

FRANCIELLE TATIANA MATHIAS

**ESTUDO DO EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS DE SAIS DE PRATA SOBRE
PARÂMETROS REPRODUTIVOS E FUNCIONAIS ESPERMÁTICOS EM RATOS
WISTAR**

Guarapuava
2013

FRANCIELLE TATIANA MATHIAS

**ESTUDO DO EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS DE SAIS DE PRATA SOBRE
PARÂMETROS REPRODUTIVOS E FUNCIONAIS ESPERMÁTICOS EM RATOS
WISTAR**

Dissertação apresentada como requisito parcial a 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.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Romano

Guarapuava
2013

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que nos permite todas as oportunidades e nos dá força em todos os momentos.

À minha família, ao meu pai Amauri (*in memoriam*), minha mãe Elisabet, meu irmão Jefferson e minha avó Angelina por todo carinho, amor, apoio e confiança em todos os momentos da minha vida.

Ao meu namorado Taylor pela compreensão, amor e incentivo.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Romano pela orientação, confiança e amizade. Por auxiliar e proporcionar aprendizado em todos os momentos e á Renata Marino Romano pelo auxílio e atenção na execução do projeto.

Às minhas amigas Ana, Letícia e Andréa pelo carinho, apoio e incentivo nos momentos difíceis e a todos os meus amigos que estiveram torcendo por mim nesse tempo.

À Patricia Wisniewski pelo auxílio na execução prática e pelas horas compartilhadas no laboratório durante a realização do projeto.

Aos colegas de mestrado pelo companheirismo, pelas conversas e trocas de experiências proporcionando bons momentos.

Aos professores por compartilhar conosco sua sabedoria e suas experiências.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que contribuíram e apoiaram de alguma maneira a execução desse projeto.

RESUMO

A pesquisa e as aplicações da nanotecnologia têm tido um enorme crescimento nos últimos anos. As nanopartículas de sais de prata (AgNPs) possuem diversas aplicações, mas dentre elas destaca-se seu potencial antimicrobiano e em razão do atual problema de resistência, esse produto vêm se tornando foco de estudos para novas drogas que atuem como antimicrobianos ou em sinergismo com medicamentos antibióticos atuais. Aliado a isso, estão sendo amplamente exploradas no setor de cuidados com a saúde, com uma utilização generalizada em diversos produtos de consumo. O alto grau de comercialização aumenta o acesso da prata, na forma de nanopartículas, a tecidos, células e moléculas biológicas dentro do corpo humano, podendo resultar em toxicidade sobre a saúde humana, em diversas áreas incluindo a da reprodução. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito das AgNPs de 60 nm e concentração de 0,02 mg/mL sobre parâmetros reprodutivos e funcionais espermáticos em ratos Wistar. Foram utilizados, como modelo experimental 30 animais, dividido em três grupos, sendo um grupo controle recebendo 0 mg/kg de AgNPs e dois grupos testes recebendo doses de 0,015 mg/Kg e 0,030 mg/Kg de AgNPs. Os animais foram acompanhados da fase pré-púbere à idade adulta e receberam o produto por gavagem do 23º dia ao 59º dia de idade. A avaliação dos parâmetros funcionais espermáticos incluiu a avaliação da integridade da membrana plasmática, através da coloração Eosina/Nigrosina, integridade do acrossomo, utilizando a coloração de Pope, avaliação da atividade mitocondrial, através da coloração de DAB e avaliação da integridade do DNA, através do ensaio do cometa. Os parâmetros reprodutivos foram avaliados no sentido de verificação de possíveis alterações teciduais, endócrinas e comportamentais nos animais em estudo e incluíram avaliação da idade e peso a puberdade, análise da contagem espermática, produção espermática diária por testículo e tempo de trânsito no epidídimo, verificação de anormalidades morfológicas nos espermatozoides dos animais, avaliação da orientação e do comportamento sexual. A exposição pré-púbere de ratos às AgNPs demonstrou comprometer a funcionalidade espermática dos animais tratados visualizado pela redução na integridade acrossomal e da membrana plasmática, além de redução na atividade mitocondrial dos espermatozoides. Entretanto, não houve dano à integridade do DNA espermático. Os animais apresentaram um atraso em dias, bem como um maior peso ao atingir a puberdade. Não houve alterações na contagem espermática e na produção espermática diária por testículo, porém a reserva espermática nos animais tratados evidenciou uma redução na concentração dos espermatozoides e houve aceleração no tempo de trânsito espermático, ambos na cauda do

epidídimo. Os espermatozoides dos animais tratados apresentaram anormalidades morfológicas e houve alteração na orientação sexual, com preferência sexual dos animais por machos, já o comportamento sexual não foi afetado. As análises hormonais revelaram que a substância não alterou o padrão endócrino. Os resultados em conjunto demonstram que houve comprometimento da qualidade seminal e dos parâmetros reprodutivos evidenciando que as AgNPs, mesmo em doses extremamente baixas têm potencial para causar prejuízo a fertilidade masculina.

Palavras chave: Nanopartículas de sais de prata. Testes funcionais. Funcionalidade espermática. Fertilidade. Reprodução.

ABSTRACT

Nanotechnology research and applications has had a remarkable growth over the last years. Silver nanoparticles (AgNPs) have several applications but among them emphasize its antimicrobial potential and due to the current problem of bacterial resistance, it is becoming focus of studies of new drugs that act as antimicrobials or in synergism with current antibiotics. Allied to this, are being widely explored in health care field with widespread use in many consumer products. The high level of commercialization increases the access of silver in nanoparticles shapes, tissues, cells and biological molecules within the human body, which can result in toxicity to human health in several areas including reproduction. The aim of this study is to evaluate the effect of AgNPs 60 nm and concentration of 0.02 mg/mL on reproductive parameters and functional sperm in male Wistar rats. Were used as experimental model 30 animals, divided into three groups, one control group receiving 0 mg/kg AgNPs and two test groups receiving doses of 0.015 mg/kg and 0,030 mg/kg AgNPs. The animals were observed from pre puberty to adulthood and the product has received by gavage from 23 days to 59 days age. The functional parameters evaluation of sperm included sperm assessment of plasma membrane integrity through Eosin/ Nigrosine staining, acrosomal integrity using Pope staining, mitochondrial activity evaluation via DAB and DNA evaluation of integrity by the comet assay. Reproductive parameters were evaluated in order to check possible tissue, endocrine and behavioral changes in animals and included age assessment and weight at puberty, sperm analysis count, daily sperm production per testis and epididymis transit time, check pathologies in animal's semen, assessment orientation and sexual behavior. The prepubertal exposure showed AgNPs compromising the sperm functionality treated animals displayed by reduction in the acrosome integrity and the plasma membrane integrity and reduction in mitochondrial activity of spermatozoa, since damage to sperm DNA integrity has not been viewed. The animals showed a delay in days as well as a greater weight to reach puberty. There were no change in sperm count and daily sperm production per testis, but the sperm reserve in treated animals showed a reduction in sperm concentration and there was acceleration in sperm transit time, both in the epididymis tail. The sperm of treated animals showed pathologies and there were changes in sexual orientation, where animals showed sexual preference for males, since sexual behavior was not affected. The hormonal analysis revealed that the substance has not changed the hormones pattern. The results altogether

pointed out that there was impairment of semen quality and reproductive parameters showing that the AgNPs, even at extremely low doses has extreme potential to affect male fertility.

Keywords: Silver nanoparticles. Functional tests. Sperm functionality. Fertility. Reproduction

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Princípio do teste Elecsys Testosterone II Immunoassay. Fonte: Bula do Kit comercial Testosterone II. Cobas, Roche.....38
- Figura 2 - Desenho esquemático do aparelho utilizado para a avaliação da orientação sexual. Planta baixa da arena e visualização lateral da parede metálica. Fonte: SANTOS, 2011.....41
- Figura 3 - Gráfico de evolução do peso corporal do grupo controle e dos grupos tratados com AgNPs nas doses de 0,015 mg/Kg e 0,030 mg/Kg do 23° ao 102° dia de idade dos animais.....44
- Figura 4- Lâminas de coloração de Pope (integridade acrossomal). Em A, acrossomo íntegro e em B, acrossomo não íntegro.....49
- Figura 5 – Lâminas de Coloração Eosina Nigrosina (Integridade da membrana plasmática). Em A, espermatozoide com membrana íntegra e em B, espermatozoide com membrana não íntegra.....49
- Figura 6 – Lâminas de coloração DAB (atividade mitocondrial). Em A, espermatozoide classificado como classe I, em B como classe II, em C como classe III e em D como classe IV.....50
- Figura 7 – Gráfico da idade ao atingir a puberdade dos animais controle e tratados com AgNPs nas doses de 0,015 mg/Kg e 0,030 mg/Kg. (Médias \pm EPM, Médias \pm Desvio padrão).....52
- Figura 8 – Gráfico do peso ao atingir a puberdade dos animais controle e tratados com AgNPs nas doses de 0,015 mg/Kg e 0,030 mg/Kg. (Médias \pm EPM, Médias \pm Desvio padrão).....52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teste da integridade acrossomal (Coloração Pope). Acrossomo íntegro e não íntegro (Mediana, Intervalo interquartílico) no grupo controle e nos grupos tratados com AgNPs.....	46
Tabela 2 – Teste da integridade da membrana plasmática (Coloração Eosina/Nigrosina). E/N íntegro: membrana plasmática íntegra, E/N não íntegro: membrana plasmática não íntegra (Mediana, Intervalo interquartílico) no grupo controle e nos grupos tratados com AgNPs....	47
Tabela 3 - Teste da atividade mitocondrial (Coloração DAB). DAB I a DAB IV (Mediana, Intervalo interquartílico) no grupo controle e nos grupos tratados com AgNPs.....	48
Tabela 4 – Idade em dias (Mediana, Intervalo interquartílico) à puberdade e peso em gramas (Médias \pm EPM, [IC 95%]) à puberdade no grupo controle e nos grupos tratados com AgNPs.....	51
Tabela 5 – Peso médio do corpo do epidídimo (em gramas) no grupo controle e nos grupos tratados com AgNPs (Média \pm EPM).....	53
Tabela 6 - Reservas espermáticas da cabeça+corpo do epidídimo (sptz x 10 ⁶) e da cauda do epidídimo (sptz x10 ⁶) no grupo controle e nos grupos tratados com AgNPs (Médias \pm EPM).....	55
Tabela 7 - Tempo de trânsito espermático (dias) nos segmentos cabeça+corpo e cauda do epidídimo no grupo controle e nos grupos tratados com AgNPs (Médias \pm EPM).....	56
Tabela 8 – Anormalidades morfológicas nos espermatozoides. Anormalidades morfológicas totais e cabeça solta (Mediana, Intervalo interquartílico) no grupo controle e nos grupos tratados com AgNPs.....	57
Tabela 9 – Preferência Sexual e tempo de permanência (segundos) do no grupo controle e dos grupos tratados com AgNPs na área do macho e na área da fêmea e escore de preferência sexual (Médias).....	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Nanopartículas de sais de prata (AgNPs).....	14
2.2 Toxicidade de AgNPs sobre a reprodução.....	19
2.3 Testes funcionais.....	22
2.3.1 Integridade acrossomal.....	22
2.3.2 Integridade da membrana plasmática.....	23
2.3.3 Atividade mitocondrial.....	23
2.3.4 Integridade do DNA espermático.....	24
2.4 Avaliação de parâmetros reprodutivos.....	24
2.4.1 Puberdade.....	24
2.4.2 Produção espermática diária por testículo e tempo de trânsito no epidídimo.....	25
2.4.3 Anormalidades morfológicas nos espermatozoides.....	26
2.4.4 Regulação hormonal da espermatogênese.....	26
2.4.5 Comportamento e orientação sexual.....	27
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4 METODOLOGIA.....	30
4.1 Manejo dos animais.....	30
4.2 Exposição às Nanopartículas de sais de prata (AgNPs).....	30
4.3 Determinação das doses das Nanopartículas de sais de prata (AgNPs).....	31
4.4 Análise do tamanho das Nanopartículas de sais de prata (AgNPs).....	32
4.5 Testes Funcionais do sêmen.....	32
4.5.1 Integridade acrossomal.....	32
4.5.2 Integridade da membrana plasmática.....	33
4.5.3 Atividade Mitocondrial.....	33
4.5.4 Integridade do DNA espermático (Ensaio do Cometa).....	34
4.6 Determinação da idade e peso à puberdade (Verificação da separação balanoprepucial).....	35

4.7 Contagem espermática, produção espermática diária por testículo e tempo de trânsito no epidídimo.....	36
4.8 Verificação de anormalidades morfológicas nos espermatozoides.....	37
4.9 Concentrações séricas hormonais: Testosterona, Estradiol, FSH e LH.....	37
4.9.1 Testosterona.....	37
4.9.2 Estradiol.....	38
4.9.3 FSH E LH.....	39
4.10 Avaliação da orientação sexual.....	39
4.11 Avaliação do comportamento sexual.....	41
4.12 Análise estatística.....	42
5 RESULTADOS.....	43
5.1 Evolução do peso corporal.....	43
5.2 Análise do tamanho e distribuição das AgNPs.....	44
5.3 Testes Funcionais.....	45
5.3.1 Integridade acrossomal.....	45
5.3.2 Integridade da membrana plasmática.....	46
5.3.3 Atividade mitocondrial (DAB).....	47
5.3.4 Integridade do DNA (Ensaio do Cometa).....	48
5.4 Determinação do peso e idade à puberdade.....	51
5.5 Contagem espermática, produção espermática diária por testículo e tempo de trânsito no epidídimo.....	53
5.5.1 Peso médio do testículo e do epidídimo.....	53
5.5.2 Contagem espermática: número de espermatozoides por testículo e por grama de testículo.....	53
5.5.3 Produção espermática diária.....	54
5.5.4 Reservas espermáticas.....	54
5.5.5 Tempo de trânsito espermático.....	55
5.6 Verificação de anormalidades morfológicas nos espermatozoides.....	56
5.7 Concentrações séricas hormonais: Testosterona, Estradiol, FSH E LH.....	57
5.8 Avaliação da orientação sexual.....	57
5.9 Comportamento sexual	58
6 DISCUSSÃO.....	60
6.1 Evolução do peso corporal.....	60
6.2 Análise do tamanho das AgNPs.....	61

6.3 Testes Funcionais.....	61
6.3.1 Integridade acrossomal.....	61
6.3.2 Integridade da membrana plasmática.....	63
6.3.3 Atividade mitocondrial (DAB).....	64
6.3.4 Integridade do DNA (Ensaio do Cometa).....	65
6.4 Determinação do peso e idade à puberdade.....	67
6.5 Contagem espermática, produção espermática diária por testículo e tempo de trânsito no epidídimo.....	68
6.6 Verificação de anormalidades morfológicas nos espermatozoides.....	70
6.7 Concentrações séricas hormonais: Testosterona, Estradiol, FSH e LH.....	71
6.8 Orientação sexual.....	72
6.9 Comportamento sexual.....	73
7 CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
ANEXOS.....	92

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa e as aplicações da nanotecnologia têm tido um enorme crescimento nos últimos anos. As nanopartículas são definidas como materiais com tamanho entre 1 e 100 nanômetros (nm), o que confere propriedades mecânicas, ópticas, elétricas e estruturais avançadas, além de uma aumentada área de superfície em relação à substância original (BEER et al., 2012). A redução do tamanho da partícula é uma maneira eficiente de melhorar a biocompatibilidade de materiais e isso, aliado ao fato de que esses materiais podem ser modificados, facilita suas aplicações em campos como a biociência e a medicina (KIM et al., 2007).

As nanopartículas de sais de prata (AgNPs) possuem inúmeras aplicações, mas dentre elas destaca-se seu potencial antimicrobiano (KIM et al., 2007). Em razão do atual problema de resistência bacteriana aos antibióticos, as AgNPs vêm se tornando foco de estudos para novas drogas que atuam como antimicrobianos ou em sinergismo com medicamentos antibióticos atuais (DURÁN et al., 2010) e os resultados têm sido animadores demonstrando que ocorre potencialização da atividade antimicrobiana e efeito sinérgico com antibióticos como gentamicina, ampicilina e ofloxacino (MORONES-RAMIREZ et al., 2013).

As aplicações dessas nanopartículas principalmente no setor de cuidados com a saúde têm sido amplamente exploradas. Estudos demonstram a eficiência das AgNPs como revestimento para curativos de queimaduras, para dispositivos cirúrgicos e em próteses ósseas, além de serem incorporadas em roupas, sempre com o objetivo de produzir efeito antimicrobiano (CHEN et al., 2006; COHEN et al., 2007; LANSDOWN, 2006; LEE et al., 2007).

Em virtude do grau de comercialização desse tipo de material estar crescendo, aumenta o acesso da prata, na forma de nanopartículas, a tecidos, células e moléculas biológicas dentro do corpo humano (CHEN; SCHLUESENER, 2008). As mesmas características que as tornam atraentes são também motivo de preocupação para a saúde humana e ambiental (BEER et al., 2012). Cada vez mais, as pesquisas demonstram que existe uma relação entre a utilização desse tipo de composto e a toxicidade observada sobre a saúde humana, em diversas áreas incluindo a da reprodução (SCHRAND et al., 2010).

Em relação à reprodução, já foi comprovado que nanopartículas podem penetrar a barreira hematotesticular (KIM et al., 2006), podem ser captadas pelas células de Leydig

alterando sua viabilidade, proliferação e expressão gênica (KOMATSU et al., 2008). As AgNPs demonstraram causar redução drástica na função mitocondrial, aumento de extravasamento da membrana, necrose e indução de apoptose em células tronco espermatogoniais de mamíferos *in vitro* (BRAYDICH-STOLLE et al., 2005), bem como causar declínio na proliferação celular dessas células tronco espermatogoniais, trazendo prejuízo para a fertilidade (BRAYDICH-STOLLE et al., 2010).

Exposição às substâncias tóxicas pode afetar eventos críticos para o desenvolvimento do sistema reprodutivo, como a determinação da célula germinativa primordial, a gametogênese e eventos de sinalização que determinam o comportamento sexual (PRYOR et al., 2000). Com relação à espermatogênese, as nanopartículas têm demonstrado afetar as três partes do espermatozoide; o acrossomo, que é responsável pela reação acrossomal, o segmento equatorial, que é responsável pela ligação do espermatozoide na membrana do oócito e a peça intermediária, que é responsável pelo vigor do esperma (LAN; YANG, 2012).

Para verificação de danos à estrutura e do potencial de fertilização dos espermatozoides, existem meios de avaliação denominados Testes Funcionais (AITKEN, 2006; RIJSSELAERE et al., 2005). Esses testes são capazes de avaliar a capacidade dos espermatozoides de realizar passos específicos no processo de fertilização, demonstrando sua competência funcional (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003).

O uso das AgNPs vem sendo amplamente difundido (BEER et al., 2012). Já existem dados demonstrando que as AgNPs afetam parâmetros reprodutivos e que nanomateriais podem causar danos à estrutura dos espermatozoides e conseqüentemente afetar sua capacidade de fertilização. O objetivo desse estudo foi avaliar *in vivo* a possível interferência da administração de baixas doses de AgNPs em ratos pré-púberes, sobre a competência funcional de células espermáticas na vida adulta, simulando uma possível contaminação pela absorção de pequenas quantidades, devido ao uso contínuo e esporádico desses compostos em produtos de higiene corporal e antissepsia médica. Outros parâmetros foram paralelamente avaliados no sentido de verificação de possíveis alterações endócrinas, comportamentais e em tecidos reprodutivos masculinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nanopartículas de sais de prata (AgNPs)

Os nanomateriais possuem propriedades físico-químicas únicas, tais como tamanho ultrapequeno, grande área de superfície em relação à massa e reatividade elevada, que são diferentes das características de materiais com a mesma composição em microescala. Estas propriedades podem ser utilizadas para ultrapassar algumas das limitações encontradas em agentes terapêuticos tradicionais (EL-ANSARY; AL-DAIHAN, 2009). As AgNPs ou nanop prata são um conjunto de átomos de prata que variam em diâmetro de 1 a 100 nm (nanômetros) e estão atraindo interesse para aplicações na área da medicina (CHALOUPKA; MALAM; SEIFALIAN, 2010).

Dentre essas aplicações, há relatos de aplicações contra câncer de mama e contra o vírus HIV. Jeyaraj et al. (2013) investigaram o efeito de citotoxicidade *in vitro* de AgNPs contra células humanas de câncer de mama. Os resultados demonstraram que as AgNPs possuem uma promissora propriedade anti-câncer. Ocorreram efeitos adversos nos componentes celulares das células cancerosas, como perda de integridade da membrana, estresse oxidativo, apoptose, além de dano ao DNA. Elechiguerra et al. (2005) demonstraram que as AgNPs têm uma interação tamanho dependente com o vírus HIV-1, onde somente nanopartículas na faixa de 1-10 nm se ligaram ao vírus. Segundo os autores, as nanopartículas interagem com o vírus via ligação preferencial com resíduos de enxofre na glicoproteína gp120, cuja principal função é ligar-se aos receptores CD4 nas células hospedeiras. Devido a essa interação, as AgNPs inibem o vírus de se ligar a célula hospedeira, resultando em inibição da infectividade do vírus *in vitro*.

As AgNPs possuem diversas aplicações, mas dentre elas destaca-se seu potencial antimicrobiano (KIM et al., 2007). As AgNPs têm mostrado atividade contra diversas bactérias, incluindo bactérias multidroga resistente e altamente patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* (INGLE et al., 2008; KIM et al., 2007). O mecanismo exato pelo qual ocorre essa atividade ainda não está totalmente elucidado, mas é provável que ocorra por uma ligação com a membrana bacteriana e interferência em processos vitais (KIM et al., 2007). Recentemente, um estudo demonstrou que o íon prata interrompe vários processos celulares em bactérias

gram-negativas, incluindo a formação de ligações sulfeto, o metabolismo central e a homeostase de ferro. Essas alterações estão associadas ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o aumento da permeabilidade da membrana, os quais seriam responsáveis por causar morte bacteriana (MORONES-RAMIREZ et al., 2013).

Em razão do atual problema de resistência bacteriana, as AgNPs vêm se tornando foco de estudos para novas drogas que atuam como antimicrobianos ou em sinergismo com medicamentos antibióticos atuais (DURÁN et al., 2010). Morones-Ramirez et al. (2013) demonstraram a possibilidade de usar a prata como um adjuvante na terapia antibiótica convencional e os resultados demonstraram que ocorre potencialização da atividade antimicrobiana e efeito sinérgico dos antibióticos gentamicina, ampicilina e ofloxacino, com adição do íon prata, para cepas de *E. coli*. O estudo também demonstrou que a vancomicina (específico para bactérias gram-positivas) foi efetivo para bactérias gram-negativas quando usado em conjunto com a prata. Por fim, a prata aumenta a atividade antibiótica contra bactérias persistentes e têm ação direta sobre a formação de biofilmes, presentes em infecções crônicas de difícil tratamento. Os autores sugerem que a prata seja colocada na forma de nanopartículas para desenvolver terapias mais sofisticadas e eficientes.

As aplicações dessas nanopartículas principalmente no setor de cuidados com a saúde têm sido amplamente exploradas. Estudos demonstram a eficiência das AgNPs como revestimento para curativos de queimaduras, para dispositivos cirúrgicos e em próteses ósseas, além de serem incorporadas em roupas, sempre com o objetivo de produzir efeito antimicrobiano (CHEN et al., 2006; COHEN et al., 2007; LANSDOWN, 2006; LEE et al., 2007). Efeito esse também responsável pela utilização generalizada das AgNPs em produtos de consumo, tais como desinfetantes, desodorantes, sprays e pós antimicrobianos, roupas de cama, lavadoras, purificadores de água, cremes dentais, xampus, bicos, mamadeiras, filtros, utensílios de cozinha, brinquedos, e umidificadores. No Projeto de Nanotecnologias Emergentes do banco de dados Woodrow Wilson, a prata na forma de nanoescala é citada como o material mais comum utilizado nas descrições de produtos, dentre os produtos baseados em nanotecnologia (Woodrow Wilson International Center for Scholars, 2011).

As mesmas características que as tornam atraentes são também motivo de preocupação para a saúde humana e ambiental (BEER et al., 2012). Quanto mais difundido o uso de nanomateriais com a prata, mais amplo torna-se o potencial da exposição humana e dos ecossistemas a esses produtos. As AgNPs podem ser liberados para o meio ambiente através de descargas nos locais de produção, a partir do desgaste e liberação desses materiais

de engenharia em produtos domésticos ou através da lavagem ou descarte de produtos contendo a prata (BENN; WESTERHOFF, 2008; MARAMBIO-JONES; HOEK, 2010).

Em virtude do alto grau de comercialização, aumenta o acesso da prata, na forma de nanopartículas, a tecidos, células e moléculas biológicas dentro do corpo humano. As principais vias de exposição humana seriam o sistema respiratório, o sistema gastrointestinal e a pele, que são as interfaces entre os sistemas internos do corpo humano e o ambiente externo (CHEN; SCHLUESENER, 2008). As AgNPs podem entrar no trato respiratório devido à inalação de poeiras ou gases que contêm essas partículas nos locais de fabricação, podem ser ingeridas através da água, através de brinquedos para crianças ou de recipientes alimentares tratados com prata, ou pode penetrar na pele através têxteis e cosméticos contendo nanopartículas (MARAMBIO-JONES; HOEK, 2010).

