

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO CLORETO DE
MERCÚRIO (HgCl₂) SOBRE A QUALIDADE E
CAPACIDADE FÉRTIL DE ESPERMATOZOIDES
BOVINOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ELANE FABÍOLA DE SOUSA JERÔNIMO DA SILVA

Uruguaiana

2017

ELANE FABÍOLA DE SOUSA JERÔNIMO DA SILVA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO CLORETO DE MERCÚRIO (HgCl₂) SOBRE A
QUALIDADE E CAPACIDADE FÉRTIL DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS**

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-graduação *Stricto Sensu* em
Bioquímica da Universidade Federal do
Pampa, como requisito parcial para
obtenção do Título de Mestre em
Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Giulia A.
Wiggers Peçanha

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela dos
Santos Brum

Uruguiana

2017

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

S586e SILVA, ELANE FABÍOLA DE SOUSA JERÔNIMO DA
EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO CLORETO DE MERCÚRIO (HgCl₂) SOBRE A
QUALIDADE E CAPACIDADE FÉRTIL DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS /
ELANE FABÍOLA DE SOUSA JERÔNIMO DA SILVA.
84 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2017.

"Orientação: Giulia Alessandra Wiggers".

1. Mercúrio. 2. Toxicologia. 3. Reprodução. 4. Modelo
bovino. 5. Estresse Oxidativo. I. Título.

ELANE FABÍOLA DE SOUSA JERÔNIMO DA SILVA

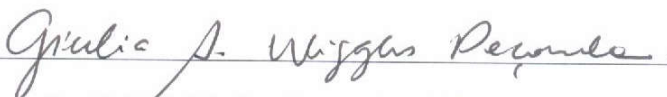
**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO CLORETO DE MERCÚRIO (HgCl₂) SOBRE A
QUALIDADE E CAPACIDADE FÉRTIL DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioprospecção Molecular

Dissertação defendida e aprovada em 14 de dezembro de 2017.

Banca examinadora:



Prof.ª. Dr.ª. Giulia Alessandra Wiggers Peçanha

Presidente / Orientadora

(Universidade Federal do Pampa / UNIPAMPA)



Prof. Dr.ª. Marta Miguel Castro

(Centro de Investigación en Ciencias de la Alimentación – CIAL
Consejo Superior de Investigaciones Científicas - CSIC)



Prof. Dr. Fernando Silveira Mesquita
(Universidade Federal do Pampa / UNIPAMPA)

*Ao meu filho amado Davi, por ser o maior
presente que Deus pode me oferecer nesta
vida.*

*À minha mãe Maria Creusa pelo amor
incondicional, carinho e o total apoio em
todos os momentos da minha vida.*

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Giulia Wiggers e à co-orientadora Prof^a. Dr^a. Daniela Brum, profissionais admiráveis por tudo que realizam, por sempre oferecerem oportunidade de conhecimento e incentivo constante.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, não imagino o que seria de mim sem a Sua presença em tudo que faço. Obrigada Senhor, por ter me sentindo abençoada, amada e protegida por Ti durante toda essa trajetória. Obrigada por colocar em minha vida pessoas dispostas a compartilhar conhecimento, tempo e disponibilidade para me auxiliarem nos momentos que precisei! Que o Senhor possa sempre abençoá-las também!

À minha mãe, que me apoiou desde do início ao fim dessa caminhada, enfrentando medo de viajar de avião sozinha, tendo que encarar temperaturas de frio que não estava habituada, renunciando a compromissos em Fortaleza, sua privacidade e rotina habitual, praticamente sua vida parou, tudo em prol desse meu sonho. Obrigada de coração pelo seu amor e por cuidar do meu pequeno, durante as minhas ausências.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Giulia Wiggers Peçanha, por ter aceitado me orientar, por sempre estimular a busca pelo o conhecimento, por ser incentivadora. Quero te agradecer por todos os ensinamentos, acadêmicos e para a vida, tenha certeza que você me ajudou muito mais que possa imaginar.

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Daniela dos Santos Brum, obrigada por ter aceito essa parceria, por ter incentivado e apoiado nos momentos certo, pela sua disponibilidade nesse trabalho, foi decisivo!

Aos professores Dr. Franck Maciel Peçanha, Dr. Fabio Gallas Leivas e Dr. Dalton Vassallo (UFES) pelas suas contribuições, relevantes na construção deste trabalho.

Ao grupo GPFisCar (Giulia, Franck, Caroline, Danize, José, Paola, Alyne, Janaina, Grazielly, Pedro, Verônica, Giovanna, Natália e Marina), muito obrigada pela companhia, partilha de todos os momentos vivenciados no grupo. Existia uma Elane antes do GPFisCar e após o GPFisCar, um divisor de águas. Quero registrar o meu grande carinho e agradecimento especial ao José, Paola, aos IC's Pedro, Verônica, Giovanna, Natália e Marina que foram meus companheiros diretos nesta caminhada. Meu muito obrigada em especial à Carol, nem sei por onde começar, mas agradeço de coração por toda sua colaboração nessa minha trajetória. Como foi maravilhoso conviver com você, ver sua generosidade em compartilhar conhecimento, sua dedicação, sua docilidade e muito entusiasmo.

Ao grupo BIOTECH, sou muito grata pela parceria, principalmente da colega Daniele Missio, pelo seu empenho e dedicação, agradeço também a Hyria, vocês foram determinantes na realização do trabalho! Aos IC's Arlon, as duas Júlias Prestes, a Tainara, meu agradecimento e carinho pelos seus esforços, por estarem ao meu lado nos momentos certos.

Ao colega e mestre seu Antônio, de uma generosidade tremenda, obrigada pela oportunidade de aprender com o senhor.

À Unipampa, ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica (PPGBioquímica), à coordenadora do programa Prof^a Dr^a Daiana Silva de Ávila, como também a todos os professores e colegas que de forma direta ou indireta contribuíram para o meu aprendizado.

À Marciana Demarchi, assistente administrativa do PPGBioquímica, por estar a disposição todas as vezes que precisei. A sua gentileza, gera gentileza!!!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte relevante durante a realização desse trabalho.

Ao grupo Marfrig, por ter disponibilizado material para os experimentos, decisivo para a realização deste estudo.

Aos os professores componentes da banca Dr^a. Marta Miguel Castro e Dr. Fernando Silveira Mesquita por terem aceitado o convite de avaliar esse trabalho.

À funcionária Estela, o seu trabalho foi exemplar e humano, abrilhantava o laboratório com uma palavra amiga e animadora, o que fazia a diferença durante os experimentos ali realizados.

À senhora Ondina e a Maria, pelo carinho e dedicação ao meu filho durante as minhas ausências.

Enfim, gostaria de expressar o meu sentimento de gratidão, a todos os amigos, colegas e profissionais aqui envolvidos. Conforme afirma o escritor Augusto Cury, todas as coisas que o dinheiro compra são baratas, todas as que ele não consegue comprar são verdadeiramente caras, e entre estas a gratidão é uma das mais preciosas...Obrigada!!!!!!!!!!!!!!

*Quando não houver saída. Quando não
houver mais solução. Ainda há de haver saída.
Nenhuma ideia vale uma vida.*

*Quando não houver esperança. Quando não
restar nem ilusão. Ainda há de haver
esperança. Em cada um de nós, algo de uma
criança. Enquanto houver sol, enquanto
houver sol, ainda haverá. Enquanto houver
sol, enquanto houver sol (...)*

Enquanto houver sol - Sergio Britto

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Universidade Federal do Pampa

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO CLORETO DE MERCÚRIO (HgCl₂) SOBRE A QUALIDADE E CAPACIDADE FÉRTIL DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS

Autora: Elane Fabíola de Sousa Jerônimo da Silva
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Giulia Alessandra Wiggers Peçanha
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Daniela dos Santos Brum

Local e Data da defesa: Uruguaiana-RS, 14 de dezembro de 2017.

O Hg é um metal pesado tóxico, bioacumulativo e de preocupação global, uma vez que suas emissões antropogênicas e naturais ainda representam um alto risco para a saúde humana e ambiental. O Hg pode ocasionar comprometimento da fertilidade masculina, entretanto a maioria dos estudos avaliaram exposição em altas doses. Nesse sentido, os efeitos adversos gerados pelo Hg em baixas doses no sistema reprodutor masculino são pouco elucidados e o uso do modelo bovino, em virtude da grande semelhança ao humano, pode contribuir para essa avaliação toxicológica neste sistema. Assim, este trabalho objetivou investigar os efeitos da exposição de diferentes concentrações ao cloreto mercúrio (HgCl₂) sobre a qualidade e capacidade fértil de espermatozoides bovinos. Palhetas de sêmen de *Bos taurus* foram descongeladas, os espermatozoides selecionados por gradientes descontínuos de Percoll® (4x10⁶ espermatozoides/mL) e divididos em: Controle (sem exposição a HgCl₂); Hg8nM; Hg8μM e Hg80μM, incubados por 0,5h, 1h e 2h. Após a exposição, foram analisados parâmetros espermáticos (motilidade, vigor, cinética espermática computadorizada, morfologia, integridade da membrana espermática) e biomarcadores de estresse oxidativo. Para a análise da fecundação *in vitro*, os oócitos bovinos maturados por 24h e, após 18 horas de co-cultivo de oócitos/espermatozoides (2x10⁶ espermatozoides/mL) a taxa de penetração e fertilização total e normal foram avaliadas. A exposição de espermatozoides bovinos a diferentes concentrações de HgCl₂ foi capaz de reduzir a motilidade espermática, aumentar os defeitos menores (Hg80μM), reduzir do número de

espermatozoides normais ($Hg80\mu M$ e $Hg8\mu M$) e afetar a integridade da membrana plasmática ($Hg8\mu M$). Quanto aos biomarcadores bioquímicos avaliados nas doses baixas deste metal, houve aumento das espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica e redução da capacidade antioxidante total em ambas as doses ($Hg8nM$ e $Hg8\mu M$) analisadas. Quanto à fertilização, houve uma redução na taxa de penetração e fertilização total e normal do grupo de Hg com a concentração de $8\mu M$. A exposição de espermatozoides bovinos a baixas concentrações de Hg favorece o aumento do estresse oxidativo que pode desencadear alterações na qualidade espermática e refletir na redução da sua capacidade fértil.

Palavras-Chave: Mercúrio; Toxicologia; Espermatozoide, Modelo bovino; Estresse Oxidativo; Fertilização *in vitro* (FIV).

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Post-Graduate Program in Biochemistry
Federal University of Pampa

EFFECTS OF MERCURY CHLORIDE EXPOSURE ON QUALITY AND FERTILITY CAPACITY OF BOVINE SPERM

Author: Elane Fabíola de Sousa Jerônimo da Silva
Advisor: Prof^ª. Dr^ª. Giulia Alessandra Wiggers Peçanha
Co-advisor: Prof^ª. Dr^ª. Daniela dos Santos Brum

Date and Place of Defense: Uruguaiiana, December 14, 2017

Hg is a toxic heavy metal, bioaccumulative and of global concern, since its anthropogenic and natural emissions still pose a high risk for human and environmental health. Hg may cause impairment of male fertility, however, most studies have evaluated high dose exposure. In this sense, the adverse effects generated by low dose Hg in the male reproductive system are little elucidated and the use of the bovine model, due to the great similarity to the human, can contribute to this toxicological evaluation in this system. The objective of this work was to investigate the effects of mercury chloride (HgCl₂) exposure at different concentrations on bovine spermatozoa and its fertilization capacity. *Bos taurus* semen straws were thawed, spermatozoa selected by discontinuous Percoll® gradients (4x10⁶ sperm/mL) and divided into: Control (without exposure to HgCl₂); Hg8nM; Hg8μM and Hg80μM, incubated for 0.5h, 1h and 2h. After the exposure, sperm parameters (motility, vigor, computerized sperm kinetics, morphology, sperm membrane integrity) and oxidative stress biomarkers were analyzed. For the analysis of in vitro fertilization, bovine oocytes matured for 24h and, after 18 hours of co-culture of oocytes/spermatozoa (2x10⁶ spermatozoa/mL), total and normal penetration and fertilization rates were evaluated. Exposure of bovine spermatozoa at different concentrations of HgCl₂ was able to reduce sperm motility, increase the minors defects (Hg80μM), reduce the number of normal spermatozoa (Hg80μM and Hg8μM) and affect the integrity of the plasma membrane (Hg8μM). Regarding the biochemical biomarkers evaluated in the low doses of this metal, there was an increase in the reactive oxygen species and lipid peroxidation and reduction of the total antioxidant capacity in both doses (Hg8nM and Hg8μM) analyzed. As for

fertilization, there was a reduction in the penetration rate and total and normal fertilization of the Hg group with the concentration of 8 μ M. Exposure of bovine spermatozoa at low concentrations of Hg favors the increase of oxidative stress that can trigger changes in sperm quality and reflect in the reduction of their capacity of IVF.

KEYWORDS: Mercury, Toxicology; Sperm, Bovine model; Oxidative Stress; *in vitro* Fertilization (IVF).

LISTA DE FIGURAS

PARTE I

Figura 1.	Representação do Espermatozoide Humano	30
-----------	--	----

PARTE II

Figure 1.	Effects of mercury at different concentrations on Total Motility and Progressive Motility in bovine sperm. Data are expressed as median (Q1 – Q3), * $p < 0.05$ compared with control (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's)	59
Figure 2.	Effects of mercury at different concentrations on biochemical biomarkers in bovine sperm. A. Reactive oxygen species levels (ROS). Values of ROS, UF: Units of fluorescence. B. Lipid peroxidation measurement. Values of MDA (malondialdehyde). C. Total antioxidant capacity. Values of FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ compared with control (ANOVA followed by Bonferroni test)	60
Figure 3.	Effects of mercury at different concentrations on total penetration and fertilization rate, and normal penetration fertilization for <i>in vitro</i> fertilization. Data are expressed as median (Q1 – Q3), * $p < 0.05$ compared with control (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's)	61

PARTE III

Figura 1.	Experimental design of the study	83
Figura 2.	Espermatozoides após descongelamento de palhetas	84
Figura 3.	Oócitos Maturados	84
Figure 4.	FIV (co-cultivo de espermatozoides e oócitos)	84

LISTA DE TABELAS

PARTE I

Tabela 1.	Limites admissíveis de exposição ao Mercúrio no Meio Ambiente em diferentes países	24
Tabela 2.	Limites Biológicos aceitáveis de exposição ao Mercúrio em diferentes países e órgãos reguladores	26

PARTE II

Table 1.	Effects of mercury at different concentrations on sperm motility and vigor.....	56
Table 2.	Effects of mercury at different concentrations on sperm kinetics evaluated by <i>Sperm Class Analyzes</i> (SCA)	57
Table 3.	Effects of mercury at different concentrations on sperm morphology and sperm membrane integrity	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg - microgramas
 $\mu\text{g/g}$ - microgramas por grama
 $\mu\text{g/kg/dia}$ - microgramas por quilograma por dia
 $\mu\text{g/kg/peso}$ - microgramas por quilograma por peso
 $\mu\text{g/L}$ - microgramas por litro
 $\mu\text{g/mL}$ - microgramas por mililitro
 $\mu\text{g/m}^3$ - microgramas por metro cúbico
 μM - micromolar
 $\mu\text{M/mL}$ - micromol per milliliter
ALH - amplitude of lateral head displacement
BSA - Bovine serum albumin
Cádmio - Cd
CASA - Computer Assisted Sperm Analysis
CCO - Complexo *cumulus* oócito
Chumbo - Pb
 CO_2 -Carbon dioxide
COCs - Cumulus oocyte complexes
Cromo hexavalente - Cr (VI)
DCF - Fluorescent Dichlorofluorescein
DCHF- DA - 2'7' - Dichlorofluorescein Diacetate
DNA - Deoxyribonucleic Acid
EO - Estresse oxidativo
EPA - Environmental Protection Agency
EROs - Espécies Reativas de Oxigênio
EtHg- Etilmercúrio
EUA - Estados Unidos da América
FIV - Fecundação *in vitro*
FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power
FSH - Follicle stimulating hormone
FU - Fluorescence Unit
Hg - mercúrio

Hg⁰ - mercúrio elementar
Hg¹⁺ - íon mercurioso
Hg²⁺ - íon mercúrio
HgCl₂ - cloreto de mercúrio
IVF - *In vitro* fertilization
IVM - *In vitro* maturation
LIN - linearity
MDA - malondialdehyde
MeHg - metilmercúrio
mg - miligram
mg/kg - miligramas por quilograma
mg/L - miligramas por litro
mg/mL - miligramas por mililitro
mg/m³ - miligramas por metro cúbico
mM/L – milimolar por litro
NC - não consta
ng/mL - nanogramas por mililitro
nM - nanomolar
PBS - phosphate buffered saline
pH - potencial hidrogeniônico
PFT - Total of Penetration and Fertilization
PNF - Penetration and Normal Fertilization
PM -progressive motility
PT - total motility
ROS - Reactive Oxygen Species
SCA - Sperm Class Analyzer
SEM - Standard Error of the Mean
SH - grupamentos tióis
Sp -Talp-TL-Sperm/Sperm-Tyrod's Albumin Lactate Pyruvate
STR - straightness
Talp-Fert - Tyrod's, Albumin Lactate Pyruvate
TBARS - Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TCM 119 -Cell culture medium 199

TPTZ - 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine

VAP - average path velocity

VCL - curvilinear velocity

VSL - straight-line velocity

WHO - World Health Organization

ZP - Zona pelúcida

SUMÁRIO

PARTE I

INTRODUÇÃO

1 Mercúrio	22
1.1 Populações de Risco e Limites de Exposição	24
1.2 Toxicidade do Hg e principais sistemas envolvidos	26
2 Espermatozoide e o seu papel na fertilização	30
2.1 Toxicidade do Hg no espermatozoide e Infertilidade masculina.....	31
3 Uso do modelo bovino	34
4 Justificativa	36
5 Objetivos	37
5.1 Geral	37
5.2 Específicos	37

PARTE II

6 Mercury exposure at low concentrations impairs sperm quality and fertilization capacity in bovine sperm	38
Abstract	39
Introduction	39
Materials and methods	40
Results	46
Discussion	47
Conclusion	49
Acknowledgments	50
References	50
Figure legends	55
Table 1	56

Table 2	57
Table 3	58
Figure 1	59
Figure 2	60
Figure 3	61
PARTE III	
7 DISCUSSÃO	62
8 CONCLUSÃO	68
9 PERSPECTIVAS	69
10 REFERÊNCIAS	70
ANEXOS	83

PARTE I

INTRODUÇÃO

1 Mercúrio

O mercúrio (Hg) é um metal pesado, não essencial, distribuído de forma onipresente no ambiente, conhecido por ser o único metal que se apresenta no estado líquido em temperatura ambiente (UNEP, 2013). O símbolo Hg vem do latim "*hydrargyrum*" cujo significado é prata líquida. Seu nome homenageia o deus romano Mercúrio, que era o mensageiro dos deuses, essa homenagem é devida à fluidez do metal (AZEVEDO, 2003).

