



Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Urutaí
Programa de Pós-Graduação em Conservação de
Recursos Naturais do Cerrado

**AVALIAÇÃO DA TOXICOLOGIA
REPRODUTIVA DO EFLUENTE DE
CURTUME EM MACHOS DE
CAMUNDONGOS SWISS**

ABRAÃO TIAGO BATISTA GUIMARÃES

Orientador(a): Prof. Dr. Guilherme Malafaia Pinto

Coorientador(a): Prof. Thiago Lopes Rocha

Urutaí, fevereiro de 2018



Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano

Reitor

Prof. Dr. Vicente Pereira Almeida

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva

Campus Urutaí

Diretor Geral

Prof. Dr. Gilson Dourado da Silva

Diretor de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. André Luís da Silva Castro

Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado

Coordenador

Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

ABRAÃO TIAGO BATISTA GUIMARÃES

**AVALIAÇÃO DA TOXICOLOGIA REPRODUTIVA DO
EFLUENTE DE CURTUME EM MACHOS DE
CAMUNDONGOS SWISS**

Orientador

Prof. Dr. Guilherme Malafaia Pinto

Coorientador

Prof. Dr. Thiago Lopes Rocha

Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano –
Campus Urutaí, como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais
do Cerrado para obtenção do título de Mestre.

Urutaí, GO

2018

Os direitos de tradução e reprodução reservados.

Nenhuma parte desta publicação poderá ser gravada, armazenada em sistemas eletrônicos, fotocopiada ou reproduzida por meios mecânicos ou eletrônicos ou utilizada sem a observância das normas de direito autoral.

ISSN XX-XXX-XXX

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIB/IF Goiano

G963a Guimarães, Abraão Tiago Batista.

Avaliação da toxicologia reprodutiva do efluente de curtume em machos de camundongos Swiss / Campus Urutaí. [manuscrito] / Abraão Tiago Batista Guimarães. -- Urutaí, GO: IF Goiano, 2018.
43 fls.

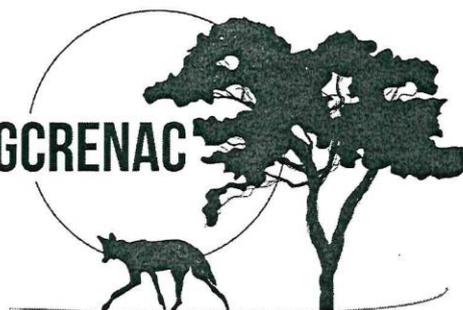
Orientador: Dr. Guilherme Malafaia

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí, 2018.

1. Reprodução. 2. Roedores. 3. Resíduo Agroindustrial. 4. Contaminante. 5. Impacto ambiente. I. Título.

CDU 574

PPGCRENAC

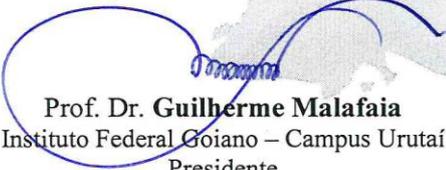


Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado

FICHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Título da dissertação:	<i>Avaliação da toxicologia reprodutiva do efluente de curtiúme em machos de camundongo Swiss</i>
Orientador:	Prof. Dr. Guilherme Malafaia
Coorientador:	Prof. Dr. Thiago Lopes Rocha
Autor:	Abraão Tiago Batista Guimarães

Dissertação de Mestrado **APROVADA** em **28 de fevereiro de 2018**, como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS DO CERRADO**, pela Banca Examinadora especificada a seguir:


Prof. Dr. Guilherme Malafaia
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí
Presidente


Prof. Dr. André Luis da Silva Castro
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí
Membro titular


Prof.ª Dra. Wanessa Fernandes Carvalho
Universidade Federal de Goiás – Campus Samambaia
Membro titular

*À Raíssa “meu bem querer” ...
Aos meus pais pela ajuda e paciência
em todos os atos de minha breve vida...
Ao Guilherme Malafaia, orientador e
amigo...*

. AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me provido de discernimento e inteligência para a conclusão deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos à todos aqueles que de alguma maneira contribuíram com meu aprendizado, tanto pessoal quanto profissional.

Aos meus pais, por terem me oferecido educação, paciência, valores e princípios essenciais na minha formação enquanto cidadão consciente.

À minha querida esposa Raíssa de Oliveira Ferreira, por me incentivar a crescer e estar sempre ao meu lado com palavras de conforto e preciosos conselhos, sendo uma pessoa que tanto admiro e que quero para sempre ao meu lado.

Ao Professor e orientador Guilherme Malafaia, que acima de tudo, sou grato pela sua amizade e por trazer alegria e entusiasmo por todo o período que trabalhamos juntos no Laboratório de Pesquisas Biológicas. Agradeço por me apresentar um mundo que não tinha conhecimento e que hoje me faz muito feliz e que pretendo continuar por toda minha vida, e também pelos ensinamentos, correções e sugestões; pelos conselhos que me fazem pensar que jamais posso deixar de me dedicar para alcançar o modelo de profissional que pretendo ser. Além disso, agradeço pela confiança e pela disponibilidade em sempre me auxiliar e, acima de tudo, pelo seu exemplo de profissionalismo.

Aos professores do PPG/CRENAC, pela contribuição em minha formação profissional.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisas Biológicas, pelo enorme apoio na execução deste trabalho e pela troca de experiências.

Aos pesquisadores do Laboratório de Imunobiologia da Inflamação – LABIIN da Universidade Federal de Ouro Preto, docente responsável Dr. André Talvani, os quais nos ajudaram com as análises das citocinas.

Aos pesquisadores do Laboratório de Comportamento Celular do ICB IV da Universidade Federal de Goiás – *Campus* Samambaia, docente responsável Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais, e em especial ao Prof. Dr. Thiago Lopes Rocha, pela sua grande ajuda e paciência em nos ensinar a confeccionar e analisar as lâminas histológicas, assim como suas contribuições na escrita da dissertação e por aceitar ser meu coorientador.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano IF Goiano – Campus Urutaí, pelas inúmeras oportunidades e por me proporcionar ensino de qualidade.

Por fim, agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), pela concessão de minha bolsa de estudos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURASX
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO.....01
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	03
2.1. Animais e delineamento experimental.....	03
2.2. Efluente de curtume.....	04
2.3. Avaliação do comportamento sexual.....	05
2.4. Avaliação da atividade locomotora.....	06
2.5. Avaliação da qualidade espermática.....	06
2.6. Análise histopatológica dos testículos.....	07
2.7. Análise da resposta inflamatória.....	08
2.8. Biometria e análise hematológica.....	09
2.9. Teste do dominante letal.....	09
2.10. Análises estatísticas.....	10
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO10
4. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29
ANEXOS	43

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (A) Espectro de massa de efluente de curtume bruto medido através de Ionização por eletropulverização (-) Orbitrap MS e (B) Ionização por eletropulverização (+) Orbitrap MS.....**37**
- Figura 2.** (A) Biomassa corpórea (g); (B) consumo de ração (g) e (C) água (mL).....**41**
- Figura 3.** (A) Massa relativa dos testículos e (B) epidídimos.....**42**
- Figura 4.** (A) Latência para a primeira tentativa de monta; (B) frequência de tentativas de montas (montas incompletas) e (C) número de células de Leydig nos testículos.....**13**
- Figura 5.** (A) Número relativo de células de Sertoli (por μm^2 de epitélio seminífero) e (B) percentual de células de Sertoli, em relação ao total de células germinativas.....**15**
- Figura 6.** Número relativo de espermatogônias do tipo A (A), de espermátides redondas (B), alongadas (C) e total de espermatozoides**16**
- Figura 7.** (A) Número relativo de espermatozóides móveis progressivos, (B) móveis não progressivos (B) e (C) imóveis**19**
- Figura 8.** (A) Somatório total de espermatozóides com anormalidades. Fotomicrografias representativas das principais anormalidades morfológicas observadas dos espermatozoides dos animais (B) cabeça estreita, (C) gancho reduzido, (D) cabeça amorfa.....**20**
- Figura 9.** Número relativo de túbulos seminíferos com (A) desorganização, (B) com vacúolos e (C) com despreendimento (descamação) apical de células germinativas.....**21**
- Figura 10.** Fotomicrografias representativas de túbulos seminíferos de machos de camundongos Swiss expostos ou não ao contato direto com efluente de curtume. (A) grupo controle; (B) grupo efluente E5; (B.1) ampliação de um túbulo seminífero contendo descamação de células germinativas no lúmen; (C) grupo E100.....**23**
- Figura 11.** Concentrações das citocinas pró-inflamatórias (IFN-gamma) (A) e CCL2 (B) nos testículos de camundongos machos Swiss expostos ou não ao contato direto com efluente de curtume. (C) Fotomicrografia representativa dos testículos que apresentaram infiltrados inflamatórios.....**25**
- Figura 12.** Fotos representativa das variáveis encontradas e contabilizadas nos diferentes grupos experimentais, (A) controle, sem alterações visíveis, (B) E100, apresenta má formação, (C) E100, setas pretas indicam má-formações e setas brancas indica reabsorção.....**26**
- Figura 13.** Número de implantações fetais (A), taxa de perdas pós-implantação (B), número de reabsorções (C) e frequência de dominante letal (D) obtidos a partir do acasalamento de camundongos machos Swiss expostos ou não.....**27**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos orgânicos identificados no efluente de curtume.....	38
Tabela 2. Características físico-químicas e químicas da água, efluente de curtume de 5% e do efluente de curtume bruto.....	41
Tabela 3. Eritrograma e leucograma de de camundongos machos Swiss expostos ou não ao contato direto com efluente de curtume.....	40

RESUMO

Sabe-se que nas indústrias a transformação da pele *in natura* em couro gera grandes quantidades de resíduos orgânicos, que atraem pequenos mamíferos (e.g.: roedores) que vivem nos arredores dessas indústrias. Ao forragear os pátios dessas indústrias, esses animais acabam sendo expostos aos efluentes gerados. No entanto, não tem sido dada atenção aos impactos que essa exposição pode causar na biologia reprodutiva desses animais. Assim, avaliamos se o contato direto com esses efluentes (por um período de 90 dias) ocasiona algum prejuízo reprodutivo em machos de camundongos Swiss. Ao final do período experimental avaliamos o comportamento sexual dos animais, realizamos análise da histologia testicular; avaliamos a qualidade e quantidade espermática, dosamos marcadores pró-inflamatórios, bem como avaliamos a performance reprodutiva dos camundongos. Nossos dados revelam que os animais expostos ao efluente bruto coletado no pátio de uma indústria curtumeira e àquele diluído em água a 5% apresentaram mudanças comportamentais, alterações histológicas nos testículos, desorganização de células germinativas nos túbulos seminíferos, bem como processo inflamatório nos espaços intertubulares, associado ao aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias (IFN-gamma e CCL2) nos testículos. Além disso, observamos aumento de anormalidades espermáticas e redução do total de espermatozoides produzidos, que em conjunto com as alterações relatadas anteriormente, pode ter sido responsável pela baixa performance reprodutiva dos animais expostos ao poluente (avaliada a partir do teste do dominante letal). Em conclusão, nosso estudo demonstra, pioneiramente, o impacto reprodutivo ocasionado pela exposição direta de pequenos roedores ao efluente de curtume, contribuindo para a compreensão de como esses poluentes podem impactar os ecossistemas naturais.

Palavras-chave: Reprodução, roedores, resíduo agroindustrial, contaminante, impacto ambiental.

ABSTRACT

It is known that in industries the transformation of the raw skin into leather generates large amounts of organic waste, which attract small mammals (eg, rodents) living in the vicinity of these industries. By foraging the yards of these industries, these animals end up being exposed to the generated effluents. However, attention has not been paid to the impacts this exposure may have on the reproductive biology of these animals. Thus, we evaluated whether the direct contact with these effluents (for a period of 90 days) causes some reproductive harm in males of Swiss mice. At the end of the experimental period we evaluated the sexual behavior of the animals, performed testicular histology analysis; we evaluated the sperm quality and quantity, we used pro-inflammatory markers, as well as evaluated the reproductive performance of the mice. Our data show that the animals exposed to the raw effluent collected in the yard of a tanning industry and to that diluted in water to 5% presented behavioral changes, histological changes in the testes, germinal cell disorganization in the seminiferous tubules, as well as inflammatory process in the intertubular spaces, associated with the increase in the concentration of proinflammatory cytokines (IFN-gamma and CCL2) in the testes. In addition, we observed an increase in sperm abnormalities and a reduction in the total sperm produced, which together with the previously reported alterations may have been responsible for the low reproductive performance of the animals exposed to the pollutant (evaluated from the dominant lethal test). In conclusion, our study demonstrates, first of all, the reproductive impact caused by the direct exposure of small rodents to the tanning effluent, contributing to the understanding of how these pollutants can impact the natural ecosystems.

Key words: Reproduction, rodents, agroindustrial residue, contaminant, environmental impact.

APRESENTAÇÃO

De acordo com o Ministério do Meio Ambiente (MMA), o Bioma Cerrado é o segundo maior da América do Sul, ocupando uma área de 2.036.448 km², cerca de 22 % do território brasileiro, abrangendo 12 Estados, e apesar de ser reconhecido como um *hotspot* de biodiversidade (Myers et al., 2000), ele possui uma porcentagem pequena de áreas sobre proteção integral (Ministério do Meio Ambiente, 2017).

O desflorestamento e a fragmentação do Cerrado são os principais problemas ambientais (Cerqueira et al., 2003), interferindo negativamente na oferta de alimentos de uma grande quantidade de espécies de pequenos mamíferos (roedores e marsupiais), indispensáveis para a manutenção do equilíbrio ecossistêmico, por integrar um importante papel nas cadeias alimentares e na dispersão de sementes (Andresen, 2000; Ripple et al., 2014).

Ampliando ainda a problemática da alimentação dos pequenos mamíferos, o Cerrado possui uma grande quantidade de indústrias de beneficiamento de pele bovina em couro, que oferece inúmeros atrativos alimentares para esses animais, como restos de carnes, gorduras e insetos (Joseph & Nithya, 2009). Atraídos por esses comestíveis, os pequenos mamíferos insetívoros ou não, se arriscam nos pátios das indústrias em busca de alimentos e acabam entrando em contato direto com grandes quantidades de produtos altamente tóxicos (Calheiros et al., 2007), por meio do toque de seus corpos com o efluente de curtume (EC), pela inalação dos compostos voláteis presentes e ingerindo pelo seu comportamento de auto-limpeza.

Entretanto, o conhecimento sobre os efeitos que o contato direto do EC podem causar nos pequenos mamíferos ainda é insipiente, especialmente sobre o impacto do EC na biologia reprodutiva. Portanto, buscamos analisar se esses contatos afetam o comportamento sexual, as características do esperma, a histologia testicular e se podem ocasionar processos inflamatórios nos testículos, alterações em sua biometria, hematologia e alterar o desempenho reprodutivo dos animais, bem como sua sobrevivência.

A seguir, será apresentado a introdução com a revisão literária, a metodologia adotada, os resultados alcançados e a discussão dos mesmos, e por fim a conclusão do estudo.

1. INTRODUÇÃO

Os aspectos socioeconômicos ligados à produção de calçados, bolsas, vestuários e estofamentos, demandam o processamento de grandes quantidades de peles bovinas em indústrias curtumeiras, localizadas especialmente em países asiáticos e da América do Sul (Aber et al., 2010). Nessas indústrias, a transformação da pele *in natura* em couro gera grandes quantidades de resíduos, constituídos de uma diversidade de compostos orgânicos e inorgânicos potencialmente tóxicos (Calheiros et al., 2007). Na etapa de ribeira, por exemplo, normalmente são utilizados sulfetos, sulfatos, cloretos, bem como grande quantidade de sódio e cálcio, produzindo resíduos líquidos com alto teor alcalino e resíduos sólidos, tais como pelos, restos de carne e gordura (Joseph & Nithya, 2009). Já na etapa de curtimento são gerados resíduos ricos em cloreto de sódio, ácidos minerais e orgânicos, sais de alumínio e diversos metais tóxicos (e.g.: cromo, chumbo, arsênio) e solventes utilizados na etapa de acabamento do couro (Hu et al., 2011; Sabumon, 2016).

Portanto, a alta produção de resíduos faz das indústrias curtumeiras grandes poluidoras (em potencial) do ambiente (Agrawal et al., 2006). Estudos prévios já demonstraram efeitos nocivos desses resíduos sobre plantas, bactérias e invertebrados, tais como *Allium cepa*, *Selenastrum capricornutum*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Hyalella azteca*, *Paracentrotus lividius* e *Sphaerechinus granularis* (Oral et al., 2005; Mitteregger et al., 2007). Contudo, o conhecimento sobre os impactos do EC sobre os vertebrados, encontra-se concentrado na classe dos peixes (Souza et al., 2016a).

Em relação ao grupo dos mamíferos, utilizando-se modelos experimentais (especialmente camundongos *inbred* e *outbred*), diferentes estudos já demonstraram efeitos prejudiciais nesses animais após exposição aguda e em longo prazo ao EC (Siqueira et al., 2011; Moysés et al., 2014; Ferreira et al., 2015; Almeida et al., 2016; Rabelo et al., 2016; Souza et al., 2016b, 2016c, 2017; Guimarães et al., 2016a, 2016b, 2017; Moysés et al., 2017; Mendes et al., 2017). Tais estudos, em sua maioria, deram enfoque na investigação do efeito da ingestão desses efluentes diluídos em água, apontando para fortes evidências de que seus constituintes afetam o sistema nervoso central (SNC) dos animais. Uma particularidade destes estudos reside no fato de que seus delineamentos experimentais buscaram correlacionar os níveis de exposição dos animais com prováveis situações em que seres humanos residentes próximos a cursos d'água receptores desses efluentes, podem ingerir água contaminada. É inegável que estes estudos fornecem subsídios importantes que podem ser utilizados para fins, inclusive, mitigatórios em localidades em que esses despejos ocorrem.

