

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR.

**EFEITO PARADOXAL DE BAIXAS DOSES DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA NA EXPRESSÃO
TESTICULAR DE GENES RELACIONADOS COM A
ESPERMATOGÊNESE, HORMÔNIOS SEXUAIS E
FUNCIONALIDADE ESPERMÁTICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MÔNICA DEGRAF CAVALLIN

GUARAPUAVA-PR

2016

MÔNICA DEGRAF CAVALLIN

**EFEITO PARADOXAL DE BAIXAS DOSES DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
NA EXPRESSÃO TESTICULAR DE GENES RELACIONADOS COM A
ESPERMATOGÊNESE, HORMÔNIOS SEXUAIS E FUNCIONALIDADE
ESPERMÁTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde e Produção Animal Sustentável, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Renata Marino Romano

Co-orientador: Marco Aurelio Romano

GUARAPUAVA-PR

2016

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Santa Cruz

C377e Cavallin, Mônica Degraf
Efeito paradoxal de baixas doses de nanopartículas de prata na expressão testicular de genes relacionados com a espermatogênese, hormônios sexuais e funcionalidade espermática / Mônica Degraf Cavallin. – Guarapuava, 2016.
xiii, 69 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde e Produção Animal Sustentável, 2016

Orientadora: Renata Marino Romano
Coorientador: Marco Aurelio Romano
Banca examinadora: Renata Marino Romano, Claudio Alvarenga de Oliveira, Giuliana Gelbcke Kasecker Botelho, Paulo Roberto da Silva

Bibliografia

1. Ciências Veterinárias. 2. Função espermática. 3. Expressão gênica. 4. Receptores de andrógenos. 5. Toxicologia. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

CDD 636.089

Monica Degraf Cavallin

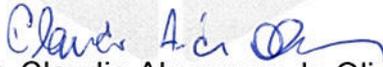
EFEITO PARADOXAL DE BAIXAS DOSES DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA NA EXPRESSÃO TESTICULAR DE GENES RELACIONADOS COM A ESPERMATOGÊNESE, HORMÔNIOS SEXUAIS E FUNCIONALIDADE ESPERMÁTICA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde e Produção Animal Sustentável, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 28 de Outubro de 2016.



Profa. Dra. Renata Marino Romano
(UNICENTRO)



Prof. Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira
(FMVZ/USP)



Profa. Dra. Giuliana Gelbcke Kasecker Botelho
(UNICENTRO)



Prof. Dr. Paulo Roberto da Silva
(UNICENTRO)

GUARAPUAVA-PR
2016



Universidade Estadual do Centro-Oeste

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

COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS - CEUA/UNICENTRO

Ofício nº 014/2015 – CEUA/UNICENTRO

Guarapuava, 14 de Maio de 2015

Senhor Pesquisador,

1. Comunicamos que o projeto de pesquisa intitulado: “ **Avaliação de limites toxicológicos seguros para o emprego de nanopartículas de prata como agente antimicrobiano baseado na avaliação toxicológica sobre a espermatogênese.** .”, parecer do protocolo 013/2015 foi analisado e considerado **APROVADO**, pelo Comitê de Ética em Uso de Animais de nossa Instituição no dia 03 de Julho de 2015.

2. Em atendimento à Resolução 196/96 do CNS, deverá ser encaminhado ao CEUA o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento do mesmo.

3. Observamos ainda que se mantenha a devida atenção aos Relatórios Parciais e Finais na seguinte ordem:

– Os **Relatórios Parciais** deverão ser encaminhados ao CEUA assim que tenha transcorrido um ano da pesquisa.

– Os **Relatórios Finais** deverão ser encaminhados ao CEUA em até **30 dias após a conclusão da pesquisa**.

– **Qualquer alteração na pesquisa** que foi aprovada, como por exemplo, números de sujeitos, local, período, etc. deverá ser necessariamente enviada uma carta justificativa para a análise do CEUA.

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

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

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

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

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

Aos meus pais, Gesse e Amauri
Aos meus orientadores, Renata e Marco Romano

AGRADECIMENTOS

À Deus que cria todas as oportunidades e nos coloca no melhor caminho.

À minha família, meus pais Amauri e Gesse e irmãos Eduardo e Jessica, pelo amor, paciência e incentivo. Vocês são o motivo pelo qual eu luto e busco sempre melhorar.

À Prof. Dra. Renata Marino Romano e ao Prof. Dr. Marco Aurélio Romano pela oportunidade, confiança, orientação, amizade, paciência e dedicação em todo meu aprendizado.

Aos meus amigos pelas palavras de incentivo e descontração e, por muitas vezes, entenderem e respeitarem minha ausência.

À todos os professores do PPGCV pela contribuição na minha formação profissional.

Às colegas do laboratório de fisiologia humana e toxicologia reprodutiva da UNICENTRO, pela acolhida, convívio e ajuda na execução prática deste trabalho.

A minha grande amiga e incentivadora Denise Ferreira, por ser um exemplo de vida e por muitas vezes acreditar na minha capacidade muito mais do que eu mesma.

Enfim, a todos que torceram por mim e participaram de alguma forma para que este trabalho pudesse ser concluído.

RESUMO

CAVALLIN, Mônica Degraf. **Efeito paradoxal de baixas doses de nanopartículas de prata na expressão testicular de genes relacionados com a espermatogênese, hormônios sexuais e funcionalidade espermática.** 2016. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). UNICENTRO.

Nanopartículas de prata (AgNPs) destacam-se nas áreas da medicina e da indústria por suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais. O alto grau de comercialização aumenta a preocupação quanto a sua potencial toxicidade sobre os diversos sistemas incluindo o reprodutivo. Este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade reprodutiva das AgNPs sobre os parâmetros selecionados numa curva de dose-resposta, onde a dose mais alta correspondeu à LOAEL (menor dose com efeito adverso observado) previamente estabelecida (15 µg/kg) em ratos Wistar pré-púberes como modelo experimental. Avaliou-se a produção espermática, as reservas espermáticas, o tempo de trânsito espermático, a funcionalidade espermática (integridades acrossômica e da membrana plasmática, atividade mitocondrial e morfologia espermática). A expressão de mRNA nos testículos foi avaliada por PCR quantitativo em tempo real a partir da transcrição reversa (RT-qPCR) para os genes do receptor de andrógenos (*Ar*), receptor de estradiol α (*Esr1*), receptor de estradiol β (*Esr2*), receptor de estrógeno 1 acoplado a proteína G (*Gper*) e aromatase (*Cyp19a1*). Foram dosadas as concentrações séricas de testosterona e estradiol. Os resultados foram analisados estatisticamente pela análise de variância seguida do pós-teste de Dunnet, considerando-se diferenças estatísticas quando $p < 0,05$. A exposição às AgNPs durante a fase pré-púbere resultou na alteração da expressão de genes *Ar*, *Gper* e *Esr1* relacionados ao controle da espermatogênese, bem como nos níveis de hormônios, reserva, tempo de trânsito e funcionalidade espermáticas. Pode-se concluir que as AgNPs possuem efeitos dose-resposta não lineares agindo como um potencial desregulador endócrino químico e causando decréscimo na fertilidade masculina.

Palavras-Chave: Função espermática, expressão gênica, receptores de andrógenos, toxicologia.

ABSTRACT

CAVALLIN, Mônica Degraf. **Paradoxical effects of low doses of silver nanoparticles on the testicular expression of spermatogenesis-related genes and sexual hormones and the sperm's functionality.** 2016. 69p. Dissertation (MSc in Veterinary Sciences). UNICENTRO.

Silver nanoparticles (AgNPs) stand out in the medicine and industry areas by their antibacterial, antifungal and antiviral properties. The high degree of commercialization increases the concerns about potential toxicity in various systems including the reproductive tract. This study aimed to evaluate the reproductive toxicity of AgNPs in the selected parameters in a dose response curve on which the higher dose corresponded to LOAEL (lowest observed adverse effect level) previously established (15 µg/kg) in prepubertal Wistar rats as experimental model. It was evaluated the sperm production, the sperm reserves, the sperm transit time, the sperm functionality (acrosome and plasma membrane integrities, mitochondrial activity and sperm morphology). The mRNA expression in the testis was evaluated by reverse transcription followed by real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) for androgen receptor (*Ar*), estradiol receptor α (*Esr1*), estradiol receptor β (*Esr2*), estrogen receptor 1 coupled to the G-protein (*Gper*) and aromatase (*Cyp19a1*) genes. It was measured the serum concentrations of testosterone and estradiol. The results were statistically analyzed by analysis of variance followed by Dunnet's post-hoc test considering statistical differences when $p < 0,05$. The exposure to AgNPs during the prepubertal period resulted in altered expression of the genes *Ar*, *Gper* and *Esr1* related to the spermatogenesis control, and in the hormones levels. The sperm parameters were also altered. It is possible to concluded that AgNPs has non-linear dose-response effects acting as a potential endocrine disrupting chemical and causing reduction in male fertility.

Keywords: Sperm function, gene expression, androgen receptors, toxicology.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Oligonucleotídeos senso (F) e antisenso (R) de cada gene utilizados para o ensaio de PCR em tempo real e as respectivas sequências de referência.....	40
Quadro 2 – Compilação de resultados dos parâmetros analisados.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Integridade acrossômica avaliada através da Coloração Simples Fast-Green/Rosa-Bengala.....	32
Figura 2 – Integridade de membrana plasmática avaliada pelo método de eosina-nigrosina..	33
Figura 3 – Atividade mitocondrial avaliada através da medição da atividade da enzima citocromo C oxidase na peça intermediária do espermatozoide utilizando 3,3' – diaminobenzidina (DAB).....	35
Figura 4 - Nível de testosterona sérico e expressão testicular do transcrito de <i>Ar</i> em ratos controle e expostos as AgNPs nas doses de 1,875 µg/kg, 3,75 µg/kg, 7,5 µg/kg e 15µg/kg.....	43
Figura 5 – Nível de estradiol sérico e expressão testicular do transcrito de <i>Cyp19a1</i> em ratos controle e expostos as AgNPs nas doses de 1,875 µg/kg, 3,75 µg/kg, 7,5 µg/kg e 15 µg/kg.	44
Figura 6 – Expressão testicular do transcrito de <i>Gper</i> , <i>Esr1</i> e <i>Esr2</i> em ratos controle e expostos as AgNPs nas doses de 1,875 µg/kg, 3,75 µg/kg, 7,5 µg/kg e 15 µg/kg.....	46
Figura 7 – Reserva espermática nos segmentos do epidídimo dos animais do grupo controle e expostos as AgNPs nas doses de 1,875 µg/kg, 3,75 µg/kg, 7,5 µg/kg e 15 µg/kg.....	48
Figura 8 – Tempo de trânsito espermático nos segmentos do epidídimo dos animais do grupo controle e expostos as AgNPs nas doses de 1,875 µg/kg, 3,75 µg/kg, 7,5 µg/kg e 15 µg/kg.	49
Figura 9 – Frequência da integridade do acrossoma, integridade da membrana plasmática, morfologia e atividade mitocondrial dos espermatozoides dos ratos controle e expostos as AgNPs nas doses de 1,875 µg/kg, 3,75 µg/kg, 7,5 µg/kg e 15 µg/kg.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção espermática dos animais dos grupos controle e expostos as AgNPs nas doses de 1,875 µg/kg, 3,75 µg/kg, 7,5 µg/kg e 15 µg/kg.....	47
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	A prata	15
2.2	Nanopartículas de sais de prata (AgNPs)	16
2.3	Toxicidade das AgNPs sobre a reprodução masculina	21
2.4	Desreguladores Endócrinos	22
2.5	Fisiologia Reprodutiva do Macho	24
2.5.1	<i>Desenvolvimento pré-púbere</i>	25
2.5.2	<i>Espermatogênese</i>	26
2.5.3	<i>Regulação hormonal da espermatogênese</i>	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo Geral e Hipótese Central	29
3.1.1	<i>Objetivo geral</i>	29
3.1.2	<i>Hipótese central</i>	29
3.2	Objetivos Específicos	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	Manejo dos animais	30
4.2	Delineamento Experimental	30
4.3	Determinação das doses de Nanopartículas de sais de prata (AgNPs)	31
4.4	Exposição às Nanopartículas de sais de prata (AgNPs)	31
4.5	Colheita de tecidos	31
4.5.1	<i>Sangue</i>	32
4.5.2	<i>Colheita de tecidos para biologia molecular</i>	32
4.5.3	<i>Colheita de espermatozoides</i>	32
4.6	Avaliação funcional dos espermatozoides	33
4.6.1	<i>Integridade do acrossomo</i>	33
4.6.2	<i>Integridade da membrana plasmática</i>	34
4.6.3	<i>Atividade mitocondrial</i>	35
4.7	Avaliação de anormalidades morfológicas nos espermatozoides	36
4.8	Produção espermática total, produção espermática diária por testículo, reserva espermática e tempo de trânsito no epidídimo	37
4.9	Identificação das alterações de expressão gênica pela quantificação do mRNA (RT-qPCR)	38
4.9.1	<i>Homogeneização e extração de RNA total do testículo</i>	38
4.9.2	<i>Verificação de concentração e integridade do RNA extraído</i>	39
4.9.3	<i>Reação de transcrição reversa para obtenção de cDNA</i>	39
4.9.4	<i>Quantificação dos transcritos por qPCR</i>	40
4.10	Dosagens Hormonais	42
4.11	Análise estatística	42
5	RESULTADOS	43
5.1	A exposição pré – púbere às AgNPs altera a expressão dos genes relacionados a espermatogênese e as concentrações séricas de testosterona e estradiol	43
5.1.1	<i>Testosterona e Ar</i>	43
5.1.2	<i>Estradiol e Cyp19a1</i>	45
5.1.3	<i>Receptores de estrógenos</i>	46

5.2	A exposição pré – púbere às AgNPs e a produção espermática	48
5.3	A exposição pré-púbere às AgNPs diminui a reserva espermática	48
5.4	A exposição pré – púbere às AgNPs diminui o tempo de trânsito espermático .	50
5.5	A exposição pré – púbere às AgNPs altera a funcionalidade dos espermatozoides	51
5.6	Resumo dos resultados	52
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

Devido às suas propriedades únicas, os nanomateriais têm atraído grande atenção para aplicações potencialmente benéficas na medicina, indústria e produtos de consumo. Definidas como materiais de tamanho entre 1 e 100 nanômetros (nm), as nanopartículas possuem propriedades mecânicas, ópticas, elétricas e estruturais avançadas, além de uma aumentada área de superfície em relação à substância original o que aumenta a biocompatibilidade desses materiais (MEDINA et al., 2007).

Em destaque na área médica, as nanopartículas de sais de prata (AgNPs) são comumente utilizadas por suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais, sendo empregadas no revestimento para curativos de queimaduras (CHEN et al., 2006), bandagens, dispositivos cirúrgicos e próteses ósseas (COHEN et al., 2007), e em produtos de cuidado com a saúde, como pasta de dentes, cosméticos, sprays, desinfetantes, desodorantes (LANSDOWN, 2006), fraldas e absorventes íntimos (SANKAR et al.; 2016), revestimento de embalagens de alimentos, além de serem incorporadas em têxteis (LEE et al., 2007), sempre com o objetivo de produzir efeito antimicrobiano (DHAWAN e SHARMA 2010; DURÁN et al., 2010; CONTRERAS et al., 2011; HORIE et al., 2012; SAVITHRAMMA, 2011).

Contudo, a alteração das características físicas sofrida pelos nanomateriais afeta a sua atividade biológica e potencial toxicidade (SCHLUESENER e SCHLUESENER, 2013), fazendo com que as mesmas características que os tornam atraentes sejam também motivo de preocupação para a saúde humana e ambiental, além de um desafio para a toxicologia (BEER et al., 2012).

Atualmente, há grande interesse científico em grupos de substâncias químicas presentes no meio ambiente, como contaminantes, e em produtos de uso diário que podem interferir no equilíbrio normal do sistema endócrino de populações humanas e animais. Conhecidos como desreguladores endócrinos, essas substâncias podem afetar a síntese, secreção, transporte, ligação, ação, metabolismo ou eliminação de hormônios endógenos, causando assim alterações no desenvolvimento, comportamento e reprodução (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009).

Estudos recentes demonstraram que as AgNPs podem agir como potenciais desreguladores endócrinos onde seus efeitos tóxicos incluem inibição da atividade mitocondrial (CARLSON et al., 2008; HADRUP et al., 2012), citotoxicidade (ASARE et al.,

2012), genotoxicidade (ASHARANI et al., 2009) e produção de espécies reativas de oxigênio causando estresse oxidativo no sistema nervoso central (WIN-SHWE e UJIMAKI, 2011).

Nanopartículas podem penetrar a barreira hematotesticular (KIM et al., 2006) alterando a viabilidade, proliferação e expressão gênica dos tecidos testiculares (KOMATSU et al., 2008). As AgNPs reduzem a função mitocondrial, causando dano na membrana, indução de apoptose e necrose em células tronco espermatogoniais de mamíferos *in vitro* (BRAYDICH-STOLLE et al., 2005), bem como causando declínio na proliferação celular dessas células tronco espermatogoniais, trazendo prejuízo para a fertilidade (BRAYDICH-STOLLE et al., 2010). Alterações na integridade espermática como comprometimento da membrana plasmática e acrossomal, redução da atividade mitocondrial de espermatozoides, e ainda modificações comportamentais reprodutivas também foram observadas (MATHIAS et al., 2014).

Os desreguladores endócrinos possuem ação em doses muito baixas e de maneira tecido específica, e devido às interações e saturação de receptores de hormônios, podem apresentar efeitos dose-resposta não lineares. Assim, não há uma relação dose-resposta específica, ou seja, diferentes doses podem resultar em efeitos desproporcionais onde doses menores podem ter efeitos mais importantes do que doses maiores (SCHUG et al., 2011).

