

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AGNPS) ALTERAM
A EXPRESSÃO GÊNICA HIPOTALÂMICA
HIPOFISÁRIA E GONADAL.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

REBECA WILK

GUARAPUAVA, PR

2016

REBECA WILK

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AGNPS) ALTERAM A EXPRESSÃO GÊNICA
HIPOTALÂMICA HIPOFISÁRIA E GONADAL.**

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.

Prof. Dr. Marco Aurélio Romano

Orientador

GUARAPUAVA, PR

RESUMO

Rebeca Wilk. Nanopartículas de prata (AgNPs) alteram a expressão gênica hipotalâmica hipofisária e gonadal.

Nanopartículas de prata AgNPs, tem sido amplamente utilizadas como componentes de diversos produtos comerciais tanto médicos quanto industriais, em função de suas propriedades bactericidas. Apesar da sua ampla gama de utilização, ainda não se conhece muito bem seus efeitos toxicológicos. Elas podem apresentar citotoxicidade, genotoxicidade, bloqueio na atividade mitocondrial, influenciam no desenvolvimento e peso, toxicidade sobre células germinativas e atraso na idade à puberdade. A fase pré-púbere é o período muito sensível, onde o eixo hipotalâmico hipofisário testicular (HHT) sofre alterações morfofisiológicas, que podem alterar os níveis hormonais e início da puberdade animal. As AgNPs são capazes de agir como potencial desreguladores endócrinos, afetando marcadamente a espermatogênese, porém são poucos trabalhos relatam seus efeitos sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. O objetivo deste estudo foi verificar a toxicidade das AgNPs em ratos, mediante avaliação do desenvolvimento corporal, idade à puberdade, peso dos órgãos reprodutivos, além da expressão de genes relacionados à função HHT e perfil hormonal. Foram utilizados 60 ratos em 5 grupos tratados com as doses: 0, 15, 7,5, 3,75 ou 1,875 µg/kg. Constatou-se atraso na puberdade, aumento da expressão do mRNA do *Gnrh* diminuição do mRNA do *Esr1* e do *Esr2* no hipotálamo. Além disso, observou-se uma diminuição do mRNA nos *Ar* e do *Esr2* na hipófise, e ocorreu um aumento do mRNA da *Inhbb* e nos níveis séricos da LH e FSH nos grupos de 3,75 e 1,875 respectivamente. Concluiu-se que a exposição pré-púbere as AgNP altera a expressão gênica no eixo HHT, bem como da idade à puberdade e os níveis séricos de LH e FSH.

Palavras-Chave: toxicidade, puberdade, desregulador endócrino, desenvolvimento reprodutivo.

ABSTRACT

Rebecca Wilk. Silver nanoparticles (AGNPS) alter the hypothalamic pituitary and gonadal gene expression.

Silver nanoparticles AgNPs have been widely used as components of various commercial products both medical and industrial because of their bactericidal properties. Despite its wide range of use, its toxicological effects are still not well understood. They may present cytotoxicity, genotoxicity, blockage in mitochondrial activity, influence on development and weight, germ cell toxicity, and delay the age at puberty. The prepubertal period is a very sensitive period, where the hypothalamic pituitary testicular axis (HPT) undergoes morphophysiological changes, which may alter the hormonal levels and the onset of puberty. AgNPs are able to function as potential endocrine disrupting chemical, affecting spermatogenesis, but few studies report the effects on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. The objective was to verify the AgNP toxicity in rats through evaluation of body development, age at puberty, weight of the reproductive organs, and expression of genes related to HPT function and hormonal profile. Sixty rats were used in 5 groups treated with the doses: 0, 15, 7.5, 3.75 or 1.875 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Puberty delay, increase in *Gnrh* mRNA expression, decreased *Esr1* and *Esr2* mRNA were observed. In addition, a decrease in mRNA in both *Ar* and *Esr2* was observed, with an increase in *Inhbb* mRNA and in serum LH and FSH levels in the 3.75 and 1.875 groups respectively. It was concluded that the prepubertal AgNP exposure alters the gene expression in the HPT axis and alters the age at puberty and the hormonal serum levels.

Keywords: toxicity, puberty, endocrine disrupter, reproductive development.

SUMÁRIO

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMO | i |
| ABSTRACT | ii |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 4 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 6 |
| 2.1 Prata..... | 6 |
| 2.2 Nanopartículas de prata | 7 |
| 2.3 Toxicidade das AgNPs | 8 |
| 2.4 Persistência no meio ambiente | 11 |
| 2.5 Farmacocinética da AgNP | 12 |
| 2.6 Desreguladores Endócrinos..... | 15 |
| 2.7 Eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular (HHT)..... | 18 |
| 3. OBJETIVOS..... | 22 |
| 3.1 Objetivo geral | 22 |
| 3.2 Objetivos específicos | 22 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 23 |
| 4.1 Delineamento experimental..... | 23 |
| 4.2 Avaliação da Puberdade..... | 24 |
| 4.3 Colheita e armazenamento..... | 24 |
| 4.4 Pesagem dos tecidos | 25 |
| 4.5 Identificação das alterações de expressão gênica pela quantificação do mRNA | 25 |
| 4.6 Dosagens hormonais | 29 |
| 4.7 Análise estatística..... | 29 |
| 5. RESULTADOS | 31 |
| 5.1 Avaliação do desenvolvimento corporal..... | 31 |
| 5.2 Puberdade | 32 |
| 5.3 Peso dos tecidos..... | 33 |
| 5.4 Expressão de genes relacionados ao controle da função hipotalâmica-hipofisária-testicular e perfil sérico hormonal. | 35 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 39 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 44 |
| 8. BIBLIOGRAFIA..... | 45 |

1. INTRODUÇÃO

A utilização de produtos à base de prata muito comum no passado ressurgiu recentemente, após o aumento da constatação de aparecimento de uma variedade de microorganismos resistentes a diversos antibióticos (KIM et al., 2007). Uma das formas desse ressurgimento foi a elaboração de produtos a base de prata na forma de nanopartículas de sais de prata (AgNPs), que demonstraram ser efetivos contra muitos microorganismos (GUGGENBICHER et al., 1999), apresentam eficácia contra bactérias, alguns fungos e algumas partículas virais (ROGERS et al., 2008), tanto no controle desses microorganismos como em processos ativos na prevenção de infecções (KIM et al., 2007).

Diversas pesquisas demonstraram que as AgNPs podem se ligar ao vírus HIV-1 e evitar sua infecção em células hospedeiras (ELECHIGUERRA et al., 2005). Por terem propriedades únicas (GUZMÁN et al., 2009), como o tamanho entre 1 a 100 nm, grande área superficial e propensão a se aglomerar (SCHLUESENER e SCHLUESENER, 2013), nanopartículas são utilizadas em uma grande variedade de produtos comerciais (cremes dentais, desodorantes, shampoos e filtros de água), produtos biomédicos (tais como implantes médicos, cateteres e pensos para feridas), assim como na produção de conservantes em alimentos e na bioengenharia (DĄBROWSKA-BOUTA et al., 2016).

