

INGRA MONIQUE DUARTE LOPES

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS OXIDATIVOS ENVOLVIDOS NAS ALTERAÇÕES DA
FUNÇÃO ESPERMÁTICA DE RATOS WISTAR APÓS EXPOSIÇÃO À
NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Guarapuava

2017

INGRA MONIQUE DUARTE LOPES

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS OXIDATIVOS ENVOLVIDOS NAS ALTERAÇÕES DA
FUNÇÃO ESPERMÁTICA DE RATOS WISTAR APÓS EXPOSIÇÃO À
NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, UNICENTRO.

Orientadora: Prof. Dra. Renata Marino Romano

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Romano

Guarapuava

2017

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

Lopes, Ingra Monique Duarte

L864a Avaliação de mecanismos oxidativos envolvidos nas alterações da função espermática de ratos wistar após exposição à nanopartículas de prata / Ingra Monique Duarte Lopes. -- Guarapuava, 2017
xv, 62 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, 2017

Orientadora: Renata Marino Romano

Coorientador: Marco Aurélio Romano

Banca examinadora: Renata Marino Romano, Larissa Sakis Bernardi, Luciana Dalazen dos Santos

Bibliografia

1. Ciências Farmacêuticas. 2. Espermatozôgenese. 3. Atividade enzimática. 4. Expressão gênica. 5. Metabolismo oxidativo. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615

TERMO DE APROVAÇÃO

INGRA MONIQUE DUARTE LOPES

Avaliação de Mecanismos Oxidativos Envolvidos nas Alterações da Função Espermática de Ratos Wistar Após Exposição à Nanopartículas de Prata

Dissertação aprovada em 15/12/2017 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacéuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:



Prof. Dra. Renata Marino Romano, UNICENTRO
Presidente



Prof. Dra. Larissa Sakis Bernardi, UNICENTRO
Membro



Prof. Dra. Luciana Dalazen dos Santos, UNOPESC
Membro

Guarapuava - PR
2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar saúde, força e por colocar em meu caminho verdadeiros amigos para juntos superarmos todas as dificuldades, especialmente nestes anos como universitária.

À Universidade, pela oportunidade de fazer o curso de mestrado e pelo ambiente agradável que proporciona.

À Prof^a. Dr^a. Renata Marino Romano e ao Prof. Dr. Marco Aurélio Romano pela oportunidade, confiança, orientação e apoio na elaboração deste trabalho. Agradeço também ao Prof. Dr. Najeh Maissar Kalil pelo auxílio e tempo dedicado aos meus experimentos.

Aos meus pais Moacir e Mariza, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Agradeço em especial a minha mãe, Mariza, heroína que me deu apoio e incentivo nas horas difíceis, de desânimo, cansaço e quando a conta corrente ficava negativa, e sempre me incentivou a confiar que todo o esforço valerá à pena. Agradeço aos meus tios Lúcia Helena e Olivo pelo acolhimento, incentivo e confiança nesta fase final.

Obrigada aos meus irmãos, Ninho por acreditar em mim e sempre me fazer lembrar que sou capaz; Niciu (e Maiara) por me dar o melhor presente de todos, meu afilhado Samuel. Enfim, a toda minha família, que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente!

Meus agradecimentos às amigas Emilli e Dani Pauluk que desde a graduação compartilham comigo as dificuldades, os dias de desespero, carência e saudade de casa, as tardes de chimarrão e pão de queijo, mas principalmente, que comemoraram cada uma das minhas conquistas.

Aos novos amigos que fiz no mestrado, Júlio, Rossana e Isabela. Júlio, obrigada por me convidar pra ser sua amiga e não desistir de sair comigo mesmo com uma tempestade, que nossa amizade resista a todas elas. Rossana, obrigada por vir ao Brasil pra nos mostrar como enfrentar as dificuldades de cabeça erguida, com simpatia e bom humor, ter você por perto torna meus dias muito (mas muito mesmo) mais divertidos. Isa, obrigada por toda a ajuda com os experimentos no laboratório e pelas diversas vezes que eu não entendia nada e você calmamente me explicava tudo denovo, mesmo que fosse pela terceira vez no dia! Preciso te agradecer ainda por cada palavra, cada conselho e por me ouvir naqueles dias que eu queria largar tudo e voltar pra casa, que eu não sabia pra

onde ir, que tinha dúvidas se estava no caminho certo, e todas as outras crises que tive, sua calma, sensatez e preocupação foram essenciais pra me ajudar a concluir essa etapa. Aos 3, obrigada por me mostrarem que é possível estar em família mesmo longe de casa. Obrigada pelas sextas e sábados (às vezes segunda, quarta...) que dançamos juntos, que passeamos de bar em bar, que bebemos as cervejas mais baratas e os melhores *drinks*. Obrigada por jogarem comigo o jogo da discórdia, mas não discordarmos nunca. Que vocês permaneçam sempre presentes em minha vida, seja na faculdade, nos barzinhos, em casa, por e-mail, sinal de fogo, no Brasil ou na Venezuela. Que tenhamos sensibilidade suficiente pra para entendermos o valor desta uma amizade e sabedoria para encontrar uma forma de mantê-la viva.

Aos colegas do mestrado Guilherme, Raul, Samantha, Débora, Jéssica, Bruno, Eduardo, e do laboratório pela amizade e contribuição para minha formação. Em especial à Mônica por sempre estar disposta a me ajudar em cada experimento e a Dani de Paula por compartilhar o medo de nada dar certo, as dúvidas intermináveis e finalmente a alegria do dever cumprido.

Às amigas de Palotina que permanecem, mesmo longe, me incentivando. Aos amigos da graduação que me deram pouso, que me visitaram, que me emprestaram seus pais, que pegaram meus pais emprestados, que estavam ao meu lado nos churrascos, aniversários ou aqueles que simplesmente me enviaram uma mensagem pra me lembrar que mesmo distante, ainda temos uns aos outros.

Ao meu namorado, por toda paciência, compreensão e amor nesses últimos meses. Sou grata por cada gesto carinhoso, por cada sorriso, por cada quilômetro percorrido para estar ao meu lado. Obrigada Andrei, meu amor.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

As nanopartículas de prata (AgNPs) são comumente utilizadas por suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais, porém, apesar do crescente interesse pelo seu mecanismo de ação, benefícios e possível toxicidade, devido a ampla exposição e variação no tamanho das nanopartículas (NPs), sua caracterização toxicológica ainda não está bem definida. Previamente, observamos alterações na integridade espermática, com comprometimento da membrana plasmática e acrossomal e redução da atividade mitocondrial em ratos expostos durante a pré-puberdade a baixas doses. O equilíbrio entre a atividade pró-oxidante e a proteção antioxidante é essencial para a maturação, armazenamento e viabilidade dos espermatozoides. Assim, nosso objetivo foi avaliar se a atividade enzimática da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPX) e glutationa redutase (GSR), e se a expressão dos transcritos dos genes envolvidos nesses mecanismos (*Cat*, *Sod1*, *Gpx4 var1*, *Gpx4 var2* e *Gsr*) foi alterada. Ratos Wistar pré-púberes foram tratados com 15; 7,5; 3,75 ou 1,875 µg de AgNP/Kg, e um grupo controle recebeu apenas o diluente. A administração das doses foi por gavagem, em dias alternados, do 23º ao 60º dia de idade, onde os animais foram eutanasiados por sobrecarga anestésica e os testículos foram excisados, congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C. Após extração do mRNA foi realizada a identificação de alterações de expressão dos transcritos para os genes da *Cat*, *Sod1*, *Gpx4 var1*, *Gpx4 var2* e *Gsr* por transcrição reversa seguida por PCR em tempo real; foi realizada quantificação proteica pelo método de Bradford e, para mensuração das atividades enzimáticas foram realizados o método descrito por Aebi para a CAT e *kits* comerciais para a SOD, GPX e GSR, seguindo as instruções do fabricante. Foram consideradas diferenças estatísticas quando $p < 0,05$. Quanto aos efeitos da exposição pré-pubere às AgNPs sobre a expressão gênica testicular, a expressão de *Cat* foi aumentada apenas no grupo tratado com a menor dose, 1,875 µg/Kg ($p < 0,01$). A expressão de *Sod1* diminuiu no grupo tratado com a dose de 3,75 µg/Kg de AgNPs ($p < 0,05$). A expressão dos níveis de mRNA de *Gpx4 var1* aumentou em todos os grupos tratados ($p < 0,001$ para o grupo tratado com 3,75 µg/Kg, e $p < 0,0001$ para os grupos tratados com 1,875 µg/Kg, 7,5µg/Kg e 15 µg/Kg); por outro lado, a exposição pré-pubere às AgNPs diminuiu os níveis de expressão do transcrito de *Gpx4 var2* somente no grupo exposto à dose de 3,75 µg/Kg de AgNPs ($p < 0,001$). A exposição pré-pubere à dose de 3,75 µg/Kg de AgNPs diminuiu os níveis de mRNA de *Gsr* ($p < 0,001$). Os ensaios de atividade enzimática mostraram que a exposição pré-pubere às AgNPs causou um aumento na atividade enzimática da CAT no grupo exposto a dose de 15 µg/Kg de ($p < 0,05$). A atividade enzimática da SOD não sofreu alterações significativas. A

atividade enzimática da GPX e da GSR também foi aumentada no grupo exposto à maior dose, 15 µg/Kg de AgNPs ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente). Todos os transcritos apresentaram alguma alteração na sua expressão. Os resultados sugerem que as AgNPs podem agir como desreguladores químicos e interferir nos genes ligados ao equilíbrio oxidativo bem como na atividade enzimática das enzimas envolvidas neste processo, entretanto, mais avaliações são necessárias para se explicar os mecanismos envolvidos em tais alterações.

Palavras chave: Espermatogênese; Atividade enzimática; Expressão gênica; Metabolismo oxidativo.

ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgNPs) are commonly used for their antibacterial, antifungal and antiviral properties. However, despite the increasing interest in their mechanism of action, benefits and possible toxicity, due to the wide exposure and variation in the size of the nanoparticles, its toxicological characterization is still not well defined. Previously, we observed alterations in sperm integrity, with plasma and acrosomal membrane impairment and reduction of mitochondrial activity in exposed rats during prepubertal at low doses. The balance between pro-oxidant activity and antioxidant protection is essential for sperm maturation, storage and viability. In this manner, the objective of this study was to evaluate the enzymatic activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) and glutathione reductase (GSR), and the transcript expression of the genes involved in these mechanisms (*Cat*, *Sod1*, *Gpx4 var1*, *Gpx4 var2* e *Gsr*). For this, prepubertal male Wistar rats were treated with 15; 7.5; 3.75 or 1.875 µg of AgNP/Kg, and a control group received only the diluent. Dosing was by gavage, from 23 throughout 60 days old. At 60 days old, animals were euthanized and the testes were collected, immediately frozen in liquid nitrogen and storage at -80°C. The samples were pulverized in liquid nitrogen, aliquoted and the total RNA was extracted by guanidine-phenol-chloroform method. mRNA was reverse transcribed with oligodT and cDNA was subjected to real time PCR for the evaluation of transcript expression. The enzymatic activity was evaluated with the resources of commercial kits, according to the manufacturer instructions. Data were analyzed by ANOVA followed by posthoc test of Dunnett and the differences between treatments were considered when $p < 0.05$. Regarding the effects of pre-pubertal exposure to AgNPs on testicular gene expression, *Cat* expression was increased only in the group treated with the lowest dose (1.875 µg AgNP/Kg, $p < 0.01$). The transcript expression of *Sod1* was decreased in the group treated with 3.75 µg AgNP/kg ($p < 0.05$). The transcript expression of *Gpx4 var1* mRNA was increased in all treated groups ($p < 0.001$); on the other hand, pre-pubertal exposure to AgNPs decreased the levels of *Gpx4 var2* transcript expression only in the group exposed to 3.75 µg/kg AgNPs ($p < 0.001$). Prepubertal exposure at the dose of 3.75 µg/kg AgNPs decreased levels of *Gsr* mRNA ($p < 0.001$). The enzymatic activity assays showed that pre-pubertal exposure to AgNPs caused an increase in CAT enzyme activity in the exposed group at a dose of 15 µg/kg ($p < 0.05$). The enzymatic activity of SOD did not change significantly. The enzymatic activity of GPX and GSR was also increased in the group exposed to the highest dose, 15 µg/kg AgNPs ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively). All transcripts of the studied genes showed some alteration in their expression. The results suggest that AgNPs may

act as chemical disrupter and interfere with the genes linked to the oxidative balance as well as the enzymatic activity of the enzymes involved in this process, however, more evaluations are necessary to explain the mechanisms involved in such alterations.

Key-words: Spermatogenesis; Enzymatic activity; Gene expression; Oxidative metabolism.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Primers *forward* (F) e *reverse* (R) de cada gene utilizado para o ensaio de PCR em tempo real e as respectivas sequências de referência. 32

Quadro 2 – Padronização do ensaio de RT-qPCR para os genes *Cat*, *Sod1*, *Gpx4 var1*, *Gpx4var2*, *Gsr* e *Rpl19*. 39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reações químicas responsáveis pela formação de H ₂ O ₂ em presença de SOD. Modificado de Bast et al., (1991).	25
Figura 2 - Reações químicas responsáveis pela formação H ₂ O a partir do H ₂ O ₂ em presença de CAT. Modificado de Bast et al., (1991).	25
Figura 3 - Vias enzimáticas de manutenção da glutathiona na forma reduzida. Adaptado de Ribeiro et al., (2005).	26
Figura 4 - Localização dos oligonucleotídeos para a amplificação do transcrito da catalase.	37
Figura 5 - Localização dos oligonucleotídeos para a amplificação do transcrito da superóxido dismutase 1.	37
Figura 6 - Localização dos oligonucleotídeos para a amplificação do transcrito da glutathiona peroxidase variante 1 (A) e variante 2 (B).	38
Figura 7 - Localização dos oligonucleotídeos para a amplificação do transcrito glutathiona redutase.	38
Figura 8 - Localização dos oligonucleotídeos para a amplificação do transcrito da proteína ribossomal L19.	38
Figura 9 - Curva de dissociação e curva padrão relativa mostrando a especificidade da reação e a eficiência de amplificação para os ensaios do gene <i>Cat</i> no testículo.	40
Figura 10 - Curva de dissociação e curva padrão relativa mostrando a especificidade da reação e a eficiência de amplificação para os ensaios do gene <i>Sod1</i> no testículo.	40
Figura 11 - Curva de dissociação e curva padrão relativa mostrando a especificidade da reação e a eficiência de amplificação para os ensaios dos genes <i>Gpx4 var1</i> e <i>Gpx4var2</i> no testículo.	41

Figura 12 - Curva de dissociação e curva padrão relativa mostrando a especificidade da reação e a eficiência de amplificação para os ensaios do gene <i>Gsr</i> no testículo.	42
Figura 13 - Curva de dissociação e curva padrão relativa mostrando a especificidade da reação e a eficiência de amplificação para os ensaios do gene <i>Rpl19</i> no testículo.	42
Figura 14 - Expressão testicular dos transcritos de <i>Cat</i> dos grupos tratados com 1,875 µg/Kg, 3,75 µg/Kg, 7,5 µg/Kg e 15 µg/Kg de AgNPs e do grupo controle.	43
Figura 15 - Expressão testicular dos transcritos de <i>Sod1</i> dos grupos tratados com 1,875 µg/Kg, 3,75 µg/Kg, 7,5 µg/Kg e 15 µg/Kg de AgNPs e do grupo controle.	43
Figura 16 - Expressão testicular dos transcritos de <i>Gpx4 var1</i> e <i>Gpx4var2</i> dos grupos tratados com 1,875 µg/Kg, 3,75 µg/Kg, 7,5 µg/Kg e 15 µg/Kg de AgNPs e do grupo controle.	44
Figura 17 - Expressão testicular dos transcritos de <i>Gsr</i> dos grupos tratados com 1,875 µg/Kg, 3,75 µg/Kg, 7,5 µg/Kg e 15 µg/Kg de AgNPs e do grupo controle.	45
Figura 18 – Atividade enzimática da CAT dos grupos tratados com 1,875 µg/Kg, 3,75 µg/Kg, 7,5 µg/Kg e 15 µg/Kg de AgNPs e do grupo controle.	46
Figura 19 – Atividade enzimática da SOD dos grupos tratados com 1,875 µg/Kg, 3,75 µg/Kg, 7,5 µg/Kg e 15 µg/Kg de AgNPs e do grupo controle.	46
Figura 20 – Atividade enzimática da GPX dos grupos tratados com 1,875 µg/Kg, 3,75 µg/Kg, 7,5 µg/Kg e 15 µg/Kg de AgNPs e do grupo controle.	47
Figura 21 – Atividade enzimática da GSR dos grupos tratados com 1,875 µg/Kg, 3,75 µg/Kg, 7,5 µg/Kg e 15 µg/Kg de AgNPs e do grupo controle.	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Desreguladores endócrinos	18
2.2 Prata	19
2.3 Nanopartículas de prata (AgNPs)	20
2.4 Toxicidade das AgNPs sobre os parâmetros reprodutivos e o metabolismo oxidativo	22
2.5 Atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) e glutathione reductase (GSR) no testículo	24
3 OBJETIVOS	28
3.1 Hipótese central e Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 METODOLOGIA	29
4.1 Animais	29
4.2 Delineamento experimental	29
4.3 Determinação das doses de AgNPs.....	29
4.4 Exposição às nanopartículas de prata (AgNPs).....	30

4.5 Colheita e armazenamento de tecidos	31
4.6 Identificação das alterações na expressão gênica pela quantificação do mRNA dos transcritos dos genes que codificam as enzimas CAT, SOD, GPX e GSR	31
4.6.1 <i>Homogeneização e Extração de RNA total dos testículos</i>	31
4.6.2 <i>Reação de Transcrição Reversa (RT)</i>	31
4.6.3 <i>Confeção dos oligonucleotídeos (primers)</i>	32
4.6.4 <i>Padronização dos primers</i>	33
4.6.5 <i>Reação de quantificação por PCR em tempo real a partir da transcrição reversa (RT-qPCR)</i>	33
4.7 Atividade enzimática.....	33
4.7.1 <i>Extração das proteínas totais</i>	33
4.7.2 <i>Quantificação proteica</i>	34
4.7.3 <i>Atividade da enzima catalase (CAT)</i>	34
4.7.4 <i>Atividade da enzima supersóxido dismutase (SOD)</i>	35
4.7.5 <i>Atividade da enzima glutationala peroxidase (GPX).....</i>	35
4.7.6 <i>Atividade da enzima glutationala redutase (GSR).....</i>	36
4.8 Análise estatística.....	36
5 RESULTADOS	36