Os objetivos do presente estudo foram avaliar os efeitos da possível desregulação endócrina ocasionada pela administração de baixas e decrescentes doses de AgNPs em ratos Wistar pré-púberes sobre a eficiência funcional de células espermáticas em decorrência de alterações causadas durante a espermatogênese, evidenciando os efeitos toxicológicos reprodutivos do nanomaterial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A prata

Há mais de 100 anos a prata tem sido explorada pela área médica devido às suas propriedades antimicrobianas (LOK et al., 2006; HOFFMANN, 1984), antifúngicas (KIM et al., 2009; WRIGHT et al., 1999) e antivirais (MEHRBOD et al., 2009). Em razão do problema de resistência bacteriana, muitos pesquisadores buscam desenvolver novas drogas que atuem como antimicrobianos ou em sinergismo com medicamentos antibióticos atuais (DURÁN et al., 2010). Assim, a necessidade de se obter drogas eficientes e livres de resistência levou ao ressurgimento da utilização de antisépticos com base na prata, pois esta possui amplo espectro e menor predisposição para induzir resistência bacteriana (JONES et al., 2004).

A prata ionizada é altamente reativa uma vez que se liga a proteínas teciduais e causa mudanças estruturais na parede celular bacteriana, levando à distorção celular e morte. Além disso, o metal também se liga ao DNA e RNA bacteriano inibindo a sua replicação e a possibilidade de desenvolver resistência (CASTELLANO et al., 2007; LANSDOWN, 2002).

A prata ionizada e compostos à base de prata são altamente tóxicos para os microorganismos, mostrando efeitos biocidas fortes sobre até 12 espécies de bactérias, incluindo *E. Coli* (ZHAO e STEVENS, 1998). Assim, a liberação de íons de prata Ag^+ é considerada a fonte de suas atividades antibacterianas e também conhecida por apresentar efeitos tóxicos em espécies biológicas, incluindo bactérias, vírus, fungos e alguns organismos aquáticos (LIU et al., 2010; RAI et al., 2009).

Em relação a toxicidade humana, casos de argiria, pigmentação cinza/azul escuro resultante da deposição de sais de prata ou prata solúvel, (MOSS et al., 1979; WILLIAMS, 1999), toxicidade neurológica irreversível e morte foram relatadas após longa ingestão de prata coloidal (HADRUP e LAM, 2014; MIRSATTARI et al., 2004).

O uso da prata como agente antibacteriano e antifúngico em produtos de uso pessoal, equipamentos médicos, têxteis e cosméticos preocupa quanto a aspectos de segurança toxicológica e potenciais riscos que estejam associados com a absorção pelo corpo humano (LANSDOWN, 2006).

A Organização Mundial de Saúde sugere como NOAEL (No observable adverse effect level) oral da prata em seres humanos uma ingestão total de 10 g de prata durante toda a vida (BURY, 2014).

2.2 Nanopartículas de sais de prata (AgNPs)

A redução do tamanho de partículas é uma ferramenta eficiente para melhorar a biocompatibilidade de materiais (MIRKIN e TATON, 2000). Nesse contexto, a nanotecnologia é um dos principais focos das atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação em diversos países. No Brasil, são produzidos resultados de vanguarda nas áreas farmacêutica e em interação com a biotecnologia, dentre os quais se podem citar os nanocarreadores, usados em cosméticos e associados a medicamentos além de alguns quimioterápicos antitumorais (RAMOS e PASA, 2008). Em 2012 instituiu-se no país o Comitê Interministerial de Nanotecnologias (CIN) com a finalidade de assessorar os Ministérios envolvidos no aprimoramento das políticas, diretrizes e ações voltadas para o desenvolvimento das nanotecnologias.

Os nanomateriais possuem propriedades físico-químicas únicas, as quais podem ser utilizadas para ultrapassar algumas das limitações encontradas em agentes terapêuticos tradicionais (EL-ANSARY; AL-DAIHAN, 2009).

Como vantagens, as drogas nanoparticuladas possuem uma maior área superficial e, conseqüentemente, aumento da taxa de dissolução, longa estabilidade, alta capacidade de transporte, capacidade de incorporar drogas hidro e lipofílicas, capacidade de administração por diferentes vias e de controle de liberação da droga, inexistência de resposta imune e reações alérgicas, aumento da biodisponibilidade dos fármacos e direcionamento dos mesmos a nível celular e nuclear garantindo a liberação da droga em tecidos específicos e otimizando a sua ação (SIRONMANI e DANIEL, 2011).

Vários produtos contendo nanomateriais estão disponíveis no mercado, dentre eles destacam-se: lipossomas (Doxil[®], DaunoXome[®]), microemulsões (Ciclosporina), nanopartículas de albumina (Abraxane[®]), nanopartículas de prata (limpeza de feridas, antibacteriano), microestrutura para composição do osso humano (NanOss[®]) e resinas para restauração dentária. No setor de cosméticos, os nanomateriais são empregados no

desenvolvimento de produtos, tais como: creme dental, protetor solar, perfumes, géis, shampoos, desodorantes e loções (RAMOS e PASA, 2008).

Destaque entre os nanomateriais, as nanopartículas de prata são definidas como um conjunto de átomos de prata que variam em diâmetro de 1 a 100 nm (nanômetros) e tem emergido pela sua ampla variedade de aplicações industriais e médicas (CHALOUPKA; MALAM; SEIFALIAN, 2010).

Em 2014, o banco de dados de Woodrow Wilson listou 259 produtos de consumo onde são incorporadas nanopartículas de prata (MATHIAS et al., 2014). Atualmente, o número de produtos contendo AgNPs cresceu para 442, evidenciando um aumento de 70% na disponibilidade desses materiais (WWICS, 2016).

Dentre as aplicações das AgNPs destaca-se o seu potencial antimicrobiano em relação a uma ampla variedade de bactérias, incluindo microorganismos resistentes as diversas drogas e altamente patogênicos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* (INGLE et al., 2008; KIM et al., 2007).

Os prováveis mecanismos pelos quais ocorre a atividade antimicrobiana estão sempre relacionados com a ligação do nanomaterial com a membrana bacteriana e interferência em processos vitais (KIM et al., 2007). Diversos estudos demonstram que devido a sua área superficial extremamente grande, as AgNPs proporcionam um melhor contato com os microorganismos, ligando-se à membrana celular e penetrando no interior das bactérias. A partir desse momento, as nanopartículas de prata interagem com as proteínas que contém enxofre e compostos que contém fósforo como o DNA, afetando assim a cadeia respiratória, a divisão celular e conseqüentemente levando à morte celular (FENG et al., 2000; SONDI e SALOPEK 2004).

Morones-Ramirez et al. (2013) demonstraram que a prata ionizada interrompe vários processos celulares em bactérias gram-negativas, como a formação de ligações sulfeto, o metabolismo central e a homeostase de ferro. Segundo os autores, essas alterações estão associadas ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ao aumento da permeabilidade da membrana, os quais seriam responsáveis por causar morte bacteriana.

Devido ao seu efeito bactericida comprovado, as nanopartículas de sais de prata têm sido amplamente exploradas e incorporadas em produtos médicos, como revestimento para curativos de queimaduras, dispositivos cirúrgicos e em próteses ósseas, além de serem inseridas em têxteis também com o objetivo de produzir efeito antimicrobiano (CHEN et al.,

2006; COHEN et al., 2007; LANSDOWN, 2006; LEE et al., 2007). Além disso, as AgNPs vem sendo incorporadas em produtos de consumo como pasta de dentes, fraldas, sprays desinfetantes, desodorantes, revestimento de embalagens de alimentos e purificadores de água (DHAWAN e SHARMA 2010; DURÁN et al., 2010; CONTRERAS et al., 2011; HORIE et al., 2012; SAVITHRAMMA, 2011).

Há ainda relatos de aplicações *in vitro* de AgNPs no tratamento de patologias como o câncer de mama e da Síndrome da Imunodeficiência Humana (SIDA) (JEYARAJ et al., 2013; ELECHIGUERRA et al., 2005).

As amplas aplicações das nanopartículas de prata aumentam a exposição humana e do ambiente a esses materiais. Como consequência, aumentam também o potencial risco relacionado à sua toxicidade. As grandes diferenças de diâmetro e o aumento da área superficial das nanopartículas afetam diretamente suas propriedades biológicas, químicas, elétricas e ópticas, o que pode resultar em problemas e riscos imprevisíveis e influenciar a sua toxicidade (EL BADAWY, 2011). Diversos estudos *in vitro* tem demonstrado que as AgNPs possuem poder toxicológico e afetam órgãos como pulmão, fígado, cérebro além de sistema vascular, pele e órgãos reprodutivos (AHAMED et al., 2010; CARLSON et al., 2008; HUSSAIN et al., 2005; LARESE et al., 2009; ROSAS-HERNÁNDEZ et al., 2009; XU et al., 2013).

Com relação aos mecanismos de toxicidade, sabe-se que as AgNPs desencadeiam uma série de respostas teciduais em diferentes linhagens celulares causando danos à membrana celular, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), danos nas mitocôndrias, diminuição da atividade metabólica, dano ao DNA e apoptose. (ASHARANI et al., 2009; BRAYDICH-STOLLE et al., 2005; FOLDBJERG et al., 2009; KHALILI FARD et al., 2015; LIU et al., 2010; PARK et al., 2011). Alguns autores definem o mecanismo de ação das AgNPs como “Cavalo de Tróia”, onde as partículas contornam barreiras e em seguida liberam os íons Ag^+ que causam danos na maquinaria da célula (PARK et al., 2010).

Estudos demonstram que fatores como tamanho, forma, características de superfície e taxa de dissolução influenciam tanto na habilidade das nanopartículas de interagir com sistemas biológicos, sua biodisponibilidade e bioacumulação como também na sua toxicidade (CASTRANOVA, 2011; NAVARRO et al., 2008).

Park et al. (2010) compararam a toxicidade de diferentes tamanhos de AgNPs (22 nm, 42 nm, 71 nm e 323 nm) avaliando a sua distribuição em tecidos e as interações entre as

nanopartículas e os componentes do sistema imune além das possíveis reações de hipersensibilidade causadas pelo material. Nos ratos tratados com AgNPs de menor tamanho (42 nm) observou-se distribuição em diversos órgãos, incluindo o cérebro, pulmão, fígado, rim e testículos enquanto as AgNPs de maiores dimensões (323 nm) não foram detectadas nos tecidos. O mesmo se verificou nas análises de distribuição de linfócitos B e imunoglobulinas E, aumento de TGF- β (fator de transformação do crescimento beta) e de citocinas IL-1, IL-6, IL-4, IL-10, IL-12. Deste modo, as partículas de AgNPs com menores dimensões são mais propensas a exercer respostas toxicológicas e induzir a resposta inflamatória e hipersensibilidade em ratos.

Almansour et al. (2015) avaliaram o efeito de tamanhos variáveis de AgNPs (10 nm, 20 nm, 40 nm 60 nm e 100 nm) em ratos saudáveis durante 35 dias. Os resultados evidenciaram efeitos tóxicos acentuados como cegueira monocular e alterações no fígado, rim e baço dos animais que receberam partículas de 10 nm e 20 nm em relação aos que receberam nanopartículas maiores.

De acordo com Beer et al. (2012), a maior área de superfície em relação ao volume presente nas partículas de menores dimensões aumenta a interação desse material com fluidos biológicos, o que faz essas partículas potencialmente mais reativas do que partículas maiores.

Em relação ao sistema nervoso central, existem poucas evidências de que a prata atravesse a barreira hematoencefálica e cause efeitos neurotóxicos, porém se sabe que a barreira não recobre toda a superfície do cérebro e a essas regiões as AgNPs teriam acesso através da circulação (LANSDOWN, 2007). Rahman et al. (2009) demonstraram que as AgNPs podem causar neurotoxicidade em ratos através da geração de ROS e ainda alterações significativas de genes de regiões do cérebro incluindo o núcleo caudado, o córtex frontal e o hipocampo. Segundo os autores, tais alterações podem afetar o sistema imune e o metabolismo aeróbico, causando apoptose e degeneração neuronal nos animais expostos. No estudo de Sung et al. (2009), verificou-se que as AgNPs podem se acumular no bulbo olfativo e cérebro, porém os órgãos-alvo para as nanopartículas de prata foram considerados os pulmões e fígado, onde exames histopatológicos indicaram infiltrado misto de células inflamatórias, inflamação crônica alveolar e pequenas lesões granulomatosas.

Recentemente, Silva et al. (2015) determinaram os efeitos pulmonares das AgNPs em ratos expostos a aerossóis, onde após obtenção de lavado bronco pulmonar obtidos em 1, 7,

21 e 56 dias pós-exposição, verificou-se produção de respostas inflamatórias e citotóxicas significativas.

Almansour et al. (2016) submetendo ratos a uma dose única diária (2mg/kg) de AgNPs (15-35 nm de diâmetro) durante 21 dias investigaram as alterações hepáticas induzidas pela exposição. As biópsias de fígado demonstraram alterações ultra-estruturais nos hepatócitos como alterações nas mitocôndrias, desregulação no retículo endoplasmático, vacuolização citoplasmática, acúmulo de gotículas lipídicas e depleção de glicogênio. Assim, os autores indicam que as AgNPs podem induzir alteração de organelas de hepatócitos, conduzindo a danos celulares que podem afetar a função do fígado, com risco potencial para a saúde humana.

Também em estudos *in vivo*, Shahare et al. (2013) evidenciaram que as AgNPs podem afetar o sistema digestório causando diminuição no peso corporal dos animais devido a danos causados nas células epiteliais das microvilosidades e às glândulas intestinais. Tais danos caracterizam-se por alterações na composição de mucinas constituintes do muco que garante a integridade do epitélio intestinal, reduzindo assim sua capacidade absorptiva.

Sycheva et al., (2016) avaliaram efeitos mutagênicos das AgNPs e do sulfato de prata nas células germinativas de ratos simulando um modelo semelhante ao impacto aos quais os seres humanos estão expostos. Partículas com 14nm de diâmetro foram ingeridas por ratos durante 14 dias nas concentrações de 0,01, 5, e 50 mg/kg. Os autores observaram que as AgNPs induziram um pequeno porém significativo aumento da frequência de espermátides com micronúcleos, o que indica o efeito citogênético. Como resposta a esse efeito, há ativação da apoptose e diminuição da fração de espermátides multinucleadas o que segundo os autores pode ser interpretado como um efeito de compensação destinada a regeneração da população de células. Na menor dose testada, o sulfato de prata aumentou a atividade apoptótica das células germinativas, porém não se observou nenhuma outra alteração no mesmo modo de ação, indicando um efeito mais pronunciado das nanopartículas de prata quando comparado com a sua forma iônica.

Expondo ratos por via oral durante 90 dias a AgNPs de 56 nanômetros nas doses de 30 mg/kg, 125 mg/kg, 500 mg/kg, Kim et al. (2010) após testes clínicos e hematológicos, histopatologia e avaliação da distribuição da prata no organismo dos animais, verificaram que a prata foi distribuída em todos os tecidos avaliados, sendo que o fígado foi o órgão mais afetado. A partir de seus resultados, os autores sugeriram para AgNPs com tamanho de 56

nanômetros, uma 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, de 30 mg/kg e a LOAEL (*Lowest observable adverse effect level*) que corresponde a menor dose administrada na qual se observa efeito adverso de 125 mg/kg.

2.3 Toxicidade das AgNPs sobre a reprodução masculina

A incidência de desordens reprodutivas masculinas como hipospadias, criptorquidismo, câncer testicular e baixa contagem espermática em adultos têm aumentado consideravelmente, podendo esse fato estar relacionado com a exposição a contaminantes ambientais (LUCAS et al., 2009). Neste contexto, as AgNPs são conhecidas por afetarem o desenvolvimento de espermatogônias *in vitro* interferindo no processo de espermatogênese (ASARE et al., 2012; BRAYDICH-STOLLE et al., 2010; LUCAS et al., 2009).

As nanopartículas possuem a capacidade de ultrapassar a barreira hematotesticular e acumular-se nos testículos (KIM et al., 2006, KIM et al., 2010). Assim, podem ser absorvidas pelas células de Leydig, responsáveis pela produção de testosterona nos testículos, afetando a viabilidade e desenvolvimento espermático bem como a expressão de genes nestas células (KOMATSU et al., 2008). Os nanomateriais podem causar ainda efeitos diretos sobre células tronco espermatogoniais e sobre células testiculares somáticas, resultando em efeitos adversos sobre o sistema reprodutivo (LUCAS et al., 2009).

Avaliando os efeitos tóxicos reprodutivos em ratos expostos por 30 dias às doses de 0,015 e 0,050 mg/kg de AgNPs durante a fase de pré-puberdade, Sleiman et al. (2013) verificaram redução de produção espermática para os grupos tratados, alterações hormonais e no desenvolvimento de tecidos andrógenos dependentes, alterações à puberdade e na morfometria testicular com redução no diâmetro luminal dos túbulos seminíferos.

No processo de espermatogênese, as nanopartículas têm demonstrado afetar as três regiões do espermatozoide; o acrossomo, responsável pela reação acrossomal, o segmento equatorial, responsável pela ligação do espermatozoide na membrana do oócito e a peça intermediária, responsável pelo vigor do espermatozoide (LAN; YANG, 2012).

Mathias et al. (2015) avaliaram o efeito das AgNPs de 60 nm nas doses de 0,015 mg/Kg e 0,030 mg/Kg sobre parâmetros reprodutivos e funcionais espermáticos em ratos Wistar onde se constatou alterações na integridade espermática, com comprometimento da

membrana plasmática e acrossomal e redução da atividade mitocondrial dos espermatozoides, além de modificações comportamentais reprodutivas, evidenciando que as AgNPs, mesmo em doses mais baixas que a LOEL proposta anteriormente, tem potencial para causar prejuízo a fertilidade masculina.

Em estudo onde se avaliou os efeitos das AgNPs sobre a expressões de genes em algumas regiões do cérebro de ratos, Rahman et al. (2009) constataram nos animais tratados alterações no gene *Park7*, que dentre as funções que possui no organismo, está a de proteger as células do estresse oxidativo e envolvimento na maturação do espermatozoide e na fertilização.

Já em coelhos como modelo animal, Castelli et al. (2014) avaliaram o efeito a longo prazo de nanopartículas de prata administradas por via intravenosa sobre a atividade reprodutiva e qualidade espermática. Coelhos tratados com AgNPs apresentaram diminuição da motilidade espermática bem como aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS). Embora a libido, os níveis séricos de testosterona, a concentração espermática e o volume de líquido seminal tenham sido pouco afetadas pelas AgNPs, as alterações encontradas foram suficientes para demonstrar que AgNPs tem a capacidade de acumular-se nos testículos comprometendo a função espermática.