Contudo, os efeitos ecotoxicológicos que esses efluentes podem causar têm sido pouco explorados. Sabe-se que em muitas indústrias, principalmente as rudimentares e de pequeno porte, seus pátios são repletos de restos de material orgânico que atraem diversas espécies de insetos que fazem parte da dieta de pequenos roedores (Hogue, 1993) que vivem em áreas adjacentes a essas indústrias. Além disso, tais materiais orgânicos (i.e., restos de pelos, gorduras e carne, oriundos do processo de beneficiamento do couro) constituem atrativos alimentares e de fácil acesso a esses animais, os quais ao forrageá-los acabam sendo expostos aos efluentes presentes nessas indústrias (Estrela et al., 2017; Mendes et al., 2017). Assim, esses resíduos entram em contato diretamente com a pele, com as vias respiratórias (gases voláteis podem ser inalados) e com as vias digestórias (ingestão por lixiviação e por meio da higienização de seus corpos por meio da auto-limpeza) destes animais (Estrela et al., 2017).

Na literatura destacam-se apenas os estudos de Estrela et al. (2017) e Mendes et al. (2017), os quais deram enfoque na investigação de possíveis efeitos do contato direto com o EC sobre representantes do grupo dos mamíferos. Estrela et al. (2017) observaram que a exposição dérmica ao EC bruto, mesmo por um curto período de tempo, causou déficit de memória social em fêmeas de camundongos Swiss. Já Mendes et al. (2017) identificaram alterações na capacidade olfatória e na resposta antipredatória de machos e fêmeas de camundongos C57Bl/6J expostos dermicamente e oralmente ao EC. Portanto, ao relatarmos, pioneiramente, alguns prejuízos que os animais podem sofrer quando em contato com esses resíduos em ocasião de forrageio de pátios de indústrias curtumeiras, tais estudos abrem novas perspectivas para investigações.

Uma das formas de inferir sobre o impacto do EC na estruturação e organização populacional de pequenos mamíferos que forrageiam indústrias curtumeiras seria avaliar aspectos reprodutivos desses grupos que, se prejudicados, podem causar danos à homeostase ecológica e à dinâmica de suas populações. Além disso, ao considerarmos que pequenos roedores fazem parte da cadeia alimentar de outros animais e que atuam como dispersores de sementes, polinizadores e ainda na reciclagem da matéria orgânica, pode-se dizer que perturbações na reprodução podem influenciar negativamente o equilíbrio ecossistêmico de uma determinada região (Mihalca & Sándor, 2013; Sunyer et al., 2013).

Nesse sentido, objetivamos neste estudo investigar sobre os possíveis impactos reprodutivos da exposição de machos de camundongos Swiss ao EC. Partimos da hipótese de que o contato direto desses animais ao EC ocasiona prejuízos que comprometem seus

comportamentos sexuais, que ocasiona alterações histopatológicas testiculares e espermáticas e que afeta a performance reprodutiva dos camundongos. Na medida em que se ampliam os estudos sobre os efeitos desse contaminante sobre representantes da classe Mammalia, cria-se a perspectiva de compreendermos mais abrangentemente a magnitude do impacto ecotoxicológico desses resíduos na biota.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e delineamento experimental

Neste estudo utilizamos 75 camundongos machos Swiss (nulíparos) com 32 dias de vida, obtidos do Laboratório Veterinário da Agrodefesa (LABVET) (UFG, Goiânia, GO, Brasil) e mantidos no biotério do Pesquisas Biológicas do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí (Urutaí, GO, Brasil). Todos os animais foram mantidos em estantes ventiladas com controle de temperatura (22 ± 2 °C), fotoperíodo (com ciclo claro/escuro de 12/12 h) e umidade (58 ± 3 %) controlada. Os camundongos eram agrupados em caixas de polipropileno (nas dimensões 45,4 cm x 30,1 cm x 16,7 cm), com tampas gradeadas de arame galvanizado com tratamento antioxidante. A água e a ração (NUVILAB-CR1) foram oferecidos *ad libitum*, durante todo período experimental. Ressalta-se que este estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais do IF Goiano (Goiânia, Brasil) (proc. n. 2616170516).

Após os animais serem contrabalanceados a partir da covariável biomassa, de modo que a média da massa corpórea inicial dos camundongos foi estatisticamente igual entre os animais, foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais:

- i) **Grupo controle (C)**: composto por camundongos que permaneceram em suas caixas residência durante o experimento, não tendo sido colocados em caixas de exposição ou expostos a EC;
- ii) **Grupo controle seco (CS)**: composto por camundongos que foram colocados em caixas de exposição secas, ou seja, que não possuíam água ou EC;
- iii) **Grupo controle água (CA)**: composto por camundongos que foram colocados em caixas sem EC, mas que continham água na mesma quantidade (vide detalhes a seguir) que os grupos expostos a EC;
- iv) **Grupo efluente de curtume 5% (E5)**: composto por camundongos que foram colocados em caixas que continham EC (5%) diluído em água potável;
- v) **Grupo efluente de curtume 100% (E100)**: composto por camundongos que foram colocados em caixas que continham EC bruto.

As caixas de exposição consistiam em caixas de polietileno transparentes [40 cm (comprimento) x 30 cm (largura) x 20 cm (altura)] com tampa perfurada, que permitia a entrada e saída de ar. Em cada caixa eram adicionados 500 mL de efluente diluído ou bruto (nos grupos E5 e E100, respectivamente) ou água potável (no grupo CA), o suficiente para manter o fundo da caixa coberto, proporcionando o contato direto com o corpo dos animais.

Vale salientar que nosso delineamento experimental visou simular o contato direto dos animais com o EC, assim como ocorre com pequenos roedores quando forrageiam os pátios de indústrias curtumeiras mais rudimentares e de pequeno porte. Enquanto o grupo E100 simula situações em que os camundongos entram em contato direto com EC bruto encontrado no pátio das indústrias de curtume em meio aos restos de materiais orgânicos, o grupo E5 representa situações em que o efluente apresenta-se mais diluído, em função, por exemplo, de água utilizada na lavagem das peles e/ou do maquinário das indústrias curtumeiras. Em ambos os grupos, a condição de exposição adotada não protege da exposição oral por meio da ingestão. Portanto, os animais foram submetidos à exposição oral concomitante à exposição dérmica ao efluente, como pode ocorrer com roedores selvagens. Comportamentos de autolimpeza, típicos dos camundongos proporcionam a ingestão concomitante do efluente durante a exposição dérmica.

A exposição dos animais foi realizada cinco dias por semana (segunda a sexta- feira, 1 h/dia), por 90 dias. Após cada exposição, os animais eram colocados em uma caixa com maravalha limpa e sob luz aquecida, para que pudessem secar. Posteriormente, os camundongos eram colocados em suas caixas residências e levados para o biotério. A opção por expor os animais a cinco dias (e não a todos os dias da semana) e a um período de 1 h por dia deveu-se ao fato de que muitos roedores silvestres são onívoros e, portanto, encontram no ambiente natural fonte diversificada de alimentos, tais como frutos, ovos, sementes, insetos, dentre outros (Kerley, 1989; Ramos, 2007; Perini, 2010), não sendo os restos alimentares das indústrias curtumeiras as únicas fontes alimentares desses animais. Assumimos que o forrageio de roedores por restos orgânicos em indústrias curtumeiras pode estar atrelado à escassez de recursos alimentares ao redor desses empreendimentos ou à facilidade de obtenção de alimento.

2.2. Efluente de curtume

O EC utilizado no presente estudo foi obtido da fase de curtimento da pele bovina (do tipo *wet blue*), fornecido por uma indústria de curtume localizada no Estado de Goiás (Brasil). Tal efluente foi coletado diretamente do pátio da referida indústria entre as peles em processamento, tal como previamente reportado Estrela et al. (2017) e Mendes et al. (2017). A caracterização físico-química e química do EC (bruno e diluído) foi realizada de acordo com a metodologia da *American Public Health Association* (APHA, 1997). Já a análise orgânica foi realizada por espectrometria de massas com ionização por *eletrospray*, conforme descrito em Guimarães et al. (2016). Os resultados dessas análises são apresentados nas Tabelas 1 e 2 (respectivamente) e na Figura 1 (vide “Material Suplementar”)

2.3. Avaliação do comportamento sexual

Partindo da hipótese de que o contato direto com o EC pudesse alterar a homeostase dos órgãos andrógenos, influenciando variáveis sexuais dos animais, após 90 dias de exposição, os camundongos foram submetidos ao teste de comportamento sexual. Tal teste foi realizado durante a fase escura do ciclo – período em que os camundongos se encontram mais ativos (Olney & Sharpe, 1969; Moore, 1997), tal como indicado por Rodrigues-Alves (2008) e Park et al. (2009). Para tanto, os machos foram retirados de suas caixas residências e colocados individualmente em uma caixa de observação de vidro [34 cm (comprimento) x 24 cm (largura) x 20 cm (altura)], cujas paredes laterais eram opacas, sendo apenas o vidro frontal transparente. O piso continha maravalha limpa a uma altura de aproximadamente 2 cm. O teste foi realizado em sala específica que possuía isolamento acústico, temperatura controlada (23 ± 2 °C) e duas câmeras com infravermelho acopladas a um computador localizado externamente.

Após ser colocado na caixa de observação, o camundongo teste ficava em habituação por 10 min. Após esse período era inserida uma fêmea da mesma linhagem, idade e em fase de estro, de seu ciclo ovariano – sexualmente receptiva. Ressalta-se que a identificação da fase do ciclo estral da fêmea foi realizada conforme procedimentos recomendados por Byes et al. (2012), que na sequência era colocada na caixa onde se encontrava o macho. Após a introdução da fêmea, os machos eram filmados por 30 min, visando registrar a exibição das seguintes categorias comportamentais, definidas com base em Rodrigues-Alves et al. (2008): (i) latência para primeira monta ou primeira tentativa de monta; (ii) latência para primeira intromissão; (iii) frequência de tentativas de montas incompletas (i.e.: sem intromissão do pênis na vagina); (iv) número de intromissões e (v) número total de ejaculações.

2.4. Avaliação da atividade locomotora

Considerando que a *performance* dos animais no teste de comportamento sexual poderia ser influenciada por déficit de locomoção, a atividade locomotora geral dos animais foi avaliada por meio da *Basso Mouse Scale* (BMS) (Basso et al., 2006). Sumariamente, o método consiste na avaliação de atributos biomecânicos da marcha como movimento e alinhamento das patas, sustentação da cauda, estabilidade do tronco e coordenação. No presente estudo, a avaliação foi realizada nos primeiros 5 min do teste de comportamento sexual, nos quais os animais estavam em período de habituação.

2.5. Avaliação da qualidade espermática

Nós também hipotetizamos que o contato direto com o EC pudesse ocasionar alterações na motilidade, quantidade e morfologia dos espermatozoides dos animais. Para avaliação da motilidade dos espermatozoides, após a eutanásia dos camundongos, o ducto deferente esquerdo foi lavado com 300 μL de soro fisiológico, cujo conteúdo foi imediatamente transferido para uma lâmina pré-aquecida a 36 °C, de acordo com Llobet et al. (1995). Em seguida, foi retirada uma alíquota (de 50 μL) para contagem imediata de 200 espermatozoides em microscópio óptico (em aumento de 400 x), os quais foram classificados em: i) progressivamente móveis; ii) móveis não progressivos ou iii) imóveis, de acordo com Tardif et al. (1998) e Slimen et al. (2014).

Para a quantificação e avaliação da morfologia dos espermatozoides, o ducto deferente direito foi lavado com 300 μL de solução salina contendo formol a 10%. A contagem dos espermatozoides foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando uma alíquota de 15 μL das amostras fixadas anteriormente, tendo sido preenchidas duas câmaras por animal e no final foi calculada a média das duas contagens. Foram contados os espermatozoides com o auxílio de um microscópio óptico (no aumento de 400 x), os quais estavam presentes nos quadrantes 1, 3, 7 e 9, da câmara de Neubauer, conforme metodologia adotada por Slimen et al. (2014). Considerando que cada quadrante da câmara representa um volume de 0,1 mm^3 e que cada 1 cm^3 é equivalente a 1 mL, a contagem total de espermatozoides por mL foi determinada

multiplicando-se o número médio de espermatozoides por quadrante pelo fator 10^6 , conforme Silva (2007).

Para a análise morfológica dos espermatozoides, foram analisadas duas alíquotas (5 μL /por animal) de cada amostra fixada previamente. Para isso, as amostras foram coradas com safranina (5 mg/mL em água destilada) e posteriormente foram montadas duas lâminas temporárias por animal (Wyrobeci & Bruce, 1975), as quais foram analisadas em microscópio óptico (1000 x). Foram analisados de modo aleatório 200 espermatozoides por animal e a frequência dos tipos de espermatozoides determinada de acordo com a classificação proposta por Filler (1993): espermatozoides normais, cabeça redonda, cabeça de alfinete, cabeça invertida, cabeça gigante, cabeça estreita, cabeça anã, cabeça separada, duas cabeças, cabeça amorfa, gancho acentuado, gancho reduzido, flagelo torto, flagelo enrolado, ponta do flagelo enrolada ou cauda quebrada.

2.6. Análise histopatológica dos testículos

Para verificar possíveis efeitos do contato direto do EC com os animais sobre as estruturas dos testículos e sobre algumas variáveis relacionadas com o processo espermatogênico, foram coletados os testículos direitos dos camundongos, os quais foram imediatamente fixados em solução de paraformaldeído tamponado a 4%, desidratados em gradientes de etanol, inclusos em parafina (Paraplast/McCormick), seccionados com espessura de 5 μm e corados com hematoxilina e eosina (HE) (Luna, 1968; Behmer et al., 1976).

Foram confeccionadas três lâminas por animal, sendo que cada lâmina continha três cortes e, destes, foi selecionado para análise o corte de melhor qualidade técnica por lâmina, sendo contabilizados três cortes por animal. Utilizando-se o *software* Bell Capture, versão 3.1.0.0 (BEL Photonics, Piracicaba, SP, Brasil), imagens aleatórias dos testículos dos animais foram focalizadas e capturadas (em aumento de 100 x). Em seguida, foi quantificada a frequência relativa de túbulos seminíferos que apresentavam: (i) vacúolos no epitélio seminífero, (ii) desprendimento apical de células (descamação das células germinativas) e (iii) epitélio desorganizado. Destaca-se que essas alterações também foram classificadas em “leve”, “moderada” ou “intensa”, conforme metodologia proposta por Carvalho (2009).

Além disso, foram analisados, 10 secções transversais de túbulos seminíferos por animal, de acordo com Verma & Singh (2014), encontrados de forma aleatória na fase VII da espermatogênese, a qual é marcada principalmente pela presença dos espermatozoides

alinhados em torno do lúmen tubular e de todos os tipos celulares que compõem o processo espermatogênico (Zorzetto, 2007). A análise dos túbulos seminíferos também ocorreu com o auxílio do *software* Bell Capture, versão 3.1.0.0 (BEL Photonics, Piracicaba, SP, Brasil), em aumento de 400 x. Os seguintes parâmetros foram aferidos:

- ✓ Frequência das células de Sertoli, espermatogônia tipo A, espermatídes redonda e alongada, em relação à área do epitélio seminífero, de acordo com Carvalho (2009).
- ✓ Frequência das células de Leydig identificadas próximas aos vasos sanguíneos ou da túnica albugínea, contabilizada nos 10 melhores campos de visão (em aumento de 40x)/testículo, em que os túbulos seminíferos e os compartimentos intertubulares intersticiais não apresentavam qualquer artefato histológico.

2.7. Análise da resposta inflamatória

Com o intuito de verificar se o contato com o EC provocou algum processo inflamatório nos testículos dos animais, as citocinas IFN-gamma e JE/CCL2 foram dosadas pelo *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Os ensaios imunoenzimáticos foram realizados utilizando sobrenadante de macerado dos testículos esquerdos dos camundongos expostos ou não ao EC.

Para obtenção do sobrenadante do macerado dos testículos, foram pesados 0,04 g do tecido selecionados em corte longitudinal, macerado por 30 s em 500 µL de solução salina (PBS), sendo que o sobrenadante foi obtido após centrifugação a 1000 rpm por 5 min a 4 °C.

Após a preparação das amostras, foram utilizados kits comerciais (*Peprotech, New Jersey, USA*) para detecção dos marcadores inflamatórios (IFN-gamma e JE/CCL2). Para a sensibilização das microplacas de 96 poços foram adicionados 100 µL/poço dos anticorpos monoclonais contra os marcadores inflamatórios, diluídos em PBS contendo 0,1 % de albumina de soro bovino – BSA (*Sigma-Aldrich*), sendo estas placas incubadas *overnight* à temperatura ambiente. Anticorpos não adsorvidos pelas placas foram descartados, por inversão e sucessivas lavagens em PBS-*Tween* e as placas bloqueadas com 300 µL/poço de uma solução contendo PBS-BSA 1 %, durante 1 h a temperatura ambiente. A seguir as placas foram novamente lavadas. Após o bloqueio foram adicionados 100 µL das amostras de sobrenadante de macerado e de 100 µL dos padrões para cada marcador. Após 2 h de incubação, realizou-se novamente o processo de lavagem e foram adicionados 100 µL dos anticorpos biotinizados de detecção, anti-citocina usando diferentes diluições em PBS, pH 7,4

com 1 % de BSA e incubadas 2 h a temperatura ambiente, seguindo-se a lavagem. Em seguida foram adicionados 100 µL/poço de estreptoavidina HRP (*Peptotech, New Jersey, USA*) em diluição de 1:200 em PBS com 1 % de BSA e posterior incubação a temperatura ambiente durante 30 min. As placas foram novamente lavadas e adicionado 100 µL de ABTS (*Liquid Substrate System 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid – Sigma-Aldrich, Missouri USA*), seguido de incubação por 30 min em temperatura ambiente. A densidade óptica foi determinada utilizando leitor de microplacas com filtro de 405 nm e correção de 650 nm. A quantificação dos marcadores inflamatórios presentes nas amostras foi determinada utilizando a densidade óptica obtida com a curva padrão de concentrações conhecidas e analisadas pelo *software SOFTmax PRO 4.0*.