O Hg apresenta vantajosas propriedades físico-químicas, o que lhe confere grande aplicabilidade no setor industrial e extenso uso em pilhas e baterias. Entretanto é potencialmente tóxico e seus efeitos variam de acordo com sua forma química, concentração e tempo de exposição (AZEVEDO, 2003; WHO, 2008; SYVERSEN; KAUR, 2012).

As principais formas químicas de apresentação do Hg são a inorgânica: elementar ou metálica (Hg^0); mercurioso (Hg_2^{2+}) e o mercúrico (Hg^{2+}), e a orgânica (MeHg e EtHg) (WHO, 2008; OLIVEIRA et al., 2016).

O Hg elementar, presente na forma líquida à temperatura ambiente, é volátil e libera vapor de Hg, oriundo de fontes naturais e atividades antropogênicas (GONZALEZ-RAYMAT et al., 2017). Podemos destacar sua aplicabilidade nas indústrias cloro-álcali como fabricação de policloreto de vinila - PVC; solventes; agroquímicos clorados; produção de sabões; detergentes (DA SILVA et al., 2017); fabricação de aparelhos de medição precisa como termômetros, esfigmomanômetros; lâmpadas fluorescentes, interruptores elétricos, baterias, em amálgama dentária e na atividade garimpeira de extração do ouro (UNEP, 2013).

Além da forma elementar, o Hg pode se oxidar na presença de outros elementos químicos como oxigênio, cloro e enxofre, formando os sais Hg_2^{2+} e Hg^{2+} (GONZALEZ-RAYMAT et al., 2017). Sob essa forma, é empregado principalmente como catalisador na indústria química, fungicida e na fabricação de tintas. Uma curiosidade sobre o cloreto mercurioso, conhecido por Hg doce, foi seu uso na medicina como diurético, purgativo e ainda hoje encontramos sua composição em cremes cutâneos com finalidade antisséptica (PARK; ZHENG, 2012).

Quando o Hg se une a um ou dois átomos de carbono (ligação covalente) forma o Hg orgânico. Os derivados desta forma de Hg podem ser utilizados como herbicidas; fungicidas;

desinfetantes; conservantes em pinturas, ceras/pastas; antissépticos, bacteriostáticos e também como conservantes de formulações farmacêuticas (vacinas, soluções nasais e oftalmológicas) (AZEVEDO, 2003; GONZALEZ-RAYMAT et al., 2017).

Através de fontes e processos naturais como a atividade vulcânica, incêndios florestais, movimento dos rios, lagos e córregos, e processos biológicos, mas principalmente pelos processos antropogênicos, o Hg é emitido na atmosfera atingindo as águas e solo (WHO, 2008; SELIN, 2014). O ciclo biogeoquímico do Hg é considerado complexo por envolver uma inter-relação entre os sistemas atmosféricos, aquáticos e terrestres (BISINOTI; JARDIM, 2004). O Hg participa de dois ciclos, o global e o local, que contribuem para o seu transporte e a distribuição.

O ciclo global relaciona-se com o Hg elementar. Este circula na atmosfera por meses até anos e pode ser amplamente disperso e transportado a milhares de quilômetros das suas prováveis fontes de emissão (WHO, 2008; SELIN, 2014). Na presença de ozônio atmosférico, o Hg elementar pode oxidar-se e retornar a superfície por precipitação seca e úmida (CLARKSON; MAGOS, 2006).

Já o ciclo local ocorre pela ação microbiológica com o Hg inorgânico se transformando em Hg orgânico. Isso se deve ao fato de que a maior parte do Hg em água, solo, sedimentos ou plantas e em animais está na forma de sais de mercúrio iônicos (HgCl_2) e a ação de microbactérias converte em metilmercúrio (AZEVEDO, 2003). Sob esta forma é incorporado às espécies aquáticas em um processo chamado de bioacumulação que por meio da cadeia alimentar pode atingir a saúde humana (NARVÁEZ et al., 2017).

O início dos estudos com o Hg foi intensificado a partir da década de 50 em virtude dos sintomas apresentados pela população da cidade de Minamata, no Japão. Uma indústria de acetaldeído lançava seus resíduos industriais na foz do rio da cidade, entre os compostos lançados, havia uma grande quantidade de Hg inorgânico o qual acabou sendo incorporado na cadeia alimentar na forma de MeHg. Em consequência, os habitantes da região, consumidores de peixe, passaram a apresentar diversos sintomas (tanto agudos, como crônicos), principalmente neurológicos (EKINO et al., 2007). Posteriormente, graves acidentes no Paquistão (1963), Guatemala (1966) e Irã (1971) aconteceram pelo uso do Hg como fungicida em lavouras, assim houve um alerta para a gravidade do uso indiscriminado do Hg e as suas consequências para a saúde humana (DA SILVA et al., 2017).

1.1 Populações de Risco e Limites de Exposição

Atualmente as populações de maior risco de intoxicação pelo o Hg são principalmente os trabalhadores expostos ocupacionalmente, populações vizinhas a fontes de poluição como minas e indústrias, ou de regiões contaminadas em especial com fontes de água assim como pessoas que se alimentam preferencialmente de pescados e outros produtos aquáticos, com risco adicional a gestantes e crianças (AZEVEDO, 2003; UNEP, 2013; WHO, 2016).

Diante desse preocupante cenário de contaminação pelo Hg, vários países e organizações internacionais estabeleceram níveis aceitáveis de exposição a este metal (OPAS, 2011). A *Environmental Protection Agency* (EPA) dos Estados Unidos da América (EUA) estabeleceu uma concentração de referência de inalação para o Hg⁰ de 0,3 µg/m³, estimando assim os possíveis riscos através desse meio de absorção.

No Brasil essa referência está vinculada a Norma Regulamentadora (NR) 15 do Ministério do Trabalho, cujo valor aceitável é de até 40 µg de Hg/m³ (para todas as formas de Hg, exceto orgânico) de exposição ocupacional, que corresponde a aproximadamente a uma concentração total de Hg de 15 - 20 µg/L de sangue (MS, 2010). Já na Colômbia, os valores recomendáveis vão até 0,025mg/m³ (OPAS, 2011). Quanto ao solo e a água potável, o limite máximo do metal, segundo a EPA, é de 0,087 µg/g e de 2 µg/L, respectivamente. No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabeleceu para a água potável o limite de 0,0002 mg/L de Hg, enquanto o solo é 0,5mg/kg (OPAS, 2011). Para uma melhor comparação sobre esses dados, a Tabela 1 expõe de maneira resumida os limites aceitáveis de Hg total no Brasil, Colômbia, Estados Unidos e Comunidade Europeia (OPAS, 2011).

Tabela 1. Limites admissíveis de exposição ao mercúrio no meio ambiente em diferentes países.

	Brasil	Colômbia	EUA (EPA)	Europa
Ar	0,04 (mg/m ³)	0,025 (mg/m ³)	0,0003 (mg/m ³)	0,025 (mg/m ³)
Água Potável	0,001 (mg/L)	0,001 (mg/L)	0,002(mg/L)	0,002 (mg/L)
Solo	0,5 (mg/kg)	NC	0,087 (mg/kg)	0,3(mg/kg)

Fonte: Adaptado OPAS 2011. NC: não consta

O consumo de peixes é a principal rota de exposição ao MeHg na população humana, diante disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda uma ingestão diária ou semanal de Hg ou MeHg de até 5 µg/kg/peso corporal para o Hg total e de 1,6 µg/kg/peso corporal para MeHg (WHO, 2008). A EPA sugere uma dose de referência diária de 0,3 µg/kg/dia para o HgCl₂ e para MeHg de 0,1 µg/kg/dia. Países como a Holanda e EUA admitem o consumo semanal de MeHg de até 0,7 µg/kg/peso corporal, no Japão este valor é de 2 µg/kg/peso corporal. Já na comunidade europeia e no Brasil, adotam o consumo máximo de pescado (MeHg) de 1mg/kg (OPAS, 2011).

Em todos os países que compreendem a região Amazônica, a exposição ao Hg é um grave problema de saúde pública, devido ao consumo de peixes oriundo de um ecossistema contaminado por uso do Hg na atividade de mineração do ouro (AMARO et al., 2014). Desde a década de 80 estudos veem alertando e aumentando a preocupação acerca dos impactos ocasionados pela atividade garimpeira nessa região (LACERDA; PFEIFFER, 1992).

No Peru, níveis elevados de Hg no cabelo foram encontrados na comunidade de Boca Amigo (média de 36 µg/g), onde uma das principais atividades ocupacionais é a extração artesanal do ouro (LANGELAND et al., 2017). Na Colômbia, esses valores de Hg no cabelo oscilaram entre 0,31 a 24,87 µg/g, com média de 3,28 µg/g (NARVÁEZ et al., 2017).

No Brasil, recente estudo indicou níveis alarmantes de Hg em habitantes perto da barragem de Tucuruí - Pará, 57% dos participantes apresentaram ≥ 20 µg/g de Hg total no cabelo (ARRIFANO et al., 2017). Em São Paulo - SP, adultos que consomem peixe mais de uma vez por semana apresentaram maior concentração sanguínea de Hg (2,1 µg/L) do que os que não consomem este alimento (0,9 µg/L) (TAKEDA et al., 2017). Além disso, a presença de metais pesados no rio Doce, proveniente em grande parte do maior desastre ambiental que o país já teve, o rompimento das barragens de rejeitos da mineradora Samarco, em Mariana/MG em 2015, contaminou os peixes da região, e ainda hoje segue com repercussões diretas na sobrevivência da tribo indígena krenak e abastecimento de água da população envolvida (FIOROTT; ZANETI, 2017).

Na Europa, estudo realizado em 17 países, incluindo Espanha, Portugal, Reino Unido e Alemanha, as concentrações de Hg no cabelo variaram de 0, 2 - 1,1 µg/g (CASTAÑO et al., 2015). Podemos destacar a Espanha, que está entre os países com o maior consumo *per capita* de peixe do mundo (FAO, 2014) e apresenta os níveis mais altos do Hg no sangue (7,9 µg/L) no continente europeu (MORENO-ORTEGA et al., 2017).

Sobre o uso de amálgama dentária, existem estudos indicando uma concentração de Hg inorgânico no sangue cerca de 4 µg/L em indivíduos que fazem uso de restauração de amálgama (VAMNES et al., 2000), e de 2,55 µg/L de Hg total em indivíduos com cerca de 19,9 superfícies de amálgama (KINGMAN et al., 1998). A EPA (1997) estima que cada amálgama libere de 3 a 17 µg de vapor de Hg por dia. No Brasil não há normas sobre os limites admissíveis ao uso de Hg em pessoas que possuem restauração com amálgama dentária, como também aos dentistas e auxiliares que realizam esse procedimento.

De maneira geral, os limites biológicos seguros para pessoas não expostas ao Hg, segundo a OMS, variam entre 5 a 10 µg/L no sangue, na urina 50 µg/g de creatinina e no cabelo de 7 µg/g (OPAS, 2011). Porém, a EPA estipula uma concentração sanguínea segura de Hg de até 5,8 ng/ml, valor significativamente menor que o determinado pela OMS (WIGGERS et al., 2008). Já o *National Research Council* (NRC) identifica 2 µg/L como a concentração sanguínea média para populações com pouco ou nenhum consumo de peixe nos EUA (*NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES*, 2000). A Tabela 2 expõe de maneira resumida os limites biológicos aceitáveis de Hg total no Brasil, Colômbia, EPA e a OMS (OPAS, 2011).

Tabela 2. Limites Biológicos aceitáveis de exposição ao Mercúrio em diferentes países e órgãos reguladores.

	Brasil	Colômbia	EPA (EUA)	OMS
Sangue	5 a 10 µg/L	≤ 20 µg/L	5,8 x 10 ⁻⁶ µg/L	5 a 10 µg/L
Urina	50 µg/g	≤ 50 µg/L	NC	50 µg/g
Cabelo	7 µg/g	≤ 5 µg/g	NC	7 µg/g

Fonte: Adaptado OPAS 2011 - NC: não consta

1.2 Toxicidade do Hg e principais sistemas envolvidos

O mecanismo tóxico do Hg é amplo. Ao ser absorvido no organismo, atravessa várias barreiras celulares, como epitélio estratificado da pele, endotélio capilar, alvéolo e trato gastrointestinal (AZEVEDO, 2003).

O Hg elementar é solúvel em lipídios, o que lhe permite atravessar membranas celulares e as suas vias de absorção são: respiratória, o que leva a sérios problemas

pulmonares; trato gastrointestinal, pouca absorção e eliminação quase total pelas fezes e a pele, que acarreta dermatite de contato (GONZALEZ-RAYMAT et al., 2017). Além disso, esta forma de Hg difunde-se rapidamente pela membrana alveolar, entra na corrente sanguínea e fixa-se nos eritrócitos. Devido sua ausência de carga elétrica e poder de difusão, o Hg elementar atravessa facilmente a barreira hemato-encefálica e placentária, entre outros órgãos (BERNHOF 2012; GONZALEZ-RAYMAT et al., 2017).

A exposição do Hg inorgânico pode ocorrer pela oxidação do Hg elementar, desmetilação do MeHg ou diretamente ao HgCl_2 . Sua maior absorção é através do trato gastrointestinal principalmente pela ingestão de água contaminada (CASTILHOS, 2015) sendo necessária a sua transformação em complexos solúveis (AZEVEDO, 2003). Em contato com a pele, sua absorção põe em risco a saúde, como já foi documentado em estudos que indicaram ocorrência de intoxicação por uso de cremes cosméticos contendo Hg (UNEP, 2013). No sangue, esta forma está quase exclusivamente ligada às proteínas plasmáticas e suas maiores concentrações e danos são principalmente nos rins, fígado, coração, vasos sanguíneos, glândulas endócrinas e cérebro (WIGGERS et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2015; RIZZETTI et al., 2017).

A forma orgânica é a mais tóxica, justamente pela sua lipossolubilidade, facilita o seu transporte entre membranas celulares e assim bioacumula em tecidos do organismo (BOUJBIHA et al., 2009; HOMME et al., 2014). Na via respiratória chega a 80% absorção, entretanto é na via trato gastrointestinal, pela ingestão de alimentos contaminados, sua maior via de absorção (SYVERSEN; KAUR, 2012). No sangue, liga-se sobretudo à hemoglobina; em geral sua distribuição leva cerca de cinco dias para atingir um equilíbrio e a maior parte fixa-se no cérebro, fígado e rins (CLARKSON; MAGOS, 2006; BERNHOF 2012).

As vias urinárias e fecal são as mais importantes na eliminação do Hg, além da excreção pelas glândulas mamárias, glândulas sudoríparas e salivares e pele (BERNHOF, 2012). A meia-vida do Hg elementar é de 35 a 90 dias, o Hg inorgânico de 29 a 50 dias, enquanto que o Hg orgânico pode apresentar meia-vida de 50 a 70 dias (AZEVEDO, 2003). Embora a maior parte do Hg absorvido seja eliminada entre 60 a 90 dias (WHO, 2008), há riscos de acúmulos detectáveis no organismo por meses e anos (CLARKSON; MAGOS, 2006).

A toxicidade do Hg nos diversos sistemas é em grande parte atribuída à sua capacidade de aumentar o estresse oxidativo (EO) (STOHS; BAGCHI, 1995; BRANDÃO et

al., 2008). O EO é uma condição que reflete num desequilíbrio entre o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o radical hidroxil ($\text{OH}\bullet$), o ânion superóxido ($\text{O}_2\bullet$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a redução da capacidade das defesas antioxidantes intermediar ou reparar o dano resultante das EROs (AGARWAL et al., 2014). Por este metal possuir alta afinidade com grupamentos tióis (SH) das células, o mesmo favorece a redução dos níveis enzimáticos e não enzimáticos, como por exemplo superóxido dismutase, catalase, glutathione redutase, glutathione peroxidase e glutathione o que confere uma menor proteção celular em relação ao EO (RIBAROV; BENOVA, 1981) e provoca interferência com o processo de fosforilação oxidativa e balanço osmótico (RAO et al., 2008).

Além disso, o Hg pode aumentar o EO através da sua participação na reação de Fenton, provavelmente por ocupar o sítio do ferro na reação, que culmina com a produção de radical hidroxil ($\text{OH}\bullet$), que é altamente lesivo (CAMPOS; YOSHIDA, 2004). Assim, de acordo com os níveis de concentrações presentes no organismo, o Hg pode desnaturar proteínas, inativar enzimas e alterar a atividade celular e ainda modificar as membranas celulares com prejuízos as suas funções (SYVERSEN; KAUR, 2012; RUBINO, 2015).

O sistema nervoso central é o principal órgão alvo do Hg (ARRIFANO et al., 2017). Os sintomas de intoxicação incluem alteração de coordenação motora, disfunção visual e tátil, paralisia, desequilíbrio, espasticidade e tremor (YOSHIDA et al., 2016). Estudos apontam o Hg como fator de risco para a doença de Alzheimer (ARRIFANO et al., 2017) e há relato de comprometimento do sistema nervoso periférico em indivíduos expostos ao Hg, associado a uma diminuição da velocidade de condução nervosa, degeneração axonal e alterações desmielinizantes características de neuropatia periférica (KINGMAN et al., 2005). As exposições crônicas em altas doses também podem afetar memória, intelecto e audição (HU et al., 2017). A exposição pré ou pós-natal ao MeHg pode levar a ocorrência de graves alterações neurológicas em crianças (ASK et al., 2002) e o sistema nervoso em desenvolvimento é mais vulnerável a toxicidade e os efeitos podem ser observados a longo prazo (WHO, 2007; GRANDJEAN; LANDRIGAN, 2006).