Há um crescente corpo de evidências *in vitro* demonstrando que as AgNPs afetam negativamente órgãos e sistemas como pulmão, fígado, cérebro, sistema vascular e pele (CARLSON et al., 2008; HUSSAIN et al., 2005; LARESE et al., 2009; ROSAS-HERNÁNDEZ et al., 2009; XU et al., 2013). Desencadeiam uma série de respostas teciduais, em diferentes linhagens celulares, como danos à membrana celular, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), danos a mitocôndrias, diminuição da atividade metabólica, apoptose, necrose, liberação de marcadores inflamatórios e dano ao DNA (ASHARANI et al., 2009; BRAYDICH-STOLLE et al., 2005; FOLDBJERG et al., 2009; FOLDBJERG; DANG; AUTRUP, 2011; HACKENBERG et al., 2011; HUSSAIN et al., 2005; LIU et al., 2010, PARK et al., 2011).

Dentre os mecanismos de citotoxicidade alguns autores concluem que ocorre principalmente por meio do estresse oxidativo (CARLSON et al., 2008; HUSSAIN et al., 2005; PARK et al., 2011). Estudos têm demonstrado que as AgNPs podem desencadear o estresse oxidativo, atuando como um cavalo de tróia (LUBICK, 2008; LUOMA, 2008; PARK et al., 2010a; STENSBERG et al., 2011). Nesse mecanismo, uma vez que a nanoprata esteja ligada a célula, poderia liberar íons prata livres diretamente para as membranas e para dentro do maquinário celular (LUOMA, 2008) resultando no desencadeamento do processo inflamatório, com a geração de ROS (PARK et al., 2010).

Estudos demonstram que para as AgNPs, quanto menor o tamanho das nanopartículas, maior é o seu potencial de toxicidade. Liu et al. (2010) avaliaram a citotoxicidade de três tamanhos de AgNPs (5nm, 20 nm e 50nm) usando modelos de células humanas e concluíram que as nanopartículas de 5 nm exibiram maior poder em afetar a morfologia celular, causar dano à membrana celular, proporcionar bloqueio do ciclo celular,

geração de ROS e apoptose, além de possuir uma maior facilidade em penetrar nas células quando comparadas as nanopartículas com tamanho de 20 e 50 nm. Park et al. (2011) estudando o efeito do tamanho de partícula sobre a citotoxicidade, inflamação, desenvolvimento de toxicidade e genotoxicidade de AgNPs em linhagens celulares de fibroblastos e macrófagos, também concluíram que as nanopartículas de menor tamanho foram mais citotóxicas do que as nanopartículas maiores, ocorrendo alteração em todos os parâmetros estudados.

Assim como para outros metais, ainda há questionamentos se a toxicidade é proveniente do íon prata ou das nanopartículas com esse metal. Kim et al. (2009) sugeriram que a toxicidade das AgNPs é devido principalmente ao estresse oxidativo e independente dos íons prata, porém a toxicidade de nanopartículas feitas com metais podem não ter origem na nanopartícula em si, mas pode ser resultante da capacidade dessas pequenas partículas se dissolverem deixando íons metálicos em solução (MUDUNKOTUWA; GRASSIAN, 2011).

Há estudos comprovando que a quantidade de íon prata contida em suspensões de AgNPs está ligada à toxicidade das AgNPs, mas não poderia explicar totalmente alguns resultados observados e que ambos, os íons prata e as AgNPs contribuem para a toxicidade (KAWATA; OSAWA; OKABE, 2009; NAVARRO et al., 2008) podendo ocorrer também efeito combinado quando há baixas frações de íons prata presentes em suspensão (BEER et al., 2012). Através desses relatos, as evidências sugerem que o íon prata está ligado pelo menos em parte à toxicidade das AgNPs, mas há ainda conflitos para serem elucidados.

Investigações toxicológicas demonstram que fatores como tamanho, forma, características de superfície e taxa de dissolução influenciam na habilidade das nanopartículas de interagir com sistemas biológicos (CASTRANOVA, 2011). A maior área de superfície em relação ao volume aumenta notavelmente propriedades de superfície de nanopartículas aumentando assim a interação desse material com fluidos biológicos, o que faz essas partículas potencialmente mais reativas do que partículas maiores (BEER et al., 2012). Por isso é importante compreender e traduzir os resultados de toxicidade encontrados *in vitro* para resultados *in vivo*, para que se possa avaliar a extrapolação dessa toxicidade para os humanos (MUNGER et al., 2013). Para as AgNPs já existem relatos de toxicidade *in vivo* para o fígado, pulmão, intestino, cérebro, dentre outros órgãos estudados, bem como definição da NOAEL e LOAEL para administração oral e NOAEL para administração por inalação.

Kim et al. (2010) intoxicaram ratos por via oral com AgNPs de 56 nm, com três doses (30 mg/kg, 125 mg/kg, 500 mg/kg). Após 90 dias de exposição, foram realizados testes clínicos e hematológicos, além de histopatologia e distribuição da prata no organismo dos

animais. Verificou-se que a prata foi distribuída em todos os tecidos avaliados, sendo o principal alvo o fígado, com alterações histopatológicas e alterações nos níveis de fosfatase alcalina e colesterol, houve também acúmulo de prata nos rins. A partir de seus resultados, os autores sugeriram como a NOAEL (No observable adverse effect level) que corresponde a maior dose administrada em um estudo de toxicidade na qual não se observa nenhum efeito adverso, a dose de 30 mg/kg e a LOAEL (Lowest observable adverse effect level) que corresponde a menor dose administrada na qual se observa um efeito adverso, a dose de 125 mg/kg. Já Sung et al. (2009) estudaram a toxicidade de AgNPs por meio da inalação em ratos. Concluíram que as AgNPs foram encontradas em todos os tecidos estudados, os órgãos alvo foram considerados o pulmão, onde houve inflamação e o fígado com hiperplasia do ducto biliar. Por fim, os autores sugeriram a NOAEL de $100\mu\text{g}/\text{m}^3$, para as AgNPs administradas por inalação.

Há evidências que as AgNPs podem também afetar o intestino *in vivo*. AgNPs na faixa de 3-20 nm, causaram diminuição no peso corporal dos animais em todas as doses avaliadas, segundo os autores houve dano às células epiteliais das microvilosidades e às glândulas intestinais, reduzindo a capacidade absorptiva do epitélio intestinal, responsável pela perda de peso (SHAHARE; YASHPAL; SINGH, 2013). Foi demonstrado também que AgNPs de 60 nm acumularam-se na lâmina própria do intestino delgado e do intestino grosso de ratos Sprague-Dawley, após 28 dias de exposição. Houve ainda, alteração na composição de mucinas que constituem o muco, o que pode gerar regiões patológicas e desestabilização da produção da camada de muco, que garante a integridade do epitélio intestinal (JEONG et al., 2010).

No cérebro, as AgNPs demonstraram causar neurotoxicidade em ratos, através da geração de ROS. Além do estresse oxidativo, as análises da expressão de genes, revelaram alterações significativas de genes seletivos de regiões do cérebro incluindo o núcleo caudado, o córtex frontal e o hipocampo. Segundo os autores, a geração e o aumento da produção de ROS, bem como a alteração de genes, podem afetar o sistema imune e o metabolismo aeróbico, causando apoptose e degeneração neuronal nos animais expostos (RAHMAN et al., 2009).

Recentemente, foi realizado um estudo para avaliar a toxicidade sistêmica de AgNPs em humanos. Os autores utilizaram soluções comerciais de AgNPs contendo 10 ppm de prata, por três, sete e quatorze dias; e 32 ppm de prata, por quatorze dias, administradas oralmente, para avaliar a possibilidade de toxicidade em diversos parâmetros sistêmicos. Os resultados demonstraram que não ocorreram alterações clinicamente importantes metabólicas,

hematológicas e urinárias, não foram detectadas alterações morfológicas nos pulmões, no coração ou nos órgãos abdominais. Também não houve alterações na geração de espécies reativas de oxigênio no pulmão ou na geração de citocinas pró-inflamatórias. Porém os autores ressaltam que o período de estudo de 14 dias, deve ser prolongado para melhor determinar se um maior tempo de exposição oral leva a uma maior biodisponibilidade de prata sistêmica e subsequente acumulação em compartimentos lipídicos humanos, sendo essa uma possível fonte de toxicidade crônica (MUNGER et al., 2013).

2.2 Toxicidade de AgNPs sobre a reprodução

As pesquisas têm demonstrando que existe uma relação entre a utilização de nanomateriais e a toxicidade observada sobre a saúde humana, em diversas áreas incluindo a da reprodução (SCHRAND et al., 2010). A toxicidade reprodutiva desses materiais torna-se cada vez mais reconhecida como uma parte importante da nanotoxicologia (EMA et al., 2010).

As nanopartículas podem se acumular em vários órgãos incluindo os testículos (KIM et al., 2006, KIM et al., 2010). Possuem a capacidade de atingir o sangue e ultrapassar a barreira sangue-testículo (KIM et al., 2006). Podem ser absorvidas pelas células de Leydig, responsáveis pela produção de testosterona nos testículos, afetando a viabilidade, a proliferação e a expressão de genes nestas células (KOMATSU et al., 2008). Podem ainda ter efeitos diretos sobre células tronco espermatogoniais; que são responsáveis pela espermatogense, e sobre células testiculares somáticas, trazendo efeitos adversos sobre os sistema reprodutivo (LUCAS; FIELDS; HOFMANN, 2009).

Em um estudo realizado para demonstrar a citotoxicidade *in vitro* de diferentes nanopartículas sobre células tronco espermatogoniais de mamíferos, as AgNPs foram as mais tóxicas, causando uma redução drástica na função mitocondrial, aumento de extravasamento da membrana, necrose e indução de apoptose (BRAYDICH-STOLLE et al., 2005). Alguns anos mais tarde, Braydich-Stolle et al. (2010) demonstraram que as AgNPs causam diminuição da proliferação de células tronco espermatogoniais em ratos, por perturbar componentes da via de sinalização da GDNF (Fator neutrófico da célula glial), que é uma molécula essencial para a auto renovação das células tronco espermatogoniais *in vivo* e para a proliferação dessas células *in vitro*.

As AgNPs demonstraram causar efeitos tóxicos sobre células primárias testiculares de rato e sobre uma linhagem celular de carcinoma testicular humano (NT2). Causaram apoptose, necrose e diminuição da proliferação celular de maneira concentração e tempo dependente, além de dano ao DNA. Os autores ressaltaram que as nanopartículas podem atravessar membranas nucleares facilmente, interagindo com o DNA direta ou indiretamente, por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos (ASARE et al., 2012). Algumas destas alterações ou danos ao DNA, ao ocorrer em espermatozóides podem causar defeitos espermatogênicos que poderiam, eventualmente, resultar em defeitos trans-geracionais (LUCAS; FIELDS; HOFMANN, 2009).

Gromadzka-Ostrowska et al. (2012) examinaram os efeitos agudos da administração intravenosa de AgNPs nos tamanhos de 20 e 200 nm e em diferentes doses (5mg/Kg e 10mg/Kg), sobre a espermatogênese, DNA espermático e a morfologia dos túbulos seminíferos de ratos. Os experimentos revelaram que nos grupos tratados houve uma diminuição nas contagens espermáticas no epidídimo, dano ao DNA espermático, mudanças na morfometria dos túbulos seminíferos, com alta vacuolização do epitélio germinativo. Houve também presença de anormalidades morfológicas nos espermatozoides quando foram comparadas amostras de 24 horas após injeção intravenosa com amostras após uma e quatro semanas de tratamento. Após o maior período de tratamento foram visualizadas anormalidades como cabeça dobrada sobre o corpo, cabeça solta, cabeça ondulada e presença de duas cabeças em um só corpo.

Foi demonstrado que altas doses de AgNPs afetam as células de Leydig e os hormônios sexuais. Baki et al. (2012) avaliaram a toxicidade de AgNPs sobre parâmetros espermáticos, hormônios sexuais e células de Leydig, testando diferentes doses (25, 50, 100 e 200 mg/kg) através de administração via oral por gavagem, em ratos Wistar. Os resultados demonstraram que houve redução nos níveis sanguíneos de testosterona, aumento no nível de LH, redução nas células de Leydig e na motilidade espermática, além de alterações morfológicas nos espermatozoides nos grupos tratados. Segundo os autores, houve impacto sobre a mitocôndria, evidenciado pela redução da motilidade espermática, bem como para as células de Leydig, resultando em consequente redução dos níveis de testosterona, concluindo que as AgNPs são capazes de influenciar o potencial de fertilidade em animais de laboratório.

Como visualizado por Baki et al. (2012), as AgNPs também afetam a motilidade espermática. Anteriormente, Mirshokraei et al. (2011) avaliaram os efeitos de colóides de nanop prata, em várias concentrações, sobre parâmetros de motilidade nos espermatozoides de rãs em diferentes tempos. Foi constatado que a substância deprime a maioria dos parâmetros

de motilidade avaliados, sendo que na concentração de 10 ppm de nanop prata, após 30 minutos de incubação, os espermatozoides foram totalmente inativados, evidenciando a toxicidade da substância para o espermatozoide, refletida no movimento. Segundo os autores, essa depressão, está diretamente ligada à atividade mitocondrial, podendo induzir infertilidade ao esperma, através do efeito citotóxico da nanop prata.

As AgNPs também demonstraram alterar a expressão de genes relacionados com o espermatozoide e a fertilidade. Um estudo que avaliou os efeitos das AgNPs sobre a expressões de genes em diferentes regiões do cérebro de ratos, concluiu dentre os genes alterados pela substância nos animais tratados, estava o gene conhecido como Park7, que possui muitas funções no organismo, dentre elas proteger as células do estresse oxidativo, além de envolvimento na maturação do espermatozoide e na fertilização (RAHMAN et al., 2009).

As AgNPs podem também estar envolvidas com toxicidade embrionária. Li et al. (2010) demonstraram que AgNPs induziram apoptose e inibição da proliferação celular em embriões de ratos na fase de blastocisto, causando ainda redução da frequência de implantação e atraso no desenvolvimento do embrião após a implantação *in vitro* e *in vivo*. Philbrook et al. (2011) avaliaram os efeitos AgNPs administrados oralmente sobre a reprodução e desenvolvimento de dois organismos-modelo *Drosophila melanogaster* e ratas CD-1 gestantes. Para as ratas gestantes, os resultados demonstraram que houve redução na viabilidade dos fetos, enquanto que para *Drosophila*, houve diminuição na porcentagem de sucesso no desenvolvimento da prole. Os autores ressaltam que as AgNPs poderiam ser prejudiciais para a reprodução e desenvolvimento de invertebrados e vertebrados.

Exposições às substâncias tóxicas podem afetar eventos críticos para o desenvolvimento do sistema reprodutivo, como a determinação da célula germinativa primordial e a gametogênese (PRYOR et al., 2000). Com relação à espermatogênese, as nanopartículas têm demonstrado afetar as três partes do espermatozoide; o acrossomo, que é responsável pela reação acrossomal, o segmento equatorial, que é responsável pela ligação do espermatozoide na membrana do oócito e a peça intermediária, que é responsável pelo vigor do espermatozoide, que são essenciais no processo de fertilização (LAN; YANG, 2012). Os dados sobre as AgNPs afetarem o espermatozoide de maneira direta são escassos e são o objetivo principal da presente dissertação.

2.3 Testes funcionais

Aspectos importantes no processo de avaliação da fertilidade masculina incluem informações sobre o número de espermatozoides presente no ejaculado, a proporção em que são móveis e a percentagem que são morfológicamente normais. No entanto, como nem sempre estes testes sozinhos explicam alguns casos de infertilidade e para refinar o diagnóstico foram desenvolvidos testes adicionais que fornecem informações sobre o potencial de fertilização dos espermatozoides, chamados Testes Funcionais (AITKEN, 2006; RIJSSELAERE et al., 2005). Esses testes são capazes de avaliar a capacidade dos espermatozoides de realizar passos específicos no processo de fertilização, demonstrando sua competência funcional (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003).

2.3.1 Integridade acrossomal

O acrossomo é a parte do espermatozoide responsável pela reação acrossomal, que é o processo que permite a penetração do espermatozoide na zona pelúcida do óvulo, para que ocorra a fertilização (MAKHLUF et al., 2006). Porém, para que o espermatozoide adquira a habilidade de fecundar o oócito e iniciar o desenvolvimento embrionário, é necessário que ele passe por uma série de eventos, como o transporte para o oviduto, a capacitação, a ligação com a zona pelúcida, a reação acrossomal e a ativação do oócito (HERRICK; SWANSON, 2003).

Os espermatozoides utilizam enzimas acrossomais para penetrar a zona mais espessa da zona pelúcida em mamíferos. No entanto, a reação acrossomal não libera apenas enzimas, mas altera o perfil apical da cabeça do espermatozoide, promovendo afilamento na borda da célula e favorecendo a penetração no óvulo, que é dependente de um impulso físico, facilitado pelo aumento da motilidade (BEDFORD, 1998; STAUSS; VOTTA; SUAREZ, 1995). Anormalidades morfológicas ou no tamanho do acrossomo os tornam menos capazes de se ligar a zona pelúcida, comprometendo a fertilização do óvulo (GARRETT; LIU; BAKER, 1997; MENKVELD et al., 1996).

Uma das maneiras de se identificar a integridade do acrossomo espermático é através da coloração de POPE (Coloração Simples Fast-Green/Rosa-Bengala), onde se identificam

acrossomos íntegros e não íntegros, através da microscopia (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991).

2.3.2 Integridade da membrana plasmática

A membrana espermática possui um importante papel nos processos de capacitação do espermatozoide e sua constituição bioquímica é um dos principais pontos de interesse da fisiologia e patologia espermática (WATSON, 2000; LENZI et al., 1996). Além de um limite celular, realiza interações célula a célula, como entre os espermatozoides e o epitélio do trato genital feminino e entre o espermatozóide e a membrana do óvulo (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003).

A viabilidade de um espermatozoide está ligada a sua motilidade e também a fato de possuir uma membrana plasmática intacta. Por isso a maioria dos ensaios de viabilidade avalia se a membrana plasmática está intacta ou não, utilizando corantes impermeáveis (que não penetram na membrana intacta) e penetrantes (penetram na membrana não intacta) alternadamente ou em combinação (HOSSAIN et al., 2011).

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, pode ser utilizada a coloração de Eosina-Nigrosina (E/N). Nesta coloração, por alterações na permeabilidade das membranas dos espermatozoides, a eosina consegue penetrar nas células corando-as de rosa. Os espermatozoides com membranas íntegras não permitem a entrada do corante, portanto, contrastando com o plano de fundo tomado pela coloração escura da nigrosina, as células aparecem brancas (BARTH; OKO, 1989).

2.3.3 Atividade mitocondrial

A mitocôndria está localizada na peça intermediária do espermatozoide e sua função é produzir energia necessária para a movimentação do flagelo, que gera a motilidade do espermatozoide, uma característica importante para o transporte de material genético para o sítio de fertilização (HUNG et al., 2008).

A motilidade depende em grande parte do volume mitocondrial dentro da peça intermediária do espermatozoide, fatores que afetam a produção de energia mitocondrial podem dar origem a alterações na motilidade e podem estar relacionadas com casos ideopáticos de astenozoospermia, onde ocorre redução ou ausência da mobilidade espermática (RUIZ-PESINI et al., 1998).

Há uma forte correlação entre a motilidade espermática e a atividade de enzimas mitocondriais específicas (RUIZ-PESINI et al., 1998). Hrudka (1987) propôs uma técnica citoquímica que detecta a atividade mitocondrial. A técnica é baseada na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB), através de uma reação em cadeia na qual o reagente é polimerizado e se deposita nos locais onde ocorre a reação, ou seja, se restringe à mitocôndria.

2.3.4 Integridade do DNA espermático

O dano ao DNA é um elemento importante a ser avaliado em relação à qualidade do sêmen. Em combinação com prejuízo a parâmetros clássicos de qualidade espermática como espermatozoides anormais e motilidade, está relacionado com a redução da fertilidade masculina (MORRIS et al. 2002). Além dos potenciais efeitos adversos na fertilidade, pode ocorrer transmissão de alterações mutagênicas para a prole, já que o espermatozoide mesmo com o DNA fragmentado pode vir a fecundar um oócito e trazer problemas para as gerações futuras (HAINES et al., 2001).

O ensaio do cometa é um meio sensível de medir danos ao DNA em núcleos de espermatozoides individualmente, possibilitando determinar se todas as células dentro de uma população demonstram o mesmo grau de dano (CODRINGTON; HALES; ROBAIRE, 2004). Nesse protocolo, as células são embebidas em gel de agarose, as fitas de DNA são lisadas e fragmentadas e os fragmentos são carregados por eletroforese formando um cometa (DUYDU et al., 2012).

2.4 Avaliação de parâmetros reprodutivos

2.4.1 Puberdade

A puberdade é o período de transição entre o estado juvenil e adulto no qual a maturação sexual começa no eixo hipotálamico-hipofisário-gonadal, levando ao desenvolvimento de características sexuais secundárias e fertilidade (STOKER et al., 2000). Um dos parâmetros utilizado para determinar a progressão da puberdade é a separação prepucial. A separação da pele do prepúcio e exposição da glândula do pênis é resultado do aumento da produção de testosterona pelos testículos (KORENBROT; HUHTANIEMI; WEINER, 1977).

A separação do prepúcio, além de ser facilmente identificável, precede outros sinais de puberdade, como a produção e espermatozoides móveis e o pico pubertal dos andrógenos circulantes, podendo ser útil como um ponto de referência para os estudos de desenvolvimento deste fenômeno. Além de ser um evento dependente de andrógeno, é necessário para o comportamento copulatório completo e pode ser utilizada como um índice de desenvolvimento do acasalamento na puberdade (KORENBROT; HUHTANIEMI; WEINER, 1977).

Os desreguladores endócrinos são moléculas exógenas que podem afetar a síntese, secreção, transporte, metabolismo, ligação e ação de hormônios naturais do organismo (KAVLOCK et al., 1996). Esse tipo de substância pode ter efeito sobre a separação balanoprepucial, bem como sobre o crescimento e peso de tecidos responsivos a andrógenos. Exposição a uma variedade de compostos farmacêuticos e ambientais tem demonstrado alterar o tempo de desenvolvimento da puberdade em animais (STOKER et al., 2000).

2.4.2 Produção espermática diária por testículo e tempo de trânsito no epidídimo

A espermatogênese ocorre nos túbulos seminíferos nos testículos e é o processo de geração do gameta masculino, pode ser dividida em quatro fases distintas: desenvolvimento e mitose de espermatogônias indiferenciadas, desenvolvimento dos espermatócitos via meiose, espermiogênese (diferenciação das espermátides) e espermição (liberação das espermátides) (HEINDEL; TREINEN, 1989). A produção espermática diária por grama de testículo é utilizada como parâmetro para avaliação da eficiência da espermatogênese (JOHNSON et al., 2000). Tóxicos reprodutivos podem causar disfunção testicular ou interrupção da espermatogênese, resultando em problemas como infertilidade e ou má qualidade dos espermatozoides (ASARE et al., 2012).

Após a liberação das espermátides para a luz dos túbulos seminíferos, elas são deslocadas para a cabeça do epidídimo. As principais funções do epidídimo são o transporte de espermatozoides, o desenvolvimento de motilidade espermática e da capacidade de fertilização dos espermatozoides, bem como a criação de um ambiente luminal propício e especializado para o processo de maturação através das atividades absorptivas e secretoras do epitélio do epidídimo (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006).

Para adquirir a capacidade de reconhecimento e fertilização do oócito, os espermatozoides de mamíferos precisam passar pelo processo de maturação, que ocorre durante a passagem através do epidídimo (CUASNICÚ et al., 2002). Alterações no tempo do trânsito espermático no epidídimo podem causar alterações de maturação, assim como alterar o número de espermatozoides disponíveis para a ejaculação (KLINEFELTER, 2002).

2.4.3 Anormalidades morfológicas nos espermatozoides

A morfologia do espermatozoide seminal é o resultado final de um processo altamente complexo de modificações celulares que ocorrem durante a espermiogênese, anormalidades morfológicas, podem estar envolvidas com a disfunção espermática (AUGER et al., 2001). A avaliação da concentração espermática e da motilidade, juntamente com a morfologia compõe informações úteis para o diagnóstico de infertilidade masculina, sendo a morfologia espermática o parâmetro mais informativo (GUZICK et al., 2001). Alguns estudos demonstram a relação entre o aumento de morfologia anormal espermática e o aumento de casos de infertilidade em humanos e animais (ALM et al., 2006; CASEY et al., 1995; GUNALP et al., 2001).

A administração de drogas durante o período crítico de desenvolvimento testicular pode interferir na morfologia espermática (AUGER et al., 2001). As nanopartículas têm demonstrado causar efeitos tóxicos ou adversos sobre a espermatogênese (LAN; YANG, 2012) e alterações na morfologia espermática (GROMADZKA-OSTROWSKA et al., 2012; BAKI et al., 2013) resultando em comprometimento da fertilidade.