Embora presente em vários produtos, não se tem suficiente conhecimento sobre os efeitos toxicológicos desses nanomateriais (GARCIA-ALONSO et al., 2011). Estudos apontam que seu uso pode provocar citotoxicidade (ASARE et al., 2012), genotoxicidade (ASHARANI et al., 2009) e possibilidade de degenerações celulares (SIQUEIRA et al., 2013).

Além disso, as AgNPs podem comportar-se como desreguladores endócrinos, intervindo na atividade dos hormônios corporais (SHETTLER et al., 1999), podendo afetar o crescimento, desenvolvimento e provocar danos ao sistema reprodutivo (WHO, 2012). Em alguns experimentos, constatou-se que ratos recebendo AgNPs apresentaram diminuição de peso corporal quando em fase de crescimento (MATHIAS et al., 2014; KIM et al., 2010) além de atraso na idade à puberdade (SLEIMAN et al., 2012; MATHIAS et al., 2014). Ainda, pode causar alterações na qualidade do sêmen e interferência em parâmetros reprodutivos, persistentes na idade adulta (MATHIAS et al., 2014).

Na fase pré-púbere, uma série de acontecimentos ocorre e pode interferir no desenvolvimento reprodutivo, endócrino e no funcionamento do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular (HHT), além de alterar os níveis hormonais tanto séricos quanto celulares e interferindo no início da puberdade. Mesmo sabendo que AgNPs podem funcionar como desregulador endócrino, principalmente em relação à espermatogênese, ainda há poucos relatos sobre os efeitos no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Desta forma, este estudo visa auxiliar o entendimento dos efeitos do consumo, utilização e ou da contaminação ambiental em doses muito baixas sobre a endocrinologia reprodutiva.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Prata

A prata (Ag) foi o terceiro metal encontrado e manipulado pelo homem, e por não oxidar em contato com os íons H^+ tornou-se muito usada em jóias e ornamentos, que possibilitam o íntimo contato com a pele e mucosas (SOUZA et al., 2013). Também foi usada na fabricação de produtos odontológicos, médicos e medicamentos, por suas propriedades bactericidas (BUTTERMAN e HILLIARD, 2005).

Produtos contendo prata já foram usados terapeuticamente, a exemplo do nitrato de prata, utilizado em problemas neurológicos, para tratamento e prevenção da sífilis e na oftalmia neonatal (FUNG e BOWEN, 1996). O nitrato de prata e sulfadiazina de prata foram muito utilizadas para tratamento em pacientes apresentando queimaduras, devido suas propriedades bactericidas que evitavam a contaminações e possibilidade de septicemia (SHINOGI e MAEIZUMI, 1993).

A prata metálica foi considerada inerte e não tóxica, mas quando na forma de íons de prata e de sal, ela pode apresentar graus de toxicidade. Podem inibir a oxidação de glicose, glicerol, fumarato, succinato e lactato, além de causar necrose coagulativa e apresentar propriedades citotóxicas (SHINOGI e MAEIZUMI, 1993). Posteriormente, a prata passou a ser introduzidas e utilizadas em diversas soluções coloidais de prata, passou a compor muitos fármacos e medicamentos (LANDSDOWN, 2006).

Por ser eliminada pelas vias metabólicas e excretada, passou a ser encontrada no meio ambiente, sendo constatada sua presença em efluentes lançados em corpos receptores hídricos. Segundo a legislação brasileira (resolução nº 357/05 do Conama), com um limite permitido de 0,1 mg de prata por litro. A prata iônica pode atuar como inibidor enzimático afetando o metabolismo de organismos vivos (PETHKAR e PAKNIKAR, 2003). Além da sua utilização em diversos produtos comerciais como auxiliar na sua conservação, evitando sua contaminação, a prata passou a ser utilizada como antibacteriano em diversos tipos de produtos, devido sua propriedade biocida (KIM et al., 2007).

2.2 Nanopartículas de prata

Recentemente, a Ag tem sido utilizada em uma apresentação diferente da prata iônica, na forma de nanopartículas de sais de prata AgNP, cujo tamanho varia de 1 a 100 nm (ROSÁRIO et al., 2016). Tem sido empregada em produtos comerciais, produtos biomédicos, assim como na produção de conservantes de alimentos e na bioengenharia (DABROWSKA-BOUTA et al., 2016). Alguns produtos que contêm nanopartículas de prata são utilizados na forma de cremes dentais, produtos para restaurações odontológicas, revestimentos de embalagens para conservação de alimentos, purificadores de água, tecidos, materiais hospitalares, xampus, desodorantes, utensílios de cozinha e também como antisséptico em centros cirúrgicos, sempre devido as suas propriedades antimicrobianas (AHAMED et al., 2010). Atualmente estima-se que existam cerca de mais de 1600 produtos comerciais à base de nanopartícula de prata (ZHOU et al., 2011).

Sua utilização ganha importância quando da constatação do uso inadequado de antimicrobianos, que promoveu o aparecimento de resistência bacteriana a muitos medicamentos, tornando-se necessário o desenvolvimento de novos produtos. Baixas concentrações de drogas insolúveis, mas na forma de nanopartículas podem servir como potencial alternativo para administração de fármacos de modo eficiente e em baixas dosagens, sem reduzir, no entanto, a eficácia do tratamento (SIRONMANI E DANIEL, 2008). As nanopartículas de prata também possuem atividade anti-HIV numa fase precoce da replicação viral, muito provavelmente como um antiviral ou inibidor de entrada viral na célula parasitada (ELECHIGUERRA et al., 2005).

Além disso, o baixo custo de produção, a biocompatibilidade, e relativa facilidade de modificar a estrutura das nanopartículas de prata, tornaram-nas alternativa de escolha viável em futuras aplicações biomédicas, principalmente sendo empregadas como biocidas (KALISHWARALAL et al., 2009). Estima-se que a produção de AgNP esteja aumentando para um patamar de 58.000 toneladas por ano até 2020 (ROSÁRIO et al., 2016)

Sua produção, comercialização e emprego em diversos produtos comerciais, possibilita que, involuntariamente possamos ingerir nanopartículas de pratas através do consumo de água ou no consumo de alimentos que estão em contato com embalagens contendo a AgNP, como ocorre no leite, por exemplo, que possuem em sua embalagem, o

revestimento a base de prata (PASCHOALINO et al., 2010) e mesmo ingerindo essas AgNPs, ainda não se sabe muito sobre sua ecotoxicidade (OGAR et al., 2015)

2.3 Toxicidade das AgNPs

Os nanomateriais nunca foram tão utilizados como recentemente. Por serem muito pequenos, são compostos que podem ser muito bem absorvidos pela pele, mucosas e membranas celulares, podendo ter sua toxicidade muito aumentada em função do seu tamanho (PASCHOALINO et al., 2010). Podem ser encontrados como contaminantes ambientais no solo, na água e no ar (MUELLER E NOWACK, 2008). A água contaminada com AgNP, embora tratada, pode possibilitar resíduos como seu lodo, que muitas vezes é utilizado na agricultura como fonte de adubo e acaba por contaminar o solo, mananciais subterrâneos e fluviais (FABREGA et al., 2011; BENN E WESTERHOFF, 2008).