Os rins são os principais órgãos alvo de acumulação de Hg após exposição a forma elementar e inorgânica (LI et al., 2010; HALEEM et al., 2012). A exposição aguda ao Hg favorece a redução da atividade da enzima ácida δ -aminolevulínico desidratase renal e um aumento nos níveis de creatinina sérica e de uréia, indicando comprometimento da função renal (MESQUITA et al., 2016). Além disso, foi reportado alterações de proteínas, DNA, estresse oxidativo, peroxidação lipídica no tecido renal após exposição aguda ao Hg

inorgânico, evidenciando a nefrotoxicidade desencadeada pelo metal (APAYDIN et al., 2014). Estudos realizados em ratos, expostos cronicamente ao Hg inorgânico resultaram em esclerose glomerular, necrose tubular aguda e fibrose intersticial (HALEEM et al., 2012).

Estudos prévios relataram associação da exposição ao metal com maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares como hipertensão arterial, maior risco de infarto do miocárdio, aterosclerose e disfunção coronariana (VIRTANEN et al., 2007; GENCHI et al., 2017). O efeito do Hg no sistema cardiovascular, a exemplo de outros sistemas é dose-dependente. Em baixas concentrações o Hg tem efeito inotrópico positivo e em altas concentrações atua deprimindo a contratilidade cardíaca (VASSALLO et al., 1999; DA CUNHA et al., 2000; VASSALLO et al., 2011). A exposição crônica a baixas doses de Hg inorgânico causa disfunção endotelial secundária ao aumento do estresse oxidativo e dos prostanoídes contráteis da via da ciclooxigenase-2, aumento da resposta contrátil à fenilefrina, redução das defesas antioxidantes e redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (WIGGERS et al., 2008; PEÇANHA et al., 2010; FURIERI et al., 2011) e, agentes antioxidantes podem reverter parcialmente essa disfunção endotelial (RIZZETTI et al., 2017b).

O Hg pode afetar órgãos reprodutores feminino e masculino (HEATH et al., 2012; KALENDER et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015). A exposição crônica ao Hg favorece ao aumento no número de abortos espontâneos, natimortos e malformação congênita dos fetos em humanos (LAPHAM et al., 1995; WRIGHT et al., 2015). Em mulheres com elevadas concentrações de Hg no cabelo (10,8 ppm), onde os limites aceitáveis é de 1ppm (EPA), apresentaram redução no número de folículos e oócitos (WRIGHT et al., 2015), além da sua associação à dificuldade de fecundação e diminuição do número de gestações (RATTAN et al., 2017). O Hg pode afetar as funções testiculares espermatogênicas e esteroidogênicas (BOUJBIHA et al., 2009), ocasiona dano ao DNA espermático, assim como interferência no desenvolvimento de células germinativas (ABARIKWU et al., 2016; ZHOU et al., 2016). Também é considerado um desregulador endócrino (PENA et al., 2009; KALENDER et al., 2013; ABARIKWU et al., 2016), promove alterações hormonais, o que acarreta em perturbações menstruais, infertilidade, efeitos teratogênicos, redução das ovulações, além de redução da contagem, alteração na morfologia espermática tanto em humanos e como em animais, diminuição dos níveis de testosterona e aumento do estresse oxidativo (ARABI; HEYDARNEJAD, 2007; QIAO et al., 2013; MARTINEZ et al., 2014b; ZHANG et al., 2016).

Embora muitos sistemas sejam afetados pela exposição ao Hg, o conhecimento acerca de seu efeito sobre o sistema reprodutor em animais e humanos bem como os mecanismos envolvidos desta toxicidade ainda permanecem pouco conhecidos.

2 Espermatozoide e o seu papel na fertilização

Para melhor contextualização dos efeitos do Hg no gameta masculino, segue um breve resumo sobre a estrutura e função do gameta masculino. O espermatozoide é uma célula altamente especializada cuja função é fertilizar o oócito (CARVALHO et al., 2002). Conforme ilustração da Figura 1, visualizamos sua divisão em três partes principais: cabeça (armazenamento genético), colo (fornece energia aos movimentos flagelares) e cauda ou flagelo (atividade locomotora), que é subdividido em porção média, principal e final, recoberto por uma membrana plasmática comum (plasmalema) (SINGH, 2006; GONÇALVES, 2008).

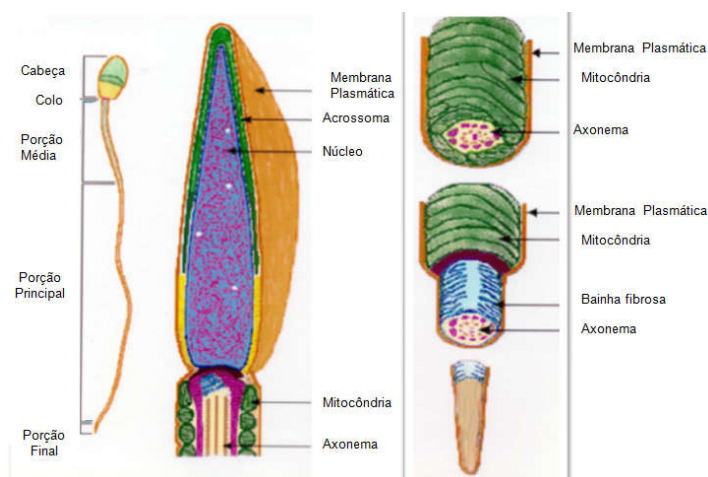


Figura 1. Representação do espermatozoide humano - adaptado de Carvalho et al., 2002.

A cabeça é composta pelo o núcleo haplóide (43% DNA e 57% de proteínas) e o acrossoma que é uma membrana dupla que envolve parte anterior do núcleo e que se estende até dois terços do núcleo, dividido em segmentos apical, principal e equatorial e composta por glicoproteínas e enzimas lisossômicas essenciais a penetração no oócito durante a fecundação (GUIMARÃES, 2013). O colo está situado entre a cabeça e peça intermediária da cauda (engloba o centríolo e a gota citoplasmática) (SINGH, 2006). A região da cauda entre o colo e

ânulo é chamada de peça intermediária, contém um par de microtúbulos centrais e nove pares microtúbulos duplos dispostos simetricamente e por uma bainha mitocondrial que a reveste. Essa bainha mitocondrial é rica em lipídeos e contém o sistema citocromo do espermatozoide (GONÇALVES, 2008).

A peça principal é a parte inferior ao anel terminal até quase o final da cauda, contém adenosina trifosfato (ATP) armazenada e pares de microtúbulos contráteis ao longo de todo o seu comprimento. Já a peça terminal é desprovida de bainha fibrosa (GUIMARÃES, 2013).

A fertilização é um processo que se inicia com o contato entre o espermatozoide e o oócito e finaliza com a fusão do material genético contido nestes gametas (CARVALHO et al., 2002). Ela envolve a ativação do oócito pelo o espermatozoide (GORDON, 2003), entretanto o espermatozoide necessita sofrer modificações funcionais e estruturais para ser capaz de fertilizar o oócito (CRISCUOLO et al., 2010).

Ao saírem no ejaculado, dentro do oviduto, eles passam pelo processo final de maturação, chamada de capacitação, tornando-se aptos para reação acrossômica (AGARWAL et al., 2014), caracterizada pela fusão entre a membrana plasmática e a acrossomal externa, que resulta em formação de vesículas e permite a liberação de enzimas do conteúdo acrossômico e irão possibilitar a penetração do espermatozoide no oócito (CARVALHO et al., 2002; BARROSO et al., 2009). Após sua penetração, ocorre a fusão do espermatozoide com a membrana plasmática do oócito. Com esta fusão, o oócito é ativado, levando a despolarização da membrana plasmática, aumento das oscilações de Ca^{2+} intracelular, entre outros fatores que irão permitir a finalização da meiose II, e consequentemente a formação do zigoto e início da clivagem (GORDON, 2003).

Além disso, as enzimas liberadas durante a reação cortical também provocam modificações na zona pelúcida (ZP), levam ao seu “endurecimento” e à inativação dos receptores. A partir dessas alterações, denominadas “reações zonais”, induz o impedimento, na maioria das espécies, da penetração de outro espermatozoide no oócito, evitando assim a polispermia (CARVALHO et al., 2002).

2.1 Toxicidade do Hg no espermatozoide e infertilidade masculina

De acordo com a OMS, 15% a 25% dos casais buscam tratamento médico para melhorar suas chances de fertilização, em aproximadamente metade desses casos, o fator

masculino é a causa da infertilidade (WHO, 2010; AGARWAL et al., 2014). A infertilidade é definida como "a incapacidade de conceber após 12 meses de relações sexuais desprotegidas, antes de uma investigação realizada a menos que o histórico médico e os achados físicos indiquem a avaliação e tratamento anteriores" (ASRM, 2004).

A incidência de infertilidade masculina está aumentando e tem se relacionado com a alteração na concentração, motilidade e/ou morfologia espermática, presente pelo menos em uma amostra de duas análises, coletadas entre uma a quatro semanas de intervalo (AGARWAL et al., 2014). Recente pesquisa indicou uma considerável redução na contagem espermática em homens de diferentes partes do mundo (América do Norte, Europa e Austrália) entre os anos de 1973 a 2011, com um declínio de 50 a 60% (LEVINE et al., 2017), demonstrando ser um problema crescente de saúde pública (WHO, 2010; BERGAMO et al., 2016).

Fatores ambientais tem cada vez mais sido relacionados ao crescente aumento da infertilidade, especialmente a infertilidade masculina por alterar características fundamentais dos gametas masculinos (DA SILVA et al., 2017). Neste contexto, há evidências de que o Hg se acumula e ocasiona danos nos órgãos reprodutores feminino e masculino, principalmente nos ovários, testículos e próstata (KALENDER et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2016; MARTINEZ et al., 2016). O Hg induz alteração no eixo hipotálamo-hipófise, com prejuízo da dinâmica hormonal necessária à ocorrência da espermatogênese (OSHIO; GUERRA, 2009), redução nos níveis de testosterona, perda de libido e disfunção erétil (SILVA et al., 2011) e/ou afeta diretamente a espermatogênese, que resulta em prejuízo da qualidade do sêmen (SILVA et al., 2011; MENDIOLA et al., 2011).

Estudos realizados em ratos demonstraram que a exposição crônica a baixas doses de Hg ocasiona danos funcionais e estruturais, como a redução no número de espermatozoides no testículo e epidídimo, na produção diária espermática, na motilidade espermática, aumento do número de anormalidades morfológicas de cabeça e cauda e perda de integridade de membrana espermática (HEATH et al., 2012; MARTINEZ et al., 2016; RIZZETTI et al., 2017).

O Hg pode ter relação com prováveis efeitos deletérios da motilidade espermática, parâmetro de grande relevância para analisar a capacidade fecundante do espermatozoide (COX et al., 2006). Arabi e Heydarnejad (2007) evidenciaram danos na motilidade de espermatozoides humanos expostos por 2h *in vitro* a doses elevadas (100 a 800µM) de Hg

inorgânico. Resultados similares foram encontrados também em humanos, com doses 40 e 20 μ M de Hg inorgânico, houve uma total imobilidade após 1,5h de exposição (ERNST; LAURITSEM, 1991), essas alterações preocupam e levantam o questionamento acerca das repercussões deste metal em doses as quais o homem pode estar exposto. Uma vez que cada vez mais é evidente a possível participação do Hg no crescente aumento dos casos de infertilidade masculina. Estudos em Hong Kong relataram que mais de um terço dos homens que fazem tratamento para fertilização apresentam concentrações elevadas de Hg no sangue (HEATH et al., 2012) e, recente investigação sugeriu que a exposição ambiental a este metal pode estar associada ao aumento do dano do DNA de espermatozoides provenientes de homens em tratamento fértil (ZHOU et al., 2016).

Um das hipóteses apontadas como mecanismo de toxicidade do Hg para induzir dano ao gameta masculino é o aumento do EO (BOUJBIHA et al., 2009; MUTHU; KRISHNAMOORTHY, 2012; KALENDER et al., 2013). Ensaios *in vitro* em altas doses de Hg, utilizando espermatozoides de coelhos e ratos, confirmam essa hipótese e demonstram que a exposição ao metal repercute negativamente na função espermática e aumenta níveis de marcadores de EO (RAO et. al, 2008; SLIVKOVA et al., 2010).

Soma-se a esta hipótese apontada o aumento nos níveis de EROS devido à redução de antioxidantes no citoplasma espermático pela perda de parte de sua membrana durante o processo de maturação espermática, perdendo assim, seus antioxidantes endógenos e ficando vulnerável à ação de EROs (CARVALHO et al., 2002). Assim, a redução de antioxidantes endógenos e a presença do Hg no plasma seminal favorece a ação de EROs e, tem sido relacionada com a toxicidade induzida pelo metal (BOUJBIHA et al., 2009; MUTHU; KRISHNAMOORTHY, 2012; KALENDER et al., 2013).

Pequenas quantidades de EROs são necessárias ao sistema reprodutor masculino, pois estimula a capacitação, hiperativação, reação acrossomal e a fusão de oócitos (AGARWAL et al., 2003), no entanto, o seu excesso danifica a viabilidade e a função deste gameta (AGARWAL et al., 2014). Altos níveis de EROS induz a lesão da membrana plasmática do espermatozoide, que por sua vez reduz a mobilidade espermática, sua capacidade de se fundir com o oócito e pode danificar diretamente o seu DNA, comprometendo a contribuição genômica paterna ao embrião (ZAFAR et al., 2014). Esses danos ao DNA induzidos por EROS também podem resultar em crescimento embrionário defeituoso, morte embrionária precoce e aborto (AGARWAL et al., 2017).

Embora estudos prévios indiquem a toxicidade do Hg nos espermatozoides, ainda há controvérsias (BUCK LOUIS et al., 2012). Recente trabalho realizado pelo departamento de saúde ambiental da Escola de Saúde Pública da Universidade de Harvard, Massachusetts (EUA) indicou não haver danos espermáticos em homens que apresentam níveis elevados de Hg e que consomem peixe mais de duas vezes por semana (MÍNGUEZ-ALARCÓN et al., 2017). Os autores apontam o consumo de pescado como fonte de ácidos graxos poliinsaturados (ômega 3), como fator protetor podendo ainda, beneficiar diretamente parâmetros de qualidade do sêmen (SAFARINEJAD, 2011; ATTAMAN et al., 2012). Demais estudos sugerem que as alterações de morfologia e motilidade são correlacionadas com o Hg apenas quando este é medido diretamente no plasma seminal, e não baseado nos níveis encontrados no sangue (CHOY et al., 2002b; MEEKER et al., 2008). Neste sentido, podemos identificar a necessidade de estudos *in vitro* no gameta masculino que possam esclarecer os possíveis efeitos da exposição ao Hg em concentrações encontradas no líquido seminal de indivíduos expostos a este metal.

3 Uso de modelo bovino

A escolha do uso de espermatozoides bovinos para avaliação da toxicidade do Hg pode auxiliar a identificação dos efeitos espermáticos e as suas possíveis repercussões na capacidade fecundante durante a fertilização *in vitro* (FIV). Estudos prévios indicam que os testes com gametas bovinos, associados a procedimentos de maturação e fertilização *in vitro* são os mais adequados para prever os riscos ocasionados por metais pesados na fertilidade de mamíferos justamente porque esses procedimentos de avaliação são rotineiramente aplicados para assistência reprodutiva na criação de animais com alto grau de sucesso (LAZARRI et al., 2008; TESSARO et al., 2015).

De fato, o modelo bovino é considerado um instrumento valioso para desvendar eventos tóxicos reprodutivos em seres humanos, devido às semelhanças entre essas duas espécies, se comparados à animais comuns usados em testes experimentais, como os ratos e camundongos (LAZARRI et al., 2008; SANTOS et al., 2014; LANGBEEN et al., 2015). Essas similaridades quanto à morfologia, período de maturação dos oócitos, assim como o tempo para atingir o estágio de duas células e blastocistos (SANTOS et al., 2014), podem auxiliar na mimetização e consequente conhecimento dos efeitos toxicológicos do Hg sobre a fertilidade masculina humana.

Outra característica importante reside no fato do sêmen bovino ter um alto grau de homogeneidade celular, é imediatamente acessível, pode ser armazenado facilmente por um longo período de tempo e a sua obtenção a partir de inseminação artificial (HINSCH et al., 1997). Apresenta fácil replicabilidade nos ensaios toxicológicos, pois as alíquotas de espermatozoides criopreservados permitem a repetição de testes de controle, bem como diferentes ensaios usando o mesmo grupo de ejaculados em diferentes momentos ou em vários laboratórios (HINSCH et al., 1997).

Além disso, o aumento dramático no número de animais necessários para testes de toxicidade reprodutiva impõe a validação de métodos alternativos para reduzir o uso de animais de laboratório (SANTOS et al., 2014; TESSARO et al., 2015). O modelo bovino representa um método promissor para evitar transtornos com custos operacionais de animais e éticos, uma vez que os oócitos bovinos podem ser coletados de ovários de abatedouros, órgãos que geralmente são descartados quando estes animais são direcionados para a cadeia de produção alimentar (LAZARRI et al., 2008; SANTOS et al., 2014; LANGBEEN et al., 2015).

Ainda que os efeitos do Hg no sistema reprodutor masculino sejam melhor esclarecidos, para nosso conhecimento, não há estudos avaliando diretamente a qualidade e a capacidade fértil de espermatozoides bovinos expostos ao Hg, principalmente em concentrações que partem de níveis de exposição humana ao metal. Assim, torna-se necessário detectar a sua toxicidade nesse modelo aqui proposto.