2.4.4 Regulação hormonal da espermatogênese

A regulação endócrina da espermatogênese é realizada em um ciclo de feedback negativo clássico, envolvendo interações entre o hipotálamo, a pituitária e os testículos (eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal). A produção de espermatozoides, é dependente da estimulação das gonadotrofinas hipofisárias LH e FSH, secretadas em resposta a liberação do hormônio GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas). A testosterona e o estradiol, possuem efeito de feedback negativo a nível do hipotálamo (controle da secreção de GnRH) e da pituitária (limita a secreção de LH e FSH). Em resposta ao FSH, há ainda a produção de inibina pelo epitélio seminífero fazendo feedback negativo sobre a produção de FSH (O'DONNELL et al., 2006).

Um nível adequado de hormônios sexuais é fundamental para a espermatogênese, o FSH estimula a produção da proteína de ligação de andrógeno pelas células de Sertoli que é essencial para manter a concentração de testosterona em níveis altos o suficiente para iniciar e manter a espermatogênese (BAI et al., 2010). As concentrações plasmáticas de LH regulam a esteroidogênese testicular dentro das células de Leydig (YOSHIDA et al., 1999). A testosterona alcança e estimula os órgãos efetores androgênicos por via sanguínea, nesses órgãos é transformada em diidrotestosterona (DHT) pela enzima 5α -redutase, ou é, em maior parte, convertida em estradiol pela ação da enzima aromatase (LITTLETON-KEARNEY & HURN, 2004).

Os disruptores endócrinos em doses extremamente pequenas, podem imitar, bloquear ou ainda interferir na atividade hormonal normal (SCHETTLER et al., 1999). A possibilidade de nanomateriais atuarem como disruptores endócrinos permanece como uma questão importante e relevante a ser avaliada (LU et al., 2013).

2.4.5 Comportamento e orientação sexual

Nos ratos, a interação sexual é iniciada por fêmeas em estro que aceitam ou não a aproximação de machos sexualmente ativos (ERSKINE, 1989). O sinal olfatório inicia um importante papel nesta decisão das fêmeas. Possivelmente o sistema acessório olfatório está envolvido na transmissão central de muitos feromônios que causam mudanças na neuroendocrinologia reprodutiva e no comportamento (SAKUMA, 2008). Para responder aos estímulos de uma fêmea receptiva, além das características visuais e auditivas, os machos

necessitam principalmente de estimulação olfatória e de concentrações adequadas de hormônios testiculares (HERNÁNDEZ-GONZALES; GUEVARA; AGAMO, 2008).

Exposição à testosterona principalmente produzida nas gônadas, pode modular a fisiologia do cérebro e aumentar a probabilidade dos machos executarem comportamentos típicos masculinos (CHARLIER; BALL; BALTHAZART, 2008). Além disso, os hormônios esteróides podem influenciar o comportamento sexual, aumentando ou diminuindo a síntese, liberação e eficácia de determinados neurotransmissores, com funções e localizações neurais específicas, por exemplo, agonistas colinérgicos demonstraram facilitar a ejaculação (BITRAN; HULL, 1987).

A avaliação da orientação sexual, parte do pressuposto que o macho escolhe um parceiro que possa lhe proporcionar recompensa sexual adequada, e quando este, passa mais tempo na vizinhança de uma fêmea receptiva do que na vizinhança de um macho, tem comportamento heterossexual (MATUSZCZYK; LARSSON, 1993). A preferência do macho por uma fêmea receptiva é alterada pelo status de testosterona do macho (HETTA; MEYERSON, 1979). Os receptores de testosterona, quando expostos a esse esteróide dimerizam-se, ligam-se a um elemento de resposta específico, que regula a transcrição de genes. A modulação da transcrição de genes irá afetar a fisiologia celular bem como a resposta de um organismo a um ambiente e a expressão de um comportamento sexual (CHARLIER et al., 2013)

Embora a testosterona altere o padrão de preferência sexual dos machos (HETTA; MEYERSON, 1978), a orientação sexual é um processo que envolve uma complexa interação entre fatores genéticos, biológicos e sócio-culturais (HU et al., 1995). Há relatos que outros fatores como variações genéticas (HU et al., 1995; HAMER et al., 1993) e diferenças na estrutura cerebral entre homossexuais e heterossexuais estão ligados a alterações na preferência sexual. (SWAAB; HOFMAN, 1990; LEVAY, 1991).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse estudo foi avaliar *in vivo* a possível interferência da administração de baixas doses de AgNPs em ratos pré-púberes, sobre a competência funcional de células espermáticas na vida adulta, bem como sobre o desenvolvimento reprodutivo, comportamental e endócrino da prole.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar os possíveis efeitos de baixas doses orais de AgNPs administradas em ratos pré-púbere sobre:

- Aspectos seminiais dos espermatozoides presentes na cauda do epidídimo dos animais, quanto a:
 - Integridade acrossomal;
 - Integridade da membrana plasmática;
 - Atividade mitocondrial;
 - Dano ao DNA;
- Idade e peso à puberdade (separação balanoprepucial);
- Contagem espermática, produção espermática diária por testículo e tempo de trânsito no epidídimo;
- Anormalidades morfológicas nos espermatozoides;
- Concentrações séricas hormonais de testosterona, estradiol, FSH e LH;
- Comportamento e orientação sexual.

4 METODOLOGIA

4.1 Manejo dos animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, recém desmamados, avaliados da pré-puberdade à idade adulta. Os animais foram separados em 3 grupos de tratamento, sendo 2 testes e 1 controle. Os grupos formados por 10 animais foram colocados em caixas de polipropileno distintas, com 5 animais em cada caixa, totalizando 30 animais. Os ratos foram adquiridos do Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Os machos foram acompanhados desde o 21º dia até o 102º dia de idade. O período de lactação se estendeu até o 22.º dia após o nascimento, e após esse período os animais tiveram água e ração comercial *ad libitum*. Os tratamentos iniciaram-se no 23º dia de idade e encerraram-se no 59º dia, com duração de 36 dias de tratamento. Após o período de tratamento, os animais continuaram sendo mantidos em caixas e observados até o 102º para realização dos experimentos de comportamento e orientação sexual. Durante todo o período experimental os animais foram mantidos em fotoperíodo de igual duração de dia e noite. O período e protocolo experimental para o tratamento estão em conformidade com o sugerido por Stoker (2000) à EDSTAC (Endocrine Disrupting Screening and Testing Advisory Committee) que compreende a avaliação de efeitos desreguladores endócrinos no período pré-púbere e a puberdade.

Para realização do experimento, os animais foram anestesiados com a associação de cloridrato de ketamina (dose de 0,04 mL/100g de peso vivo) e cloridrato de xilazina (dose de 0,02 mL/100g de peso vivo) para a colheita de sangue, sêmen e testículo, em seguida eutanasiados por decaptação. Os animais foram então congelados e depois entregues a empresa especializada, responsável pela coleta e eliminação desse tipo de material. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com animais da Unicentro, sob parecer 016/2012.

4.2 Exposição às Nanopartículas de sais de prata (AgNPs)

A administração das AgNPs teve início no 23º dia de idade dos ratos, onde todos os animais foram pesados para homogeneização dos lotes e determinação das quantidades orais diárias. As pesagens diárias foram realizadas até a conclusão da fase de exposição, aos 59 dias de idade, após o período de tratamento, os animais passaram a ser pesados em dias alternados até 102º, para avaliar a evolução do peso corporal. Foram utilizadas AgNPs com tamanho de 60 nanômetros, concentração de 0,02 mg/mL, provenientes do fabricante Sigma-Aldrich (730815). A substância foi administrada por via oral (gavagem) uma vez ao dia, sempre pela manhã, diariamente. O grupo controle recebeu apenas água (Mili-Q) como tratamento, já nos grupos tratados as doses de AgNPs foram de 0,015 mg/Kg/dia e de 0,030 mg/Kg/dia. As AgNPs foram diluídas em água Mili-Q para alcançar as referidas doses.

Diariamente, a diluição era feita no momento do fornecimento aos animais para garantir que não houvesse interferências do diluidor na integridade do produto. Desta forma, foram calculados os volumes a serem administrados aos animais a partir das doses definidas, conforme o peso diário e feita a diluição da quantidade necessária para cada grupo de tratamento, sendo que o volume oral diário de AgNPs ingerido pelos animais foi de 0,25 mL/100g de peso vivo.

4.3 Determinação das doses de AgNPs

Kim et al. (2010) intoxicando ratos por via oral, durante um período de 90 dias, concluiu que para as AgNPs, com tamanho de 56 nanômetros, a NOAEL (No observable adverse effect level) que corresponde a maior dose administrada em um estudo de toxicidade na qual não se observa nenhum efeito adverso, foi definida em 30 mg/kg e a LOAEL (Lowest observable adverse effect level) que corresponde a menor dose administrada na qual se observa um efeito adverso foi definida em 125 mg/kg. A partir da NOAEL deduzida nesse estudo definiu-se as doses para o experimento em 0,015 mg/Kg/dia e 0,030 mg/Kg/dia. A dose de 0,030 mg/Kg/dia é 1000 vezes menor do que a NOAEL e a dose de 0,015 mg/Kg/dia é 2000 vezes menor. Com isso procurou-se demonstrar a possibilidade de alterações reprodutivas, mesmo em uma dose muito menor do que aquela definida pela NOEL, comprovando assim a toxicidade da substância.

4.4 Análise do tamanho das Nanopartículas de sais de prata (AgNPs)

O aparelho Dynamic Light Scattering (DLS) é utilizado para analisar o tamanho médio de nanopartículas, bem como sua distribuição e estabilidade em diferentes meios (DHAWAN; SHARMA, 2010). Para verificar se as diferentes doses utilizadas e o meio de diluição causavam algum efeito sobre o tamanho das AgNPs e conseqüentemente sobre sua estabilidade, submeteu-se a substância a este aparelho.

No procedimento, alíquotas de 20 µl das nanopartículas puras e nas diluições correspondentes as duas doses utilizadas no experimento foram colocadas em 4 mL de água Mili-Q na cubeta do aparelho, homogeneizadas e analisadas (MURDOCK et al., 2008).

4.5 Testes Funcionais do sêmen

Os testes funcionais realizados no presente experimento foram avaliação da integridade acrossomal, avaliação da integridade da membrana plasmática, avaliação da atividade mitocondrial e avaliação da integridade do DNA dos espermatozoides. Para as análises espermáticas, os animais foram previamente anestesiados com associação de cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina, feita uma incisão com lâmina de bisturi na cauda do epidídimo, de onde foram colhidos 20 µl de sêmen e colocado em eppendorf, identificados com o número do animal, contendo 200 µl do diluidor TRIS (Hidroximetil-amino metano). O sêmen diluído caracterizou a amostra. Os procedimentos seguiram a metodologia abaixo descrita para cada teste funcional.

4.5.1 Integridade acrossomal

Para a avaliação da integridade acrossomal foi utilizada a Coloração Simples Fast-Green/Rosa-Bengala (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991). Para tanto, uma alíquota de cada amostra (5 µl) foi adicionada ao Corante Simples de Pope (5 µl), sendo a mistura incubada por 60 segundos em mesa aquecida à 37°C. Após a incubação, foram feitos esfregaços sobre

lâminas de microscopia, os quais foram analisados em microscópio óptico em imersão (1000 x). Foram contadas 200 células por lâmina, classificadas em acrossomo íntegro, onde a região acrossomal apresentou coloração levemente mais escura que a região pós-acrossomal e acrossomo não-íntegro, onde a região acrossomal apresentou coloração levemente mais clara que a região pós-acrossomal.

4.5.2 Integridade da membrana plasmática

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática, foi utilizada a coloração de Eosina-Nigrosina (E/N), descrita por Barth e Oko (1989). Nesta coloração, por alterações na permeabilidade das membranas dos espermatozoides, a eosina consegue penetrar nas células corando-as de rosa. Os espermatozoides com membranas íntegras não permitem a entrada do corante, portanto, contrastando com o plano de fundo tomado pela coloração escura da nigrosina, as células aparecem brancas. A coloração consiste em misturar uma alíquota de sêmen (5 µl) ao corante, na proporção de 1:1, e realizar esfregaços sobre lâminas de microscopia, deixando secar em temperatura ambiente. Após a confecção, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico em imersão (1000x). Foram contadas 200 células por lâmina, classificadas como células com membrana íntegra (não coradas) e não-íntegra (coradas).

4.5.3 Atividade Mitocondrial

Segundo Hrudka (1987), a enzima Citocromo C-Oxidase (CCO) tem um papel fundamental no processo de respiração celular e metabolismo energético das células, além disso, é pré-requisito para a função osmótica e sintética, motilidade e manutenção da estrutura celular. A técnica citoquímica é baseada na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pelo Complexo Citocromo C, o que inclui a CCO, através de uma reação em cadeia na qual o reagente é polimerizado e se deposita nos locais onde ocorre a reação, ou seja, se restringe à mitocôndria. Esta deposição pode ser identificada através de microscopia convencional pela

sua coloração marrom. Desta maneira, é possível descrever o declínio espontâneo da CCO ocasionado por tratamentos físicos e/ou químicos aos que os espermatozoides são submetidos.

Para realização desta técnica, o DAB foi previamente preparado na concentração de 1mg/mL em PBS e congelado. No dia do teste, este foi descongelado em banho seco a 37°C, protegido da luz. A seguir, uma alíquota de 10µL de amostra foi incubada com 300µL de DAB, a 37°C, por uma hora. Após incubação, foram feitos esfregaços em lâmina de vidro pré-aquecidas e estas fixadas em formol a 10% por 10 minutos. As lâminas foram secas no ar sob proteção da luz. A atividade citoquímica da mitocôndria espermática foi avaliada segundo descrito por Hrudka (1987). Desta maneira, as lâminas foram observadas em microscópio de contraste de fase sob aumento de 400x. Foram contados 200 espermatozoides/lâmina, e classificados de acordo com o grau de coloração da peça intermediária em 4 classes:

- Classe I: células espermáticas com peça intermediária totalmente corada indicando alta atividade mitocondrial (DAB I).
- Classe II: células espermáticas com mais da metade dos segmentos corados (ativos) indicando atividade mitocondrial média a alta (DAB II).
- Classe III: células espermáticas com menos da metade dos segmentos corados (ativos) indicando alto comprometimento da atividade mitocondrial (DAB III).
- Classe IV: células espermáticas com peça intermediária totalmente descorada indicando ausência de atividade mitocondrial (DAB IV).

4.5.4 Integridade do DNA espermático (Ensaio do Cometa)

Para avaliar a integridade do DNA dos animais, foi realizado o teste do cometa, utilizando o protocolo proposto por Vendramini, Robaire e Miraglia (2012). Nesse protocolo, as células são embebidas em gel de agarose, as fitas de DNA são lisadas e fragmentadas e os fragmentos são carregados por eletroforese formando um cometa (DUYDU et al., 2012). O ensaio do cometa é um meio sensível de medir de danos no DNA em núcleos de espermatozoides individualmente, possibilitando determinar se todas as células dentro de uma população demonstram o mesmo grau de dano (CODRINGTON; HALES; ROBAIRE, 2004).

No dia do teste, os espermatozoides coletados da cauda do epidídimo foram descongelados em banho-maria, uma alíquota de 12 µl de espermatozoides de cada animal foi adicionada a 120 µl de agarose LMPA (Agarose Low Melting Point) 0,5% e em seguida 120 µl do homogeneizado foi pipetado sobre a lâmina pré-preparada de agarose NMPA (Agarose Normal Melting Point) 1,5%, as lâminas foram colocadas na geladeira por 10 minutos para a solidificação do gel. Para evitar dano ao DNA espermático pela presença de luz, os passos seguintes foram realizados no escuro. Ao retirar da geladeira, foram pipetados 1,5 ml da solução de lise previamente gelada (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris-HCl; pH 10) contendo 10% de dimetilsulfóxido, 1% de Triton X-100 e 40 mM de ditiotretitol sobre as lâminas e deixado na geladeira, no escuro por 1h. As lâminas então foram lavadas com água destilada por 5 minutos e mergulhadas em solução de proteinase K, (proteínase 0,1mg/mL em solução de lise de estoque constituída de 2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM TRIS), foram então deixadas por 3h no escuro em estufa, a 37°C . Após nova lavagem com água destilada gelada, as lâminas foram mergulhadas em solução alcalina (1 mM EDTA, 0.05 M NaOH, pH 12.1) recém preparada e gelada, por 45 minutos no escuro. Essa solução então foi dispensada e as lâminas lavadas duas vezes por 5 minutos com tampão TBE (0.89 M Tris, 0.89 M ácido bórico e 0.5 M EDTA, pH 8). As lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese contendo TBE (4 mm de altura), selecionada a potência de 16 V e a corrida foi mantida por 20 minutos. Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas com álcool a 70% gelado e secas a temperatura ambiente. Realizou-se a coloração com Brometo de Etídio (1,5ml de TBE + 2µl de Brometo/lâmina) e após três lavagens de 15 minutos com TBE, as lâminas foram analisadas em microscópio com fluorescência, sendo contadas 50 células/lâmina e avaliadas 02 lâminas por animal.

Os espermatozoides foram avaliados conforme o grau de fragmentação do DNA:

Classe I: espermatozoides que não apresentaram fragmentação no DNA

Classe II: espermatozoides com pouca fragmentação no DNA

Classe III: espermatozoides com extensiva fragmentação no DNA

Classe IV: espermatozoides com alta fragmentação no DNA.

4.6 Determinação da idade e peso à puberdade (Verificação da separação balanoprepucial)

Para determinação da idade à puberdade, foi utilizada como método a avaliação da separação balanoprepucial, que é a separação da mucosa prepucial e exteriorização da glândula peniana. A monitoração da separação balanoprepucial foi iniciada no 30º dia de idade para todos os animais, realizada uma vez ao dia, no momento da pesagem, até a constatação da separação da pele e exposição completa da glândula (PARKER, 2006), visto que a puberdade é considerada como um fenômeno continuado que mostra como marco de referência o total descolamento balanoprepucial. Neste momento foi determinada a idade e o peso à puberdade.

4.7 Contagem espermática, produção espermática diária por testículo e tempo de trânsito no epidídimo

O testículo direito de cada animal foi retirado e congelado em nitrogênio líquido. No dia do referido teste, o testículo foi inicialmente pesado em uma balança de precisão analítica e depois homogeneizado em 5 mL de NaCl 0,9% contendo Triton X 100 0,5%, seguido por sonicação durante 30 segundos. Depois de uma diluição de 10 vezes, uma amostra de cada animal foi transferida para câmaras de Neubauer procedendo à contagem de espermatozoides.

A contagem do total das células resultou em um número de espermatozoides por testículo, e gerou um dado de concentração de espermatozoides por mL. Esse dado foi dividido pelo peso dos testículos de cada animal para se chegar ao número de espermatozoides por grama de testículo. Para determinar a produção espermática diária testicular (PED), a concentração espermática/mL de cada animal foi dividida por 6,1, que é o número de dias que os espermatozoides estão presentes no epitélio seminífero.

Para determinação do tempo de trânsito no epidídimo, este foi separado do testículo e em seguida do tecido adiposo e dividido em cabeça, corpo e cauda. Todos os segmentos foram pesados separadamente em uma balança de precisão analítica, cada parte foi seccionada em pequenos fragmentos com lâmina de bisturi, seguidos de homogeneização em 5 mL de NaCl 0,9% contendo Triton X 100 0,5% e sonicação por 30 segundos. Após uma diluição de 10 vezes, cada amostra foi transferida para câmaras de Neubauer para a contagem de espermatozoides. O tempo de trânsito de espermatozoides através do epidídimo foi determinado pela divisão do número de espermatozoides em cada segmento por PED (ROBB; AMMAN; KILLIAN, 1978; MOURA et al., 2006).

4.8 Verificação de anormalidades morfológicas nos espermatozoides

Para verificação de anormalidades morfológicas nos espermatozoides, uma alíquota de 10 µl de sêmen diluído vinte vezes foi adicionada a 10 µl de diluidor TRIS (Hidroximetil-amino metano) sob uma lâmina de microscopia. Após homogeneização, foi colocada uma lamínula sobre a amostra, presa com esmalte ao seu redor e procedeu-se a observação em microscópio óptico, sob aumento de 400 vezes. Foram contadas 200 células por lâmina e observou-se nos espermatozoides, a presença das seguintes características: cauda enrolada, cauda dobrada, cauda fortemente enrolada, cauda fortemente dobrada, cabeça solta, peça intermediária, gota protoplasmática proximal, gota protoplasmática distal. As anormalidades morfológicas foram classificadas segundo Blom (1973), citado por Silva, Dode e Unanian (1993).

Foram observadas as anormalidades possíveis de visualização para espermatozoides de ratos no grupo controle e nos grupos tratados. Considerou-se o grupo controle como padrão de normalidade, para comparação com os grupos tratados. Após contagem, os dados passaram por tratamento estatístico.

4.9 Concentrações séricas hormonais: Testosterona, Estradiol, FSH e LH

No dia da realização do experimento, após a colheita de sêmen e tecidos, o sangue dos animais foi retirado por punção cardíaca. O sangue de cada animal foi centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos e o soro foi separado e armazenado em criotubos a -80°C. Esse material foi encaminhado para o Laboratório de Endocrinologia da Universidade Federal de São Paulo, onde todas as análises hormonais foram realizadas, conforme metodologia descrita a seguir.

4.9.1 Testosterona

A testosterona foi quantificada no soro dos animais dos dois grupos tratados e do controle, através do imunoensaio de eletroquimioluminescência Elecsys® Testosterone II Immunoassay, Cobas, Roche©. O ensaio baseia-se em um teste principal competitivo, utilizando um anticorpo monoclonal de alta atividade, especificamente dirigido contra a testosterona. A testosterona endógena é liberada da amostra pelo 2-bromoestradiol e compete com o derivado de testosterona adicionado ao ensaio marcado com o complexo de rutênio, pelos sítios de ligação no anticorpo biotinizado (figura 1).

Inicialmente a amostra foi incubada com um anticorpo monoclonal biotinizado testosterona específico, formando-se um imunocomplexo, cuja quantidade depende da concentração do analito na amostra. Após adição de micropartículas revestidas com estreptavidina e de um derivado de testosterona marcado com um complexo de rutênio, os sítios de ligação do anticorpo biotinizado foram ocupados pelo analito da amostra formando um complexo, que se torna ligado à fase sólida através da interação da biotina e da estreptavidina. A reação de mistura é aspirada para a célula de medição, onde as micropartículas são magneticamente capturadas sobre a superfície do eletrodo. Substâncias não ligados são removidos pelo ProCell. A aplicação de uma corrente elétrica ao eletrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador. Os resultados são determinados por meio de uma curva de calibração, que é especificamente gerada pela calibração de 2 pontos, e numa curva principal incluída no código de barras do reagente.

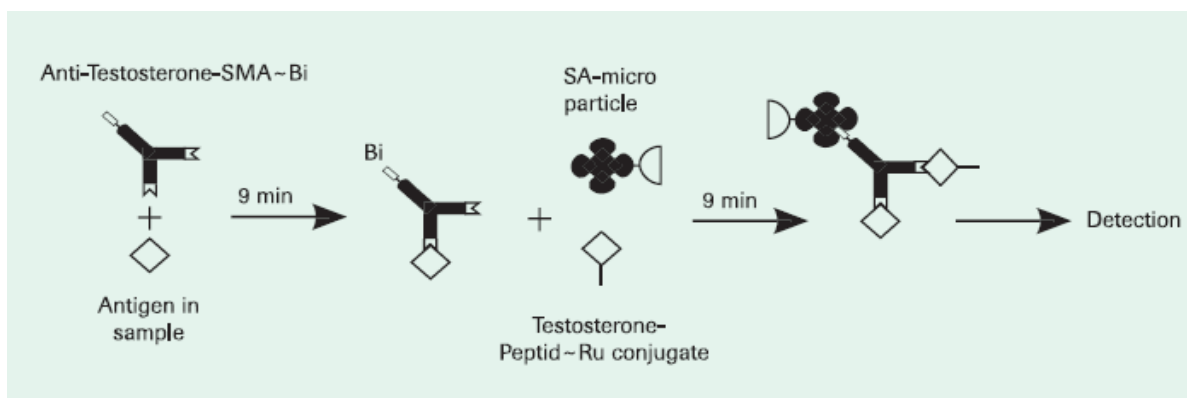


Figura 1 - Princípio do teste Elecsys Testosterone II Immunoassay. Fonte: Bula do Kit comercial Testosterone II. Cobas, Roche©.

4.9.2 Estradiol

Para quantificação do estradiol no soro dos animais, foi utilizado o kit comercial Estradiol II, Cobas, Roche®. Assim como o kit utilizado para a testosterona, é um imunensaio de eletroquimioluminescência. O ensaio possui o mesmo princípio descrito para a testosterona, com exceção que inicialmente a amostra é incubada com um anticorpo biotinilado específico anti-estradiol formando um imunocomplexo, a partir desse passo, a técnica segue a metodologia descrita acima.