A prata possui diversos tecidos alvo, podendo causar efeitos tóxicos sobre os pulmões, fígado, órgãos reprodutivos, tecidos nervosos e células sanguíneas (AHAMED et al., 2010) e diversos efeitos nocivos desses materiais sobre os mais variados sistemas biológicos e componentes celulares, de tal modo a sujeitar seres vivos a intoxicações devido à grande utilização das AgNPs (FARD et al., 2015).

Por exemplo, quando no intestino delgado, as AgNPs podem apresentar mudanças em sua estabilidade de alterações de forma e tamanhos, ou podem precipitar na forma de ions solúveis em função da solubilidade em fluidos teciduais e do pH dos diversos seguimentos do trato gastrointestinal (TGI) (DREW e ZHAGEN, 2016). As AgNP podem facilmente atravessar a barreira hematoencefálica e acumular-se no cérebro de roedores após a administração oral ou intravenosa (DABROWSKA-BOUTA et al., 2016).

Como as nanopartículas possuem grande área superficial e certa propensão a se aglomerarem (SCHLUESENER E SCHLUESENER, 2013), elas podem aumentar a interação com soro, saliva, muco e componentes do fluido de revestimento pulmonar, sendo mais reativas do que as partículas maiores (BEER et al., 2012). AgNP pode se comportar como “cavalo de tróia”, na qual a forma de partículas facilita a absorção aumentando assim a biodisponibilidade celular metálica (GLIGA et al., 2014).

Camundongos tratados via oral com diferentes concentrações de AgNP nos tamanhos que variam de 3 a 20 nm, nas doses de 5, 10, 15 e 20 mg/kg, apresentaram perda de peso, sem apresentarem diminuição do consumo de alimentos. Esta observação está correlacionada à perda da função absorptiva, por danos ao epitélio intestinal nestes animais (SHAHARE et al., 2013). Ratos tratados com AgNP de 60 nm, por 28 dias nas concentrações de 30 mg/kg, 300 mg/kg e 1000 mg/kg de peso corporal, apresentaram alteração na capacidade secretória da mucosa intestinal, comprometendo a defesa natural dos intestinos (JEONG et al., 2010).

Kim et al. (2008) administrando AgNP a 60 nm nas concentrações de 30, 300 e 1000mg/kg e pelo período de 28 dias em ratos, encontraram alterações nos níveis de fosfatase alcalina e colesterol, mostrando que a exposição da nanopartículas de prata pode resultar em alguma lesão hepática. A absorção oral das nanopartículas de prata pode adentrar a circulação sanguínea e afetar a coagulação do sangue. Em doses altas (acima de 125 mg/kg a 56 nm), além de diferenças na fosfatase alcalina e no colesterol, observa-se queda no peso corporal e na dose de 300 mg/kg aumento do peso testicular. Esses resultados possibilitaram a determinação de uma NOAEL (nível de efeito adverso não-observável) de 30 mg/kg e LOAEL (dose mais baixa de efeito adverso observável) de 125 mg/kg. (KIM et al., 2010). Como em outros tecidos, órgãos e sistemas o comportamento possa divergir, estudos mais específicos são necessários.

A administração oral durante 28 dias de nanopartículas de prata (15 e 20 nm) demonstrou que os principais órgãos alvo para a distribuição de prata são o fígado e o baço, seguido pelos testículos, rins, cérebro e pulmões. Após dois meses de exposição, o cérebro e os testículos ainda continham concentrações elevadas de prata, indicando que sua eliminação ocorre a uma taxa extremamente lenta nestes órgãos (VAN DER ZANDE et al., 2012).

Ratos que inalaram nanopartículas de prata durante 13 semanas, em concentrações de 49 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 133 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 515 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (18-19 nm), apresentaram aumento (dose dependente) na concentração de prata nos pulmões, sangue e no fígado. Os órgãos-alvo neste estudo para as nanopartículas de prata por inalação foram os pulmões e o fígado, constatando-se uma NOAEL de 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (SUNG et al., 2009).

As AgNPs podem causar danos celulares por apoptoses, acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), estresse oxidativo e danos ao DNA celular (AHAMED et al., 2010; ASARE et al., 2012). Em peixes, provocam deformidades na medula espinhal, arritmias

cardíacas, estresse oxidativo, acidose sanguínea, colapso, e por fim choque circulatório (FABREGA et al., 2011).

Ratos tratados com 1 mg/kg de AgNPs via oral durante 14 dias nos tamanhos de 22 nm, 42 nm e 71 nm apresentaram distribuição nos rim, testículos, pulmões, fígado e cérebro, bem como elevação dos níveis de fator de crescimento tumoral. Embora no tamanho de 323 nm não produziram o mesmo efeito (PARK et al., 2010).

Tamanhos diferentes, agregações, taxa de dissolução e revestimentos diversos, podem produzir diferentes taxas de absorção, distribuição, metabolização e excreção, além de citotoxicidade em tipos celulares distintos, sendo necessário avaliações diferentes em tecidos diferentes (FURTADO et al., 2016; GLIGA et al., 2014; LIU et al., 2010). Também foi observado um aumento da geração de ROS em diferentes tamanhos de AgNP conferindo diminuição da viabilidade celular em macrófagos (CARLSON et al., 2008).

Camisetas contendo nanop prata possibilitaram o encontro no suor, de 500 nm de aglomerações de nanopartículas de prata (KULTHONG et al., 2010). Diferentes tipos de AgNPs (não lavadas / não revestidas com 20, 50 e 80 nm de diâmetro, lavadas / não revestidas 20, 50 e 80 nm e revestidas com carbono 35 nm) foram absorvidas pela pele intacta e mais intensamente pela pele lesionada. Observações macroscópicas não demonstraram irritação grave na pele suína, enquanto observações microscópicas e ultra estruturais demonstraram áreas de inflamação focal e localização de AgNPs na superfície e nas camadas superiores do estrato córneo. Isto é de fundamental importância, pois muitos compostos a base de nanop prata, são utilizados como antissépticos em feridas, podendo agravar os quadros de intoxicação. Nas células podem gerar espécies reativas de oxigênio potencialmente prejudiciais ao DNA e organelas celulares (SAMBERG et al., 2010).

Em contrapartida, um estudo com humanos utilizado via oral 10 ppm (5-10 nm) de AgNP durante períodos de 3, 7 e 14 dias e usando 32 ppm (25-40 nm) durante 14 dias, modificaram a contagem de glóbulos vermelhos (RBC), uréia nitrogenada do sangue (BUN) e ALT (alanina aminotransferase). Mesmo com esse resultado, após 14 dias recebendo AgNP via oral não foi observado importante toxicidade clínica (MUNGER et al., 2014).

Segundo a US EPA (United States Environmental Protection Agency), a concentração que pode ser ingerida diariamente durante um tempo de vida sem efeitos adversos de prata em

humanos é 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ (US EPA, 1996). A ingestão diária permitida foi estimada como sendo $< 0,4$ a 27 $\mu\text{g}/\text{dia}$ para diferentes populações (DREW e HAGEN, 2016). Hoje em dia, a exposição às AgNP tem sido mais constante e em maior escala à medida que novos produtos são lançados no mercado.