5.1 Avaliação da suspensão de AgNPs por dispersão dinâmica de luz	36
5.2 Efeitos da exposição pré-pubere às AgNPs na expressão de genes <i>Cat</i>, <i>Sod1</i>, <i>Gpx4 var1</i>, <i>Gpx4 var2</i> e <i>Gsr</i>.....	37
5.2.1 <i>Confeção dos oligonucleotídeos (primers)</i>	37
5.2.2 <i>Padronização dos primers</i>	38
5.2.3 <i>Padronização do ensaio de RT-qPCR para os genes <i>Cat</i>, <i>Sod1</i>, <i>Gpx4 var1</i>, <i>Gpx4 var2</i> e <i>Gsr</i></i>	39
5.2.4 <i>Efeitos da exposição pré-pubere às AgNPs na expressão testicular de <i>Cat</i>.....</i>	43
5.2.5 <i>Efeitos da exposição pré-pubere às AgNPs na expressão testicular de <i>Sod1</i></i>	43
5.2.6 <i>Efeitos da exposição pré-pubere às AgNPs na expressão testicular de <i>Gpx4var1</i> e <i>Gpx4 var2</i></i>	44
5.2.7 <i>Efeitos da exposição pré-pubere às AgNPs na expressão testicular de <i>Gsr</i></i>	45
5.3 Atividade enzimática.....	46
5.3.1 <i>Atividade da enzima catalase (CAT)</i>	46
5.3.2 <i>Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....</i>	46
5.3.3 <i>Atividade da enzima glutationala peroxidase (GPX)</i>	47
5.3.4 <i>Atividade da enzima glutationala redutase (GSR)</i>	47
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÃO.....	55

REFERÊNCIAS 56

ANEXOS62

1 INTRODUÇÃO

Desreguladores endócrinos químicos (DEQs) são produtos sintéticos, produzidos originalmente para uma ação específica, porém podem causar algum tipo de efeito colateral quando absorvido pelo corpo (SCHUG et al., 2011). Estudos recentes demonstram que para exercer suas ações de desregulação os DEQs podem agir sobre algumas vias enzimáticas, sobre mecanismos relacionados aos sistemas endócrino e reprodutor (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009), ou ainda desencadear alteração na expressão de diferentes genes (MORAL et al., 2008). Como as funções normais de todos os sistemas de órgãos são reguladas por fatores endócrinos, são necessários estudos toxicológicos que demonstrem os efeitos de diferentes doses destas substâncias nos diferentes sistemas dos organismos expostos (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009; KAVLOCK et al., 1996).

A prata, classificada como um metal de baixa toxicidade, foi registrada nos Estados Unidos como um material biocida em 1954 (NOWACK et al., 2011), porém devido a seus efeitos antibacterianos, antivirais e antifúngicos bem estabelecidos já vem sendo utilizada há mais de 100 anos (CASTELLANO et al., 2007; HOLLINGER, 1996; TOLAYMAT et al., 2010). Atualmente as nanopartículas de prata (AgNPs) são amplamente utilizadas em produtos e dispositivos médicos, como curativos, cateteres e próteses ósseas; produtos de consumo tais como cosméticos, sabões e pulverizadores de ambiente (FERNÁNDEZ et al., 2008; HOLLINGER, 1996; LANSDOWN, 2006; TOLAYMAT et al., 2010); ou ainda como revestimento da superfície interna de alguns produtos (KIM et al., 2010).

As nanopartículas (NPs) possuem uma elevada relação superfície/volume podendo interagir mais facilmente com as diferentes substâncias do organismo, desta forma pode ocorrer um aumento da atividade das NPs sobre as células e consequentemente um potencial aumento da toxicidade celular. Assim, ao mesmo tempo em que as NPs são promissoras para o desenvolvimento de novos produtos, são também alvo de preocupação e investigação quanto aos riscos que podem oferecer ao meio ambiente ou aos seres humanos (BEER et al., 2012; DONALDSON, 2004; DURÁN et al., 2010).

Alguns efeitos tóxicos decorrentes da exposição à prata, como a argiria, já são bem descritos na literatura (HOLLINGER, 1996). Mais recentemente, alguns estudos demonstraram que durante o terceiro mês da gravidez a prata pode atravessar a barreira placentária, se acumular no fígado e causar danos neurológicos e embrionários (LYON et al., 2002); se administrada oralmente a prata é capaz de entrar na circulação sanguínea e ser distribuída em diferentes tecidos (KIM et al., 2010); e um estudo de toxicidade por inalação de 90 dias indicou o fígado e

os pulmões como órgãos-alvo (SUNG et al., 2009). Com relação à toxicologia reprodutiva, doses baixas de AgNPs causam redução da produção espermática (SLEIMAN et al., 2013), alterações na integridade espermática, com comprometimento da membrana plasmática e acrossomal e redução da atividade mitocondrial, e ainda modificações comportamentais reprodutivas (MATHIAS et al., 2015).

O metabolismo oxidativo é essencial para a manutenção da vida, sendo a principal fonte de energia para organismos aeróbios, entretanto o consumo de oxigênio gera subprodutos, chamados espécies reativas de oxigênio (EROs) que são perigosos para a célula. A formação de EROs, tais como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}) pode ser identificada em toda parte dentro dos sistemas biológicos aeróbicos (DREVET, 2006). Normalmente existe um equilíbrio entre a produção e a degradação ou eliminação de EROs, de modo que as células estão protegidas contra a potencial citotoxicidade e a função celular normal é mantida. Um desequilíbrio neste sistema é o que caracteriza o chamado estresse oxidativo (ONG; SHEN; CHIA, 2002).

Para proteger as células contra os danos oxidativos o organismo possui a defesa não-enzimática, que inclui vitaminas e minerais, e a defesa enzimática. Dentre as enzimas envolvidas na defesa antioxidante, pode-se citar a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) e glutathione redutase (GSR). A primeira enzima envolvida na proteção contra danos oxidativos é a SOD, o H_2O_2 resultante de sua ação é então metabolizado pela CAT ou, em maior medida, pela GPX. A GSR é uma enzima dependente de NADPH e responsável por converter a glutathione reduzida (GSH) em glutathione oxidada (GSSG), mantendo assim a razão GSH/GSSG (BAUCHÉ; FOUCHARD; JÉGOU, 1994; WONG et al., 2000).

Os testículos são altamente sensíveis aos efeitos deletérios da radiação e de vários agentes químicos (BAUCHÉ; FOUCHARD; JÉGOU, 1994) e os espermatozoides, apesar de serem um organismo aeróbio, possuem uma capacidade significativa para gerar EROs, e esta propriedade pode afetar a qualidade do sêmen, implicando na etiologia da infertilidade masculina e na capacidade fecundante do espermatozoide (AITKEN; CLARKSON, 1987). O equilíbrio da atividade pró-oxidante e da proteção antioxidante é essencial para a maturação, armazenamento e viabilidade dos espermatozoides, nesse contexto, este sistema de controle oxidativo em populações de células testiculares precisa ser mais bem compreendido (SIKKA; RAJASEKARAN; HELLSTROM, 1995).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Desreguladores endócrinos

Desreguladores endócrinos químicos (DEQs) são produtos sintéticos, produzidos originalmente para uma ação específica, como um pesticida, plastificante ou solvente, porém, além de sua ação esperada, causam algum tipo de efeito colateral quando absorvido pelo corpo (SCHUG et al., 2011). Os DEQs são então definidos como agentes exógenos, capazes de interferir na síntese, secreção, transporte, metabolismo, ligação ou eliminação de hormônios naturais, responsáveis pela manutenção da homeostase e regulação dos processos de desenvolvimento. A exposição a químicos ambientais que interagem com o sistema endócrino pode vir a causar efeitos adversos para a saúde nos organismos expostos ou em sua descendência (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009; KAVLOCK et al., 1996).

Originalmente, os DEQs eram conhecidos por exercerem ações através de receptores hormonais nucleares, incluindo receptores de estrogênio, andrógenos, progesterona, receptores da tireoide e receptores retinoides. Com o crescente interesse acerca dos DEQs, estudos recentes demonstram que para exercer suas ações de desregulação, os DEQs podem agir também sobre os receptores nucleares, como receptores de hormônio esteroide não nuclear; receptores não esteróides, como receptores de neurotransmissores; receptores órfãos, como receptores de hidrocarboneto de aril; vias enzimáticas envolvidas no metabolismo de esteróides; e numerosos outros mecanismos relacionados aos sistemas endócrino e reprodutor (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009).

Outros mecanismos de ação menos conhecidos dos DEQs incluem efeitos diretos sobre os genes, como já demonstrado para o Bisfenol A (BPA), conhecido como um desregulador endócrino ambiental e amplamente utilizado como um plastificante. A exposição ao BPA demonstrou alterar a expressão gênica da glândula mamária e induziu mudanças nos genes relacionados à diferenciação (MORAL et al., 2008). Esses efeitos são particularmente preocupantes, uma vez que as alterações genéticas durante os estágios iniciais de desenvolvimento podem ter efeitos profundos anos mais tarde e também podem levar à herança transgeracional da doença (SCHUG et al., 2011; SKINNER, 2011).

Sabe-se que as funções normais de todos os sistemas de órgãos são reguladas por fatores endócrinos e pequenos distúrbios na função endócrina, especialmente durante certas fases do ciclo de vida, como desenvolvimento, gravidez e lactação, podem levar a efeitos profundos e duradouros. Porém, o grupo de moléculas identificadas como DEQs é altamente heterogêneo e

tais substâncias podem não apresentar qualquer semelhança estrutural, assim, é difícil prever se um composto pode ou não exercer ações de desregulação endócrina. Devido à dificuldade de definir se uma substância está ou pode vir a causar algum efeito no organismo, as fontes de exposição a possíveis DEQs são diversas, constantes e altamente variáveis em todo o mundo (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009; KAVLOCK et al., 1996), sendo então necessários estudos toxicológicos que demonstrem os efeitos de diferentes doses destas substâncias nos diferentes sistemas dos organismos expostos.

2.2 Prata

Os metais estão provavelmente entre as toxinas mais antigas conhecidas pelos seres humanos. Historicamente, a toxicologia dos metais preocupou-se com a exposição não intencional a fontes ambientais, sejam elas ocupacionais ou não ocupacionais, e ainda com efeitos agudos ou evidentes. Mais recentemente, há um crescente interesse em efeitos crônicos e subclínicos, onde as relações de causa e efeito não são necessariamente óbvias (HOLLINGER, 1996).

Registrada nos Estados Unidos como um material biocida desde 1954 (NOWACK et al., 2011), a literatura científica aponta um amplo uso de prata em numerosas aplicações. Geralmente classificada como um metal de menor toxicidade, a prata tem seus efeitos antibacterianos, antivirais e antifúngicos bem estabelecidos e tem sido utilizada há mais de 100 anos no tratamento de queimaduras e feridas crônicas, uma vez que as infecções são a principal causa de morbidade e mortalidade por lesões causadas por queimaduras e procedimentos cirúrgicos (CASTELLANO et al., 2007; HOLLINGER, 1996; TOLAYMAT et al., 2010).

Inicialmente, a prata foi usada na sua forma sólida, como nitrato de prata (CASTELLANO et al., 2007) e, a partir de pesquisas e experimentos, novas preparações e formulações utilizando a prata foram surgindo, dentre elas a sulfadiazina. A sulfadiazina de prata foi sintetizada a partir de nitrato de prata e sulfadiazina de sódio. Teoricamente, este composto combinou a atividade bactericida do íon prata e o efeito bacteriostático da sulfadiazina. O fármaco foi posteriormente incorporado à pomadas e cremes, atingido um uso extensivo no tratamento de infecções da membrana mucosa, uma vez que estes produtos higroscópicos, preparados a partir de óxido de prata, nitrato e outros sais, são considerados menos irritantes do que o nitrato de prata (HOFFMANN, 1984; LANSDOWN, 2002).

Os efeitos antimicrobianos dos produtos de prata parecem estar diretamente relacionados com a quantidade e a taxa de liberação de íons de prata. Quimicamente, embora a prata no seu

estado metálico seja inerte, quando interage com a umidade da pele e com o fluido de uma ferida, a prata é ionizada levando a efeitos antimicrobianos. A prata ionizada é altamente reativa, ligando-se a proteínas teciduais e causando mudanças estruturais na parede celular bacteriana e nas membranas intracelulares e nucleares, levando em última instância à distorção celular e perda de viabilidade. Adicionalmente, o íon de prata exibe ainda propriedades bacteriostáticas por ligação e desnaturação do DNA e RNA bacteriano, e assim inibe a replicação bacteriana (LANSDOWN, 2002).

As nanopartículas de prata (AgNPs) são amplamente utilizadas em produtos e dispositivos médicos, como curativos para feridas, materiais esterilizados de uso hospitalar, cateteres, dispositivos contraceptivos, instrumentos cirúrgicos, agulhas de acupuntura e agulhas cirúrgicas, próteses ósseas, implantes cardíacos e dentários, medicamentos e revestimento ósseo. Pode-se também observar sua ampla utilização em produtos de consumo tais como cosméticos, loções, cremes, pastas de dentes, detergentes para roupa, sabões, limpadores de superfícies, pulverizadores de ambiente, brinquedos, tintas antimicrobianas, eletrodomésticos (por exemplo, máquinas de lavar, filtros de ar e água), estofados automotivos, palmilhas de sapato, vassouras, recipientes de armazenamento de alimentos e têxteis (FERNÁNDEZ et al., 2008; HOLLINGER, 1996; LANSDOWN, 2006; TOLAYMAT et al., 2010). As AgNPs podem estar misturadas a estrutura principal ou podem estar revestindo a superfície interna do produto, para que este se torne mais resistente a ação de alguns microorganismos e previna o crescimento de fungos e bactérias (KIM et al., 2010).

Alguns efeitos tóxicos decorrentes da exposição à prata já são descritos na literatura, dentre eles a argiria, termo geral utilizado para designar toxicidade local ou generalizada na qual ocorre uma descoloração azul-acinzentada permanente, é um dos mais conhecidos e evidentes. A utilização intencional da prata em produtos médicos, cosméticos e de consumo (HOLLINGER, 1996; LANSDOWN, 2006), aumenta nossa potencial exposição à prata, tornando o entendimento dos mecanismos de ação e da toxicidade relacionada a este agente antimicrobiano de grande importância (DURÁN et al., 2010).

2.3 Nanopartículas de prata (AgNPs)

O surgimento de agentes patogênicos resistentes aos fármacos já disponíveis no mercado torna essencial o desenvolvimento de novos antimicrobianos, seja através da inserção de um novo princípio ativo ou da modificação de um fármaco já disponível (DURÁN et al., 2010). Dentro da nanotecnologia, a obtenção de NPs, definidas como partículas com dimensão entre 1 e

100 nm, permite que as características químicas e físicas de uma substância original sejam alteradas, resultando em modificações de suas propriedades magnéticas, elétricas, ópticas, mecânicas e estruturais. As NPs possuem uma relação superfície/volume mais elevada que outros materiais ou partículas maiores, desta forma seu potencial para ser transportada através do organismo também é favorecido, aumentando assim sua interação com o soro, a saliva, o muco ou os componentes do fluido do revestimento do pulmão. Deste modo, ao mesmo tempo em que as NPs são promissoras para o desenvolvimento de novos produtos, são também alvo de preocupação e investigação quanto aos riscos que podem oferecer ao meio ambiente ou aos seres humanos (BEER et al., 2012; DONALDSON, 2004; DURÁN et al., 2010).

Apesar da ampla aplicação dos nanomateriais, existe ainda uma grande falta de informação sobre o impacto causado pela alteração das propriedades físico-químicas dos compostos através da obtenção das NPs na saúde humana e no ambiente. Após a administração sistêmica, as NPs são suficientemente pequenas para penetrar até mesmo capilares muito pequenos em todo o corpo e, portanto, podem ser mais bem distribuídas em certos tecidos (BRAYDICH-STOLLE et al., 2005).

Devido à sua aplicação generalizada, entre todas as NPs utilizadas em produtos de consumo, as AgNPs estão entre as com maior grau de comercialização (AHAMED et al., 2010) e, como as NPs podem passar através de membranas biológicas, elas podem afetar a fisiologia de qualquer célula em um corpo, resultando em interações imprevisíveis com os sistemas biológicos, desde sua porta de entrada até a ampla gama de possíveis vias que terminam em potenciais órgãos-alvo. Desta forma o potencial de resposta biológica significativa em cada um destes locais requer investigação (BRAYDICH-STOLLE et al., 2005; DONALDSON, 2004; DURÁN et al., 2010; SCHRAND et al., 2010).

Durante o terceiro mês da gravidez a prata pode atravessar a barreira placentária, se acumular no fígado e causar danos neurológicos e embrionários. Um estudo de Lyon et al (2002), mostrou que as concentrações de prata são significativamente mais elevadas em fetos, neonatos e lactentes do que em crianças mais velhas e adultos, sugerindo que a prata é acumulada da mãe durante a gravidez e lactação, algum tempo depois esta concentração decai devido ao desenvolvimento do fígado, diluição e excreção (LYON et al., 2002; SHAVLOVSKI et al., 1995).

Kim et al (2010) avaliaram a presença das AgNPs no sangue, e seus resultados indicam que a prata absorvida oralmente a partir de NPs é capaz de entrar na circulação sanguínea e ser distribuída a outros órgãos. O fígado foi reportado como o órgão-alvo para a distribuição da prata originária de NPs e, estes resultados são consistentes com um estudo anterior de toxicidade

oral de 28 dias, o qual também demonstrou como órgão-alvo para as AgNPs o fígado (KIM et al., 2007), e um estudo de toxicidade por inalação de 90 dias que indicou o fígado e os pulmões como órgãos-alvo (SUNG et al., 2009). Uma vez que efeitos semelhantes não foram previamente relatados para a prata solúvel, existe a possibilidade de que os efeitos das AgNPs não sejam apenas devido à ionização da prata a partir da superfície das AgNPs, mas podem se originar, pelo menos em parte, dos efeitos diretos das NPs, devido as suas características (KIM et al., 2010).