2.8. Biometria e análise hematológica

A biomassa corpórea dos animais foi aferida inicialmente e ao final do período experimental. Além disso, após a exposição e eutanásia, a massa relativa dos testículos e dos epidídimos foram calculados a fim de verificar se o contato direto com o EC provocou hipertrofia ou hipotrofia nesses órgãos andrógenos. Para isso, dividiu-se a massa de cada órgão (g) pela biomassa corpórea do animal (g) (aferida no dia da eutanásia), conforme realizado por Estrela et al. (2014). O consumo de água e ração foi aferido diariamente, por meio da subtração diária entre a cota oferecida e o rejeito do dia subsequente. Além disso, nós analisamos o eritrograma e leucograma dos animais, pelo método automatizado ABX – Micros 60, conforme metodologia reportada por Estrela et al. (2015).

2.9. Teste do dominante letal

Por fim, realizamos o teste do dominante letal, a fim de avaliar se a exposição ao EC teria afetado o desempenho reprodutivo dos animais. Para isso, após o último dia de exposição (i.e., 91º dia experimental), os animais dos diferentes grupos foram individualizados em caixas padrão para roedores e pareados com uma fêmea nulípara não exposta a poluentes e na fase estral do ciclo ovariano. Os animais permaneceram juntos para se acasalar por um período de 24 h, atendendo à recomendação de Ehling et al. (1978), os quais preconizam que o período de acasalamento deve preferencialmente ser o mais curto possível para a obtenção de informações sobre as ações específicas de mutagênicos químicos no estágio das células germinativas. Após esse período, os machos foram eutanasiados, para avaliação dos parâmetros descritos nos itens anteriores.

As fêmeas foram submetidas a laparotomia após 18 dias de prenhez para avaliação dos seguintes parâmetros, conforme procedimentos metodológicos descritos por Oliveira et al. (2014): taxa de fertilidade (número de fêmeas prenhas x 100/número de fêmeas), número de implantações embrionárias, taxa de perda pós-implantação (número de implantes - número de fetos vivos x 100/número de implantações), número de reabsorções e frequência de dominante letal (número de reabsorções x 100/número de implantações).

2.10. Análises estatísticas

Inicialmente, para verificar a distribuição dos dados foi utilizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados que apresentaram distribuição normal, foram submetidos à análise de variância simples (*one-way ANOVA*), seguida do pós-teste de Tukey, nos casos de F significativo. Nos casos em que os dados não apresentaram distribuição normal, os mesmos foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para ambos os testes, o nível de significância utilizado foi de 5 %. Para avaliar quantitativamente a relação entre o resultado de um experimento e a distribuição esperada para o fenômeno utilizamos o teste do qui-quadrado (χ^2). Ressalta-se que todas as análises estatísticas e a confecção dos gráficos foram realizadas no *software* GraphPad Prism (versão 6.0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de avaliar possível toxicidade sistêmica, inicialmente nós avaliamos se a biomassa dos animais e as massas relativas de alguns órgãos foram alteradas. Em relação à biomassa corpórea, nossas análises relevaram efeito apenas do fator “tempo” sobre o referido parâmetro. Nesse caso, todos os grupos apresentaram incremento de suas biomassas ao final do experimento, quando comparadas às iniciais (Figura 2A – vide “Material Suplementar”). Conforme também reportado por Golub & Germann (2001), esse aumento está relacionado ao desenvolvimento/crescimento dos animais, uma vez que quando o experimento foi iniciado os animais estavam na fase de puberdade (32 dias de vida). Além disso, acreditamos que a ausência de diferenças entre a biomassa corpórea dos animais ao final do período experimental, esteja relacionada à ausência de diferenças entre os grupos experimentais quanto ao consumo médio diário de ração e água (Figura 2B-C, respectivamente – vide “Material Suplementar”).

Em relação às massas relativas dos testículos e dos epidídimos, também não observamos diferenças entre os grupos experimentais (Figura 3A-B – vide “Material Suplementar”). Logo, esses dados e os dados de biomassa corpórea sugerem que os camundongos de todos os grupos experimentais mantiveram o mesmo aproveitamento dos recursos alimentares disponíveis, indicando que o EC nas concentrações e tempo de exposição analisado não induziu alterações significativas do metabolismo energético do animal, sugerindo a inexistência de intoxicação sistêmica nos animais estudados. Além disso, os dados de massa relativa nos permitem inferir que a exposição ao EC não causou hipo ou hipertrofia nos órgãos andrógenos avaliados.

Quanto ao desempenho dos animais no teste de comportamento sexual, registramos a latência para primeira monta e a frequência de tentativas de montas (montas incompletas). As demais categorias comportamentais especificadas em “Material e Métodos” não foram observadas em nosso estudo, o que pode estar relacionado principalmente ao tempo com que os machos interagiram com as fêmeas receptivas. Nesse caso, o tempo de 30 min de filmagem, adotado em nosso estudo, pode não ter sido suficiente para a exibição de um repertório de comportamentos sexuais mais amplo, embora estudos prévios já tenham relatado comportamentos mais diversificado. Conforme discutido por Hull & Dominguez (2007), a exibição de comportamentos sexuais de roedores machos, tais como a latência para a primeira ejaculação, pode variar de 10 a 115 min, podendo esse período ser diferente entre distintas linhagens de ratos e camundongos. Além disso, não podemos negligenciar o fato de que os camundongos avaliados em nosso estudo eram nulíparos (sem qualquer experiência sexual anterior), os quais normalmente requerem mais tempo para a exibição de um maior repertório comportamental sexual.

Se por um lado, a latência para primeira tentativa de monta foi semelhante entre os grupos experimentais (Figura 4A); por outro, os camundongos dos grupos E5 e E100 foram aqueles que apresentaram maior frequência de tentativas de montas (Figura 4B). Esses dados nos permitem descartar a hipótese de que a exposição ao EC pudesse prejudicar os receptores quimiossensíveis dos sistemas olfativos principal e acessório (importante para a exibição de comportamentos sexuais), diferentemente do que foi reportado por Mendes et al. (2017), os quais evidenciaram prejuízo olfatório de machos e fêmeas de camundongos C57Bl/6J expostos dermicamente a EC bruto, por 15 dias. Contrariamente, acreditamos que os constituintes do EC tenham provocado aumento dos níveis séricos de testosterona – o qual medeia efeitos motivacionais do comportamento sexual, como ereção peniana e libido

(Schanbacher & Lunstra, 1976; Batty, 1978), e isso ter sido responsável pela maior frequência de tentativas de montas observada nos animais expostos ao EC. Essa hipótese é reforçada, principalmente, pela constatação de maior número de células de Leydig (sem modificações morfológicas) nos testículos dos animais expostos ao contaminante (Figura 4C).

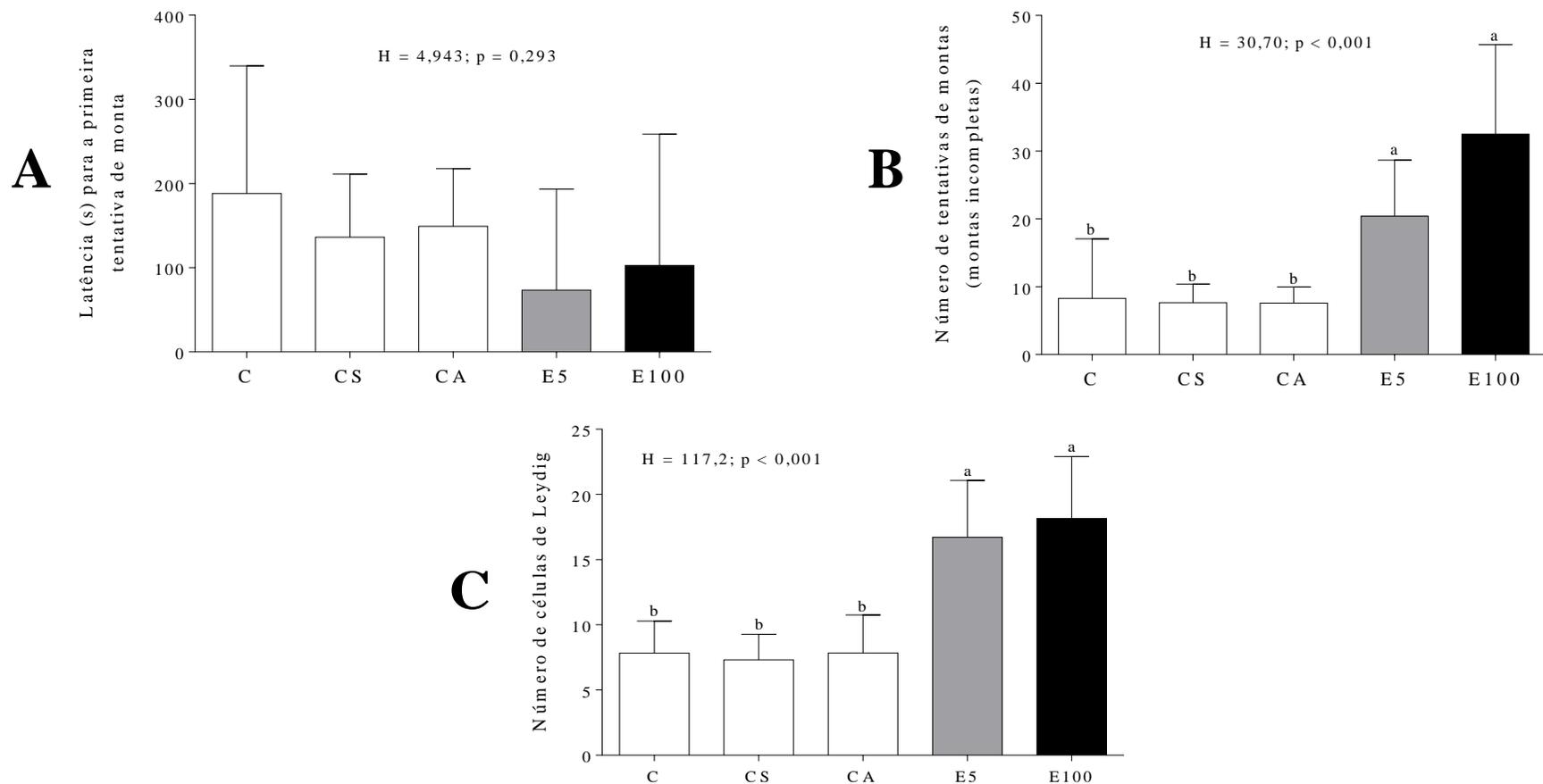


Figura 4. (A) Latência para a primeira tentativa de monta; (B) frequência de tentativas de montas (montas incompletas) e (C) número de células de Leydig nos testículos de camundongos machos Swiss expostos ou não ao contato direto com efluente de curtume. As barras representam a média + desvio padrão (n=15/grupo). Os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, sendo que as múltiplas comparações foram realizadas pelo teste de Dunn's, a 5% de probabilidade. As letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas. C: grupo controle; CS: grupo controle seco; CA: grupo controle água; E5: grupo efluente de curtume a 5% e E100 grupo efluente de curtume (100%).

De acordo com Russell et al. (1990) e Shima et al. (2013), as células de Leydig apresentam marcante produção de andrógenos a partir do colesterol, como a testosterona. Nesse caso, é possível que os xenobióticos contidos no EC possam ter ocasionado aumento das reações de síntese do referido hormônio, atuando nos diferentes componentes que medeiam essas reações, cujos mecanismos devem ser elucidados. Na literatura não há um consenso sobre as consequências da exposição de distintos modelos animais aos variados contaminantes presentes no ambiente sobre os níveis séricos de testosterona (vide revisão de Guillette & Gunderson, 2001). No entanto, alguns estudos, como o de Ljungvall et al. (2005) e Kumar et al. (2008) evidenciam que xenobióticos estimulam a síntese ou liberação de testosterona em roedores. Ljungvall et al. (2005) observaram aumento significativo da população de células de Leydig, acompanhado de incremento proporcional dos níveis sérios de testosterona em javalis expostos à ftalatos (um dos constituintes mais abundantes identificados no EC que utilizamos). Já Kumar et al. (2008) reportaram evidências sobre o aumento dos níveis séricos de testosterona em machos de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de EC. Além disso, outras investigações envolvendo camundongos expostos a outros poluentes (Daí et al., 2001) e modelos experimentais não mamíferos (peixes e sapos) também evidenciam que os níveis séricos de testosterona podem aumentar consideravelmente em animais expostos a diferentes contaminantes (Sangalang & Freeman, 1974; Hopkins et al., 1997). Portanto, esses estudos reforçam a hipótese de que o EC tenha contribuído para o aumento da síntese ou liberação de testosterona nos animais dos grupos E5 e E100.

Surpreendentemente, nós também observamos maior número de células de Sertoli nos animais expostos ao EC, tanto por μm^2 de epitélio seminífero (Figura 5A), quanto analisando o percentual dessas células em relação ao total de células germinativas dos túbulos seminíferos contabilizados (Figura 5B). Conforme demonstrado por diversos estudos [vide revisões de Russell (1980); Griswold (1995), Walker & Cheng (2005), Johnson et al. (2008), Kopera et al. (2010)], as células de Sertoli desempenham papel central na espermatogênese. Nos mamíferos, desde o período neonatal até o início da produção de espermatozoides, na puberdade, a interação entre essas células e as células germinativas é essencial, obrigatória e complexa, seja física ou bioquimicamente (Griswold, 1995).

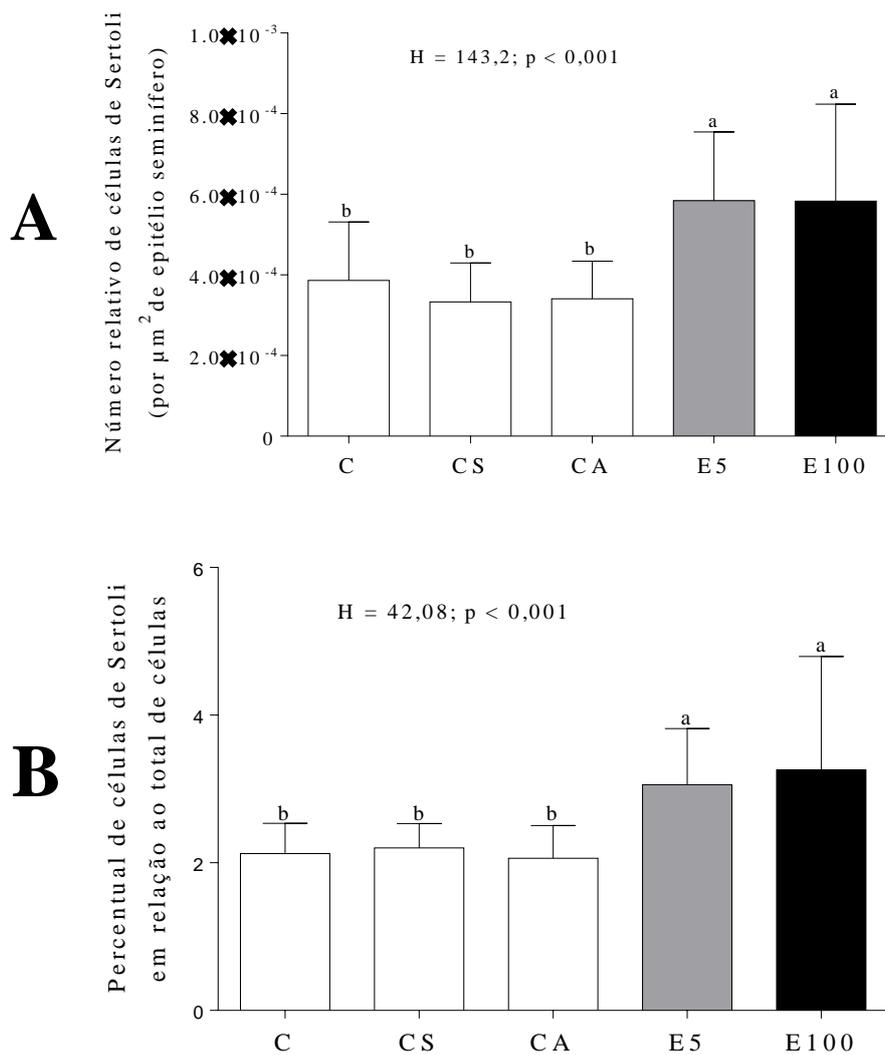


Figura 5. (A) Número relativo de células de Sertoli (por μm^2 de epitélio seminífero) e (B) percentual de células de Sertoli, em relação ao total de células germinativas contabilizadas nos túbulos seminíferos de camundongos machos Swiss expostos ou não ao contato direto com efluente de curtume. As barras representam a média + desvio padrão (n=15/grupo). Os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, sendo que as múltiplas comparações foram realizadas pelo teste de Dunn's, a 5% de probabilidade. As letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas. C: grupo controle; CS: grupo controle seco; CA: grupo controle água; E5: grupo efluente de curtume a 5% e E100 grupo efluente de curtume (100%).