4.9.3 FSH E LH

O ensaio para a dosagem sérica de FSH e LH foi realizado através do kit comercial Milliplex® MAP Rat Pituitary Panel, que utiliza a tecnologia Luminex® xMAP®, da EMD Millipore. Este ensaio envolve um processo que cora internamente microesferas de poliestireno com dois corantes fluorescentes. Através de concentrações precisas desses corantes, podem ser criados 100 conjuntos coloridos distintos de esferas, cada um dos quais é revestido com um anticorpo de captura específico. Após o analito de uma amostra teste ser capturado pelas esferas, ocorre uma detecção biotinilada do anticorpo. A reação de mistura é, em seguida, incubada com o conjugado Estreptavidina-ficoeritrina (AS-PE *reporter*, emite sinal fluorescente), para completar a reação na superfície de cada microesfera. As microesferas passam rapidamente através de um laser que excita os corantes internos, marcando um conjunto de microsferas. Um segundo laser excita PE, o corante fluorescente, na molécula *reporter*. Finalmente, processadores de sinais digitais a alta velocidade identificam cada microesfera individualmente (o código de cor específico para o ensaio) e quantificam o resultado do bio-ensaio baseados em sinais *reporter* fluorescentes.

4.10 Avaliação da orientação sexual

A orientação sexual foi realizada com um aparelho, constituído de uma arena circular de madeira com diâmetro de 94 cm, circundada por uma parede metálica de 14,5 cm de altura (figura 2). Acoplado a arena, existem 2 compartimentos localizados nas extremidades laterais

diametralmente opostas, denominados de caixas incentivo, medindo 25 x 25 x 14,5 cm. Estas caixas alojam, respectivamente, um macho e uma fêmea (os ratos “iscas”); que são isoladas da arena por uma tela de arame e ficaram fechadas por uma placa de acrílico removível. O chão da arena é dividido, por segmentos de reta, em 32 partes aproximadamente iguais: as duas partes próximas tanto da caixa de incentivo do macho quanto da fêmea são denominadas de área I do macho ou da fêmea; as 6 partes subsequentes são pintadas de cinza e denominadas de área II; e finalmente as 16 partes localizadas na região central da arena são denominadas de área indiferente. Este aparelho foi inicialmente proposto por Hetta e Meyerson (1979), sendo posteriormente modificado por Dahlgren, Matucszczyk e Hard (1991).

Os testes foram realizados aos 97 dias de idade dos animais, na fase escura do ciclo claro/escuro, uma vez que ratos Wistar são mais ativos à noite. A única iluminação da sala foi realizada através de lâmpada infravermelha. A observação foi feita por dois observadores posicionados próximos às caixas incentivo, sendo que um contou o tempo de permanência nas áreas I e II do macho e o outro das áreas I e II da fêmea. Para o estudo da orientação sexual dos machos, são utilizadas fêmeas especialmente preparadas para cada pareamento, denominadas ratas iscas. A rata isca é previamente ovariectomizada (três semanas antes) e tem cio induzido por manipulação hormonal, na qual se administram 50 µg/Kg de cipionato de estradiol 54 horas antes do início do teste e acetato de medroxiprogesterona 2 mg/Kg 6 horas antes do teste.

Foram colocados nas respectivas caixas incentivo um rato macho isca e a rata fêmea ovariectomizada com cio induzido, sendo que as placas de acrílico foram mantidas, evitando o contato entre os compartimentos. A seguir foi introduzido na arena o rato a ser avaliado, dando-se início a um período de habituação de 5 min. Após este período o rato foi posicionado no centro da arena (área indiferente) e as placas de acrílico das caixas incentivo foram retiradas, porém a tela de arame impediu o contato direto dos animais testados com os ratos “iscas”, pois o incentivo considerado é o odor que os animais “iscas” exalam. Iniciou-se então, a observação da motivação sexual do rato, por 20 minutos. Durante este período foi cronometrado o tempo de permanência do rato na área I do macho, na área II do macho, na área I da fêmea e na área II da fêmea; o tempo que o animal permaneceu na área indiferente não foi cronometrado.

O escore de preferência sexual foi calculado subtraindo-se o tempo total que o animal fica na zona do macho do tempo total que ele permanece na área da fêmea. Assim, a pontuação positiva significa preferência deste animal pelo sexo feminino e pontuação

negativa significa preferência pelo sexo masculino. Decorrido o tempo de observação, o rato teste foi retirado da arena que recebeu higienização com uma solução de álcool a 5% e então outro rato teste foi colocado na arena. A observação dos animais experimentais e controle foi feita intercaladamente.

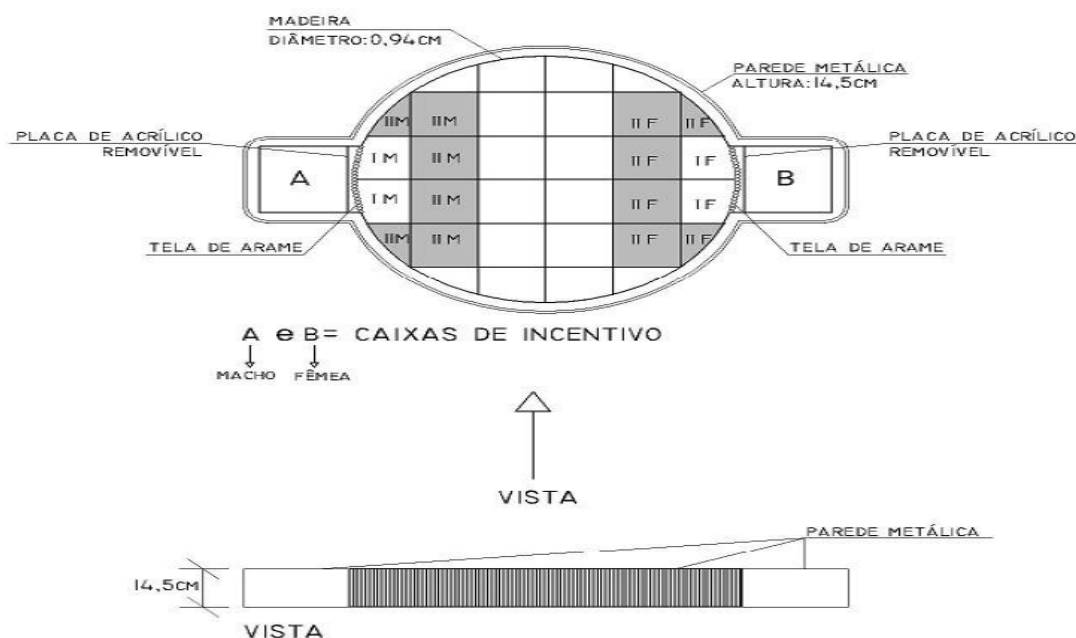


Figura 2 - Desenho esquemático do aparelho utilizado para a avaliação da orientação sexual. Planta baixa da arena e visualização lateral da parede metálica. Fonte: SANTOS, 2011.

4.11 Avaliação do comportamento sexual

A observação do comportamento sexual foi feita aos 101 dias de idade dos animais, na fase escura do ciclo claro/escuro dos ratos, uma vez que estes são mais ativos durante a noite. A iluminação da sala foi feita através de luz infravermelha. Foram utilizadas fêmeas especialmente preparadas, denominadas “ratas iscas”. A rata isca foi previamente ovariectomizada e tratada três semanas após a castração com 50 µg /Kg de cipionato de estradiol e 2 mg/kg de acetato de medroxiprogesterona, 54 e 6 horas, respectivamente, antes do início dos testes.

Cada rato a ser estudado foi colocado individualmente em uma caixa de observação 5 minutos antes da rata preparada para o pareamento, para adaptar-se a nova situação. A seguir, a fêmea foi introduzida na caixa de observação, registrando-se os seguintes parâmetros:

- Presença ou não de monta nos dez minutos subsequentes. Os animais que não apresentaram monta nesse período foram retirados do experimento;
- Presença ou não de ejaculação nos quarenta minutos subsequentes;
- Latência para a primeira monta;
- Latência para a primeira intromissão. Infere-se a ocorrência de intromissão peniana da presença conjunta dos seguintes sinais: monta com duração superior a dois segundos, lordose da fêmea e limpeza genital do rato após a monta;
- Latência para a ejaculação. A ejaculação é caracterizada pela ocorrência de monta e intromissão, seguidas pelo levantar do tronco do macho e imobilidade por alguns segundos;
- Número de montas incompletas (sem intromissão) até a ejaculação;
- Número de intromissões até a ejaculação;
- Número total de montas (soma das montas incompletas e intromissões);
- Latência para a primeira monta pós-ejaculação;
- Número de ejaculações após a primeira intromissão observado por um período de trinta minutos.

A partir desses parâmetros são obtidos dados; como frequência de intromissões por minuto, frequência de montas por minuto, eficiência da taxa copulatória e índice de atividade sexual, que em conjunto refletem o comportamento sexual dos animais do grupo controle e dos grupos tratados com AgNPs (FELICIO; PALERMO-NETO; NASELLO, 1989).

4.12 Análise estatística

Os resultados desse estudo foram avaliados e julgados por métodos estatísticos paramétricos ou não paramétricos segundo a avaliação prévia da normalidade, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e da homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett. Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa Statistica 7.0 (Statsoft Inc) e Graphpad Prism 5,0, sendo que foi considerada diferença estatística quando $p < 0,05$ e $p < 0,01$. Quando os dados apontaram para uma metodologia paramétrica, foi empregada a análise de variância (ANOVA) e os testes de comparação entre médias, como o teste de Tukey. Já quando os dados apontaram para uma metodologia não paramétrica, foi empregada a análise de variância não paramétrica, como o teste de Kruskal-Wallis e as comparações pelos testes de Friedman e Mann-Whitney.

5 RESULTADOS

Para verificar possíveis alterações reprodutivas causadas nos animais pelas AgNPs, foram realizados testes funcionais no sêmen dos animais, conjuntamente com a avaliação de diversos parâmetros que auxiliam na análise da capacidade reprodutiva, incluindo determinação de idade e peso à puberdade, contagem espermática, produção espermática diária por testículo, tempo de trânsito no epidídimo, verificação de anormalidades morfológicas nos espermatozoides, perfil sérico de hormônios sexuais, avaliação do comportamento e da orientação sexual dos animais. Foi avaliada também a evolução do peso corporal dos animais, para verificar possíveis interferências, além de uma análise das AgNPs, para avaliar estabilidade frente às doses utilizadas.

Inicialmente cada grupo era composto por 10 animais, porém durante a execução do experimento houve a perda de dois animais do grupo tratado com a dose de 0,015 mg/Kg, ficando esse grupo com 08 animais. Além disso, para os procedimentos referentes à contagem espermática, produção espermática diária por testículo e tempo de trânsito no epidídimo houve problemas com a identificação dos tecidos, alterando o número de animais avaliados nos grupos. Já para os experimentos de comportamento e orientação sexual o número de animais avaliados em cada grupo foi 07 para otimizar a realização dos testes. Em nenhum dos casos houve prejuízo para avaliação dos dados pelas análises estatísticas.

Todos os dados estão apresentados em tabelas com seus respectivos valores de Média \pm Erro Padrão da Média (EPM), Intervalos de confiança (IC) quando paramétricos e como Mediana e Intervalo interquartílicos, quando não paramétricos. Em caso de dados paramétricos foi aplicado ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey e em caso de dados não paramétricos foi aplicado Kruskal – Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

5.1 Evolução do peso corporal

O desenvolvimento corporal dos animais foi avaliado através da evolução do peso individual durante todo o experimento. Os animais foram pesados diariamente desde o desmame aos 23 dias até os 59 dias de idade, depois foram pesados em dias alternados, até a conclusão do experimento, momento em que tinham 102 dias de vida.

O objetivo dessa avaliação foi constatar se as AgNPs comprometeram de alguma maneira o desenvolvimento destes animais. Através da figura 3 e pela análise estatística, análise multivariada de variâncias para medidas repetidas pelo procedimento de modelo linear generalizado, pode-se observar que a substância não causou alterações no metabolismo dos animais tratados quando comparados ao controle ($p=0,53$), que pudessem prejudicar o desenvolvimento corporal normal destes. Esse comportamento torna mais fácil a interpretação das variáveis estudadas na sequência, pois restringe as causas sobre os problemas de desenvolvimento reprodutivo observados.

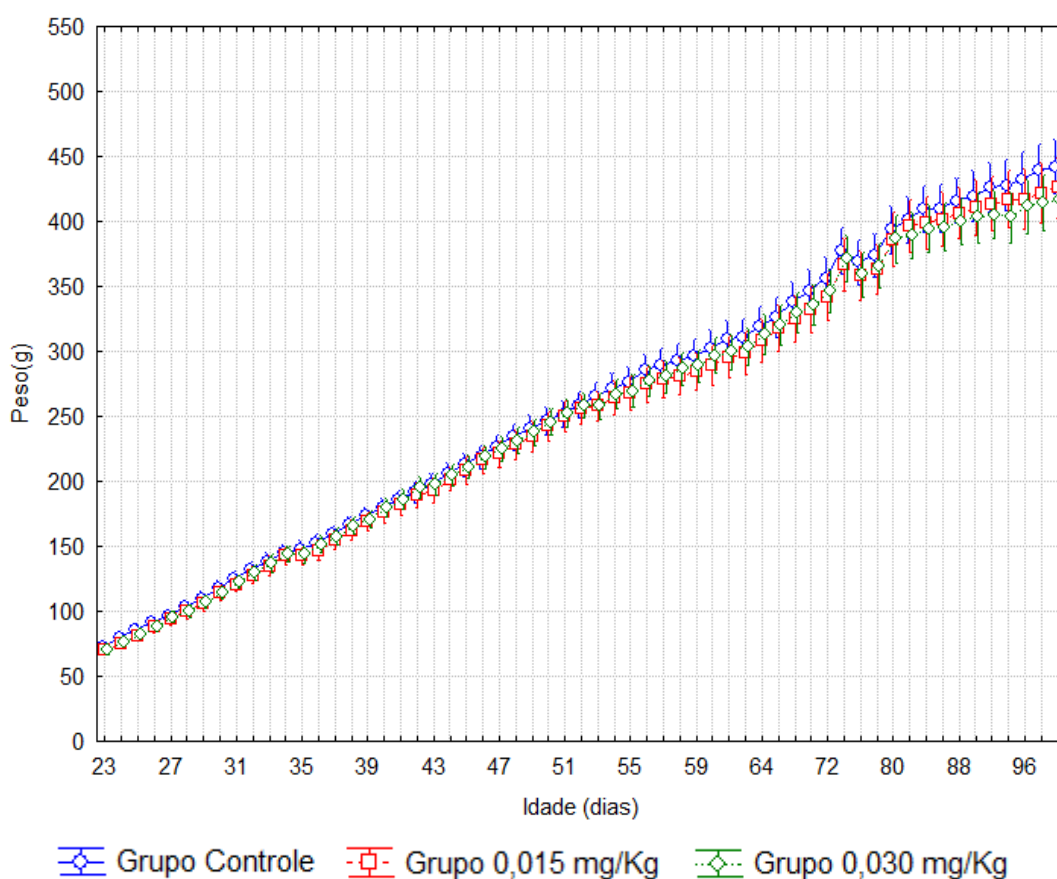


Figura 3 - Gráfico de evolução do peso corporal do grupo controle e dos grupos tratados com AgNPs nas doses de 0,015 mg/Kg e 0,030 mg/Kg do 23º ao 102º dia de idade dos animais.

5.2 Análise do tamanho e distribuição das AgNPs

As AgNPs foram analisadas pelo aparelho Dynamic Light Scattering. As AgNPs puras revelaram ter um diâmetro médio de 86,1 nm, já diluídas em água Mili-Q nas doses de 0,015mg/Kg e 0,030 mg/Kg obtiveram diâmetros de 86,8 nm e 87 nm respectivamente. As três análises demonstraram boa polidispersividade, as AgNPs puras apresentou 0,330, a dose de 0,015mg/Kg apresentou 0,340 e a dose de 0,030 mg/Kg apresentou 0,346 de polidispersividade, demonstrando que há homogeneidade no tamanho das nanopartículas e baixa taxa de aglomeração. Este resultado demonstra que não houve alteração no tamanho médio das AgNPs diluídas, não alterando assim sua estabilidade frente as doses utilizadas.

5.3 Testes Funcionais

5.3.1 Integridade acrossomal

Para a avaliação da integridade acrossomal foi utilizada a Coloração Simples Fast-Green/Rosa-Bengala (POPE et al., 1991). As lâminas foram analisadas em microscópio convencional em imersão (1000x), foram contadas 200 células por lâmina, classificadas como acrossomo íntegro e não íntegro, conforme figura 4.

A tabela 1 traz os dados da análise estatística, demonstrando que houve diferença estatística significativa de ambos os grupos tratados em relação ao controle, tanto para o acrossomo íntegro quanto para o acrossomo não íntegro ($p= 0,0003$) para os grupo tratados com 0,015 mg/Kg e 0,030mg/Kg de AgNPs. Assim, pode-se visualizar a presença de dano a integridade do acrossomo dos espermatozoides nos grupos tratados, que tiveram um maior número de células com a integridade acrossomal comprometida quando comparados ao controle.

Tabela 1 – Teste da integridade acrossomal (Coloração Pope). Acrossomo íntegro e não íntegro (Mediana, Intervalo interquartilico) no grupo controle e nos grupos tratados com AgNPs.

Grupos	Acrossomo Íntegro	Acrossomo Não Íntegro
Controle (n=10)	197,50 ^a (188,00 – 200,00)	2,50 ^a (0,00 – 12,00)
0,015 mg/Kg (n= 8)	189,50 ^b (180,00 – 198,00)	10,50 ^b (2,00 – 20,00)
0,030 mg/Kg (n=10)	187,00 ^b (183,00 – 189,00)	13,00 ^b (11,00 – 17,00)

a, b Dados com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,01$) (Kruskal – Wallis, Teste de Dunn)

5.3.2 Integridade da membrana plasmática

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática, foi utilizada a coloração de Eosina-Nigrosina (E/N). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico em imersão (1000x). Foram contadas 200 células por lâmina, classificadas como células com membrana íntegra (não coradas) e não-íntegra (coradas), conforme figura 5.

Através da tabela 2, pode-se verificar que houve diferença estatística de ambos os grupos tratados com AgNPs em relação ao controle para a membrana plasmática íntegra e não íntegra ($p < 0,0001$). Nota-se assim, que nos grupos tratados com AgNPs houve um número maior de células com ausência de integridade da membrana plasmática em relação ao grupo não tratado.

Tabela 2 – Teste da integridade da membrana plasmática (Coloração Eosina/Nigrosina). E/N íntegro: membrana plasmática íntegra, E/N não íntegro: membrana plasmática não íntegra (Mediana, Intervalo interquartilico) no grupo controle e nos grupos tratados com AgNPs.

Grupos	E/N Íntegro	E/N Não Íntegro
Controle (n=10)	198,50 ^a (197,00 - 200,00)	1,50 ^a (0,00 – 3,00)
0,015 mg/Kg (n=8)	194,00 ^b (191,00 - 196,00)	6,00 ^b (4,00 – 9,00)
0,030 mg/Kg (n=10)	192,00 ^b (189,00 - 197,00)	8,00 ^b (3,00 – 11,00)

a, b Dados com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,01$) (Kruskal – Wallis, Teste de Dunn)

5.3.3 Atividade mitocondrial (DAB)

Para verificação da atividade mitocondrial foi utilizada a coloração DAB. As lâminas foram observadas em microscópio de contraste de fase sob aumento de 400x. Foram contados 200 espermatozoides/lâmina, e classificados de acordo com o grau de coloração da peça intermediária em 4 classes: DAB I, DAB II, DAB III e DAB IV, como apresentado na figura 6.

A tabela 3 demonstra que todas as classes tiveram diferença estatística significativa nos grupos tratados em relação ao controle. A classes DAB I teve $p < 0,0001$ para ambas as doses, a classe DAB II teve $p = 0,0002$ para ambas as doses, a classe III teve $p = 0,0111$ para ambas as doses e a classe DAB IV, teve $p = 0,0034$ para ambas as doses. Considerando, conforme a metodologia, que essa coloração permite avaliar a atividade mitocondrial dos espermatozoides, percebe-se na tabela, que para o DAB I, que corresponde a uma alta atividade mitocondrial, houve diminuição do número de espermatozoides com essa classificação, em ambos os grupos tratados em relação ao controle. Já para DAB II, DAB III e DAB IV, que correspondem respectivamente à atividade mitocondrial média a alta, alto comprometimento e ausência de atividade; houve um aumento do número de espermatozoides contendo essas classificações em ambos os grupos tratados em relação ao controle. Esses dados em conjunto convergem para demonstrar que os grupos tratados com AgNPs nas doses de 0,015 mg/Kg e 0,030 mg/Kg tiveram danos na peça intermediária dos espermatozoides, diminuindo sua atividade mitocondrial, quando comparados ao controle.

Tabela 3 - Teste da atividade mitocondrial (Coloração DAB). DAB I a DAB IV (Mediana, Intervalo interquartilico) no grupo controle e nos grupos tratados com AgNPs.

Classes	Controle (n=10)	0,015 mg/Kg (n=8)	0,030 mg/Kg (n=10)
DAB I	198,00 ^a (196,00 – 199,00)	186,00 ^b (174,00 – 194,00)	191,00 ^b (178,00 – 197,00)
DAB II	2,00 ^a (1,00 – 4,00)	5,00 ^b (3,00 – 7,00)	4,50 ^b (2,00 – 6,00)
DAB III	0,00 ^a (0,00 – 1,00)	2,00 ^c (0,00 – 8,00)	1,50 ^c (0,00 – 7,00)
DAB IV	0,00 ^a (0,00 – 0,00)	5,0 ^b (0,00 – 22,00)	1,00 ^b (0,00 – 12,00)

a,b Médias com letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,01$)

a,c Médias com letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

(Kruskal – Wallis, Teste de Dunn)

5.3.4 Integridade do DNA (Ensaio do Cometa)

Após realizar o ensaio do cometa, para verificar se a substância causou danos à integridade do DNA dos espermatozoides, não foram identificadas diferenças nos níveis de fragmentação do DNA entre os animais do grupo controle e dos grupos tratados, sendo que a Classe I, definida como espermatozoides que não apresentam fragmentação no DNA, foi predominantemente visualizada nas lâminas. Não foram aplicadas análises estatísticas.

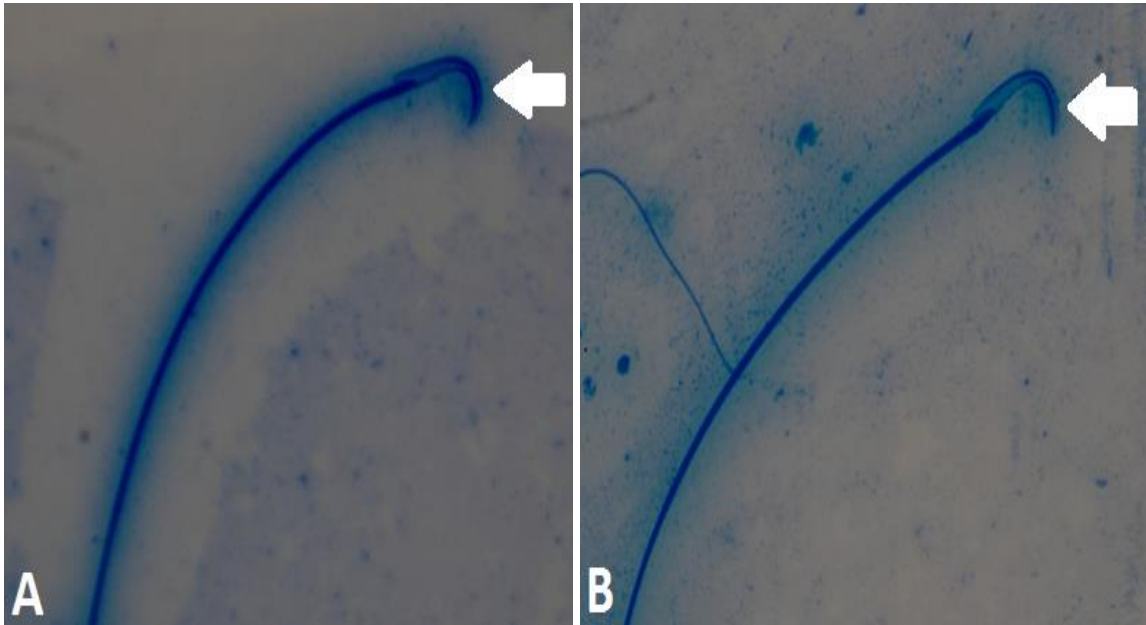


Figura 4 - Lâminas de coloração de Pope (integridade acrossomal). Em A, acrossomo íntegro e em B, acrossomo não íntegro.