O tamanho das NPs pode determinar o lugar em que esta será depositada no organismo, desta forma influencia na toxicidade celular e também afeta a habilidade do corpo de defender-se destas. Assim, para as NPs a NOAEL (*no observable adverse effect level*), que corresponde à maior dose em que não são observados efeitos adversos, e a LOAEL (*lowest observable adverse effect level*), que corresponde a dose mais baixa em que não se observam efeitos adversos, pode variar de acordo com seus tamanhos (PAN et al., 2007). Schaeublin et al (2011) relacionam a citotoxicidade às NPs com tamanhos menores que 15 nm, pois possuem capacidade de induzir a apoptose diferentemente de partículas maiores, de até 100 nm. Pan et al (2007) relataram que as nanopartículas de ouro (AuNPs) demonstram uma toxicidade dependente do tamanho para tamanhos variando de 0,8 a 15 nm. Kim et al (2010) sugerem para as AgNPs com tamanho de 56 nm uma LOAEL de 125 mg/Kg e uma NOAEL de 30 mg/Kg a partir de um estudo de toxicidade oral durante um período de 90 dias.

2.4 Toxicidade das AgNPs sobre os parâmetros reprodutivos e o metabolismo oxidativo

Apesar da ampla aplicação das NPs, pouco se sabe a respeito de sua toxicidade. O tamanho e a área superficial são reconhecidos como determinantes importantes sobre seu impacto na saúde humana e no meio ambiente, por esta razão, é essencial caracterizar adequadamente as NPs utilizadas em estudos de toxicologia a fim de avaliar sua ação nos diferentes órgãos e mecanismos (JI et al., 2007; MURDOCK et al., 2008). É crescente a incidência de estudos que demonstram a existência de uma relação entre a utilização das AgNPs e a toxicidade observada sobre a saúde humana, em diversas áreas incluindo a da reprodução (SCHRAND et al., 2010). Já foi demonstrado, por exemplo, que as NPs magnéticas podem ter consequências reprodutivas ao penetrar a barreira hematotesticular (KIM et al., 2006), podendo ser captadas especificamente pelas células de Leydig alterando sua viabilidade, proliferação e expressão gênica (KOMATSU et al., 2008).

Para avaliar a influência da administração da prata na forma de NPs, em um estudo utilizando a linhagem celular C18-4 isoladas de testículos de ratos que exibe um fenótipo característico de células-tronco germinativas *in vivo*, Braydich-Stolle et al (2005) mostraram que o carbonato de prata, geralmente considerado não-tóxico, apresentou efeito citotóxico significativo na função mitocondrial e na viabilidade celular em concentrações de 100 µg/mL. A EC50 (concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo) de carbonato de prata foi calculada em 408 µg/mL. Por outro lado, a prata adicionada às células como uma NP (diâmetro de 15 nm) reduziu a função mitocondrial e viabilidade celular. O efeito tóxico das AgNPs iniciou-se entre 5 e 10 µg/mL, com uma EC50 calculada a 8,75 µg/mL.

Kim et al (2008) avaliaram o potencial acumulativo das AgNPs, e após 28 dias de exposição oral houve um evidente acúmulo da prata em vários órgãos incluindo fígado, rim, testículos, pulmões e cérebro.

O estresse oxidativo resultante da geração aumentada de EROs ou da redução do sistema de defesa antioxidante têm sido implicado na patogênese de distúrbios neurodegenerativos, incluindo a doença de Parkinson (CURTIN et al., 2002). Rahman et al (2009) observaram alterações no gene *Park7* após exposição à AgNPs com 25 nm, e sugeriram que a mutação observada está associada ao início precoce da doença Parkinson, pois as AgNPs têm potencial para gerar EROs induzindo o estresse oxidativo e danos ao DNA. A produção aumentada de EROs, desencadeada pelas AgNPs podem afetar o sistema imunológico e o metabolismo aeróbio produzindo apoptose e degeneração neuronal nos animais expostos, desta forma as AgNPs estão envolvidas no mecanismo de neurotoxicidade em ratos. Além das alterações observadas no metabolismo oxidativo, o gene *Park7* pode vir a alterar os parâmetros reprodutivos, uma vez que *Park7* possui ainda diversas funções, tais como a proteção das células contra o estresse oxidativo, a maturação e fertilização dos espermatozoides (LARSEN et al., 2007).

A aplicação em numerosos produtos juntamente com a exposição não intencional, dificulta a mensuração da concentração ou dose de AgNPs a que estamos expostos. A ingestão involuntária pode ocorrer de variadas formas, como por exemplo, através do consumo de água proveniente de aparelhos para purificação, consumo de leite armazenado em embalagem Tetra Pak®, além de alimentos que tiveram contato prolongado com utensílios que contenham prata. Desta forma, a via oral é uma porta de entrada importante para o consumo das AgNPs (KIM et al., 2010; TOLAYMAT et al., 2010). Em um estudo de toxicidade oral aguda que avaliou toxicidade de AgNPs com tamanho médio de 8,12 nm, na concentração de 1µg/mL, incorporadas em matriz polimérica (carboximetilcelulose) na utilização em embalagens

alimentícias, foi observada a degeneração celular no fígado de ratos machos, sugerindo que este dano está relacionado a ação das AgNPs no organismo (SIQUEIRA et al., 2013).

2.5 Atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutationala peroxidase (GPX) e glutationala redutase (GSR) no testículo

O oxigênio é essencial para o metabolismo oxidativo e a vida de organismos aeróbios, porém ao mesmo tempo, o consumo de oxigênio gera metabólitos ativos, também chamados de EROs, que são perigosos para a célula. As principais EROs produzidas em células eucarióticas são o $O_2^{\cdot-}$, o H_2O_2 e o OH^{\cdot} (DREVET, 2006). O estresse oxidativo e consequente dano celular é teoricamente o resultado de um desequilíbrio entre a produção de radicais livres, ou EROs, e o grau de eliminação e proteção dos mecanismos antioxidantes (ONG; SHEN; CHIA, 2002; SIKKA; RAJASEKARAN; HELLSTROM, 1995).

O organismo desenvolveu múltiplos mecanismos para proteger as células contra os danos oxidativos e as substâncias que participam destes processos recebem o nome de antioxidantes. Dentre as substâncias classificadas como agentes antioxidantes estão vitaminas, minerais e as enzimas. A primeira enzima envolvida na proteção contra danos oxidativos é a SOD, o H_2O_2 resultante de sua ação é então metabolizado pela CAT ou, em maior medida, pela GPX. Os peróxidos orgânicos sofrem ação da GPX e assim, a GSH é então convertida em GSSG. A GSSG por sua vez é subsequentemente reduzida a GSH por uma enzima dependente de NADPH, a GSR, mantendo assim a razão GSH/GSSG. Toda essa ação enzimática é voltada para restabelecer o balanço entre as moléculas oxidantes e antioxidantes no organismo, mantendo assim a integridade das membranas celulares e prevenindo o dano oxidativo ao DNA (BAUCHÉ; FOUCHARD; JÉGOU, 1994; WONG et al., 2000).

Os testículos são altamente sensíveis aos efeitos deletérios da radiação e de vários agentes químicos (BAUCHÉ; FOUCHARD; JÉGOU, 1994) e os espermatozoides, apesar de serem um organismo aeróbio, sendo o oxigênio um elemento essencial para a manutenção de suas funções, possuem uma capacidade significativa para gerar EROs, principalmente $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , e esta propriedade pode afetar a qualidade do sêmen, implicando na etiologia da infertilidade masculina e na capacidade fecundante do espermatozoide (AITKEN; CLARKSON, 1987). A capacidade de manutenção, formação e eliminação, das EROs dos espermatozoides é normalmente mantida por níveis adequados de SOD, CAT e provavelmente de algumas enzimas dependentes de GSH no testículo (GPX e GSR), desta forma este sistema de controle oxidativo

em populações de células testiculares precisam ser estudados (BAUCHÉ; FOUCHARD; JÉGOU, 1994; SIKKA; RAJASEKARAN; HELLSTROM, 1995).

A SOD catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ para produzir H_2O_2 . Essa reação é mostrada na Figura 1.

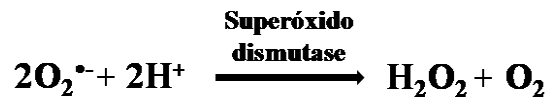


Figura 1 - Reações químicas responsáveis pela formação de H_2O_2 em presença de SOD. Modificado de Bast et al (1991).

Embora recicle o radical livre de $O_2^{\bullet-}$, alguns autores consideram a SOD um pró-oxidante, uma vez que converte uma molécula de curta duração e confinada ($O_2^{\bullet-}$) em H_2O_2 , uma molécula bastante estável e invasiva. Além disso, tendo em conta as reações acopladas de Fenton/Haberweiss, a acumulação de H_2O_2 se não for eficientemente reciclada, levará ao aparecimento do OH^{\bullet} muito agressivo. Este último atacará qualquer componente celular, começando com lipídios em membranas, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, levando à morte celular (DREVET, 2006).

Para eficientemente reciclar o H_2O_2 , duas enzimas estão disponíveis: a CAT e a GPX. Ambas transformam H_2O_2 em um produto inofensivo, H_2O . Embora exerçam a mesma ação, Cohen e Hochstein (1963) mostraram que elas não funcionam em condições idênticas. A CAT usa apenas H_2O_2 como substrato e funciona quando sua concentração está muito acima dos níveis fisiológicos, como pode acontecer no estresse oxidativo. Essa reação é mostrada na Figura 2.



Figura 2 - Reações químicas responsáveis pela formação H_2O a partir do H_2O_2 em presença de CAT. Modificado de Bast et al (1991).

A GPX usa substratos diferentes além de H_2O_2 , e pode exercer sua função mesmo na presença de pequenas variações na concentração de H_2O_2 . Deste modo, a atividade da GPX representa a primeira resposta protetora para pequenos ajustes nas concentrações de H_2O_2 em condições fisiológicas normais (COHEN; HOCHSTEIN, 1963; DREVET, 2006). A GSH sofre

peroxidação pela ação da GPX, formando então a GSSG. A GSSG posteriormente é reduzida a GSH por uma enzima dependente de NADPH, a GSR, mantendo assim a razão GSH/GSSG (BAUCHÉ; FOUCHARD; JÉGOU, 1994). Essa reação é mostrada na Figura 3.

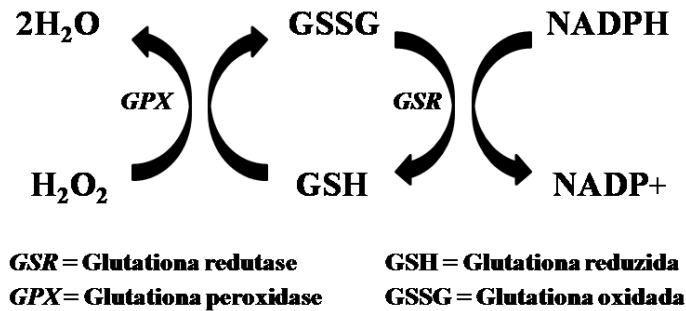


Figura 3 - Vias enzimáticas de manutenção da glutatona na forma reduzida. Adaptado de Ribeiro et al (2005).

A SOD, que dismuta o $O_2^{\bullet -}$ para H_2O_2 e O_2 , desempenha um papel central nas reações antioxidantes. Três isoenzimas estão presentes em mamíferos, SOD1 (CuZn-SOD) que contém Cu e Zn como cofatores de metal e é principalmente citosólica, enquanto SOD2 (Mn-SOD) contendo Mn é uma isoforma mitocondrial e SOD3 (EC-SOD), estruturalmente semelhante a CuZn-SOD, porém extracelular.

A deficiência de SOD1 no sexo feminino resulta em infertilidade, porém, existem poucos artigos que sugerem seu envolvimento no sistema reprodutor masculino. Um papel central da SOD1 na proteção das células testiculares contra a apoptose induzida pelo estresse térmico foi demonstrado *in vivo* e *in vitro*. Para a SOD2 nenhuma anormalidade no trato genital tem sido relatada para camundongos heterozigotos, embora alguns órgãos sejam susceptíveis ao estresse oxidativo. Pelo contrário, ratos transgênicos que expressam níveis mais elevados de SOD2 (Mn-SOD) são inférteis, mas o mecanismo para isso é desconhecido. A SOD3 (EC-SOD), que foi originalmente relatada como uma isoforma extracelular no pulmão, está presente também em níveis elevados no epidídimo, e no núcleo dos túbulos seminíferos do testículo (FUJII et al., 2003). A SOD tem grande importância na estratégia de defesa antioxidante, de tal forma que os testículos possuem não apenas SOD1, citosólica, mas também a SOD3, extracelular, produzidas pelas células de Sertoli e células germinativas (AITKEN; ROMAN, 2008).

A GSH é um importante mecanismo de defesa em células vivas e o metabolismo da GSH está fortemente ligado ao controle do metabolismo oxidativo testicular, pois a GSH está presente em alta concentração no testículo de rato adulto, e o nível de GSH em relação à quantidade de proteína no testículo é tão alto quanto no fígado. A presença da GSH e GSSG é importante uma

vez que servem de substrato para a geração das proteínas antioxidantes GPX e GSR (TRAMER et al., 1998), prevalentes nos espermatozoides, desta forma sua principal função é agir como um antioxidante, protegendo os constituintes celulares dos efeitos nocivos de peróxido e outras EROs formados a partir do metabolismo (BOREK, 2001; MORI et al., 1989).

A família da GPX é amplamente estudada em células eucarióticas e, com base na sua sequência primária, especificidade do substrato e localização subcelular é dividida em cinco classes principais: GPX1, GPX2, GPX3, GPX4 e GPX5. As duas enzimas mais expressas são a GPX1, abundante no citoplasma e presente em um nível elevado em eritrócitos, fígado e rim, e a GPX4, presente principalmente em testículos de mamíferos, cérebro e coração. Outras duas enzimas têm expressão limitada nos tecidos, sendo a GPX2, citosólica, detectada principalmente em tecidos gastrointestinais de ratos e fígado humano, e a GPX3, extracelular, identificada primeiramente no plasma humano, mas também expressa no rim, pulmão, coração, mama, placenta e fígado. Posteriormente, foi identificada a GPX5, uma enzima específica do epidídimo induzida por androgênio que partilha homologia de sequência com GPX3 no rato (CHU, 1994; DREVET, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Hipótese central e Objetivo geral

Hipótese central: A exposição pré-púbere as AgNPs causa redução da atividade mitocondrial afetando o metabolismo oxidativo e levando a geração de EROs com repercussão sobre a espermatogênese dos ratos tratados.

Objetivo Geral: Avaliar o efeito de baixas concentrações de AgNPs sobre a expressão e a função anti e pró-oxidativa das enzimas CAT, SOD, GPX e GSR no testículo de ratos tratados durante a fase pré-púbere.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da exposição pré-púbere à diferentes concentrações de AgNPs:

- na expressão testicular de genes que codificam proteínas dos sistemas anti e pró-oxidantes (CAT, SOD, GPX e GSR) por PCR em tempo real;
- na atividade enzimática das enzimas CAT, SOD, GPX e GSR nos testículos por metodologia enzimática.

4 METODOLOGIA

Os itens a seguir descrevem os materiais e as metodologias utilizados em cada etapa deste experimento. Todos os procedimentos estão de acordo com o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com animais da Universidade Estadual do Centro-Oeste, sob parecer 013/2015.

4.1 Animais

Como modelo experimental para a avaliação do efeito da exposição pré-púbere às AgNPs sobre os mecanismos oxidativos envolvidos nas alterações da função espermática foram utilizados 60 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com 21 dias de idade (idade pré-púbere). Os mesmos foram obtidos do Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (43 x 43 x 20 cm) com uma camada de 5 cm de maravalha, não permaneceram em jejum sendo alimentados com ração comercial (Nuvilab CR-1, Nuvital, PR, Brasil) e água *ad libitum*. A sala de manutenção foi mantida em ciclo de 12:12 horas claro/escuro e temperatura controlada (22 ± 2 °C).

4.2 Delineamento experimental

Os animais foram mantidos em ambientação do 21º ao 23º dia de idade, no 23º dia de idade foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos. Todos os animais receberam identificação individual, foram pesados para homogeneização dos lotes e distribuídos em cinco grupos de tratamento, cada um dos grupos foi composto por 12 animais, sendo: grupo 1 (controle); grupo 2 – AgNP 15 µg/Kg, grupo 3 – AgNP 7,5 µg/Kg, grupo 4 – AgNP 3,75 µg/Kg e grupo 5 – AgNP 1,875 µg/Kg.

A administração das AgNPs (Sigma-Aldrich, catalog number 730815, 60 nm de diâmetro, 0,02 mg/mL) ocorreu do 23º dia de idade dos ratos (PND23) ao 60º dia de idade (PND60), quando se realizou a colheita de tecidos. O período e protocolo experimental foram baseados em Stoker et al (2000) à EDSTAC (Endocrine Disrupting Screening and Testing Advisory Committee) e compreende a avaliação de efeitos desreguladores endócrinos na pré-puberdade.

4.3 Determinação das doses de AgNPs

As doses do experimento e o tamanho das NPs foram definidos a partir de estudos anteriores realizados no Laboratório de Fisiologia Humana e Toxicologia Reprodutiva do departamento de Farmácia da Universidade Estadual do Centro-Oeste. O tamanho das AgNPs utilizadas no tratamento foi de 60 nm, considerado um tamanho intermediário e com menor probabilidade de causar dano celular como constatado por Liu et al (2010b), que demonstraram maior toxicidade para AgNPs de 20 nm em relação a suas homólogas maiores que 50 nm.