Ao considerarmos que a proliferação das células de Sertoli ocorre normalmente antes da fase adulta (tanto em humanos, quanto em roedores) (Sharpe et al., 2003), acreditamos que possa ter ocorrido alguma desregulação nos processos que controlam e que medeiam a proliferação dessas células, o que explicaria o maior número observado nos animais expostos ao EC. Em roedores, especificamente, a proliferação das células de Sertoli ocorre predominantemente no período fetal, neonatal e anterior à fase adulta ou de maturação sexual

(Sharpe et al., 2003). Em nosso estudo, a exposição ao EC foi iniciada na fase puberbal dos camundongos (i.e.: aos 32 dias de vida) e, portanto, os primeiros dias de contato com os constituintes do EC já teriam sido suficientes para ocasionar alterações no processo proliferativo das células de Sertoli.

Outra possibilidade estaria relacionada com a amplitude do período em que normalmente ocorre a proliferação das células de Sertoli, sendo maior nos animais expostos ao EC, quando comparado com aqueles não expostos ao contaminante. Além disso, é tentador especular que os constituintes do EC tenham provocado alterações nas operações fisiológicas do eixo hipotálamo-hipófise, especialmente em neuromodulações ligadas à produção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). O aumento da frequência e amplitude dos pulsos de secreção de GnRH, por exemplo, podem ter provocado incremento da síntese e/ou liberação do hormônio folículo estimulante (FSH), culminando na maior proliferação das células de Sertoli nos primeiros dias de exposição ao EC, já que esse hormônio é fundamental para a proliferação dessas células (Orth, 1984). Estudos anteriores que sugerem efeitos neurotóxicos importantes no eixo hipotálamo-hipófise, causados pela exposição de roedores a EC (Moysés et al., 2017; Rabelo et al., 2017; Estrela et al., 2017) reforçam nossa hipótese. Além disso, a observação de maior número de células de Leydig (Figura 4C) acompanhado pelo aumento proporcional do número de células de Sertoli (Figura 5A-B) sugerem a ocorrência de falhas nos mecanismos de retroalimentação negativa envolvendo o hormônio luteinizante (LH) e o FSH, uma vez que esses hormônios estão intimamente relacionados com a população dessas células nos testículos (Mendis-Handagama, 1997; Haider, 2004; Walker & Change, 2005).

Apesar dos animais expostos ao EC terem apresentado maior população de células de Sertoli, o número reduzido de espermatogônias do tipo A (Figura 6A), espermatídes redondas e alongadas (Figura 6B-C), bem como a menor produção de espermatozóides (Figura 6DA) e com alterações na motilidade (Figura 7A-C) e morfologia (Figura 8A), sinalizam possíveis prejuízos funcionais nessas células, sugerindo também que o aumento do número de células de Sertoli pode ser uma resposta compensatória para o aumento do número de espermatozoides alterados. Conforme discutido por Russell et al. (1990), as células de Sertoli são mais resistentes à ação de agentes tóxicos do que as células germinativas; porém, são muito sensíveis a perturbações funcionais que afetam suas vias metabólicas e regulatórias, o que pode rapidamente levar a uma degeneração e má formação das células germinativas.

É bem descrito na literatura que dentre as diversas funções desempenhadas pelas células de Sertoli, destacam-se seu papel na sustentação das células espermatogênicas, na fagocitose de corpos residuais tubulares, secreção de fluido que contém substâncias importantes para a função epididimária e maturação espermática, bem como no fornecimento de nutrientes para as células germinativas (Russell et al., 1990; Russell & Griswold, 1993). Essas células também atuam na regulação endócrina primária da espermatogênese, especialmente via FSH e testosterona (Walker & Change, 2005), além de apresentarem papel essencial na regulação do ambiente intratubular e intercelular adluminal (Russell & Griswold, 1993). Logo, tais células propiciam a formação de uma barreira hemato-testicular, responsável pela criação de um microambiente específico, imunoprivilegiado e essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (Russell et al., 1990; Russell & Griswold, 1993). Desse modo, a proliferação das células de Sertoli pode prevenir o aumento da bioacumulação dos poluentes presentes no EC nos testículos.

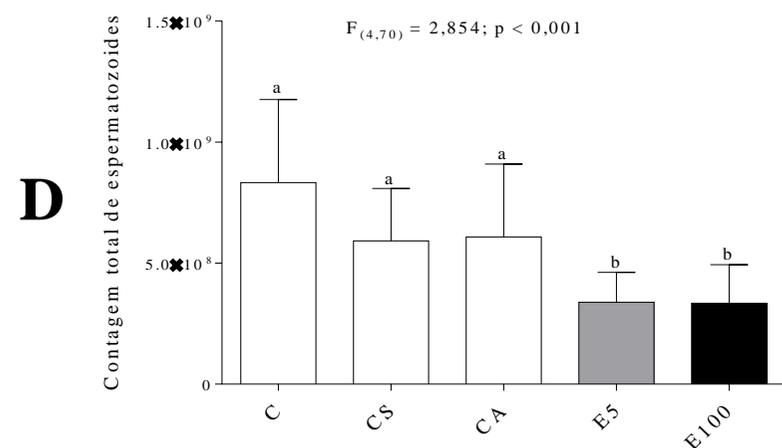
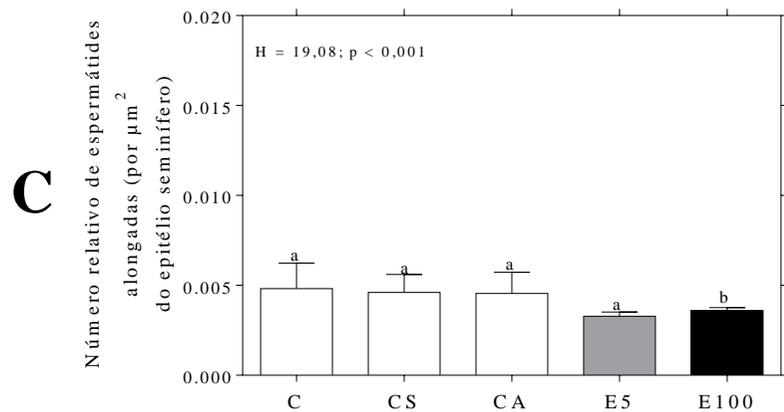
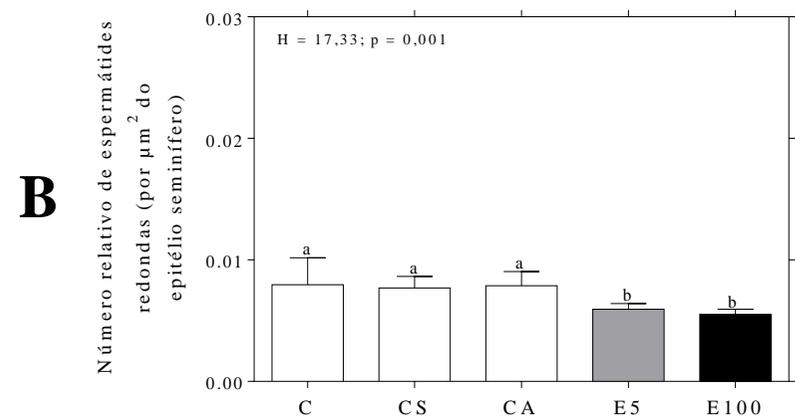
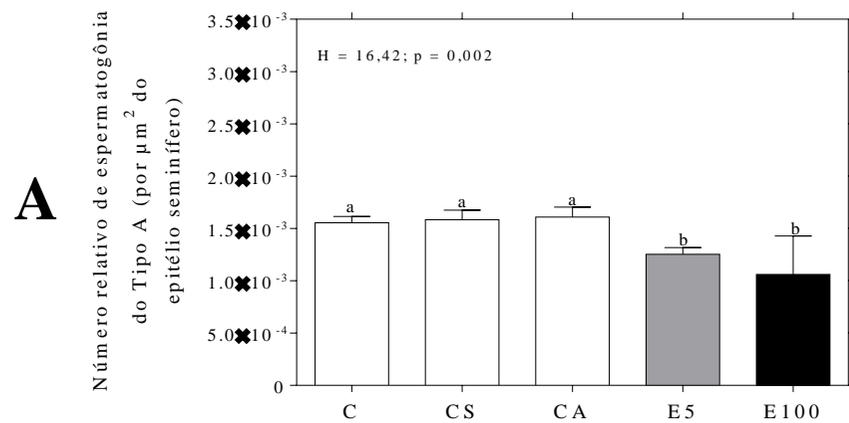


Figura 6. Número relativo de espermatogônias do tipo A (A), de espermátides redondas (B), alongadas (C) e total de espermatozoides de camundongos machos Swiss expostos ou não ao contato direto com efluente de curtume. As barras representam a média + desvio padrão (n=15/grupo). Os dados paramétricos foram submetidos ao one-way ANOVA (sendo que as múltiplas comparações foram realizadas pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade) e os não-paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis (sendo que as múltiplas comparações foram realizadas pelo teste de Dunn's, a 5% de probabilidade). As letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas. C: grupo controle; CS: grupo controle seco; CA: grupo controle água; E5: grupo efluente de curtume a 5% e E100 grupo efluente de curtume (100%).

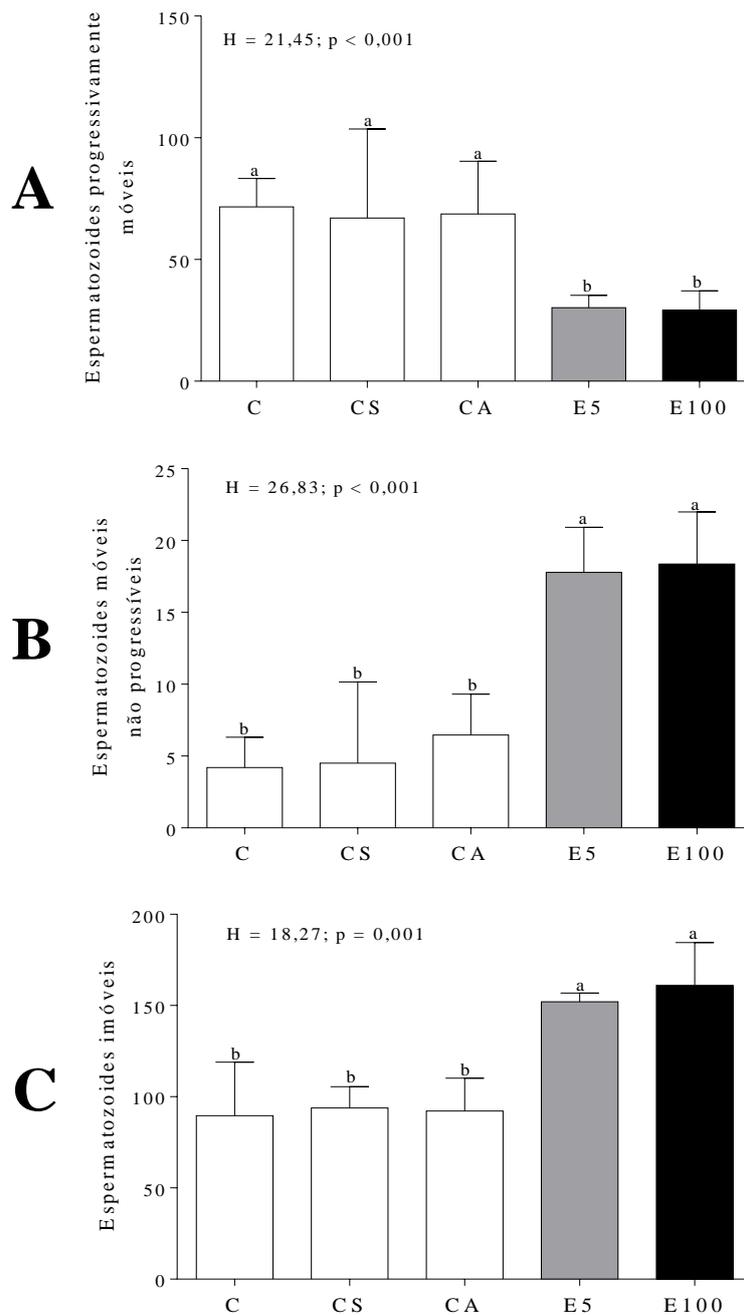


Figura 7. (A) Número relativo de espermatozoides móveis progressivos, (B) móveis não progressivos (B) e (C) imóveis de camundongos machos Swiss expostos ou não ao contato direto com efluente de curtume. As barras representam a média + desvio padrão (n=15/grupo). Os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, sendo que as múltiplas comparações foram realizadas pelo teste de Dunn's, a 5% de probabilidade. As letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas. C: grupo controle; CS: grupo controle seco; CA: grupo controle água; E5: grupo efluente de curtume a 5% e E100 grupo efluente de curtume (100%).

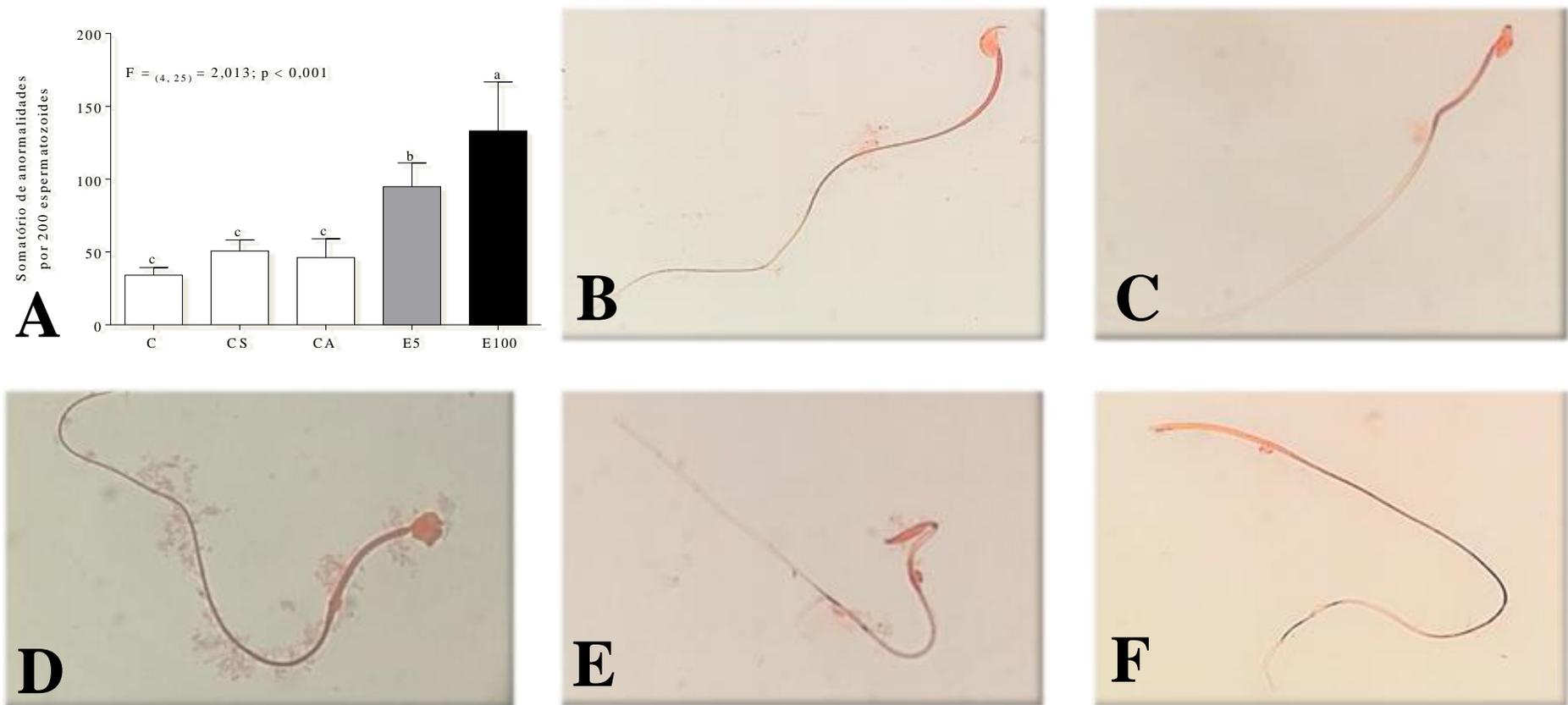
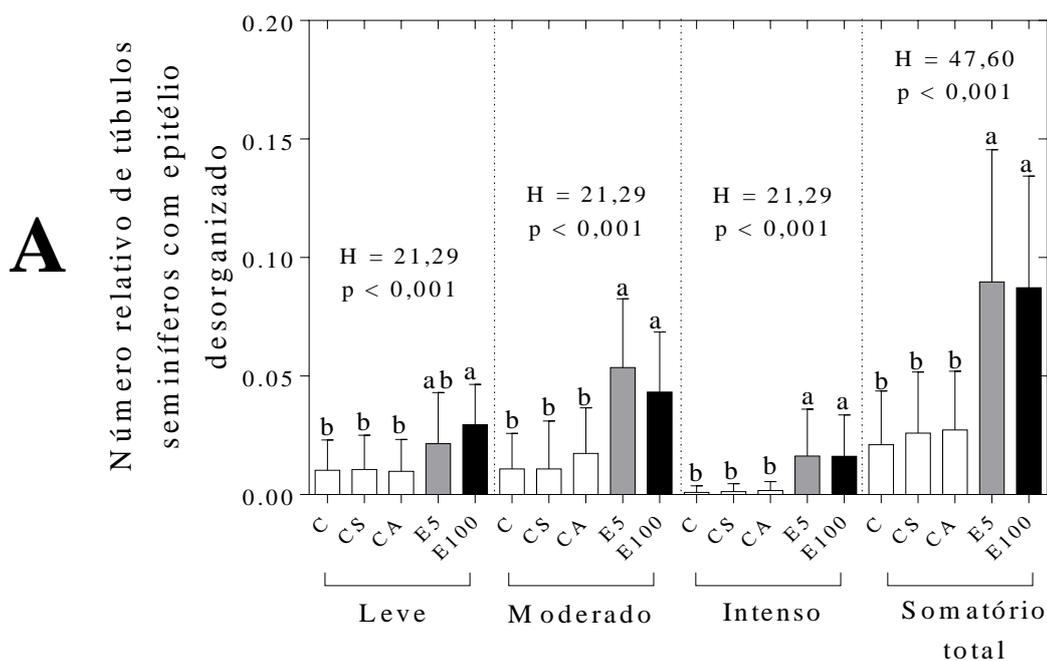


Figura 8. (A) Somatório total de espermatozoides com anormalidades morfológicas de camundongos machos Swiss expostos ou não ao contato direto com efluente de curtume. Fotomicrografias representativas das principais anormalidades morfológicas observadas nos espermatozoides dos animais. (B) espermatozoide normal; (C) com gancho reduzido; (D) cabeça amorfa; (E) cabeça estreita e (F) cauda quebrada. As barras representam a média + desvio padrão (n=15/grupo). Os dados foram submetidos ao one-way ANOVA, sendo que as múltiplas comparações foram realizadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas. C: grupo controle; CS: grupo controle seco; CA: grupo controle água; E5: grupo efluente de curtume a 5% e E100 grupo efluente de curtume 100%.