Como são encontrados em vários produtos que possuem íntimo contato com o sistema reprodutivo de seres humanos, como produtos contraceptivos e de higiene íntima, as AgNPs podem causar toxicidade para as células germinativas através de redução da função mitocondrial e indução de apoptose (AHAMED et al., 2010).

2.4 Persistência no meio ambiente

A persistência de AgNPs foi investigada em um lago e dois rios durante 4 meses, sendo observado diferenças entre os tamanhos de 5, 10 e 50 nm de AgNP, sendo o último mais resistente a dissolução em água. Essa diferença diminuiu quando a área superficial da Ag foi normalizada, sugerindo um papel importante da área superficial para determinar a perda de prata. Partículas menores de AgNPs (5 nm) dissolvem-se rapidamente e quase completamente, enquanto que AgNPs maiores (50 nm) têm o potencial para persistir durante um período prolongado de tempo, e pode servir como uma fonte contínua de íons de Ag na água (DOBIAS E BERNIER-LATMANI, 2013).

A dissolução é influenciada pelo revestimento das partículas. AgNPs revestidas com citrato a 10 nm, mostraram-se menos estáveis no decorrer do tempo e tiveram maior sedimentação quando comparado com os AgNPs revestidos com PVP 10 nm. O revestimento de citrato de 10 nm de AgNP revelou uma maior liberação de Ag em meio celular (10,6%) depois de 4h, em comparação com os AgNPs revestidos com PVP a 10 nm (5,8%) e isto ocorre devido a diferença de tamponamento e estabilidade do agente. Apesar das diferenças na aglomeração das revestidas por citrato e PVP em partículas 10 nm, não houve diferença dependente do revestimento e da citotoxicidade (DOBIAS E BERNIER-LATMANI, 2013).

As AgNPs não revestidas apresentam estabilidade de partícula inferior às partículas revestidas e maior formação de aglomerados de forma mais rápida, fazendo com que a área de superfície exposta seja reduzida, diminuindo a cinética de dissolução (GLIGA et al., 2014).

AgNPs revestidas com PVP, ácido tânico, são mais propensas a liberação de Ag^+ do que aquelas revestidas com ácido cítrico (DOBIAS e BERNIER-LATMANI, 2013).

Além da forma, do tamanho e do revestimento da AgNP, o que pode influenciar na excreção, no metabolismo e na toxicidade das nanopartículas são a composição química, carga superficial, solubilidade, capacidade ligante e interações biológicas no meio ambiente (BEER et al., 2012).

2.5 Farmacocinética da AgNP

Na farmacocinética do sangue ou plasma, a meia vida é dependente da espécie. Cerca de 4,1 dias em ratos e de 11,7-16,3 dias em coelhos para o tamanho de 7,9 nm de AgNP revestidas com citrato, após injeção intravenosa. O tempo de meia vida é de 3-4 vezes mais curto em ratos do que em coelhos. Isto seria consistente com o tempo de passagem mais longo de nanopartículas no sistema circulatório de animais maiores do que em roedores menores (LIN et al., 2015).

A farmacocinética também pode ser influenciada pelo sexo como é o caso de um estudo onde se utilizou 90,5 nm de AgNP em ratos, via intravenosa na concentração de 120 mg/kg, no qual níveis de Ag no sangue atingiram um pico de 10 min em ambos os sexos e o tempo de meia vida foi de 15,6 h para o sexo masculino e 29,9 h para o sexo feminino (XUE et al., 2012).

A absorção oral é baixa e depende da fração solúvel, é menor que 1% para AgNPs menores que 20 nm não revestidas ou menor que 15 nm revestidas com PVP (LIN et al., 2015). A fração de absorção intestinal está entre 0,12% e 0,88% (BACHLER et al., 2013).

O aproveitamento oral de partículas de 7,9 nm de AgNPs revestidas com citrato foi de 1,2% e 4,2% nas doses de 1 e 10 mg/kg, respectivamente, indicando uma baixa biodisponibilidade (PARK et al., 2011). Após a exposição oral a AgNPs, a maior parte de Ag no plasma encontra-se na forma de prata iônica, e apenas uma pequena fração de partículas encontra-se biodisponível (LIN et al., 2015). As nanopartículas de prata são melhor absorvidas principalmente pelo intestino, quando administrada via oral em ratos (VAN DER ZANDER et al., 2012).

Estudos em humanos aplicando $70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de AgNPs (25 nm) revestidos com PVP durante 24 h em pele lesionada e em pele intacta determinaram concentrações de $0,46 \text{ ng cm}^{-2}$ na pele intacta e de $2,32 \text{ ng cm}^{-2}$ na pele danificada, demonstrando que a absorção pela pele intacta foi muito mais baixa e detectável do que na lesionada, provavelmente por um aumento de permeabilidade para a prata na pele lesada (LARESE et al., 2009). Similaridade foi obtida em um estudo feito em suínos para constatação da citotoxicidade, onde observou-se que as partículas foram mais absorvidas nas camadas superficiais do estrato córneo da pele (SAMBERG et al., 2010).

As nanopartículas de prata podem se distribuir a partir do local de exposição e tornar-se disponível sistemicamente. Uma vez dentro do corpo, seja por via pulmonar, cutânea ou exposição oral, eles podem induzir a toxicidade a todos os órgãos e tecidos (XUE et al., 2012). Na maioria dos estudos, a distribuição de AgNPs nos tecidos ocorre principalmente no fígado e o baço, seguido pelo rim, independentemente da via de exposição (LIN et al., 2015).

Partículas de AgNPs maiores que 80 nm são distribuídas para o baço, e as partículas de AgNPs menores que 60 nm estão predominantemente acumuladas no fígado. Isto provavelmente em função dos capilares hepáticos que captam mais partículas menores do que as partículas maiores que são absorvidas com maior afinidade no baço (LIN et al., 2015). Alta concentração de AgNP no fígado pode também ser devido a acumulação de complexo de tiol-prata, relacionado a alta afinidade de íons de prata com o enxofre que normalmente estão presentes no fígado (VAN DER ZANDER et al., 2012).

No sangue, os macrófagos são capazes de dissolver pequenas quantidades de AgNPs instantaneamente e só se acumularem em grandes quantidades de AgNPs. Acima deste limiar, as condições no sangue (pH, força iônica) promovem a aglomeração de nanopartículas de prata e que são posteriormente eliminados da corrente sanguínea pelo sistema mononuclear fagocitário e abaixo deste limiar, o sistema mononuclear fagocitário não é ativado por AgNP no sangue. No entanto, se a AgNP for dissolvida no sistema mononuclear fagocitário, a maior fração da prata dissolvido seria transportada para o fígado (BACHLER et al., 2013).