Seguindo o mesmo padrão de toxicidade, foi verificado também que AgNPs de 3 a 4 nm apesar de possuírem propriedades bactericidas mais eficazes contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, são mais tóxicas do que suas homologas com tamanhos entre 40 e 50 nm (LIU et al., 2010). Com o intuito de avaliar o efeito de baixas concentrações destas AgNPs sobre os mecanismos oxidativos envolvidos nas alterações da função espermática, os animais foram expostos a partir da menor dose anteriormente identificada para o comprometimento da função espermática, a LOAEL de 15 µg/Kg (MATHIAS et al., 2015) e a partir daí, à doses decrescentes de 7,5 µg/Kg, 3,75 µg/Kg e 1,875 µg/Kg de AgNPs.

4.4 Exposição às nanopartículas de prata (AgNPs)

Os animais foram pesados durante toda a fase de exposição ao produto com o objetivo de determinar as quantidades orais diárias a serem fornecidas para que ocorressem sempre em função do peso e ainda, para evitar refluxo, o volume administrado foi de 0,25 mL/100g de peso corporal. A via de administração utilizada foi a via oral (gavagem) com auxílio de sonda rígida em aço inoxidável acoplada a uma seringa de volume total de 1 mL. Para garantir a aplicação da concentração necessária, as AgNPs foram diluídas em água destilada. Assim, conforme peso diário realizou-se a diluição sempre no momento do fornecimento aos animais para garantir que não houvesse interferência do diluidor na estabilidade do produto. O grupo controle recebeu apenas o diluidor como tratamento.

Para avaliar se a diluição da solução de AgNPs afetou a estabilidade das NPs, analisamos o tamanho médio das partículas e o índice de polidispersidade por dispersão dinâmica de luz (BIC 90 plus – Brook haven Instruments Corp., EUA) com um ângulo de dispersão de 90 ° e uma temperatura de 25 °C. Estes resultados foram avaliados com auxílio do Zeta Plus Particle Sizing Software Versão 5.34 (Brook haven Instruments Corp., EUA) e não foram observadas variações significativas (dados não apresentados).

A administração das doses de AgNPs se deu uma vez ao dia, sempre pela manhã, em dias alternados. Os animais não foram mantidos em jejum devido a fase de desenvolvimento (pré-puberdade), além de que a exposição às AgNPs ocorre, muitas vezes, de forma não intencional, deste modo foi possível simular não somente a exposição intencional (formulações medicamentosas), mas a exposição diária a produtos contendo AgNPs.

4.5 Colheita e armazenamento de tecidos

Aos 60 dias de idade (PND60), os animais receberam anestesia geral composta pela associação de cloridrato de quetamina (0,10 mL/100g) e cloridrato de xilazina (0,05 mL/100g) por via intraperitoneal e seguiu-se a decapitação para a eutanásia. Os testículos foram excisados e congelados em nitrogênio líquido, mantidos a -80 °C, para as análises posteriores descritas nos subitens a seguir.

4.6 Identificação das alterações na expressão gênica pela quantificação do mRNA dos transcritos dos genes que codificam as enzimas CAT, SOD, GPX e GSR

4.6.1 Homogeneização e Extração de RNA total dos testículos

Os testículos foram pulverizados em N₂ utilizando-se gral e pistilo, transferidos para microtubos de centrifugação 1,5 mL e armazenados a -80 °C. O RNA total foi extraído pelo método de guanidina-fenol-clorofórmio (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987) através da utilização do Reagente Trizol® (Life Technologies, Carlsbad, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do RNA total foi estimada pela densidade óptica (DO) da solução, mensurando-se a absorvância a 260 nm e o grau de pureza foi determinado pela razão A_{260nm/280nm}. Após a quantificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,2 % em tampão TBE, para análise da integridade do RNA e depois armazenadas -80 °C.

4.6.2 Reação de Transcrição Reversa (RT)

Após a extração, 2,5 µg de RNA total foram submetidos à reação de transcrição reversa (RT) para a síntese de uma fita de DNA complementar à fita de mRNA (cDNA), com o uso do kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA) de acordo com as

instruções do fabricante. Para cada reação foram obtidos 10 µL de cDNA com concentração final estimada em 250 ng/µL. As amostras foram armazenadas a -20 °C até análises subsequentes de PCR em tempo real.

4.6.3 Confeccção dos oligonucleotídeos (primers)

As sequências de referência dos transcritos dos genes de interesse foram obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os oligonucleotídeos foram confeccionados com o auxílio do recurso Pick Primer disponível no GenBank, de forma a amplificar ao menos uma região de junção entre dois éxons distintos, proporcionando maior especificidade e não amplificação de DNA genômico. Os pares de oligonucleotídeos foram verificados quanto às ligações complementares pelos recursos do OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>). No quadro 1 são mostrados os nomes dos genes, as sequências dos oligonucleotídeos e o número da sequência de referência utilizada.

Quadro 1 – *Primers forward (F) e reverse (R)* de cada gene utilizado para o ensaio de PCR em tempo real e as respectivas sequências de referência.

Gene	Oligonucleotídeo (5'-3')	Sequência de referência
<i>Cat</i> (Catalase)	F: TTCTTGTTTCAGCGACCGAGG R: GATGCCCTGGTCAGTCTTGTA	NM_012520.2
<i>Sod1</i> (Superóxido dismutase 1)	F: GGGGACAATACACAAGGCTGT R: CATGCCTCTCTTCATCCGCT	NM_017050.1
<i>Gpx4var1</i> (Glutationaperoxidase Variante 1)	F: CCGTCTGAGCCGCTTATT R: CACGCAACCCCTGTACTTATCCA	NM_017165.2
<i>Gpx4 var2</i> (Glutationaperoxidase Variante 2)	F: GACCTTCCCCAGACCAGCAAC R: CACGCAACCCCTGTACTTATCCA	NM_001039849.2
<i>Gsr</i> (Glutationa redutase)	F: ACTTCTCACCCCAGTTGCG R: CCACGGTAGGGATGTTGTCA	NM_053906.2
<i>Rpl19</i> (Proteína ribossomal L19)	F: CAATGAAACCAACGAAATCG R: TCAGGCCATCTTTGATCAGCT	NM_031103.1

4.6.4 Padronização dos primers

Para padronizar os *primers*, a partir de amostras de teste do tecido (3 testículos de grupo controle), obteve-se o cDNA através da reação de RT. O cDNA foi diluído serialmente e a eficiência de ligação dos *primers* foi avaliada. Para cada uma das diluições de cDNA foram realizadas curvas com ciclos de amplificação para cada *primer*. Assim as condições de amplificação (concentrações de cDNA e *primer*) foram padronizadas para cada gene. A eficiência ideal deve estar entre 90 e 110 % (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Como reagentes para a reação foi utilizado o kit Platinum® SYBR® Green qPCRSuperMix-UGD (Life Technologies Corporation, Van Allen Carlsbad, CA, USA). Para confirmar a especificidade da reação, fez-se uma curva de dissociação, utilizando como base a temperatura de dissociação (*melt point*), que consiste no aquecimento lento das amostras, indo de 58 °C para 95 °C e deve resultar em um único *amplicon* por amostra.

4.6.5 Reação de quantificação por PCR em tempo real a partir da transcrição reversa (RT-qPCR)

A expressão dos transcritos dos genes que codificam as enzimas CAT, SOD, GPX e GSR foi avaliada pelo método de PCR quantitativo em tempo real a partir da transcrição reversa (RT-qPCR). O ensaio foi realizado pelo uso do kit Platinum SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação foi realizada com os recursos do equipamento AppliedBiosystemsStepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Singapore) nas seguintes condições de ciclo: 50°C (2 min), 95°C (2 min), e 40 ciclos de 95 °C (15 s) e 60°C (30 s). Ao final da reação, foi realizada uma curva de dissociação para confirmar a especificidade da reação. Os valores médios de *cycle threshold* (Ct) foram automaticamente determinados pelo StepOne™ Software v2.3 (AppliedBiosystems) e a quantificação foi realizada pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, como previamente descrito (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.7 Atividade enzimática

4.7.1 Extração das proteínas totais

Para a quantificação proteica e análise das atividades enzimáticas, foram utilizadas amostras de tecido previamente pulverizadas e mantidas a -80 °C. Cada uma das amostras foi pesada individualmente em microtubos de centrifugação 1,5 mL, e para garantir que houvesse o rompimento celular e liberação dos componentes celulares, a cada uma das alíquotas de 25 mg do tecido previamente pulverizado foi adicionado 250 µl de tampão TrisHCl a 0,5mM, pH7,4, mantendo-se a sempre a proporção 1:10 (p/v), as amostras foram agitadas em vórtex durante 30 segundos e posteriormente centrifugadas a 2500 rpm (rotações por minuto) a 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi separado para as análises subseqüentes em 5 microtubos de centrifugação 1,5 mL, 4 deles para atividade enzimática de cada uma das enzimas incluídas no estudo e um quinto microtubo de centrifugação, para a quantificação proteica.

4.7.2 Quantificação proteica

A quantificação proteica foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Partindo de uma solução mãe de BSA 2 µg/µl, foi realizada uma diluição seriada e construção da curva de BSA em microplaca. Para a construção da curva foram realizadas duplicatas utilizando as concentrações 8 µg, 4 µg, 2 µg, 1 µg e 0,5 µg. A diluição utilizada para a quantificação proteica de cada uma das amostras foi 1:50 (v/v) com volume final de 40 µl. Após preparação de todas as amostras, para evitar degradação, uma vez que o reagente é fotossensível, a placa foi envolvida em papel alumínio durante 10 minutos, após decorrido este tempo foi realizada a leitura a 595 nm com auxílio do SpectraMax 190 Microplate Reader (Molecular Devices, USA).

A partir da interpolação valores de absorbância da curva padrão foi quantificada a proteína de cada amostra, obtendo-se um valor de µg de proteína em 40 µl de amostra (µg/40µl). Para obter-se a quantidade de proteína/µl utilizou-se a seguinte equação:

$$Proteína/\mu l = \frac{X\mu g \text{ de proteína}/40\mu l}{40} .50$$

Xµg de proteína/40µl: quantidade de proteína em 40 µl de amostra

40: volume total da amostra

50: fator de diluição

4.7.3 Atividade da enzima catalase (CAT)

O ensaio de atividade da CAT foi realizado usando a determinação espectrofotométrica, determinada pela taxa de decaimento do H₂O₂, medida a 240nm. Para determinar a atividade da CAT, após extração das proteínas, em cubeta de quartzo, utilizou-se 10 µl do sobrenadante e a ele foi adicionado 500 µl de H₂O₂ (20mM, pH 7,0), a temperatura da reação foi de 30°C e a leitura da absorbância foi realizada no tempo 0, 20, 40 e 60 segundos com o auxílio do V-630 Bio UV-Vis Spectrophotometer (JASCO, USA). O método utilizado para dosagem da atividade enzimática a partir do sobrenadante obtido foi previamente descrito por Aebi (1984) e adaptado conforme padronização do nosso laboratório. Para o cálculo da atividade específica da CAT foi utilizada a fórmula a seguir e os resultados são expressos em ΔAbs . seg⁻¹ . µg de Ptn⁻¹.

$$\text{Atividade CAT} = \frac{\frac{(ABS_{\text{inicial}} - ABS_{\text{final}})}{t \text{ (seg)}}}{\text{Quantidade de proteína } (\mu\text{g}/\mu\text{l})}$$

4.7.4 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A mensuração da atividade da SOD emprega a xantina e xantina oxidase (XOD), sendo baseada na detecção espectrofotométrica do grau de inibição do formazan (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971), com auxílio do Kit RANSOD (catálogo N°. SD 125; Randox Laboratories Limited, Crumlin, Northern Ireland) segundo as instruções do fabricante. A mensuração da absorbância a 505 nm foi realizada com auxílio do SpectraMax 190 Microplate Reader (Molecular Devices, USA). Para cada amostra, a absorbância foi dividida pela concentração proteica obtendo-se a atividade específica da SOD. O resultado foi expresso em U de SOD . µg de Ptn⁻¹.

4.7.5 Atividade da enzima glutathione peroxidase (GPX)

A atividade da GPX foi mensurada baseada no método descrito por Paglia e Valentine (1967), com o uso do Kit RANSEL (catálogo N°. RS 505; Randox Laboratories Limited, Crumlin, Northern Ireland), seguindo as instruções do fabricante. A GPX catalisa a oxidação da GSH em presença de hidroperóxido de cumeno. Na presença de GSR e NADPH, a GSSG é imediatamente convertida para a forma reduzida com uma oxidação concomitante de NADPH para NADP⁺. A diminuição da absorbância foi mensurada a 340 nm com auxílio do SpectraMax

190 Microplate Reader (Molecular Devices, USA). Para cada amostra, o resultado encontrado para a absorbância foi dividido pela concentração proteica obtendo-se a atividade específica da GPX. O resultado foi expresso em U de GPX . L⁻¹ . µg de Ptn⁻¹.

4.7.6 Atividade da enzima glutathiona redutase (GSR)

A GSR catalisa a redução da GSSG na presença de NADPH, que é oxidado a NADP⁺ (KANEKO et al., 2002). A atividade da GSR foi mensurada usando o Kit GLUTATHIONE REDUCTASE (GLUT RED), catálogo N°. GR 2368; Randox Laboratories Limited, Crumlin, Northern Ireland, seguindo as instruções do fabricante (MELISSINOS et al., 1981). A leitura da absorbância foi realizada a 340 nm com auxílio do SpectraMax 190 Microplate Reader (Molecular Devices, USA). Para cada amostra, o resultado encontrado para a absorbância foi dividido pela concentração proteica obtendo-se a atividade específica da GSR. O resultado foi expresso em U de GSR . L⁻¹ . µg de Ptn⁻¹.

4.8 Análise estatística

As variáveis estudadas foram primeiramente submetidas aos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade pelo teste de Bartlett. Os outros parâmetros foram avaliados pela ANOVA seguida pelo pós-teste de Dunnett. Todas as análises foram efetuadas com a utilização do software Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) e GranPadPrismVersion 5.0 (GraphPad Software Inc., CA, USA). Considerou-se diferença estatística quando o valor de p foi inferior a 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da suspensão de AgNPs por dispersão dinâmica de luz

O diâmetro das NPs foi estimado em 86,5 nm para a solução comercial (20 µg/mL), 90 nm, 86 nm, 61 e 74 para as diluições de 15, 7,5, 3,75 e 1,875 µg/Kg, respectivamente. O índice de polidispersidade medido foi 0,450, 0,509, 0,533, 0,747 e 0,635 para as mesmas diluições, respectivamente.

5.2 Efeitos da exposição pré-pubere às AgNPs na expressão de genes *Cat*, *Sod1*, *Gpx4 var1*, *Gpx4 var2* e *Gsr*

5.2.1 Confeção dos oligonucleotídeos (primers)

As seqüências de referência dos transcritos dos genes de interesse obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), com o auxílio do recurso Pick Primer, de forma a amplificar ao menos uma região de junção entre dois éxons distintos, proporcionando maior especificidade e não amplificação de DNA genômico estão representadas nas figuras que seguem.

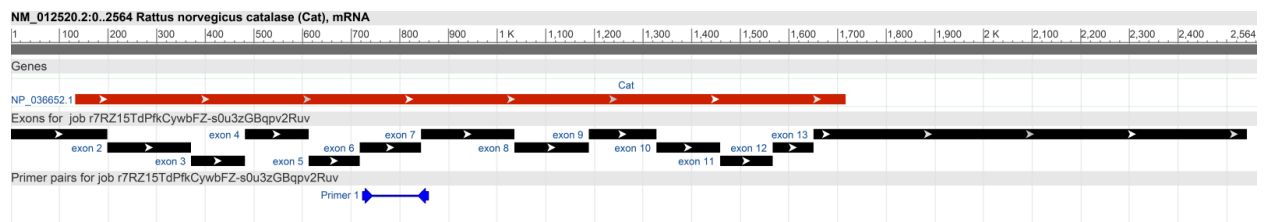


Figura 4 - Localização dos oligonucleotídeos para a amplificação do transcrito da catalase. Em azul observa-se o fragmento amplificado de 135 pares de base entre os éxons 6 e 7 na reação de RT-qPCR. Os oligonucleotídeos senso e anti-senso são indicados pelas setas azuis.

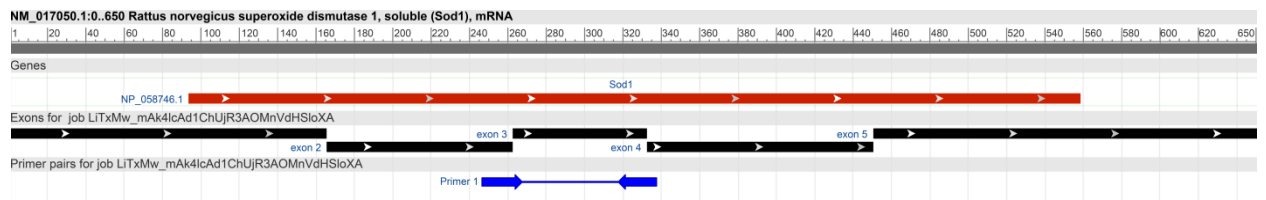


Figura 5 - Localização dos oligonucleotídeos para a amplificação do transcrito da superóxido dismutase 1. Em azul observa-se o fragmento amplificado de 91 pares de base entre os éxons 2 e 3 na reação de RT-qPCR. Os oligonucleotídeos senso e anti-senso são indicados pelas setas azuis.