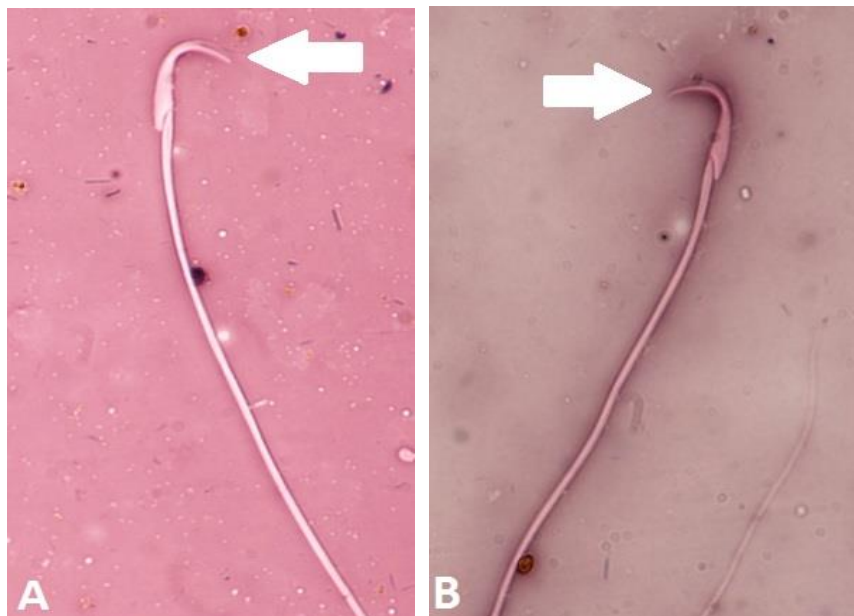


Figura 5 – Lâminas de Coloração Eosina Nigrosina (Integridade da membrana plasmática). Em A, espermatozoide com membrana plasmática íntegra e em B, espermatozoide com membrana plasmática não íntegra.

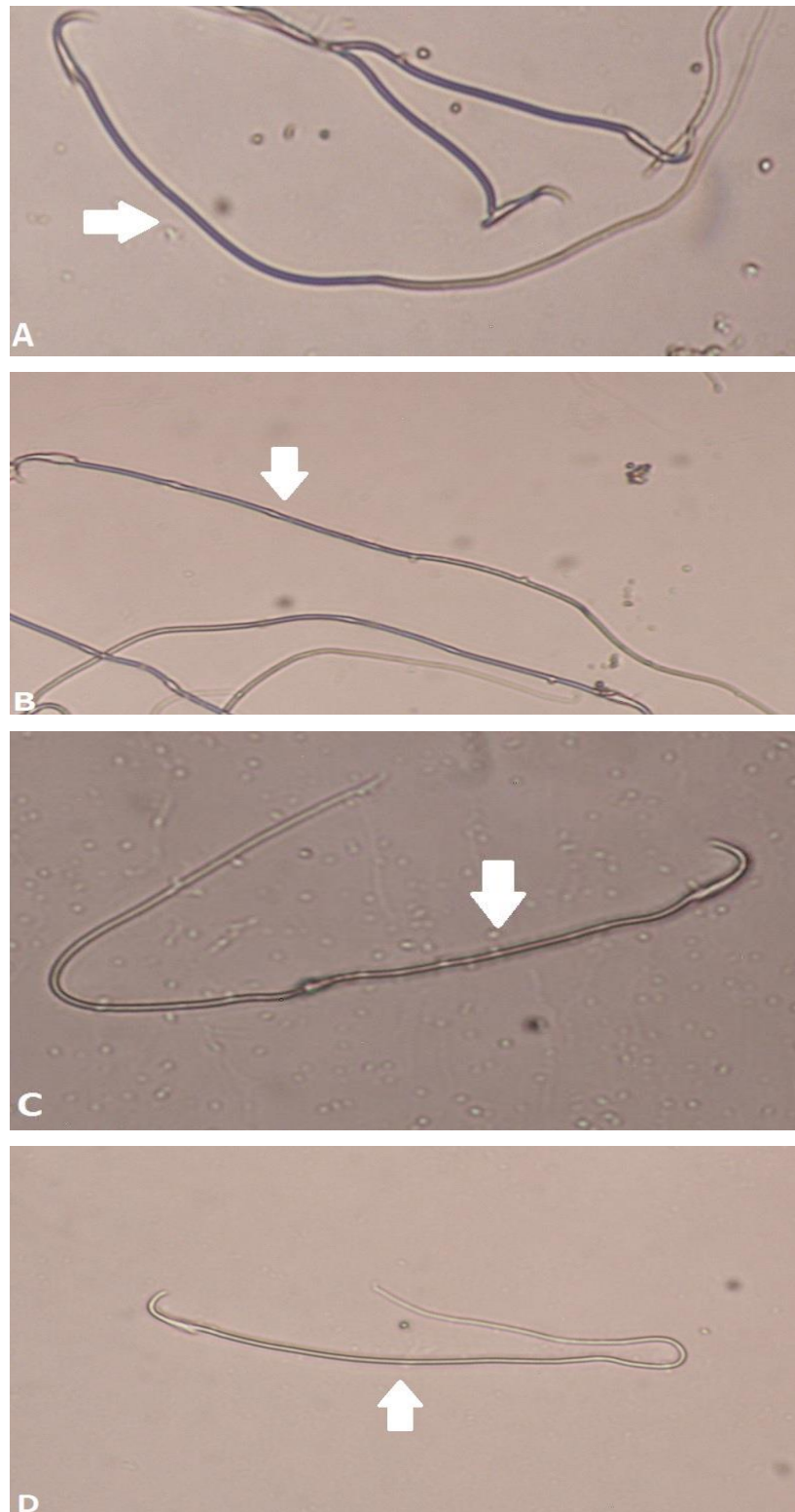


Figura 6 – Lâminas de coloração DAB (atividade mitocondrial). Em A, espermatozoide classificado como classe I, em B como classe II, em C como classe III e em D como classe IV.

5.4 Determinação do peso e idade à puberdade

Para determinação do peso e idade à puberdade, foi utilizada como método a avaliação separação balanoprepucial. A monitoração foi iniciada no 30º dia de idade para todos os animais de todos os grupos, e realizada até a constatação da puberdade. Nesse momento, os dados de peso e idade foram registrados para comparação estatística.

A tabela 4 apresenta a mediana da idade em dias, juntamente com o intervalo interquartilico e também o peso médio \pm EPM dos animais. Os dados demonstraram que para a idade à puberdade houve diferença estatística ($p < 0,0001$) para ambos os grupos tratados em relação ao controle, demonstrando que os animais tratados atingiram a puberdade mais tardiamente quando comparados ao controle (figura 7).

Já para o peso à puberdade houve diferença estatística ($p = 0,011780$) do grupo tratado com a dose de 0,030 mg/Kg em relação ao controle, demonstrando que este grupo atingiu a puberdade com um peso maior em relação ao controle. Já para o grupo tratado com a dose de 0,015 mg/Kg não houve diferença estatística ($p = 0,251070$) em relação ao controle (figura 8).

Tabela 4 – Idade em dias (Mediana, Intervalo interquartilico) á puberdade e peso em gramas (Médias \pm EPM, [IC 95%]) à puberdade no grupo controle e nos grupos tratados com AgNPs

Grupos	Idade (dias)	Peso (g)
Controle (n=10)	40,00 ^a (40,00 – 40,00)	179,63 \pm 4,21 ^c (170,1111 - 189,1489)
0,015 mg/Kg (n=8)	43,00 ^b (42,00 – 43,00)	189,68 \pm 3,47 ^c (181,4618 - 197,8882)
0,030 mg/Kg (n=10)	43,00 ^b (42,00 – 43,00)	197,82 \pm 4,64 ^d (187,3249 - 208,3151)

a, b Dados com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,01$)

c, d Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

Idade(dias): Kruskal – Wallis, Teste de Dunn Peso (g): ANOVA, Tukey

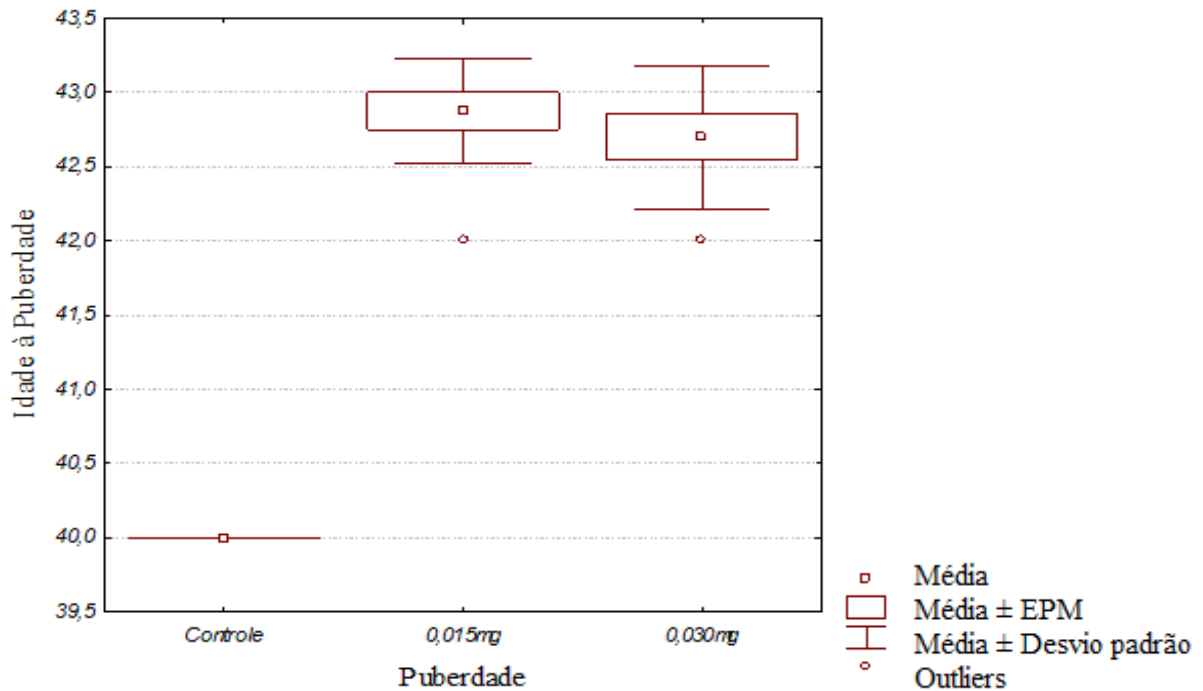


Figura 7 – Gráfico da idade ao atingir a puberdade dos animais controle e tratados com AgNPs nas doses de 0,015 mg/Kg e 0,030 mg/Kg. (Médias ± EPM, Médias ± Desvio padrão)

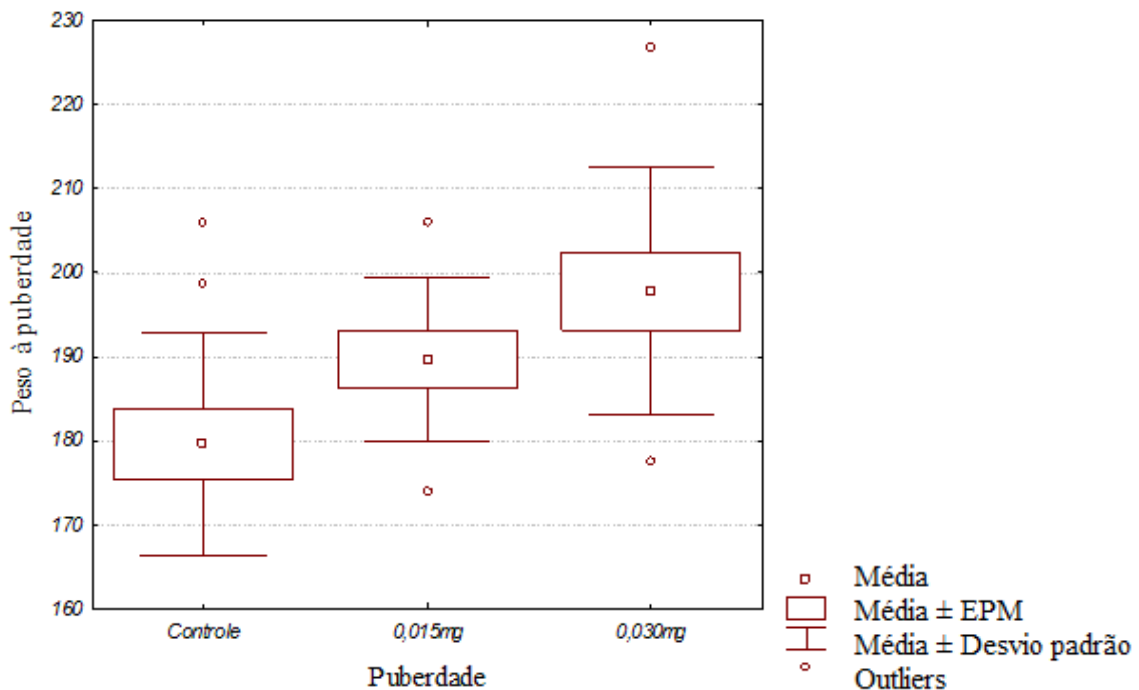


Figura 8 – Gráfico do peso ao atingir a puberdade dos animais controle e tratados com AgNPs nas doses de 0,015 mg/Kg e 0,030 mg/Kg. (Médias ± EPM, Médias ± Desvio padrão)

5.5 Contagem espermática, produção espermática diária por testículo e tempo de trânsito no epidídimo

5.5.1 Peso médio do testículo e do epidídimo

O testículo direito, juntamente com o epidídimo de cada animal foi retirado e congelado em nitrogênio líquido no dia da eutanásia dos animais. No dia da avaliação dos parâmetros citados acima, ambos foram descongelados. O epidídimo foi dividido em cabeça, corpo e cauda e estes segmentos pesados separadamente, os testículos também foram pesados.

Para o peso dos testículos não houve diferença significativa dos grupos tratados com as AgNPs em relação ao controle ($p=0,937616$, ANOVA).

Já para o peso dos segmentos do epidídimo houve diferença significativa para o corpo do epidídimo para o grupo tratado com $0,015$ mg/Kg de AgNPs ($p=0,007172$) e para o grupo tratado com $0,030$ mg/Kg de AgNPs ($p= 0,014648$) em relação ao grupo controle (tabela 5). Os dados demonstram que os animais tratados apresentaram o corpo do epidídimo mais leve que o controle. Para o peso da cabeça ($p=0,515017$, ANOVA) e da cauda ($p=0,367942$, ANOVA) do epidídimo não houve diferença significativa para ambos os grupos tratado.

Tabela 5 – Peso médio do corpo do epidídimo (em gramas) no grupo controle e nos grupos tratados com AgNPs (Média \pm EPM)

Grupos	Corpo do epidídimo
Controle (n=9)	$0,065 \pm 0,006^a$
$0,015$ mg/Kg (n=6)	$0,038 \pm 0,005^b$
$0,030$ mg/Kg (n=10)	$0,044 \pm 0,004^c$

a, b Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,01$)

a,c Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) (ANOVA, Tukey)

5.5.2 Contagem espermática: número de espermatozoides por testículo e por grama de testículo

Após ser pesado, o testículo foi homogeneizado em 5 mL de NaCl 0,9% contendo Triton X 100 0,5%, seguido por sonicação durante 30 segundos. Depois de uma diluição de 10 vezes, uma amostra de cada animal foi transferida para câmaras de Neubauer procedendo a contagem de espermatozoides. A contagem do total das células resultou em um número de espermatozoides por testículo, e gerou um dado de concentração de espermatozoides por mL. Essa concentração por mL foi dividida pelo peso dos testículos de cada animal para se chegar ao número de espermatozoides por grama de testículo. Os dados de número de espermatozoides por testículo ($p=0,304236$, ANOVA) e por grama de testículo ($p= 0,198060$, ANOVA) foram analisados estatisticamente e constatou-se que não houve diferença significativa dos grupos tratados em relação ao controle.

5.5.3 Produção espermática diária

Para determinar a produção espermática diária testicular, a concentração espermática/mL de cada animal foi dividida por 6,1, que é o número de dias que os espermatozoides estão presentes no epitélio seminífero. Feita a análise estatística, comprovou-se que não houve diferença estatística significativa ($p<0,319790$, ANOVA) entre os grupos tratados e o grupo controle.

5.5.4 Reservas espermáticas

A avaliação das reservas espermáticas foi feita no epidídimo através da contagem de espermatozoides em cada segmento. Para isso, cada segmento do epidídimo foi homogeneizado em 5 mL de NaCl 0,9% contendo Triton X 100 0,5%, seguido por sonicação durante 30 segundos. Depois de uma diluição de 10 vezes, uma amostra de cada animal foi transferida para câmaras de Neubauer procedendo à contagem. Para essa análise foi preconizada a divisão cabeça+ corpo e cauda.

Conforme a tabela 6, para o segmento cabeça + corpo do epidídimo não houve diferença estatística significativa ($p=0,439332$, ANOVA) nos grupos tratados em relação ao controle. Já para a cauda do epidídimo houve diferença estatística ($p=0,022141$) do grupo

tratado com 0,015 mg/Kg de AgNPs, apresentando uma menor concentração de espermatozoides, em relação ao controle. Para o grupo tratado com 0,030 mg/Kg de AgNPs, não houve diferença estatística ($p=0,552051$, ANOVA) significativa para a reserva espermática na cauda do epidídimo em relação ao controle.

Tabela 6 - Reservas espermáticas da cabeça+corpo do epidídimo (sptz x 10^6) e da cauda do epidídimo (sptz x 10^6) no grupo controle e nos grupos tratados com AgNPs (Médias \pm EPM).

Grupos	Cabeça + corpo do epidídimo (10^6)	Cauda do epidídimo (10^6)
Controle (n=9)	220,00 \pm 24,27	344,44 \pm 39,48 ^c
0,015 mg/Kg (n=7)	155,71 \pm 51,68	190,00 \pm 24,20 ^d
0,030 mg/Kg (n=10)	193 \pm 26,88	293,00 \pm 37,00 ^c

c,d Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) (ANOVA, Tukey) Sptz: espermatozoide

5.5.5 Tempo de trânsito espermático

O tempo de trânsito de espermatozoides através do epidídimo foi determinado pela divisão do número de espermatozoides em cada parcela pela produção espermática diária. Para essa análise foi preconizada a divisão cabeça + corpo e cauda.

A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa para os segmentos cabeça + corpo do epidídimo entre os grupos controle e tratados ($p= 0,313452$, ANOVA). Já para o segmento cauda houve diferença estatística ($p=0,013925$) do grupo tratado com 0,015 mg/Kg de AgNPs, evidenciando que os espermatozoides ficaram menos tempo neste segmento do epidídimo quando comparado ao controle, enquanto que o grupo tratado com 0,030 mg/Kg de AgNPs não diferiu estatisticamente do grupo controle (tabela 7).

Tabela 7 - Tempo de trânsito espermático (dias) nos segmentos cabeça+corpo e cauda do epidídimo no grupo controle e nos grupos tratados com AgNPs (Médias \pm EPM).

Grupos	Cabeça + corpo do epidídimo (dias)	Cauda do epidídimo (dias)
Controle (n=9)	6,33 \pm 0,62	10,27 \pm 1,22 ^c
0,015 mg/Kg (n=7)	4,32 \pm 1,82	5,10 \pm 0,87 ^d
0,030 mg/Kg (n=10)	4,47 \pm 0,64	7,16 \pm 1,13 ^c

c,d Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) (ANOVA, Tukey)

5.6 Verificação de anormalidades morfológicas nos espermatozoides

Para verificação de anormalidades morfológicas nos espermatozoides, uma lâmina contendo uma alíquota de sêmen diluído em TRIS (Hidroximetil-amino metano) de cada animal foi observada sob microscópio óptico, sob aumento de 400 vezes. Foram contadas 200 células por lâmina e observou-se nos espermatozoides, a presença de danos que caracterizam anormalidades. Das anormalidades apresentadas na metodologia, foi possível visualizar cabeça solta, cauda dobrada e cauda fortemente dobrada, assim como fazer uma análise das anormalidades morfológicas totais.

A tabela 8 demonstra que para a anormalidade cabeça solta houve diferença estatística significativa ($p = 0,0087$) dos dois grupos tratados em relação ao grupo controle. Para as outras anormalidades visualizadas, cauda dobrada e cauda fortemente dobrada não houve diferença estatística significativa de ambos os grupos em relação ao controle. As anormalidades cabeça solta, cauda fortemente dobrada e cauda dobrada juntas, formaram o dado de anormalidades morfológicas totais, que diferiu estatisticamente ($p = 0,0086$) nos dois grupos tratados com AgNPs em relação ao controle, evidenciando que houve um número maior de espermatozoides apresentando as anormalidades citadas nesses grupos.

Tabela 8 – Anormalidades morfológicas nos espermatozoides. Anormalidades totais e cabeça solta (Mediana, Intervalo interquartilico) no grupo controle e nos grupos tratados com AgNPs.

Grupos	Anormalidades morfológicas totais	Cabeça solta
Controle (n=10)	7,00 ^a (0,00 – 8,00)	4,00 ^a (0,00 – 8,00)
0,015 mg/Kg (n=8)	15,00 ^b (12,00 – 51,00)	14,00 ^b (12,00 – 50,00)
0,030 mg/Kg (n=10)	22,00 ^b (15,00 – 32,00)	20,00 ^b (14,00 – 27,00)

a, b Dados com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,01$) (Kruskal – Wallis, Teste de Dunn)

5.7 Concentrações séricas hormonais: Testosterona, Estradiol, FSH E LH

A quantificação de testosterona, estradiol, FSH e LH no soro dos animais não revelou diferenças estatísticas significativas através da ANOVA, entre o grupo controle e os grupos tratados com as doses de 0,015 mg/Kg e 0,030 mg/Kg de AgNPs. A análise estatística revelou $p = 0,144123$ para a testosterona, $p = 0,137143$ para o estradiol, $p = 0,450015$ para o FSH e $p = 0,645297$ para o LH.

5.8 Avaliação da orientação sexual

O escore de preferência sexual foi calculado subtraindo-se o tempo total que o animal fica na zona do macho do tempo total que ele permanece na área da fêmea. Assim, a pontuação positiva significa preferência deste animal pelo sexo feminino e pontuação negativa significa preferência pelo sexo masculino.

Conforme a tabela 9, pode-se visualizar que houve diferença estatística ($p < 0,0003$) do grupo tratado com 0,015 mg/Kg de AgNPs em relação ao grupo controle. Essa diferença pode também ser constatada pela pontuação negativa no escore desse grupo, indicando que

houve preferência sexual dos animais pelo sexo masculino. Para o grupo tratado com 0,030 mg/Kg de AgNPs não houve diferença estatística significativa em relação ao controle.

Tabela 9 – Preferência Sexual e tempo de permanência (segundos) no grupo controle e dos grupos tratados com AgNPs na área do macho e na área da fêmea e escore de preferência sexual (Médias \pm EPM).

Parâmetros	Tempo (segundos)		
	Controle (n=7)	0,015mg/Kg (n=7)	0,030mg/Kg (n=7)
Tempo de Permanência na área I do Macho	1075,0 \pm 31,16	1111,0 \pm 35,56	940,0 \pm 18,13
Tempo de Permanência na área II do Macho	2430,0 \pm 25,74	2516,0 \pm 22,74	2439,0 \pm 32,35
Tempo Total na Área do Macho	3505,0 \pm 38,14	3627,0 \pm 51,17	3379,0 \pm 46,85
Tempo de Permanência na área I da Fêmea	1590,0 \pm 40,68	1377,0 \pm 25,24	1463,0 \pm 34,68
Tempo de Permanência na área II da Fêmea	2169,0 \pm 27,28	2069,0 \pm 21,69	2147,0 \pm 28,89
Tempo Total na Área da Fêmea	3759,0 \pm 31,77	3446,0 \pm 35,12	3610,0 \pm 49,98
Escore de Preferência Sexual	254,0 \pm 66,71 ^a	-181,0 \pm 81,92 ^b	231,0 \pm 95,53 ^a

a, b Dados com letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,01$) ANOVA, Tukey

5.9 Comportamento sexual

Para a avaliação do comportamento sexual, cada animal foi colocado individualmente em uma caixa de observação 5 minutos antes da introdução da fêmea, para adaptar-se a nova situação. A seguir, a fêmea foi introduzida na caixa de observação e os animais observados por um período de 10 minutos. Em caso de presença de monta dentro

desse período, os animais foram observados por mais 30 minutos, registrando-se diversos parâmetros citados na metodologia.

Após análise estatística verificou-se que não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos tratados com AgNPs e o controle ($p < 0,25324$, ANOVA), demonstrando que a substância não afetou as intromissões, o número e a frequência de montas e ejaculações, não prejudicando assim o comportamento sexual dos animais.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliada a possível interferência da administração de baixas doses de AgNPs em ratos pré-púberes, sobre a função espermática na vida adulta. Outros parâmetros foram paralelamente avaliados no sentido de verificação de possíveis alterações endócrinas, comportamentais e em tecidos reprodutivos masculinos. O objetivo foi simular uma possível contaminação pela absorção de pequenas quantidades, devido ao uso contínuo e esporádico desses compostos em produtos de higiene corporal e antissepsia médica.

As AgNPs demonstraram comprometer a funcionalidade espermática dos animais em estudo, bem como a sua morfologia, causaram algumas alterações teciduais e comportamentais e não revelaram prejudicar o padrão endócrino. Inúmeros podem ser os mecanismos que corroboraram para estes resultados, pretende-se agora discuti-los para compreender a toxicidade desta substância.