2.4 Desreguladores Endócrinos

Desreguladores endócrinos químicos (DEQs) são agentes exógenos que interferem nas funções do sistema endócrino, alterando os processos de síntese, secreção, transporte, ação, metabolismo e eliminação de hormônios naturais endógenos, alterando a fisiologia dos organismos expostos e possivelmente da sua descendência (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009).

Os primeiros relatos sobre a ação dos desreguladores endócrinos devem-se a acontecimentos como o aparecimento de câncer no trato reprodutivo de filhas de mulheres que usaram dietilestilbestrol (DES) na gravidez, entre os anos de 1940 a 1970, anomalias no sistema reprodutivo observadas em jacarés que habitavam um lago na Flórida contaminado com o pesticida diclorodifeniltricloroetano (DDT) e um estudo realizado na Dinamarca que, através de análise de publicações de bancos de dados, investigou a qualidade do sêmen de homens entre os anos de 1938 e 1990 e evidenciou uma redução global na fertilidade

masculina neste período podendo esta estar relacionada com um aumento na incidência de anomalias geniturinárias (BILA e DEZOTTI 2007).

Em 2009, a Sociedade Internacional de Endocrinologia publicou a primeira declaração científica a respeito dos desreguladores endócrinos afirmando que estes representam uma preocupação significativa para a saúde pública (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009). Atualmente, através de diversos estudos realizados, a comunidade científica possui amplo conhecimento sobre como os desreguladores endócrinos interagem e alteram funções fisiológicas estando diretamente relacionados a perturbações nos sistemas de neurodesenvolvimento e neuroendócrino (GORE et al., 2015).

Um desregulador endócrino pode se ligar ao receptor hormonal, interagir com enzimas que sintetizam ou metabolizam hormônios, alterar a liberação hipotalâmica-hipofisária de hormônios e/ou alterar a transdução de sinais (KAVLOCK, 1996).

Além de alterar a sinalização do receptor nuclear, os DEQs são capazes de agir através de receptores não esteroides, coativadores de transcrição e vias enzimáticas envolvidas na biossíntese ou metabolismo de esteróides (SCHUG et al., 2011). Outros mecanismos de ação incluem efeitos diretos sobre genes (MORAL et al., 2008) e seu impacto epigenético (ANWAY e SKINNER, 2008). Esses efeitos se tornam preocupantes, uma vez que alterações na programação genética, durante as fases iniciais de desenvolvimento, podem ter efeitos ao longo da vida podendo também levar a herança transgeracional da doença através de modificações genômicas, tais como alterações no DNA e metilação e acetilação das histonas, principais proteínas que compõem o nucleossomo com importância na expressão dos genes (SCHUG, 2011).

Assim como os hormônios, os desreguladores endócrinos agem em doses muito baixas e de maneira tecido específica, podendo apresentar efeitos dose-resposta não tradicionalmente observadas como outros fármacos, devido às complicadas dinâmicas de ocupação e saturação de receptores (SCHUG et al., 2011; WELSHONS et al, 2003).

Desreguladores endócrinos estão associados a diversos processos fisiológicos que afetam a saúde reprodutiva (MCLACHLAN, 2001). O aumento da incidência de neoplasias relacionadas a hormônios, tais como adeno carcinoma mamário, neoplasias uterinas e testiculares, diminuição da contagem de espermatozoides, aumento da incidência de criptorquidia e hipospádia em crianças, desenvolvimento sexual anormal, redução da fertilidade masculina, aumento da incidência de ovários policísticos, distúrbios de fertilização

e gravidez anormal vem sendo relacionadas, pelo menos em parte, à exposição a baixos níveis de substâncias químicas no meio ambiente que interferem no sistema endócrino do organismo (TOPPARI et al., 1996).

As alterações reprodutivas estão associadas ao fato de que os desreguladores endócrinos alteram a homeostase dos hormônios esteroidais acarretando em prejuízos à diferenciação sexual, com conseqüente masculinização ou feminilização, e ao sistema reprodutivo, causando danos à fertilidade (KELCE, 1997) podendo até mesmo levar à esterilização e conseqüente redução da população (HARRISON et al., 1997).

Várias são as substâncias que possuem a capacidade de afetar o sistema endócrino, tais como, substâncias sintéticas (alquilfenóis, pesticidas, fungicidas, ftalatos, policlorados de bifenilas (PCD), bisfenol A e substâncias farmacêuticas como o dietilestilbestrol) e substâncias naturais onde se enquadram estrogênios naturais e fitoestrogênios (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009). A exposição humana a esses desreguladores endócrinos ocorre através de diversas vias, sendo respiratória, digestória e cutânea as vias mais comuns de introdução dessas substâncias (KAVLOCK, 1996).

A importância da pesquisa e as maiores preocupações em relação à exposição de humanos e animais aos desreguladores endócrinos recaem sobre as dúvidas que ainda se tem sobre essas substâncias como, por exemplo: se podem produzir efeitos tóxicos em baixas concentrações; se estão presentes em concentrações ambientalmente relevantes que possam ser uma ameaça à saúde de humanos e animais; e, principalmente, se existe uma concentração limiar abaixo da qual essas substâncias químicas podem ser consideradas como seguras (MORAES, 2008).

2.5 Fisiologia Reprodutiva do Macho

O sistema reprodutor masculino é formado pelos testículos, epidídimos e órgãos acessórios, como as glândulas bulbouretrais, glândulas vesiculares e a próstata (KEER et al., 2006).

O testículo é um órgão constituído de dois compartimentos: intersticial, contendo fibras do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos e células de Leydig (responsáveis pela produção testicular de andrógenos) e tubular, contendo túbulos seminíferos que são constituídos pela camada peritubular, epitélio seminífero e lúmen (RUSSELL et al., 1990). O

epitélio seminífero é composto por células de Sertoli e células germinativas. A função das células de Sertoli é fornecer suporte físico e nutricional para as células germinativas em desenvolvimento. Para que ocorra a produção de espermatozoides é necessário que a proliferação e maturação das células de Sertoli ocorram corretamente. Acredita-se que a fase proliferativa das células de Sertoli ocorre durante dois períodos de vida, na vida fetal e no período pré-puberal em todas as espécies (SHARPE et al., 2003).

2.5.1 Desenvolvimento pré-púbere

Em relação aos principais eventos que dão movimento ao início da puberdade masculina, há um consenso na literatura onde se tem o sistema nervoso central como origem do processo e os testículos desempenhando um papel crítico, onde alterações testiculares ocorrem durante os períodos de juvenil e peripuberais. Tais alterações incluem o aumento da sensibilidade dos testículos por estimulação das gonadotrofinas, desempenhando papel fundamental no comportamento, espermatogênese e manutenção dos órgãos sexuais acessórios (STOKER et al., 2000).

Assim, a puberdade é definida como o período de transição entre o estado juvenil e adulto no qual a maturação sexual se inicia através do eixo hipotálamico-hipofisário-gonadal, levando ao desenvolvimento de características sexuais secundárias e fertilidade (STOKER et al., 2000).

O desenvolvimento sexual no rato macho é classificado em quatro períodos, neonatal, pós-natal (1-7 dias), infantil (8-21 dias), juvenil, (22-35 dias) e peripuberal (36-55 ou 60 dias). No último período, ao redor dos 45 dias de idade os primeiros espermatozoides são observadas no lúmen dos túbulos seminíferos alcançando os canais deferentes aos 58 dias (CLERMONT e PERCY, 1957). A separação do prepúcio do pênis da glândula, separação prepucial (PPS), é um marcador de início da puberdade, o que normalmente ocorre entre 40 e 50 dias de idade, com uma média de 43 dias (KORENBROT et al., 1977).

No homem, o sistema reprodutivo fica inativo na infância e a sua reativação acontece na adolescência, quando há maturação sexual, caracterizada também pela ativação fisiológica do eixo hipotalâmico hipofisário gonadal (MARSHALL; TANNER, 1970)

O início da puberdade caracteriza-se pela ativação de neurônios hipotalâmicos, que secretam, de uma maneira pulsátil e específica, o hormônio liberador de gonadotrofinas

(GnRH). A secreção desse, através do sistema portal hipofisário atinge os gonadotrofos da adeno-hipófise e induzem à secreção também pulsátil dos hormônios luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH) (LOURENÇO e QUEIROZ, 2010).

No rato macho, os níveis hipotalâmicos de GnRH e o conteúdo hipofisário de LH e FSH continuam a se elevar com a idade, sendo que entre os dias 16 e 55 os hormônios do eixo hipotalâmico hipofisário e seus receptores estão sendo expressos de maneira crescente e alguns já em níveis definitivos (STOKER et al., 2000).

2.5.2 *Espermatogênese*

A espermatogênese ocorre nos túbulos seminíferos durante a vida adulta como resultado da estimulação pelos hormônios gonadotróficos da glândula hipófise anterior, começando na puberdade e continuando durante toda a vida, mas reduzindo-se na velhice (O'DONNELL et al., 2006). Portanto, não é um processo aleatório, mas sim regulado por secreções parácrinas de células adjacentes ao epitélio seminífero e pelo complexo eixo hipotálamo-hipófise-testículo (TAKASHIBA, 2011).

Durante a espermatogênese, ocorre um processo de diferenciação celular, onde uma espermatogônia ($2n$) migra entre as células de Sertoli em direção ao lúmen central dos túbulos seminíferos e é gradativamente diferenciada numa célula haplóide altamente especializada, o espermatozoide (FRANÇA; RUSSELL, 1998). Esta diferenciação envolve três classes de células germinativas, as espermatogônias, os espermatócitos e as espermátides, sendo esse um processo contínuo que pode ser dividido em três fases distintas: a mitótica, a meiótica e a espermiogênese (COUROT; HOCHEREAU; ORTAVANT, 1970).

Durante a fase mitótica (espermatogonial ou proliferativa), as espermatogônias ($2n$) passam por sucessivas e rápidas divisões originando outras duas células, os espermatócitos, onde um vai servir para a renovação da população de células tronco e a outra entra no processo espermatogênico. A fase meiótica (espermatocitogênica) envolve síntese de DNA nos espermatócitos em pré-leptóteno, síntese de RNA em espermatócitos em paquíteno e no final da meiose, quando vai ocorrer a divisão reducional, esses últimos geram as espermátides haplóides (PARVINEN et al., 1991). Na terceira fase da espermatogênese, as espermátides se diferenciam através de uma série de modificações morfológicas progressivas em espermatozoides, processo conhecido como espermiogênese. Estas modificações incluem

desenvolvimento do acrossoma, condensação e alongamento do núcleo e formação da cauda espermática (RUSSELL et al., 1990).

Uma vez liberado no lúmen dos túbulos seminíferos, os espermatozoides deixam o testículo como células imóveis e incapazes de fertilizar os oócitos, sendo que sua maturação será concluída apenas após passagem pelo epidídimo (SHUM et al., 2009).

O epidídimo desempenha um papel importante na maturação dos espermatozoides incluindo aquisição de motilidade e capacidade fertilizante progressiva. A estrutura é subdividida em regiões com funções específicas, sendo que a região de cabeça e corpo está envolvida com os processos de maturação espermática (aquisição da motilidade, capacidade de reconhecimento e fertilização do oócito), e a região da cauda está associada com a fagocitose de espermatozoides anormais e com o armazenamento espermático (CORNWALL, 2009).

Assim, a maturação espermática é essencial para o estabelecimento da fertilidade masculina (BRETON et al., 2016). O mecanismo responsável pelo trânsito dos espermatozoides através do lúmen do epidídimo é atribuído principalmente às contrações rítmicas musculares do revestimento epididimal que são influenciadas por fatores hormonais e neuronais. A regulação destes fatores garante um tempo de trânsito espermático adequado para a ocorrência da maturação espermática (ROBAIRE et al., 2006).

2.5.3 Regulação hormonal da espermatogênese

A espermatogênese é um processo altamente complexo controlado por mecanismos endócrinos, parácrinos e autócrinos, que fornecem um microambiente adequado para o seu desenvolvimento (LUCAS, 2014). Todo o processo é dependente do hormônio folículo-estimulante (FSH) e de andrógenos produzidos localmente em resposta ao hormônio luteinizante (LH). Este duplo controle é conhecido desde os anos 1930 e 1940, porém trabalhos recentes utilizando camundongos tem permitido determinar que partes da via espermatogênica são reguladas por cada hormônio (O'SHAUGHNESSY, 2014).

O desenvolvimento e maturação de células de Sertoli são fundamentais para o desenvolvimento da espermatogênese em todos os aspectos, desde a manutenção das células tronco espermatogônias até o processo final de espermiogênese (O'SHAUGHNESSY, 2014). Tanto o FSH como os andrógenos regulam a espermatogênese através de receptores nas

células de Sertoli, assim o número total de células germinativas no testículo adulto é dependente do número dessas células (ORTH et al., 1988).

Andrógenos interagem com o receptor de androgênio (*Ar*), sendo necessários para processos de manutenção da barreira hematotesticular bem como aderência e liberação de espermatozoides das células de Sertoli. O FSH liga-se e ativa o receptor de FSH (*Fshr*) sendo essa interação responsável por manter a concentração de testosterona em níveis altos o suficiente para iniciar e manter a espermatogênese. Já as concentrações plasmáticas de LH regulam a esteroidogênese testicular dentro das células de Leydig (BAI et al., 2010).

A testosterona alcança e estimula os órgãos efetores androgênicos por via sanguínea, onde é transformada em diidrotestosterona (DHT) pela enzima 5 α -redutase, ou é convertida em estradiol pela ação da enzima aromatase (LITTLETON-KEARNEY e HURN, 2004). O estradiol se liga aos receptores de estrógenos localizados no núcleo e no citoplasma (*Esr1* e *Esr2*) ou na membrana plasmática (*Gper*) que são vitais para a atividade das células de Sertoli (CHIMENTO et al., 2014).

Quando a testosterona atinge concentrações elevadas no sangue, um mecanismo de *feedback* negativo atua reduzindo ou inibindo a liberação de GnRH pelo hipotálamo, que por sua vez fará diminuir a produção, na hipófise, de LH e FSH. A redução dos níveis destes hormônios no sangue faz diminuir a secreção de testosterona. Assim, esse mecanismo opera sempre em função de níveis de testosterona desejados (O'DONNELL et al., 2006).

Nas células de Sertoli é produzida também a inibina, que participa no controle da produção hormonal do complexo hipotálamo-hipófise. Níveis elevados desse hormônio inibem o funcionamento do hipotálamo, diminuindo a produção de GnRH e, conseqüentemente, a produção dos hormônios hipofisários, FSH e LH, reduzindo os níveis de testosterona no sangue. Os níveis hormonais no sangue são mantidos relativamente constantes através desses mecanismos permitindo um funcionamento equilibrado do sistema reprodutor masculino (O'DONNELL et al., 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral e Hipótese Central

3.1.1 *Objetivo geral*

Avaliar o efeito de concentrações decrescentes de AgNPs sobre a espermatogênese de ratos tratados durante a fase pré-púbere, uma importante janela de sensibilidade a desreguladores endócrinos químicos.

3.1.2 *Hipótese central*

A exposição pré-púbere às AgNPs causa alterações na função testicular dos ratos tratados.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito de concentrações decrescentes de AgNPs:

- a) na expressão de genes relacionados ao controle da espermatogênese (*Ar*, *Esr1*, *Esr2*, *Gper* e *Cyp19a1*);
- b) na integridade e produção espermática, através dos ensaios de
 - i. Integridade do acrossomo;
 - ii. Integridade da membrana plasmática;
 - iii. Atividade mitocondrial;
 - iv. Morfologia espermática;
 - v. Produção espermática;
 - vi. Reservas espermáticas;
 - vii. Tempo de trânsito espermático;
- c) e no perfil sérico hormonal de testosterona e estradiol por metodologia de quimioluminescência.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados estão de acordo com o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal sendo submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com animais da Universidade Estadual do Centro-Oeste sob o parecer nº 013/2015.

4.1 Manejo dos animais

Foram utilizados como modelos experimentais 60 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos em idade pré-púbere (21 dias) obtidos do Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR). Os animais foram distribuídos em grupos de 4 animais, acomodados em caixas de polipropileno (43 x 43 x 20 cm) com uma camada de 5 cm de maravalha e mantidos com ração comercial (Nuvilab CR-1, Nuvital, PR, Brasil) e água *ad libitum*. A sala de manutenção foi mantida em fotoperíodo de 12:12 horas claro/escuro e com temperatura controlada (23 ± 1 °C).

4.2 Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi totalmente casualizado, onde o fator para formação dos grupos foi o peso corporal aos 23 dias de idade. Todos os animais receberam identificação individual, foram pesados para homogeneização dos lotes e distribuídos em cinco grupos de tratamento, cada um composto por 12 animais, sendo: grupo 1 (controle) – AgNP 0 µg/kg, grupo 2 – AgNP 15 µg/kg, grupo 3 – AgNP 7,5 µg/kg, grupo 4 – AgNP 3,75 µg/kg e grupo 5 – AgNP 1,875 µg/kg.

A administração das nanopartículas de sais de prata (AgNP, Sigma-Aldrich, catalog number 730815, 60nm de diâmetro, 0,02 mg/mL) ocorreu do 23º dia de idade dos ratos (PND23) aos 60º dias de idade (PND60), quando se realizou a colheita de tecidos. O período e protocolo experimental estão de acordo com o sugerido por Stoker (2000) à EDSTAC (*Endocrine Disrupting Screening and Testing Advisory Committee*) e compreende a avaliação de efeitos desreguladores endócrinos nos períodos pré-púbere e puberdade.

4.3 Determinação das doses de Nanopartículas de sais de prata (AgNPs)

As doses do experimento foram definidas a partir de estudos anteriores realizados no Laboratório de Fisiologia Humana e Toxicologia Reprodutiva do departamento de Farmácia da Universidade Estadual do Centro-Oeste. Assim, buscando avaliar o efeito de concentrações decrescentes de AgNPs sobre a espermatogênese, os animais foram expostos a partir da menor dose estudada anteriormente sendo 15 µg/kg, 7,5 µg/kg, 3,75 µg/kg e 1,875 µg/kg de AgNPs.