A constatação de degeneração tubular, caracterizada por túbulos seminíferos com epitélio desorganizado (Figura 9A e 10), vacuolização tubular (Figura 9B e 10), além de descamação (desprendimento) apical de células germinativas (Figura 9C) nos animais expostos ao EC, reforça o pressuposto de que as células de Sertoli desses camundongos estariam com suas funções prejudicadas, especialmente no que se refere à formação da barreira hemato-testicular. A descamação de células germinativas observada com maior frequência nos animais expostos ao EC, por exemplo (Figura 10B-C), pode ter ocorrido devido à perda das junções celulares entre as células germinativas e as células de Sertoli e/ou à desregulação de microtúbulos (resultando no desprendimento das células germinativas), o que também foi reportado por estudos de toxicidade induzida por xenobióticos (Boekelheide et al., 2005; Xia et al., 2005; Liu et al., 2008; Flora et al., 2011; Costa, 2013). Além disso, os espaços intercelulares observados em nosso estudo (Figura 10B), tanto em células germinativas que ocupam o ambiente basal, quando o adluminal, reforçam a ação negativa do EC sobre as junções de adesão.



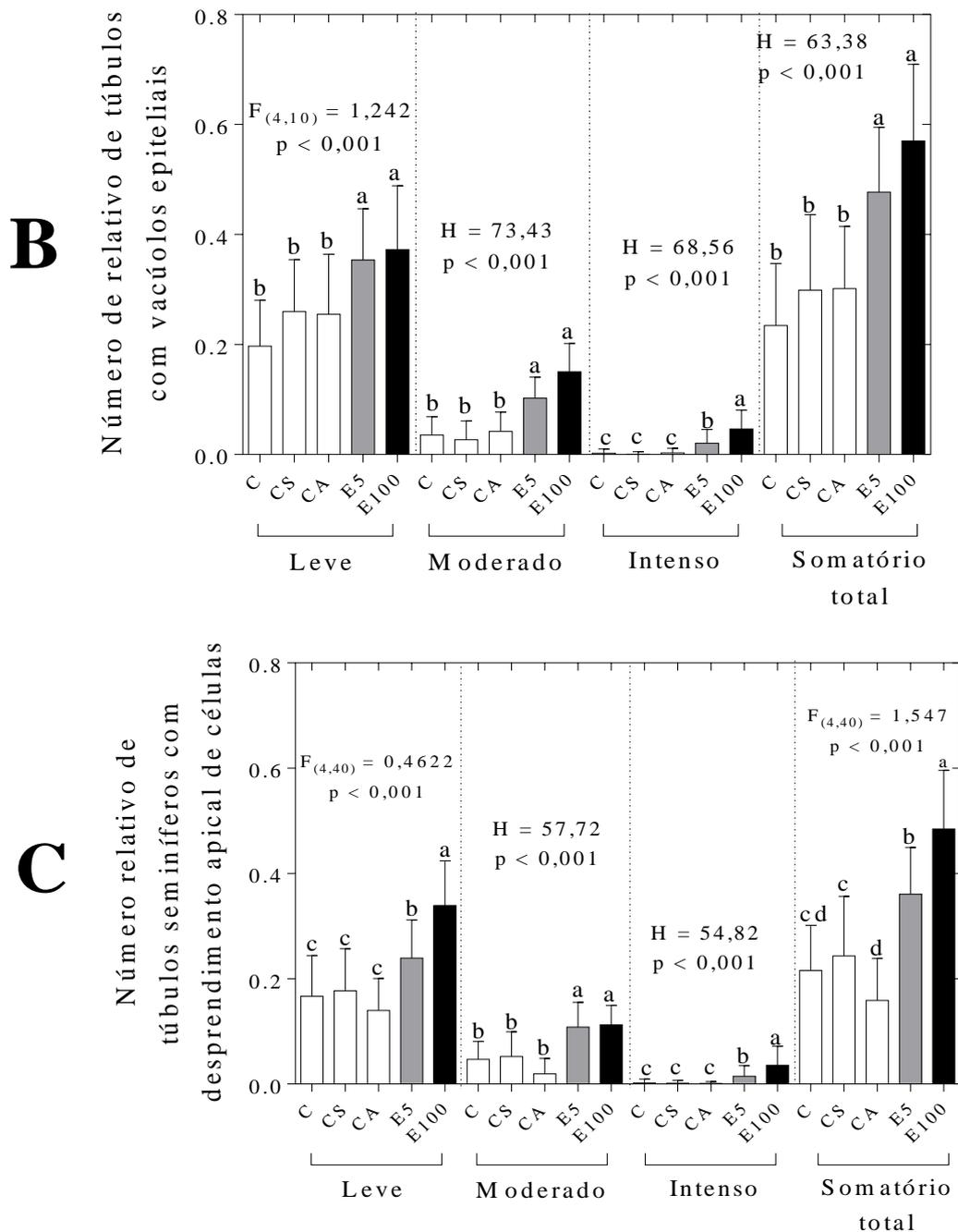


Figura 9. Número relativo de túbulos seminíferos com (A) desorganização, (B) com vacúolos e (C) com desprendimento (descamação) apical de células germinativas, de camundongos machos Swiss expostos ou não ao contato direto com efluente de curtume. As barras representam a média + desvio padrão (n=15/grupo). Os dados paramétricos foram submetidos ao one-way ANOVA (sendo que as múltiplas comparações foram realizadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade) e os não-paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis (sendo que as múltiplas comparações foram realizadas pelo teste de Dunn's, a 5% de probabilidade). As letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas. C: grupo controle; CS: grupo controle seco; CA: grupo controle água; E5: grupo efluente de curtume a 5% e E100 grupo efluente de curtume (100%).

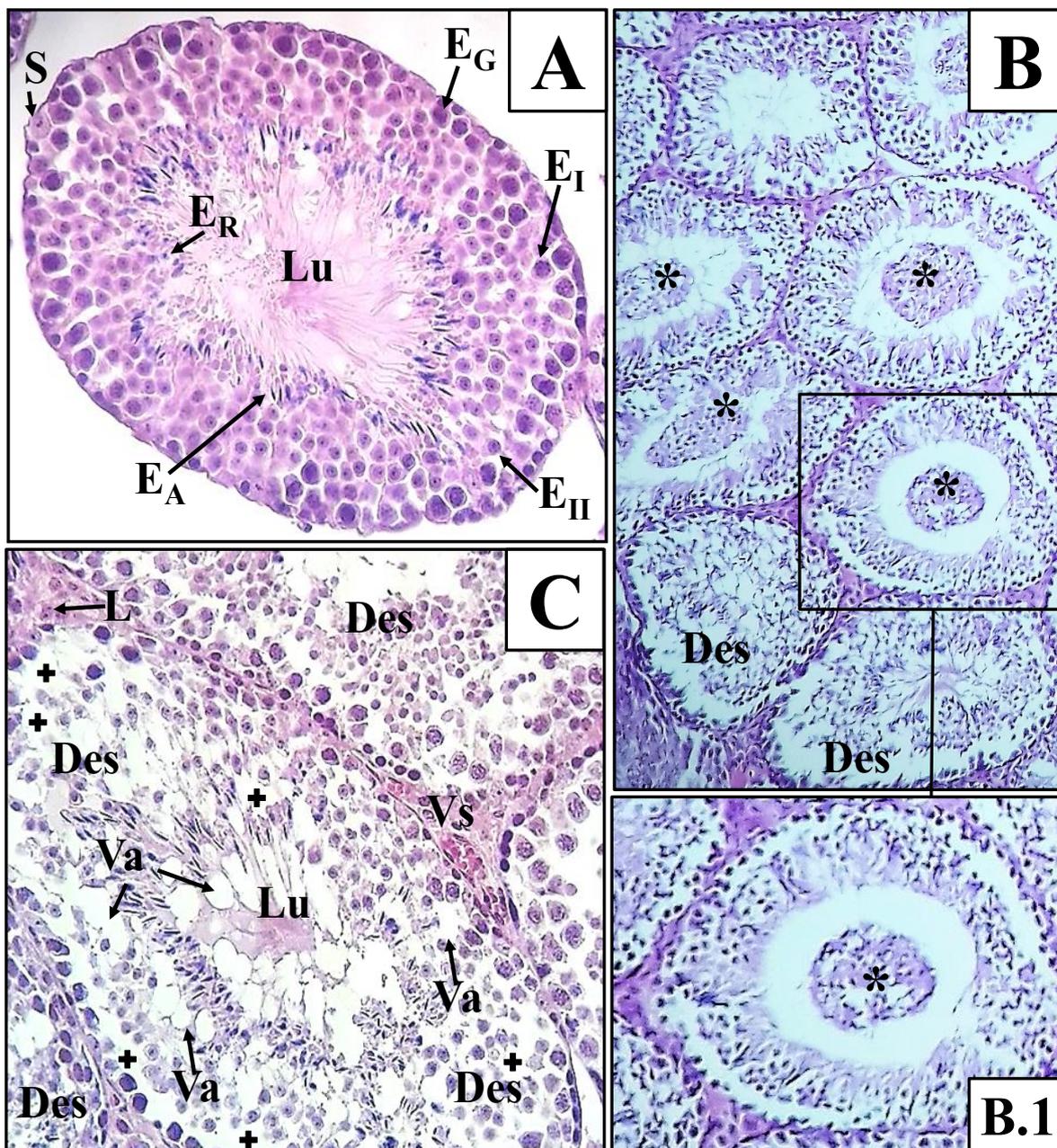


Figura 10. Fotomicrografias representativas de túbulos seminíferos de machos de camundongos Swiss expostos ou não ao contato direto com efluente de curtume. (A) grupo controle; (B) grupo efluente E5; (B.1) ampliação de um túbulo seminífero contendo descamação de células germinativas no lúmen; (C) grupo E100. Des: epitélio germinativo desorganizado; Va: vacúolo; Lu: lúmen; EA: espermátide alongada; ER: espermátide redonda; EG: espermatogônia; S: célula de Sertoli; L: célula de Leydig; *: descamação de células germinativas no lúmen; Vs: vaso sanguíneo; +: espaços intercelulares. E5: grupo efluente de curtume a 5 % e E100 grupo efluente de curtume (100 %). Coloração HE.

Os resultados do presente estudo sugerem que as alterações histopatológicas observadas nos túbulos seminíferos podem ser associadas ao estabelecimento de um processo inflamatório nos testículos dos animais expostos ao EC (grupos E5 e E100), devido ao aumento da concentração das citocinas pró-inflamatórias IFN-gamma e CCL2 (Figura 11A-

B). Além disso, os animais expostos ao EC também apresentaram infiltrado de células mononucleares nos espaços intertubulares (Figura 11C), os quais não foram observados nos animais do grupo controle. Tais infiltrados apresentam características compatíveis com uma inflamação inespecífica (de grau leve-moderado), multifocal, intertubular e de causa desconhecida (Figura 11C). Além disso, a diminuição do número total de neutrófilos e monócitos no sangue periférico (Tabela 3 – vide “Material Suplementar”) dos animais expostos ao EC sinaliza para possível migração dessas células para os focos testiculares. Adicionalmente observamos um quadro sugestivo de amiloidose testicular nos animais submetidos a EC, o qual consiste de acúmulo extracelular de material homogêneo, eosinófilo e amorfo no interstício (Figura 11C) e que está diretamente relacionado com o aumento do processo inflamatório local, conforme reportado por Gonzales et al. (1983).

Arriscamos especular que o processo inflamatório sugerido anteriormente possa estar ligado à inabilidade das células de Sertoli em formar uma barreira hemato-testicular eficiente ou à desestruturação das especializações juncionais (i.e.: ectoplasmáticas). Tal desestruturação pode ter sido ocasionada por ação direta de produtos das reações de estresse oxidativo ocasionadas pelos xenobióticos do EC [o qual apresenta potencial para provocar esse tipo de efeito – Estrela et al. (2017) e Rabelo et al. (2017)], bem como pela alteração de componentes bioquímicos e moleculares que medeiam a estruturação/formação da barreira hemato-testicular. Esses eventos estariam, portanto, interferindo na função da barreira hemato-testicular em segregar mecanicamente os autoantígenos de células germinais, permitindo seu extravasamento no espaço intersticial, levando às cascatas de sinalização celular responsáveis pela atração de células mononucleares do sangue periféricos para os focos inflamatórios. Danos estruturais na barreira hemato-testicular de roedores expostos a constituintes abundantes identificados no EC, avaliados isoladamente, reforçam esse pressuposto [ftalato: Yao et al. (2010) e Shen et al. (2017); cromo: Carette et al., 2013; chumbo e arsênio: Ramos-Treviño et al. (2017)].

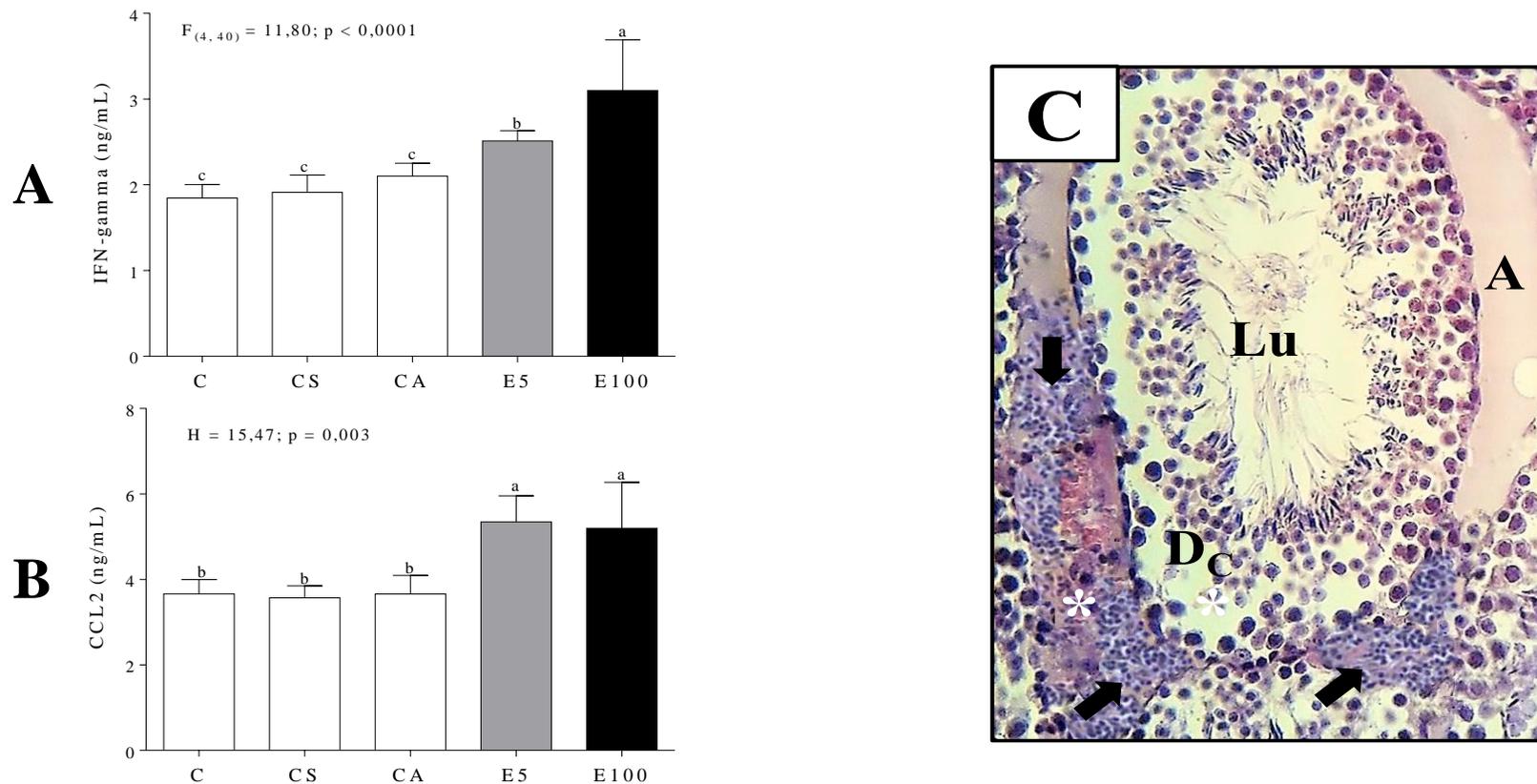


Figura 11. Concentrações das citocinas pró-inflamatórias (IFN-gamma) (A) e CCL2 (B) nos testículos de camundongos machos Swiss expostos ou não ao contato direto com efluente de curtume. (C) Fotomicrografia representativa dos testículos que apresentaram infiltrados inflamatórios (setas), coloração HE. As barras representam a média + desvio padrão (n=15/grupo). Os dados paramétricos foram submetidos ao one-way ANOVA (sendo que as múltiplas comparações foram realizadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade) e os não-paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis (sendo que as múltiplas comparações foram realizadas pelo teste de Dunn's, a 5% de probabilidade). As letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas. C: grupo controle; CS: grupo controle seco; CA: grupo controle água; E5: grupo efluente de curtume a 5% e E100 grupo efluente de curtume (100 %). D_C: descamação do epitélio germinativo; Lu: lúmen.