6.1 Evolução do peso corporal

A evolução do peso corporal foi acompanhada através de pesagens durante todo o período experimental. Observou-se que a substância não causou alterações no metabolismo dos animais tratados com as AgNPs, que pudessem refletir no seu desenvolvimento corporal normal. Park et al (2010) obtiveram o mesmo resultado intoxicando ratos e ratas por via oral, com AgNPs na dose de 1 mg/Kg, de vários tamanhos (22 nm, 42 nm, 71 nm e 323 nm). Já Shahare, Yashpal e Singh (2013) demonstraram que AgNPs na faixa de 3 a 20 nm, quando administradas oralmente nas doses de 5, 10, 15 e 20 mg/kg em ratos albinos Swiss, causaram diminuição significativa ($p < 0,05$) no peso corporal em todos os grupos tratados. Esse mesmo estudo demonstrou que as AgNPs danificaram as microvilosidades de células epiteliais, bem como glândulas intestinais, diminuindo a capacidade de absorção do epitélio intestinal. Há trabalhos que demonstram que para as AgNPs, quanto menor o tamanho das nanopartículas, maior é o seu potencial de toxicidade (LIU et al., 2010; PARK et al., 2011) e há evidências que para o intestino partículas menores são captadas mais facilmente (DESAI et al., 1996; MORISHITA et al., 2004). Isso pode estar relacionado com o resultado encontrado para AgNPs de 60 nm nesse estudo, o peso corporal pode não ter sofrido prejuízo em virtude do

tamanho maior das nanopartículas, em comparação com utilizadas no estudo de Shahare, Yashpal e Singh (2013). As AgNPs de 60 nm podem não ter atravessado a parede intestinal, não causando danos as microvilosidades do intestino.

6.2 Análise do tamanho das AgNPs

A análise do tamanho das AgNPs feita através do aparelho Dynamic Light Scattering, demonstrou que não houve alteração de tamanho e nem da distribuição de tamanho na comparação entre as nanopartículas puras e nas diluições realizadas para alcançar as doses utilizadas no experimento. Segundo Montes-Burgos et al. (2010) em nanotoxicologia, é importante saber o estado das nanopartículas utilizadas, em particular parâmetros como o seu tamanho e distribuição de tamanho das partículas no meio que se está utilizando, pois podem ocorrer alterações da substância inicial resultando em agregação ou mudança na distribuição de tamanho, características que podem ter efeito significativo sobre a dose escolhida e interpretação dos resultados obtidos posteriormente.

O tamanho das nanopartículas encontrados pelas análises foram maiores do que o descrito pelo fabricante, mas para determinar o tamanho da partícula, consta na bula do produto que a técnica utilizada foi TEM (Microscopia eletrônica de transmissão). Técnicas diferentes podem resultar em diferentes tamanhos de nanopartículas (DHAWAN; SHARMA, 2010).

Além do fato das técnicas serem diferentes, o tamanho de partícula obtido por Dynamic Light Scattering é geralmente maior do que o medido por outras técnicas, tais como TEM. Isto pode ser atribuído ao fato de DLS medir a distribuição de tamanho de um conjunto de partículas em solução e produzir um diâmetro médio hidrodinâmico, incluindo assim algumas camadas de solvente (HRADIL et al., 2007).

6.3 Testes Funcionais

6.3.1 Integridade acrossomal

Utilizando a coloração de POPE para verificar a integridade acrossomal dos espermatozoides, constatou-se que os grupos tratados com AgNPs tiveram um maior número de espermatozoides com acrossomo não íntegro quando comparados ao controle. O acrossomo é a parte do espermatozoide responsável pela reação acrossomal, que é o processo que permite a penetração do espermatozoide na zona pelúcida do óvulo, para que ocorra a fertilização (MAKHLUF et al., 2006). Os espermatozoides utilizam enzimas acrossomais para penetrar a zona mais espessa da zona pelúcida em mamíferos. No entanto, a reação acrossomal não libera apenas enzimas, mas altera o perfil apical da cabeça do espermatozoide, promovendo afilamento na borda da célula e favorecendo a penetração no óvulo, que é dependente de um impulso físico, facilitado pelo aumento da motilidade (BEDFORD, 1998; STAUSS; VOTTA; SUAREZ, 1995).

Anormalidades morfológicas ou no tamanho do acrossomo os tornam menos capazes de se ligar a zona pelúcida, comprometendo a fertilização do óvulo (GARRETT; LIU; BAKER, 1997; MENKVELD et al., 1996). A reação acrossomal tem grande importância na reprodução, alguns estudos demonstram que esse parâmetro bem como a capacidade da zona pelúcida de induzir a reação acrossomal, deve ser avaliado em processos de fertilização *in vitro*, por serem preditores da capacidade de fertilização (LIU; BAKER, 2003; ESTERHUIZEN et al., 2001).

Makhluf et al. (2006) avaliaram a possibilidade de nanopartículas magnéticas revestidas com álcool polivinílico, afetarem a funcionalidade de células espermáticas bovinas. Entre os testes realizados, foi avaliada a capacidade de o espermatozoide submeter-se a reação acrossomal, utilizando um meio de incubação mTALP (Tyrode's Albumin-Lactate-Pyruvate) com condições de capacitação com e sem as nanopartículas magnéticas. Os autores concluíram que as nanopartículas magnéticas penetraram espontaneamente nas células espermáticas, ligando-se ao acrossomo, mas não afetaram a capacidade do espermatozoide submeter-se a reação acrossomal e a motilidade dos mesmos, duas características importantes para o sucesso da fertilização.

Para as AgNPs, não foram encontrados estudos relatando a toxicidade da prata na forma de nanopartículas para a reação acrossomal e para a integridade do acrossomo. No entanto, tem se relatado que as AgNPs estão envolvidas com a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (CARLSON et al., 2008; HUSSAIN et al., 2005; LIU et al., 2010; PARK et al., 2011; SU et al., 2009) e o excesso de tais espécies podem afetar negativamente parâmetros como a motilidade e a morfologia (AGARWAL; IKEMOTO; LOUGHLIN, 1994) bem como a habilidade de fertilização do espermatozoide, incluindo a reação acrossomal (ICHIKAWA

et al., 1999; CHEN et al., 2013) sendo um possível mecanismo para o aumento do número de acrossomos comprometidos nos grupos tratados.

6.3.2 Integridade da membrana plasmática

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, foi utilizada a coloração de Eosina-Nigrosina (E/N), em que foi avaliada a presença de membranas íntegras, sem a entrada do corante e membranas não íntegras, com presença de corante dentro das células. Os resultados mostraram que nos grupos tratados com AgNPs houve um número maior de espermatozoides com membranas não íntegras, quando comparados ao controle.

A viabilidade de um espermatozoide está ligada a sua motilidade e também a fato de possuir uma membrana plasmática intacta, uma vez que esta é crucial para interações entre os espermatozoides e outras células em seu ambiente. Por isso a maioria dos ensaios de viabilidade avalia se a membrana plasmática está intacta ou não, utilizando corantes impermeáveis (que não penetram na membrana intacta) e penetrantes (penetram na membrana não intacta) alternadamente ou em combinação (HOSSAIN et al., 2011).

Pawar e Kaul (2012) examinaram se diferentes concentrações de nanopartículas de óxido de titânio (TiO_2) alteram a funcionalidade do espermatozoide de búfalo, incluindo a integridade da membrana espermática através de um teste hipo-osmótico (HOST - Hypo-osmotic Swelling Test), que avalia se ocorre enrolamento das caudas dos espermatozoides. Nas primeiras 3 horas de incubação do esperma com a solução hipo-osmótica não houve efeito significativo das diferentes concentrações de nanopartículas de TiO_2 sobre a integridade da membrana, mas após 6 h de incubação, a integridade da membrana dos espermatozoides em todas as concentrações (1, 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$) mostrou diminuição significativa, em comparação com os controles (12,7%, 16,5% e 26%, respectivamente).

Estudos têm demonstrado que as AgNPs afetam a integridade da membrana plasmática de diferentes tipos celulares (BRAYDICH-STOLLE et al., 2005; HUSSAIN et al., 2005; LIU et al., 2010; PARK et al., 2011). Park et al. (2010b) estudando a toxicidade de AgNPs sobre macrófagos peritoniais de rato, propôs um mecanismo de ação sobre a membrana. A fagocitose das AgNPs estimularia a geração de espécies reativas de oxigênio, ativando por sua vez macrófagos, que induziriam a secreção de $\text{TNF}\alpha$ (Fator de Necrose

Tumoral alfa), responsável por causar danos a membrana celular e apoptose. Todos esses resultados seriam causados pela ionização das AgNPs em células, através de um mecanismo do tipo cavalo de tróia.

O cavalo de tróia tem sido citado em trabalhos como um dos mecanismos responsáveis pela toxicidade das AgNPs sobre membranas e sobre a célula (LUBICK, 2008; LUOMA, 2008; PARK et al., 2010; STENSBERG et al., 2011). Nesse mecanismo, uma vez que a nanop prata esteja ligada a célula, poderia liberar íons prata livres diretamente para as membranas e para dentro do maquinário celular (LUOMA, 2008) resultando no desencadeamento do processo inflamatório (PARK et al., 2010a).

Não há relatos na bibliografia da toxicidade das AgNPs diretamente sobre a membrana plasmática do espermatozoide. Outros tipos de nanopartículas, como as de titânio, demonstraram comprometer a integridade da membrana espermática. Há vários relatos comprovando a toxicidade das AgNPs para diferentes tipos de membranas celulares e envolvendo mecanismos como o cavalo de tróia. No presente estudo verificamos prejuízo de integridade da membrana plasmática para espermatozoides, somando assim mais um tipo celular que é afetado pelas AgNPs.

6.3.3 Atividade mitocondrial (DAB)

A avaliação da atividade mitocondrial dos espermatozoides foi feita através da coloração DAB e verificou-se que nos animais tratados com as duas doses de AgNPs houve prejuízo na atividade mitocondrial. Para o DAB I, que corresponde a uma alta atividade mitocondrial, houve diminuição do número de espermatozoides com essa classificação, em ambos os grupos tratados em relação ao controle. Já para DAB II, DAB III e DAB IV, que correspondem respectivamente à atividade mitocondrial média a alta, alto comprometimento e ausência de atividade; houve um aumento do número de espermatozoides contendo essas classificações em ambos os grupos tratados em relação ao controle. A mitocôndria é localizada na peça intermediária do espermatozoide e sua função é produzir energia necessária para a movimentação do flagelo, que gera a motilidade do espermatozoide, uma característica importante para o transporte de material genético para o sítio de fertilização (HUNG et al., 2008).

Alguns estudos têm demonstrado que as AgNPs causam danos a mitocôndria em espermatogônias, linhagem celulares derivadas do fígado e neuroendócrinas (BRAYDICH-STOLLE et al., 2005; HUSSAIN et al., 2005; HUSSAIN et al., 2006). O íon prata demonstra causar alterações na membrana da mitocôndria, causando anormalidades morfológicas, edema, aceleração na respiração mitocondrial, além de aumentar a permeabilidade mitocondrial através da interação com grupos sulfidril que fazem parte das proteínas de membrana mitocondriais (ALMOFTI et al., 2003).

Mirshokraei et al. (2011) avaliaram os efeitos de colóides de nanop prata, em várias concentrações, sobre parâmetros de motilidade nos espermatozoides de rãs em diferentes tempos. Foi constatado que a substância deprime a maioria dos parâmetros de motilidade avaliados, sendo que na concentração de 10 ppm de nanop prata, os espermatozoides foram totalmente inativados. Segundo os autores, essa depressão, está diretamente ligada à atividade mitocondrial, podendo induzir infertilidade, através do efeito citotóxico da nanop prata.

Nanopartículas de selênio demonstraram ter um efeito protetor sobre as mitocôndrias na peça intermediária dos espermatozóides de bodes. Os animais foram tratados com ração suplementada com nanopartículas de selênio e comparados com o grupo controle, sem suplementação. Após o tratamento, observou-se através de microscopia eletrônica de transmissão, que os espermatozoides dos animais controle apresentavam mitocôndrias com forma anormal, com presença de lacunas e extensa vacuolização, enquanto que o grupo tratado com as nanopartículas não apresentou essas anormalidades. No entanto, é conhecido que o selênio atua na manutenção da fertilidade masculina, o que foi comprovado também para esse elemento em forma de nanopartícula (LI-GUANG et al., 2010).

A nanop prata já demonstrou causar prejuízo para a motilidade de espermatozoides e consequentemente para as mitocôndrias (MIRSHOKRAEI et al., 2011). Para as AgNPs de 60 nm avaliadas nesse estudo, a atividade mitocondrial dos espermatozoides também se mostrou comprometida pela substância, evidenciado sua toxicidade para essa importante organela celular.

6.3.4 Integridade do DNA (Ensaio do Cometa)

Para avaliar a integridade do DNA dos espermatozoides utilizou-se o ensaio do cometa. Após realizar as análises dos grupos intoxicados pelas AgNPs e o do grupo controle

não foram identificadas diferenças nos níveis de fragmentação do DNA entre os animais do grupo controle e dos grupos tratados, sendo que a Classe I, definida como espermatozoides que não apresentam fragmentação no DNA, foi predominantemente visualizada nas lâminas. O dano ao DNA espermático em combinação com prejuízos a parâmetros clássicos de qualidade espermática como espermatozoides anormais e motilidade, estão relacionados com a redução da fertilidade masculina (MORRIS et al., 2002).

As AgNPs têm demonstrado causar danos ao DNA em estudos *in vitro* em várias linhagens celulares (ASHARANI et al., 2009; FOLDBJERG; DANG; AUTRUP, 2011; HACKENBERG et al., 2011; PARK et al., 2011) incluindo linhagens de células testiculares. Asare et al. (2012) avaliaram a toxicidade de AgNPs de 20 e 200 nm para o DNA utilizando uma linhagem celular de carcinoma testicular humano (NT2) e células testiculares primárias de ratos, através do ensaio do cometa. Os autores concluíram que as AgNPs de 200 nm causaram aumento de quebras na fita de DNA de maneira concentração dependente. Ressaltaram ainda que as nanopartículas podem atravessar membranas nucleares facilmente, interagindo com o DNA direta ou indiretamente, por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos. No entanto, embora muitos estudos *in vitro* tenham sido realizados, os estudos *in vivo* ainda demonstram ser escassos e por vezes contraditórios (GROMADZKA-OSTROWSKA et al., 2012)

Gromadzka-Ostrowska et al. (2012) avaliaram a integridade do DNA espermático de ratos intoxicado por AgNPs, dividindo os animais em três grupos, grupo Ag I (Nanopartículas (Np) de 20 nm, dose de 5 mg/Kg), Ag II (Np de 20 nm, dose de 10 mg/Kg) e Ag III (Np de 200 nm, dose de 5 mg/Kg), realizando análises após 24 horas, 7 e 28 dias da administração intravenosa. Os resultados demonstraram que houve aumento na porcentagem de dano ao DNA após 24 horas no grupo I e no grupo II, enquanto que para 7 e 28 dias bem como no grupo III em nenhum dos tempos, houve diferença significativa na porcentagem de dano entre os grupos tratados e o controle. Segundo os autores, o organismo removeu as AgNPs do organismo e houve reparo no DNA comprometido, já que após as análises de 7 e 28 dias não foi verificado dano a integridade do DNA. Somado a isso, assim como para outros parâmetros avaliados no estudo, as nanopartículas de menor tamanho demonstraram ser mais tóxicas ao DNA.

No caso das AgNPs de 60 nm avaliadas nesse estudo, o tratamento com a substância durou 36 dias e o ensaio do cometa foi realizado após 44 dias do fim dos tratamentos, para que se pudesse realizar os experimentos de orientação e comportamento sexual. Como as análises não foram realizadas no final do tratamento e nem logo após as primeiras doses (24

horas, por exemplo) é possível que possa ter ocorrido dano e em seguida uma reparação do DNA pelo organismo do animal. Aliado a isso, como o protocolo é de difícil execução, não foi possível identificar diferenças nos níveis de fragmentação do DNA além da Classe 1, sendo possível que outros níveis de fragmentação talvez presentes não puderam ser identificados.

6.4 Determinação do peso e idade à puberdade

Para a idade à puberdade houve diferença estatística dos dois grupos tratados em relação ao controle, os animais tratados atingiram a puberdade mais tardiamente do que o controle. Já para o peso à puberdade, somente o grupo tratado com a dose mais alta de 0,030 mg/Kg diferiu estatisticamente do controle, apresentando um maior peso ao ser detectada a puberdade, quando comparado ao controle.

A puberdade é um processo complexo regulado pelo sistema endócrino (MARANGHI; MANTOVANI, 2012). Um dos parâmetros utilizado para determinar a progressão da puberdade é a separação prepucial (KORENBROT; HUHTANIEMI; WEINER, 1977). O aumento da produção de testosterona pelos testículos é conhecido por ser responsável pela separação da pele do prepúcio e exposição da glândula do pênis (KORENBROT; HUHTANIEMI; WEINER, 1977). No entanto, a exposição pré-púbere ao AgNPs não causou alterações nos níveis séricos de testosterona, o atraso em dias e diferença no peso dos animais, podem ter sido resultante de algum outro evento não ligado a questão endócrina.

Keene et al. (2002) demonstraram que a ausência de receptores para o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) resulta em atraso da separação balanoprepucial e conseqüentemente na puberdade de ratos. No entanto, não foram detectadas diferenças significativas nos níveis de concentração plasmática de testosterona entre os grupos controle e os que possuíam ausência do receptor, evidenciando a falta de ligação do atraso da puberdade com andrógenos, neste caso.

O aumento de peso encontrado no grupo tratado com 0,030 mg/Kg de AgNPs pode estar relacionado ao fato desses animais terem alcançado a puberdade mais tardiamente em relação ao controle, proporcionando o aumento de peso. Embora o valor do peso encontrado

para o grupo de 0,015 mg/Kg esteja próximo do grupo tratado com 0,030mg/Kg, não houve diferença estatística em relação ao controle, para a dose mais baixa.

Em relação a estudos com nanopartículas, Jackson et al. (2011) avaliaram a idade à puberdade, através da separação balanoprepucial, em ratos que tiveram as mães intoxicadas por nanopartículas de carbono (Printex 90). Os autores observaram que a puberdade iniciou em tempos similares nos grupos tratados e no controle, não ocorrendo prejuízo para a idade à puberdade. Para as AgNPs não foram encontrados estudos para comparação, mas em nosso experimento pode-se verificar que houve prejuízo para a puberdade em ratos intoxicados com AgNPs, com tamanho de 60 nm.

6.5 Contagem espermática, produção espermática diária por testículo e tempo de trânsito no epidídimo

Ao avaliar diversos parâmetros relacionados ao testículo e ao epidídimo, a conclusões foram que as AgNPs de 60 nm avaliadas nesse estudo, não alteraram o peso dos testículos, bem como o peso da cabeça e da cauda do epidídimo dos animais, houve apenas diminuição do peso do corpo do epidídimo em ambos os grupos tratados. A contagem espermática no testículo e a produção espermática diária não sofreram alteração pela substância, enquanto que a reserva espermática e o trânsito espermático, ambos na cauda do epidídimo, demonstraram menor concentração e menor tempo de trânsito respectivamente, nos animais tratados com a dose de 0,015 mg/Kg quando comparados ao controle.

Gromadzka-Ostrowska et al. (2012) avaliando AgNPs com tamanhos de 20 e 200 nm e em diferentes doses (5mg/Kg e 10mg/Kg), através de injeção intravenosa em ratos Wistar, concluíram que em nenhuma das doses utilizadas houve diferença no peso dos testículos e dos epidídimos quando comparados ao controle e que nanopartículas de 20 nm, na dose mais baixa tiveram o efeito de diminuir a contagem de espermatozoides no epidídimo (reserva espermática), após 24h e 28 dias de exposição. Efeito semelhante ao obtido no presente estudo, porém na metodologia do estudo citado não houve a segmentação do epidídimo em cabeça, corpo e cauda, sendo os dados evidenciados no epidídimo como um todo. Para as nanopartículas de 60 nm houve uma diminuição no peso corpo do epidídimo nos animais tratados em comparação com o controle, que pode estar relacionada com o seccionamento

dessa parte do epidídimo, que é uma região pequena e não bem delimitada, e por ter sido realizado de forma aleatória pode ter gerado a diminuição de peso observada.

Os parâmetros contagem espermática no testículo e a produção espermática diária não sofreram alteração pela AgNPs. Kyjovska et al. (2013) investigaram a influência de nanopartículas de dióxido de titânio e de carbono (Printex 90) sobre a função reprodutiva em duas gerações (F1 e F2), através da exposição maternal das vias áreas de ratas. Dentre os parâmetros estudados estavam a produção espermática diária (PED) e espermatozoides por grama de testículo. Os autores concluíram que a geração F1 que teve as mães expostas aos dois tipos de nanopartículas, não apresentaram alterações nos parâmetros citados, enquanto que na geração F2 houve diminuição dos dois parâmetros para as nanopartículas de titânio e para as nanopartículas de carbono, diminuição para PED e tendência a diminuição para espermatozoides por grama de testículo. Segundo os autores, podem ter ocorrido alterações epigenéticas, que só se manifestaram na segunda geração. No caso das AgNPs a administração foi feita através de gavagem diretamente nos ratos em estudo e não foram encontradas alterações. Estudos futuros podem avaliar a toxicidade das AgNPs em uma exposição pré-natal e investigar possíveis mecanismos epigenéticos.

Os grupos tratados com AgNPs de 60 nm, avaliadas neste estudo, apresentaram diminuição de reserva espermática e aceleração do trânsito espermático. Para adquirir a capacidade de reconhecimento e fertilização do oócito, os espermatozoides de mamíferos precisam passar por um processo de maturação, que ocorre durante a passagem dos mesmos através do epidídimo (CUASNICÚ et al., 2002). Alterações no tempo do trânsito espermático no epidídimo podem causar alterações de maturação, assim como alterar o número de espermatozoides disponíveis para a ejaculação (KLINEFELTER, 2002).

O transporte dos espermatozoides através do epidídimo está ligado à atividade contrátil na parede ductal (COSENTINO et al., 1984). Embora a testosterona tenha influência sobre parâmetros espermáticas no epidídimo (FERNANDEZ et al., 2007) as contrações no músculo liso do túbulo epididimal e o trânsito de espermatozoides são influenciados por muitos outros fatores (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006). Contratilidade do túbulo do epidídimo é influenciada por prostaglandinas (PGs). $\text{PGF}_{2\alpha}$ aumenta a frequência e amplitude das contrações no epidídimo proximal *in vitro*, ao passo que a PGE_2 diminui estas contrações (COSENTINO et al., 1984). Substâncias como a oxitocina, e a vasopressina, também aumentam a contratilidade do epidídimo tanto *in vitro* (STUDDARD; STEIN; COSENTINO, 2002; FILIPPI et al., 2002) como *in vivo* (WHITTINGTON et al., 2001; MELIN, 1970). Estudos demonstram que a estimulação da atividade contrátil pode resultar

em aumento do número de espermatozoides ejaculados e do transporte espermático para a cauda do epidídimo (FILIPPI et al., 2002; NICHOLSON; PARKINSON; LAPWOOD, 1999).

Como as AgNPs não causaram alterações nas dosagens de testosterona, poderia ter ocorrido alguma alteração no padrão de contração do músculo liso do epidídimo, trazendo o aumento dessas contrações, o que acarretaria em um tempo menor de trânsito espermático. Não foram realizados testes para verificar esta suposição, portanto o mecanismo responsável para esse resultado não está definido.

6.6 Verificação de anormalidades morfológicas nos espermatozoides

No presente estudo, ambos os grupos tratados apresentaram anormalidades morfológicas em relação ao grupo controle. As AgNPs já demonstraram causar anormalidades em espermatozoides de ratos *Wistar* em um estudo que comparou amostras de 24 horas após injeção intravenosa das nanopartículas com amostras após uma e quatro semanas de tratamento, sendo que após esse período, todos os grupos tratados apresentaram anormalidades morfológicas. Entre as anormalidades visualizadas nos espermatozoides, estavam cabeça dobrada sobre o corpo, cabeça solta, cabeça ondulada e presença de duas cabeças em um só corpo (GROMADZKA-OSTROWSKA et al., 2012). Em outro estudo, que utilizou a gavagem para a administração das AgNPs, também com ratos *Wistar* e onde várias doses da substância foram testadas, houve diminuição da morfologia normal dos espermatozoides nos grupos tratados quando comparados ao controle, resultado que demonstrou ser dose dependente, pois na dose mais alta de 200 mg/Kg houve o máximo de anormalidades morfológicas presentes nos espermatozoides. Segundo os autores, as AgNPs poderiam estar afetando o DNA celular e como consequência causar mutações genéticas, responsáveis pelas anormalidades morfológicas (BAKI et al., 2013).

Já há estudos demonstrando que as AgNPs realmente afetam o DNA causando danos (ASHARANI et al., 2009; GROMADZKA-OSTROWSKA et al., 2012; FOLDBJERG; DANG; AUTRUP, 2011) mas a sua ligação com as mutações genéticas e consequentemente com as anormalidades morfológicas ainda não está clara. No entanto, ambos os estudos citados em concordância com o presente, demonstram a toxicidade das AgNPs sobre a morfologia dos espermatozoides.