4.4 Exposição às Nanopartículas de sais de prata (AgNPs)

Os animais foram pesados durante toda a fase de exposição ao produto com o objetivo de determinação das quantidades orais diárias a serem fornecidas em função do peso. A administração se deu uma vez ao dia, sempre pela manhã, em dias alternados e com o volume de 0,25 mL/100g de peso corporal. A via de administração utilizada foi a via oral (gavagem) com auxílio de sonda rígida em aço inoxidável acoplada a uma seringa de volume total de 1ml.

A fim de garantir a aplicação da concentração necessária, as AgNPs foram diluídas em água destilada. Assim, conforme peso diário realizou-se a diluição sempre no momento do fornecimento aos animais para garantir que não houvesse interferência do diluidor na estabilidade do produto. O grupo controle recebeu apenas o diluidor como tratamento.

4.5 Colheita de tecidos

Aos 60 dias de idade (PND60), os animais receberam anestesia geral composta pela associação de cloridrato de quetamina (0,10 mL/100g) e cloridrato de xilazina (0,05 mL/100g) por via intraperitoneal. Na sequência, os animais foram submetidos à punção cardíaca para colheita de sangue e em seguida realizou-se a eutanásia por decapitação. Os tecidos foram colhidos para análises posteriores de acordo com os procedimentos descritos nos subitens a seguir.

4.5.1 *Sangue*

A colheita de sangue foi realizada visando às análises hormonais. O procedimento foi realizado através de punção cardíaca sendo as amostras depositadas em tubos a vácuo e imediatamente centrifugadas a 3500 rpm (Excelsa II 206 BL, São Paulo, SP, Brasil) por 15 minutos para a obtenção do soro sanguíneo. O soro foi separado, acondicionado em microtubos e congelado em ultrafreezer a -80 °C para subseqüentes dosagens de testosterona e estradiol.

4.5.2 *Colheita de tecidos para biologia molecular*

Imediatamente após eutanásia, os testículos foram excisados, congelados em nitrogênio líquido e mantido a -80 °C até as subseqüentes análises de expressão gênica por PCR em tempo real.

4.5.3 *Colheita de espermatozoides*

Para colheita dos espermatozoides, realizou-se uma incisão com lâmina de bisturi na cauda do epidídimo de onde se drenou rapidamente 20 µL de fluido seminal. A amostra foi suspensa em 200 µL de diluidor seminal Tris-frutose-ácido cítrico (328,8 mM Tris, 91,3 mM frutose, 115,8 mM ácido cítrico, suplementado com 1000 UI penicilina/ml, 1000 µg de estreptomicina/mL, 5% glicerol) a 37°C, como descrito (MATHIAS et al., 2015). Conforme metodologia descrita, as amostras foram imediatamente submetidas aos testes funcionais de integridade do acrossomo, integridade da membrana plasmática, atividade mitocondrial e morfologia espermática.

4.6 Avaliação funcional dos espermatozoides

4.6.1 Integridade do acrossomo

Avaliou-se a integridade do acrossomo através da Coloração Simples Fast-Green/Rosa-Bengala contendo 1% (w/v) rosa bengala (referencia 330000, Sigma-Aldrich Co, MO, USA), 1% (w/v) fast green FCF (referencia F7252, Sigma-Aldrich Co, MO, USA), e 40% de etanol em 200 mM de tampão de fosfato dissódico contendo 100 mM ácido cítrico pH 7,2, como previamente descrito (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991). Para realização do ensaio, 5 μ L de cada amostra de líquido seminal foram incubados a mesmo volume de solução Coloração Simples Fast-Green/Rosa-Bengala por 1 min em placa aquecida a 37°C. Após incubação, o volume total (10 μ L) foi depositado em lâmina de microscopia onde se realizou o esfregaço. Posteriormente à secagem das lâminas, a análise foi realizada em microscopia de luz (1.000X) onde 200 espermatozoides/lâmina foram contados e classificados de acordo com a intensidade de coloração de sua região acrossomal em: acrossomo íntegro (região acrossomal apresentando coloração levemente mais escura que a região pós-acrossomal) e acrossomo não íntegro (região acrossomal apresentando coloração levemente mais clara que a região pós-acrossomal), como visualizado na Figura 1.

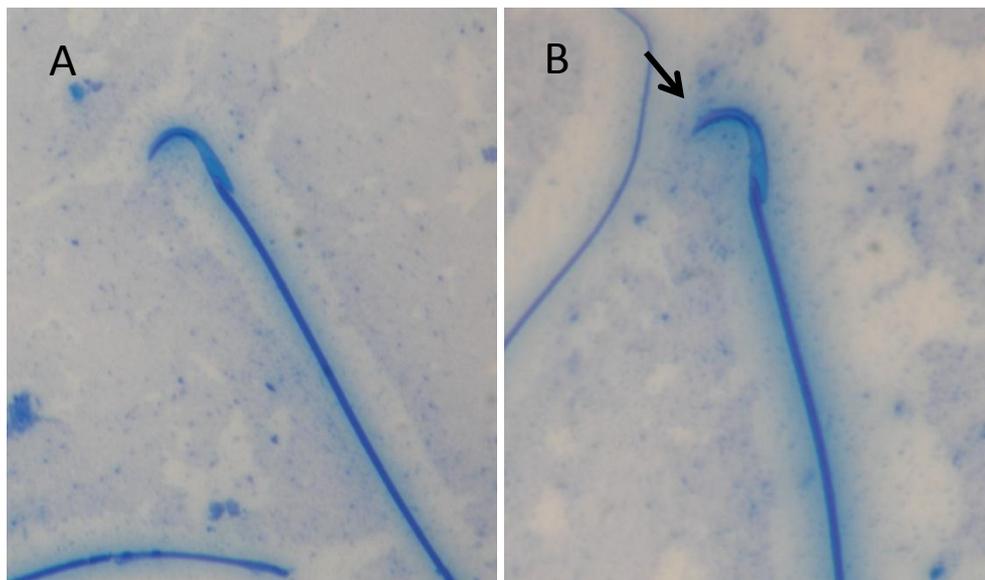


Figura 1 – Integridade acrossômica avaliada através da coloração Coloração Simples Fast-Green/Rosa-Bengala. Em A observa-se o acrossomo íntegro e em B acrossomo não-íntegro indicado pela seta. Fonte: ROMANO et al., 2016.

4.6.2 Integridade da membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática foi avaliada pela técnica de coloração de Eosina-Nigrosina, descrita por Barth e Oko (1989). O princípio da técnica baseia-se no fato de que por alterações na permeabilidade das membranas dos espermatozoides, a eosina consegue penetrar nas células corando-as de rosa. Já nos casos onde as membranas estejam íntegras, estas não permitem a entrada do corante, portanto, contrastando com o plano de fundo tomado pela coloração escura da nigrosina, as células aparecem brancas. A solução de coloração foi preparada com 1% de eosina Y (referencia E4009, Sigma-Aldrich Co, MO, USA) e 10% de nigrosina (referencia 198285, Sigma-Aldrich Co, MO, USA) em água ultrapura. Para a realização do ensaio, 5 μ L de cada amostra de líquido seminal foram incubados a mesmo volume de solução de coloração sendo o volume total (10 μ L) depositado em lâmina de microscopia para realização de esfregaço. Após a secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram então analisadas em microscópio óptico em imersão (1000x), contando-se 200 células que foram classificados em espermatozoides com membrana íntegra (não coradas) e não-íntegra (coradas), como visualizado na Figura 2.

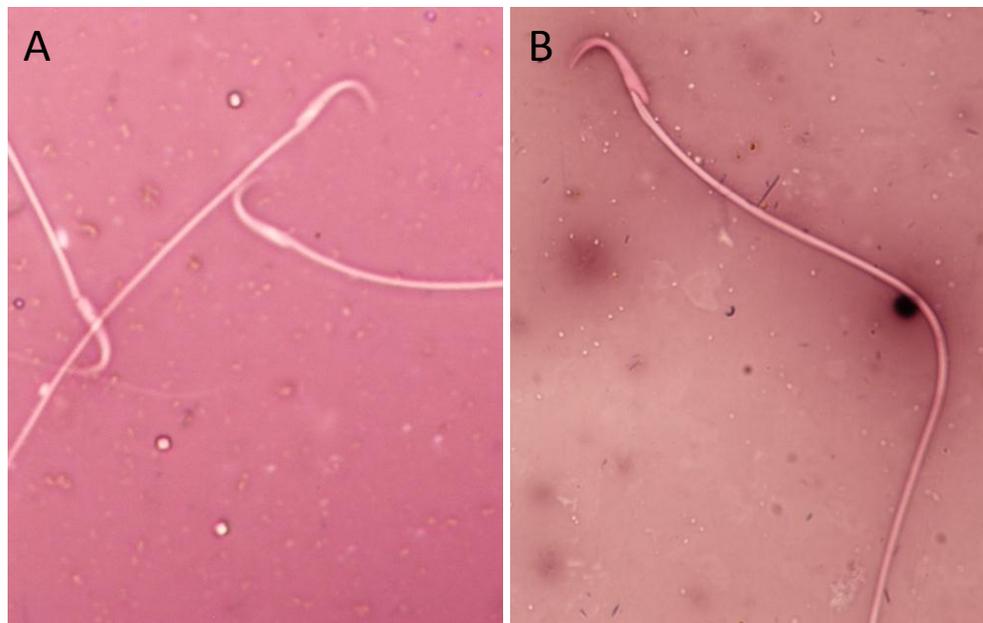


Figura 2 – Integridade de membrana plasmática avaliada pelo método de eosina-nigrosina. Membrana plasmática íntegra (A) não permite a entrada do corante e contrastando com o plano de fundo tomado pela coloração escura da nigrosina, as células aparecem brancas. Na membrana plasmática não íntegra (B) a eosina consegue penetrar nas células corando-as de rosa. Fonte: ROMANO et al., 2016.

4.6.3 Atividade mitocondrial

A atividade mitocondrial foi avaliada pela medição da atividade da enzima citocromo C oxidase na peça intermediária do espermatozoide, como previamente descrito por Hrudka (1987). Segundo o autor, a enzima citocromo C-Oxidase (CCO) tem um papel fundamental no processo de respiração celular e metabolismo energético das células, sendo pré-requisito para a função osmótica e sintética, motilidade e manutenção da estrutura celular. A técnica é baseada na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pelo Complexo Citocromo C, incluindo 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 forma, é possível descrever o declínio espontâneo da CCO ocasionado por tratamentos físicos e/ou químicos aos que os espermatozoides são submetidos. Para realização da técnica, o DAB (3,3'-Diaminobenzidine, referencia D8001, Sigma-Aldrich Co, MO, USA) foi diluído em PBS (2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 8 mM NaHPO₄, 1,4 mM KPO₄, pH 7,4) para a concentração final de 1 mg/ml e armazenado a -20 C até o uso. Dez microlitros de cada amostra foram incubados com 300 µL de solução de DAB pré-aquecida a 37°C por 1 h na ausência de luz. Dez microlitros de cada amostra foram depositados em lâmina de microscopia onde se realizou esfregaço seguido de secagem a 37°C também na ausência de luz. As lâminas foram incubadas por 10 min com uma solução fixativa contendo 10% de formaldeído (F8775, Sigma-Aldrich Co, MO, USA) em PBS e secas a 37°C protegidas da luz. Após a secagem, as lâminas foram analisadas em microscopia de contraste de fase (400X) onde 200 espermatozoides de cada amostra foram classificados com base no grau de coloração da peça intermediária. As amostras foram classificadas em DAB I (completamente corada), DAB II (>50%), DAB III (<50%) e DAB IV (não corada), assim o grau de coloração da peça intermediária indica o nível de atividade mitocondrial (Figura 3), como se segue:

- DAB I: células espermáticas com peça intermediária totalmente corada indicando alta atividade mitocondrial.
- DAB II: células espermáticas com mais da metade dos segmentos corados (ativos) indicando atividade mitocondrial média a alta.

- DAB III: células espermáticas com menos da metade dos segmentos corados (ativos) indicando alto comprometimento da atividade mitocondrial.
- DAB IV: células espermáticas com peça intermediária totalmente descorada indicando ausência de atividade mitocondrial.

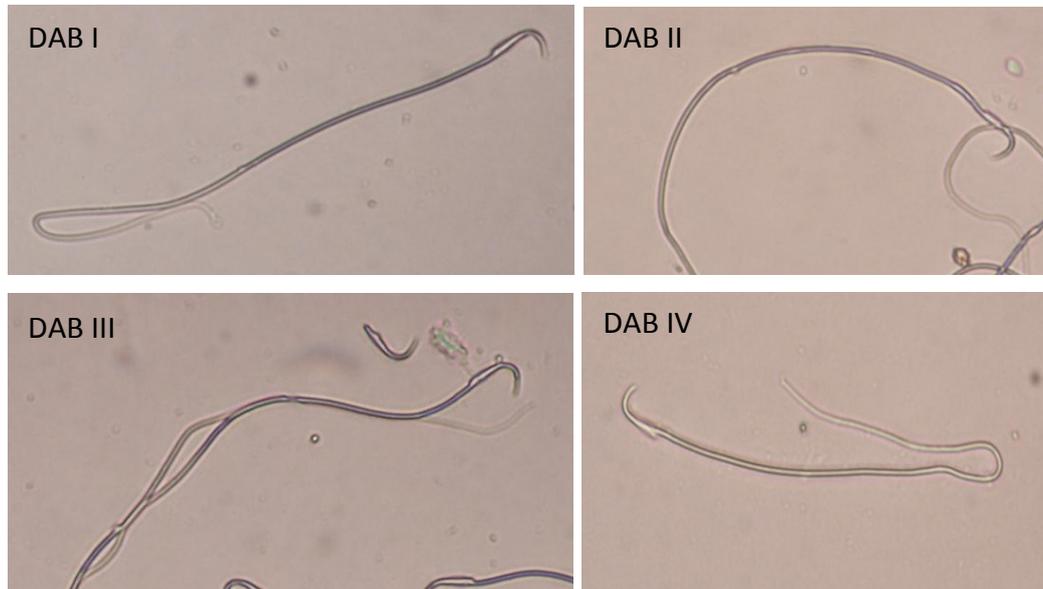


Figura 3 – Atividade mitocondrial avaliada através da medição da atividade da enzima citocromo C oxidase na peça intermediária do espermatozoide utilizando 3,3' – diaminobenzidina (DAB). O espermatozoide é classificado com base no grau de coloração da peça intermédia como DAB I (completamente coradas), DAB II (> 50%), DAB III (< 50%) e DAB IV (completamente descorada).
Fonte: ROMANO et al., 2016.

4.7 Avaliação de anormalidades morfológicas nos espermatozoides

Para verificação de anormalidades morfológicas nos espermatozoides, as amostras foram diluídas em fator de 10 em uma solução de formol salina tamponada (34,72 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 18,68 mM KH_2PO_4 , 92,4 mM NaCl , 12,5% (v/v) formaldehyde) e avaliadas em preparação úmida em microscopia de contraste de fase (400X). Foram contadas 200 células por lâmina as quais foram classificadas em espermatozoides normais e anormais, segundo Blom (1973), citado por Silva, Dode e Unanian (1993), de acordo com a presença das seguintes características: cauda enrolada, cauda dobrada, cauda fortemente enrolada, cauda fortemente dobrada, cabeça solta, defeitos em peça intermediária, gota protoplasmática proximal e gota protoplasmática distal.

4.8 Produção espermática total, produção espermática diária por testículo, reserva espermática e tempo de trânsito no epidídimo

A produção espermática foi determinada como previamente descrita (Robb et al. 1978; Romano et al. 2012). Os testículos e epidídimos (subdividido em cabeça, corpo e cauda) coletados e congelados anteriormente, foram inicialmente pesados em uma balança de precisão analítica. Em seguida, a túnica albugínea foi removida do testículo e o parênquima homogeneizado em 5 ml de solução salina-Triton 0.5% seguida de sonicação por 30 s. As amostras foram então diluídas 10 vezes em solução salina e as espermátides resistentes à homogeneização contadas com o auxílio de um hemocitômetro - Câmara de Neubauer.

A contagem do total das células determinou o número de espermatozoides por testículo, e gerou um dado de concentração de espermatozoides por ml. A concentração de espermatozoides por ml foi dividida pelo peso dos testículos de cada animal, resultando então no número de espermatozoides por grama de testículo. Para a determinação da produção espermática diária (PED), dividiu-se a concentração espermática/mL de cada animal por 6,1 (AMANN et al.; 1976), que corresponde ao tempo para que as espermátides se encontrem nos estágios 17-19, e que representam 48% de um ciclo total do epitélio seminífero com duração de 12,75 dias ($12,75 \text{ dias} \times 48\% = 6,1$).

Para a determinação da reserva espermática e do tempo médio de trânsito espermático, os segmentos do epidídimo foram separados em cabeça, corpo e cauda e processados separadamente. Os segmentos foram pesados em uma balança de precisão analítica, seccionados em pequenos fragmentos com lâmina de bisturi, homogeneizados em 5 mL de NaCl 0,9% contendo Triton X 100 0,5% seguidos de sonicação por 30 segundos. Após diluição de 10 vezes, cada amostra foi transferida para câmaras de Neubauer para a contagem de espermatozoides em cada segmento, determinando-se assim a reserva espermática. O tempo médio de trânsito espermático nos segmentos do epidídimo foi calculado dividindo-se o número de espermatozoides de cada segmento pela PED do testículo correspondente (ROBB; AMMAN; KILLIAN, 1978).

4.9 Identificação das alterações de expressão gênica pela quantificação do mRNA (RT-qPCR)

A metodologia para análise da expressão do mRNA de genes que participam da regulação da espermatogênese envolveu as etapas de: extração do RNA total, verificação de concentração e integridade do RNA extraído, reação de transcrição reversa para obtenção de cDNA, construção e validação dos primers específicos e quantificação dos transcritos por PCR em tempo real. As metodologias estão apresentadas nos subitens a seguir:

4.9.1 Homogeneização e extração de RNA total do testículo

Os testículos coletados e congelados anteriormente foram pulverizados individualmente com auxílio de gral e pistilo de porcelana utilizando-se para isso nitrogênio líquido. O material pulverizado foi transferido para microtubos de onde se preparou alíquotas com 50 mg de cada amostra sendo estas armazenadas em ultrafreezer à - 80 °C.