No cérebro, é razoável chamar a atenção para o risco de neurotoxicidade causada pela exposição de baixo nível para AgNP. A administração via oral em ratos de AgNP de 10 nm na concentração de $0,2 \text{ mg}/\text{kg}$, resultou em anomalias morfológicas nas bainhas de mielina e a expressão alterada de proteínas da mielina. Além disso, sabe-se que a meia-vida biológica da

prata no SNC é mais longa do que em outros órgãos (DABROWSKA-BOUTA et al., 2016). Quando administradas em ratas prenhas, a AgNP pode ser encontrado no endométrio, saco vitelino e no feto, mostrando que há uma transferência placentária (EMA et al., 2016).

A AgNP após ser ingerida, e exposta ao pH baixo no fluido gástrico apresenta dissolução da oxidação acelerada de AgNP e libera Ag^+ no estômago, o que pode precipitar com Cl^- . No sangue, Ag^+ pode ligar-se a proteínas com grupos tiol e pequenas moléculas de tiois, tais como GSH, produzindo H^+ e GS-Ag, que, eventualmente, formam complexos de polímero Ag-GSH e são distribuídos a vários tecidos. Complexos Ag-tiol podem ainda serem reduzidos. Quando AgNPs ligam-se ao enxofre tornam-se Ag_2S (sulfeto de prata) e podem reagir com selênio via reação de troca Se/S para produzir Ag_2S NPs e Ag/S/Se partículas argyriais (LIN et al., 2015).

Em uma mulher com argyria, foi encontrada a permanência de 18% de Ag de uma dose administrada via oral (DREW e HAGEN, 2016). A dose a 14,0 e 25,6 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ de prata iônica diária oral ingerida durante 70 anos que pode determinar o desenvolvimento de argyria (BACHLER et al., 2013). No intestino delgado, os aglomerados de prata podem reverter-se para nanopartículas, ou as nanopartículas podem ser formadas a partir de precipitação de íons solúveis que saem do estômago (DREW e HAGEN, 2016).

Ratos expostos diariamente a AgNP revestidas com PVP (<15nm) e não revestidas (<20 nm) durante 28 dias, apresentaram após um dia de exposição, queda significativa de AgNP no sangue e uma semana após, ocorreu uma redução a um nível não detectável, indicando eliminação rápida da prata a partir do sangue. Assim como no sangue, após uma semana da administração não foi mais encontrado prata nas fezes. Foi estimado que cerca de > 99% da ingestão de prata foi excretado, indicando que apenas uma pequena fração acumulada (VAN DER ZANDER et al., 2012).

Em outro estudo foi relatado que apenas $9,0\% \pm 0,08\%$ da AgNP foi excretada nas fezes e urina respectivamente, dentro das primeiras 24 horas (BACHLER et al., 2013), mostrando que a eliminação de AgNPs ocorre principalmente pela bile (LIN et al., 2015). De acordo com Drew e Hagen (2016), a eliminação de Ag ocorre lentamente, mas após 2 meses de exposição, ainda pode ser encontrada no cérebro e no testículo em ratos.

2.6 Desreguladores Endócrinos

Desreguladores endócrinos são substâncias que influenciam na atividade do sistema endócrino (síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de um hormônio natural do corpo). Algumas substâncias encontradas no ambiente podem ser consideradas potencialmente um desregulador endócrino químico, devido sua natureza. A contaminação por essas substâncias pode ser direta ou indireta como a ingestão de alimentos ou água, contato com produtos ou inalação (BILA e DEZOTTI, 2007).

São encontrados em muitos produtos químicos comerciais como detergentes, resinas, plásticos, brinquedos, embalagens de alimentos, pesticidas, herbicidas, fungicidas, medicamentos, fármacos, equipamentos médicos além do meio ambiente nas águas superficiais e subterrâneas (BILA e DEZOTTI, 2007). Estima-se que de todos os produtos químicos fabricados no mundo, milhares deles podem influenciar o sistema endócrino e serem encontrados de forma residual no corpo humano (GORE et al., 2014).

Existem na forma de resíduos, principalmente de produtos que possuem propriedades de desregular o sistema endócrino e excretados na urina, distribuídos no sangue ou na placenta (GORE et al., 2014). Os efeitos destas substâncias não dependem só da concentração encontrada no ambiente, mas também da possibilidade de sua bioacumulação, persistência, tempo de exposição, mecanismos de biotransformação, excreção entre outros (BILA e DEZOTTI, 2007).

A origem dos problemas hormonais em indivíduos sadios é muitas vezes incerta. Mas as alterações podem ser decorrentes da exposição desde o período fetal até adulto, com as manifestações clínicas ocorrendo desde a fase aguda até muitos anos depois da exposição (SOLOMON e SCHETTLER, 2000).

Os hormônios presentes do organismo, principalmente os esteróides podem continuar a estimular o crescimento e proliferação celular muito tempo após a sua exposição (SOLOMON e SCHETTLER, 2000). Como exemplo, o dietilestilbestrol, que entre os anos 1938 a 1971 foi administrado a mulheres grávidas para evitar aborto espontâneo, manifestaram em meninas expostas ainda no útero, malformações do trato reprodutivo e neoplasias raras do sistema reprodutivo somente na adolescência. Efeitos estes que

anteriormente e normalmente só eram descritas em mulheres na pós-menopausa (GORE, 2007).

Crianças e animais jovens apresentam maior risco quando expostos a desreguladores endócrinos do que adultos, pois nessas fases do desenvolvimento, os hormônios são responsáveis pelo controle e desenvolvimento de tecidos e órgãos e sistemas (BILA e DEZOTTI, 2007). Além disso, quaisquer interrupções dos processos naturais podem alterar, por vezes, irreversivelmente, a estrutura e ou função de um sistema fisiológico. O tempo e a fase de exposição são as chaves para a compreensão sobre quais órgãos ou tecidos podem ser afetados. Um órgão que está se desenvolvendo durante a exposição é mais susceptível de ser afetado do que um órgão que já completou seu desenvolvimento (GORE et al., 2014).

Uma desregulação endócrina química reprograma a metilação do DNA (substituição de um átomo ou grupo por um grupo metila) e que são incorporadas na linha germinal e transmitidas às gerações futuras (CREWS, 2008). Nos últimos anos, a saúde reprodutiva em humanos vem diminuindo progressivamente, o que pode ser devido à ação de desreguladores endócrinos químicos ambientais, que tem um papel na etiologia de muitas patologias uma vez que o eixo hipotálamo-hipofisário-testicular é um alvo para muitas substâncias tóxicas (LAFUENTE et al., 2000).

Diversos hormônios influenciam no funcionamento do sistema reprodutivo e controlam as atividades do desenvolvimento físico, genital e organogênico. Por isso, a maioria das pesquisas realizadas em desreguladores endócrinos tem concentrado a sua atenção na saúde reprodutiva (IAVICOLI et al., 2013). Essas substâncias causam anomalias no sistema reprodutivo, principalmente feminilização dos machos, comportamento sexual anormal, defeitos ao nascimento, diminuição da densidade de espermatozoides, diminuição do tamanho dos testículos, neoplasias mamárias, neoplasias testiculares, infertilidade, subfertilidade, intersexualidade e disfunções endócrinas gerais e tireoideanas (SOLOMON e SCHETTLER, 2000; BILA e DEZOTTI, 2007).