Por fim, observamos que a exposição ao EC afetou a performance reprodutiva dos animais. Apesar do índice de fertilidade não ter diferenciado entre os diferentes grupos [(C: 80 %; CS: 80 %; CA: 80 %; E5: 90 % e E100: 80 % ($\chi^2 = 5,420$; $p = 0,246$)], as fêmeas acasaladas com os machos expostos ao EC apresentaram menor número de implantações fetais (Figura 13A), maior taxa de perdas pós-implantação (Figura 13B) e maior número de reabsorções (Figura 13C). Além disso, a frequência de dominante letal foi maior nos grupos E5 e E100 (Figura 13D). O prejuízo observado no desenvolvimento fetal e as perdas embrionárias pós-implantação, podem ser entendidos, conforme Maxwell & Newell (1973), como resultantes de uma mutação letal que ocorreu no material genético dos espermatozoides dos animais expostos a EC e que foi transmitida à sua prole. Alguns dos prejuízos observados podem ser visualizados na Figura 14.

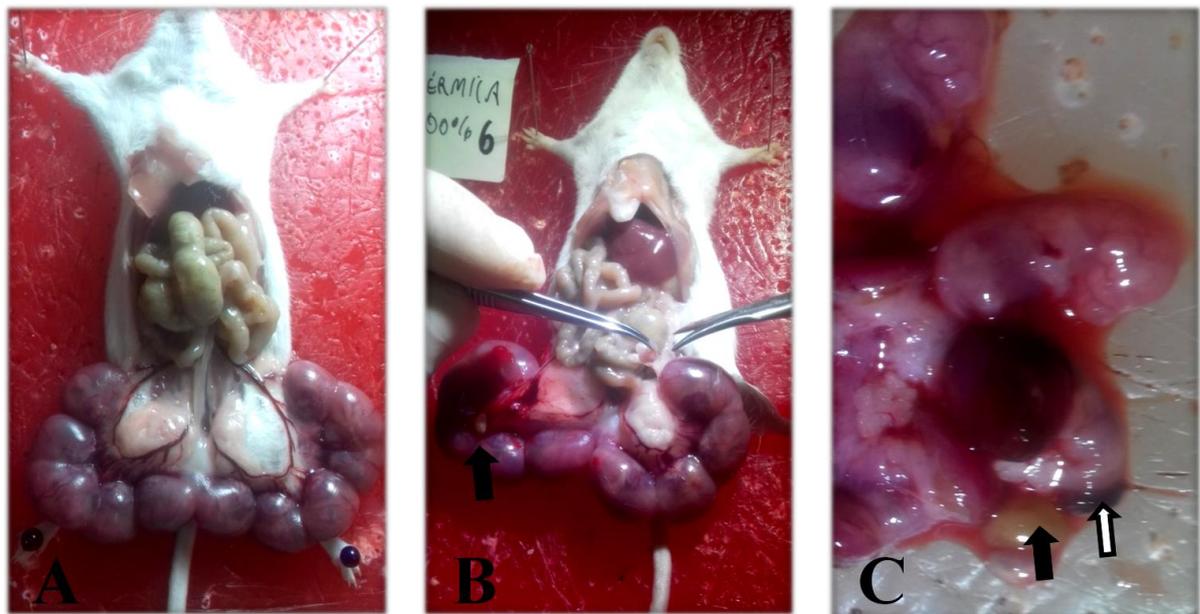


Figura 12. Fotos representativa das variáveis encontradas e contabilizadas nos diferentes grupos experimentais, (A) controle, sem alterações visíveis, (B) E100, apresenta má formação, (C) E100, setas pretas indicam má-formações e setas brancas indica reabsorção.

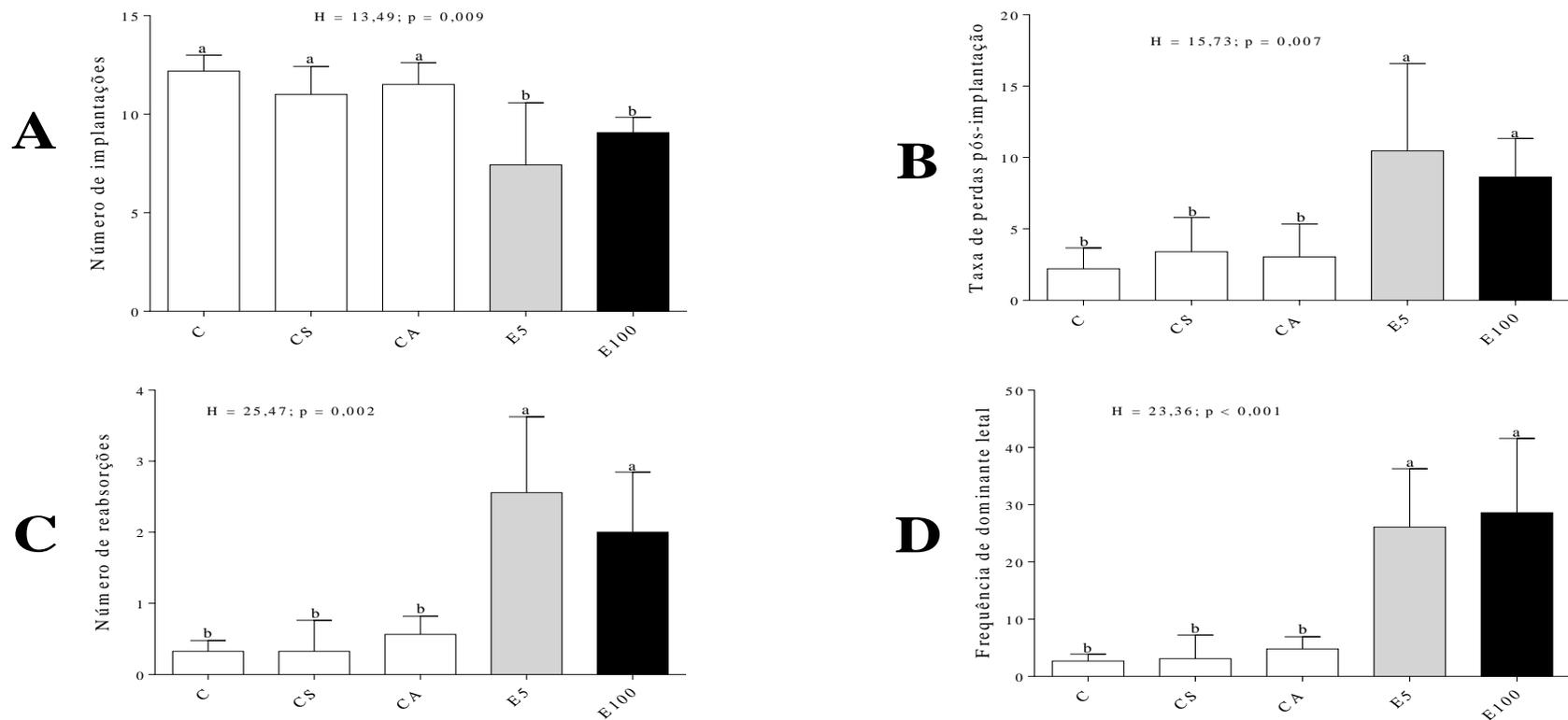


Figura 13. (A) Número de implantações fetais, (B) taxa de perdas pós-implantação, (C) número de reabsorções e (D) frequência de dominante letal obtidos a partir do acasalamento de camundongos machos Swiss expostos ou não ao contato direto com efluente de curtume com fêmeas não expostas ao contaminante. As barras representam a média + desvio padrão (n=15/grupo). Os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, sendo que as múltiplas comparações foram realizadas pelo teste de Dunn's, a 5% de probabilidade. As letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas. C: grupo controle; CS: grupo controle seco; CA: grupo controle água; E5: grupo efluente de curtume a 5% e E100 grupo efluente de curtume (100%).

Nesse caso, é provável que as mortes zigóticas e fetais ocorreram devido à mudanças ou rearranjos cromossômicos ocorridos durante o processo espermatogênico causadas pelos xenobióticos contidos no EC. Além disso, as anormalidades morfológicas e de motilidade observadas nos espermatozoides dos animais expostos ao EC (Figuras 7 e 8) fortalece a relação entre esses efeitos e o aumento da ocorrência de prováveis mutações letais dominantes, culminando no déficit reprodutivo dos animais. Nesse sentido, nossos dados complementam achados anteriores que evidenciaram alterações neurocomportamentais na prole de genitores submetidos à ingestão de água contendo EC (Guimarães et al., 2016a), demonstrando pioneiramente que este poluente também pode causar prejuízos pré-natais na prole de machos de camundongos submetidos dermicamente aos xenobióticos deste efluente.

Por fim, é importante ponderar que as alterações biológicas que impactam o sistema reprodutor são complexas, não se restringindo a determinados mecanismos bioquímicos ou moleculares, especialmente quando os animais são expostos a poluentes não convencionais como o EC, constituído de uma mistura complexa de produtos químicos de efeitos tóxicos já conhecidos e outros cuja toxicidade ainda não foi descrita, Bharagava et al. (2017). Conforme discutido por Guillette et al. (2001), os contaminantes podem agir no sistema reprodutor como agonistas ou antagonistas de receptores hormonais, estimular ou inibir a síntese e/ou liberação de hormônios inibitórios ou estimulantes da hipófise ou hipotálamo, provocar alterações hepáticas relacionadas com processos de biotransformação enzimática de hormônios, bem como alterar a concentração ou o funcionamento de proteínas ligantes presentes no plasma sanguíneo, modificando as concentrações séricas de distintos hormônios, dentre outros. Merece também chamar atenção para a complexidade química do EC que utilizamos. A presença no EC de componentes orgânicos e inorgânicos de conhecida toxicidade, além de compostos nunca antes estudados (isoladamente – Tabelas 1 e 2 – vide “Material Suplementar”), permite que especulemos uma gama de possibilidades que podem elucidar o aparecimento dos efeitos prejudiciais observados no presente estudo.

4. CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso estudo confirma a hipótese de que o contato direto com EC causa impactos comportamentais, histopatológicos e na performance reprodutiva de machos de camundongos Swiss, permitindo-nos inferir que esse poluente pode provocar alterações importantes na dinâmica das populações de pequenos mamíferos que vivem em áreas

próximas a indústrias curtumeiras. O conjunto de alterações que evidenciamos sugere fortemente que os variados xenobióticos contidos no EC podem ter agido isolada, sinérgica ou aditivamente nos sistemas biológicos dos animais, causando desregulações endócrinas, neurológicas, bioquímicas, moleculares e/ou mutagênicas que, em longo prazo, pode levar ao declínio da fertilidade dos animais. Nesse sentido, os resultados reportados em nosso estudo revelam apenas a “ponta do iceberg” que representa os prejuízos que a exposição ao EC pode ocasionar sobre a biota terrestre, além de demonstrar que novas investigações devem ser desenvolvidas para que possamos compreender melhor a magnitude do impacto que esse poluente pode ocasionar nos ecossistemas.

5. REFERÊNCIAS

- Aber S, Salari D, Parsa MR. Employing the Taguchi method to obtain the optimum conditions of coagulation–flocculation process in tannery wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*. 162, 1, 127-134, 2010.
- Agrawal A, Kumar V, Pandey BD. Remediation options for the treatment of electroplating and leather tanning effluent containing chromium. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review*. 27, 2, 99-130, 2006.
- Almeida SF, Rabelo LM, Souza JM, Ferreira RO, Guimarães ATB, Pereira CCO, Malafaia G. Behavioral changes in female Swiss mice exposed to tannery effluents. *Revista Ambiente & Água*. 11, 3, 519-534, 2016.
- American Public Health Association (APHA). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20. ed. New York: APHA, AWWA, WPCR, 1194, 1997.
- Andresen ELLEN. Ecological roles of mammals: the case of seed dispersal. *Conservation Biology Series-Cambridge*. 11-26, 2000.
- Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J Neurotrauma*. 23, 635-659, 2006.
- Batty J. Acute changes in plasma testosterone levels and their relation to measures of sexual behaviour in the male house mouse (*Mus musculus*). *Animal Behaviour*. 26, 349-357, 1978.
- Behmer AO, Tolosa EMC, Freitas NAG. Manual de técnicas para histologia e patologia. São Paulo: EUSPE, 1976.
- Bharagava RN, Saxena G, Mulla SI, Patel DK. Characterization and Identification of Recalcitrant Organic Pollutants (ROPs) in Tannery Wastewater and Its Phytotoxicity

Evaluation for Environmental Safety. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1-14, 2017.

Boekelheide, K. Mechanisms of toxic damage to spermatogenesis. *JNCI Monographs*, 34, 6-8, 2005.

Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA. Mouse estrous cycle identification tool and images. *Plos ONE*. 7, 4, e35538, 2012.

Calheiros CS, Rangel OSSA, Castro MLP. Constructed wetland systems vegetated with different plants applied to the treatment of tannery wastewater. *Water research*. 41, 8, 1790-1798, 2007.

Carette D1, Perrard MH, Prisant N, Gilleron J, Pointis G, Segretain D, Durand P. Hexavalent chromium at low concentration alters Sertoli cell barrier and connexin 43 gap junction but not claudin-11 and N-cadherin in the rat seminiferous tubule culture model. *Toxicology Applied Pharmacology*. 268, 1, 27-36, 2013.

Carvalho FAR. Morfologia e morfometria testicular de camundongos adultos submetidos a exposição crônica ao arsenato. 2009.

Cerqueira R, Brant A, Nascimento MT, Pardini R. Fragmentação: alguns conceitos. Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas. Brasília: MMA/SBF, 23-40, 2003.

Costa KCS. Histomorfometria testicular e processo espermatogênico do morcego *Artibeus planirostris* (*Chiroptera: Phyllostomidae*) (Master's thesis, Brasil), 2016.

Dai D, Cao Y, Falls G, Levi PE, Hodgson E, Rose RL. Modulation of Mouse P450 Isoforms CYP1A2, CYP2B10, CYP2E1, and CYP3A by the Environmental Chemicals Mirex, 2,2-Bis(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroethylene, Vinclozolin, and Flutamide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 70, 3, 127-141, 2001.

Ehling UH, Machemer L, Buselmaier W, Dýcka J, Frohberg H, Kratochvilova J, Lang R, Müller D, Peh J, Röhrborn G, Roll R, Schulze-Schncking M, Wiemann H. Standard protocol for the dominant lethal test on male mice set up by the work group “dominant lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics”. *Archives of Toxicology*. 39,3, 173-185, 1978.

Estrela CD, Guimarães ATB, Carvalho LC, Malafaia G. Short-term malnutrition in Wistar rats. *Scientia Plena*. 10,7, 2014.

Estrela DC, Silva WAM, Guimarães ATB, Mendes BO, Castro ALS, Torres ILS, Malafaia G. Predictive behaviors for anxiety and depression in female Wistar rats subjected to cafeteria diet and stress. *Physiology & behavior*. 151, 252-263, 2015.

Estrela FN, Rabelo LM, Vaz BG, Costa DRO, Pereira I, Rodrigues ASL, Malafaia G. Short-term social memory deficits in adult female mice exposed to tannery effluent and possible mechanism of action. *Chemosphere*, 184, 148-158, 2017.

Ferreira RO, Guimarães ATB, Silva BC, Silva WAM, Mendes BO, Rodrigues ASL, Malafaia G. Análise de Toxicidade Aguda e determinação da dose letal mediana (DL50) de efluentes de curtume em camundongos Swiss. *Multi-Science Journal*. 1, 3, 83-87, 2015.

Filler R. Methods for evaluation of rat epididymal sperm morphology. *Male reproductive toxicology*. 3A, 334-343, 1993.

Flora SJ. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radical Biology and Medicine*. 51, 2, 257-281, 2011.

Golub MS, Germann SL. Long-term consequences of developmental exposure to aluminum in a suboptimal diet for growth and behavior of Swiss Webster mice. *Neurotoxicology and teratology*. 23,4, 365-372, 2001.

Gonzales JL, Gallego E, Castaño M, Rueda A. testicular amyloidosis in hamsters experimentally infected with *Leishmania donovani*. *British Journal of Experimental Pathology*. 64, 518-523, 1983.

Griswold MD. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biology of Reproduction*. 52, 211-216, 1995.