4 JUSTIFICATIVA

Durante as últimas décadas, o aumento de distúrbios do sistema reprodutor e o comprometimento da capacidade fértil masculina em diferentes partes do mundo aumentaram a preocupação acerca do envolvimento de fatores ambientais e ocupacionais nesse importante parâmetro de saúde humana. Dentre os contaminantes ambientais, que podem contribuir para isto, o Hg é um metal pesado tóxico e bioacumulativo persistente de preocupação global, uma vez que suas emissões antropogênicas e naturais ainda representam alto risco para a saúde. A exposição humana ao Hg ainda é alta, mesmo com as recomendações das agências reguladoras internacionais.

Estudos em humanos apontam prejuízos promovidos pelo Hg no sistema reprodutor, porém esses achados apresentam discrepâncias. Em modelos animais experimentais, há maiores evidências da ação danosa deste metal, no entanto a maioria utiliza altas doses de Hg, não mimetizando doses similares de exposição humana ao metal. Adicionado a isso, não há estudos prévios que avaliem a qualidade espermática e a sua capacidade de fertilização em espermatozoides bovinos expostos ao Hg em baixa dose.

Diante desse cenário sobre a infertilidade masculina e as repercussões deletérias que o Hg pode acarretar na saúde humana e animal, faz-se necessário avaliar os efeitos da exposição ao Hg em baixas concentrações *in vitro* sobre características espermáticas e capacidade de fertilização de espermatozoides, para que possamos melhor esclarecer os efeitos específicos do metal sobre a célula progenitora masculina.

5 OBJETIVO

5.1 Geral

Investigar os efeitos da exposição a diferentes concentrações de cloreto de mercúrio sobre espermatozoides bovinos e sua capacidade fecundante na fertilização *in vitro* (FIV).

5.2 Específicos

- Identificar se a exposição ao HgCl_2 nas concentrações de 8nM, 8 μM e 80 μM são capazes de alterar motilidade, morfologia e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides bovinos;
- Verificar se o tempo de exposição ao HgCl_2 influencia diretamente nos parâmetros cinéticos espermáticos;
- Avaliar se os possíveis efeitos da exposição ao HgCl_2 estão relacionados às alterações nos marcadores de estresse oxidativo em gametas masculinos;
- Investigar se as possíveis alterações espermáticas promovidas pelo HgCl_2 são capazes de interferir na capacidade de fertilização.

PARTE II

Este artigo será submetido ao *Toxicology in vitro*

Fator de impacto: 2.866

Qualis CBII: B1

Mercury exposure at low concentrations impairs sperm quality and fertilization capacity in bovine sperm

Elane Fabíola de Sousa Jerônimo da Silva¹, Daniele Missio², Caroline Silveira Martinez¹, Dalton Valentim Vassallo³, Franck Maciel Peçanha¹, Fabio Gallas Leivas², Daniela dos Santos Brum², Giulia Alessandra Wiggers¹

¹ Graduate Program in Biochemistry, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

² Graduate Program in Animal Science, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

³ Departments of Physiological Sciences, Universidade Federal do Espírito Santo and School of Medicine of Santa Casa de Misericórdia, Vitória, Espírito Santo, Brazil

Correspondence to: Giulia Alessandra Wiggers: - Graduate Program in Biochemistry - Universidade Federal do Pampa, BR 472 – Km 592 – PO box 118. Zip Code: 97500-970, Uruguaiana – Rio Grande do Sul, Brazil.

* E-mail: giuliawp@gmail.com

** elanefabiola@hotmail.com

Abstract

The highlighted reduction in human sperm quality over the last years points to a raised role of environmental contaminants. The effects of mercury (Hg) exposure at low levels directly on male gametes and fertility capacity are unknown. Here in, we have investigated the impact of Hg exposure at different levels on sperm quality and fertilization capacity, using bovine sperm as a model. For that, sperm were divided and incubated for 0.5h, 1h and 2h, as follow: i) Control: without Hg exposure; ii) Hg8nM: Hg at 8nM; iii) Hg8μM: Hg at 8μM and; iv) Hg80μM: Hg at 80μM. Sperm kinetics, morphology, sperm membrane integrity, reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, total antioxidant capacity and, the in vitro fertilization (IVF) were analyzed. Hg exposure at low levels decreased sperm kinetic parameters such as progressive and total motility, curvilinear velocity, straight-line velocity, the straightness and hyperactivity, reduced the number of sperm with normal morphology and impaired the sperm membrane integrity. Hg at the 8μM and 8nM increased ROS and lipid peroxidation levels, decreased the antioxidant capacity and, Hg at 8μM was able to impair the fertilization rate of male gametes. Our study shows that low levels of Hg increase oxidative stress, alter sperm membrane integrity and quality, which then impair sperm fertility capacity.

Keywords: mercury; reproductive toxicology; sperm quality bovine; in vitro fertilization; oxidative stress.

Introduction

The decline on sperm count among men from different parts of the world suggests the male infertility as a burgeoning health problem of this century and highlights the involvement of environmental factors in this phenomenon [1, 2].

Mercury (Hg), a widespread environmental contaminant, has been identified as a hazard to the male reproductive system [3 - 5]. Even with the well-known risks, humans are

continuously exposed to Hg through several sources, mainly by the seafood consumption [6]. The possible relation between male infertility and Hg exposure was already suggested. In Hong Kong, elevated levels of Hg in blood were found among male partners of infertility couples [7].

Hg exposure is related to several health problems which are dependent on exposure factors such as chemical form, time, dose and route of exposure [8, 9]. In the male reproductive system, Hg exposure has been related with impaired sperm motility and normal morphology in experimental animals [5, 10, 11].

Among the suggested mechanisms by which Hg can impair sperm quality, the endocrine disruption and increased oxidative stress are the most postulated [3, 4, 12]. Particularly, the spermatozoa cells are very susceptible to oxidative damage. In excess, reactive oxygen species (ROS) can impair sperm membrane and, consequently, sperm motility and the ability to do the oocyte fusion [4, 13].

Even with the current knowledge regarding Hg and male reproductive system, the effects of low levels of Hg directly on male gametes and consequently, their fertility capacity are unknown. Moreover, besides the suggested oxidative stress involvement, the underlying mechanisms by which Hg can impair the sperm cells are not fully understood [3, 7, 14]. Therefore, the present study aimed to investigate the impact of different levels of HgCl_2 on sperm quality and fertility capacity, using the bovine sperm as an experimental model. Also, we have investigated the redox status on male gametes after Hg exposure.

Materials and Methods

Drugs and reagents

HgCl_2 was purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Salts and reagents were of analytical grade obtained from Sigma and Merk (Darmstadt, Germany).

Experimental design

For the experiment I (5 replicates), semen from two *Bos taurus taurus* bulls were used and all of samples (0.5 mL straws) were from the same commercial batch. The samples were homogenized and the sperm selected by the method of discontinuous gradients of Percoll. To verify the effects of Hg on male gametes, sperm were divided and incubated for 0.5h, 1h and 2h at 37°C in SP-TALP medium, as follow: i) Control: without HgCl₂ exposure; ii) Hg8nM: HgCl₂ at 8nM; iii) Hg8μM: HgCl₂ at 8μM and; iv) Hg80μM: HgCl₂ at 80μM. After, sperm quality parameters such as motility, vigor, sperm kinetics, morphology and sperm membrane integrity as well as oxidative stress biomarkers: ROS, lipid peroxidation and total antioxidant capacity, were determined.

According to the results obtained in experiment I, the fertilization capacity of the exposed sperm was analyzed in experiment II (4 replicates). For that, bovine oocytes were matured for 24h and, after 18h of co-incubation with sperm (final sperm concentration, 2x10⁶ spermatozoa/mL) the potential zygotes were examined by epifluorescence.

Sperm selection procedures

An isotonic Percoll solution was used for the preparation of 90, 60 and 30% solutions with modified Talp-Fert media [15]. The Percoll density gradient was created by layering 300 μL of each solution into a 1.5 mL tube, starting with the 90% Percoll solution in the bottom of the microtube. On the top of the gradient, 300 μL of thawed semen was layered, and the tubes were centrifuged for 5 min at 2200 × g [16]. The pellets were re-suspended in 300 μL of Talp-Fert media and centrifuged again for 1 min at 2200 x g. The samples were submerged in different concentrations of Hg (8nM, 8μM and 80μM) and Control during 0.5h, 1h or 2h. After, the sperm and biochemical parameters were analyzed (the final concentration of spermatozoa was 4x10⁶).

Next, the pellets were re-suspended in the IVF medium and the final concentration was adjusted to 2×10^6 spermatozoa/mL.

Assessment of sperm quality parameters

Sperm motility and vigor

The sperm motility and vigor were assessed immediately after thawing and processing. An estimation of the percentage of progressively motile cells was performed at 100x magnification. These evaluations were performed by the same examiner unaware of the examined group [17].

Sperm kinetics

Sperm kinetics was evaluated by the Computer Assisted Semen Analysis (CASA) system fitted with the *Sperm Class Analyzer* (SCA) software (Version 5.1; Microptic, Barcelona, Spain). The following parameters were analyzed: total motility (%), progressive motility (%), straight-line velocity (mm/s), curvilinear velocity (mm/s), average path velocity (mm/s), straightness (%), linearity (%), amplitude of lateral head displacement (mm), tail beat frequency (Hz), and hyperactivity (sperm with rapid movement; %).

Membrane integrity

The functional integrity of the bovine sperm membrane was determined using the hypoosmotic-swelling test (HOS) as described by Lomeo and Giamberso [18]. The assay was performed by mixing 10 μ L of semen with 50 μ L of hypoosmotic solution (100 mOsm) and incubating this mixture at 37°C for 40 min. A total of 1000 cells per group were evaluated in at least five different fields under 400x magnification. The calculation followed the reactive forms formula: $HOS = (\% \text{ change from the tail region after HOS test}) - (\% \text{ change in the tail region before the HOS test})$ [19]. Spermatozoa with changes were denoted as swelled or HOS positive (HOS+).

Morphology and sperm concentration

To assess the sperm morphology and their concentration, the semen samples were diluted (1:20) in 95 μ L of formaldehyde solution.

A 10 μ L aliquot of fixed sperm suspension was placed on a microscope slide, overlaid with a coverslip and permitted to settle in a humidified chamber for 2 min. A total of 1000 spermatozoa (each group) were assessed and the proportion of abnormal forms in each sample was determined using phase-contrast microscopy (1000 $\times$). The defects were classified as: non-compensable (major) and compensable (minor), based on a method described by Barth and Oko [20].

The sperm count was performed in a hematic Neubauer chamber under 400 $\times$ magnification. Spermatozoa in 10 of the 25 squares were counted, with each square measuring 0.04 mm² (volume = 0.004 mm³, with a height of 0.1 mm). The results were converted to a concentration of sperm per mL by multiplying the number of sperm counted in five squares by 0.5×10^6 .

Reactive Oxygen Species (ROS) levels

ROS levels were assessed spectrofluorometrically using 2,7- dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) as a probe as previously described [21]. The sample (S1) was diluted (1:10) in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) and the DCHF-DA (1mM) was added to the medium. The DCHF-DA is enzymatically hydrolyzed by intracellular esterases to form nonfluorescent DCFH, which is then rapidly oxidized to form highly fluorescent 20,7-dichlorofluorescein (DCF) in the presence of ROS. DCF fluorescence intensity is proportional to the amount of reactive species formed. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm (with 488 nm excitation) (Spectramax M5 Microplate/Cuvette Reader, Molecular Devices,

Pennsylvania, USA) for 60 min at 15 min intervals. The ROS levels were expressed as fluorescence unit (FU).

Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was evaluated by the Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS) assay [22]. In this procedure, an aliquot of sample was incubated with a 0.8% thiobarbituric acid solution, acetic acid buffer (pH 3.2) and sodium dodecyl sulfate solution (8%) at 95 °C for 1h, and the color reaction was measured at 532 nm (Spectramax M5 Microplate/Cuvette Reader, Molecular Devices, Pennsylvania, USA). Results were expressed as nmol of malondialdehyde (MDA) per mg of protein.

Total antioxidant capacity

Total antioxidant capacity was evaluated by Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay. The FRAP was performed according to a colorimetric method [23]. To prepare working FRAP reagent, acetate buffer (300 mM, pH 3.6), 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine (TPTZ) (10 mM in 40 mM HCl) and FeCl₃ (20 mM) were mixed in a 10:1:1 ratio (v:v:v). After this, the reagent was mixed with S1. The reduction of the Fe³⁺-TPTZ complex to a colored Fe²⁺-TPTZ complex by the samples was monitored after incubation of the samples for 15 min at 37°C, by measuring the absorbance at 593 nm Spectramax M5 Microplate/Cuvette Reader, Molecular Devices, Pennsylvania, USA). Antioxidant potential of the samples was determined against standards of Trolox, which were processed in the same manner as the samples. Results are presented with particular reference to Trolox equivalents.

In vitro maturation (IVM) and In vitro fertilization (IVF)

Bovine ovaries were obtained at the slaughterhouse and transported to the laboratory in saline solution (0.9%) with antibiotics (100IU/mL penicillin and 100mg/mL streptomycin) at 30°C. Cumulus oocyte complexes (COCs) from 2 to 8 mm diameter follicles were aspirated

with a vacuum pump (vacuum rate of 20mL of water/min). The COCs were recovered and only oocytes with homogenous ooplasm and intact cumulus layers were selected for further processing. An average of groups with 23 COCs were transferred to plates containing 400 μ L of modified TCM 199 media with 10% estrous mare serum, 5 μ g/mL of porcine follicle stimulating hormone, NIH-FSH-P1 (Folltropin-V, Bioniche Animal Health, Ontario, Canada), 50 μ g/mL of porcine pituitary luteinizing hormone, LH-P (Lutropin-V, Bioniche Animal Health), 100 μ g/mL of human epidermal growth factor (hEGF), and 22 μ g/mL of pyruvate and gentamicin. For IVM, the COCs were cultured for 24h at 39°C in a gaseous atmosphere with 5% CO₂ and saturated humidity.

After sperm processing, samples were divided in three groups (Control, Hg8nM, Hg8 μ M) exposed for 2h and used for IVF. Droplets containing 400 μ L modified Talp-Fert medium [24] with 22 μ g/mL pyruvate, 6 mg/mL BSA, 10 μ g/mL heparin, 20 μ M/mL penicillamine, 10 μ M hypotaurine and 2 μ M/mL epinephrine, were prepared in a 4-well plate for CCO fertilization with 2×10^6 sperm/mL. The sperm and oocyte co-culture was performed at 39°C with saturated humidity and a gaseous atmosphere of 5% CO₂. At 18h post insemination, potential zygotes were stained for 15 min (1% Hoechst 33342 in PBS), washed with PBS containing 1 mg/mL polyvinylpyrrolidone, mounted on glass slides and examined under an epifluorescence microscope at 400x magnification for evidence of sperm penetration and fecundation. The penetration rate and the mean number of spermatozoa per penetrated oocyte were evaluated for each group. Normal penetration was attributed when only one sperm was penetrated, above that value, was considered total penetration. An oocyte was considered normal fertilized if it had two pro nuclei or the fusion of the nuclei, total fertilized if it presented more than two pro nuclei.

Data analysis and statistics

Data are presented as the mean values $\pm$ SEM and as the median (Q1 – Q3). Differences were analyzed using ANOVA followed Bonferroni post hoc tests for parametric data and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test for nonparametric data. Values of $p < 0.05$ were regarded as being significantly different.

Results

During the phase experimental I, the subjective sperm parameters were evaluated and, the vigor and motility were not different between the Control and Hg8nM groups (Table 1). Hg exposure at the middle concentration of 8 μ M decreased the motility after 2h of exposure and, Hg exposure at the highest level of 80 μ M totally impaired the sperm movement and vigor as indicated by the immotile sperm (Table 1).

The CASA kinetics evaluation revealed that Hg exposure for 2h at the lowest concentration of 8nM was able to decrease the progressive motility (Figure 1), curvilinear velocity, straight-line velocity and the straightness (Table 2). While Hg exposure at 8 μ M decreased the progressive and total motility (Figure 1), curvilinear velocity and hyperactivity (Table 2). Due to immotile sperm from group Hg80 μ M in the subjective evaluation, we were not able to evaluate this group with the CASA software.

The effects of Hg in sperm morphology and membrane integrity were evaluated. Hg at the middle and highest concentrations (8 μ M and 80 μ M) impaired sperm morphology with reduced number of normal sperm. Moreover, Hg at 80 μ M increased the number of sperm with minor defects (Table 3). Hg at 8 μ M impaired sperm membrane integrity after 2h of exposure (Table 3 – $p < 0.05$ vs Control).

The role of oxidative stress on sperm quality impairment after Hg exposure was evaluated. Hg at the lower and middle levels increased ROS and lipid peroxidation and decreased the total antioxidant capacity (Figure 2). Raising ROS production more than 50% in

Hg group at 8nM and 90% in 8μM in; 40% in lipid peroxidation levels in sperm exposed to Hg at 8nM and 60% in sperm exposed to Hg at 8μM and, the total antioxidant capacity was reduced almost 60% in all Hg-treated sperm (Figure 2).

Regarding the experiment II, Hg exposure at 8μM was able to compromise the fertilization rates, reducing the percentage of fertilization and penetration (reduction of 24% compared to control) and, the percentage of total penetration and normal fertilization (reduction of 18.5% compared to control - Figure 3).

Discussion

Our results show that the presence of low levels of Hg on sperm for a short exposure period are sufficient to impair sperm quality and decrease in vitro fertility capacity. Here, we demonstrate for the first time that sperm exposed to low levels of Hg are unable to do the oocyte fusion and, as expected, the Hg reproductive effects are dependent on time and dose of exposure. Moreover, based on our results, we can suggest that Hg first increases oxidative stress, impairing sperm membrane and quality which then compromise sperm fertility rates.

Studies on reproductive effects of Hg are numerous, however the current study is the first evaluating Hg exposure at 3 different concentrations on sperm quality and fertilization capacity, using the bovine sperm as a model, more similar to human sperm than rodents sperm [10, 13, 25 - 28]. Moreover, here we have seen adverse effects of Hg at the lowest concentration evaluated, which is lower than found in involuntarily Hg exposed individuals [7].