O RNA total dos testículos foi extraído pelo método de guanidina-fenol-clorofórmio (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987) através da utilização do Reagente Trizol[®] (Life Technologies, Carlsbad, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Para isso, 1 mL do reagente Trizol[®] foi adicionado ao microtubo contendo 50 mg do tecido pulverizado e, com auxílio de um agitador de tubos do tipo vortex, homogeneizou-se a amostra durante 1 minuto. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12,000 rcf x g durante 10 min a 4 °C, sendo em seguida o sobrenadante transferido para um novo microtubo e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos para completa dissociação de nucleoproteínas.

Transcorrido o tempo de incubação, foram adicionados 200µL de clorofórmio seguido de homogeneização em agitador de tubos por 15 segundos e incubação a temperatura ambiente por 5 minutos. Na sequência, a amostra foi centrifugada a 12.000 rcf x g por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, obteve-se a separação da solução em 3 fases: fase aquosa incolor onde esta presente o RNA, fase de interfase de coloração branca constituída por DNA e fase orgânica de coloração vermelha composta pelo fenol-clorofórmio.

A fase de interesse contendo o RNA foi transferida para um novo microtubo onde se adicionou 500 µL de isopropanol para a precipitação do RNA total. Os microtubos foram homogeneizados em agitador de tubos do tipo vortex por 10 segundos e em seguida incubados

à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, as amostras passaram por nova centrifugação a 12,000 rcf x g durante 10 minutos a 4 °C formando nesta etapa um sedimento de RNA na porção inferior do microtubo. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado por duas vezes através da adição de 500 µL de etanol a 75 % seguido de centrifugação a 12,000 rcf x g durante 5 minutos a 4 °C. Ao término das lavagens, o sobrenadante foi removido e o sedimento presente no fundo do microtubo passou por secagem na bancada por aproximadamente 5 minutos.

Finalizando a fase de extração, o sedimento de RNA de cada amostra foi ressuspensão em 20µL de água livre de RNase e estas armazenadas em ultrafreezer a -80 °C.

4.9.2 Verificação de concentração e integridade do RNA extraído

A concentração do RNA total foi estimada pela densidade óptica (DO) da solução, através de espectrofotometria (KASVI Modelo K23-002) mensurando-se a absorbância a 260 nm e 280 nm. A relação A260/A280 foi utilizada para a avaliação da pureza do RNA, a qual foi considerada adequada no intervalo 1,9 a 2,1.

A integridade do RNA total extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose desnaturante a 1,2 % em tampão TBE, através da visualização das bandas ribossômicas 18S e 28S coradas pelo brometo de etídeo. Após confirmação de integridade, as amostras foram estocadas em ultrafreezer a -80 °C e posteriormente submetidas à transcrição reversa.

4.9.3 Reação de transcrição reversa para obtenção de cDNA

Após a extração, 2,5 µg de RNA total foram submetidos à reação de transcrição reversa (RT) para a síntese de uma fita de DNA complementar à fita de mRNA (cDNA), com o uso do *kit* GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Seguindo o protocolo, foram adicionados em microtubo uma alíquota de volume correspondente a 2,5 µg de RNA total juntamente com 0,5 µL de oligonucleotídeos de desoxitimidina (oligo [dt]) e quantidades suficiente para 2,5 µL de água livre de RNase. As amostras foram incubadas em termociclador (AXYGEN MAXYGENE modelo term-1000, Foster City, Califórnia, USA) a temperatura de 70 °C por 5 minutos. Transcorrido período de incubação, as amostras foram imediatamente resfriadas a 4°C e

mantidas nessa temperatura durante 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados para cada amostra, uma solução contendo 2 µL de tampão da enzima (GoScript 5X); 3,25 µL de água livre de RNase; 0,5 µL de desoxirribonucleotídeos (ddNTPs); 0,25 µL de RNasin; 1 µL de cloreto de magnésio e 0,5 µL da enzima mM_{LV} GoScript Reverse Transcriptase. A reação com volume total de 10 µL foi incubada em termociclador inicialmente por 5 minutos a 25 °C, seguida por 1 hora a 42 °C. Para cada reação foram obtidos 10 µL de cDNA com concentração final estimada em 250 ng/µL. As amostras foram armazenadas a -20 °C até subsequentes análises de PCR em tempo real.

4.9.4 Quantificação dos transcritos por qPCR

4.9.4.1 Confeção dos oligonucleotídeos (*primers*)

As condições de amplificação (concentrações de cDNA e *primer*) foram padronizadas previamente no laboratório de Biologia Molecular, buscando-se a eficiência ideal entre 90 e 110 % (Livak and Schmittgen 2001). As sequências de referência dos transcritos dos genes *Ar*, *Esr1*, *Esr2*, *Gper*, *Cyp19a1* e *Rpl19* foram obtidos no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os oligonucleotídeos foram confeccionados com o auxílio do recurso *Pick Primer* disponível no GenBank, de forma a amplificar ao menos uma região de junção entre dois exons distintos, proporcionando maior especificidade e não amplificação de DNA genômico. A análise da especificidade das sequências senso e antisense obtidas aos mRNAs de estudo, foram obtidas pela comparação com outras sequências do banco de dados do NCBI através do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os pares de oligonucleotídeos foram verificados quanto a ligações complementares pelos recursos do OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>). O tamanho dos fragmentos gerados pela reação de PCR em tempo real foi confirmado em eletroforese em gel de agarose a 1,2 % em TBE, onde o padrão de migração da amostra foi comparado ao padrão de massa molar de 100 pb (100bp DNA Ladder, LifeTechnologies, Carlsbad, USA). No quadro 1 estão descritos a denominação dos genes, as sequências dos oligonucleotídeos e o número da sequência de referência utilizada no NCBI.

Quadro 1 – Oligonucleotídeos senso (F) e antisenso (R) de cada gene utilizados para o ensaio de PCR em tempo real e as respectivas sequências de referência.

Gene	Primer (5'-3')	Sequência de referência
<i>Ar</i> (Receptor de andrógeno)	F: GCCATGGGTTGGCGGTCCTT R: AGGTGCCTCATCCTCACGCACT	NM_012502.1
<i>Esr1</i> (Receptor de estradiol 1)	F: CCATATCCGGCACATGAGTA R: TGAAGACGATGAGCATCCAG	NM_012689.1
<i>Esr2</i> (Receptor de estradiol 2)	F: CTCACGTCAGGCACATCAGT R: TGTGAGCATTTCAGCATCTCC	NM_012754.1
<i>Gper</i> (Receptor de estrógenos acoplado a proteína G)	F: CCCTTGACAGGCCACATAGT R: CTCCGTGCTGTCTGGTATGA	NM_133573.1
<i>Cyp19a1</i> (Aromatase)	F: CGTCATGTTGCTTCTCATCG R: TACCGCAGGCTCTCGTTAAT	NM_017085.2
<i>Rpl19</i> (Proteína ribossomal L19)	F: CAATGAAACCAACGAAATCG R: TCAGGCCATCTTTGATCAGCT	NM_031103.1

4.9.4.2 Reação de quantificação dos transcritos por PCR em tempo real

A expressão dos genes relacionados a espermatogênese foi avaliada pelo método de PCR quantitativo em tempo real a partir da transcrição reversa (RT-qPCR). O objetivo da avaliação foi estimar a quantidade relativa dos níveis de RNA mensageiro (mRNA) dos genes estudados comparando os níveis de mRNA de todas as amostras com a expressão do gene constitutivo *Rpl19*. O ensaio foi realizado com uso do kit Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix-UDG (Life Technologies, Carlsbad, USA) para os genes *Ar*, *Esr1*, *Gper*, *Cyp19a1* e seu constitutivo *Rpl19*. Para avaliação de expressão do gene *Esr2* utilizou-se o kit Taqman® Gene Expression Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, USA). Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes. A amplificação foi realizada com os recursos do equipamento Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Singapore) nas seguintes condições de ciclo para o kit Platinum® SYBR® Green: 50°C (2 min), 95°C (2 min), e 40 ciclos de 95 °C (15 s) e 60°C (30 s). Para o kit Taqman® Gene Expression as condições foram: 50°C (2 min), 95°C (2 min), e 40 ciclos de 95 °C (15 s) e 60°C (1 min). Ao final da amplificação, obteve-se a curva de dissociação ou *Melting curve* para confirmar a especificidade da reação. Os valores médios de cycle threshold (Ct) foram automaticamente determinados pelo StepOne™ Software v2.3 (Applied

Biosystems) e a quantificação realizada pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, como previamente descrito (LIVAK e SCHMITTGEN 2001).

4.10 Dosagens Hormonais

Os ensaios para as dosagens séricas hormonais de testosterona e estradiol foram realizadas a partir do soro sanguíneo, previamente separado e mantido a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, através da metodologia de Elisa com o uso de kits comerciais Testosterone ELISA kit e 17β – Estradiol ELISA kit (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA). Originalmente descrito por Engvall e Perlmann (1971), o método utiliza um anticorpo policlonal que se liga de forma competitiva ao anticorpo da amostra. Após incubação simultânea em temperatura ambiente, os excessos de reagentes foram removidos por lavagem e o substrato foi adicionado. Depois de um período de incubação, a reação enzimática foi parada e a coloração amarela interpretada por leitor de microplacas a 405 nm. Uma vez que a intensidade da cor amarela é inversamente proporcional à concentração de 17β - estradiol ou testosterona tanto em padrões ou de amostras, através da densidade óptica. Os dados foram analisados pela equação dose resposta: log (inibidor) vs. Resposta – curva variável (4 parâmetros) com o auxílio do programa GraphPad Prism 6 (Graph Pad Software Inc.). A concentração dos hormônios que foi expressa em pg/ml.

4.11 Análise estatística

As variáveis estudadas foram primeiramente submetidas aos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade pelo teste de Bartlett. Os parâmetros foram avaliados pela ANOVA seguida pelo pós-teste de Dunnett. Todas as análises foram efetuadas com a utilização do software Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) e Graphpad Prism 6,0. Foram consideradas diferenças estatísticas quando o valor de p foi inferior a 0,05.

5 RESULTADOS

As possíveis alterações reprodutivas causadas nos animais pela administração diária de AgNPs foram analisadas através de parâmetros que auxiliam na análise da capacidade reprodutiva. Para isso realizou-se a avaliação da expressão de genes relacionados ao controle da espermatogênese; avaliação de produção espermática total e diária por testículo, reserva espermática e tempo de trânsito no epidídimo; avaliação da função espermática através da verificação de integridade de acrossomo, membrana plasmática e atividade mitocondrial; verificação de anormalidades morfológicas nos espermatozoides e dosagem do perfil sérico dos hormônios sexuais testosterona e estradiol. Os subitens a seguir apresentam esses resultados analisados.

5.1 A exposição pré – púbere às AgNPs altera a expressão dos genes relacionados a espermatogênese e as concentrações séricas de testosterona e estradiol

5.1.1 Testosterona e Ar

O nível de testosterona sérica (ng/mL) elevou no grupo tratado com a menor dose ($p < 0,05$) (Figura 4A) sendo a expressão de *Ar* também reduzida no mesmo grupo ($p < 0,003$) (Figura 4B), e no grupo exposto a dose de 3,75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AgNP ($p < 0,05$) (Figura 4).

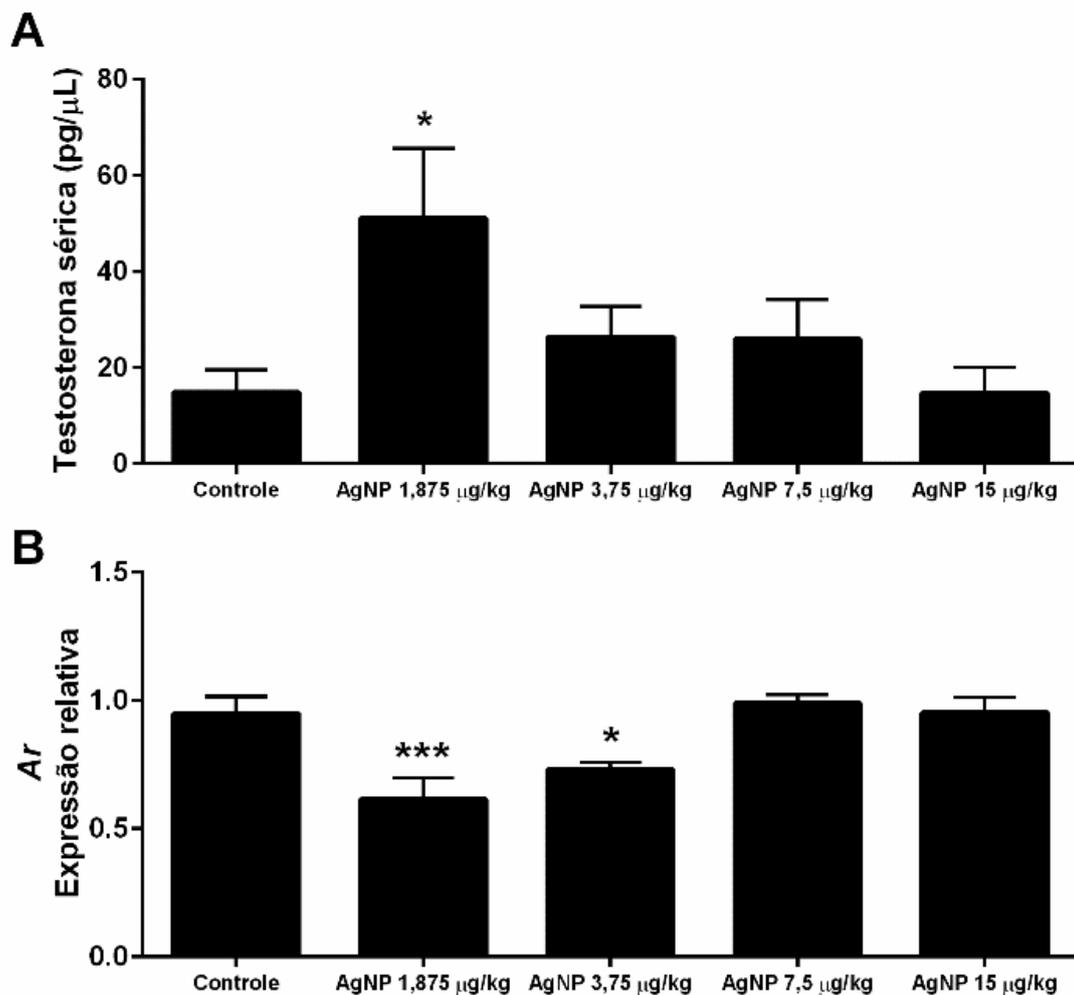


Figura 4 – Nível de testosterona sérico (A) e expressão testicular do transcrito de *Ar* (B) em ratos controle e expostos as AgNPs nas doses de 1,875 μ g/kg, 3,75 μ g/kg, 7,5 μ g/kg e 15 μ g/kg. O *Rpl19* foi empregado como gene constitutivo. A exposição pré-púbere à menor dose de AgNPs aumentou o nível de testosterona sérica e reduziu a expressão do transcrito *Ar* em relação ao controle para o mesmo grupo. Para a dose de 3,75 μ g/kg de AgNPs a expressão do transcrito *Ar* também foi reduzida. Os valores estão representados em média \pm E.P.M. (ANOVA e pós-teste de Dunnet), * $p < 0,05$ e *** $p < 0,003$ vs controle, $n = 12$ /grupo. *Ar*: receptor de andrógeno; *Rpl19*: proteína ribossomal L19; AgNPs: nanopartículas de prata. E.P.M.: erro padrão da média.

5.1.2 Estradiol e *Cyp19a1*

O nível de estradiol sérico (ng/mL) elevou no grupo tratado com a dose de 7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AgNP ($p < 0,01$) (Figura 5A), enquanto a expressão de *Cyp19a1* não alterou significativamente nos grupos tratados com AgNPs (Figura 5B).

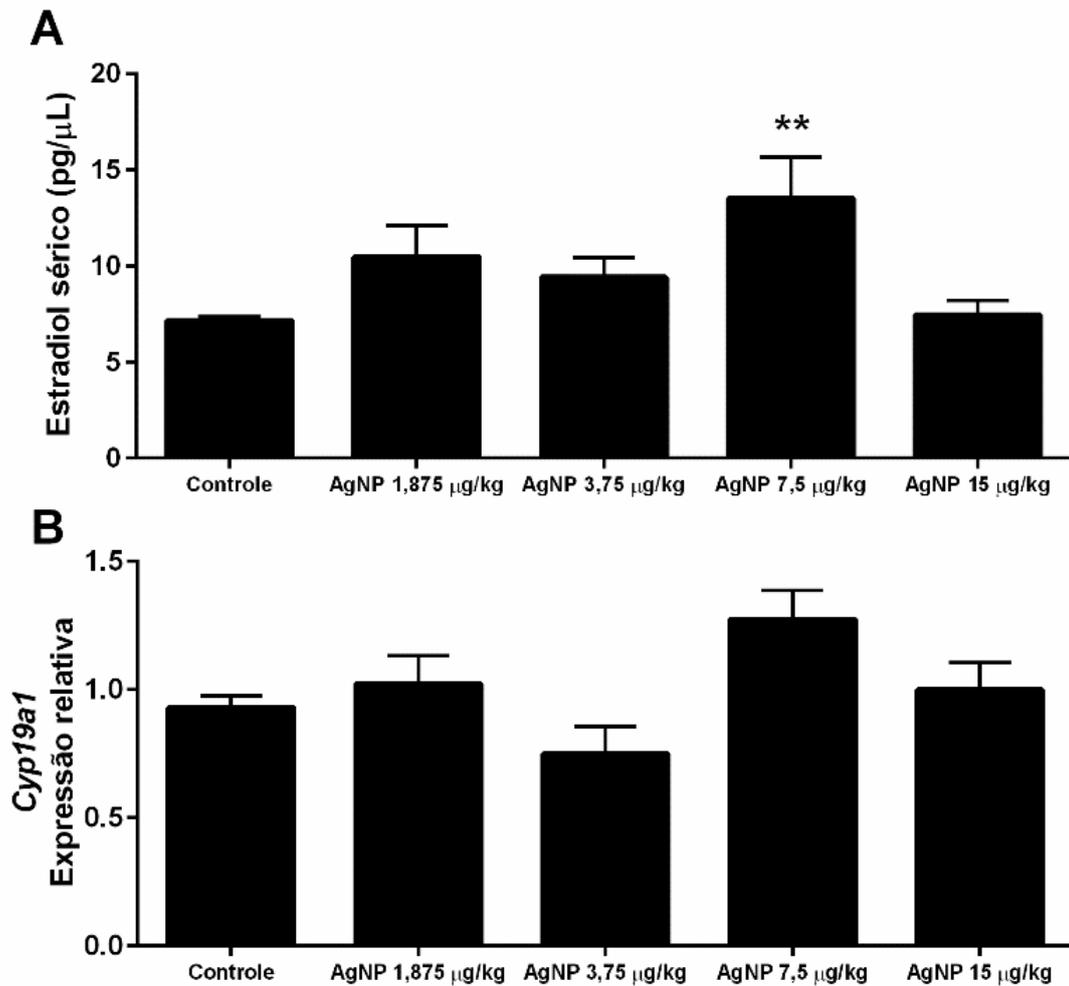


Figura 5 – Nível de estradiol sérico (A) e expressão testicular do transcrito de *Cyp19a1* (B) em ratos controle e expostos as AgNPs nas doses de 1,875 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 3,75 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$. O *Rpl19* foi empregado como gene constitutivo. A exposição pré-púbere à dose de 7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AgNPs aumentou o nível de estradiol sérico em relação ao controle. Em todos os grupos tratados com AgNPs não houve alteração significativa nos níveis de expressão do transcrito de *Cyp19a1*. Os valores estão representados em média \pm E.P.M. (ANOVA e pós-teste de Dunnet), ** $p < 0,01$ vs controle, $n = 12/\text{grupo}$. *Cyp19a1*: aromatase; *Rpl19*: proteína ribossomal L19; AgNPs: nanopartículas de prata. E.P.M.: erro padrão da média.