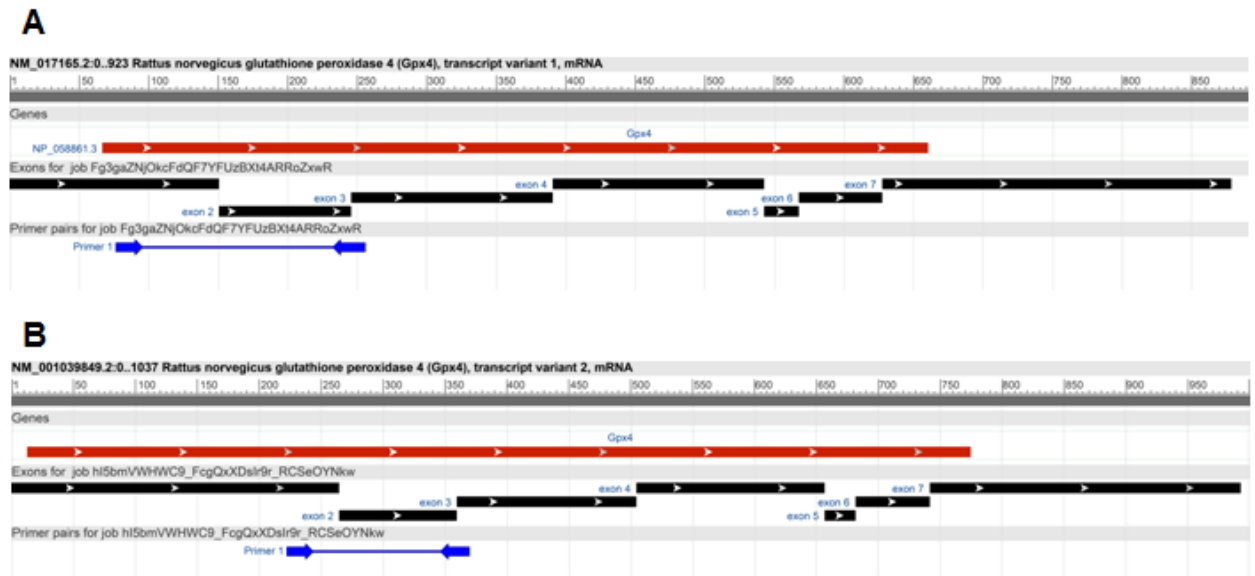


Figura 6 - Localização dos oligonucleotídeos para a amplificação do transcrito da glutathione peroxidase variante 1 (A) e variante 2 (B). Na figura A, em azul observa-se o fragmento amplificado de 179 pares de base entre os éxons 1 e 2 na reação de RT-qPCR. Na figura B, em azul observa-se o fragmento amplificado de 149 pares de base entre os éxons 1 e 2 na reação de RT-qPCR. Os oligonucleotídeos senso e anti-senso são indicados pelas setas azuis.

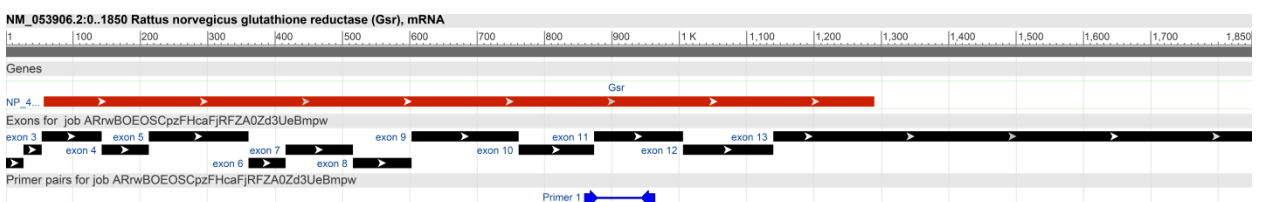


Figura 7 - Localização dos oligonucleotídeos para a amplificação do transcrito da glutathione reductase. Em azul observa-se o fragmento amplificado de 104 pares de base entre os éxons 10 e 11 na reação de RT-qPCR. Os oligonucleotídeos senso e anti-senso são indicados pelas setas azuis.

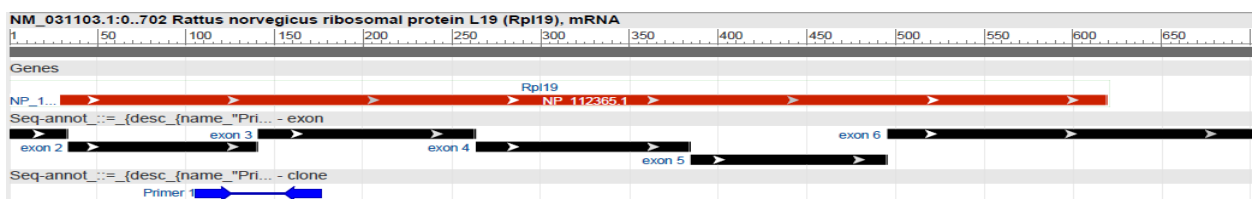


Figura 8 - Localização dos oligonucleotídeos para a amplificação do transcrito da proteína ribossomal L19. Em azul observa-se o fragmento amplificado de 71 pares de base entre os éxons 2 e 3 na reação de RT-qPCR. Os oligonucleotídeos senso e anti-senso são indicados pelas setas azuis.

5.2.2 Padronização dos primers

Os *primers* foram padronizados a fim de se obter as melhores condições de amplificação para o ensaio e confirmação da sua especificidade. Para isso, construiu-se curvas de ciclos para

diluições seriadas de cDNA e foi feita uma curva padrão relativa para cada transcrito, no intuito de definir um limiar de detecção em torno de 100 % além de otimizar as quantidades de *primer* e de cDNA a serem utilizadas nas reações de quantificação relativa de cada transcrito. A concentração do *primer* também foi testada, primeiramente utilizou-se 2 μM de *primer* e, quando necessário, ajustou-se a concentração para 1 μM , 0,8 μM ou 0,2 μM . A seguir são mostradas as curvas de dissociação, a eficiência de amplificação obtida, as concentrações dos *primers* e as quantidades de cDNA otimizadas para cada tecido.

5.2.3 Padronização do ensaio de RT-qPCR para os genes *Cat*, *Sod1*, *Gpx4 var1*, *Gpx4 var2* e *Gsr*

A concentração de *primer*, de cDNA e a eficiência para os genes *Cat*, *Sod1*, *Gpx4 var1*, *Gpx4 var2* e *Gsr* estão mostrados no quadro 2. As concentrações de cDNA utilizadas para construção contidos os resultados dos ensaios para otimização dos *primers*, assim como a quantidade ótima de cDNA e a eficiência. A diluição escolhida para o ensaio com os grupos experimentais foi 6,25 ng/ μL , pois os 5 genes apresentaram bom resultado nessa concentração. A curva de dissociação e a curva padrão relativa de cada *primer* padronizado estão representadas nas figuras 9, 10, 11, 12 e 13.

Quadro 2 – Padronização do ensaio de RT-qPCR para os genes *Cat*, *Sod1*, *Gpx4 var1*, *Gpx4 var2*, *Gsr* e *Rpl19*.

Gene	Concentração de primers (μM)	Concentração de cDNA (ng)	Eficiência (%)
<i>Cat</i> (Catalase)	2	5	93,4
<i>Sod1</i> (Superóxido dismutase)	2	10	90,3
<i>Gpx4 var1</i> (Glutathionaperoxidase Variante 1)	1,6	5	93,1
<i>Gpx4 var2</i> (Glutathionaperoxidase Variante 2)	2	5	98,34
<i>Gsr</i> (Glutathionaredutase)	1	10	108,7
<i>Rpl19</i> (Proteínaribossomal L19)	2	12,5	101

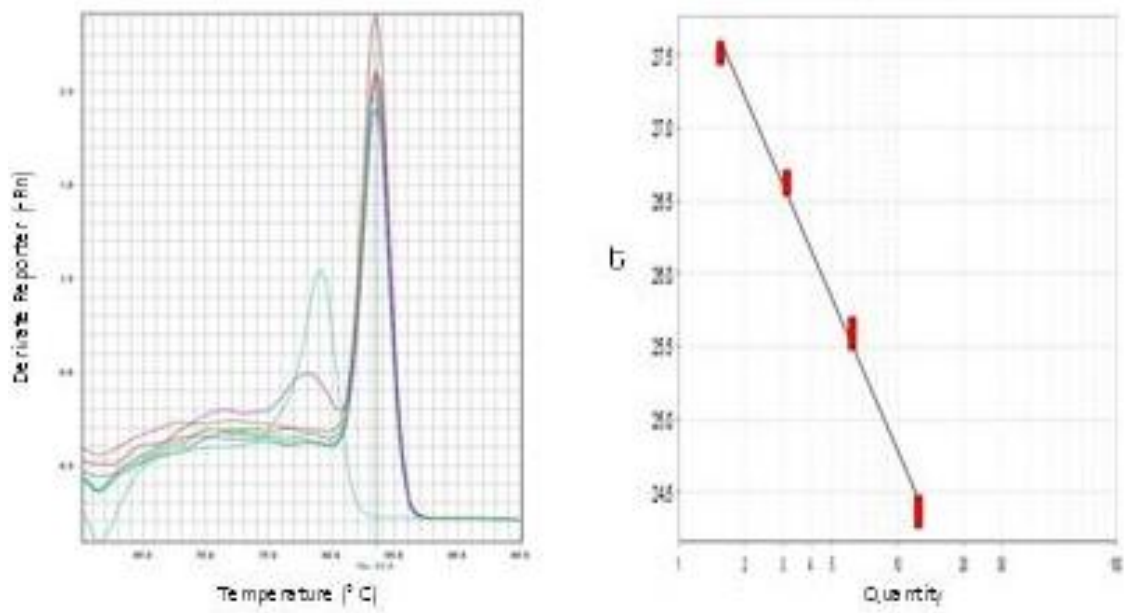


Figura 9 - Curva de dissociação (à esquerda) e curva padrão relativa (à direita). As imagens mostram a especificidade da reação e a eficiência de amplificação para os ensaios do gene *Cat* no testículo. *Cat*: catalase.

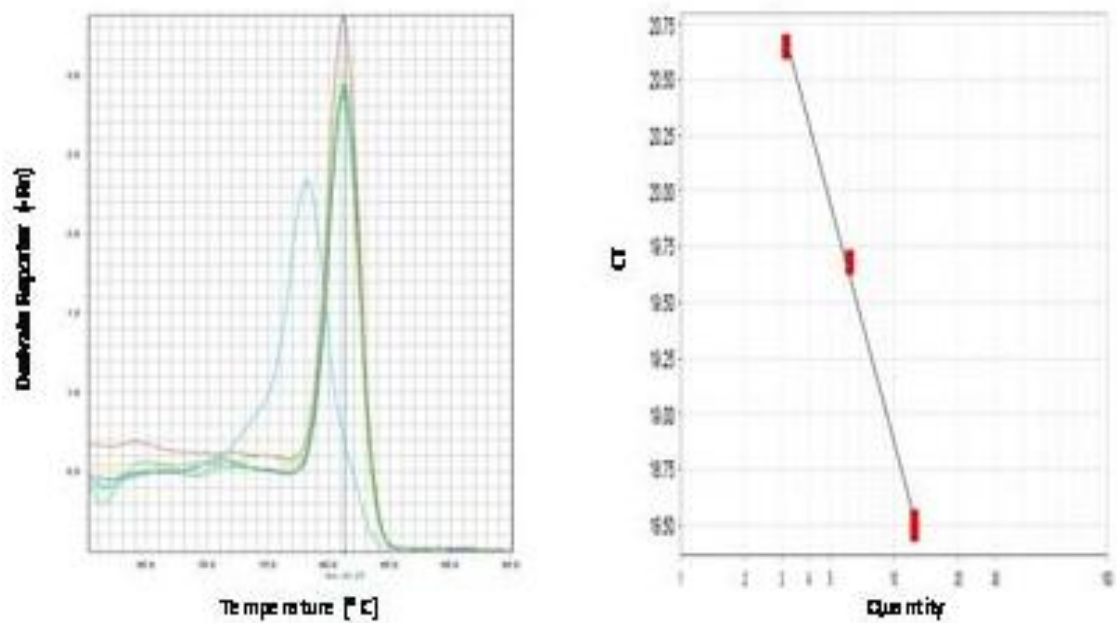


Figura 10 - Curva de dissociação (à esquerda) e curva padrão relativa (à direita). As imagens mostram a especificidade da reação e a eficiência de amplificação para os ensaios do gene *Sod1* no testículo. *Sod1*: superóxido dismutase 1.

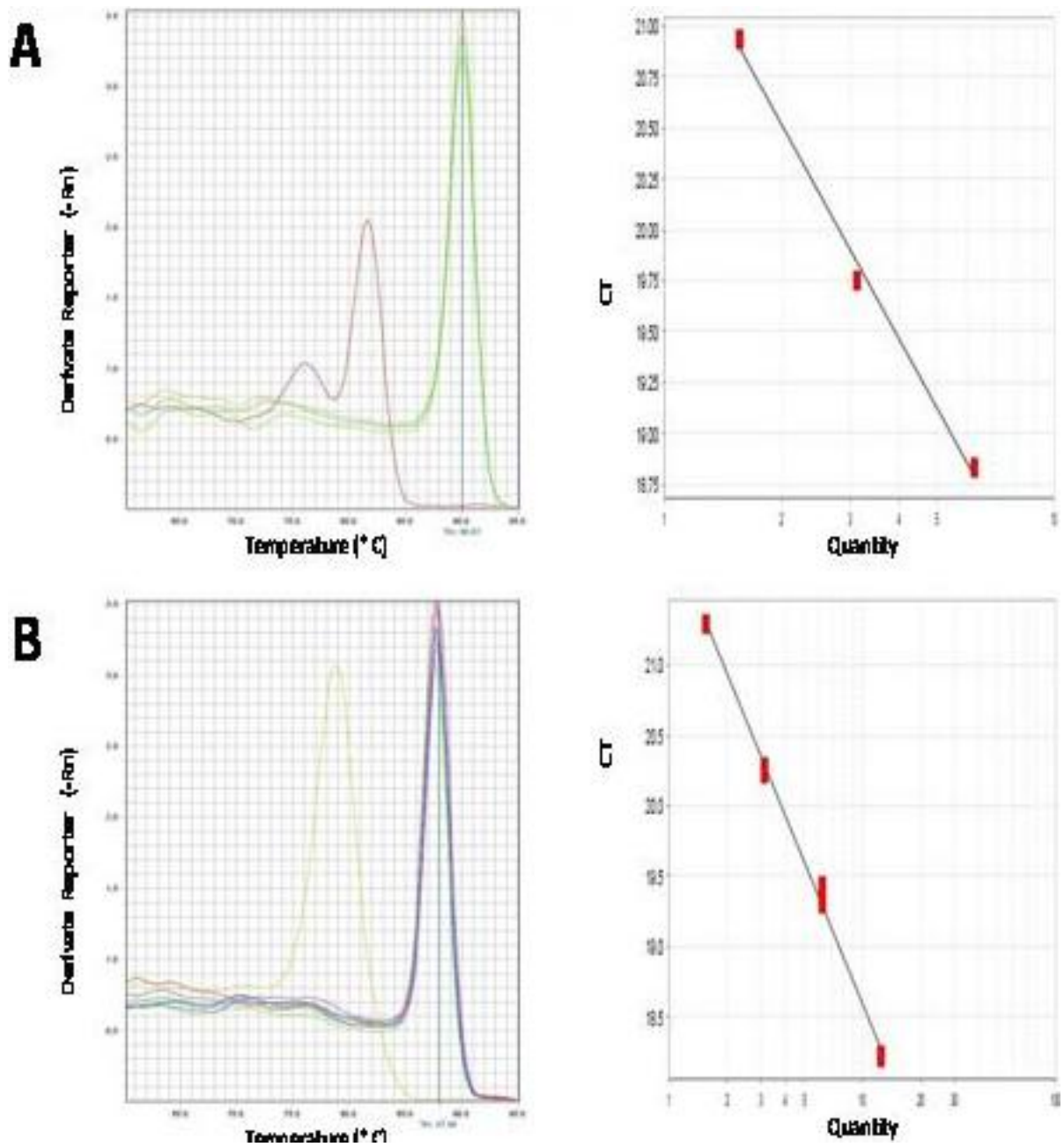


Figura 11 - Curva de dissociação (à esquerda) e curva padrão relativa (à direita). As imagens mostram a especificidade da reação e a eficiência de amplificação para os ensaios dos genes *Gpx4 var1* (A) e *Gpx4 var2* (B) no testículo. *Gpx4 var1*: glutationa peroxidase variante de transcrito 1, *Gpx4 var2*: glutationa peroxidase variante de transcrito 2.

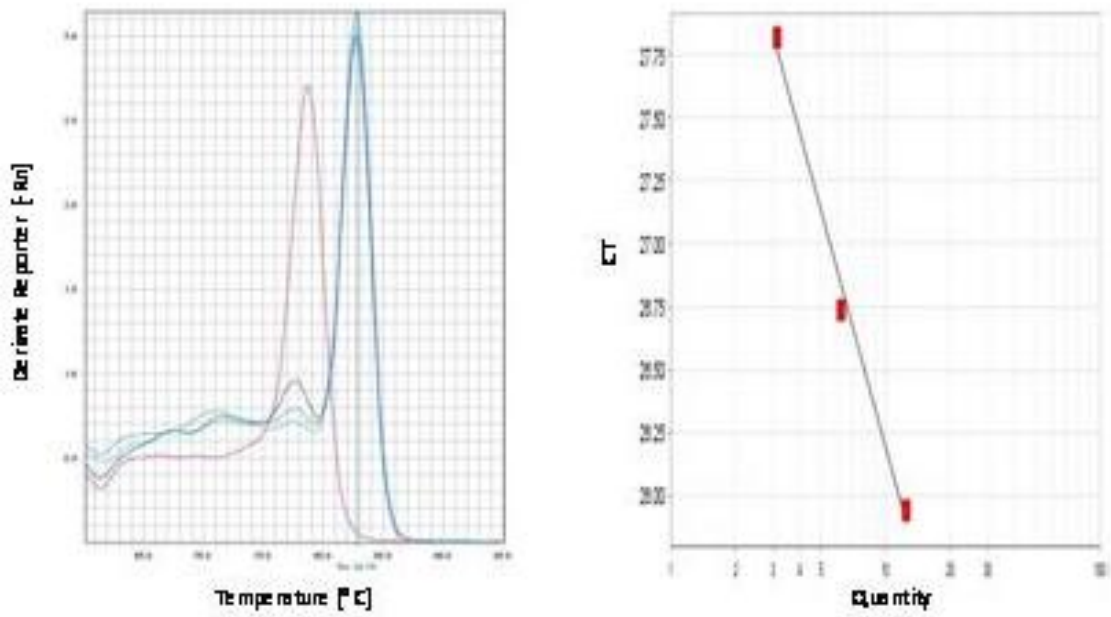


Figura 12 - Curva de dissociação (à esquerda) e curva padrão relativa (à direita). As imagens mostram a especificidade da reação e a eficiência de amplificação para os ensaios do gene *Gsr* no testículo. *Gsr*: glutationa redutase.