The present findings confirm that Hg at different exposure levels can impair sperm quality both in vivo and in vitro [10, 12, 13, 28]. Previous studies from our group have yet demonstrated that Hg exposure at a level similar to human exposure impairs sperm quality and production per testis [5, 12, 11]. The current study have assessed the sperm quality

parameters using the specific software for sperm analysis SCA and, we have demonstrated that Hg not only decreases the sperm motility but also impairs important kinetics parameters such as curvilinear and straight-line velocities, straightness and hyperactivity. These parameters are directly associated with a successful oocyte fertilization [29], which could explain the failed fertilization rates found in the present study. Similarly, previous studies at higher exposure period (e.g.4h) or concentration levels (e.g.100 μ M) have demonstrated the ability of Hg to inhibit rabbit sperm motility in vitro [10, 28].

In the present study Hg impaired sperm morphology and sperm membrane integrity after 2h of exposure. These specific alterations have also seen in our previous in vivo reports on Hg reproductive effects in male rats [5, 12]. The integrity and functional activity of the sperm membrane are needed for the fertilization process, and assessment of membrane function may be a useful indicator of the fertilizing potential of the spermatozoa [30, 31]. Arabi [13] has demonstrated a dramatic deleterious effect of Hg on sperm membrane (concentrations: 50 - 300 μ M) and suggested that Hg can alter the organization of lipid elements in the sperm membrane resulting in a defective sperm.

Among the available experimental models to investigate the effects of contaminants on male gametes, the bovine sperm seem to be a very relevant model since there are several similarities between bovine and human sperm [31, 32]. Therefore, the present study was designed to investigate the effects of Hg on sperm quality and its implication on fertility, using the bovine sperm. Here we have seen that Hg has negative impact in the fertilization capacity when evaluated in vitro. Specifically, sperm exposed to Hg at 8 μ M for 2h showed reduction in the penetration and fertilization rates. These effects are in accordance and should be, at least in part, a consequence of the sperm kinetics characteristics found, needed for a successful fertilization [33].

This is the first study on fertilization capacity of bovine sperm in vitro, however, heavy metals such as cadmium are known to reduce the fertility rate in spermatozoa after Hg exposure at low level [34].

Among the mechanisms of action of Hg, numerous studies suggested that Hg can induce ROS production and increase oxidative stress in several systems [33, 35, 36]. The male reproductive system is especially sensible to the raised on oxidative stress [37]. ROS at low concentrations play an important role in the fertilizing capabilities of the spermatozoa stimulating the sperm capacitation, hyperactivation, acrosome reaction and, oocyte fusion [33]. However, an unbalance in ROS production can impair the sperm membrane which in turn reduce the sperm motility, ability to fuse with the oocyte and can directly damage the sperm DNA, compromising the paternal genomic contribution to the embryo [4, 7, 33]. Hg exposure at 8nM or 8μM increased ROS and lipid peroxidation levels and decreased the total antioxidant capacity in the spermatozoa. Results of the present study support the oxidative stress as an important mechanism of action of Hg in the male reproductive system, and now specifically to the sperm cell impairment.

Conclusion

In conclusion, our study shows that the direct exposure of Hg at low levels on male gametes are able to impair sperm quality and fertility in vitro. Our study suggests that Hg increases oxidative stress, altering sperm membrane and quality which then impair sperm fertility capacity. The elevation of oxidative stress in male gametes after Hg exposure appoints the pro-oxidant activity of Hg as a pathway of toxic action of this metal in the progenitor male cells.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*; the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* [445824/2014-0]; *Programa Nacional de Cooperação Acadêmica*; *Pró-reitoria de Pesquisa - Universidade Federal do Pampa* [Nº 10.305.16] and MARFRIG GROUP for providing the ovaries.

References

- [1] Bergamo P, Volpe MG, Lorenzetti S, Mantovani A, Notari T, Cocca E, Cerullo S, Di Stasio M, Cerino P, Montano L. Human semen as an early, sensitive biomarker of highly polluted living environment in healthy men: A pilot biomonitoring study on trace elements in blood and semen and their relationship with sperm quality and RedOx status. *Reprod Toxicol* 2016; 66:1–9
- [2] Levine H, Jørgensen N, Martino-Andrade A, Mendiola J, Weksler-Derri D, Mindlis I, Pinotti R, and Swan SH. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Human Reprod Update* 2017; 1–14
- [3] Boujbiha MA, Hamden K, Guermazi F, Bouslama A, Omezzine A, Kammoun A, Feki AE. Testicular toxicity in mercuric chloride treated rats: association with oxidative stress. *Reprod Toxicol* 2009; 28:81-89
- [4] Zafar A, Eqani SAMAS, Bostan N, Cincinelli A, Tahir F, Shah STA, Hussain A, Alamdar A, Huang Q, Peng S, Shen H. Toxic metals signature in the human seminal plasma of Pakistani population and their potential role in male infertility *Environ Geochem Health* 2014
- [5] Martinez CS, Peçanha FM, Brum DS, Santos FW, Franco JL, Zemolin APP, Anselmo-Franci JA, Junior FB, Alonso MJ, Salaices M, Vassallo DV, Leivas FG, Wiggers GA.

- Reproductive dysfunction after mercury exposure at low levels: evidence for a role of glutathione peroxidase (GPx) 1 and GPx4 in male rats. *Reproduction, Fertility and Development* 2016
- [6]Wright DL, Afeiche MC, Ehrlich S, Smith K, Williams PL, Chavarro JE, Batsis M, Toth TL, Hauser R. Hair mercury concentrations and in vitro fertilization (IVF) outcomes among women from a fertility clinic. *Reprod Toxicol* 2015; 51:125–132.
- [7]Heath JC, Abdelmageed Y, Braden TD, Goyal HO. The Effects of Chronic Ingestion of Mercuric Chloride on Fertility and Testosterone Levels in Male Sprague Dawley Rats. *J of Biomedicine and Biotechnology* 2012; 815186.
- [8]Penna S, Pocino M, Marval MJ, Lloreta J, Gallardo L, Vila J. Modifications in Rat Testicular Morphology and Increases in IFN-g Serum Levels by the Oral Administration of Subtoxic Doses of Mercuric Chloride. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 2009, 55:69–84
- [9]Mahajan VE, Yadav RR, Dakshinkar NP, Dhoot VM, Bhojane GR, Naik MK, Shrivastava P, Naoghare PK, Krishnamurthi K. Influence of mercury from fly ash on cattle reared nearby thermal power plant. *Environ Monit Assess* 2012; 184:7365–7372
- [10]Castellini C, Mourvakia E, Sartini B, Cardinali R, Moretti E, Collodel G, Fortaner S, Sabbioni E, Renieri T. In vitro toxic effects of metal compounds on kinetic traits and ultrastructure of rabbit spermatozoa. *Reprod Toxicol* 2009; 27: 46-54
- [11]Rizzetti DA, Martinez CS, Escobar AG, Silva TM, Uranga-Ocio JA, Peçanha FM, Vassallo DV, Castro MM, Wiggers GA. Egg white-derived peptides prevent male reproductive dysfunction induced by mercury in rats. *Food Chem Toxicol* 2017; 100: 253-264
- [12]Martinez CS, Torres JGD, Peçanha FM, Anselmo-Franci JA, Vassallo DV, Salaices M, J. Alonso M, Wiggers GA. 60-Day Chronic Exposure to Low Concentrations of HgCl₂

- Impairs Sperm Quality: Hormonal Imbalance and Oxidative Stress as Potential Routes for Reproductive Dysfunction in Rats. *Plos One* 2014; 9: e111202
- [13] Arabi, M. Bull spermatozoa under Mercury Stress. *Reprod Dom Anim* 2005; 40: 454–459 (2005)
- [14] Martinez CS, Escobar AG, Torres JG, Brum DS, Santos FW, Alonso MJ, Salaices M, Vassallo DV, Peçanha FM, Leivas FG, Wiggers GA. Chronic exposure to low doses of mercury impairs sperm quality and induces oxidative stress in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 2014b; 77: 143-154
- [15] Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH. First NL. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986; 25:591-600
- [16] Guimarães AC, Leivas FG, Santos FW, Schwengber EB, Giotto AB, Machado CI, Gonçalves CG, Folchini NP, Brum DS. Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases in vitro fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. *Anim Reprod Sci* 2014; 146:103-110
- [17] Platz CC, Seager SWJ. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1978;173:1353–5
- [18] Lomeo AM, Giamberso AM. Water-test: a simple method to assess sperm-membrane integrity. *Int J Androl* 1991; 14: 278–282
- [19] Melo MIV, Henry M Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino. *Arq Bras Med Vet Zootec* 1999; 51: 77-78
- [20] Barth AD, Oko RJ. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*, first ed. Iowa State University Press 1989, Ames, IA.
- [21] Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology* 1992; 13:637-648.

- [22]Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
- [23]Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70 -7.
- [24]Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. Effect of bovine spermseparation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 1995; 44:859–869
- [25]Ernst' E, Lauritsen JG. Effect of Organic and Inorganic Mercury on Human Sperm Motility. *Pharmacology & Toxicology* 1991; 69: 440-444
- [26] Hanf V, Forstmann A, Code JE, Schieferstein G, Fisher I, Schweinsberg F. Mercury in urine and ejaculate in husbands of barren couples. *Toxicology Letters* 1996; 88: 227-231
- [27]Rao MV, Gangadharan B. Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro. *Toxicology in Vitro* 2008;22: 935 -942
- [28]Slivkova J, Massanyi P, Pizzi F, Trandzik J, Roychoudhury S, Lukac N, Dankova M, Almasiova V. In vitro toxicity of mercuric chloride on rabbit spermatozoa motility and cell membrane integrity, *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 2010; 45: 767-774
- [29]Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2002; 57: 149-179
- [30]Celeghini ECC, Andrade AFC, Raphael CF, Nascimento J, Ticianelli JS, Arruda RP. Damage Assessment of the Equine Sperm Membranes by Fluorimetric Technique. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2010; 53: 1285-1292
- [31]Santos RR, Schoevers EJ, Roelen BAJ. Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2014; 12:117

- [32] Langbeen A, De Porte HFM, Bartholomeus E, Leroy JLMR, Bols PEJ. Bovine in vitro reproduction models can contribute to the development of (female) fertility preservation strategies. *Theriogenology* 2015; 84: 477 - 489
- [33] Agarwal A, Gurpriya V, Ong C & Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health* 2014; 32: 1-17
- [34] Kim K, Fujimoto VY, Parsons PJ, Steuerwald AJ, Browne RW, Bloom MS. Recent cadmium exposure among male partners may affect oocyte fertilization during in vitro fertilization (IVF). *Journal Assisted Reproduction Genetic* 2010; 27:463 - 468
- [35] Kalender S, Uzun FG, Demir F, Uzunhisarcıklı M, Aslanturk A. Mercuric chloride induced testicular toxicity in rats and the protective role of sodium selenite and vitamin E. *Food Chem Toxicol* 2013; 55: 456 - 462
- [36] Muthu K, Krishnamoorthy P. Effect of vitamin C and vitamin E on mercuric chloride-induced reproductive toxicity in male rats. *Biochem Pharmacol* 2012;1:102
- [37] Agarwal A, Arafa M, Chandrakumar R, Majzoub A, AlSaid S, H. Elbardisi H. A multicenter study to evaluate oxidative stress by oxidation–reduction potential, a reliable and reproducible method. *Andrology* 2017; 1 - 7

Figure legends

Figure 1. Effects of mercury at different concentrations on Total Motility and Progressive Motility in bovine sperm. Data are expressed as median (Q1 – Q3), * $p < 0.05$ compared with control (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's).

Figure 2. Effects of mercury at different concentrations on biochemical biomarkers in bovine sperm. A. Reactive oxygen species levels (ROS). Values of ROS, UF: Units of fluorescence. B. Lipid peroxidation measurements. Values of MDA (malondialdehyde). C. Total antioxidant capacity. Values of FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ compared with control (ANOVA followed by Bonferroni test).

Figure 3. Effects of mercury at different concentrations on Total penetration and fertilization rate, and Normal penetration fertilization for in vitro fertilization. Data are expressed as median (Q1 – Q3), * $p < 0.05$ compared with control (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's).

Table 1. Effects of mercury at different concentrations on sperm motility and vigor.

	Motility			Vigor (0-5)		
	0.5h	1h	2h	0.5h	1h	2h
Control	50 (50 - 50)	50 (40 - 50)	40 (30 - 52.5)	3.8 ± 0.2	3.8 ± 0.2	3.4 ± 0.2
Hg8nM	45 (40 - 50)	40 (35 - 40)	30 (25 - 37.5)	3.6 ± 0.2	3.4 ± 0.2	3.2 ± 0.2
Hg8μM	40 (40 - 40)	35 (30 - 42.5)	30 (25 - 32.5)*	3.4 ± 0.2	3.4 ± 0.2	3.1 ± 0.1
Hg80μM	0*	0*	0*	0 *	0*	0*

Motility: expressed as median (Q1 – Q3). Kruskal-Wallis test followed by Dunn's (* p <0.05 vs Control)

Vigor: expressed as mean ± SEM. ANOVA followed by Bonferroni test (* p <0.05 vs Control)

Table 2. Effects of mercury at different concentrations on sperm kinetics evaluated by *Sperm Class Analyzes* (SCA).

	Control	Hg8nM	Hg8μM
VCL (μm/s)	50.97 ± 2.80	39.66 ± 3.58*	40.85 ± 2.85*
VSL (μm/s)	27.19 ± 2.60	17.65 ± 1.20*	19.95 ± 2.95
VAP (μm/s)	34.94 ± 3.37	25.15 ± 1.71	27.23 ± 2.64
LIN (%)	54.3 (35.1 - 61.2)	36.5 (20.5 - 45.3)	49.0 (44.8 - 67)
STR (%)	81.6 (70.1 - 89.9)	69.6 (55.2 - 73.9)*	80.2 (59.3 - 91.1)
WOB (%)	64.5 (50.1 - 72.2)	57.2 (52.4 - 61.6)	64.1(59.3 - 74)
ALH (μm)	1.97 ± 0.27	1.72 ± 0.42	1.59 ± 0.19
TBF (Hz)	7.01 ± 0.90	6.10 ± 0.86	6.45 ± 0.46
Hyperactivity(%)	8.4 (3.3 - 13.2)	4.2 (3.6 - 4.2)	3.5 (0 - 4.3)*

VCL: curvilinear velocity; VSL: straight-line velocity; VAP: average path velocity; LIN: linearity; STR: straightness; WOB:oscillation index; ALH: amplitude of lateral head displacement; TBF: tail beat frequency; Hyperactivity: sperm with rapid movement.

Absolute data are expressed as mean ± SEM. ANOVA followed by Bonferroni test (* p <0.05 vs Control)

Data in % are expressed as median (Q1 – Q3). Kruskal-Wallis test followed by Dunn's (* p <0.05 vs Control)

Table 3. Effects of mercury at different concentrations on sperm morphology and sperm membrane integrity.

	Morphology			Sperm membrane integrity
	Major defect	Minor defect	Normal Sperm	
Control	4.0 (2.5 - 6.0)	13.5 (9.5 - 15.9)	83.5 (78.5 - 84.7)	29.0 (25.0 - 32.0)
Hg 8nM	4.5 (1.0 - 8.0)	16.5 (11.0 - 18.7)	78.0 (75.5 - 83.0)	28.0 (23.0 - 29.0)
Hg 8μM	4.0 (2.0 - 7.5)	18.7(10.5 - 21.1)	76.2 (68.5 - 83.5)	17.2 (3.0 - 22.0)*
Hg80μM	3.5 (1.5 - 6.0)	49.0 (40.0 - 56.5)*	49.0 (35.5 - 53.5)*	25.5 (5.5 - 28.0)

Data are expressed as median (Q1 – Q3). Kruskal-Wallis test followed by Dunn's (* p <0.05 vs Control)