Os hormônios esteróides estão envolvidos na determinação do sexo e no desenvolvimento neonatal, assim como na aquisição e manutenção das características sexuais secundárias em adultos. Eles também podem programar o sistema nervoso central e neuroendócrino pré-natal ou neonatal, dependendo da espécie, resultando em dimorfismo sexual em questões comportamentais e metabólicas da reprodução. Pesticidas que alteram a

função endócrina podem afetar gravemente o desenvolvimento, comportamento e eventos bioquímicos vitais para o sucesso reprodutivo (LEBLANC et al., 1997).

Mesmo pequenas quantidades de produtos químicos podem perturbar o sistema endócrino, interrompendo sistemas reprodutivos e causando outros problemas hormonais. (GORE et al., 2014). Alguns dos problemas reprodutivos relatados sobre os desreguladores endócrinos foram encontrados em pesquisas com AgNP.

Nanopartículas de prata são produtos químicos encontrados no ambiente e produtos consumidos direta ou indiretamente, dos quais não se conhece o perfil toxicológico. Alguns estudos encontram principalmente alterações e comprometimento da espermatogênese (IAVICOLI et al., 2013), declínio na motilidade e viabilidade espermática, mesmo com baixas concentrações, além de modificação na estrutura testicular e alterações biocinéticas e catabólicas das vias de síntese de testosterona (TERZUOLI et al., 2011).

24 h após a administração intravenosa de AgNP em ratos, de concentrações de 5 e 10 mg/kg provoca uma diminuição na contagem de espermatozóides nos epidídimos e aumento de danos ao DNA em células germinativas (GROMADZKA-OSTROWSKA et al., 2012). Sleiman et al. (2013) encontraram num estudo com ratos em fase pré púbere, diminuição na espermatogênese, menor contagem espermática na idade adulta além de atraso na idade à puberdade, coincidindo com dados observados por Mathias et al. (2014), além de aumento no peso dos testículos em ratos (KIM et al., 2010).

Nanopartículas de prata administradas via oral nas doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg durante 28 dias, alteram as taxas de hormônios LH (hormônio luteinizante), FSH (hormônio folículo-estimulante) e testosterona provocando também a insuficiência renal e do metabolismo hepático (REZAEI-ZARCHI, 2013). A presença dessas substâncias no meio ambiente, as exposições esporádicas e eventuais, combinadas aos efeitos prejudiciais à saúde, justificam pesquisas, medidas de educação e medidas preventivas para reduzir ou minimizar a exposição humana a esses produtos (SOLOMON E SCHETTLER, 2000).

2.7 Eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular (HHT)

A manutenção da função reprodutiva depende da secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) que sofre alterações durante o desenvolvimento sexual. O começo da estimulação neuroendócrina ocorre na gestação, onde a partir de 16 semanas de gestação o hipotálamo e a hipófise começam a funcionar efetivamente para determinar os ciclos sexuais (WALDHAUSER et al., 1981).

O hipotálamo é uma estrutura do sistema nervoso central que fica situado na base do cérebro, abaixo do tálamo e do terceiro ventrículo e logo acima da hipófise. Ele sintetiza e secreta neurotransmissores também denominados de neurohormônios que podem estimular ou inibirem a secreção de hormônios hipofisários (CORRADI et al., 2016).

A hipófise está localizada abaixo do hipotálamo, em uma depressão da base do crânio chamada sela túrcica (CORRADI et al., 2016) e é dividida em duas partes, que são o lobo anterior e o lobo posterior. A região posterior da hipófise é controlada por sinais neurais que originam no hipotálamo e a região anterior é controlada por hormônios hipotalâmicos que podem ser tanto liberadores quanto inibidores. Eles são secretados no hipotálamo, para a região anterior por meio de vasos portais hipotalâmico-hipofisários (GUYTON E HALL, 2006).

Os hormônios liberadores e inibidores do hipotálamo têm função de controlar a secreção da hipófise anterior. Um desses hormônios é o hormônio liberador de gonadotrofina que é segregada de uma forma pulsátil a partir da eminência mediana do hipotálamo nos vasos porta da hipófise e que estimula a liberação de hormônios gonadotrópicos, que são o hormônio luteinizante e o hormônio folículo-estimulante da hipófise (HANDA E WEISER, 2014; STOKER et al., 2000; GUYTON E HALL, 2006; CORRADI et al., 2016).

FSH e LH consistem de subunidades de cadeias peptídicas α e β (*Fshb* e *Lhb*), produzidos na hipófise onde α é idêntica em ambos os hormônios e a β encarregado pela atividade específica de cada hormônio (CORRADI et al., 2016). A secreção de LH é cíclica enquanto que o FSH aumenta e diminui ligeiramente a variação da secreção de GnRH. O LH é primeiramente secretado pela hipófise, que estimula as células de leydig a produzir e

secretar a testosterona e que com o FSH leva a espermatogênese nas células de sertoli. (GUYTON e HALL, 2006; HAFEZ e HAFEZ, 2004).

O FSH age nas células germinativas e túbulos seminíferos (HAFEZ e HAFEZ, 2004), estabelece o número de célula de sertoli no testículo e a indução e manutenção da espermatogênese (CORRADI et al., 2016).

A testosterona é estimulada pelo LH e é secretada pelas células intersticiais de leydig nos testículos (GUYTON e HALL, 2006). A função da testosterona é estimular a fase final da espermatogênese, prolongar a vida do espermatozóide nos epidídimos, estimular o crescimento, desenvolvimento e atividades secretoras das glândulas acessórias e manter as características secundárias e da libido do macho (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Após a secreção de testosterona pelos testículos, a maior parte dela se liga à albumina plasmática ou a uma beta globulina, circulando no sangue até ser transferida para tecidos ou ser degradada. O que não se fixa nos tecidos se transforma no fígado em androsterona e desidroepiandrosterona e ao mesmo tempo conjugada com glicuronídeos ou sulfatos. Após são excretados no intestino, pela bile ou pela urina (GUYTON e HALL, 2006).

As células de sertoli produzem as inibinas que contribuem para a regulação endócrina do sistema reprodutivo e são secretadas pelos vasos linfáticos. As inibinas reduzem a secreção de FSH, regulam as funções celulares epiteliais e intersticiais nos testículos, são reguladores da esteroidogênese parácrina que modulam o sinal endócrino do LH e tem função como fator de crescimento e diferenciação (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Os receptores hormonais, principalmente os de hormônio luteinizante aumentam ao longo da gestação até atingem níveis máximos perto do nascimento. Com esse comportamento há uma elevação dos níveis de testosterona testicular fetal. Ao final da gestação, a concentração de LH e hormônio folículo-estimulante diminuem pelo fato da placenta aumentar a produção de estrogênio que suprime a atividade do eixo HHT até o final da gestação (KUIRI-HÄNNINEN et al., 2014).

A diferenciação sexual inicia-se na gestação, e no macho, ocorre no em função da ação e expressão do fator determinante testicular (SRY) ligado ao cromossomo Y masculino e pela secreção de testosterona pelas células de leydig do testículo fetal (OJEDA e SKINNER, 2006).