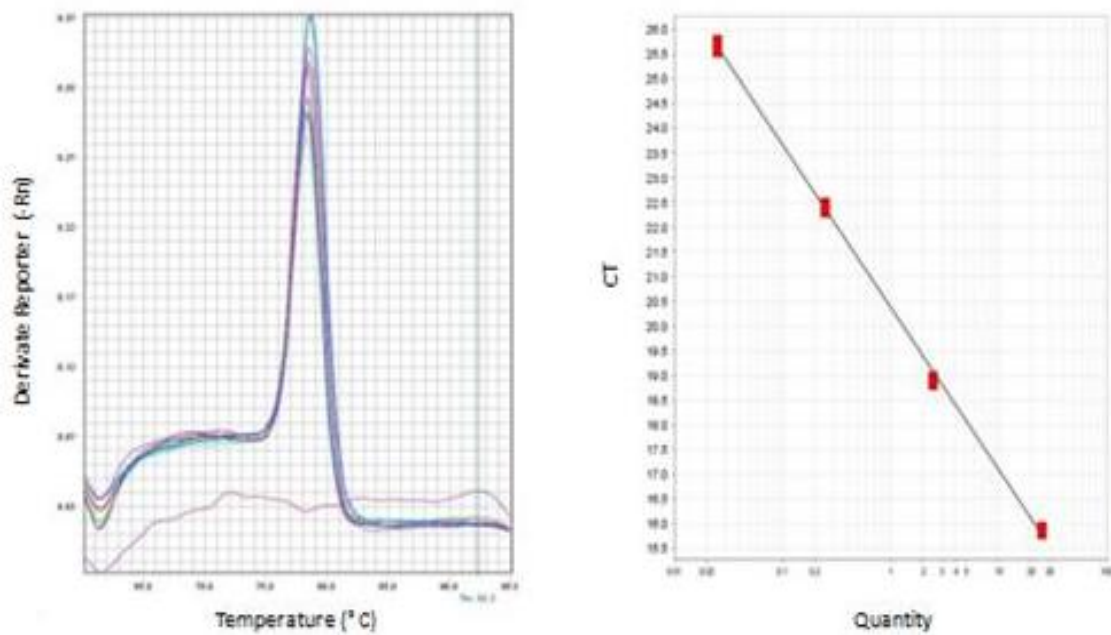


Figura 13 - Curva de dissociação (à esquerda) e curva padrão relativa (à direita). As imagens mostram a especificidade da reação e a eficiência de amplificação para os ensaios do gene *Rpl19* no testículo. *Rpl19*: proteína ribossomal L19.

5.2.4 Efeitos da exposição pré-pubere às AgNPs na expressão testicular de *Cat*

Houve aumento dos níveis de mRNA de *Cat* somente no grupo exposto a menor dose, 1,875 µg/Kg de AgNPs no período pré-pubere, em relação ao controle ($p < 0,01$; Fig. 14).

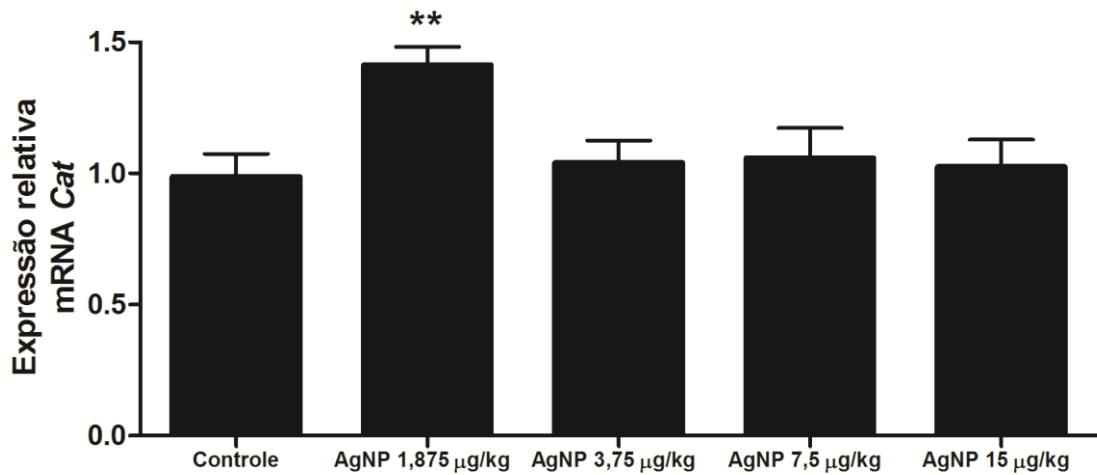


Figura 14 - Expressão testicular dos transcritos de *Cat* dos grupos tratados com 1,875 µg/Kg, 3,75 µg/Kg, 7,5 µg/Kg e 15 µg/Kg de AgNPs e do grupo controle. O *Rpl19* foi empregado como gene constitutivo. Os valores estão representados em média \pm E.P.M. (ANOVA e pós-teste de Dunnett), ** $p < 0,01$ vs controle, $n = 7-8$ /grupo. *Cat*: catalase; *Rpl19*: proteína ribossomal L19; AgNPs: nanopartículas de prata; E.P.M.: erro padrão da média.

5.2.5 Efeitos da exposição pré-pubere às AgNPs na expressão testicular de *Sod1*

Houve diminuição dos níveis de mRNA de *Sod1* somente no grupo exposto à dose de 3,75 µg/Kg de AgNPs no período pré-pubere, em relação ao controle ($p < 0,05$; Fig. 15).

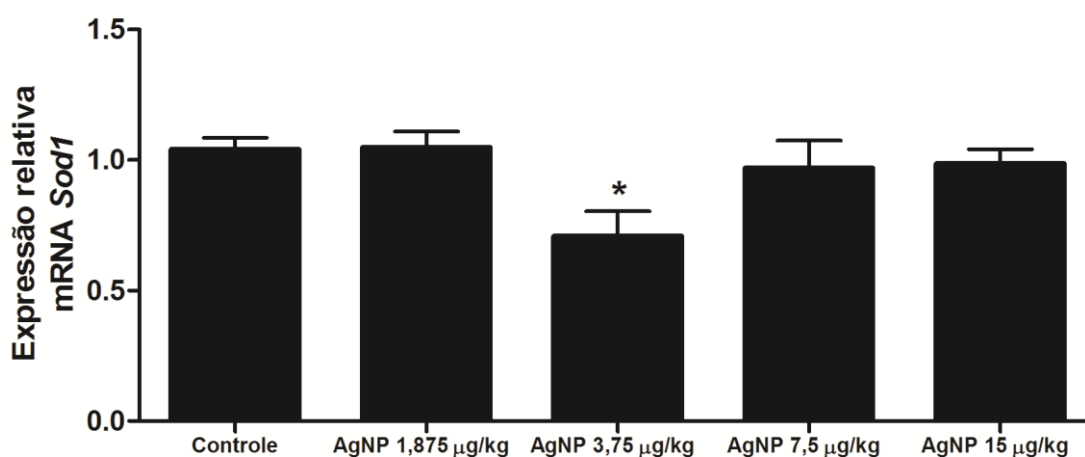


Figura 15 - Expressão testicular dos transcritos de *Sod1* dos grupos tratados com 1,875 µg/Kg, 3,75 µg/Kg, 7,5 µg/Kg e 15 µg/Kg de AgNPs e do grupo controle. O *Rpl19* foi empregado como gene constitutivo. Os valores estão representados em média ± E.P.M. (ANOVA e pós-teste de Dunnett), * $p < 0,05$ vs controle, $n = 7-8$ /grupo. *Sod1*: superóxido dismutase 1; *Rpl19*: proteína ribossomal L19; AgNPs: nanopartículas de prata; E.P.M.: erro padrão da média.

5.2.6 Efeitos da exposição pré-pubere às AgNPs na expressão testicular de *Gpx4 var1* e *Gpx4 var2*

Houve aumento dos níveis de mRNA de *Gpx4 var1* em todos os grupos exposto às AgNPs no período pré-pubere, em relação ao controle ($p < 0,001$ para o grupo tratado com 3,75 µg/Kg, e $p < 0,0001$ para os grupos tratados com 1,875 µg/Kg, 7,5 µg/Kg e 15 µg/Kg; Fig. 16A). observou-se também diminuição dos níveis de mRNA de *Gpx4 var2* somente no grupo exposto à dose de 3,75 µg/Kg de AgNPs no período pré-pubere, em relação ao controle ($p < 0,001$; Fig. 16B).

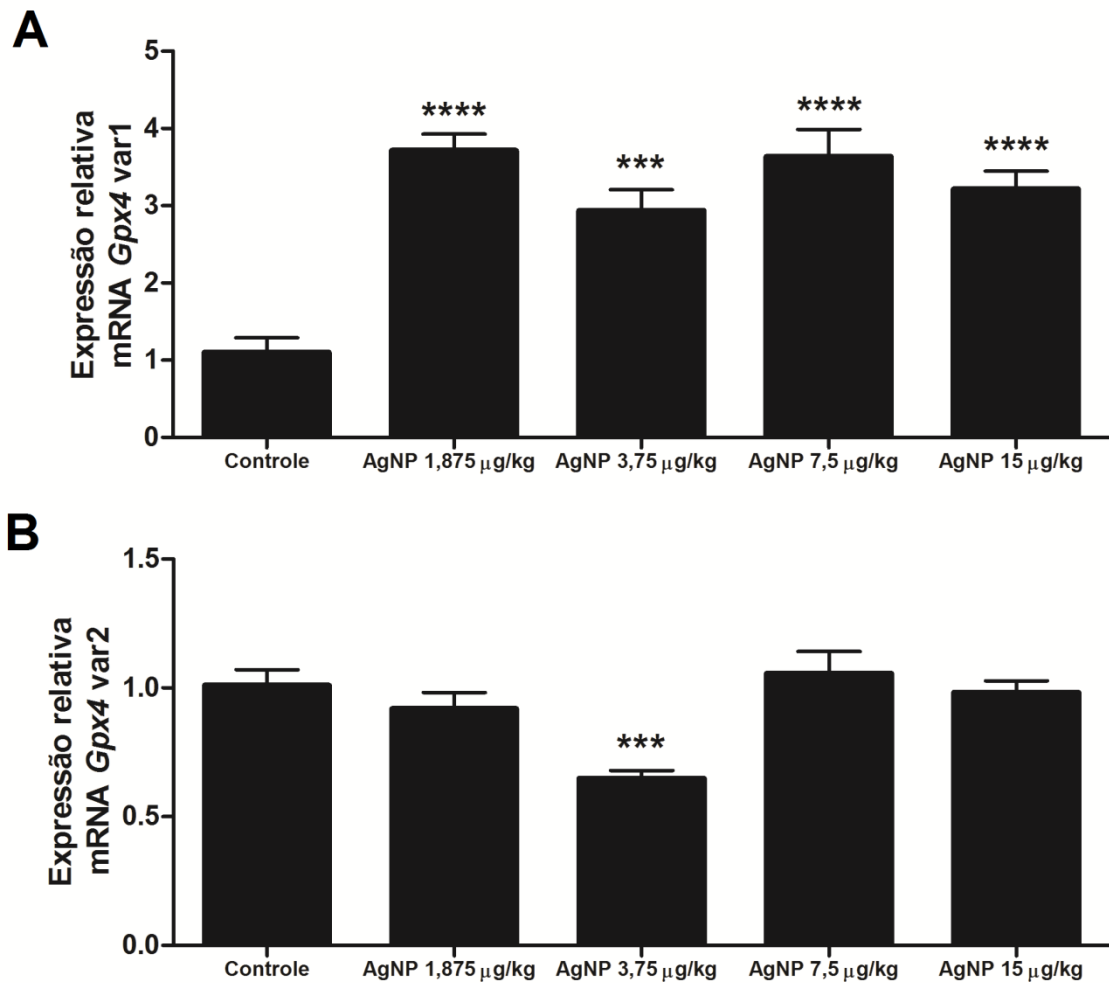


Figura 16- Expressão testicular dos transcritos de *Gpx4var1* (A) e *Gpx4var2* (B) dos grupos tratados com 1,875 µg/Kg, 3,75 µg/Kg, 7,5 µg/Kg e 15 µg/Kg de AgNPs e do grupo controle. O *Rpl19* foi empregado como gene constitutivo. Os valores estão representados em média \pm E.P.M. (ANOVA e pós-teste de Dunnett), *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ vs controle, $n = 7-8$ /grupo. *Gpx4var1*: glutationa peroxidase variante de transcrito 1; *Gpx4var2*: glutationa peroxidase variante de transcrito 2; *Rpl19*: proteína ribossomal L19; AgNPs: nanopartículas de prata; E.P.M.: erro padrão da média.

5.2.7 Efeitos da exposição pré-pubere às AgNPs na expressão testicular de *Gsr*

Houve diminuição dos níveis de mRNA de *Gsr* somente no grupo exposto à dose de 3,75 µg/Kg de AgNPs no período pré-pubere, em relação ao controle ($p < 0,001$; Fig. 17).

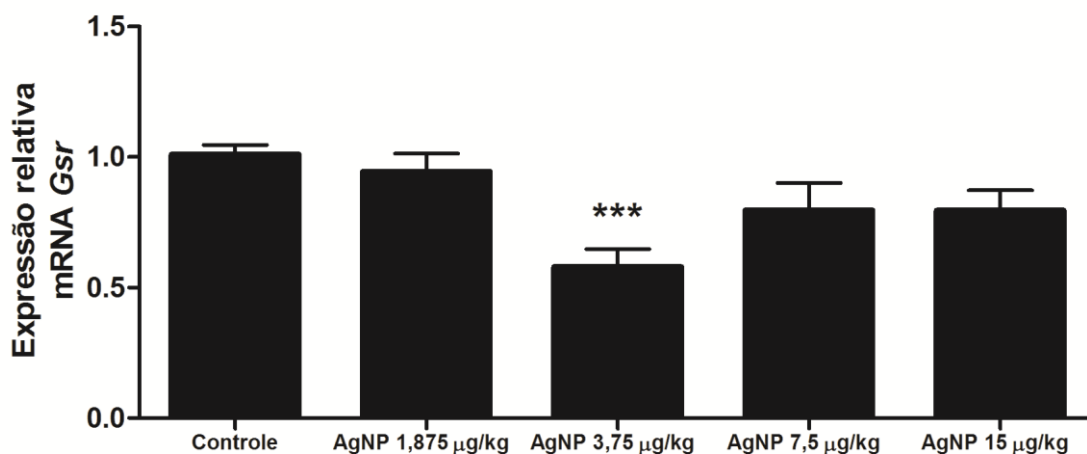


Figura 17 - Expressão testicular dos transcritos de *Gsr* dos grupos tratados com 1,875 µg/Kg, 3,75 µg/Kg, 7,5 µg/Kg e 15 µg/Kg de AgNPs e do grupo controle. O *Rpl19* foi empregado como gene constitutivo. Os valores estão representados em média ± E.P.M. (ANOVA e pós-teste de Dunnett), *** $p < 0,001$ vs controle, $n = 7-8$ /grupo. *Gsr*: glutationa redutase; *Rpl19*: proteína ribossomal L19; AgNPs: nanopartículas de prata; E.P.M.: erro padrão da média.

5.3 Atividade enzimática

5.3.1 Atividade da enzima catalase (CAT)

A exposição pré-pubere à dose de 15 µg/Kg de AgNPs aumentou a atividade enzimática da CAT ($p < 0,05$; Fig. 18).

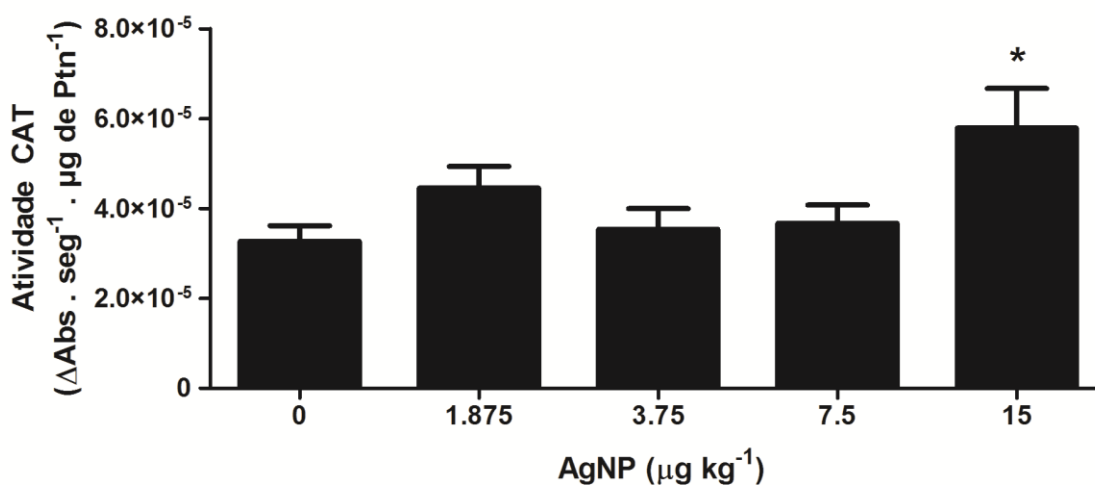


Figura 18—Atividade enzimática da CAT dos grupos tratados com 1,875 µg/Kg, 3,75 µg/Kg, 7,5 µg/Kg e 15 µg/Kg de AgNPs e do grupo controle. Os valores estão representados em média ± E.P.M. (ANOVA e pós-teste de Dunnett), * $p < 0,05$ vs controle, $n = 7-8$ /grupo. CAT: catalase; AgNPs: nanopartículas de prata; E.P.M.: erro padrão da média.

5.3.2 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A exposição pré-pubere às AgNPs não apresentou alterações significativas na atividade enzimática da SOD (Fig. 19).