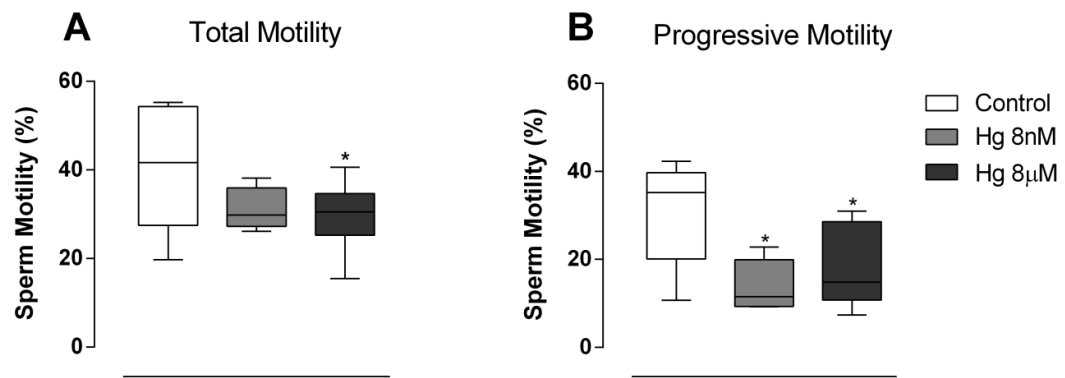


Figure 1

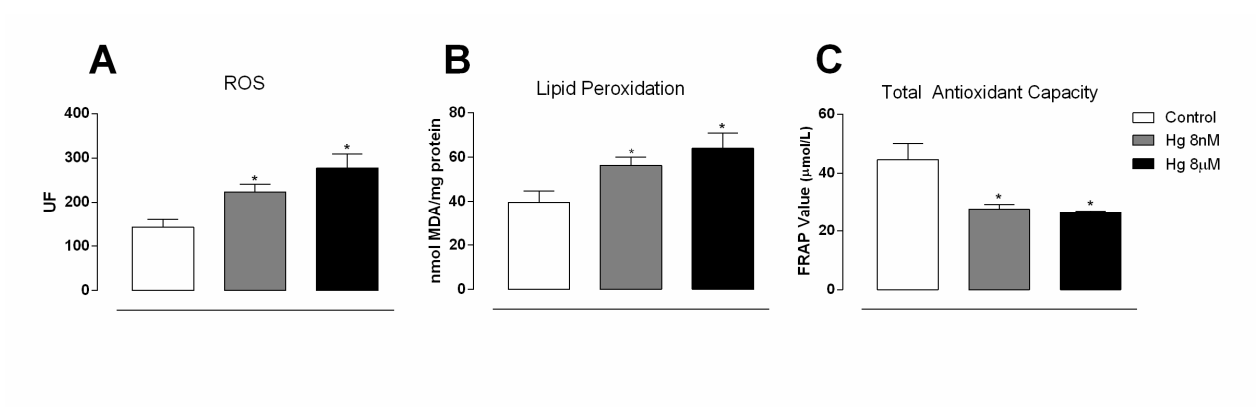


Figure 2

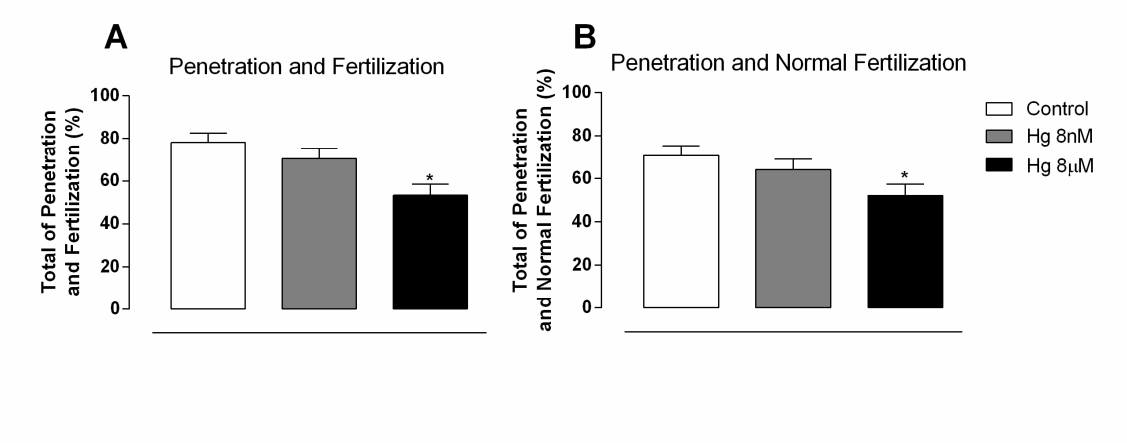


Figure 3

PARTE III

7.0 DISCUSSÃO

Resultados deste trabalho demonstram que a exposição ao HgCl_2 em diferentes concentrações foi capaz de reduzir a motilidade espermática, alterar a morfologia com aumento nos defeitos menores ($\text{Hg}80\mu\text{M}$) e reduzir no número de espermatozoides normais ($\text{Hg}80\mu\text{M}$ e $\text{Hg}8\mu\text{M}$) além de afetar a integridade da membrana plasmática de espermatozoides bovinos ($\text{Hg}8\mu\text{M}$). Em adição a estes achados, a exposição ao Hg ($\text{Hg}8\mu\text{M}$) reduziu a taxa de penetração e fertilização dos espermatozoides *in vitro*. Dentre os possíveis mecanismos de ação, o HgCl_2 parece estar atuando por meio do aumento do estresse oxidativo e redução das defesas antioxidantes.

As alterações espermáticas foram visualizadas após exposição ao Hg em diferentes concentrações de Hg inorgânico (HgCl_2 ; Peso Molecular 271,50): 8nM , $8\mu\text{M}$ e $80\mu\text{M}$ as quais correspondem respectivamente a $\sim 2,18 \text{ ng/mL}$, $2,18 \mu\text{g/mL}$ e $21,8 \mu\text{g/mL}$, sendo selecionadas de estudos prévios *in vitro* (ERNST; LAURITSEN, 1991; HANF et al., 1996; ARABI, 2005; RAO et al., 2008; CASTELLINI et al., 2009; SLIVKOVA et al., 2010), assim como de valores de Hg encontrados em populações expostas ao metal, através do consumo de peixes contaminados ou atividades ocupacionais (OPAS, 2011; KHOURY et al., 2013; CASTILHOS et al., 2015).

De fato o efeito do metal sobre o sistema reprodutor masculino tem sido estudado. A exposição ao Hg é capaz de induzir problemas reprodutivos em seres humanos expostos a altas doses de Hg inorgânico ($100 - 800\mu\text{M}$) em testes *in vitro*, como também em animais, como coelhos ($10 - 100 \mu\text{M}$), ratos ($10 - 100 \mu\text{M}$) e peixes ($62 - 250 \mu\text{M}$) expostos (ARABI; HEYDARNEJAD, 2007; CASTELLINI et al., 2009; RAO; GANGADHARAN, 2008; HATEF et al., 2011). A toxicidade do Hg foi associada à redução da libido, problemas com a produção e função dos espermatozoides, mutações em células germinativas e a baixa fertilidade em homens expostos a este metal (ERNST; LAURITSEN, 1991; MENDIOLA et al., 2011). Em animais, a exposição aguda e crônica ao Hg está relacionada à disfunção do eixo hipotálamo-hipófise, ao déficit nas funções espermatogênicas e esteroidogênicas testiculares (MARTINEZ et al., 2014b), diminuição da secreção de componentes de maturação do espermatozoide pelo epidídimo (RAO; SHARMA, 2001) e redução na

contagem de espermática, motilidade e morfologia (MARTINEZ et al., 2014a; MARTINEZ et al., 2014b, RIZZETTI et al., 2017).

A exemplo do que ocorre em outros sistemas e é comum a metais, os efeitos do Hg em espermatozoides bovinos é dose e tempo dependente (DIETRICH et al., 2010; PARK; ZHENG, 2012; OLIVEIRA et al., 2015). Nossos achados evidenciam que 0,5h é suficiente para afetar drasticamente a motilidade e vigor no maior nível de exposição e o aumento do tempo foi capaz de afetar esta característica em uma dose 10x e 1000x menor, ou seja, identificamos danos espermáticos em dose nanomolar, valor de exposição muito abaixo dos utilizados nos estudos anteriores.

Já a mais alta dose de exposição utilizada nesse estudo, Hg80 μ M, embora inferior se comparado a muitos estudos, comprometeu totalmente a viabilidade espermática na análise subjetiva o que demonstrou o importante efeito deletério e dose dependente do metal sobre o gameta masculino. Nesse sentido, avaliação espermática computadorizada (CASA) foi possível apenas ser realizada nos demais grupos de Hg e controle no período de 2h de exposição. Nossa análise foi coerente ao encontrada na avaliação subjetiva, quanto ao grupo Hg8 μ M, houve diminuição da motilidade total e progressiva em 2h de incubação, além de redução significativa da motilidade progressiva que no grupo de menor dose Hg8nM. O Hg interferiu na motilidade, parâmetro que reflete a habilidade fertilizante do espermatozoide (MATOS et al., 2008). Nossos achados corroboram com prévios estudos realizados em espermatozoides de coelhos expostos Hg, a partir da dose de 10 μ M (incubados por 4h) (CASTELLINI et al., 2009) e em peixes expostos numa concentração de 4mg/L por 4h de incubação (DIETRICH et al., 2010), demonstrando assim o potencial tóxico do metal sobre a célula espermática em nível menor de exposição.

A análise computadorizada dos espermatozoides pelo método CASA é uma ferramenta potente na detecção de parâmetros defeituosos espermáticos e, felizmente tem sido utilizada em estudos toxicológicos. No presente trabalho, além da motilidade, avaliações de outros importantes parâmetros indicaram a perda da atividade espermática na presença do Hg. A velocidade curvilínea (VCL - velocidade da trajetória real do espermatozoide) foi prejudicada em ambos os grupos com Hg; a velocidade linear progressiva (VSL - velocidade média da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide) e a retilinearidade (STR - estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta) foram reduzidas após exposição ao metal na concentração nanomolar de 8nM; já a hiperatividade (HIP - relacionado ao processo de capacitação e fertilização do

espermatozoide) (MATOS et al., 2008) apresentou diminuição significativa no grupo Hg8 μ M. Essas importantes alterações encontradas nos grupos expostos ao Hg sugerem uma provável redução de taxa de fertilização, visto que a VCL e a VSL são significativamente maiores em amostras com maior de potencial de fertilização (VERSTEGEN et al., 2002), o que foi comprovado nos experimentos de FIV na dose de Hg8 μ M. As alterações de velocidade e retilinearidade encontradas no nosso estudo já foram observadas em espermatozoides de coelhos expostos por 4h ao Hg nas doses de 10 μ M a 100 μ M (CASTELLINI et al., 2009), novamente, doses mais altas que as utilizadas no nosso trabalho. Já a hiperatividade apresentada pelos espermatozoides no grupo Hg8 μ M alerta para o comprometimento da capacidade de fecundação no oócito, visto que esse é um importante biomarcador de fertilização e funcionalidade espermática (VERSTEGEN et al., 2002).

Além de parâmetros cinéticos, outros componentes da avaliação espermática são fundamentais para determinar a sua funcionalidade. Avaliamos a morfologia dos espermatozoides expostos ao Hg, e, a exposição ao metal não foi capaz de promover defeitos maiores, provavelmente devido ao fato desses defeitos estarem mais fortemente associados a danos durante sua formação, na fase espermatogênica (FRENEAU, 2011). No entanto, o Hg na maior concentração estudada (80 μ M) aumentou significativamente o número de defeitos menores e, a exposição ao Hg na maior e na dose intermediária (80 e 8 μ M) reduziu a quantidade de espermatozoides morfologicamente normais. De fato, a capacidade do metal em promover danos morfológicos já foi relatada não somente *in vitro* como também *in vivo* (ERNST; LAURITSEN, 1991; ARABI, 2005; CASTELLINI et al., 2009; MARTINEZ et al., 2014a). Dentre as possíveis explicações para os efeitos adversos do Hg estão a capacidade do metal em ligar-se a grupos sulfídricos presentes nas membranas celulares do espermatozoide o que, subsequentemente, afeta a permeabilidade e a integridade funcional das membranas e pode refletir na funcionalidade do gameta (ERNST; LAURITSEN, 1991; SILVA et al., 2011).

Os espermatozoides bovinos expostos ao Hg apresentaram danos na membrana espermática, crucial para o evento de fusão de membranas durante a fertilização o qual, portanto, pode comprometer a capacidade fértil do espermatozoide (CELEGHINI et al., 2010). Especificamente, a exposição ao Hg na concentração de 8 μ M comprometeu a integridade de membrana o que curiosamente, não ocorreu na maior dose testada do metal (80 μ M). Ainda que contraditório, visto que estudos anteriores apontam que quanto maior a dose exposta menor a integridade de membrana, esse efeito ímpar pode apontar um

mecanismo compensatório desencadeado pela presença do metal apenas na maior dose testada, o que ainda precisa ser melhor investigado.

Observamos nesse estudo que a exposição ao Hg *in vitro* promove aumento do EO e, este sim pode explicar não apenas as alterações de membrana espermática como também as demais disfunções observadas no espermatozoide, uma vez que os espermatozoides de mamíferos são ricos em ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) sendo facilmente suscetíveis ao ataque das EROS (MARTINEZ et al., 2014a). Assim, a produção excessiva e/ou acúmulo de EROs pode resultar em peroxidação lipídica e danos à membrana, inativação de enzimas glicolíticas, danos nas membranas acrosomais e oxidação do DNA (RAO; GANGADHARAN, 2008). A exposição ao Hg desencadeia um significativo aumento do EO o que foi observado em diversos sistemas como o nervoso, cardiovascular e renal (RIZZETTI et al., 2016a; VASSALLO; 2016; APAYDIN et al., 2016).

O aumento do EO e peroxidação lipídica observados em ambos os grupos de células espermáticas expostas ao Hg fortalece a relação Hg e elevação do EO e, corrobora com os estudos prévios sobre os efeitos do Hg no sistema reprodutor de animais e humanos (BOUJBIHA et al., 2009, MUTHU; KRISHNAMOORTHY, 2012, KALENDER et al., 2013, MARTINEZ et al., 2016; RIZZETTI et al., 2017). De fato, o malondialdeído (MDA) é um dos maiores produtos da peroxidação dos PUFAs e importante indicador de peroxidação lipídica (AGARWAL et al., 2014). Assim, o Hg pode alterar a organização dos elementos lipídicos da membrana espermática o que resultaria em espermatozoides defeituosos (ARABI, 2005). Estudos prévios *in vitro* e *in vivo* também apontaram essa relação entre Hg e o aumento do EO e sugerem que essa elevação do EO seja o principal desencadeador da toxicidade do Hg (BOUJBIHA et al.; 2009, MUTHU; KRISHNAMOORTHY, 2012; KALENDER et al., 2013; MARTINEZ et al., 2016).

Para combater a produção de EROs, o sistema reprodutor masculino especialmente a célula espermática apresenta um grande leque de antioxidantes endógenos (AGARWAL; BEDAIWY, 2003; AGARWAL et al., 2014). Nesse, sentido as defesas antioxidantes também são um indicador importante do desequilíbrio oxidativo promovido pela exposição ao Hg. Nosso estudo identificou uma redução da capacidade antioxidante total após exposição ao Hg em baixa dose, o que sugere ainda mais a excessiva produção de EROs após exposição ao metal e consequentemente, esgotamento e redução das defesas antioxidantes levando ao desenvolvimento das alterações espermáticas encontradas. Estudos anteriores do nosso grupo apontam para as diferenças de comportamento das defesas antioxidantes durante a exposição

a metais, com redução da capacidade antioxidante em próstata e testículo expostos ao alumínio (MARTINEZ et. al., 2017), e um aumento em epidídimo e testículo numa exposição crônica ao Hg (RIZZETTI et al., 2017), apontando para as mudanças transitórias das defesas antioxidantes em resposta as necessidades de proteção para um determinado órgão de acordo com as condições específicas de EO. No nosso estudo, a temporal redução da capacidade antioxidante pode sugerir a falência desse sistema em combater o aumento do EO com consequentemente esgotamento das defesas antioxidantes.

A funcionalidade dos gametas é melhor avaliada e entendida apenas se verificarmos a capacidade das mesmas em reproduzir-se. Nesse sentido, verificamos *in vitro* a capacidade fértil dos espermatozoides expostos a diferentes concentrações de Hg por meio da FIV. Nossos achados demonstram pela primeira vez que a exposição ao Hg na concentração de 8µM reduz a taxa de fertilização de espermatozoides. Embora não se tenham relatos prévios sobre o efeito do Hg em espermatozoides bovinos com relação a capacidade de fertilização *in vitro*, a exposição a outros metais pesados como o Cádmio (Cd) e o Chumbo (Pb), reduz a taxa de fertilidade de espermatozoides humanos expostos a baixas doses desses metais (KIM et al., 2010; BLOOM et al., 2010). Ainda, resultados similares foram observados em espermatozoides de ratos expostos ao Cromo hexavalente Cr (VI) com doses entre 6.25 a 50µM, onde ocorreu diminuição na taxa da FIV e um atraso da formação subsequente de blastocistos (YOISUNGNERN et al., 2015a). Em outro estudo realizado, a exposição de espermatozoides de ratos a nanopartículas de prata (Ag), doses entre 1- 50µg/mL, promoveu os mesmos efeitos deletérios na FIV (YOISUNGNERN et al., 2015b). Dentre os mecanismos responsáveis pela alteração da capacidade fértil avaliada em espermatozoides, os autores supracitados são unânimes em relacionar os efeitos adversos da exposição a estes metais, parcialmente, com a indução e aumento do EO, o que esta em consonância com nossos achados.

Através desse estudo, com o uso do modelo bovino, podemos evidenciar os efeitos tóxicos do Hg no gameta masculino e o impacto negativo na sua capacidade fértil. Podemos observar que os danos gerados numa exposição a 8µM provalmente prejudicou a etapa considerada pré - fertilização, que é justamente a interação entre o espermatozoide e a ZP. Uma das hipóteses possíveis para explicar este fenômeno é a indução de EO promovido por esta exposição o que repercute em alterações de parâmetros determinantes da funcionalidade do espermatozoide. Embora não investigado neste estudo, uma consequência deste achado em ratos e bovinos há relatos (ARABI 2005; BOUJBIHA et al.; 2009) que o EO gera perda da

capacitação deste gameta e isso pode ter interferir na sua reação acrossômica, hiperativação e dificultado a sua penetração no oócito.

8 CONCLUSÃO

Em resumo a exposição de espermatozoides bovinos a diferentes concentrações de Hg (Hg8nM, Hg8μM e Hg80μM):

- Indicou total imobilidade espermática no grupo Hg80μM em 0,5h de exposição;

Após 2h de incubação:

- Diminuiu os parâmetros cinéticos de: Motilidade Total (Hg8μM) e Progressiva (Hg8nM e Hg8μM); VCL (Hg8nM e Hg8μM); STR (Hg8nM) e hiperatividade (Hg8μM);
- Aumentou os defeitos menores (Hg80μM);
- Reduziu o número de espermatozoides normais (Hg8μM e Hg80μM);
- Reduziu a integridade de membrana plasmática (Hg8μM);
- Aumentou os níveis de EROS em ambas as doses investigadas;
- Aumentou os níveis de peroxidação lipídica em ambas as doses investigadas;
- Reduziu a capacidade antioxidante total em ambas as doses investigadas;
- Culminou com uma diminuição na taxa de penetração e fertilização total e normal (Hg8μM)

Diante dos resultados encontrados concluímos que a exposição de espermatozoides bovinos à baixa concentração de Hg favorece o aumento do estresse oxidativo que pode desencadear alterações na qualidade espermática e refletir na redução da sua capacidade fértil durante a FIV.

9 PERSPECTIVAS

Baseado nos resultados obtidos, as perspectivas para futuros trabalhos são:

- Avaliar o desenvolvimento embrionário oriundo de espermatozoides expostos ao Hg;
- Verificar os efeitos da exposição ao Hg no gameta feminino durante a FIV e no desenvolvimento embrionário;
- Investigar os efeitos da FIV e o desenvolvimento embrionário quando os dois gametas estão expostos ao Hg;
- Avaliar possíveis substâncias protetoras, como estratégias de atenuação contra os possíveis efeitos do Hg.