No momento do nascimento, a atividade hipotálamo-hipofisário é reativada, aumentando os níveis de gonadotrofinas e conseqüentemente acontece à ativação da produção de hormônios gonadais (KUIRI-HÄNNINEN et al., 2014). Após o nascimento, ocorre um aumento de andrógenos que suprime a secreção de GnRH pelo hipotálamo (CORRADI et al., 2016) e a concentração de testosterona diminui (OJEDA e SKINNER, 2006).

Durante a infância permanece baixa a frequência de pulso do eixo hipotálamico-hipofisário e, portanto, uma menor secreção de GnRH (CORRADI et al., 2016). Conforme se aproxima a puberdade, os neuronios GnRH secretores no rato macho sofrem alterações morfológicas. O início da puberdade masculina tem origem no sistema nervoso central, com os testículos realizando um papel essencial. As alterações testiculares posteriores que ocorrem durante a juventude, como o aumento da sensibilidade dos testículos à estimulação por gonadotrofinas desempenham aspectos da função de adultos, incluindo mudanças comportamentais, na espermatogênese, na diferenciação e na maturação dos órgãos sexuais acessórios. Dentro do eixo hipotálamico-hipofisário-gonadal, outros fatores podem afetar o início da puberdade em ratos do sexo masculino, como o estado nutricional e influências do ambiente (STOKER et al., 2000).

Na puberdade, a testosterona aumenta rapidamente sob estímulo de hormônios gonadotrópicos da hipófise anterior (GUYTON e HALL, 2006), que ocorre devido ao aumento da secreção de LH. O fotoperíodo, ou seja, a duração dos períodos de luminosidade e escuridão estimula a secreção gonadal de esteróides sexuais. Com o passar da puberdade, as gonadotrofinas são secretadas o dia todo concluindo o desenvolvimento sexual (CORRADI et al., 2016), permanecendo assim na vida adulta, diminuindo apenas na senelidade (GUYTON e HALL, 2006).

Receptores de andrógeno (AR) e de estrógeno (ER) são caracterizados pela capacidade de reconhecer e ligar-se a elementos de resposta a hormônios específicos no DNA e aprimorar ou reprimir a transcrição do gene. Receptores de andrógenos são responsáveis por ações centrais e periféricas da testosterona e a di-hidrotestosterona (DHT), ou seja, ele é ativado após se ligar com a testosterona ou DHT (HANDA e WEISER, 2014). Tem função no desenvolvimento e manutenção da função sexual masculina, tem participação no processo de dimorfismo sexual, da modulação da função imunológica, para o desenvolvimento de tecidos

neurais (QUIGLEY, 1998) e tem um papel importante na modulação da expressão do gene de gonadotropina, interfere na inibição do *feedback* da testosterona (JEONG e KAISER, 2006).

O mecanismo endócrino nos machos ocorre com o hipotálamo secretando o GnRH e estimulando a hipófise a liberar LH e FSH. As gonadotrofinas entram na circulação sistêmica para atingir as gônadas. O LH estimula a secreção de testosterona, enquanto que o FSH estimula a espermatogênese (JEONG e KAISER, 2006).

A testosterona, quando elevada, tem efeito direto sobre o hipotálamo, reduzindo a secreção de GnRH, que inibe a secreção de LH e de FSH pela hipófise anterior. Essa redução no LH diminui a secreção de testosterona pelos testículos fazendo *feedback* negativo. Quando a testosterona está em baixas quantidades, ela induz o hipotálamo a secretar GnRH, aumentando a secreção de LH e FSH da hipófise anterior e aumentando a secreção de testosterona. Quando os túbulos seminíferos param de produzir espermatozóide, aumenta a secreção de FSH e quando a espermatogênese ocorre muito rápida, é estimulada a secreção de inibina que leva a hipófise a diminuir a secreção de FSH (GUYTON e HALL, 2006).

Deste modo, baseando-se nas características da fisiologia endócrina, diferenciação sexual, desregulação endócrina, metabolismos de substâncias químicas potencialmente prejudiciais à saúde reprodutiva, e tendo em consideração o potencial efeito desregulador endócrino das nanopartículas de sais de prata, este estudo visa contribuir com o entendimento dos mecanismos de interações e das AgNPs sobre a reprodução masculina em ratos intoxicados durante a fase pré púbere.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de nanopartículas de sais de prata sobre a função hipotalâmica-hipofisária-testicular de ratos tratados durante a fase pré-púbere.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da exposição à nanopartículas de sais de prata sobre o desenvolvimento corporal;

Avaliar o efeito da exposição à nanopartículas de sais de prata na idade e peso à puberdade;

Avaliar o efeito da exposição à nanopartículas de sais de prata na expressão de genes relacionados ao controle da função hipotalâmica-hipofisária-testicular, a partir da transcrição reversa, para a quantificação do mRNA no hipotálamo (*Gnrh*, *Esr1*, *Esr2*, *Ar*), hipófise (*Gnrhr*, *Lhb*, *Fshb*, *Esr1*, *Esr2*, *Ar*) e testículo (*Lhcgr*, *Fshr*, *Inhbb*);

Avaliar o efeito da exposição à nanopartículas de sais de prata sobre o perfil sérico hormonal de LH e FSH.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental.

Foram utilizados 60 ratos da linhagem Wistar com 21 dias de idade, provenientes do Biotério da Pontifícia Universitária Católica do Paraná. Os animais foram distribuídos em grupos de 5 animais, em caixas de polipropileno com uma camada de 5 cm de maravalha. Foram mantidos com ração comercial (Nuvilab CR-1, Nuvital, PR, Brasil) e água *ad libitum* em ambiente com ciclo de 12 horas claro/ 12 horas escuro e temperatura controlada (23 ± 1 °C). Todos os procedimentos estão de acordo com o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com animais da Universidade Estadual do Centro-Oeste (CEUA 013/2015).

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos, cada um consistindo de 12 animais: grupo 1 G1 - controle (recebendo somente água destilada), grupo 2 G2 - (15 µg/kg de AgNP), grupo 3 G3 - (7,5 µg/kg de AgNP), grupo 4 G4 - (3,75 µg/kg de AgNP), e grupo 5 G5 - (1,875 µg/kg de AgNP). Todos os animais foram identificados individualmente de acordo com o seu grupo. A dosagem de AgNP foi diluída em água destilada e administrada via oral por gavagem por volta das 7 horas com o volume de 0,25 mL/100g de peso corporal. Essa diluição foi realizada no dia da administração, para não modificação do tamanho das nanopartículas. A escolha das concentrações foram efetuadas a partir dos resultados apresentados anteriormente no grupo de pesquisa e descrito por Sleiman et al. (2013) e Mathias et al. (2014), partindo-se da menor dose que apresentou atraso na puberdade e diminuindo-se as doses pela metade sucessivamente por 3 vezes.

