASCONCELOS, T.H.C., MODESTO-FILHO, J.; DINIZ, M.F.F.M.; SANTOS, H.B.; AGUIAR, F.B.; MOREIRA, P.V.L. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). *Rev. Bras. Farmacog.* 17:583-591, 2007.

WAALKES, M.P.; COOGAN, T.P.; BARTER, R.A. Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. *Crit. Rev. Toxicol.*, 22, 175-201,1992.

WAALKES, M.P.; FRIDBERG,L.; NELSON,N.; BEAUMONT,J.; FOWLER,B.A.; LAUWERYS,R.; NOSDBERG,G.; VOSTAL,J.; ZIELHUIS,R. WORKGROUP. Problem of epidemiological evidence. *Environm. Health Perspec.*, 40: 11-20, 1992.

WEINBAUER G. F.; WESSELS, J. 'Paracrine' control of spermatogenesis. *Andrologia.*; 31:249-62, 1999.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Environmental Health criteria 17, Geneva, 1981.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Manganese its compounds. Concise international chemical assessment document n° 12, Geneva, 1999.

WEBSTER WS, VALOIS AA. Reproductive toxicology of manganese in rodents including exposure during the postnatal period. *Neurotoxicol.*, 8:437–44, 1987.

WILTON, L. J.; TEMPLE-SMITH, P. D. ; BAKER, H. W. G.; DE KRETZER, D. M. Human male infertility caused by degeneration and death of sperm in the epididymis. *Fertil. Steril.*, 49:1052-1058, 1988.

WU, T.J.; KHOO, N.H.; ZHOU, F.; DAY, B.J.; PARKS, D.A. Decreased hepatic ischemia-reperfusion injury by manganese-porphyrin complexes. *Free Radic. Res.*, 41 (2): 127-34, 2007.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. *Toxicologia Aquática - Princípios e aplicações*. Ed. Rima Editora, São Carlos, SP. 478 pp, 2006.

ZENICK, H., CLEGG, E.D., PERREAULT, S.D., KLINEFELTER, G.R., GRAY, L.E. Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach. In: *Principles and methods of toxicology*. 3. ed. New York: Raven, pp. 937-988, 1994.