10 REFERÊNCIAS

ABARIKWU, S.B.; EBAH, S.G.; OBILOR, G.; AGBAM, G. Oral administration of Moringa oleifera oil but not coconut oil prevents mercury-induced testicular toxicity in rats. **Andrologia** p. 1–13, 2016.

AGARWAL, S.R.; BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertil Steril** v. 79, p 829 - 43, 2003.

AGARWAL, A.; GURPRIYA, V.; ONG, C.; PLESSIS, S.S. Effect of oxidative stress on male reproduction. **World J Mens Health** v.32, p. 1 - 17, 2014.

ARABI, M.; HEYDARNEJAD, M.S. In vitro mercury exposure on spermatozoa from normospermic individuals. **J. Biol. Sci.** v.10, p. 2448 - 2453, 2007.

ARABI, M. Bull spermatozoa under Mercury Stress. **Reprod Dom Anim** v.40, p. 454 - 459, 2005.

AGUADO, A.; GALÁN, M.; ZHENYUKH, O.; WIGGERS, A., G.; ROQUE, F., R.; REDONDO, S.; PEÇANHA, F.; MARTÍN, A.; FORTUÑO, A.; ACHOFEIRO, V.; TEJERINA, T.; SALAICES, M.; BRIONES, A.M. Mercury induces proliferation and reduces cell size in vascular smooth muscle cells through MAPK, oxidative stress and cyclooxygenase-2 pathways. **J. Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 268, n. 2, p.188 - 200, 2013.

AMARO, C.S.O.; RODRIGUES JUNIOR, D.; SILVA, M.C.F.; LIMA A.A.S.; SANTOS G.F.S.; PINHEIRO M.C.N. Concentração de mercúrio total (Hg-T) em peixes comercializados em diferentes períodos sazonais. **Pan-Amaz Saudev**.5, n.1, p. 53 - 60, 2014.

APAYDIN, F.G.; BAS, H.; KALENDER, S.; KALENDER, Y. Subacute effects of low dose lead nitrate and mercury chloride exposure on kidney of rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology** v.41,p. 219 - 224, 2016.

AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE (ASRM) Definition of 'infertility'. **Fertility and Sterility**v.82 (suppl. 1), S206,2004.

ARRIFANO G.P. F.; MARTÍN-DOIMEADIOS R. C. R.; JIMÉNEZ-MORENO M.; RAMÍREZ-MATEOS V.; SILVA N.F.S.; SOUZA-MONTEIRO J.R.; AUGUSTO-OLIVEIRA M.; PARAENSE R.S.O.; MACCHI B. M.; NASCIMENTO J. L. M.; CRESPO-LOPEZ M. E. Large-scale projects in the Amazon and human exposure to mercury: The case-study of the Tucuruí Dam. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v.147, p. 299 - 305, 2017.

ASK, K.; AKESSON, A.; BERGLUND, M. Inorganic mercury and methylmercury in placentas of Swedish women. **Environ Health Perspect.** v.110, p. 523 - 526, 2002.

ATTAMAN, J.A.; TOTH, T.L.; FURTADO, J.; CAMPOS, H.; HAUSER, R.; CHAVARRO, J.E. Dietary fat and semen quality among men attending a fertility clinic. **Hum. Reprod.** v.27, p. 1466 - 1474, 2012.

AZEVEDO, F. A. **Toxicologia do mercúrio.** São Carlos: RiMa. 1ª ed., 2003.

BARROSO, G.; VALDESPIN, C.; VEJA, E.; KERSHENOVICH, R.; AVILA, R.; AVENDANO, C.; OEHNINGER, S. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. **Fertility and Sterility.** v.92, n.3, 2009.

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

BERNHOF, A. Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature **Journal of Environmental and Public Health** v. 2012, 2012.

BISINOTI, M.C., JARDIM, W.F. O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. **Quim Nova.** v. 27, p. 593 - 600, 2004.

BLOOM, M.S.; PARSONS, P.J.; STEUERWALD, A.J.; SCHISTERMAN, E.F.; BROWNE, R.W.; KIM, K.; COCCARO, G.A.; NARAYAN, N.; FUJIMOTO, V.Y. Toxic trace metals and human oocytes during in vitro fertilization (IVF). **Reprod Toxicol.** v.29, n.3, p. 298–305, 2010.

BOUJBIHA, M. A.; HAMDEN, K.; GUERMAZI, F.; BOUSLAMA, A.; OMEZZINE, A.; KAMMOUN, A.; EL, F. A. Testicular toxicity in mercuric chloride treated rats: association with oxidative stress. **Reprod. Toxicol.** v.28, n.1, p. 81 - 9, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Coletânea de Informações sobre o Mercúrio Incluindo padrões ambientais no Brasil.** Brasília, 2010.

BRANDÃO, R., BORGES, L. P., DE OLIVEIRA, R., ROCHA, J. B., NOGUEIRA, C. W. Diphenyl diselenide protects against hematological and immunological alterations induced by mercury in mice. **J Biochem Mol Toxicol.** v.22, n.5, p. 311 - 9, 2008.

BUCK LOUIS, G.M.; SUNDARAM, R.; SCHISTERMAN, E.F.; SWEENEY, A.M.; LYNCH, C.D.; GORE-LANGTON, R.E.; CHEN, Z.; KIM, S.; CALDWELL, K.L.; BARR, D.B. Heavy metals and couple fecundity, the LIFE Study. **Chemosphere**. v.87, p. 1201 - 1207, 2012.

CAMPOS EBP, YOSHIDA WB. O Papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia reperfusão em retalhos cutâneos: modelo experimental e estratégias de tratamento. **J Vasc Br**. v.3, n.4, p.357- 66. 2004.

CARVALHO, O.F.; FERREIRA, J.D.J.; SILVEIRA, N.A.; FRENEAU, G.E. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* v. 38, n. 1, p. 33 - 38, 2002.

CASTAÑO, A.; CUTANDA, F.; ESTEBAN, M.; PÄRT, P.; NAVARRO, C.; GÓMEZ, S.; *et al*. Fish consumption patterns and hair mercury levels in children and their mothers in 17 EU countries. **Environmental Research** v.141, p. 58 - 68, 2015.

CASTELLINI C, MOURVAKIA E, SARTINI B, CARDINALI R, MORETTI E, COLLODEL G, FORTANER S, SABBIONI E, RENIERI T. In vitro toxic effects of metal compounds on kinetic traits and ultrastructure of rabbit spermatozoa. **Reprod Toxicol** v.27, p. 46 - 54, 2009.

CASTILHOS, Z.; RODRIGUES-FILHO, S.; CESAR, R.; RODRIGUES, A.P.; VILLAS-BÔAS, R.; JESUS, I.; LIMA, M.; KLEBER FAIAL, ANTÔNIO MIRANDA, A.; BRABO, E.; CHRISTIAN BEINHOFF, C.; SANTOS, E. Human exposure and risk assessment associated with mercury contamination in artisanal gold mining areas in the Brazilian Amazon. **Environ Sci Pollut Res** 2015.

CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J.; TICIANELLI, J.S.; ARRUDA, R.P. Damage Assessment of the Equine Sperm Membranes by Fluorimetric Technique **Braz. Arch. Biol. Technol**. v.53 n. 6: p. 1285 - 1292, 2010.

CLARKSON, T.; MAGOS, L. The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, v.36, p. 609 - 662, 2006.

CHOY, C.M.Y.; LAMB, C.W.K.; CHEUNG, L.T.F.; BRITON-JONES, C.M.; CHEUNG L.P.; HAINES, C.J. Infertility, blood mercury concentrations and dietary seafood consumption: a case-control study an International. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 109, p. 1121 - 1125, 2002.

COX, J.F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v.66, p. 860 - 867, 2006.

CRISCUOLO, T.; ROCHA, A.M.; SEMACO, E.; SERZEDELO, T.; ALEGRETTI, J.R.; SERAFINI, P.; MOTTA E.L.A. Motile sperm binding to egg yolk membrane is an easy and feasible function test for acrosome integrity. **JBRA Assist. Reprod.** v.4, n. 4, 2010.

DA CUNHA, V.; ROSSONI, L. V.; OLIVEIRA, P. A.; POTON, S.; PRETTI, S. C.; *et al.* Cyclooxygenase inhibition reduces blood pressure elevation and vascular reactivity dysfunction caused by inhibition of nitric oxide synthase in rats. **Clin Exp Hypertens.** v. 22, p. 203 - 15, 2000.

DA SILVA, R. R.; CASTELO BRANCO, J.; THOMAZ, S. M. T.; CESAR, A. Convenção de Minamata: análise dos impactos socioambientais de uma solução em longo prazo. **Saúde Debate** v. 41, p. 50 - 62, 2017.

DIETRICH, G.J.; DIETRICH, M.; KOWALSKI, R.K.; DOBOSZ, S.; KAROL, H.; DEMIANOWICZ, W.; GLOGOWSKI J. Exposure of rainbow trout milt to mercury and cadmium alters sperm motility parameters and reproductive success. **Aquatic Toxicology.** v. 97, p. 277 - 284, 2010.

EKINO, S.; SUSAKI, M.; NINOMIYA, T.; IMAMURA, K.; KITAMURA, T. Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. **J. Neurol. Sci.** v.262, n. 1 - 2, p.131 - 144, 2007.

ERNST, E., LAURITSEN, J.G. Effect of organic and inorganic mercury on human sperm motility. **Pharmacol. Toxicol.** v.68, p. 440 - 444, 1991.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - EPA. Mercury Study Report to Congress. U.S., Washington, DC. 1997.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA - FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014. **FAO**, 2014.

FIOROTT, T.H; ZANETTI, I.C.B.B. Tragédia do Povo Krenak pela Morte do Rio Doce/Uatu, no Desastreda Samarco/Vale/BHP, Brasil. **Journal of Social, Technological and Environmental Science.** v.6, n.2, p.127 - 146, 2017.

FURIERI, L. B.; GALÁN, M.; AVENDAÑO, M. S.; GARCÍA-REDONDO, A. B.; AGUADO, A.; MARTÍNEZ, S.; CACHOFEIRO, V.; BARTOLOMÉ, M. V.; ALONSO, M. J.; VASSALLO, D. V.; SALAICES, M. Endothelial dysfunction of rat coronary arteries after

exposure to low concentrations of mercury is dependent on reactive oxygen species. **Br J Pharmacol.** v.162, n. 8, p. 1819 -31, 2011.

FRENEAU G.E. Aspectos da morfologia espermática em touros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.35, n.2, p.160 - 170, 2011.

GENCHI, G.; SINICROPI, M.S.; CAROCCI, A.; LAURIA, G.; CATALANO, A. Mercury Exposure and Heart Diseases. **Int. J. Environ. Res. Public Health.** v. 14, n. 74, 2017.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.** 2ª. ed., Roca, São Paulo, 2008.

GONZALEZ-RAYMAT, H.; GUANGLIANG LIU, G.; CAROLINA LIRIANO, C.; YANBIN LI, Y.; YONGGUANG YIN, Y.; SHI, J.; GUIBIN JIANG, G.; CAI, Y. Elemental mercury: Its unique properties affect its behavior and fate in the environment. **Environmental Pollution.** v. 229, p. 69 - 86, 2017.

GORDON, I. R. **Laboratory production of cattle embryos.** Biotechnology in Agriculture Series: CABI Publishing, p. 576, 2003.

GRANDJEAN, P.; LANDRIGAN P.J. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. **Lancet.** v.368, p. 2167 - 78, 2006.

GUIMARÃES, D. B. **Proteínas da membrana plasmática do espermatozoide suíno e sua relação com a resistência ao processo de criopreservação.** Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2013.

HATEF, A.; ALAVI, S.M.H.; BUTTS, I.A.E.; POLICAR, T.; LINHART, O. Mechanism of action of mercury on sperm morphology, adenosine triphosphate content, and motility in *perca fluviatilis* (percidae; teleostei). **Environ. Toxicol. Chem.** v.30, 2011.

HALEEM, N.Y.A.; EL-AASAR, H.M.; SHERIF MOHAMED ZAKI, S.M.; SABRY S. M. EL-ZAINY, A.W. Concomitant protective and therapeutic role of verapamil in chronic mercury induced nephrotoxicity in the adult rat: histological, morphometric and ultrastructural study. **Arch Med Sci,** 2012.

HEATH, J.C., ABDELMAGEED, Y., BRADEN, T.D., GOYAL, H.O. The effects of chronic ingestion of mercuric chloride on fertility and testosterone levels in male Sprague Dawley rats. **J Biomed Biotechnol,** 2012.

HINSCH, E.; PONCE, A.A.; HA"GELE, W.; HEDRICH, F.; MU"LLER-SCHLO"SSER, F.; SCHILL, W-B.; HINSCH, K-D. A new combined in-vitro test model for the identification of substances affecting essential sperm functions. **Human Reproduction** v.12 n.8 p.1673 - 1681, 1997.

HOMME, K.G.; KERN, J.K.; HALEY, B.E.; GEIER, D.A.; KING, P.G.; SYKES, L.K.; GEIER, M.R. New science challenges old notion that mercury dental amalgam is safe. **Biometals** v. 27, p. 19 - 24, 2014.

HU X.F.; ECCLES K.M.; CHAN, H.M. High selenium exposure lowers the odds ratios for hypertension, stroke, and myocardial infarction associated with mercury exposure among inuit in Canada. **Environment International** v.102, p. 200 - 206, 2017.

KALENDER, S.; UZUN, F. G.; DEMIR, F.; UZUNHISARCIKLI, M.; ASLANTURK, A. Mercuric chloride-induced testicular toxicity in rats and the protective role of sodium selenite and vitamin E. **Food Chem. Toxicol.** v.55: p. 456 - 62, 2013.

KINGMAN, A.; ALBERTINI, T.; BROWN, L. J. Mercury concentrations in urine and whole blood associated with amalgam exposure in a US military population. **J Dent Res.** v.77, n.3, p. 461 - 71, 1998.

KINGMAN, A.; ALBERS, J. W.; AREZZO, J. C.; GARABRANT, D. H.; MICHALEK, J. E. Amalgam exposure and neurological function. **Neurotoxicology.** v. 26, p. 241 - 255, 2005.

KIM K, FUJIMOTO VY, PARSONS PJ, STEUERWALD AJ, BROWNE RW, BLOOM MS. Recent cadmium exposure among male partners may affect oocyte fertilization during in vitro fertilization (IVF). **Journal Assisted Reproduction Genetic** v. 27, p. 463 - 468, 2010.

KHOURY, E.D.T.;SOUZA, G.S.; SILVEIRA, L.C.L.; COSTA, C.A.; AMÉLIA A. DE ARAÚJO, A.A.; PINHEIRO, M.C.N. Manifestações neurológicas em ribeirinhos de áreas expostas ao mercúrio na Amazônia brasileira. **Cad. Saúde Pública.** v. 29, n 11, p. 2307 - 2318, 2013.

LANGBEEN, A.; DE PORTE, H.F.M.; BARTHOLOMEUS E.; LEROY, J.L.M.R.; BOLS, P.E.J. Bovine in vitro reproduction models can contribute to the development of (female) fertility preservation strategies. **Theriogenology.** v.84, p. 477 - 489, 2015.

LANGELAND, A.; HARDIN, R.D.; NEITZEL, R.L. Mercury Levels in Human Hair and Farmed Fish near Artisanal and Small-Scale Gold Mining Communities in the Madre de Dios River Basin, Peru. **Int. J. Environ. Res. Public Health.** v.14, p. 302, 2017.

LAPHAM, L.W.; CERNICHIARI, E.; COX, C.; MYERS, G.J.; BAGGS, R.B.; BREWER, R.; SHAMLAYE, C.F.; DAVIDSON, P.W.; CLARKSON, T.W. An analysis of autopsy brain

tissue from infants prenatally exposed to methylmercury. **Neurotoxicology**. v.16, p. 689 - 704, 1995.

LAZZARI, G.; TESSARO, I.; CROTTI, G.; GALLI, C.; HOFFMANN, S.; BREMER, S. et al. Development of an in vitro test battery for assessing chemical effects on bovine germ cells under the ReProTect umbrella. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.233, p. 360 - 70, 2008.

LEVINE, H.; JØRGENSEN, N.; MARTINO-ANDRADE, A.; MENDIOLA, J.; WEKSLER-DERRI, D.; MINDLIS, I.; PINOTTI, R.; SWAN, S.H. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. **Human Reprod Update** p.1-14, 2017.

LI, H.; ALUKO, R. E. Identification and inhibitory properties of multifunctional peptides from pea protein hydrolysate. **J. Agric. Food Chem.** v.58, p.11471 -76, 2010.

MATOS D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G.; TONIOLLI R. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura **Rev Bras Reprod Anim**.v.32, n.4, p.225 - 232, 2008.

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

MARTINEZ, C. S.; TORRES, J. G.; PECANHA, F. M.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; VASSALLO, D. V.; SALAICES, M.; ALONSO, M. J.; WIGGERS, G. A. 60-Day chronic exposure to low concentrations of HgCl₂ impairs sperm quality: hormonal imbalance and oxidative stress as potential routes for reproductive dysfunction in rats. **PlosOne**. v.9, p. e111202, 2014b.

MARTINEZ, C.S., PEÇANHA, F.M.;BRUM, D.S.; SANTOS, F.W.; FRANCO, J.L.;ZEMOLIN, A.P.P.;ANSELMO-FRANCI, J.A.;JUNIOR, F.B.; ALONSO, M.J.; SALAICES, M.; VASSALLO, D.V.; LEIVAS, F.G.; WIGGERS, G.A. Reproductive dysfunction after mercury exposure at low levels: evidence for a role of glutathione peroxidase (GPx) 1 and GPx4 in male rats. **Reproduction, Fertility and Development**.v. 2016, 2016.

MARTINEZ, C.S.; ESCOBAR, A.G.; URANGA-OCIO, J.A.; PEÇANHA, F.M.; VASSALLO, D.V.; EXLEY, C.; MIGUEL M.; WIGGERS G.A. Aluminum Exposure for 60days at Human Dietary Levels Impairs Spermatogenesis and Sperm Quality in Rats. **Reproductive Toxicology**. v.73, p.128-141, 2017.