6.7 Concentrações séricas hormonais: Testosterona, Estradiol, FSH e LH

As AgNPs demonstraram não provocar alterações endócrinas nos animais em estudo. Para as análises de testosterona, estradiol, FSH e LH não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados e o grupo controle. Um nível adequado de hormônios sexuais é fundamental para a espermatogênese, o FSH estimula a produção da proteína de ligação de andrógeno pelas células de Sertoli que é essencial para manter a concentração de testosterona em níveis altos o suficiente para iniciar e manter a espermatogênese (BAI et al., 2010). As concentrações plasmáticas de LH regulam a esteroidogênese testicular dentro das células de Leydig (YOSHIDA et al., 1999). Em relação ao estradiol, a ampla gama de receptores nas células testiculares e capacidade dos testículos em converter irreversivelmente andrógenos em estrógenos através de um complexo enzimático microsomal chamado aromatase, deixam claro o seu papel fisiológico na espermatogênese (CARREAU et al., 2003).

Baki et al. (2013) avaliaram a toxicidade de AgNPs sobre parâmetros espermáticos, hormônios sexuais e células de Leydig, testando diferentes doses (25, 50, 100 e 200 mg/kg) através de administração via oral por gavagem, em ratos Wistar. Os resultados demonstraram uma redução nos níveis sanguíneos de testosterona e um aumento no nível de LH, ambos em doses elevadas, enquanto os níveis de FSH não apresentaram nenhuma redução significativa. Os autores atribuíram a redução dos níveis de testosterona à redução das células de Leydig nos animais tratados. O aumento de LH a um mecanismo de auto regulação do hipotálamo em resposta a diminuição de testosterona e a diminuição de FSH mesmo não sendo significativa, a produção do hormônio inibina pelas células de Sertoli.

Bai et al. (2010) demonstraram que nanotubos de carbono, não alteraram os níveis plasmáticos de testosterona, LH e FSH em ratos e nem parâmetros como concentração espermática e motilidade, após aplicações intravenosas de 5 doses (5 mg/Kg cada) em diferentes tempos, as análises hormonais foram realizadas aos 15, aos 60 e aos 90 dias, após a primeira dose. Já Yoshida et al. (2008) demonstraram que nanopartículas de carbono administradas por via intratecal em 10 doses ao longo de 10 semanas aumentaram os níveis séricos de testosterona, bem como causaram vacuolização nos túbulos seminíferos e diminuição na produção espermática diária. Baseados em estudos prévios do grupo, os autores sugeriram um possível comprometimento das células de Leydig, como responsável pelas flutuações hormonais.

Os disruptores endócrinos são moléculas exógenas que podem afetar a síntese, secreção, transporte, metabolismo, ligação e ação de hormônios naturais do organismo (KAVLOCK et al., 1996). A possibilidade de nanomateriais atuarem como disruptores endócrinos permanece como uma questão importante e relevante (LU et al., 2013). As AgNPs de 60 nm avaliadas nesse estudo não alteraram os hormônios sexuais, porém Baki et al. (2013) observou tais alterações em seu experimento para AgNPs. O estudo não cita o tamanho de AgNPs, mas utilizou doses mais altas que o presente estudo, é possível que as doses de 0,015 mg/Kg e 0,030 mg/Kg utilizadas em nosso estudo não foram altas suficientemente para trazer alterações hormonais nos animais. Além disso, como visto nos estudos realizados por Bai et al. (2010) e Yoshida et al. (2008) para as nanopartículas de carbono, fatores como o número de doses e a via de administração, dentre outros interferem com os resultados. Assim, são necessários mais experimentos para concluir se as AgNPs causam ou não alterações hormonais.

6.8 Orientação sexual

Ao avaliar a orientação sexual dos animais tratados com AgNPs, verificou-se que o grupo que recebeu a dose de 0,015 mg/Kg obteve pontuação negativa no escore de preferência sexual, o que conforme a metodologia, confirma preferência desse grupo pelo sexo masculino. Para o grupo tratado com 0,030 mg/Kg de AgNPs não houve diferença estatística significativa em relação ao controle, que demonstrou preferência pelo sexo feminino. A orientação sexual é um termo utilizado para caracterizar os aspectos relacionados com o comportamento sexual. Os ratos mostram preferências de acasalamento consistentes por machos ou fêmeas e a orientação sexual ou o padrão de preferência refere-se a esse fenômeno (MATUSZCZYK; LARSSON, 1993).

O método da arena, para avaliação do comportamento sexual, parte do pressuposto que o macho escolhe um parceiro que possa lhe proporcionar recompensa sexual adequada, e quando este, passa mais tempo na vizinhança de uma fêmea receptiva do que na vizinhança de um macho, tem comportamento heterossexual (MATUSZCZYK; LARSSON, 1993). Estudos demonstraram que a preferência do macho por uma fêmea receptiva é alterada pelo status de testosterona do macho (HETTA; MEYERSON, 1979). Os receptores de testosterona, quando expostos a esse esteróide dimerizam-se, ligam-se a um elemento de resposta específico, que

regula a transcrição de genes. A modulação da transcrição de genes irá afetar a fisiologia celular bem como a resposta de um organismo a um ambiente e a expressão de um comportamento sexual (CHARLIER et al., 2013).

Dahlgren, Matuszczyk e Hard (1990) investigaram a preferência sexual de uma prole de machos nascidos de mães expostas a etanol na dieta, durante a gestação. Utilizando a arena como modo de avaliação, os autores concluíram que os machos com mães expostas ao etanol, não demonstraram preferência nem pelo macho e nem pela fêmea, enquanto o grupo controle apresentou preferência pela fêmea. Segundo os autores, a ausência de preferência pela fêmea receptiva nos grupos tratados poderia estar sendo causada por distúrbios causados pelo etanol, no desenvolvimento de elementos neurais envolvidos na preferência sexual durante o período pré-natal, sensível a testosterona.

Embora a testosterona altere o padrão de preferência sexual dos machos (HETTA; MEYERSON, 1979), a orientação sexual é um processo que envolve uma complexa interação entre fatores genéticos, biológicos e sócio-culturais (HU et al., 1995). Há relatos que outros fatores como variações genéticas (HAMER et al., 1993; HU et al., 1995;) e diferenças na estrutura cerebral entre homossexuais e heterossexuais (SWAAB; HOFMAN, 1990; LEVAY, 1991) estão ligados a alterações na preferência sexual.

Em nosso experimento as análises hormonais que incluíram testosterona, estradiol, FSH e LH não apresentaram diferenças estatísticas significativas nos animais tratados em relação ao controle. Resultados que demonstram que a pontuação negativa obtida no escore de preferência sexual no grupo de 0,015 mg/Kg pode ter ocorrido nos animais por outro mecanismo não hormonal e aparenta não ser dose dependente, já que os animais tratados com a dose maior não diferiam estatisticamente do controle.

6.9 Comportamento sexual

Para as AgNPs, avaliadas nesse estudo, não houve diferença estatística dos grupos tratados em relação ao controle para o comportamento sexual dos animais, no entanto, verificou-se que nos grupos tratados mais animais não realizaram montas nos dez primeiros minutos do teste, em relação ao controle.

Moniz et al. (1999), utilizando a mesma metodologia do presente trabalho, demonstraram que ratos expostos ao pesticida fenvalerato em período perinatal exibiram

aumento no total do número de montas até a ejaculação e diminuição no número de ejaculações após a primeira intromissão, sugerindo que houve uma redução na potencia sexual dos animais expostos ao fenvalerato. Paralelamente a estes resultados, houve diminuição dos níveis de testosterona, dos pesos das vesículas seminais e da próstata, além de atraso na descida dos testículos dos animais. Segundo os autores, esses resultados em conjunto indicam que houve uma desregulação no meio androgênico durante o período de exposição, causando uma possível redução na liberação de testosterona no período crítico pós – natal.

Exposição à testosterona principalmente produzida nas gônadas pode modular a fisiologia do cérebro e aumentar a probabilidade dos machos executarem comportamentos típicos masculinos (CHARLIER et al., 2013). Além disso, os hormônios esteróides podem influenciar o comportamento sexual, aumentando ou diminuindo a síntese, liberação e eficácia de determinados neurotransmissores, com funções e localizações neurais específicas, por exemplo, agonistas colinérgicos demonstraram facilitar a ejaculação (BITRAN; HULL, 1987).

Um estudo feito com codornas (machos) demonstrou que apenas dois dias de tratamento com cápsulas subcutâneas de testosterona, são suficientes para desencadear estágios iniciais da sequência copulatória, como por exemplo, tentativas de monta e que sete dias de exposição são necessários para ativar a sequência completa, incluindo movimentos de contato coais. Comportamento não observado em machos castrados não tratados (CHARLIER; BALL; BALTHAZART, 2008).

Estes estudos deixam claro o papel da testosterona sobre o comportamento sexual. Em nosso estudo as AgNPs não diminuíram os níveis de testosterona nos ratos, o que está de acordo com o fato de que não houve diferença estatística dos grupos tratados em relação ao controle para o comportamento sexual dos animais. No entanto, os animais tratados obtiveram um comportamento diferente dos animais do grupo controle, com mais animais não realizando montas nos dez primeiros minutos do teste. Isso pode ser devido à influência da substância em estudo em outros mecanismos que interfiram no comportamento sexual sem, no entanto, alterar o padrão hormonal nas doses utilizadas.

7 CONCLUSÃO

A exposição pré-púbere de ratos com baixas doses de AgNPs demonstrou comprometer a funcionalidade espermática dos animais. O comprometimento foi revelado pela redução na integridade acrossomal, na integridade da membrana plasmática e na atividade mitocondrial dos espermatozoides, enquanto que dano à integridade do DNA não foi visualizado.

Os animais tratados com a substância apresentaram um atraso em dias, bem como um maior peso ao atingir a puberdade. Não houve alterações na contagem espermática e na produção espermática diária por testículo, porém a reserva espermática nos animais tratados evidenciou uma redução na concentração dos espermatozoides e houve aceleração no tempo de trânsito espermático, ambos na cauda do epidídimo. Ocorreram alterações na morfologia espermática dos animais e alteração na orientação sexual, onde animais tratados apresentaram preferência sexual por machos. As análises hormonais revelaram que a substância não alterou o padrão endócrino.

Os resultados, em conjunto, demonstram que houve comprometimento da qualidade seminal e de parâmetros reprodutivos, evidenciando que as AgNPs, mesmo em doses extremamente baixas tem potencial para causar prejuízo a fertilidade masculina. 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 a curto e a longo prazo, permitindo explorar os benefícios das AgNPs de forma segura.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; IKEMOTO, I.; LOUGHLIN, K. R. Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. **The Journal of Urology**, v.152, n.1, p.107-110, 1994.

AITKEN, R. J. Sperm function tests and fertility. **International Journal of Andrology**, v. 29, n.1, p. 69-75, 2006.

ALM, K.; PELTONIEMI, O. A. T.; KOSKINEN, E.; ANDERSSON, M. Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, n. 3, p. 210–213, 2006.

ALMOFTI, M. R.; ICHIKAWA, T.; YAMASHITA, K.; TERADA, H.; SHINOHARA, Y. Silver Ion Induces a Cyclosporine A-Insensitive Permeability Transition in Rat Liver Mitochondria and Release of Apoptogenic Cytochrome c. **The Journal of Biochemistry**, v.134, n.1, p. 43-49, 2003.

ASARE, N.; INSTANESA, C.; SANDBERGA, W. J.; REFSNESA, M.; SCHWARZEA, P.; KRUSZEWSKIB, M.; BRUNBORG, G. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. **Toxicology**, v. 291, n. 1-3, p.65– 72, 2012.

ASHARANI, P. V.; MUN, G. L. K.; HANDE, M. P.; VALIYAVEETIL, S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS Nano**, v.3, n. 2, p. 279 – 290, 2009.

AUGER, J.; EUSTACHE, F.; ANDERSEN, A. G.; IRVINE, D. S.; JORGENSEN, N.; SKAKKEBAEK, N.E.; SUOMINEN, J.; TOPPARI, J.; VIERULA, M.; JOUANNET, P. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. **Human Reproduction**, v. 16, n.12, p. 2710-2717, 2001.

BAI, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; MU, Q.; ZHANG, W.; BUTCH, E. R.; SNYDER, S. E.; YAN, B. Repeated administrations of carbon nanotubes in male mice cause reversible testis damage without affecting fertility. **Nature Nanotechnology**, v.5, n.9, p.683-689, 2010.

BAKI, M. E.; EAMRAI, E.; FAZILATI, M.; POURENTEZARI, M.; ASGHARI, S.; YOUSOFI, V.; SPANANI, H. R.; FALAH, A. The Effect of Silver Nanoparticles (Ag-Nps) Concentration on the Sperm parameters, Number of Leydig Cells and Sex Hormones in Wistar Rats. In: THE 17TH NATIONAL E 5TH INTERNATIONAL IRANIAN BIOLOGY

CONFERENCE, 2012, Kerman. Disponível em: <http://ibc17.ir/wp-content/uploads/ibc17th_ibc17thp7571t001-1_fullpapersubmission.pdf>. Acesso em: 16 jul. 2013.

BARTH; A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989.

BEDFORD, J. M. Mammalian Fertilization Misread? Sperm Penetration of the Eutherian Zona Pellucida Is Unlikely to be a Lytic Event. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 6, p. 1275–1287, 1998.

BEER, C.; FOLDBJERGA, R.; HAYASHIB, Y.; SUTHERLAND, D.; AUTRUPA, H. Toxicity of silver nanoparticles—Nanoparticle or silver ion? **Toxicology Letters**, v. 208, n. 3, p. 286–292, 2012.

BENN, T.; WESTERHOFF, P. Nanoparticle Silver Released into Water from Commercially Available Sock Fabrics. **Environmental Science Technology**, v.42, n.11, p. 4133–4139, 2008.

BITRAN, D.; HULL, E. M. Pharmacological Analysis of Male Rat Sexual Behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 11, n. 4, p. 365-389, 1987.

BRAYDICH-STOLLE, L. K.; LUCAS, B.; SCHRAND, A.; MURDOCK, R. C.; LEE, T.; HUSSAIN, S.; SCHLAGER, J.; HOFMANN, M. Silver Nanoparticles Disrupt GDNF/Fyn kinase Signaling in Spermatogonial Stem Cells. **Toxicological Science**, v. 116, n.2, p. 577–589, 2010

BRAYDICH-STOLLE, L. K.; HUSSAIN, S.; SCHLAGER, J. J.; HOFMANN, M. C. *In Vitro* Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germline Stem Cells. **Toxicological Sciences**, v. 88, n.2, p. 412–419, 2005.

CARLSON, C.; HUSSAIN, S. M.; SCHRAND, A. M.; BRAYDICH-STOLLE, L. K.; HESS, K. L.; JONES, R. L.; SCHLAGER, J. J. Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. **The Journal of Physical and Chemistry B**, v.112, n.43, p. 13608–13619, 2008.

CARREAU, S.; LAMBARD, S.; DELALANDE, C.; GALERAUD, I. D.; BILINSKA, B.; BOURGUIBA, S. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, n.35, p. 1-6, 2003.

CASEY, P. J.; GRAVANCE, C. G.; DAVIS, R. O.; CHABOT, D. D.; LIU, I. K. M. Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. **Theriogenology**, v. 47, n 2, p. 575–582, 1997.

CASTRANOVA, V. Overview of current toxicological knowledge of engineered nanoparticles. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 53, n.6, p.14–17, 2011.

CHALOUPKA, K.; MALAM, Y.; SEIFALIAN, A. M. Nanosilver as a new generation of nanoprodukt in biomedical applications. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 580–588, 2010.

CHARLIER, T. D.; BALL, G. F.; BALTHAZART, J. Rapid action on neuroplasticity precedes behavioral activation by testosterone. **Hormones and Behavior**, v. 54, n.4, p. 488–495, 2008.

CHARLIER, T. D.; SEREDYNSKI, A. L.; NIESSEN, N. A.; BALTHAZART, J. Modulation of testosterone-dependent male sexual behavior and the associated neuroplasticity. **General and Comparative Endocrinology**, v. 190, p. 24-33, 2013.

CHEN, J.; HAN, C. M.; LIN, X. W.; TANG, Z. J.; SU, S. J. Effect of silver nanoparticle dressing on second degree burn wound. **Chinese Journal of Surgery**, v.44, n.1, p. 50–52, 2006.

CHEN, S.; ALLAM, J. P.; DUAN, Y.; HAIDL, G. Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches. **Archives of Gynecology and Obsteric**, v. 288, n. 1, p.191-199, 2013.

CHEN, X.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: A nanoprodukt in medical application. **Toxicology Letters**, v. 176, n. 1, p. 1-12, 2008.

CODRINGTON, A. M.; HALES, B. F.; ROBAIRE, B. Spermiogenic Germ Cell Phase-Specific DNA Damage Following Cyclophosphamide Exposure. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 3, p. 354-362, 2004.

COHEN, M.S.; STERN, J. M.; VANNI, A. J.; KELLEY, R. S.; BAUMGART, E.; FIELD, D., LIBERTINO, J. A.; SUMMERHAYES, I. C. *In vitro* analysis of a nanocrystalline silver-coated surgical mesh. **Surgical Infections**, v. 8, n.3, p. 397–403, 2007.

COSENTINO, M. J.; TAKIHARA, H.; BURHOP, J. W.; COCKETT, A. T. K. Regulation of rat caput epididymidis contractility by prostaglandins. **Journal of Andrology**, v. 5, n. 3, p. 216 - 222, 1984.

CUASNICÚ, P. S. et al. Changes in specific sperm proteins during epididymal maturation. In: ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. (Ed.). **The Epididymis – From Molecules to Clinical Practice**. New York: Plenum Publisher, 2002. p. 389–403.

DAHLGREN, I. L.; MATUCSZCZYK, J. V.; HARD, E. Sexual orientation in male pregnant rats prenatally exposed to ethanol. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 13, n. 3, p. 267-269, 1991.

DESAI, M. P.; LABHASETWAR, V.; AMIDON, G. L.; LEVY, R. J. Gastrointestinal Uptake of Biodegradable Microparticles: Effect of Particle Size. **Pharmaceutical Research**, v.13, n. 12, p. 1838-1845, 1996.

DHAWAN, A.; SHARMA, V. Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 2, p. 589–605, 2010.

DURÁN, N.; MARCATO, P. D.; DE CONTI, R.; ALVES, O. L.; COSTA, F. T. M.; BROCCHI, M. Potential Use of Silver Nanoparticles on Pathogenic Bacteria, their Toxicity and Possible Mechanisms of Action . **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 6, p. 949-959, 2010

DUYDU, Y.; BASARAN, N.; USTUNDAG, A.; AYDIN, S.; UNDEGER, U.; ATAMAN, O.Y.; AYDOS, K.; DUKER, Y.; ICKSTADT, K.; WALTRUP, B. S.; GOLKA, K.; BOLT, H. M. Assessment of DNA integrity (COMET assay) in sperm cells of boron-exposed workers. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 1, p. 27–35, 2012.

EL-ANSARY, A.; AL-DAIHAN, S. On the Toxicity of Therapeutically Used Nanoparticles: An Overview. **Journal of Toxicology**, v. 2009, p. 1-9, 2009.

ELECHIGUERRA, J. L.; BURT, J. L.; MORONES, J. R.; BRAGADO, A. C.; GAO, X.; LARA, H. H.; YACAMAN, M. G. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 3, n. 6, p. 1-10, 2005.

EMA, M.; KOBAYASHI, N.; NAYA, M.; HANAI, S.; NAKANISHI, J. Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. **Reproductive Toxicology**, v. 30, n. 3, p.343–352, 2010.

ERSKINE, M. S. Solicitation behavior in the estrous female rat: a review. **Hormones and Behavior**, v. 23, n. 4, p. 473–502, 1989.

ESTERHUIZEN, A. D.; FRANKEN, D. R.; LOURENS, G. J. H.; ROOYEN, L. H. Clinical importance of zona pellucida-induced acrosome reaction and its predictive value for IVF. **Human Reproduction**, v. 16, n.1, p. 138-144, 2001.

FELICIO, L. F., PALERMO-NETO, J., NASELLO, A. G. Perinatal bromopride treatment: Effects on sexual behavior of male and female rats. **Behavioral and Neural Biology**, v. 52, n.2, p. 145- 151, 1989.

FERNANDEZ, C. B.; PORTO, E. M.; ARENA, A. C.; KEMPINAS, W. G. Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. **International Journal of Andrology**, v. 31, n.4, p. 427-437, 2007.

FILIPPI, S.; VANNELLI, G. B.; GRANCHI, S.; LUCONI, M.; CRESCIOLI, C.; MANCINA, R.; NATALI, A.; BROCCHI, S.; VIGNOZZI, L.; BENCINI, E.; NOCI, I.; LEDDA, F.; FORTI, G.; MAGGI, M. Identification, localization and functional activity of oxytocin receptors in epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.193, n.1-2, p. 89–100, 2002.

FOLDBJERG, R.; DANG, D. A.; AUTRUP, H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. **Archives of Toxicology**, v.85, n.7, p.743-750, 2011.

FOLDBJERG, R.; OLESEN, P.; HOUGAARD, M.; DANG, D.A.; HOFFMANN, H.J.; AUTRUP, H. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. **Toxicology Letters**, v. 190, n.2, 156–162, 2009.

GARRETT, C.; LIU, D.Y.; BAKER, H. W. G. Selectivity of the human sperm-zona pellucida binding process to sperm head morphometry. **Fertility and Sterility**, v. 67, n. 2, p. 362-371, 1997.

GROMADZKA-OSTROWSKA, J.; DZIENDZIKOWSKA, K.; LANKOFF, A.; DOBRZYNSKA, M.; INSTANES, C.; BRUNBORG, G.; GAJOWIK, A.; RADZIKOWSKA, J.; WOJEWODZKA, M.; KRUSZEWSKI, M. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. **Toxicology Letters**, v. 214, n. 3, p. 251– 258, 2012.

GUNALP, S.; ONCULOGLU, C.; GURGAN, T.; KRUGER, T. F.; LOMBARD, C. J. A study of semen parameters with emphasis on sperm morphology in a fertile population: an attempt to develop clinical thresholds. **Human Reproduction**, v. 16, n. 1, p. 110-114, 2001.

GUZICK, D. S.; OVERSTREET, J. W.; FACTOR-LITVAK, P.; BRAZIL, C. K.; NAKAJIMA, S. T.; COUTIFARIS, C.; CARSON, S. A.; CISNEROS, P.; STEINKAMPF, M. P.; HILL, J. A.; XU, D.; VOGEL, D. L. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n.19, p. 1388-1393, 2001.

HACKENBERG, S.; SCHERZED, A.; KESSLER, M.; HUMMEL, S.; TECHNAU, A.; FROELICH, K.; GINZKEY, C.; KOEHLER, C.; HAGEN, R.; KLEINSASSER, N. Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. **Toxicology Letters**, v.201, n. 1, p.27–33, 2011.

HAINES, G. A.; HENDRY, J. H.; DANIEL, P.; MORRIS, I. D. Increased levels of comet-detected spermatozoa DNA damage following *in vivo* isotopic- or X-irradiation of spermatogonia. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 495, n.1–2, p. 21–32, 2001.

HAMER, D. H.; HU, S.; MAGNUSON, V. L.; HU, N.; PATTATUCCI, A. M. L. A Linkage Between DNA Markers on the X Chromosome and Male Sexual Orientation. **Science**, v. 261, n. 5119, p. 321-327, 1993.

HEINDEL, J. T.; TREINEN, K. A. Physiology of the Male Reproductive System: Endocrine, Paracrine and Autocrine Regulation. **Toxicologic Pathology**, v. 17, n. 2, p. 411-445, 1989.

HERNÁNDEZ-GONZÁLES, M.; GUEVARA, M.A.; AGAMO, A. Motivational influences on the degree and direction of sexual attraction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1129, n. 1, p. 61-87, 2008.

HERRICK, J. R.; SWANSON, W. F. Gonadotropin exposure, salt storage and storage duration affect penetration of domestic cat oocytes by homologous spermatozoa. **Theriogenology**, v.59, n.7, p.1503-1513, 2003.

HETTA, J.; MEYERSON, B.J. Sexual motivation in the male rat. A methodological study of sex-specific orientation and the effects of gonadal hormones. **Acta Physiologic Scandinavic Suppl.**, v.453, p. 1-68, 1978.

HOSSAIN, M. S.; JOHANNISSON, A; WALLGREN, M.; NAGY, S; A. P., SIQUEIRA; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. **Asian Journal of Andrology**, v.13, n.3, p. 406–419, 2011.

HRADIL, J.; PISAREV, A.; BABIC, M.; HORÁK, D. Dextran-modified iron oxide nanoparticles. **China Particuology**, v.5, n. 1-2, p. 162–168, 2007.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome-c oxidase in spermatozoa and dynamics of changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v.10, n.6, p. 809-828, 1987.