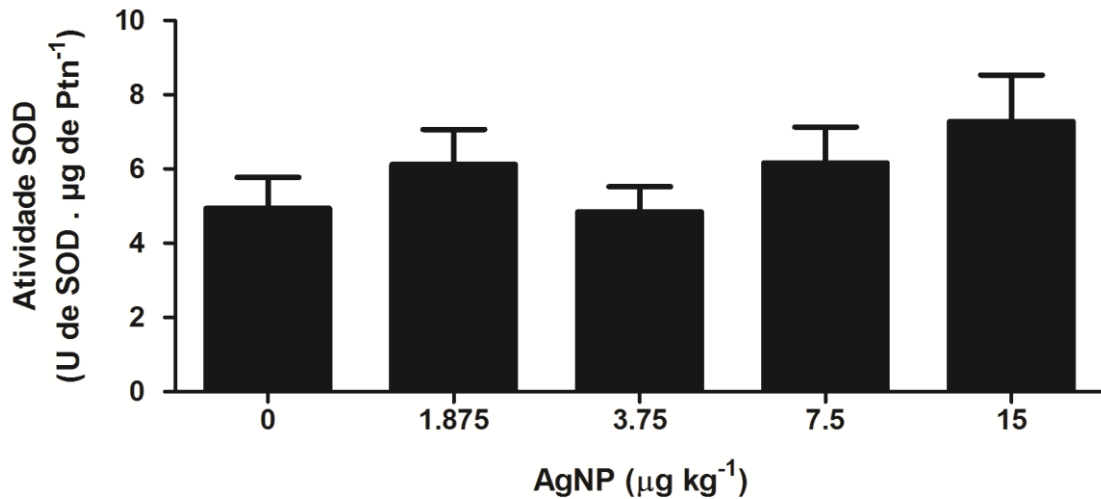


Figura 19 – Atividade enzimática da SOD dos grupos tratados com 1,875 $\mu\text{g/Kg}$, 3,75 $\mu\text{g/Kg}$, 7,5 $\mu\text{g/Kg}$ e 15 $\mu\text{g/Kg}$ de AgNPs e do grupo controle. Os valores estão representados em média \pm E.P.M. (ANOVA e pós-teste de Dunnett), $n=7-8/\text{grupo}$. SOD: superóxido dismutase; AgNPs: nanopartículas de prata; E.P.M.: erro padrão da média.

5.3.3 Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPX)

A exposição pré-pubere à dose de 15 $\mu\text{g/Kg}$ de AgNPs aumentou a atividade enzimática da GPX ($p < 0,001$; Fig. 20).

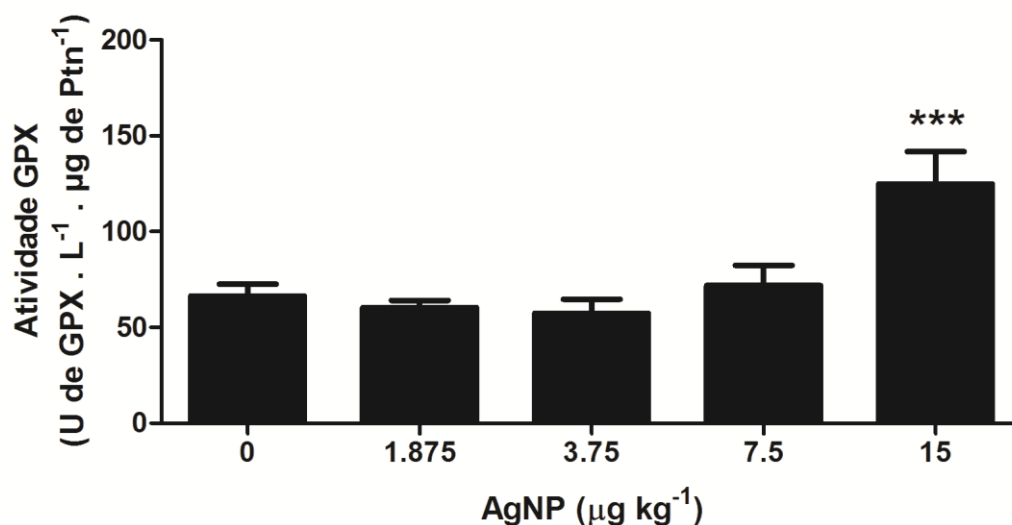


Figura 20 – Atividade enzimática da GPX dos grupos tratados com 1,875 $\mu\text{g/Kg}$, 3,75 $\mu\text{g/Kg}$, 7,5 $\mu\text{g/Kg}$ e 15 $\mu\text{g/Kg}$ de AgNPs e do grupo controle. Os valores estão representados em média \pm E.P.M. (ANOVA e pós-teste de Dunnett), *** $p < 0,001$ vs controle, $n = 6-8/\text{grupo}$. GPX: glutationa peroxidase; AgNPs: nanopartículas de prata; E.P.M.: erro padrão da média.

5.3.4 Atividade da enzima glutationa redutase (GSR)

A exposição pré-pubere à dose de 15 $\mu\text{g/Kg}$ de AgNPs aumentou a atividade enzimática da GSR ($p < 0,01$; Fig. 21).

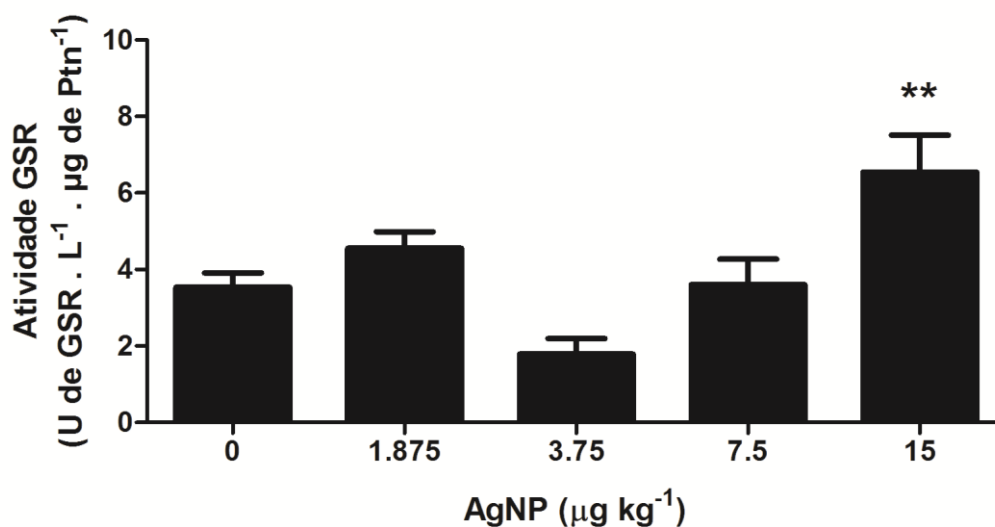


Figura 21 – Atividade enzimática da GSR dos grupos tratados com 1,875 $\mu\text{g/Kg}$, 3,75 $\mu\text{g/Kg}$, 7,5 $\mu\text{g/Kg}$ e 15 $\mu\text{g/Kg}$ de AgNPs e do grupo controle. Os valores estão representados em média \pm E.P.M. (ANOVA e pós-teste de Dunnett), ** $p < 0,01$ vs controle, $n = 6-8/\text{grupo}$. GSR: glutationa redutase; AgNPs: nanopartículas de prata; E.P.M.: erro padrão da média.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado o possível efeito da exposição à baixas doses de AgNPs em ratos pré-púberes sobre a expressão testicular de genes e enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo. O objetivo foi simular uma possível contaminação devido ao uso constante de produtos contendo AgNPs, durante a fase pré-púbere, período crítico no desenvolvimento dos parâmetros reprodutivos.

Existe uma grande quantidade de fatores físicos, químicos e patológicos que aparentemente contribuem para a indução do estresse oxidativo nos testículos, o que torna o quadro clínico extremamente complexo, uma vez que cada indivíduo está sujeito a uma gama única de fatores causais como resultado da: exposição ocupacional e ambiental a diferentes agentes; presença de outros fatores patológicos como infecção ou diabetes; e a fatores genéticos que possam influenciar na forma como os xenobióticos específicos são metabolizados.

Os testículos são altamente dependentes do oxigênio para conduzir a espermatogênese, e ao mesmo tempo, são altamente suscetíveis aos efeitos tóxicos das EROs, desta forma, diversos fatores e agentes são capazes de induzir o estresse oxidativo nos testículos (AITKEN; ROMAN, 2008). Devido ao fato de o estresse oxidativo nos testículos ser um dos maiores fatores que induzem apoptose de células germinativas, além da defesa antioxidante enzimática, este órgão tem concentrações relativamente altas de antioxidantes, como a GSH, o ácido ascórbico e a vitamina E. Estas substâncias protegem as células germinativas contra danos ao DNA e desempenham funções importantes na espermatogênese (KASAHARA et al., 2002; SANOCKA; KURPISZ, 2004).

Ao avaliar a influencia das AgNPs sobre o metabolismo oxidativo e a geração de EROs, em nosso estudo, as AgNPs demonstraram alguma interferência na expressão relativa dos transcritos dos genes responsáveis pela codificação das enzimas CAT, SOD, GPX e GSR, envolvidas no controle anti e pró-oxidativo testicular, assim como em suas atividades enzimáticas específicas.

Foi observado que a exposição pré-púbere às AgNPs levou ao aumento na expressão do mRNA da *Cat* no grupo exposto a dose de 1,875 µg/Kg de AgNPs e na expressão do mRNA da *Gpx4 var1* em todos os grupos expostos às AgNPs. Houve diminuição na expressão do mRNA da *Sod1*, *Gpx4 var2* e *Gsr* no grupo exposto à dose de 3,75 µg/Kg de AgNPs. Quanto a atividade enzimática, a exposição pré-púbere às AgNPs levou ao aumento na atividade enzimática da CAT, GPX e GSR no testículo no grupo exposto a maior dose, 15 µg/Kg de AgNPs, enquanto a

atividade enzimática da SOD não sofreu alterações significativas em nenhum dos grupos expostos.

Os achados do estudo sugerem que as AgNPs causam alterações na expressão e na atividade das enzimas envolvidas no controle oxidativo testicular durante o desenvolvimento pré-púbere, sugerindo que as AgNPs podem agir como um potencial desregulador endócrino. Diversos mecanismos podem estar envolvidos nessas alterações, portanto os resultados serão discutidos a fim de se compreender melhor a toxicidade reprodutiva das AgNPs.

A espermatogênese envolve processos de auto-renovação e diferenciação de células-tronco espermatogônicas no testículo. Para manutenção do equilíbrio entre estes processos e da fertilidade potencial é necessário o consumo de oxigênio mitocondrial, o que consequentemente resulta na geração de EROs. As EROs estão envolvidas em todos os processos fisiológicos celulares e têm efeitos benéficos ou nocivos nos sistemas biológicos, dependendo de sua natureza, concentração, localização e tempo de exposição (AITKEN et al., 2014; GUERRIERO et al., 2014).

Nos testículos, as EROs são indispensáveis no processo proliferação e maturação de células germinais masculinas (SHI et al., 2010), por outro lado, concentrações elevadas ou remoção inadequada de EROs podem ser muito perigosas, causando modificações em moléculas suscetíveis, como o DNA, os lipídeos e as proteínas. Além disso, os testículos e as membranas celulares dos espermatozoides contêm grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados, tornando-os altamente vulneráveis à fixação de EROs e suscetíveis aos danos induzidos pelo oxigênio e, portanto, à peroxidação lipídica (LPO).

O estresse oxidativo é uma condição que reflete um desequilíbrio entre a manifestação sistêmica das EROs e a capacidade de um sistema biológico de desintoxicar facilmente os intermediários reativos ou reparar o dano resultante, sendo considerado uma causa importante da infertilidade masculina idiopática. Para garantir que as funções espermatogênicas e esteroidogênicas das células de Leydig não sejam impactadas pela sobre-expressão das EROs, os espermatozoides possuem mecanismos de defesa antioxidantes capazes de neutralizar EROs, protegendo as células gonadais e espermatozoides maduros de danos oxidativos. Os mecanismos disponíveis incluem a baixa tensão de oxigênio, característica deste tecido, juntamente com a ação de uma variedade de enzimas antioxidantes (GUERRIERO et al., 2014; HENKEL, 2011; SAALU, 2010).

Estudos realizados anteriormente em nosso laboratório avaliaram os efeitos das AgNPs (15, 7,5, 3,75 ou 1,875 μg AgNP/kg) sobre a produção e funcionalidade dos espermatozoides. A atividade mitocondrial reduziu nos grupos tratados com 7,5 e 15 μg AgNP/kg (CAVALLIN,

2016). Essas alterações no grupo tratado com 15 µg AgNP/kg foram previamente demonstradas pelo nosso grupo (MATHIAS et al., 2015), sendo incluída esta dose neste estudo para se ajustar a curva de dose-resposta como a dose mais elevada.

A mitocôndria está localizada na peça intermediária do espermatozoide, produzindo a energia para movimentar o flagelo e impulsionar os espermatozoides através do trato genital feminino. Desta forma, a redução da sua função pode comprometer a motilidade espermática e, conseqüentemente, impedir a fertilização (AMARAL et al., 2013). Ainda neste estudo a exposição pré-púbere às AgNPs alterou a expressão testicular de genes relacionados a espermatogênese: receptor de androgênio (*Ar*), receptor de estrogênio α acoplado a proteína G (*Gper*) e receptores de estrógenos (*Esr1*); a reserva e o tempo de trânsito espermático nas porções de cabeça e corpo do epidídimo; a integridade do acrossomo, níveis séricos de testosterona e estradiol. Apesar das alterações nas concentrações de testosterona sérica, na expressão de receptores de andrógeno, nas concentrações de estradiol sérica e na expressão do receptor de estrógenos, a produção de espermatozoides não foi afetada (CAVALLIN, 2016).

Os espermatozoides são ricos em mitocôndrias, responsáveis pela respiração celular e fornecimento de energia para a sua motilidade, desta forma a geração de EROs nos espermatozoides é mediada por atividades redox intracelulares. A presença de espermatozoides não funcionais no sêmen eleva significativamente a produção de EROs, o que, por sua vez, afeta sua função mitocondrial e, posteriormente, a função espermática. A maioria das EROs presentes em espermatozoides humanos é o $O_2^{\bullet-}$ (HENKEL, 2011), o qual pode ser gerado por enzimas especializadas, como a xantina ou NADPH oxidases, ou como um subproduto do metabolismo celular, e são convertidos em H_2O_2 pela SOD. O H_2O_2 e o $O_2^{\bullet-}$, em presença de metais de transição, como cobre e ferro, sofrem a reação de Haber-Weiss para gerar o OH^{\bullet} , uma ERO altamente reativa e nociva. Os OH^{\bullet} são iniciadores potentes da cascata de LPO e podem levar a ruptura da membrana e perda de função espermática (AGARWAL et al., 2014; SIKKA, 2001).

A defesa contra os radicais formados pela SOD, geralmente é mediada pela CAT ou GPX, que usam GSH como doador de elétrons. A GSH mantém as células em um estado reduzido, agindo como doador de elétrons para outras enzimas antioxidantes e também como fonte para a formação de conjugados com alguns compostos prejudiciais endógenos e xenobióticos. Os níveis de GSH são mantidos através de duas etapas que consomem ATP, envolvendo c-glutamil cisteína sintetase (cGCS) e glutatona sintetase. A outra opção constitui o sistema de reciclagem envolvendo GSR, na interação da GSH com as EROs, a GSH serve como doador de elétrons, o produto de oxidação resultante, GSSG, é reciclado pela GSR através de

transferência de elétrons de NADPH ou bombeado para fora das células. Assim, a GSR participa indiretamente na proteção das células contra o estresse oxidativo (GUERRIERO et al., 2014).

A SOD desempenha um papel vital na defesa local contra danos nos tecidos e radicais livres no trato genital masculino e durante a diferenciação de células germinativas no testículo. A tensão do oxigênio é conhecida por regular a atividade da SOD em bactérias, porém, cada uma das isoenzimas responde de forma diferente à ação do oxigênio, sugerindo que a pressão de oxigênio pode desempenhar um papel na regulação da atividade da SOD em diferentes tecidos de mamíferos (MICHELSON; MCCORD; FRIDOVICH, 1977).

Em contrapartida, Delabar et al (1987) sugeriram que o controle da atividade e da expressão da SOD em cultura de tecidos e células se deve em grande parte à regulação do mRNA provavelmente à nível transcricional ou pós-transcricional, pois em condições fisiológicas normais a regulação da expressão da SOD1 em diferentes tecidos não mostrou nenhuma correlação entre o nível de mRNA de SOD1 e/ou atividade enzimática e a tensão de oxigênio do tecido. Todos esses dados sugerem que outros fatores, além da tensão do oxigênio e/ou do consumo de oxigênio, regulam a expressão dos genes que codificam a SOD (DELABAR et al., 1987; GU; MORALES; HECHT, 1995).

Diferentes fatores de transcrição, com função reguladora estão envolvidos na espermatogênese, tais fatores são importantes durante o desenvolvimento e durante a maturação de tipos celulares específicos. Em particular, eles podem ser subdivididos em fatores de transcrição gerais, superfamília dos receptores nucleares, fatores de transcrição envolvidos em funções testiculares, índice de expressão específica do testículo e reguladores transcricionais da dinâmica da junção celular. Nas células de Sertoli, o fator de transcrição da proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP (CREB), um transdutor importante de sinais de FSH, está envolvido na regulação da expressão gênica em resposta a uma série de vias de sinalização induzidas por sobre expressão de EROs. O FSH atua nas células de Sertoli estimulando a designação, a expressão gênica e a recuperação de peptídeos e outras moléculas de adesão (AITKEN; ROMAN, 2008; GRIMES, 2004).

No testículo de ratos, a expressão de mRNA é dependente do ciclo de desenvolvimento das células germinativas e de Sertoli. Em um estudo realizado em nosso laboratório, foi observado um aumento na concentração sérica do FSH no grupo exposto a dose de 1,875 µg/kg de AgNPs (WILK, 2016). O modulador do elemento de resposta cAMP do fator de transcrição (CREM) é altamente expresso em células germinais masculinas e regula a expressão de vários genes pós-meióticos, e é provável que seja o regulador chave da expressão de genes durante a espermatogênese. A interrupção direta do gene CREM bloqueia o programa de diferenciação no

primeiro passo da espermiogênese, o que indica um papel crucial do CREM na diferenciação das células germinativas pós-meióticas, ligando a ação dos estímulos hormonais à regulação direta dos genes da espermatogênese (GUERRIERO et al., 2014; RANAWAT; BANSAL, 2010).