MEEKER, J.D.; ROSSANO, M.G.; PROTAS, B.; DIAMOND, M.P.; PUSCHECK, E.; DALY, D.; PANETH, N.; WIRTH, J.J. Cadmium, Lead, and Other Metals in Relation to Semen Quality: Human Evidence for Molybdenum as a Male Reproductive. **Toxicant Environmental Health Perspectives**. v. 116, n. 11, 2008.

MELLO, R.R.; FERREIRA, J.E.; SOUSA, S.L.G.; MELLO, M.R.B.; PALHANO, H.B. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.40, n.2, p.58 - 64, 2016.

MENDIOLA J.; JOSÉ M MORENO, ROCA, M.; VERGARA-JUÁREZ, N.; MARTÍNEZ-GARCÍA, M.J.; ANTONIO GARCÍA-SÁNCHEZ, A.; BELÉN ELVIRA-RENDUELES, B.; MORENO-GRAU, S.; LÓPEZ-ESPÍN, J.J.; 3, TEM, J.; BERNABEU, R.; TORRESCANTERO, A.M. Relationships between heavy metal concentrations in three different body fluids and male reproductive parameters: a pilot study. **Environmental Health**, 10:6, 2011.

MESQUITA, M.; PEDROSO, T.F.; OLIVEIRA, C.S.; OLIVEIRA, V.A.; SANTOS, R.F.; BIZZI, C.A.; PEREIRA, M.E. Effects of zinc against mercury toxicity in female rats 12 and 48 hours after HgCl₂ exposure. **Excli Journal**. v.15, p. 256 - 267, 2016.

MÍNGUEZ-ALARCÓN, L.; AFEICHEA, M.C.; WILLIAMS, P.L.; ARVIZUD, M.; TANRIKUTE, C.; AMARASIRIWARDENAG, C.J.; FORDA, J.B.; HAUSERA, R. JORGE E. CHAVARRO, J.E. Hair mercury (Hg) levels, fish consumption and semen parameters among men attending a fertility center International. **Journal of Hygiene and Environmental Health**, 2017.

MORENO-ORTEGA, A.; MORENO-ROJAS, R.; INEZ-ALVAREZ, J.R.M.; ESTECHA, M.G.; GONZALEZ, N.P.C.; LOPEZ, M.A.A. Probabilistic risk analysis of mercury intake via food consumption in Spain. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v.43, p. 135 - 141, 2017.

MUTHU, K.; KRISHNAMOORTHY, P. Effect of vitamin C and vitamin E on mercuric chloride-induced reproductive toxicity in male rats. **Biochem Pharmacol** v.1, p.102, 2012.

NARVÁEZ, D.M.; GROOT, H.; SONIA M. DIAZ, PALMA, R.M.; MUÑOZ, N.; CROS, M.P.; HERNÁNDEZ-VARGAS, H. Oxidative stress and repetitive element methylation changes in artisanal gold miners occupationally exposed to mercury. **Heliyon**. v.3, e004002017, 2017.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. Toxicological Effects of Methylmercury. **National Research Council**, Washington, DC, USA, 2000.

OLIVEIRA C.S.; JOSHEE L.; ZALUPS R.K.; PEREIRA, M.E.; BRIDGES, C.C. Disposition of inorganic mercury in pregnant rats and their offspring. **Toxicology**. v.1, n. 335, p. 62 - 71, 2015.

OLIVEIRA C.S.; OLIVEIRA, V.A.; COSTA, L.M.; PEDROSO, T.P.; MARIANA M. FONSECA, M.M.; BERNARDI, J.S.; FIUZA, T.L.; PEREIRA, M.E. Inorganic mercury exposure in drinking water alters essential metal homeostasis in pregnant rats without altering rat pup behavior. **Reproductive Toxicology**. v.65, p 18 - 23, 2016.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE – OPAS. Cooperação Técnica entre Brasil, Bolívia e Colômbia: Teoria e Prática para o Fortalecimento da Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Mercúrio. Brasília: **OPAS**, 2011.

OSHIO, L.T.; GUERRA, M.O. Métodos em toxicologia do sistema reprodutor masculino e fertilidade em roedores **Revista Interdisciplinar de Estudos experimentais**. v. 1, n. 3, p. 148 -152, 2009.

PARK, J-D.; ZHENG, W. Human Exposure and Health Effects of Inorganic and Elemental Mercury. **J Prev Med Public Health**. v. 45, p. 344 - 352, 2012.

PEÇANHA, F. M.; WIGGERS, G. A.; BRIONES, A. M.; PEREZ-GIRON, J. V.; MIGUEL, M.; GARCIA-REDONDO, A. B.; VASSALLO, D.V.; ALONSO, M. J.; SALAICES, M. The role of cyclooxygenase (COX)-2 derived prostanoids on vasoconstrictor responses to phenylephrine is increased by exposure to low mercury concentration. **J Physiol Pharmacol**. v. 61, n. 1, p. 29 - 36, 2010.

PENNA, S.; POCINO, M.; MARVAL, M.J.; LLORETA, J.; GALLARDO, L.; VILA, J. Modifications in Rat Testicular Morphology and Increases in IFN-g Serum Levels by the Oral Administration of Subtoxic Doses of Mercuric Chloride. **Systems Biology in Reproductive Medicine**. v.55, p. 69 - 84, 2009.

LACERDA L.D.; PFEIFFER W.C. O mercúrio dos garimpos de ouro na amazônia – uma revisão. **Química Nova** v.15, n. 2, 1992.

QIAO, Q., LIU, W., WU, K., SONG, T., HU, J., HUANG, X., WEN, J., CHEN, L., ZHANG, X. Female zebrafish (*Danio rerio*) are more vulnerable than males to microcystin-LR exposure, without exhibiting estrogenic effects. **Aquat. Toxicol**. v.142, p. 272 - 282, 2013.

RAO, M. V.; GANGADHARAN, B. Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro. **Toxicol. In Vitro**. v.22, p. 935 - 42, 2008.

RAO, M. V.; SHARMA, P. S. Protective effect of vitamin E against mercuric chloride reproductive toxicity in male mice. **Reprod. Toxicol**. 15:705 - 12, 2001.

REBELO, F.M.; CUNHA, L.R.; ANDRADE, P.D.; COSTA JUNIOR, W.A.; BASTOS, W.R.; CALDAS, E.D. Mercury in breast milk from women in the Federal District, Brazil and dietary risk assessment for breastfed infants. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v.44, p. 99 - 103, 2017.

RICE, D.C. 2004. The US EPA reference dose for methylmercury: sources of uncertainty. **Environ Res**. v.95, p 406 - 413.

RIBAROV, S. R., BENOVOV, L. C. Relationship between the hemolytic action of heavy metals and lipid peroxidation. **Biochim Biophys Acta**. v.640, p. 721 - 6, 1981.

RIZZETTI, D.A.; MARTINEZ, C.S.; ESCOBAR, A.G.; SILVA, T.M.; URANGA-OCIO, J.A.; PEÇANHA, F.M.; VASSALLO, D.V.; CASTRO, M.M.; WIGGERS GA. Egg white-derived peptides prevent male reproductive dysfunction induced by mercury in rats. **Food Chem Toxicol**. v.100, p. 253 - 264, 2017.

RUBINO, F.M. Toxicity of Glutathione-Binding Metals: A Review of Targets and Mechanisms. **Toxics**. v.3, p. 20 - 62, 2015.

SAFARINEJAD, M.R. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on semen profile and enzymatic anti-oxidant capacity of seminal plasma in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratospermia: a double-blind, placebo-controlled, randomised study. **Andrologia**. v.43, p 38 - 47, 2011.

SANTOS, R.R.; SCHOEVERS, E.J.; ROELEN, B.A.J. Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v.12, p. 117, 2014.

SELIN, N.E. Global change and mercury cycling: challenges for implementing a global mercury treaty. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9999, n. 9999, p. 1 - 9, 2014.

SINGH BK, Compêndio de Andrologia e Inseminação Artificial em Animais de Fazenda, 1ª. ed., **Andrei**, São Paulo, 331 p., 2006.

SILVA, D.A.F.; TEIXEIRA, C.T.; SCARANO, W.R.; FAVARETO, A.P.A.; FERNANDEZ, C.D.B.; GROTO, D.; BARBOSA JR., F.; KEMPINAS, W.G. Effects of methylmercury on male reproductive functions in Wistar rats. **Reproductive Toxicology** v.31, p. 431- 439, 2011.

SLIVKOVA, J.; MASSANYI, P.; PIZZI, F.; TRANDZIK, J.; ROYCHOUDHURY, S.; LUKAC, N.; DANKOVA, M.; ALMASIOVA, V. In vitro toxicity of mercuric chloride on

rabbit spermatozoa motility and cell membrane integrity. **Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**. v.45, p. 767 - 774, 2010.

STOHS, S. J., BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biol Med**. v.18, p.321 - 36, 1995.

SYVERSEN, T.; KAUR, P. The toxicology of mercury and its compounds. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology** v.26, p. 215 - 226, 2012.

TAKEDA, S.H.K.; KUNO, R.; BARBOSA, F., GOUVEIA, N. Trace element levels in blood and associated factors in adults living in the metropolitan area of Sao Paulo, Brazil. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. 2017.

TESSARO, I.; MODINA, S.C.; CROTTI, G.; FRANCIOSI F.; COLLEONI, S.; LODDE, V.; GALLI, C.; LAZZARI, G.; LUCIANO, A.M. Transferability and inter-laboratory variability assessment of the in vitro bovine oocyte fertilization test. **Reprod Toxicol**. v.51, p.106-13, 2015.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME – UNEP. Global Mercury Assessment 2013: Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport. **UNEP Chemicals Branch**, Geneva, Switzerland, 2013.

VAMNES, J. S.; EIDE, R.; ISRENN, R.; HÖL, P. J.; GJERDET, N. R. Diagnostic value of a chelating agent in patients with symptoms allegedly caused by amalgam fillings. **J Dent Res**. v.79, n. 3, p. 868 - 74, 2000.

VASSALLO, D. V.; SIMÕES, M. R.; FURIERI, L. B.; FIORESI, M.; FIORIM, J.; et al. Toxic effects of mercury, lead and gadolinium on vascular reactivity. **Braz J Med Biol Res**. v.44, 2011.

VASSALLO, DV. Efeitos tóxicos de mercúrio sobre a pressão arterial e a contratilidade miocárdica. **Salus J Health Sci**. v.2, n 3, p.1 - 10, 2016.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**. v.57, p. 149 - 179, 2002.

VIRTANEN, J.K.; RISSANEN, T.H.; VOUTILAINEN, S.; TUOMAINEN, T.P. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. **J Nutr Biochem**. v.18, n 2, p. 75 - 85, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Preventing disease through healthy environments exposure to mercury: a major public health concern. **WHO**, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO: **Assessing the environmental burden of disease at national and local levels**. Environmental Burden of Disease Series n. 16. WHO, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Laboratory manual for the examination and processing of human sperm**, 5th edn. WHO, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Environmental and occupational health hazards associated with artisanal and small-scale gold mining**. WHO, 2016

WIGGERS, G. A.; PEÇANHA, F. M.; BRIONES, A. M.; PÉREZ-GIRÓN, J. V.; MIGUEL, M.; VASSALLO, D. V.; CACHOFEIRO, V.; ALONSO, M. J.; SALAICES, M. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v.295, p. H1033 - 43, 2008a.

WRIGHT, D.L.; AFEICHE, M.C.; EHRLICH, S.; SMITH, K.; WILLIAMS, P.L.; CHAVARRO, J.E.; BATSIS, M.; TOTH, T.L.; HAUSER, R.; Hair mercury concentrations and in vitro fertilization (IVF) outcomes among women from a fertility clinic. **Reprod Toxicol**. v.51, p. 125 - 132, 2015.

YOISUNGNERN, T.; CHOI, Y-J.; HAN, J.W.; 1, KANG, M-H.; DAS, J.; GURUNATHAN, S.; DEUG-NAM KWON D-N.; SSANG-GOO CHO, S-G.; CHANKYU PARK,C.; CHANG, W.K.; CHANG, B-S.; PARNPAI, R.; KIM, J-H. Internalization of silver nanoparticles into mouse spermatozoa results in poor fertilization and compromised embryo development. **Sci. Rep**. v.5, 11170, 2015b.

YOISUNGNERN, T.; DAS, J.; CHOI, Y-J.; PARNPAI, R.; KIM, J-H. Effect of hexavalent chromium-treated sperm on *in vitro* fertilization and embryo development. **Toxicology and Industrial Health**. v.2015, 2015a.

YOSHIDA, S.; MATSUMOTO, S.; KANCHIKA, T.; HAGIWARA, T.; MINAMI, T.; The organic mercury compounds, methylmercury and ethylmercury, inhibited ciliary movement of ventricular ependymal cells in the mouse brain around the concentrations reported for human poisoning. **NeuroToxicology**. v. 57, p. 69 - 74, 2016.

ZHANG, Q.F.; LI, Y.W.; LIU, Z.H; CHEN, Q.L. Reproductive toxicity of inorganic mercury exposure in adult zebrafish: histological damage, oxidative stress, and alterations of sex hormone and gene expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. **Aquatic Toxicology**. 2016.

ZAFAR, A.; EQANI, S.A.M.A.S.; BOSTAN, N.; CINCINELLI, A.; TAHIR, F.; SHAH, S.T.A.; HUSSAIN, A.; LAMDAR, A.; HUANG, Q.; PENG, S.; SHEN, H. Toxic metals signature in the human seminal plasma of Pakistani population and their potential role in male infertility. **Environ Geochem Health**. v. 2014, 2014.

ZHOU, Y.; FU, X-M.; HE, D-L.; ZOU, X-M.; WU, C-Q.; GUO, W-Z.; FENG, W. Evaluation of urinary metal concentrations and sperm DNA damage in infertile men from an infertility clinic. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 45, p. 68 - 73, 2016.

ANEXOS

Experimental design

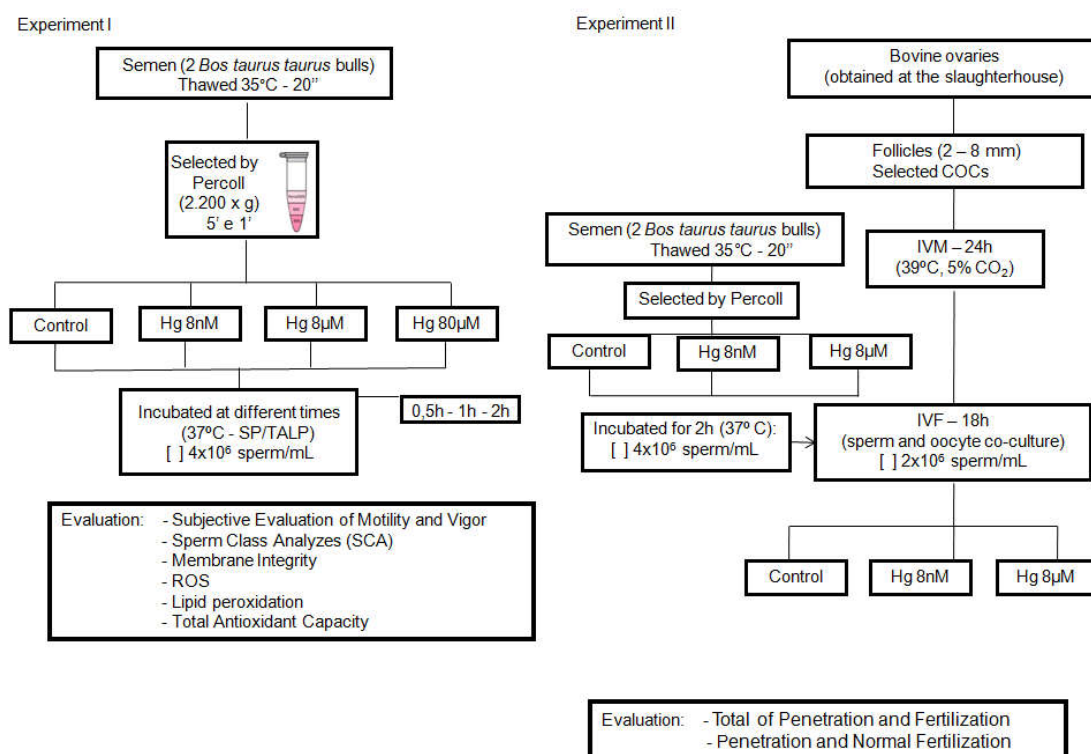


Figura1. Experimental design

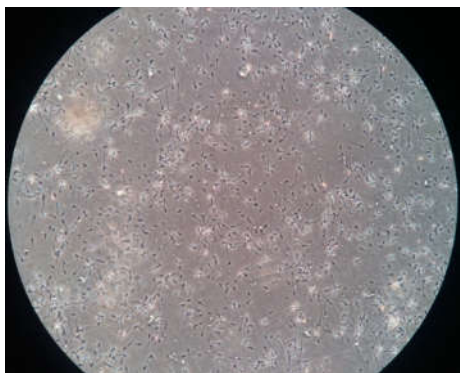


Figura 2. Espermatozoides após descongelamento de palhetas

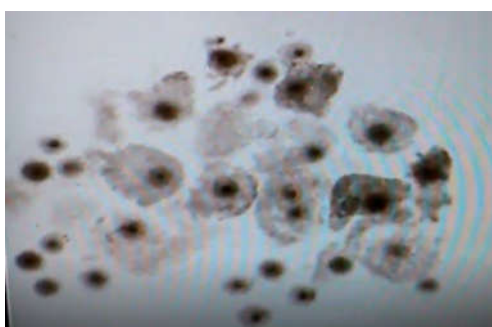


Figura 3. Oócitos Maturados

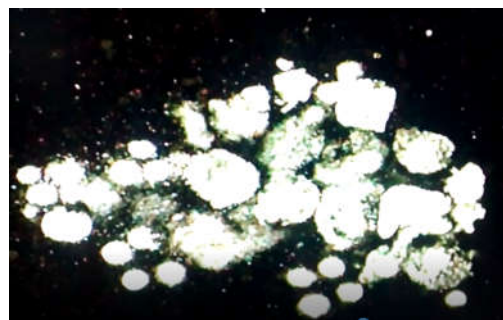


Figura 4. FIV (co-cultivo de espermatozoides e oócitos)