HU, S.; PATTATUCCI, A. M. L.; PATTERSON, C.; LI, L.; FULKER, D. W.; CHERNY, S. S.; KRUGLYAK, L.; HAMER, D. H. Linkage between sexual orientation and chromosome Xq28 in males but not in females. **Nature Genetics**, v. 11, n.3, p. 248 – 256, 1995.

HUNG., P.; MILLER, M. G.; MEYERS, S. A.; VANDEVOORT, C. A. Sperm Mitochondrial Integrity Is Not Required for Hyperactivated Motility, Zona Binding, or Acrosome Reaction in the Rhesus Macaque. **Biology of Reproduction**, v. 79, n. 2, p. 367–375, 2008.

HUSSAIN, S. M.; HESS, K. L.; GEARHART, J. M.; GEISS, K. T.; SCHLAGER, J. J. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. **Toxicology in Vitro**, v.19, n. 7, p. 975–983, 2005.

HUSSAIN, S. M.; JAVORINA, A. K.; SCHRAND, A. M.; DUHART, H. M.; ALI, S. F.; SCHLAGER, J. J. The Interaction of Manganese Nanoparticles with PC-12 Cells Induces Dopamine Depletion. **Toxicological Sciences**, v. 92, n. 2, p.456–463, 2006.

ICHIKAWA, T.; OEDA, T.; OHMORI, H.; SCHILL, W. B. Reactive oxygen species influence the acrosome reaction but not acrosin activity in human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 22, n. 1, p.37-42, 1999.

INGLE, A.; GADE, A.; PIERRAT, S.; SÖNNICHSEN, C.; RAI, M. Mycosynthesis of Silver Nanoparticles Using the Fungus *Fusarium acuminatum* and its Activity Against Some Human Pathogenic Bacteria. **Current Nanoscience**, v. 4, n. 2, p.141-144, 2008.

JACKSON, P.; VOGEL, U.; WALLIN, H.; HOUGAARD, K. S. Prenatal Exposure to Carbon Black (Printex 90): Effects on Sexual Development and Neurofunction. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.109, n.6, p.434–437, 2011.

JEONG, G. N.; JO, U. B.; RYU, H.Y.; KIM, Y. S.; SONG, K. S.; YU, J. Histochemical study of intestinal mucins after administration of silver nanoparticles in Sprague–Dawley rats. **Archives of Toxicology**, v.84, n.1, p. 63-69, 2010

JEYARAJ, M.; SATHISHKUMAR, G.; SIVANANDHAN, G.; MUBARAKALI, D.; RAJESH, M.; ARUN, R.; KAPILDEV, G.; MANICKAVASAGAM, M.; THAJUDDIN, N.; PREMKUMAR, K.; A. GANAPATHI, A. Biogenic silver nanoparticles for cancer treatment: An experimental report. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 106, p. 86–92, 2013.

JOHNSON, L.; VARNER, D. D.; ROBERTS, M. E.; SMITH, T. L.; KEILLOR, G. E.; SCRUTCHFIELD, W. L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 471–480, 2000.

KAVLOCK, R. J.; DASTON, G. R.; DEROSA, C.; FENNER-CRISP, P.; GRAY, L. E.; KAATTARI, S.; LUCIER, G.; LUSTER, M.; MAC, M. C.; MACZKA, C.; MILLER, R.; MOORE, J.; ROLLAND, R.; SCOTT, G.; SHEEHAN, D. M.; SINKS, T.; TILSON, H. A. 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, n.4, p. 715-740, 1996.

KAWATA, K.; OSAWA, M.; OKABE, S. *In vitro* toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 15, p. 6046–6051, 2009.

KEENE, D. E.; SUESCUN, M. O.; BOSTWICK, M. G.; CHANDRASHEKAR, V.; BARTKE, A.; KOPCHICK., J. J. Puberty Is Delayed in Male Growth Hormone Receptor Gene–Disrupted Mice. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 5, p. 661-668, 2002.

KIM, J.; KUK, E.; YU, K. N.; KIM, J.; PARK, S.; LEE, H.; KIM, S.; PARK, Y.; PARK, Y.; HWANG, C.; KIM, Y.; LEE, Y.; JEONG, D. H.; CHO, M. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 3, n. 1, p. 95–101, 2007.

KIM, J.; YOON, T.; YU, K. N.; KIM, B. G.; PARK, S.; KIM, H. W.; LEE, K.; PARK, S.; LEE, J. K.; CHO, M. H. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. **Toxicological Science**, v. 89, n.1, p. 338–347, 2006.

KIM, S.; CHOI, J. E.; CHOI, J.; CHUNG, K. H; PARK, K.; YI, J.; RYU, D.Y. Oxidative stress dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. **Toxicology In Vitro**, v.23, n.6, p.1076–1084, 2009.

KIM, Y. S.; SONG, M. Y.; PARK, J. D.; SONG, K. S.; RYU, H. R.; CHUNG, Y. H.; CHANG, H. K.; LEE, J. H.; OH, K. H.; KELMAN, B. J.; HWANG, I. K.; YU, I.J. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. **Particle and Fibre Toxicology**, v.7, n. 20, p.1-11, 2010.

KLINFELTER, G. R. Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. In: Robaire, B.; Hinton, B. T. (Ed.) **The Epididymis – From Molecules to Clinical Practice**. New York: Plenum Publisher, 2002. p. 353–369

KOMATSU, T.; TABATA, M.; KUBO-IRIE, M.; SHIMIZU, T.; SUZUKI, K.; NIHEI, Y.; TAKEDA, K. The effects of nanoparticles on mouse testis Leydig cells *in vitro*. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 8, p. 1825–1831, 2008.

KORENBROT, C. C.; HUHTANIEMI, I. T.; WEINER, R. I. Prepubertal Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. **Biology of Reproduction**, v.17, n.2, p. 298-303, 1977.

KYJOVSKAA, Z. O.; BOISENA, A. M. Z.; JACKSONA, P.; WALLINA, H.; VOGELA, U.; HOUGAARDA; K. S. Daily sperm production: Application in studies of prenatal exposure to nanoparticles in mice. **Reproductive Toxicology**, v. 36, p.88– 97, 2013.

LAN, Z.; YANG, W. Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood–testis barrier. **Nanomedicine**, v.7, n.4, p. 579–596, 2012.

LANSDOWN, A.B. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. **Current Problems in Dermatology**, v. 33, p.17–34, 2006.

LARESE, F. F.; D'AGOSTIN, F.; CROSERA, M.; ADAMI, G.; RENZI, N.; BOVENZI, M.; MAINA, G. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. **Toxicology**, v. 255, n. 1-2, p. 33-37, 2009.

LEE, H. Y.; PARK, H. K.; LEE, Y. M.; KIM, K.; PARK, S. B. A practical procedure for producing silver nanocoated fabric and its antibacterial evaluation for biomedical applications. **Chemical Communications**, v. 28, n. 28, p. 2959–2961, 2007.

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; DONDERO, F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v.2, n.3, p.246-256, 1996.

LEVAY, S. A difference in hypothalamic structure between heterosexual and homosexual men. **Science**, v. 253, n. 5023, p. 1034-1037, 1991.

LI, P. W.; KUO, T. H.; CHANG, J. H.; YEH, J. M.; , CHAN, W. H. Induction of cytotoxicity and apoptosis in mouse blastocysts by silver nanoparticles. **Toxicology Letters**, v. 197, n. 2, p.82–87, 2010.

LI-GUANG, S.; YANG, R.; YUE, W.; XUN, W.; ZHANG, C.; REN, Y.; SHI, L.; LEI, F. Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats. **Animal Reproduction Science**, v.118, n.2-4, p. 248–254, 2010.

LITTLETON-KEARNEY, M.; HURN, P. D. Testosterone as a modulator of vascular behavior. **Biological Research for Nursing**, v. 5, n. 4, p. 276-85, 2004.

LIU, D.Y.; BAKER, H. W. G. Disordered zona pellucida–induced acrosome reaction and failure of *in vitro* fertilization in patients with unexplained infertility. **Fertility and Sterility**, v.79 , n. 1, p. 74-80, 2003.

LIU, D. Y.; CLARCKE, G. N.; MARTIC, M.; GARRETT, C.; BAKER, H.W.G. Frequency of disordered zona pellucida (ZP) – induced acrosome reaction in infertile men with normal semen analysis and normal spermatozoa – ZP binding. **Human Reproduction**, v. 16, n.6, p. 1185-1190, 2001.

LIU, W.; WU, Y.; WANG, C.; LI, H.C.; WANG, T.; LIAO, C.Y.; CUI, L.; ZHOU, Q. F.; YAN, B.; JIANG, G. B. Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. **Nanotoxicology**, v.4, n. 1-4, p. 319–330, 2010.

LU, X.; LIU, Y.; KONG, X.; LOBIE, P. E.; CHEN, C.; ZHU, T. Nanotoxicity: A Growing Need for Study in the Endocrine System. **Nano Micro Small**, v. 9, n. 9-10, pages 1654–1671, 2013.

LUBICK, N. Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles—or both? **Environmental science & technology**, v. 42, n. 23, p. 8617 – 8617, 2008.

LUCAS, B.; FIELDS, C.; HOFMANN, M. C. Signaling Pathways in Spermatogonial Stem Cells and Their Disruption by Toxicants. **Birth Defects Research (Part C)**, v. 87, n. 1, p. 35-42, 2009.

LUOMA, S. N. **Silver nanotechnologies and the environment: old problems and new challenges?** Washington DC: Woodrow Wilson International Center for Scholars, 2008.

MAKHLUF, S. B. D.; QASEM, R.; RUBINSTEIN, S.; GEDANKEN, A.; BREITBART, H. Loading magnetic nanoparticles into sperm cells does not affect their functionality. **Langmuir**, v. 22, n.23, p. 9480–9482, 2006.

MARAMBIO-JONES, C.; HOEK, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **Journal of Nanoparticle Research**, v.12, n. 5, p. 1531-1551, 2010.

MARANGHI, F.; MANTOVANI, A. Targeted toxicological testing to investigate the role of endocrine disrupters in puberty disorders. **Reproductive Toxicology**, v. 33, n. 3, p. 290–296, 2012.

MATUSZCZYK, J. V.; LARSSON, K. Sexual Orientation and Sexual Motivation of the Adult Male Rat. **Physiology e Behavior**, v. 53, n.4, p. 747-750, 1993.

MELIN, P. Effects *in vivo* of neurohypophysial hormones on the contractile activity of accessory sex organs in male rabbits. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 22, n.2, p.283–292, 1970.

MENKVELD, R.; RHEMREV, J. P. T.; FRANKEN, D. R.; VERMEIDEN, J. P. W.; KRUGER T. F. Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis : relation with acrosin activity, morphology (stric criteria), and fertilization *in vitro*. **Fertility and Sterility**, v. 65, n.3, p. 637-644, 1996.

MIRSHOKRAEI, P.; HASSANPOUR, H.; TAHERI, M. A.; RIYAH, M.; SHAMS-ESFANDABADI, N. The *in vitro* effects of nanosilver colloid on kinematic parameters of ram spermatozoa. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 12, n.4, p. 317 – 323, 2011.

MONIZ, A. C.; CRUZ-CASALLAS, P. E. ; OLIVEIRA, C. A.; LUCISANO, A.; FLORIO, J. C.; NICOLAU, A. A.; SPINOSA, H. S.; BERNARDI, M. M.. Perinatal Fenvalerate Exposure: Behavioral and Endocrinology Changes in Male Rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 21, n. 5, p. 611–618, 1999.

MONTES-BURGOS, I.; WALCZYK, D.; HOLE, P.; SMITH, J.; LYNCH, I.; DAWSON, K. Characterisation of nanoparticle size and state prior to nanotoxicological studies. **Journal of Nanoparticle Research**, v.12, n. 1, p. 47–53, 2010.

MORISHITA, M.; GOTO, T.; PEPPAS, N. A.; JOSEPH, J. I.; TORJMAN, M. C.; MUNSICK, C.; NAKAMURA, K.; YAMAGATA, T.; TAKAYAMA, K.; LOWMAN, A. M. Mucosal insulin delivery systems based on complexation polymer hydrogels: effect of particle

size on insulin enteral absorption. **Journal of Controlled Release**, v.97, n. 1, p. 115–124, 2004.

MORONES-RAMIREZ, J. R.; WINKLER, J. A.; SPINA, C. S.; COLLINS, J. J. Silver Enhances Antibiotic Activity Against Gram-Negative Bacteria. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 190, p. 1-11, 2013.

MORRIS, I. D.; ILOTT, S.; DIXON, L.; BRISON, D. R. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. **Human Reproduction**, v. 17, n.4, p. 990-998, 2002.

MOURA, C. S.; GUERRA, M. M. P.; SILVA JUNIOR, V. A.; SILVA, C. G. C.; CAJU, F. M.; ALVES, L. C. Avaliação histomorfométrica do parênquima testicular de ratos adultos tratados com diferentes doses de ivermectina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 799-808, 2006.

MUDUNKOTUWA, I.A.; GRASSIAN, V. H. The devil is in the details (or the surface): impact of surface structure and surface energetics on understanding the behavior of nanomaterials in the environment. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n.5, p. 1135–1144, 2011.

MUNGER, M. A.; RADWANSKI, P.; HADLOCK, G. C.; STODDARD, G.; SHAABAN, A.; FALCONER, J.; GRAINGER, D. W.; DEERING-RICE, C. E. *In vivo* human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles (in press). **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 2013.

MURDOCK, R. C.; BRAYDICH-STOLLE, L.; SCHRAND, A. M.; SCHLAGER, J. J.; HUSSAIN, S. M. 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.

NAVARRO, E.; PICCAPIETRA, F.; WAGNER, B.; MARCONI, F.; KAEGI, R.; ODZAK, N.; SIGG, L.; BEHRA, R. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environmental Science Technology**, v. 42, n. 23, p. 8959–8964, 2008.

NICHOLSON, H. D.; PARKINSON, T. J; LAPWOOD, K. R. Effects of oxytocin and vasopressin on sperm transport from the cauda epididymis in sheep. **The Journal of Reproduction and Fertility**, v.117, n.2, p. 299-305, 1999.

O'DONNELL, L. et al. Endocrine Regulation of Spermatogenesis. In: Neill, J. D. (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, 6 ed. San Diego: Elsevier, 2006. cap 21, p. 1017-1096.

PARK, E. J.; BAE, E.; YI, J.; KIM, Y.; CHOI, K.; LEE, S. H.; YOON, J.; LEE, B. C.; PARK, K. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.30, n.2, p.162–168, 2010 (b).

PARK, E. J.; YI, J.; KIM, Y.; CHOI, K.; PARK, K. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 3, p. 872–878, 2010 (a).

PARK, M.V.D.Z.; NEIGHC, A. M.; VERMEULENB, J. P.; FONTEYNEB, L. J. J.; HENNY W. VERHAREN, H. W.; BRIEDÉA, J. J.; LOVERENA, H.; JONG, W. H. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 36, p. 9810–9817, 2011.

PARKER, R. M. Testing for reproductive toxicity. In: Hood, R. D. (Ed.). **Developmental and reproductive toxicology**. 2. ed. New York: Taylor and Francis, 2006. cap. 10, p. 425-487.

PAWAR, K.; KAUL, G. Toxicity of titanium oxide nanoparticles causes functionality and DNA damage in buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm *in vitro*. **Toxicology and Industrial Health**, v.28, n.9, p. 1-14, 2012.

PHILBROOK, N. A.; WINN, L. M.; AFROOZ, A.R.M.; SALEH, N. B.; WALKER, V. K. The effect of TiO₂ and Ag nanoparticles on reproduction and development of *Drosophila melanogaster* and CD-1 mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 257, n. 3, p. 429–436, 2011.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrossosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p.87-95, 1991.

PRYOR, J.; HUGHES, C.; FOSTER, W.; HALES, B.; ROBAIRE, B. Critical windows of exposure for children's health: the reproductive system in animals and humans. **Environmental Health Perspective**, v. 108, n.3, p. 491–503, 2000.

RAHMAN, M. F.; WANGA, J.; PATTERSONA, T. A.; SAINIA, U. T.; ROBINSONB, B. L.; NEWPORTA, G. D.; MURDOCKC, R. C.; SCHLAGERC, J. J.; HUSSAINC, S. M.; ALI, S. F. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles. **Toxicology Letters**, v.187, n. 1, p. 15–21, 2009.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOON, A.; TANGHE, S.; CORYN, M.; MAES, D; DE KRUIF, A. New techniques for the assessment of canine sperm quality: A review. **Theriogenology**, v.64, n.3, p.706-719, 2005.

ROBAIRE, B.; HINTON, B. T.; ORGEBIN-CRIST, M.C. The Epididymis. In: Neill, J. D. (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, 6 ed. San Diego: Elsevier, 2006. 2006. cap 22, p. 1071- 1148.

ROBB, G.W.; AMMAN, R.P; KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, n. 1, p. 103-107, 1978.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction of Domestic Animals**, v.38, n.4, p. 312-318, 2003.

ROSAS-HERNÁNDEZ, H.; JIMÉNEZ-BADILLO, S.; MARTÍNEZ-CUEVAS, P. P.; GRACIA-ESPINO, E.; TERRONES, H.; TERRONES, M.; HUSSAIN, S. M.; ALI, S. F.; GONZÁLEZ, C. Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings. **Toxicology Letters**, v.191, n.2-3, 15, p.305-313, 2009.

RUIZ-PESINI, E.; DIEZ, C.; LAPEN, A. C.; PEREZ-MARTOS, A.; MONTOYA, J.; ALVAREZ, E.; ARENAS, J.; LOPEZ-PEREZ, M. J. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 1616-1620, 1998.

SANTOS, L. D. **Efeito da exposição perinatal ao herbicida glifosato-roundup na diferenciação sexual e endocrinologia reprodutiva**. 2011. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná, Guarapuava, 2011.

SAKUMA, Y. Neural substrates for sexual preference and motivation in the female and male rat. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1129, n.1, p. 55-60, 2008.

SCHETTLER, T. et al. **Generations at Risk. Reproductive Health and the Environment**. Cambridge: MIT Press, 1999.

SCHRAND, A.M.; RAHMAN, M. F.; HUSSAIN, S. M.; SCHLAGER, J. J.; SMITH, D. A.; SYED, A. F. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. **Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 5, p.544-568, 2010.

SHAHARE, B.; YASHPAL, M.; SINGH, G. Toxic effects of repeated oral exposure of silver nanoparticles on small intestine mucosa of mice. **Toxicology Mechanisms Methods**, v. 23, n.3, p. 161–167, 2013.

SILVA, A. D. E. F.; DODE, M. A. N.; UNANIAN, M. M. **Capacidade reprodutiva do touro de corte: funções, anormalidades e outros fatores que a influenciam**. Campo Grande: Embrapa, 1993.

STAUSS, C. R.; VOTTA, T. J.; SUAREZ, S. S. Sperm Motility Hyperactivation Facilitates Penetration of the Hamster Zona Pellucida. **Biology of Reproduction**, v.53, n. 06, p. 1280-1285, 1995.

STENSBERG, M. C.; WEI, Q.; MCLAMORE, E. C.; PORTERFIELD, D. M.; WEI, A.; SEPÚLVEDA, M. S. Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging. **Nanomedicine**, v. 6, n. 5, p. 879–898, 2011.

STOKER, T. E.; PARKS, L. G.; GRAY, L. E.; COOPER, R. L. Endocrine-disrupting chemicals: pubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations. Endocrine Disrupting Screening and Testing Advisory Committee. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, n. 2, p. 197-252, 2000.

STUDDARD, P. W.; STEIN, J. L.; COSENTINO, M. J. The effects of oxytocin and arginine vasopressin *in vitro* on epididymal contractility in the rat. **International Journal of Andrology**, v. 25, n. 2, p. 65-71, 2002.

SU, H. L.; CHOU, C. C.; HUNG, D. J.; LIN, S. H.; PAO, I. C.; LIN, J. H.; HUANG, F. L.; DONG, R. X.; LIN, J. J. The disruption of bacterial membrane integrity through ROS generation induced by nanohybrids of silver and clay. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5979–5987, 2009.

SUNG, J. H.; JI, J. H.; PARK, J. D.; YOON, J. U.; KIM, D. S.; JEON, K. S.; SONG, M. Y.; JEONG, J.; HAN, B. S.; HAN, J. H.; CHUNG, Y. H.; CHANG, H. K.; LEE, J. H.; CHO, M. H.; KELMAN, B. J.; YU, I. J. Subchronic Inhalation Toxicity of Silver Nanoparticles. **Toxicological Sciences**, v.108, n. 2, p. 452–461, 2009.

SWAAB, D. F.; HOFMAN, M. A. An enlarged suprachiasmatic nucleus in homosexual men. **Brain Research**, v. 537, n.1–2, 24, p. 141–148, 1990.

VENDRAMINI, V.; ROBAIRE, B.; MIRAGLIA, S. M. Amifostine–doxorubicin association causes long-term prepubertal spermatogonia DNA damage and early developmental arrest. **Human Reproduction**, v.27, n.8, p. 2457–2466, 2012.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p.481-492, 2000.

WHITTINGTON, K.; ASSINDER, S. J.; PARKINSON, T.; LAPWOOD, K. R.; AND NICHOLSON, H. D. Function and localization of oxytocin receptors in the reproductive tissue of rams. **Reproduction**, v.122, n. 2, p. 317–325, 2001.

WOODROW WILSON International Center for Scholars. Project on emerging nanotechnologies (2011). Disponível em <http://www.nanotechproject.org/news/archive/9231/>. Acesso em 20 ago. 2013.

XU, F.; PIETT, C.; FARKAS, S.; QAZZAZ, M.; SYED, N. Silver nanoparticles (AgNPs) cause degeneration of cytoskeleton and disrupt synaptic machinery of cultured cortical neurons. **Molecular Brain**, v. 6. n. 29, p. 1-15, 2013.

YOSHIDA, S.; HIYOSHI, K.; ICHINOSE, T.; TAKANO, H.; OSHIO, S.; SUGAWARA, I.; TAKEDA, K.; SHIBAMOTO, T. Effect of nanoparticles on the male reproductive system of mice. **International Journal of Andrology**, v. 32, n. 4, p. 337–342, 2008.

YOSHIDA, S.; SAGAI, M.; OSHIO, S.; UMEDA, T.; IHARA, T.; SUGAMATA, M.; SUGAWARA, I.; TAKEDA, K. Exposure to diesel exhaust affects the male reproductive system of mice. **International journal of andrology**, v. 22, n.5, p.307-315, 1999.

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 060/2012 - CEUA/UNICENTRO

Guarapuava, 25 de setembro de 2012

Senhor Pesquisador

1. Comunicamos que o projeto de pesquisa intitulado: “**Estudo do efeito das nanopartículas de sais de prata sobre parâmetros funcionais espermáticos em ratos Wistar**”, parecer 016/2012 foi analisado e considerado **APROVADO**, pelo Comitê de Ética em Uso de Animais de nossa Instituição em Reunião Ordinária no dia 20 de setembro de 2012.

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.

Pesquisador: Marco Aurélio Romano

Atenciosamente

PI 
 Prof. Rosilene Rebeca
Presidente do CEUA/UNICENTRO
 Port. 1.983/2011 - GR/UNICENTRO

AO SENHOR: Marco Aurélio Romano
 DEFARM: Departamento de Farmácia
 UNICENTRO

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

ANEXO B - Diluição Nanopartículas de sais de prata (AgNPs)

Doses:

- 0,015 mg/Kg
- 0,030 mg/Kg

Concentração das AgNPs (Sigma Aldrich): 0,02 mg/Kg Tamanho: 60 nm

- Utilizamos 0,25 mL/100 g de peso vivo na gavagem:

1) Dose de 0,015mg/1000 mg

Isto corresponde em 100g

0,015 mg ----- 1000g

X ----- 100g x= 0,0015 mg

0,0015 mg/100g/0,25 mL

C= m/v C= 0,0015/0,25

C= 0,006 mg/mL (concentração para que dose de 0,015 mg/kg seja alcançada)

2) 0,030mg/ 1000g

0,030 mg -----1000g

X ----- 100g x=0,0030 mg

0,0030mg/ 100g/ 0,25mL

C= m/v C= 0,0030/0,25

C= 0,012 mg/mL (concentração para que a dose de 0,030 mg/Kg seja alcançada)

Exemplo de aplicação prática:

Para administras as AgNPs para o total de 20 ratos, se os ratos pesarem em média 30 g:

20 x30: 600g 0,25 mL/100g

0,25 mL ----- 100g

X ----- 600g

X= 1,5 mL (volume total para cada dose a ser administrada)

1) Dose de 0,015 mg/Kg C= 0,006mg/mL

$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$

0,02 . $V_1 = 0,006 \cdot 1,5$ $V_1 = 0,45$ ml de AgNPs Vágua = 1,5 – 0,45= 1,05 mL

2) Dose de 0,030 mg/kg C= 0,012 mg/Kg

0,02. $V_1 = 0,012 \cdot 1,5$

$V_1 = 0,9$ mL de AgNPs Vágua= 0,6 mL

A quantidade administrada na seringa é conforme o peso tabelado de cada animal (0,25 mL/100g) de peso vivo. Ex: se o animal pesar 30 g receberá 0,075 mL de volume total.