5.1.3 Receptores de estrógenos

A expressão do transcrito de *Gper* diminuiu no grupo tratado com a menor dose de AgNPs ($p < 0,05$) (Figura 6A). O mesmo aconteceu com a expressão do transcrito de *Esr1* para as doses de 1,875 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 3,75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AgNPs ($p < 0,01$) (Figura 6B). Por outro lado, a exposição pré-púbere não alterou significativamente os níveis de expressão do transcrito de *Esr2* em todos os grupos tratados (Figura 6C).

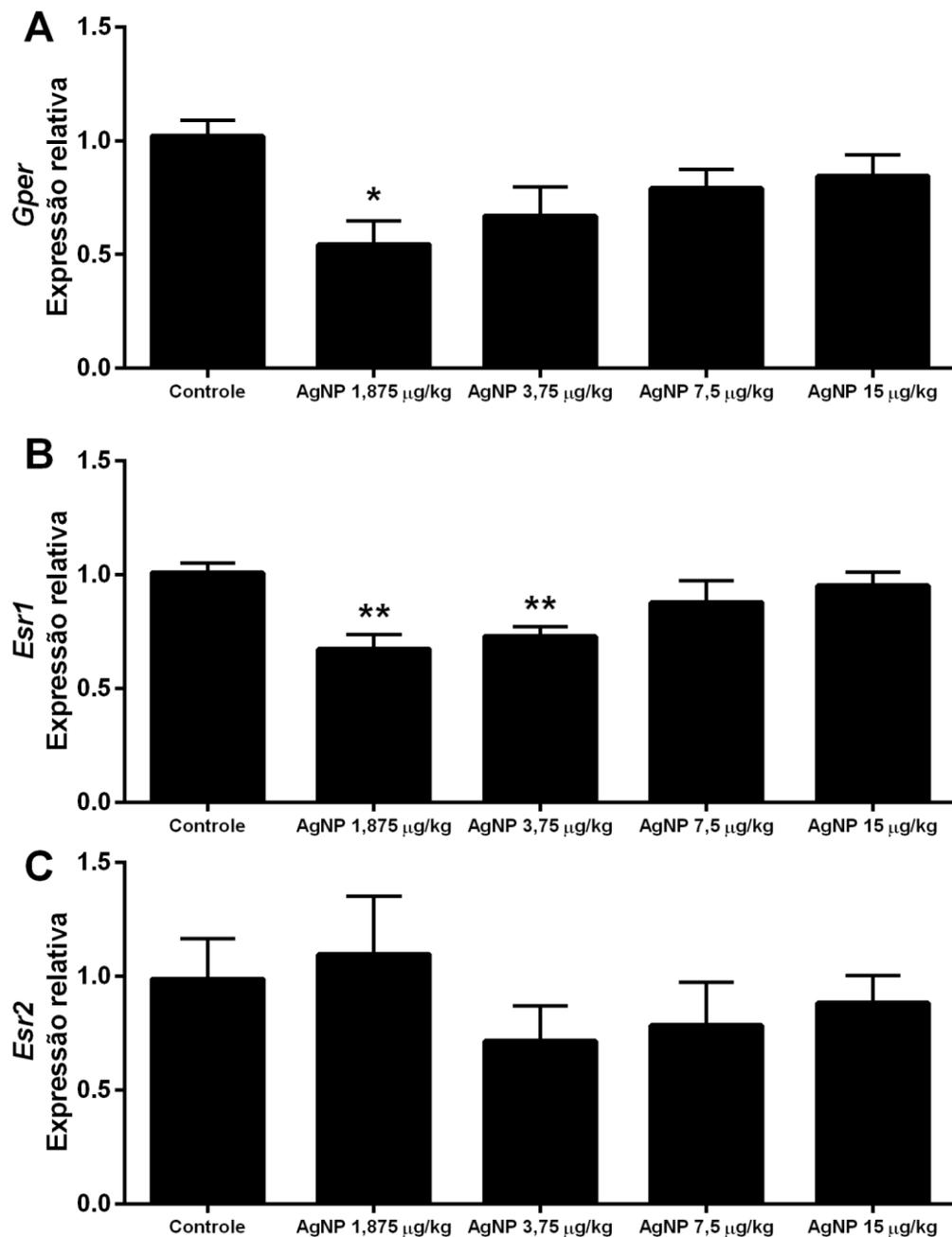


Figura 6 – Expressão testicular do transcrito de *Gper* (A); *Esr1* (B) e *Esr2* (C) em ratos controle e expostos as AgNPs nas doses de 1,875 µg/kg, 3,75 µg/kg, 7,5 µg/kg e 15 µg/kg. O *Rpl19* foi empregado como gene constitutivo. A exposição pré-púbere à menor dose de AgNPs reduziu a expressão do transcrito *Gper* em relação ao controle. O mesmo ocorreu para o transcrito *Esr1* para as doses de 1,875 µg/kg e 3,75 µg/kg de AgNPs. Em todos os grupos tratados com AgNPs não houveram alterações significativas nos níveis de expressão do transcrito de *Esr2*. Os valores estão representados em média ± E.P.M. (ANOVA e pós-teste de Dunnet), ** $p < 0,01$ vs controle, $n = 12$ /grupo. *Gper*: Receptor de estrógenos acoplado a proteína G; *Esr1*: receptor de estradiol 1; *Esr2*: receptor de estradiol 2; *Rpl19*: proteína ribossomal L19; AgNPs: nanopartículas de sais de prata. E.P.M.: erro padrão da média.

5.2 A exposição pré – púbere às AgNPs e a produção espermática

Não houve diferença significativa entre os grupos controle e tratados (Tabela 1).

Tabela 1 - Produção espermática dos animais dos grupos controle e expostos as AgNPs nas doses de 1,875 µg/kg, 3,75 µg/kg, 7,5 µg/kg e 15 µg/kg. Os valores estão representados em média ± E.P.M. (ANOVA e pós-teste de Dunnett), n= 12/grupo. AgNPs: nanopartículas de sais de prata. E.P.M.: erro padrão da média.

Produção espermática	Controle	1,875 µg/kg	3,75 µg/kg	7,5 µg/kg	15 µg/kg
Total					
x 10 ⁶ /testículo	97,05 ± 3,5	98,33 ± 8,5	92,73 ± 8,3	98,13 ± 10,0	99,38 ± 7,2
x 10 ⁶ /g testículo	68,99 ± 2,9	70,39 ± 6,0	64,82 ± 5,9	69,84 ± 7,5	65,57 ± 5,4
Diária					
x 10 ⁶ /testículo	15,91 ± 0,5	16,12 ± 1,4	15,20 ± 1,3	16,09 ± 1,6	16,29 ± 1,1
x 10 ⁶ /g testículo	11,31 ± 0,4	11,54 ± 0,9	10,63 ± 0,9	11,45 ± 1,2	10,75 ± 0,8

5.3 A exposição pré-púbere às AgNPs diminui a reserva espermática

Com relação à reserva espermática, observou-se menor concentração de espermatozoides no segmento de cabeça e corpo do epidídimo do grupo tratado com a dose 1,875 µg/kg de AgNPs ($p < 0,05$) (Figura 7A). Já no segmento de cauda do epidídimo não houve diferenças estatísticas entre os animais tratados em relação ao controle (Figura 7B). Os dados estão expressos na Figura 7.

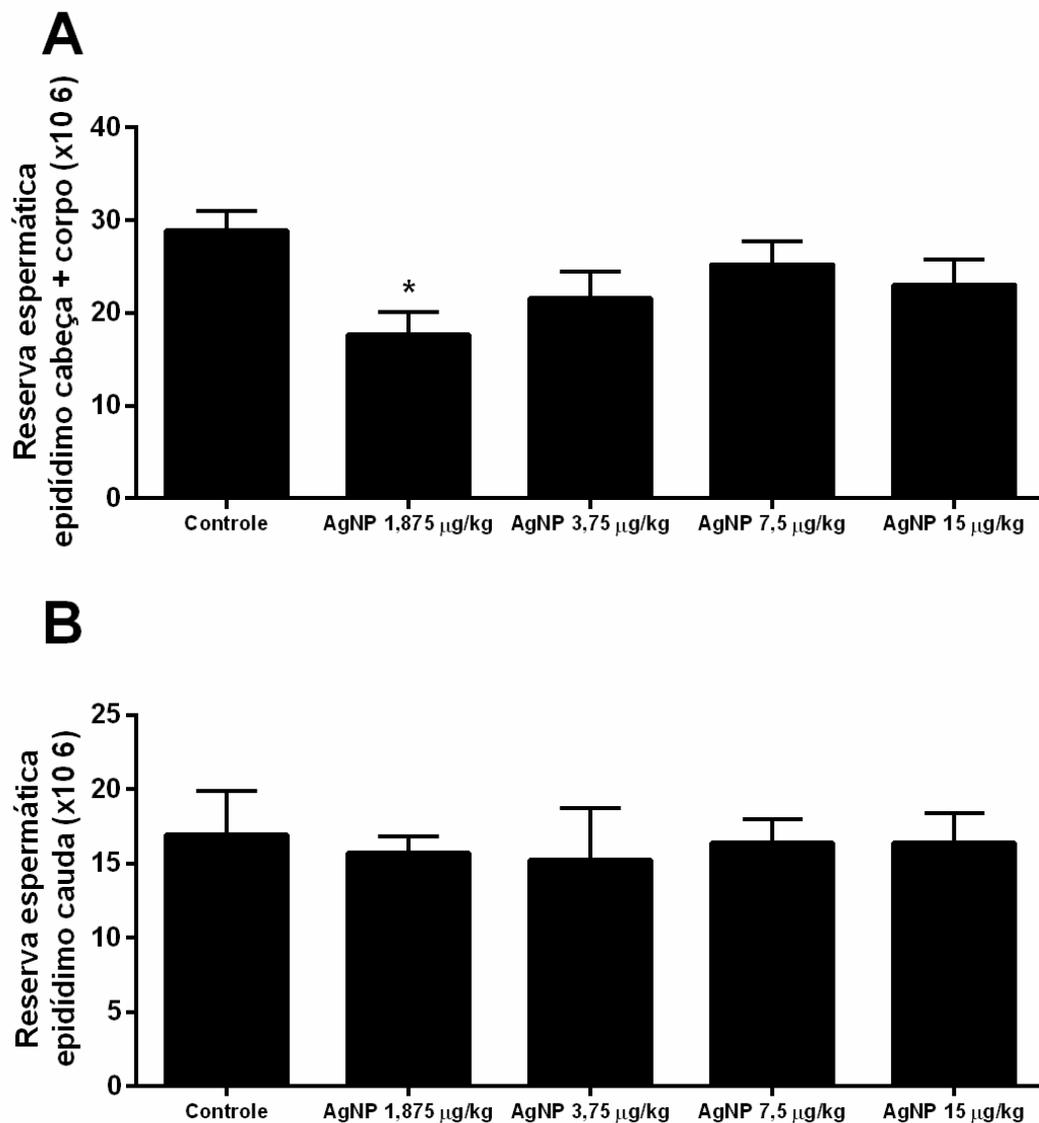


Figura 7 – Reserva espermática nos segmentos do epidídimo cabeça + corpo (A) e cauda (B) dos animais do grupo controle e expostos às AgNPs nas doses de 1,875 µg/kg, 3,75 µg/kg, 7,5 µg/kg e 15 µg/kg. A exposição pré-púbere à menor dose de AgNPs reduziu a concentração de espermatozoides no segmento de cabeça e corpo do epidídimo. A reserva espermática no segmento de cauda do epidídimo não foi alterada pelos tratamentos. Os valores estão representados em média ± E.P.M. (ANOVA e pós-teste de Dunnett), *p<0,05 vs controle, n = 12/grupo. AgNPs: nanopartículas de prata. E.P.M.: erro padrão da média.

5.4 A exposição pré – púbere às AgNPs diminui o tempo de trânsito espermático

O tempo de trânsito espermático através do epidídimo no segmento de cabeça e corpo foi reduzido no grupo tratado com a dose 1,875 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AgNPs ($p < 0,05$) (Figura 8A). No segmento de cauda do epidídimo não houve diferença estatística entre os animais tratados em relação ao controle (Figura 8B).

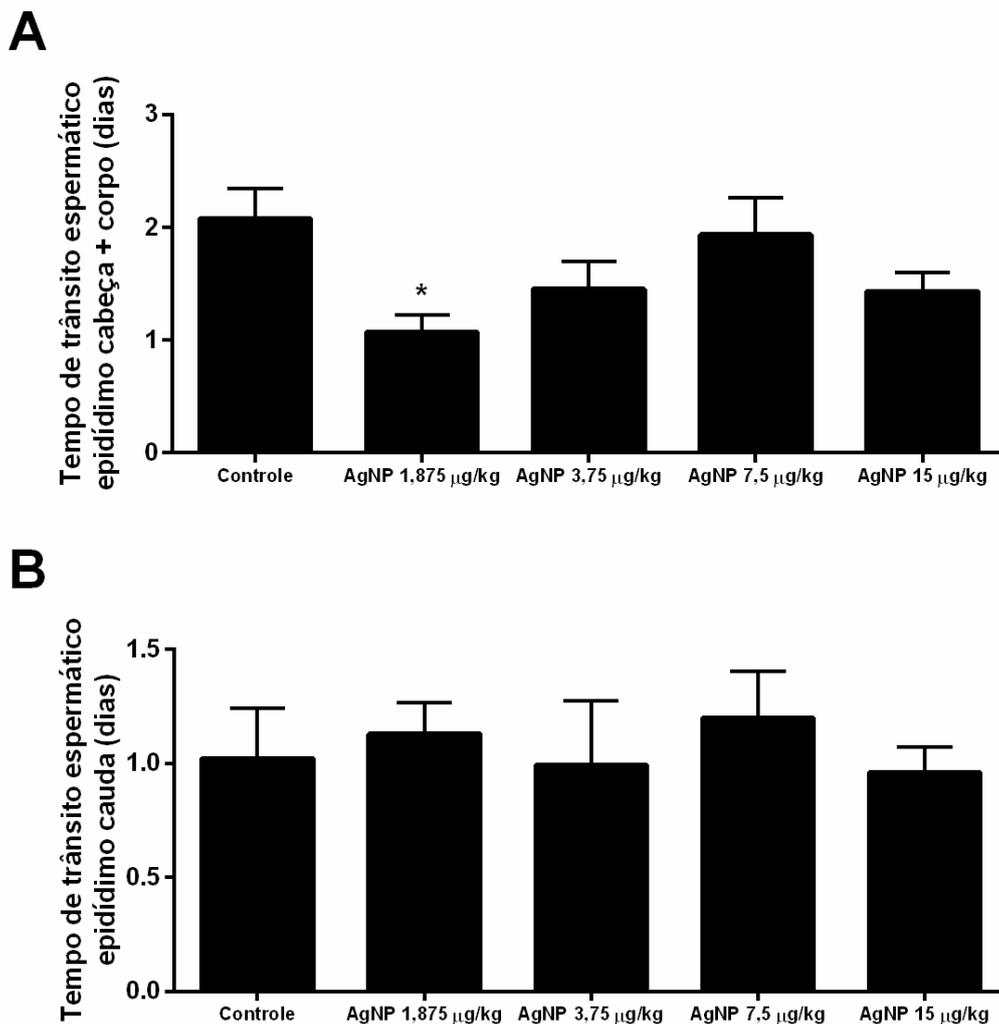


Figura 8 – Tempo de trânsito espermático nos segmentos do epidídimo cabeça + corpo (A) e cauda (B) dos animais do grupo controle e expostos às AgNPs nas doses de 1,875 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 3,75 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A exposição pré-púbere à menor dose de AgNPs reduziu o tempo de trânsito dos espermatozoides no segmento de cabeça e corpo do epidídimo. O tempo de trânsito no segmento de cauda do epidídimo não foi alterado pelos tratamentos. Os valores estão representados em média \pm E.P.M. (ANOVA e pós-teste de Dunnet), * $p < 0,05$ vs controle, $n = 12/\text{grupo}$. AgNPs: nanopartículas de prata. E.P.M.: erro padrão da média.