A SOD catalisa a reação entre dois radicais superóxido para produzir O_2 e H_2O_2 (MICHELSON; MCCORD; FRIDOVICH, 1977). Um estudo realizado por Bray et al (1974) mostrou uma diminuição na atividade da SOD quando esta enzima é exposta a altas concentrações de H_2O_2 . A cinética que governa a perda de atividade enzimática da SOD foi estudada em soluções de enzimas diluídas usando grandes excessos de H_2O_2 e os aumentos de absorbância observados foram acompanhados por uma perda de atividade enzimática da SOD, sendo que a adição de CAT não conseguiu reverter as mudanças, sugerindo que o H_2O_2 resultante da própria reação enzimática ou da glicação de proteínas (JIANG; WOOLLARD; WOLFF, 1990) poderia estar causando inativação da SOD.

Em nosso estudo, não foi possível observar alteração da atividade da SOD nos testículos dos animais expostos às AgNPs. Esses resultados sugerem que esta enzima não está respondendo positivamente ao aumento da geração de EROs, possibilitando um aumento dos danos causados por eles. Em contrapartida a atividade enzimática das outras enzimas estudadas (CAT, GPX e GSR), mostrou-se aumentada sempre no grupo exposto à maior dose de AgNPs, a dose de 15 $\mu\text{g/Kg}$, sugerindo que há um aumento compensatório na atividade destas enzimas antioxidantes na tentativa de evitar o dano oxidativo testicular.

Alguns estudos têm sugerido que as AgNPs podem influenciar no metabolismo oxidativo testicular, porém são raros os relatos na literatura de trabalhos que procuram avaliar alterações no sistema antioxidante em nível de expressão gênica. Um ponto importante nesta discussão são os dados provenientes de estudos experimentais, que mostram que há variação na expressão de enzimas antioxidantes de acordo com o tecido a até mesmo o tipo celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A quantificação do mRNA é uma ferramenta importante para analisar os diferentes graus da mecanística e compreender qual é o nível de atuação das AgNPs. Os dados apresentados, quantificação do mRNA e atividade enzimática, não são grandezas proporcionais, portanto o grau de interação entre estes parâmetros nos permite avaliar se as AgNPs tem capacidade de interagir com o organismo a nível de regulação gênica, sendo este efeito restrito a este nível, ou se pode se estender a níveis posteriores.

Em nosso estudo, as alterações na expressão gênica foram mais frequentes nos grupos expostos à dose de 3,75 $\mu\text{g/Kg}$ de AgNPs, e o grupo que apresentou menor alteração foi o grupo tratado com a dose de 15 $\mu\text{g/Kg}$ de AgNPs; em contrapartida, quanto a atividade enzimática, a

dose de 15 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de AgNPs foi a única capaz de desencadear um aumento na atividade das enzimas estudadas, com exceção da SOD, a qual não sofreu alteração. Em estudos anteriores realizados em nosso laboratório, a dose de 3,75 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de AgNPs foi identificada como a dose limítrofe para as alterações funcionais, ou seja, as alterações observadas ocorreram sempre com doses mais elevadas (CAVALLIN, 2016).

Em um estudo de Bhor et al (2004) que avaliou a atividade e a expressão de diferentes enzimas no intestino de ratos diabéticos, não foram observadas alterações na expressão de mRNA dos genes *Gpx1* e *Sod1*, mesmo tendo observado um aumento na atividade destas enzimas, sugerindo que não há uma relação direta entre expressão e atividade enzimática e que a regulação da atividade destas enzimas, não ocorreu através de processos transcricionais.

Os animais tratados apresentaram aumento da atividade enzimática da CAT, GPX e GSR no grupo exposto a maior dose (15 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de AgNPs), enquanto a expressão dos transcritos dos genes foram alteradas nos grupos expostos às menores doses. Os resultados, em conjunto, demonstram que pode estar havendo algum comprometimento do sistema de defesa antioxidante, o que pode influenciar negativamente a espermatogênese, uma vez que o período de pré- puberdade é muito suscetível a substâncias potencialmente desreguladoras endócrinas, como as AgNPs. Para auxiliar na compreensão da relação entre as alterações na quantificação do mRNA e a atividade enzimática, mais experimentos podem ser realizados, dentre eles a quantificação de proteínas carboniladas, presença de antioxidantes não enzimáticos, LPO, proporção GSH/GSSH.

Devido ao fato de a exposição humana e ambiental a este componente estar em crescimento exponencial, possuindo aplicações médicas, torna-se necessário a investigação dos mecanismos de toxicidade reprodutiva e sistêmica, para avaliar os riscos de exposições à diferentes doses, a curto e a longo prazo, permitindo explorar os benefícios das AgNPs de forma segura.

7 CONCLUSÃO

A exposição de ratos pré-púberes à baixas doses de AgNPs demonstrou alterar a expressão e a atividade enzimática de enzimas relacionadas ao controle do metabolismo oxidativo testicular. As alterações observadas podem causar algum comprometimento do sistema de defesa antioxidante e influenciar negativamente a espermatogênese, uma vez que o período de pré-puberdade é muito suscetível a substâncias potencialmente desreguladoras endócrinas, como as AgNPs.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Oxygen radicals in biological systems. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AGARWAL, A. et al. Effect of oxidative stress on male reproduction. v. 32, n. 1, p. 1–17, 2014.
- AHAMED, M.; ALSALHI, M. S.; SIDDIQUI, M. K. J. Silver nanoparticle applications and human health. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 23–24, p. 1841–1848, 2010.
- AITKEN, R. et al. Oxidative stress and male reproductive health. **Asian Journal of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 31, 2014.
- AITKEN, R.; CLARKSON, J. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **Journals of Reproduction e Fertility**, v. 81, n. 2, p. 459–69, 1987.
- AITKEN, R. J.; ROMAN, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 636, n. December, p. 154–171, 2008.
- AMARAL, A. et al. Mitochondria functionality and sperm quality. **Reproduction**, v. 146, n. 5, 2013.
- BAST, A.; HAENEN, G. R. M. M.; DOELMAN, C. J. A. Oxidants and antioxidants: State of the art. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3 SUPPL. 3, 1991.
- BAUCHÉ, F.; FOUCHARD, M. H.; JÉGOU, B. Antioxidant system in rat testicular cells. **FEBS Letters**, v. 349, n. 3, p. 392–396, 1994.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276–287, 1971.
- BEER, C. et al. Toxicity of silver nanoparticles-Nanoparticle or silver ion? **Toxicology Letters**, v. 208, n. 3, p. 286–292, 2012.
- BHOR, V. M.; RAGHURAM, N.; SIVAKAMI, S. Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 89–97, 2004.
- BOREK, C. Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as a supplement. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 3, p. 1016–1019, 2001.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRAY, B. R. C. et al. Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. **Biochemistry Journal**, v. 139, p. 43–48, 1974.

- BRAYDICH-STOLLE, L. et al. In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germline Stem Cells. **Toxicological Sciences**, v. 16, n. 2, p. 1816–1826, 2005.
- CASTELLANO, J. J. et al. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. **International Wound Journal**, v. 4, n. 2, 2007.
- CAVALLIN, M. D. **Efeito paradoxal de baixas doses de nanopartículas de prata na expressão testicular de genes relacionados com a espermatogênese, hormônios sexuais e funcionalidade espermática**. [s.l.] Universidade Estadual do Centro-Oeste, 2016.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156–159, 1987.
- CHU, F. F. The human glutathione peroxidase genes GPX2, GPX3, and GPX4 map to chromosomes 14, 5 and 19, respectively. **Cytogenet Cell Genet**, v. 66, p. 96–98, 1994.
- COHEN, G.; HOCHSTEIN, P. Glutathione Peroxidase : The Primary Agent for the Elimination of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes *. **Biochemistry**, v. 2, n. 6, p. 1420–1428, 1963.
- CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **Journal of Immunological Methods**, v. 265, n. 1–2, p. 49–72, 2002.
- DELABAR, J. M. et al. Cloning and sequencing of a rat CuZn superoxide dismutase cDNA. Correlation between CuZn superoxide dismutase mRNA level and enzyme activity in rat and mouse tissues. **European Journal Of Biochemistry**, v. 166, n. 1, p. 181–187, 1987.
- DIAMANTI-KANDARAKIS, E. et al. Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. **Endocrine Review**, v. 30, n. 4, p. 293–342, 2009.
- DONALDSON, K. Nanotoxicology. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 61, n. 9, p. 727–728, 2004.
- DREVET, J. R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, n. 1–2, p. 70–79, 2006.
- DURÁN, N. et al. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 6, p. 949–959, 2010.
- FERNÁNDEZ, E. J. et al. The preparation of highly active antimicrobial silver nanoparticles by an organometallic approach. **Nanotechnology**, v. 19, n. 18, p. 185602, 2008.
- FUJII, J. et al. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. **Asian Journal of Andrology**, 2003.
- GRIMES, S. R. Testis-specific transcriptional control. **Gene**, v. 343, p. 11–22, 2004.
- GU, W.; MORALES, C.; HECHT, N. B. In male mouse germ cells, copper-zinc superoxide

dismutase utilizes alternative promoters that produce multiple transcripts with different translation potential. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 1, p. 236–243, 1995.

GUERRIERO, G. et al. Roles of reactive oxygen species in the spermatogenesis regulation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, n. APR, p. 10–13, 2014.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. Fourth Edition; **Oxford University Press**, p.268-340, 2007.

HENKEL, R. R. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, p. 43–52, 2011.

HOFFMANN, S. Silver sulfadiazine: an antibacterial agent for topical use in burns. A review of the literature. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 18, p. 119–126, 1984.

HOLLINGER, M. A. Toxicological aspects of topical silver pharmaceuticals. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 26, n. 3, p. 255–260, 1996.

JI, J. H. et al. Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. **Inhalation Toxicology**, v. 19, n. 10, p. 857–871, 2007.

JIANG, Z.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 268, n. 1, p. 69–71, 1990.

KANEKO, T. et al. The expression of glutathione reductase in the male reproductive system of rats supports the enzymatic basis of glutathione function in spermatogenesis. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 5, p. 1570–1578, 2002.

KASAHARA, E. et al. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di(2-ethylhexyl)phthalate. **Biochemistry Journal**, v. 365, p. 849–856, 2002.

KAVLOCK, R. J. et al. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. **Environmental Health Perspectives**, v. 104 Suppl, n. August, p. 715–740, 1996.

KIM, J. S. et al. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. **Toxicological Sciences**, v. 89, n. 1, p. 338–347, 2006.

KIM, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 95–101, 2007.

KIM, Y. S. et al. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. **Inhalation Toxicology**, v. 20, n. 6, p. 575–583, 2008.

KIM, Y. S. et al. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. **Particle and Fibre**

- Toxicology**, v. 7, n. 1, p. 20, 2010.
- KOMATSU, T. et al. The effects of nanoparticles on mouse testis Leydig cells in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 8, p. 1825–1831, 2008.
- LANSDOWN, A. Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. **Journal of Woun**, v. 11, n. 4, p. 125–30, 2002.
- LANSDOWN, A. Silver in healthcare: antimicrobial effects and safety in use. **Biofunctional Textiles and the Skin**, v. 33, p. 17–34, 2006.
- LARSEN, K. et al. Porcine DJ-1: Cloning of PARK7 cDNA, sequence comparison, expression analysis and chromosomal localization. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 116, n. 1–2, p. 93–99, 2007.
- LIU, H. L. et al. Antibacterial properties of silver nanoparticles in three different sizes and their nanocomposites with a new waterborne polyurethane. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, n. 1, p. 1017–1028, 2010a.
- LIU, W. et al. Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size. **Nanotoxicology**, v. 4, n. 3, p. 319–330, 2010b.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.
- LYON, T. D. B. et al. Age dependence of potentially toxic elements (Sb, Cd, Pb, Ag) in human liver tissue from paediatric subjects. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 4, n. 6, p. 1034–1039, 2002.
- MATHIAS, F. T. et al. Daily exposure to silver nanoparticles during prepubertal development decreases adult sperm and reproductive parameters. **Nanotoxicology**, v. 5390, p. 1–7, 2015.
- MELISSINOS, K. G. et al. Determination of glutathione reductase activity. **Nephron**, v. 28, p. 76–79, 1981.
- MICHELSON, A. M.; MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. **Superoxide and superoxide dismutases**. [s.l.] Academic Press, 1977.
- MORAL, R. et al. Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature. **The Journal of Endocrinology**, v. 196, n. 1, p. 101–112, 2008.
- MORI, K. et al. Testicular toxicity and alterations of glutathione metabolism resulting from chronic inhalation of ethylene oxide in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 101, n. 2, p. 299–309, 1989.
- MURDOCK, R. C. et al. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. **Toxicological Sciences**, v. 101, n. 2, p. 239–

253, 2008.

NOWACK, B.; KRUG, H. F.; HEIGHT, M. 120 years of nanosilver history: Implications for policy makers. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 4, p. 1177–1183, 2011.

ONG, C.-N.; SHEN, H.-M.; CHIA, S.-E. Biomarkers for male reproductive health hazards: are they available? **Toxicology Letters**, v. 134, n. 1–3, p. 17–30, 2002.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70, n. 1, p. 158–69, jul. 1967.

PAN, Y. et al. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. **Small**, v. 3, n. 11, p. 1941–1949, 2007.

RAHMAN, M. F. et al. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles. **Toxicology**, v. 187, p. 15–21, 2009.

RANAWAT, P.; BANSAL, M. P. Modulatory effects of selenium on spermatogenesis: involvement of transcription factors CREB and CREM. **American Journal of Biomedical Sciences**, v. 2, n. 4, p. 329–341, 2010.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formacao e os efeitos das especies reativas de oxigenio no meio biologico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133–149, 2005.

SAALU, L. C. The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility: an evidence based evaluation. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 9, p. 413–422, 2010.

SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, n. 12, p. 1–7, 2004.

SCHAEUBLIN, N. M. et al. Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. **Nanoscale**, v. 3, n. 2, p. 410–420, 2011.

SCHRAND, A. M. et al. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 5, p. 544–568, 2010.

SCHUG, T. T. et al. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, n. 3–5, p. 204–215, 2011.

SHAVLOVSKI, M. M. et al. Embryotoxicity of silver ions is diminished by ceruloplasmin—further evidence for its role in the transport of copper. **Biometals**, v. 8, n. 2, p. 122–128, 1995.

SHI, Y. et al. Comparative studies of oxidative stress and mitochondrial function in aging. **Integrative and Comparative Biology**, v. 50, n. 5, p. 869–879, 2010.

- SIKKA, S. C. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. **Current Medical Chemistry**, v. 8, p. 851–862, 2001.
- SIKKA, S.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **J Androl.**, v. 16, n. 6, p. 464–8, 1995.
- SIQUEIRA, M. C. et al. Caracterização e avaliação da toxicidade de nanopartículas de prata para incorporação em matriz polimérica para uso em embalagens de alimentos. **Embrapa Instrumentação**, p. 542–544, 2013.
- SKINNER, M. K. Role of epigenetics in developmental biology and transgenerational inheritance. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 93, n. 1, p. 51–55, 2011.
- SLEIMAN, H. K. et al. Effects of prepubertal exposure to silver nanoparticles on reproductive parameters in adult male wistar rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 76, n. 17, p. 1023–1032, 2013.
- SUNG, J. H. et al. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. **Toxicological Sciences**, v. 108, n. 2, p. 452–461, 2009.
- TOLAYMAT, T. M. et al. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 5, p. 999–1006, 2010.
- TRAMER, F. et al. Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. **Biology of reproduction**, v. 59, n. 4, p. 753–8, 1998.
- WILK, R. **Nanopartículas de prata (AgNPs) alteram a expressão gênica hipotalâmica**. [s.l.] Universidade Estadual do Centro-Oeste, 2016.
- WONG, W. Y. et al. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. **Fertility and Sterility**, v. 73, n. 3, p. 435–442, 2000.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do comitê de ética



Universidade Estadual do Centro-Oeste

Reconhecida pelo Decreto Estadual nº 3.444, de 8 de agosto de 1997

COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS - CEUA/UNICENTRO

Ofício nº 014/2015 – CEUA/UNICENTRO

Guarapuava, 14 de Maio de 2015

Senhor Pesquisador,

1. Comunicamos que o projeto de pesquisa intitulado: “ **Avaliação de limites toxicológicos seguros para o emprego de nanopartículas de prata como agente antimicrobiano baseado na avaliação toxicológica sobre a espermatogênese.** .”, parecer do protocolo 013/2015 foi analisado e considerado **APROVADO**, pelo Comitê de Ética em Uso de Animais de nossa Instituição no dia 03 de Julho de 2015.
2. Em atendimento à Resolução 196/96 do CNS, deverá ser encaminhado ao CEUA o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento do mesmo.
3. Observamos ainda que se mantenha a devida atenção aos Relatórios Parciais e Finais na seguinte ordem:
 - Os **Relatórios Parciais** deverão ser encaminhados ao CEUA assim que tenha **transcorrido um ano da pesquisa**.
 - Os **Relatórios Finais** deverão ser encaminhados ao CEUA em até **30 dias após a conclusão da pesquisa**.
 - **Qualquer alteração na pesquisa** que foi aprovada, como por exemplo, números de sujeitos, local, período, etc. deverá ser necessariamente enviada uma carta justificativa para a análise do CEUA.

Pesquisadora: Prof.^a. Dr . Marco Aurélio Romano
Atenciosamente,

Larissa S. Bernardi
Prof.^a. Larissa Sakis Bernardi
Coordenador do CEUA/UNICENTRO
Port. 728/2015 - GR/UNICENTRO

AO Senhora
Prof.^a. Dr . Marco Aurélio Romano
UNICENTRO-CEDETEG

Home Page: <http://www.unicentro.br>

Campus Santa Cruz: Rua Pres. Zacarias 875 – Cx. Postal 3010 – Fone: (42) 3621-1000 – FAX: (42) 3621-1090 – CEP 85.015-430 – GUARAPUAVA – PR
Campus CEDETEG: Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 – Fone/FAX: (42) 3629-8100 – CEP 85.040-080 – GUARAPUAVA – PR
Campus de Irati: PR 153 – Km 07 – Riozinho – Cx. Postal, 21 – Fone: (42) 3421-3000 – FAX: (42) 3421-3067 – CEP 84.500-000 – IRATI – PR