Guillette LJ, Gunderson MP. Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine-disrupting contaminants. *Reproduction*. 122, 857-864, 2001.

Guimarães ATB, Ferreira RO, Rabelo LM, Silva BC, Souza JM, Silva WAM, Menezes IPP, Rodrigues ASL, Vaz BG, Costa DRO, Pereira I, Silva AR, Malafaia G. The C57BL/6J mice offspring originated from a parental generation exposed to tannery effluents shows object recognition deficits. *Chemosphere*. 164, 593-602, 2016a.

Guimarães ATB, Ferreira RO, Rodrigues ASL, Malafaia G. Memory and depressive effect on male and female Swiss mice exposed to tannery effluent. *Neurotoxicology and Teratology*. 61, 123-127, 2017.

Guimarães ATB, Ferreira RO, Silva WAM, Castro ALS, Malafaia G. Parental exposure to tannery effluent cause anxiety-and depression-like behaviors in mice offspring. *JSM Anxiety Depression*. 1, 1, 1005, 2016b.

Haider SG. Cell biology of Leydig cells in the testis. *International Review of Cytology*. 233, 181-241, 2004.

Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *Journal of Science Communication*. 163, 51–59, 2010.

Hogue CL. *Latin American Insects and Entomology*. University of California Press, California, 1993.

Hopkins WA, Mendonça MT, Congdon JD. Increased circulating levels of testosterone and corticosterone in Southern toads, *Bufo terrestris*, exposed to coal combustion waste. *General and Comparative Endocrinology*. 108, 2, 237-246, 1997.

Hu J, Xiao Z, Zhou R, Deng W, Wang M, Ma S. Ecological utilization of leather tannery waste with circular economy model. *Journal of Cleaner Production*. 19, 2, 221-228, 2011.

Hull EM, Dominguez JM. Sexual behavior in male rodents. *Hormones and behavior*. 52, 1, 45-55, 2007.

Johnson L, Thompson DLJ, Varner DD. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Animal Reproduction Science*. 105, 23-51, 2008.

Joseph, K, Nithya N. Material flows in the life cycle of leather. *Journal of Cleaner Production*. 17, 7, 676-682, 2009.

Kerley GIH. Diet of small mammals from the Karoo. South Africa. *South African Journal of Wildlife Research-24-month delayed open access*. 19, 2, 67-72, 1989.

Kopera IA, Bilinska B, Cheng CY, Mruk DD. Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 365, 1546-1593, 2010.

Kumar V, Majumdar C, Roy P. Effects of endocrine disrupting chemicals from leather industry effluents on male reproductive system. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 111, 3: 208-216, 2008.

Ljungvall K, Karlsson P, Hultén F, Madej A, Norrgren L, Einarsson S, Rodriguez-Martinez H, Magnusson U. Effects on the hypothalamic-pituitary-testis axis by Di(2-ethylhexyl) phthalate or oestradiol benzoate in the prepubertal boar. *Theriogenology*. 64, 5, 1170-1184, 2005.

Llobet JM, Colomina MT, Sirvent JJ, Domingo JL, Corbella J. Reproductive toxicology of aluminum in male mice. *Toxicological Sciences*. 25, 1, 45-51, 1995.

Luna LG. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 1968.

Maxwell WA, Newell GW. Considerations for evaluating chemical mutagenicity to germinal cells. *Environmental Health Perspectives*. 6, 47, 1973.

Mendes OB, Rabelo LM, Silva BC, Souza JM, Castro ALS, Silva AR, Malafaia, G. Mice exposure to tannery effluents changes their olfactory capacity, and their response to predators and to the inhibitory avoidance test. *Environmental Science and Pollution Research*. 24, 23, 19234-19248, 2017.

Mendis-Handagama SM. Luteinizing hormone on Leydig cell structure and function. *Histology and Histopathology*. 12, 3, 869-882, 1997.

Mihalca AD, Sándor AD. The role of rodents in the ecology of *Ixodes ricinus* and associated pathogens in Central and Eastern Europe. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 3, 56, 2013.

Ministério do Meio Ambiente, disponível em <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>, acesso: 02, dezembro, 2017.

Mittregger JRH, Silva J, Arenzonc A, Portelac CS, Ferreira ICFS, Henriques JAP. Evaluation of genotoxicity and toxicity of water and sediment samples from a Brazilian stream influenced by tannery industries. *Chemosphere*. 67, 6, 1211-1217, 2007.

Moore MD. Circadian rhythms: basic neurobiology and clinical applications. *Annual Review Medicine*. 48, 1, 253-266, 1997.

Moysés FS, Bertoldi K, Elsner VR, Cechinel LR, Basso C, Stülz S, Siqueira IR. Effect of tannery effluent on oxidative status of brain structures and liver of rodents. *Environmental Science and Pollution Research*. 24, 15689–15699, 2017.

Moysés FS, Bertoldi K, Spindler C, Sanches EF, Elsner VR, Rodrigues MAS, Siqueira IR. Exposition to tannery wastewater did not alter behavioral and biochemical parameters in Wistar rats. *Physiology & Behavior*. 129, 160-166, 2014.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GA, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 403, 6772, 853-858, 2000.

Oliveira RJ, Pasarini JR, Salles MJS, Kanoo TYN, Lourenço ACS, Leite VS, Silva AF, Matiazi HJ, Ribeiro LR, Mantovani MS. Effects of β -glucan polysaccharide revealed by the

dominant lethal assay and micronucleus assays, and reproductive performance of male mice exposed to cyclophosphamide. *Genetics and Molecular Biology*. 37, 1, 111-119, 2014.

Olney JW, Sharpe LG. Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science*. 166, 3903, 386-388, 1969.

Oral R, Meriç S, De Nicola E, Petruzzelli D, Della RC, Pagano G. Multi-species toxicity evaluation of a chromium-based leather tannery wastewater. *Desalination*. 211, 48-57, 2005.

Orth JM. The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology*. 115, 4, 1248-1255, 1984.

Park JH, Bonthuis P, Ding A, Rais S, Rissman EF. Androgen-and estrogen-independent regulation of copulatory behavior following castration in male B6D2F1 mice. *Hormones and Behavior*. 56,2, 254-263, 2009.

Perini AA. A importância da Araucaria angustifolia na dieta de pequenos roedores silvestres em área de floresta com araucária no sul do Brasil. 2010.

Rabelo LM, Guimarães ATB, Souza JM, Silva WAM, Mendes BO, Ferreira RO, Malafaia G. Histological liver changes in Swiss mice caused by tannery effluent. *Environmental Science and Pollution Research*. 1-7, 2017.

Rabelo LM, Silva BCE, Almeida SF, Silva WAM, Mendes BO, Guimarães ATB, Silva AR, Castro ALS, Rodrigues ASL, Malafaia G. Memory deficit in Swiss mice exposed to tannery effluent. *Neurotoxicology and Teratology*. 55, 45-49, 2016.

Ramos VN. Ecologia alimentar de pequenos mamíferos de áreas de cerrado no Sudeste do Brasil. 2007.

Ramos-Treviño J, Bassol-Mayagoitia S, Ruiz-Flores P, Espino-Silva PK, Saucedo-Cárdenas O, Villa-Cedillo SA, Nava-Hernández MP. In Vitro Evaluation of Damage by Heavy Metals in Tight and Gap Junctions of Sertoli Cells. *DNA Cell Biology*. 36, 10, 829-836, 2017.

Ripple WJ, Estes JA, Beschta RL, Wilmers CC, Ritchie EG, Hebblewhite M, Schmitz OJ. Status and ecological effects of the world's largest carnivores. *Science*. 343, 6167, 1241484, 2014.

Rodrigues-Alves PS, Lebrun I, Flório JC, Bernardi MM, Spinosa HDES. Moxidectin interference on sexual behavior, penile erection and hypothalamic GABA levels of male rats. *Research in Veterinary Science*. 84, 1, 100-106, 2008.

Russell LD, Griswold,MD. The Sertoli Cell. Clearwater, 1993.

Russell LD, Ren HP, Hikim IS, Schulze W, Hikim APS. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *Developmental Dynamics*. 188, 1, 21-30, 1990.

Russell LD. Sertoli-germ cells interrelations: a review. *Molecular Reproduction & Development*. 3, 2, 179-202, 1980.

Sabumon PC. "Perspectives on biological treatment of tannery effluent", *Advances in Recycling & Waste Management*. 1, 3-10, 2016.

Sangalang GB, Freeman HC. Effects of sublethal cadmium on maturation and testosterone and 11-ketotestosterone production in vivo in brook trout. *Biology of Reproduction*. 11, 4, 429-435, 1974.

Schanbacher BD, Lunstra DD. Seasonal changes in sexual activity and serum levels of LH and testosterone in Finish Landrace and Suffolk rams. *Journal of Animal Science*. 43, 3, 644-650, 1976.

Sharpe RM, Mckinnell C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*. 25, 769-784, 2003.

Shen LJ, Tang XL, Long CL, Cao XN, Wei Y, Wang YC, Sun M, Zhou Y, Liu Y, Liu B, Huang FY, Wei GH. Effect of Di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure on blood-testis barrier integrity in rats. *Journal of Southern Medical University*. 37, 9, 1178-1182, 2017.

Shima Y, Miyabayashi K, Haraguchi S, Arakawa T, Otake H, Baba T, Matsuzaki S, Shishido Y, Akiyama H, Tachibana T, Tsutsui K, Morohashi K. Contribution of Leydig and Sertoli cells to testosterone production in mouse fetal testes. *Molecular Endocrinology*. 27, 63-73, 2013.

Silva AR, Silva LDM, Chirinéa VH, Souza FFD, Lopes M D, Cardoso RCS. Evaluation of Fertilizing Potential of Frozen-thawed dog Spermatozoa Diluted in ACP-106® using an In Vitro Sperm-Oocyte Interaction Assay. *Reproduction in Domestic Animals*. 42,1, 11-16, 2007.

Siqueira IR, Vanzella C, Bianchetti P, Rodrigues MAS, Stülpe S. Anxiety-like behaviour in mice exposed to tannery wastewater: the effect of photoelectrooxidation treatment. *Neurotoxicology and Teratology*. 33, 481-484, 2011.

Slimen S, Fazaa S, Gharbi N. Oxidative stress and cytotoxic potential of anticholinesterase insecticide, malathion in reproductive toxicology of male adolescent mice after acute exposure. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 17, 7, 522-530, 2014.

Soto AM, Calabro JM, Precht NV, Yau AU, Orlando EF, Daxenberger A, Kolok AS, Guillette JL, Bizac BL, Lange IG, Sonnenschein C. Androgenic and estrogenic activity in water bodies receiving cattle feedlot effluent in Eastern Nebraska, USA, *Environmental Health Perspectives*. 112, 346–352, 2004.

Souza JM, Guimarães ATB, Silva WAM, Mendes BDO, Estrela DC, Rodrigues ASL, Malafaia G. Histopathological assessment of C57Bl/J mice organs exposed to tannery effluents. *Revista Ambiente & Água*. 11, 1, 24-34, 2016c.

Souza JM, Guimarães ATB, Silva WAM, Pereira CCO, Menezes IPP, Malafaia G. Tannery effluent effects on vertebrates: lessons from experimental animals. *International Journal of Current Research*. 8, 10, 39902-39914, 2016a.

Souza JM, Silva WAM, Mendes BO, Guimarães ATB, Almeida SF, Estrela DC, Silva AR, Rodrigues ASL, Malafaia G. Neurobehavioral evaluation of C57Bl/6j mice submitted to tannery effluents intake. *JSM Anxiety and Depression*. 1, 1-10, 2016b.

Souza JM, Silva WAM, Mendes BO, Guimarães ATB, Rodrigues ASL, Montalvão MF, Malafaia G. Inbred mice strain shows neurobehavioral changes when exposed to tannery effluent. *Environmental Science and Pollution Research*. 24, 2, 2035-2046, 2017.

Sunyer P, Muñoz A, Bonal R, Espelta JM. The ecology of seed dispersal by small rodents: a role for predator and conspecific scents. *Functional Ecology*. 27,6, 1313-1321, 2013.

Tardif AL, Farrell PB, Trouern-Trend V, Simkin ME, Foote RH. Use of Hoechst 33342 Stain to Evaluate Live Fresh and Frozen Bull Sperm by Computer-Assisted Analysis. *Journal of andrology*. 19, 2, 201-206, 1998.

Verma HP, Singh SK. Effect of aqueous leaf extract of *Dalbergia sissoo Roxb.* on spermatogenesis and fertility in male mice. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care*. 19, 475-486, 2014.

Walker WH, Cheng J. FHS and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*. 130, 15-28, 2005.

Wyrobek AJ, Bruce WR. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences EUA*. 72, 11, 4425-4429, 1975.

Xia W, Wong CH, Lee NP, Lee WM, Cheng CY. Disruption of Sertoli-germ cell adhesion function in the seminiferous epithelium of the rat testis can be limited to adherens junctions without affecting the blood–testis barrier integrity: An in vivo study using an androgen suppression model. *Journal of Cellular Physiology*. 205, 1, 141-157, 2005.

Yao PL, Lin YC, Richburg JH. Mono-(2-Ethylhexyl) Phthalate-Induced Disruption of Junctional Complexes in the Seminiferous Epithelium of the Rodent Testis Is Mediated by MMP2. *Biology of Reproduction*. 82, 3, 516-527, 2010.

Zorzetto JC. "Avaliação dos efeitos da inalação crônica de cocaína crack na espermatogênese de camundongos." Universidade de São Paulo (2007).

MATERIAL SUPLEMENTAR

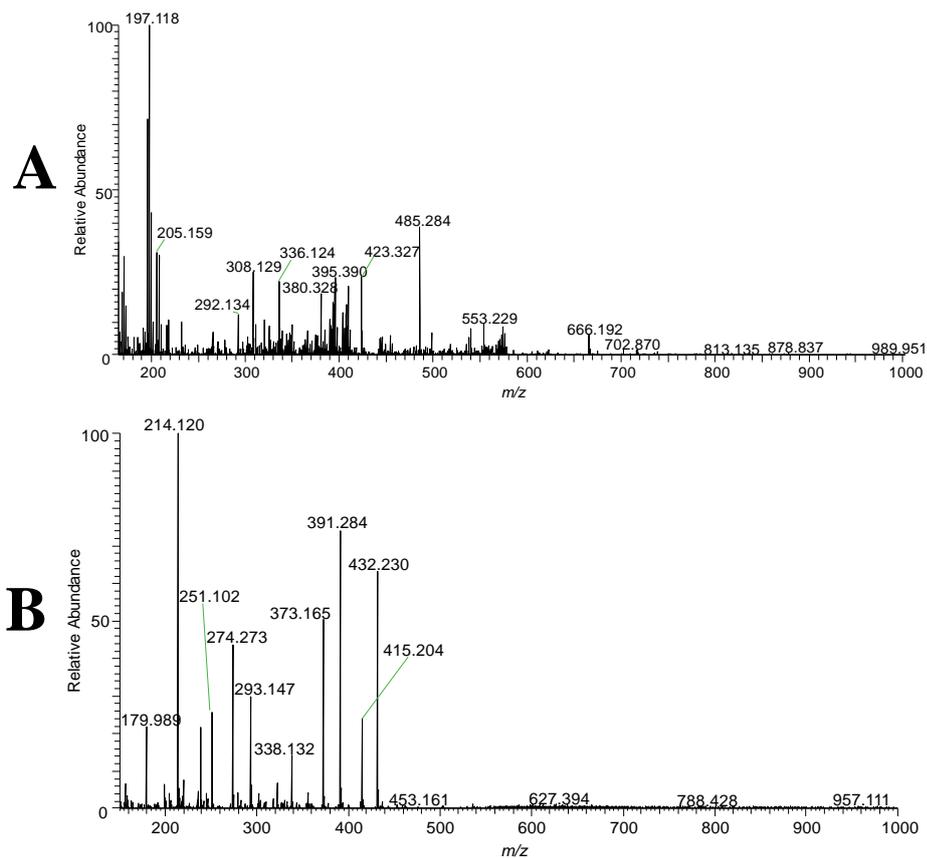


Figura 1. (A) Espectro de massa de efluente de curtume bruto medido através de Ionização por eletro-pulverização (-) Orbitrap MS e (B) Ionização por eletro-pulverização (+) Orbitrap MS.

Tabela 1. Compostos orgânicos identificados no efluente de curtume utilizados no presente estudo.