5.5 A exposição pré – púbere às AgNPs altera a funcionalidade dos espermatozoides

Houve comprometimento da integridade do acrossoma dos espermatozoides dos ratos expostos a dose de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AgNP ($p < 0,001$) (Figura 9A). A integridade da membrana plasmática (Figura 9B) e a morfologia espermática (Figura 9C) dos ratos tratados não foi alterada com a exposição às AgNPs. Conforme mostrado na Figura 9D, a atividade mitocondrial dos espermatozoides foi reduzida dos ratos expostos as AgNPs nas doses de 7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p < 0,001$).

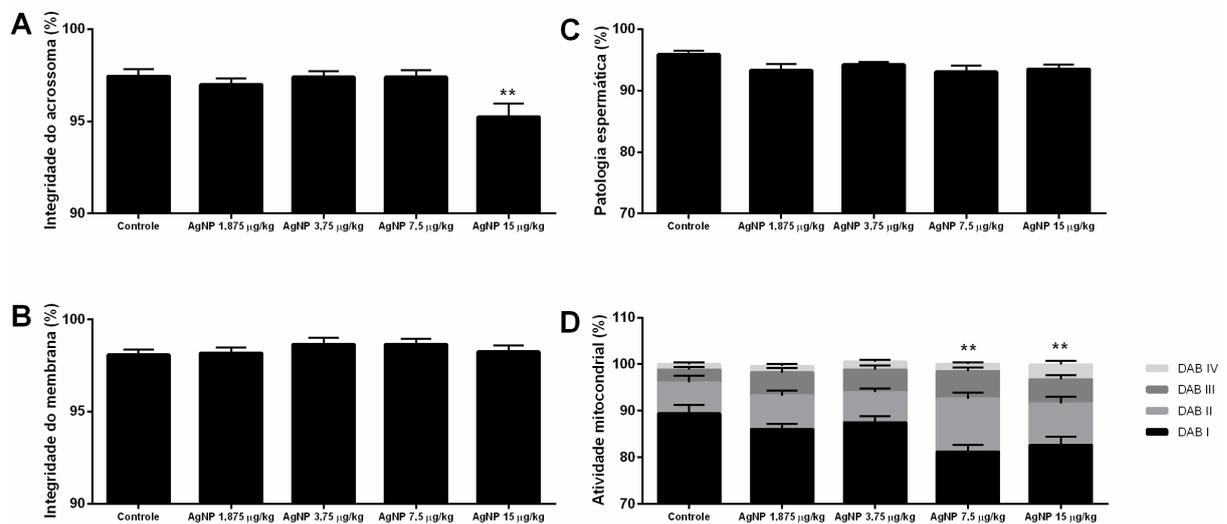


Figura 9 – Frequência da integridade do acrossoma (A), integridade da membrana plasmática (B), morfologia (C) e atividade mitocondrial (D) dos espermatozoides dos ratos controle e expostos às AgNPs nas doses de 1,875 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 3,75 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (A). A exposição pré-púbere à maior dose de AgNPs reduziu integridade do acrossoma dos espermatozoides deste grupo em relação ao controle. Integridade de membrana plasmática e patologia espermática não foram alterados pelo tratamento. Já a atividade mitocondrial foi reduzida dos ratos expostos as AgNPs nas doses de 7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Os valores estão representados em média \pm E.P.M. (ANOVA e pós-teste de Dunnet), * $p < 0,01$ vs controle, $n = 12/\text{grupo}$. AgNPs: nanopartículas de prata. E.P.M.: erro padrão da média.

5.6 Resumo dos resultados

O resumo dos resultados dos parâmetros analisados estão apresentados no quadro 2.

Quadro 2 - Compilação de resultados dos parâmetros analisados.

PARÂMETROS ANALISADOS	15 µg AgNP/kg	7,5 µg AgNP/kg	3,75 µg AgNP/kg	1,875 µg AgNP/kg
EXPRESSÃO GÊNICA				
<i>Ar</i>	↔	↔	↓	↓
<i>Esr1</i>	↔	↔	↓	↓
<i>Esr2</i>	↔	↔	↔	↔
<i>Gper</i>	↔	↔	↔	↓
<i>Cyp19a1</i>	↔	↔	↔	↔
INTEGRIDADE ESPERMÁTICA				
Integridade do acrossomo	↓	↔	↔	↔
Integridade da membrana plasmática	↔	↔	↔	↔
Atividade mitocondrial	↓	↓	↔	↔
Morfologia espermática	↔	↔	↔	↔
PRODUÇÃO E RESERVA ESPERMÁTICA				
Produção espermática	↔	↔	↔	↔
Reserva - Cabeça + corpo	↔	↔	↔	↓
Reserva – Cauda	↔	↔	↔	↔
TEMPO DE TRÂNSITO ESPERMÁTICO				
Cabeça + corpo	↔	↔	↔	↓
Cauda	↔	↔	↔	↔
NÍVEIS SÉRICOS HORMONAIS				
Testosterona	↔	↔	↔	↑
Estradiol	↔	↑	↔	↔

AgNPs: nanopartículas de prata; *Ar*: receptor de andrógeno; *Cyp19a1*: aromatase; *Gper*: Receptor de estrógenos acoplado a proteína G; *Esr1*: receptor de estradiol 1; *Esr2*: receptor de estradiol 2; ↑: aumentou; ↓: diminuiu; ↔ : não houve alteração.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo avaliou-se o efeito da possível desregulação endócrina ocasionada pela administração de baixas e decrescentes doses de AgNPs em ratos Wistar pré-púberes sobre a eficiência funcional de células espermáticas e consequente capacidade de fertilização em decorrência de alterações causadas durante a espermatogênese.

A fisiologia reprodutiva envolve processos biológicos complexos que podem ser sensíveis a contaminantes químicos ambientais, podendo o aumento da incidência de distúrbios no sistema reprodutor masculino estarem relacionados à exposição a esses contaminantes (LUCAS et al., 2009). Anteriormente, demonstramos os efeitos deletérios da AgNPs sobre a espermatogênese de ratos tratados com doses de 50, 30 e 15 mg / kg de AgNP (MATHIAS et al., 2015; SLEIMAN et al., 2013). No presente estudo, foram investigados os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos dose-resposta de quatro doses de AgNPs (15, 7,5, 3,75 ou 1,875 ug AgNP/kg) sobre a produção e funcionalidade dos espermatozoides bem como na expressão de genes relacionados com o processo de espermatogênese, utilizando-se para isso ratos Wistar machos pré-púberes como modelo experimental.

A exposição pré-púbere as AgNPs elevou o nível de testosterona sérica no grupo tratado com a menor dose. Em nossos estudos anteriores, as concentrações séricas de testosterona não foram afetadas nos grupos que receberam doses de 50 (SLEIMAN et al., 2013), 30 (MATHIAS et al., 2015; SLEIMAN et al., 2013) ou 15 µg/kg (MATHIAS et al., 2015) de AgNP. Baki et al. (2014) expuseram ratos Wistar pré-púberes a altas doses de AgNPs e observaram redução das concentrações de testosterona no soro em doses a partir de 50 mg/kg. Isso pode sugerir que a susceptibilidade de desregulação da testosterona pode variar de acordo com a concentração de AgNP, aumentando em doses baixas e intermediárias e diminuindo em doses elevadas.

A testosterona estimula a síntese do receptor de andrógeno e estabiliza o seu mRNA (MORA e MAHESH 1999; MORA et al. 1996). Contrariamente ao esperado, observou-se a redução na expressão de *Ar* no grupo com testosterona elevada (dose mais baixa) e também no grupo tratado com 3,75 µg AgNP/kg. O receptor de andrógenos desempenha papel central na espermatogênese, na manutenção da barreira hemato-testicular e na adesão e liberação dos espermatozoides a partir das células de Sertoli (DE GENDT et al., 2004; WANG et al., 2006).

O equilíbrio entre andrógenos e estrógenos é essencial para o desenvolvimento sexual normal e reprodução em mamíferos. Nos testículos, a manutenção deste equilíbrio está sob um ajuste do sistema endócrino e fatores parácrinos, mas também está relacionada com a atividade da aromatase, um complexo enzimático localizado no retículo endoplasmático que assegura a conversão de andrógenos em estrógenos (CARREAU et al., 2003). O estradiol testicular é produzido a partir do processo de aromatização da testosterona pela enzima aromatase citocromo P450A1 e codificado pelo gene *Cyp19a1* (O'DONNELL et al., 2006). No presente estudo, os níveis de estradiol sérico aumentaram no grupo exposto a 7,5 µg AgNP/kg, enquanto a expressão de *Cyp19a1* não foi alterada. Apesar de não ter ocorrido alterações significativas, nota-se que as flutuações dos níveis de estradiol entre os diferentes grupos de tratamento correspondem às flutuações dos transcritos de aromatase (*Cyp19a1*). Curiosamente, as concentrações séricas de estradiol e a expressão da aromatase não foram afetados no grupo tratado com 1,875 µg AgNP/kg, o que pode indicar um mecanismo de proteção evitando níveis de estradiol mais elevados e deletérios (HESS, 2003).

Os estrogênios testiculares interagem com receptores de estrógenos, que estão localizados no núcleo, no citoplasma (*Esr1* e *Esr2*) e na membrana plasmática (*Gper*) sendo vitais para a regulação de proteínas envolvidas na função dos testículos (CHIMENTO et al., 2014), pois camundongos *knockout* para receptores de estrógenos (ESR1 e ESR2) apresentam comprometimento da espermatogênese (EDDY et al., 1996). Estes receptores (*Esr1* e *Esr2*) estão presentes nos testículos de ratos imaturos e adultos, e também no núcleo de células de Sertoli em co-cultura obtidos a partir de ratos de 15 dias de idade, sendo o estradiol o indutor da proliferação destas células (LUCAS et al., 2008). É importante enfatizar que a expressão desses genes é altamente variável, com diferenças entre as espécies e até mesmo entre indivíduos dentro de uma espécie (LUCAS et al., 2014). O receptor de estrogênio α acoplado a proteína G (*Gper*) também tem sido detectado em regiões extranucleares das células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade e pode regular a expressão de genes envolvidos com apoptose celular (LUCAS et al., 2010). Os receptores de *Esr1* e *Esr2* estão envolvidos no controle da proliferação e diferenciação celular através de indutores e inibidores do ciclo celular. Além disso, o *Esr1* é necessário para a viabilidade de células germinativas e está envolvido na condensação da cromatina e na integridade do DNA de espermatozoides (CACCIOLA et al., 2013). Neste estudo, a expressão dos transcritos de *Gper* só foi diminuído no grupo tratado com 1,875 µg AgNP/kg, enquanto que os transcritos de *Esr1* foram

diminuídos em ambos os grupos 1,875 e μg 3,75 AgNP/kg. Os transcritos de *Esr2* não foram modulados pelos tratamentos.

Apesar das alterações nas concentrações de testosterona sérica, na expressão de receptores de andrógeno, nas concentrações de estradiol sérica e na expressão do receptor de estrógenos 1 e receptor de estrógenos 1 acoplado à proteína G no grupo tratado com a dose de 1,875 μg AgNP/kg, a produção de espermatozoides não foi afetada. Sleiman et al. (2013) e Mathias et al. (2015) avaliaram a produção de espermatozoides logo após o fim do tratamento (PND53) e também não observaram alterações. No entanto, trinta e sete dias após o final da exposição às AgNP, no PND90, as produções total e diária de espermatozoides foram reduzidas (SLEIMAN et al. 2013). Neste sentido, o comprometimento da espermatogênese nestes grupos expostos a doses mais baixas de AgNPs daquelas utilizadas por Sleiman et al. (2013) e Mathias et al. (2015), não pode ser desconsiderada.

Durante o trânsito através dos segmentos do epidídimo, os espermatozoides liberados do lúmen dos túbulos seminíferos passam por maturação, aquisição de motilidade progressiva e a capacidade de fertilizar óvulos (ROBAIRE et al., 2006). O transporte dos espermatozoides através do epidídimo se deve ao movimento do fluido secretado pelas células de Sertoli resultante da atividade contrátil da parede epididimária a qual é controlada pela ação de andrógenos e pelo sistema nervoso autônomo (RICKER, 1998). Neste estudo, a reserva e o tempo de trânsito espermático através da cabeça e do corpo do epidídimo foram reduzidos no grupo exposto a dose de 1,875 μg AgNP/kg. Como as AgNPs elevaram os níveis de testosterona na mesma dose, é possível que esta tenha causado alteração no padrão de contração do músculo liso do epidídimo, aumentando as suas contrações e diminuindo o tempo de trânsito espermático.

Finalmente, os espermatozoides coletados de cauda do epidídimo foram submetidos à análise funcional da integridade acrossômica, integridade da membrana plasmática, atividade mitocondrial e morfologia espermática. A morfologia espermática e a integridade da membrana plasmática não foram alteradas pelo tratamento. Já a integridade do acrossomo reduziu no grupo exposto a 15 μg AgNP/kg e a atividade mitocondrial reduziu nos grupos tratados com 7,5 e 15 μg AgNP/kg. Essas alterações no grupo tratado com 15 μg AgNP/kg foram previamente demonstradas pelo nosso grupo (MATHIAS et al. 2015), sendo incluído neste estudo para se ajustar a curva de dose-resposta como a dose mais elevada. O acrossomo é parte fundamental no processo de fertilização e a redução de sua integridade pode

comprometer a habilidade fecundante do espermatozoide (WOELDERS, 1991). A mitocôndria está localizada na peça intermediária do espermatozoide, produzindo a energia para movimentar o flagelo e impulsionar os espermatozoides através do trato genital feminino. Desta forma, a redução da sua função pode comprometer a motilidade espermática e, conseqüentemente, impedir a fertilização (AMARAL et al., 2013).

7 CONCLUSÃO

A exposição pré-púbere às AgNPs alterou a expressão testicular de genes relacionados a espermatogênese, diminuindo os transcritos de: a) *AR* na dose de 3,75 e 1,875µg AgNP/kg; b) *Gper* na dose de 1,875µg AgNP/kg; e c) *Esr1* 3,75 e 1,875µg AgNP/kg. Além disso, diminuiu: a) a reserva e o tempo de trânsito espermático nas porções de cabeça e corpo do epidídimo na dose de 1,875µg AgNP/kg; e b) a integridade do acrossomo e a atividade mitocondrial dos espermatozoides nas doses de 15 e 7,5µg AgNP/kg; e aumentou os níveis séricos de testosterona nas doses de 1,875µg AgNP/kg e de estradiol na dose de 7,5µg AgNP/kg.

Esses resultados demonstram que a exposição às AgNPs na pré-puberdade, fase altamente susceptível à ação dos desreguladores endócrinos químicos, compromete a função espermática no grupo recebendo a maior dose, enquanto a modulação dos genes relacionados ao controle da espermatogênese e as concentrações séricas de testosterona e estradiol somente ocorre no grupo de menor dose. Pode-se concluir que as AgNPs possuem efeitos dose-resposta paradoxal, agindo como um potencial desregulador endócrino químico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHAMED, M.; ALSALHI, M.S.; SIDDIQUI, M.K. Silver nanoparticle applications and human health, **Clinica Chimica Acta**, v. 23-24, p. 1841-1848, 2010.

ALMANSOUR, M.; JARRAR, Q.; BATTAH, A.; JARRAR, B. Morphometric Alterations Induced by the Toxicity of Variable Sizes of Silver Nanoparticles. **International Journal of Morphology**, v. 33, n. 2, p. 544-552, 2015.

ALMANSOUR, M.; SAJTI, L.; MELHIM, W.; JARRAR, B.M. Ultrastructural hepatocytic alterations induced by silver nanoparticle toxicity. **Ultrastructural Pathology**, v. 40, n. 2, p. 92-100, 2016.

AMANN, R.P., JOHNSON, L., THOMPSON, D.L., PICKETT, B.W. Daily Spermatozoal Production, Epididymal Spermatozoal Reserves and Transit Time of Spermatozoa Through the Epididymis of the Rhesus Monkey. **Biology of Reproduction**, v. 15, n.5, p. 586-592, 1976.

AMARAL, A.; LOURENÇO, B.; MARQUES, M.; SANTOS, J. R. Mitochondria functionality and sperm quality. **Reproduction**, v. 146, n. 5, p. 163-174, 2013.

ANWAY, M. D.; SKINNER, M. K. Epigenetic programming of the germ line: effects of endocrine disruptors on the development of transgenerational disease, **Reproductive Biomedicine Online**, v. 16, n. 1, p. 23–25, 2008.

ASARE, N.; INSTANES, C.; SANDBERG, W.J.; REFSNES, M.; SCHWARZE, P.; KRUSZEWSKI, M.; BRUNBORG, G. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. **Toxicology**, v. 291, n. 13, 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.

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.; MIRESMAILI, S. M.; POURENTEZARI, M.; AMRAII, E.; YOUSEFI, V.; SPENANI, H. R.; TALEBI, A. R.; ANVARI, M.; FAZILATI, M.; ASGHAR, A.; FALLAH, A.; MANGOLI, E. Effects of silver nano-particles on sperm parameters, number of Leydig cells and sex hormones in rats. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 12, n, 2, p. 139-144, 2014.

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

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.

BILA, D. M.; DEZOTTI, D. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Quimica Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

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.

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.

BRETON, S.; RUAN, Y. C.; PARK, Y. J.; KIM, B. Regulation of epithelial function, differentiation, and remodeling in the epididymis **Asian Journal of Andrology**, v. 18, p. 3-9, 2016.

BURY, N. R. SILVER. IN: MARET, W.; WEDD, A. (Ed.). **Binding, Transport and Storage of Metal Ions in Biological Cells**, 1 ed. Londres: Royal Society of Chemistry, 2014, cap. 19, p. 556-581.

CACCIOLA, G., CHIOCCARELLI, T., FASANO, S., PIERANTONI, R. AND COBELLIS, G. Estrogens and spermiogenesis: new insights from type 1 cannabinoid receptor knockout mice. **International Journal Endocrinology**, v. 2013, 2013.

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 chemistry**, 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.

CASTELLANO, J.J.; SHAFII, S.M.; KO, F.; DONATE, G.; WRIGHT, T.E.; MANNARI, R. J.; PAYNE, W. G.; SMITH, D. J.; ROBSON, M. C. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. **International Wound Journal**, v. 4, n.2, p. 114-122, 2007.

CASTELLINI, C.; RUGGERI, S.; MATTIOLI S.; BERNARDINI, G.; MACCHIONI, L.; MORETTI, E.; COLLODEL, G. Long-term effects of silver nanoparticles on reproductive activity of rabbit buck. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 60, n. 3, p. 143-150, 2014.