ID	<i>m/z</i>	Erro (ppm)	RDB ^a	Fórmula Molecular	Nomes dos compostos
IEP (-) Orbitrap MS					
1	197,11803	-1,461	3,5	C ₁₁ H ₁₇ O ₃	5-Cyclohexyl-5-oxopentanoic acid
2	205,15999	0,982	4,5	C ₁₄ H ₂₁ O	2,6-Di-tert-butylphenol
3	292,13458	0,950	11,5	C ₁₉ H ₁₈ NO ₂	1-benzoyl-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydro-6-quinolinol
4	308,12958	1,178	11,5	C ₁₉ H ₁₈ NO ₃	(S)-3-Hydroxy-pyrrolidine-1-carboxylic acid 9H-fluoren-9-ylmethyl ester
5	336,12433	0,590	12,5	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	(2S)-1-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)pyrrolidine-2-carboxylic acid
6	380,32878	1,390	3,5	C ₂₂ H ₄₂ N ₃ O ₂	4,4'-[1-(4-piperidyl)propane-1,3-diyl]bis(piperidine-1-ethanol)
7	395,39001	1,406	1,5	C ₂₆ H ₅₁ O ₂	Cerotic acid
8	423,32705	0,463	8,5	C ₂₉ H ₄₃ O ₂	4,4'-Methylenebis[2,6-bis(1,1-dimethylethyl)phenol]
9	485,28424	-0,200	9,5	C ₂₈ H ₄₁ N ₂ O ₃ S	1,2-Naphthalenediol, 5,6,7,8-tetrahydro-6-[[6-[[2-[(2-methoxyphenyl)thio]ethyl]amino]hexyl]propylamino]
10	553,22937	0,579	9,5	C ₂₇ H ₃₇ O ₁₂	1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, 2,2',2''-(1,2,3-propanetriyl)ester
11	666,19287	0,989	31,5	C ₄₄ H ₂₈ NO ₆	N-[3'-Hydroxy-6'-(1-naphthylmethoxy)-3-oxo-3H-spiro [2-benzofuran-1,9'-xanthen]-5-yl]-4-biphenylcarboxamid
IEP (+) Orbitrap MS					
12	214,12059	1,657	4,5	C ₁₂ H ₁₇ NONa	Diethyl toluamide
13	251,10241	-0,890	6,5	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₄	Ethyl 6-(2-furyl)-2-hydroxy-4-methyl-1,6-dihydropyrimidine-5-carboxylate
14	274,27359	-1,698	-0,5	C ₁₆ H ₃₆ NO ₂	N-Lauryldiethanolamine
15	293,14761	1,472	3,5	C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O ₄ Na	Ethyl 1-(4-morpholinylcarbonyl)-4-piperidinecarboxylate
16	338,13248	0,661	4,5	C ₁₃ H ₂₁ N ₃ O ₆ Na	N-{3-[(tert-butoxy)carbonylamino]propyl}(2,5-dioxoazolidinyloxy) carboxamide
17	373,16501	1,193	9,5	C ₂₁ H ₂₅ O ₆	Tetrahydrocurcumin

18	391,28418	-0,271	5,5	C ₂₄ H ₃₉ O ₄	Diocetyl phthalate (plasticizer contaminant)
19	415,20471	-0,674	9,5	C ₂₃ H ₃₁ N ₂ O ₃ S	2-methylpropyl 6-[4-(tert-butyl)phenyl]-8-methyl-4-oxo-5,6-dihydro-2H,3H-pyrimidino[2,1-b]1,3-thiazaperhydroine-7-carboxylate
20	432,23013	0,796	14,5	C ₂₉ H ₃₁ NONa	5-(4-tert-butylphenyl)-2,2-dimethyl-1,3,5,6-tetrahydrobenzo [a]phenanthridin-4-one

Tabela 2. Características físico-químicas e químicas da água, efluente de curtume de 5% e do efluente de curtume bruto utilizado no presente estudo.

Atributos	Efluente de curtume (100%)	Água potável	Efluente de curtume (5%)	Diretrizes da OMS para Qualidade da Água Pótavel ¹	
				Normalmente encontrado em águas superficiais e subterrâneas	Diretriz baseada na saúde pela OMS
pH at 25°C (UpH)	3,93	7,38	5,05	Sem diretriz	6,5 – 8,5
Total de sólidos dissolvidos (mg.L ⁻¹)	43.800,00	73,33	2.259,66	Sem diretriz	Sem diretriz
Turbidez	140,00	2,85	9,71	Sem diretriz	Sem diretriz
Condutividade elétrica	51.900,00	67,20	2.658,84	Sem diretriz	Sem diretriz
Zn (mg.L ⁻¹)	0,50	0,37	0,38	Sem diretriz	3,00
Na (mg.L ⁻¹)	11.235,00	25,59	586,06	< 20,00	200,00
Ca (mg.L ⁻¹)	320,64	6,28	22,00	Sem diretriz	Sem diretriz
Fe (mg.L ⁻¹)	2,90	0,31	0,44	0,5 – 50 mg.L ⁻¹	Sem diretriz
P (mg.L ⁻¹)	1,17	0,14	0,19	Sem diretriz	Sem diretriz
N (mg.L ⁻¹)	6,6	2,43	2,64	Sem diretriz	50,00
K (mg.L ⁻¹)	16,30	7,45	7,89	Sem diretriz	Sem diretriz
S (mg.L ⁻¹)	2.600,00	3,00	132,85	Sem diretriz	Sem diretriz
Cu (mg.L ⁻¹)	0,30	0,35	0,35	Sem diretriz	2,00
Mn (mg.L ⁻¹)	0,10	0,57	0,55	Sem diretriz	0,50
Mg (mg.L ⁻¹)	498,56	1,78	26,62	Sem diretriz	Sem diretriz
Pb (mg.L ⁻¹)	0,025	<0,005	<0,005	Sem diretriz	0,01
As (mg.L ⁻¹)	2,337	<0,005	116,85	Sem diretriz	0,01
Cr (mg.L ⁻¹)	493,00	<0,005	24,65	< 0,002	0,05
Cd (mg.L ⁻¹)	<0,005	<0,005	<0,005	< 0,001	0,003
Ni (mg.L ⁻¹)	0,016	<0,005	<0,005	< 0,02	0,02

Tabela 3. Eritrograma e leucograma de camundongos machos Swiss expostos ou não ao contato direto com efluente de curtume.

Eritrograma	C	CS	CA	E5%	E100%	Estatística
Hemácia (milhões/mm ³)	7,609±1,056	7,929±1,342	7,532±1,498	7,890±0,451	8,196±0,670	H = 6,373; p = 0,173
Hemoglobina (g/dL)	13,09±1,40	13,12±1,96	13,21±2,47	13,41±0,79	13,87±0,78	H = 3,997; p = 0,406
Hematócrito (%)	37,66±3,46	38,93±2,16	38,95±2,73	38,79±2,25	40,78±2,60	H = 7,794; p = 0,099
V.C.M (fL)	48,73±2,84	47,86±1,84	49,13±2,32	49,14±1,92	50,27±2,49	F _(4,70) = 0,7223; p = 0,123
H.C.M (pg)	17,33±1,27	16,68±1,05	17,67±1,17	17,00±0,72	16,95±0,90	F _(4,70) = 1,020; p = 0,106
C.H.C.M (g/dL)	34,79±0,96	34,80±0,63	34,96±0,93	34,83±0,52	34,22±1,00	F _(4,70) = 1,268; p = 0,270
RDW (%)	15,98±2,07	14,80±0,94	15,42±1,00	15,44±0,76	15,51±1,38	H = 6,411; p = 0,170
Leucograma						
Leucócitos Totais (10 ³ /mm ³)	5,356±0,9409	5,611±1,250	5,623±1,445	5,964±1,338	5,908±1,429	F _(4,70) = 0,5461; p = 0,804
Linfócitos (10 ³ /mm ³)	3,755±0,771 ^b	4,196±1,021 ^b	3,892±1,072 ^b	5,572±1,081 ^a	5,627±1,197 ^a	F _(4,70) = 0,4873; p < 0,001
Neutrófilos (10 ³ /mm ³)	0,4083±0,0900 ^a	0,3648±0,1180 ^a	0,3364±0,0504 ^a	0,2105±0,0498 ^b	0,1636±0,0504 ^b	H = 38,40; p < 0,001
Monócitos (10 ³ /mm ³)	0,910±0,324 ^a	1,009±0,422 ^a	0,809±0,361 ^a	0,370±0,154 ^b	0,321±0,157 ^b	H = 39,65; p < 0,001

Legenda: V.C.M.: Volume corpuscular médio; H.C.M.: Hemoglobina corpuscular média; C.H.C.M.: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RDW: Red Cell Distribution Width. C: grupo controle; CS: grupo controle seco; CA: grupo controle água; E5: grupo efluente de curtume a 5% e E100 grupo efluente de curtume (100 %). Os dados paramétricos foram submetidos ao one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey, a 5% de probabilidade e os dados não-paramétricos foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's, também à 5% de probabilidade. Os números indicam a média ± desvio padrão.

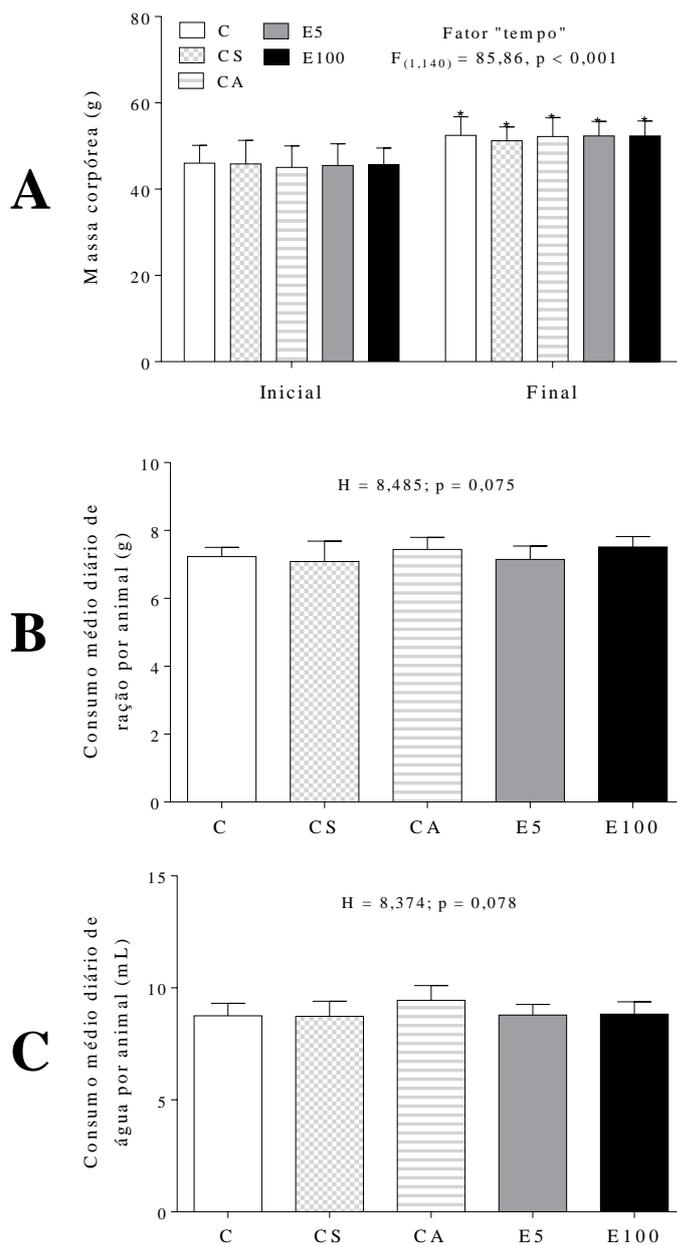


Figura 2. (A) Biomassa corpórea (g); (B) consumo de ração (g) e (C) água (mL) de camundongos machos Swiss expostos ou não ao contato direto com efluente de curtume. As barras representam a média + desvio padrão (n=15/grupo). Em “A” os asteriscos indicam diferença significativa das massas dos animais aferidas no início e ao final do experimento, cujos dados foram submetidos à two-way ANOVA, com pós-teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Em “B e C”, os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, também a 5% de probabilidade. C: grupo controle; CS: grupo controle seco; CA: grupo controle água; E5: grupo efluente de curtume a 5% e E100 grupo efluente de curtume (100 %).

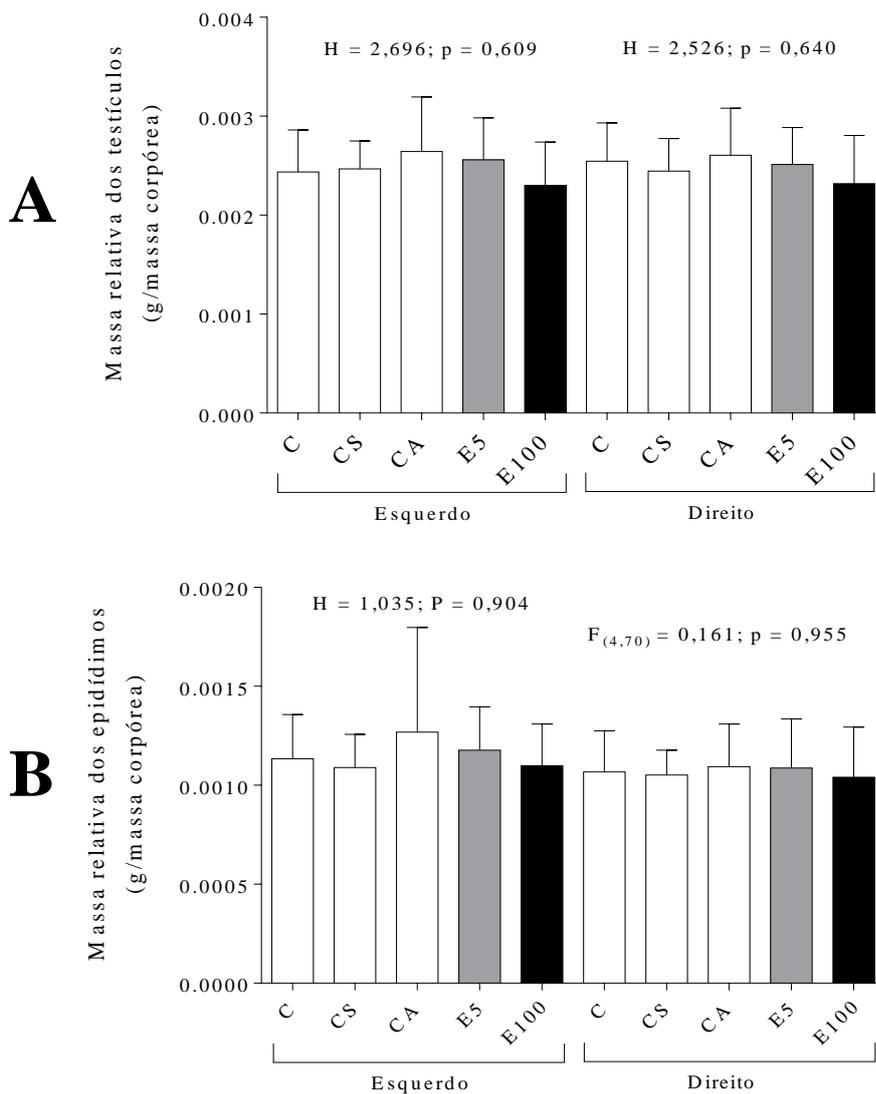


Figura 3. (A) Massa relativa dos testículos e (B) epidídimos de camundongos machos Swiss expostos ou não ao contato direto com efluente de curtume. As barras representam a média + desvio padrão (n=15/grupo). Em “A”, os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade. Em “B”, os dados referentes ao epidídimo esquerdo foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e do epidídimo esquerdo, à one-way ANOVA, também a 5% de probabilidade. C: grupo controle; CS: grupo seco; CA: grupo controle água; E5: grupo efluente de curtume a 5 % e E100 grupo efluente de curtume (100%).

ANEXO I



Ministério da
Educação

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto Intitulado "TOXICOLOGIA REPRODUTIVA DE MACHOS DE CAMUNDONGOS SWISS EXPOSTOS A EFLUENTE DE CURTUME", protocolado sob o CEUA nº 2616170516, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Guilherme Malafala Pinto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Federal Goiano (CEUA/IF Goiano) em reunião de 09/08/2016.

We certify that the proposal "Reproductive toxicology of Swiss mice exposed to tannery effluent", utilizing 270 Heterogenic mice (males and females), protocol number CEUA 2616170516, under the responsibility of **Prof. Dr. Guilherme Malafala Pinto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Goiano Federal Institute (CEUA/IF Goiano) in the meeting of 08/09/2016.

Vigência da Proposta: de 08/2016 a 02/2017

Area: Ciências Biológicas

Procedência: Biotério Central

Espécie: Camundongos heterogênicos

Linhagem: Swiss

Gênero: Machos e Fêmeas

Idade: 3 a 4 meses

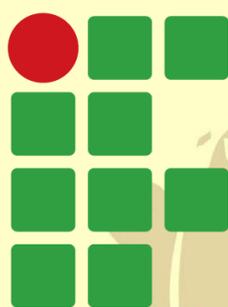
N: 270

Peso: 30 a 45 g

Resumo: Os efluentes de curtume são resíduos gerados em grandes quantidades pelas indústrias curtumeiras. Em função de sua constituição química, tais resíduos tem potencial altamente tóxico. Raros estudos envolvendo os efeitos desses efluentes em mamíferos foram realizados. Questiona-se, por exemplo, sobre como seria o comportamento sexual de camundongos machos expostos à efluente de curtume? A exposição à efluente de curtume seria capaz de afetar a produção e a morfologia de espermatozoides, assim como provocar alterações histopatológica em órgãos do sistema reprodutor dos animais? E por fim, a exposição a esses efluentes causaria toxicidade reprodutiva nos animais, provocando-lhes prejuízos reprodutivos, quando colocados em acasalamento com fêmeas? O quão essas alterações podem ser extrapoladas para espécies de pequenos mamíferos do Cerrado que podem ter contato direto ou indireto com esses resíduos? Nesse sentido, o presente projeto visará responder a essas questões, com o intuito de contribuir com o conhecimento sobre o impacto que o efluente de curtume, descartado incorretamente no ambiente, pode causar em um mamífero terrestre. É importante ponderar que estudos dessa natureza podem subsidiar ações ou medidas em prol da preservação e conservação do Cerrado, considerando que muitas indústrias curtumeiras descartam seus resíduos em ambiente natural, sem qualquer preocupação com o que essa prática pode causar no ambiente e nos organismos.

Goânia, 09 de agosto de 2016

Prof. Ms. Fabricio Carrião dos Santos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Federal Goiano



INSTITUTO FEDERAL

Goiano

Campus
Urutaí