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 is a new generation of nanoparticle in biomedical applications. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 580-588, 2010.

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.

CHIMENTO, A., SIRIANNI, R., CASABURI, I., PEZZI, V. Role of estrogen receptors and G protein-coupled estrogen receptor in regulation of hypothalamus-pituitary-testis axis and spermatogenesis. **Frontiers in Endocrinology**, v.5, n. 1, p. 1-8, 2014.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, n, 1, p.156-159, 1987.

CLERMONT, Y.; PERCY, B. The stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the rat: practical definitions in PA-Schiff-Hematoxylin and hematoxylin-eosin stained sections. **Revue Canadienne de Biologie**, v.16, n. 4, p. 451-462, 1957.

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.

CONTRERAS, R.G.; FIGUEROA, L.A.; RUBALCAVA; C.M.; MARTÍNEZ, R.J.; GUAJARDO, S.C.; REYNA,P.A.S.; ZERON, H.M. Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice. **International Dental Journal**, v. 61, n. 6, p. 297-301, 2011.

CORNWALL, G, A. New insights into epididymal biology and function. **Human Reproduction Update**, v.15, n.2, p. 213–227, 2009.

COUROT, M.; HOCHEREAU, M. T. R.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: Johnson, A. D.; Gomes, W.; Vandemark, N. L.(eds.). **The Testis**. 3ed. New York: Academic Press, 1970, p. 339-432.

DE GENDT, K.; SWINNEN, J. V.; SAUNDERS, P. T.; SCHOONJANS, L.; DEWERCHIN, M.; DEVOS, A.; TAN, K.; ATANASSOVA, N.; CLAESSENS, F.; LÉCUREUIL, C.; HEYNS, W.; CARMELIET, P.; GUILLOU, F.; SHARPE, R.M.; VERHOEVEN, G. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. **Proceedings of the National Academy Sciences of the USA**. v. 101, n. 5, p. 1327-1332, 2004.

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

- DIAMANTI-KANDARAKIS, E., BOURGUIGNON, J.P., GIUDICE, L.C., HAUSER, R., PRINS, G.S., SOTO, A.M., ZOELLER, R.T., GORE, A.C. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 4, p. 293-342, 2009.
- 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.
- EDDY E.M., WASHBURN T.F., BUNCH D.O., GOULDING E.H., GLADEN B.C., LUBAHN D.B. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. **Endocrinology**, v. 137, n. 11, p. 4796–4805, 1996.
- EL BADAWY, A. M.; SILVA, R. G.; MORRIS, B.; SCHECKEL, K. G.; SUIDAN, M. T.; TOLAYMAT, T. M. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. **Environmental Science Technology**, v.45, n. 1, p. 283-287, 2011.
- 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.
- ENGVALL, E.; PERLMANN, P. (1971). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871-875, 1971.
- FENG, Q.L.; WU, J.; CHEN, G.Q.; CUI, F.Z.; KIM, T.N.; KIM, J. O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, n. 4, p. 662-668, 2000.
- 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.
- FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic mammals. In: Martínez-García, F.; Regadera, J. (Ed.). **Male Reproduction: A Multidisciplinary Overview**. 1ed. Madrid: Churchill Communications. p. 198-219, 1998.
- GORE, A.C.; CHAPPELL, V. A.; FENTON, S. E.; FLAWS, J. A.; NADAL, A.; PRINS, G.S.; TOPPARI, J.; ZOELLER, R.T. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals (Review). **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 6, p. 1-150, 2015.

HADRUP, N.; LOESCHNER, K.; MORTENSEN, A.; SHARMA, A. K.; QVORTRUP, K.; LARSEN, E. H.; LAM, H. R. The similar neurotoxic effects of nanoparticulate and ionic silver in vivo and in vitro. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 3, p. 416-423, 2012.

HADRUP, N.; LAM, H. R. Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver - a review. **Regulatory Toxicology Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 1-7, 2014.

HARRISON, P. T. C., HOLMES, P., HUMFREY, C. D. N. Reproductive Health in Humans and Wildlife: Are Adverse Trends Associated With Environmental Chemical Exposure? **The Science of the Total Environment**, v. 205, n. 1-2, p. 97-106, 1997.

HESS, R. A.; BUNICK, D.; BAHR, J. Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract — a review. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 178, n. 1-2, p. 29-38, 2003.

HOFFMANN, S. Silver sulfadiazine: an antibacterial agent for topical use in burns. **Scandinavian Journal Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 18, n. 1, p. 119-126, 1984.

HORIE, M.; KATO, H.; FUJITA, K.; ENDOH, S.; IWAHASHI, H. In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles. **Chemical Research Toxicology**, v. 25, n.3, p. 605-619, 2012.

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.

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.

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.

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.

JONES, S. A.; BOWLER, P.G.; WALKER, M.; PARSONS, D. Controlling wound bioburden with a novel silver-containing Hydrofiber dressing. **Wound Repair Regeneration**, v. 12, n. 3, p. 288-294, 2004.

KANDARAKIS, E. D.; BOURGUIGNON, J.P., GIUDICE. L.C., HAUSER, R., PRINS, G.S., SOTO, A.M., ZOELLER, R.T., GORE, A.C. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 4, p. 293-342, 2009.

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.

KEER, J. B.; LOVELAND, K. L.; O'BRYAN, M. K.; DE KRETSEER, D. M. Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. In Neill, J. D. Ed. **Knobil and Neill's Physiology of reproduction**. 3rd. ed. Amsterdam: Elsevier, p. 829-947, 2006.

KELCE, W. R.; WILSON, E. M. Environmental antiandrogens: developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications. **Journal of Molecular Medicine**, v. 75, n. 3, p. 198-207, 1997.

KHALILI FARD, J.; JAFARI, S.; MOHAMMAD A. E. A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity of Nanoparticles. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, n. 4, 447-454, 2015.

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, J. S.; KUK, E.; YU, K.N.; KIM, J.; PARK, S. J.; LEE, H. J.; KIM, S. H.; PARK, Y. K.; PARK, Y. H.; 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, 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.

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., WIENER, R. I. Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat, **Biology of Reproduction**, v.17, p.298-303, 1977.

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 I: its antibacterial properties and mechanism of action. **Journal of Wound Care**, v. 11, n.4, p. 111-125, 2002.

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

LANSDOWN, A. B. G. Critical observations on the neurotoxicity of silver. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 37, n. 3, p. 237-250, 2007.

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.

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, 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.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOK, C. N.; HO C.M.; CHEN, R.; HE, Q.Y.; YU, W. Y.; SUN, H.; TAM, P. K.; CHIU, J. F.; CHEN, C. M. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 4, p. 916-924, 2006.

LOURENÇO, B.; QUEIROZ, L.B. Crescimento e desenvolvimento puberal na adolescência. **Revista de Medicina (São Paulo)**, v. 89, n. 2, p. 70-75, 2010.

LUCAS, T. F.; SIU, E. R.; ESTEVES, C. A.; MONTEIRO, H.P.; OLIVEIRA, C. A.; PORTO, C.S.; LAZARI, M. F. 17beta-estradiol induces the translocation of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 to the cell membrane, MAPK3/1 phosphorylation and proliferation of cultured immature rat Sertoli cells. **Biology of Reproduction**, v.78, n. 1, p. 101-114, 2008.

LUCAS, B.; FIELDS, C.; HOFMANN, M. C. Signaling pathways in spermatogonial stem cells and their disruption by toxicants. **Birth defects research Part C, Embryo today: reviews**, v.87, n. 1, p. 35-42, 2009.

LUCAS, T. F.; ROYER, C.; SIU, E. R.; LAZARI, M. F.; PORTO, C. S. **Expression and signaling of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in rat sertoli cells.** *Biology of Reproduction*, v. 83, n. 2, p. 307-317, 2010.

LUCAS, F. G.; LAZARI, M. F. M.; PORTO, C. S. Differential role of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 on the regulation of proteins involved with proliferation and differentiation of Sertoli cells from 15-day-old rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 84-96, 2014.

MARSHALL, W. A.; TANNER, J. M. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. **Archives of Disease in Childhood**, v. 45, p. 13-23, 1970.

MATHIAS, F.T; ROMANO, M. A; ROMANO, R. M. Avaliação dos Efeitos Toxicológicos e Ambientais de Nanopartículas de Sais de Prata. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 2, p. 187-193, 2014.

MATHIAS, F. T.; ROMANO, R. M.; KIZYS, M. M. L.; KASAMATSU, T.; GIANNOCCO, G.; CHIAMOLERA, M. I.; DIAS-DA-SILVA, M. R.; ROMANO, M. A. Daily exposure to silver nanoparticles during prepubertal development decreases adult sperm and reproductive parameters. **Nanotoxicology**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2015.

MCLACHLAN, J. A. Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 3, p. 319-341, 2001.

MEDINA, C., SANTOS-MARTINEZ, M.J.; RADOMSKI A.; CORRIGAN O.I.; RADOMSKI M.W. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. **British Journal Pharmacology**, v. 150, p. 552–558, 2007.

MEHRBOD, P., MOTAMED, N., TABATABAIAN, M., SOLEIMANI ESTYAR, S., AMINI, E., SHAHIDI, M., KHEIRI, M. T. In Vitro Antiviral Effect of "Nanosilver" on Influenza Virus. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 17, n. 2, p. 88-93, 2009.

MIRKIN, C. A; TATON, T.A. Semiconductors meet biology, **Nature**, v. 405, n. 6787, p. 626-627, 2000.

MIRSATTARI, S. M.; HAMMOND, R.R.; SHARPE, M.D.; LEUNG, F.Y.; YOUNG, G.B. Myoclonic status epilepticus following repeated oral ingestion of colloidal silver. **Neurology**, v. 62, n. 8, p. 1408-1410, 2004.

MORA, G. R.; MAHESH, V. B. Autoregulation of the androgen receptor at the translational level: testosterone induces accumulation of androgen receptor mRNA in the rat ventral prostate polyribosomes. **Steroids**, v. 64, n. 9, p. 587-591, 1999.

MORA, G. R.; PRINS, G. S.; MAHESH, V. B. Autoregulation of androgen receptor protein and messenger RNA in rat ventral prostate is protein synthesis dependent. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 58, n. 5-6, p. 539-549, 1996.

MORAES, N.V; GRANDO, M.D.; VALERIO, D. A. R.; OLIVEIRA, D. P. Exposição ambiental a desreguladores endócrinos: alterações na homeostase dos hormônios esteroidais e tireoideanos. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 1, n.1, p. 1-8, 2008.

MORAL, R.; WANG, R.; RUSSO, I. H.; LAMARTINIERE, C. A.; PEREIRA, J.; RUSSO, J. Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature. **The Journal of Endocrinology**, v. 196, n. 1, p. 101-112, 2008.

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.

MOSS, A. P.; SUGAR, A.; HARGETT, N. A. The ocular manifestations and functional effects of occupational argyrosis. **Archives of Ophthalmology**, v.97, n.5, p.906-908, 1979.

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.

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.

O'SHAUGHNESSY, P. J. Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. **Seminars in Cell Developmental Biology**, v. 29, p.55-65, 2014.

ORTH, J. M.; GUNSALUS, G. L.; LAMPERTI, A. A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. **Endocrinology**, v. 122, n. 3, 787-794, 1988.

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.

PARK, M.V.D.Z.; NEIGHC, A. M.; VERMEULENB, J. P.; FONTEYNEB, L. J. J.; HENNY W. VERHARENB, 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.

PARVINEN, M.; SODER, O.; MALI, P.; FROYSA, B.; RITZÉN, E. M. In vitro stimulation of stage-specific deoxyribonucleic acid synthesis in rat seminiferous tubule by interleukin-1alfa. **Endocrinology**, v. 129, p. 1614-1620, 1991.

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.

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.

- RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials, **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 76-83, 2009.
- RAMOS, B. G. Z; PASA, T. B. C. Nanotechnology development: world-wide and national investments. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 89, n. 2, p. 95-101, 2008.
- RICKER, D. D. The Autonomic Innervation of the epididymis: its effects on epididymal function and fertility. **Journal of Andrology**, v. 19, n. 1, p. 1-4, 1998.
- 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.
- ROMANO, M. A.; ROMANO, R.M.; SANTOS, L. D.; WISNIEWSKI, P.; CAMPOS, D. A.; SOUZA, P. B.; VIAU, P.; BERNARD M. M.; NUNES, M. T.; OLIVEIRA, C. A. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. **Archives Toxicology**, v. 86, n. 4, p. 663-673, 2012.
- ROMANO, R.M., GOMES, S.N., CARDOSO, N.C.S., SCHIESSL, L., ROMANO, M. A., OLIVEIRA, C. A. New insights for male infertility revealed by alterations in spermatid function and differential testicular expression of thyroid-related genes. **Endocrine**, p. 1-11, 2016.
- 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, p.305-313, 2009.
- RUSSELL, L. D.; ETTLIN R. A.; HIKIM A. P. S.; CLEG, E. D. Histological and histopathological evaluation of the testis. **International Journal of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 83, 1990.
- SANKAR P.C. K.; RAMAKRISHNAN, R.; ROSEMARY, M. J. Biological evaluation of nanosilver incorporated cellulose pulp for hygiene products. **Materials Science and Engineering**, v. 61, p. 631-637, 2016.
- SAVITHRAMMA, N.R.; RAO, M. L.; RUKMINI, K.; DEVI, P. S. Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by using medicinal plants. **International Journal of ChemTech Research**, v. 3, n. 3, p. 1394-1402, 2011.
- SCHLUESENER, J.K.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: application and novel aspects of toxicology. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 4, p. 569-576, 2013.

SCHUG, T.T.; JANESICK, A.; BLUMBERG, B.; HEINDEL, J.J. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, n. 3-5, p.204-215, 2011.

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.

SHARPE, R.M., MCKINNELL, C., KIVLIN, C., FISHER, J.S. Proliferation and Functional Maturation of Sertoli Cells, and Their Relevance to Disorders of Testis Function in Adulthood. **Reproduction**, v. 125, n. 6, p. 769-784, 2003.

SHUM, W.W., DA SILVA, N., BROWN, D., BRETON, S. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. **The Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 11, p. 1753-1761, 2009.

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.

SILVA, R. M.; ANDERSON, D. S.; PEAKE, J.; EDWARDS, P. C.; PATCHIN, E. S.; GUO, T.; GORDON, T.; CHEN, L. C.; SUN, X.; VAN WINKLE, L. S.; PINKERTON, K. E. Aerosolized Silver Nanoparticles in the Rat Lung and Pulmonary Responses over Time. **Toxicological Sciences**, v. 144, n. 1, p. 151-162, 2015.

SIRONMANI, A; DANIEL, K. Silver Nanoparticles – Universal Multifunctional Nanoparticles for Bio Sensing, Imaging for Diagnostics and Targeted Drug Delivery for Therapeutic Applications. In: Kapetanovic, I. M. (Ed.). **Drug Discovery and Development-Present and Future**, 1 ed. Rijeka: InTech, 2011, cap. 20, p. 463-488.

SLEIMAN, H.; ROMANO, R. M.; OLIVEIRA, C. A.; ROMANO, M. A. Effects of prepubertal exposure to silver nanoparticles on reproductive parameters in adult male Wistar rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 76, n. 17, p. 1023-1032, 2013.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, n. 1, p. 177-182, 2004.

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.

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.

SYCHEVA, L. P.; MURAV'EVA, L. V.; ZHURKOV, V. S.; MIKHAILOVA, R. I.; SAVOSTIKOVA, O. N.; ALEKSEEVA, A. V.; SHEREMET'EVA, S.M. Study of cytogenetic and cytotoxic effects of nanosilver and silver sulfate in germ cells of mice in vivo, **Nanotechnologies in Russia**, v.11, n. 3-4, p. 256-262, 2016.

TAKASHIBA, K. S.; SEGATELLI, T. M.; FRANZÓI DE MORAES, S. M.; NATALI, M. R. M. Morfologia testicular de ratos Wistar obesos sedentários e submetidos a treinamento físico. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 33, n. 1, p. 25-33, 2011.

TOPPARI, J.; LARSEN, J. C.; CHRISTIANSEN, P.; GIWERCMAN, A.; GRANDJEAN, P.; GUILLETTE, L. J.; JÉGOU, B.J.; JENSEN, T. K.; JOUANNET, P.; KEIDING, N.; LEFFERS, H.; MCLACHLAN, J. A.; MEYER, O.; MÜLLER, J.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; SCHEIKE, T.; SHARPE, R.; SUMPTER, J.; SKAKKEBAEK, N. E. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, n. 4, p. 741-803, 1996.

WANG, R. S.; YEH, S.; CHEN, L. M.; LIN, H. Y.; ZHANG, C.; NI, J.; WU, C. C.; DI SANT'AGNESE, P. A.; DEMESY-BENTLEY, K. L.; TZENG, C. R.; CHANG, C. Androgen receptor in sertoli cell is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testes. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5624-5633, 2006.

WELSHONS, W.V., THAYER, K.A., JUDY, B.M., TAYLOR, T.A., CURRAN, E.M., VOM SAAL, F.S. Large effects from small exposure. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 8, p. 994-1006, 2003.

WILLIAMS, N. Longitudinal medical surveillance showing lack of progression of argyrosis in a silver refiner. **Occupational Medicine**, v.49, n.6, p.397-399, 1999.

WIN-SHWE, T. T.; FUJIMAKI, H. Nanoparticles and neurotoxicity. **International Journal Molecular Sciences**, v. 12, n. 9, p. 6267-6280, 2011.

WOELDERS, H. Overview of in methods for evaluation of semen quality. **Reproduction in Domestic Animals**, Suppl.1, p.145-164, 1991.

Woodrow Wilson International Center for Scholars (WWICS) Project on emerging nanotechnologies. Disponível em: <<http://www.nanotechproject.org/inventories/silver/>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

WRIGHT, J., LAM, K., HANSEN, D., BURRELL, R. Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens. **American Journal Infection Control**, v. 27, n. 4, p. 344-345, 1999.

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.

ZHAO, G.; STEVENS JR, S. E. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of Escherichia coli to the silver ion. **Biometals**, v.11, n. 1, p.27-32, 1998.