Os animais foram submetidos à administração das nanopartículas de sais de prata (AgNP, Sigma-Aldrich, catalog number 730815, na medida de 60 nm de diâmetro) do 23º dia de idade ao 59º dia de vida, em dias alternados. Aos 60 dias de idade foram eutanasiados e realizada a colheita de tecidos. A escolha da administração na pré-puberdade foi realizada em função de ser um período que corresponde à importante janela de sensibilidade reprodutiva, onde os hormônios estão sofrendo modificações que precedem a chegada da idade à puberdade (CORRADI et al., 2016).

Durante o experimento, os animais foram submetidos à pesagem diária para a avaliação do seu crescimento e para determinação da quantidade exata de AgNP a ser administrada, além da determinação de idade e peso à puberdade.

4.2 Avaliação da Puberdade.

A puberdade foi determinada utilizando como método a avaliação da separação balanoprepucial, que é a separação da mucosa prepucial e exteriorização da glândula peniana (KORENBROT et al., 1977). A monitoração iniciou no 33º dia de idade para todos os animais e foi realizada uma vez ao dia, até a constatação da separação da pele e exposição completa da glândula peniana. Neste momento, determinou-se a idade e o peso à puberdade.

4.3 Colheita e armazenamento.

Ao final dos 60 dias os animais foram anestesiados através da administração de 60 mg/kg de quetamina, 10 mg/kg de xilazina por via intraperitoneal.

Sangue

Após anestesiados, o sangue foi colhido por punção cardíaca e centrifugado a 3.500 rpm (Excelsa II 206 BL, São Paulo, SP, Brazil) por 15 min. O soro foi separado, acondicionado no eppendorf e mantido a -70 °C até as subseqüentes análises hormonais.

Colheita de tecidos

Após a colheita do sangue foram excisados a hipófise, o hipotálamo, os testículos, os epidídimos e a vesícula seminal, congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -70 °C até as subseqüentes análises.

4.4 Pesagem dos tecidos

A vesícula seminal, testículo e o epidídimo foram pesados com uma balança de precisão. A vesícula seminal foi pesada repleta de líquido e depois de ser drenada. Os epidídimos foram divididos em duas partes: cabeça e corpo juntos e cauda separadamente.

4.5 Identificação das alterações de expressão gênica pela quantificação do mRNA

Homogeneização e extração de RNA total

Os tecidos foram pulverizados em N₂ utilizando-se gral e pistilo, transferidos para eppendorfs e armazenados a -80 °C para posteriores análises. O RNA total foi extraído pelo método de guanidina-fenol-clorofórmio (CHOMCZYNSKI E SACCHI, 1987), foi através da utilização do Reagente Trizol[®] (Life Technologies, Carlsbad, USA).

Primeiramente foi adicionado 1.000 µL do Reagente Trizol[®] ao eppendorfs com amostra, homogeneizado no vórtex e então a amostra incubada durante 5 minutos em temperatura ambiente. O Trizol[®] rompe as células e conserva a integridade do RNA. Após, a adição de 200 µL de clorofórmio nos eppendorf, que foram agitados no vórtex por 15 segundos e incubados à temperatura ambiente durante 5 minutos. O clorofórmio produz separação em 3 fases: a parte inferior rosa, que é a fase orgânica; a parte média branca, que é o DNA; e a parte superior, transparente, que é o RNA.

Após a adição de clorofórmio, as amostras foram centrifugadas a 12,000 rcf X g durante 15 minutos a 4°C e removida a fase aquosa (RNA) da amostra, colocando a solução em um novo eppendorf sem interfase (DNA). Posteriormente foram adicionados 500 µL de isopropanol a 100% à fase aquosa, para a precipitação do RNA, e homogeneizado no vórtex por 10 segundos. As amostras foram então mantidas *overnight* a -20°C. Após, foram centrifugadas a 12,000 rcf X g durante 10 minutos a 4°C para precipitação do RNA e formação do *pellet* no fundo do eppendorf. O sobrenadante do tubo foi removido, deixando só o *pellet* e foi adicionado 500 µL de etanol a 75% aos eppendorfs, que foi novamente centrifugado a 12,000 rcf X g durante 5 minutos a 4°C. Foi descartada a lavagem e repetido o

processo do etanol. Após esse procedimento retirou-se o líquido, secando o *pellet* de RNA por aproximadamente 5 minutos. Para ressuspender o *pellet*, colocou-se 10 μL de água livre de RNase e homogeneizou a solução.

A concentração do RNA total foi estimada pela densidade óptica da solução, mensurando-se a absorvância em uma razão de 1,9 a 2,1 a 260 nm e o grau de pureza foi determinado pela razão $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$. Após a quantificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,2 % em tampão TBE, para análise da integridade do RNA e depois armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Reação de transcrição reversa

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*GoScriptTM Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA). Em cada tubo de amostra, adicionou-se 2,5 μg do RNA, 1 μL do oligo dT e 2,5 μL de água QSP do kit. As amostras foram ao termociclador a 70°C durante 5 minutos. Depois mantidas em gelo por 5 minutos para choque térmico.

Em um eppendorf separado, realizou-se o mix. Para uma reação foi utilizado 3,25 μL de água, 2 μL do GoScript 5x, 1 μL de MgCl_2 , 0,5 μL do dNTPs, 0,25 μL do RNasin e 0,5 μL do RT tendo um volume do mix de 7,5 μL que foi adicionado a cada amostra. Os eppendorf foram então aquecidos a 25°C por 5 minutos e encubados a 42° por 1 hora. Antes de proceder à análise com PCR, foi inativado a transcrição reversa a 70°C por 15 minutos. Para cada reação foram obtidos 10 μL de cDNA com concentração final estimada em 250 ng/ μL . As amostras foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até subseqüentes análises de PCR em tempo real.

Confecção dos oligonucleotídeos (Primers)

As condições de amplificação (concentrações de cDNA e *Primer*) já haviam sido padronizadas previamente em nosso laboratório, buscando-se a eficiência ideal entre 90 e 110 % (LIVAK E SCHMITTGEN, 2001). As sequências de referência dos transcritos dos genes de interesse 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. Os pares de oligonucleotídeos foram verificados quanto às 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 por 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 são mostrados os genes, as sequências dos oligonucleotídeos e o número da sequência de referência utilizada no NCBI.

Quadro 1 – *Primers Forward (F) e Reverse (R)* de cada gene utilizado para o ensaio de PCR real time e as respectivas sequências de referência.

| Gene | Oligonucleotídeo (5'-3') | NCBI |
|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------|
| <i>Gnrh</i> (Hormônio liberador de gonadotrofinas) | F: AGGAGCTCTGGAACGTCTGAT R: AGCGTCAATGTCACACTCGG | NM_012767.2 |
| <i>Gnrhr</i> (Receptor do hormônio liberador de gonadotrofinas) | F: GCTGCCTGTTCATCATCCCT R: CTGTAGTTTGCGTGGGTCCT | NM_031038.3 |
| <i>Lhb</i> (Hormônio luteinizante) | F: ATGAGTTCTGCCAGTCTGC R: GTGGGTGGGCATCAGAAGAG | NM_012858.2 |
| <i>Fshb</i> (Hormônio foliculo estimulante) | F: AAGTCGATCCAGCTTTGCAT R: GTCCCAGGCCTCTTACAGTG | NM_001007 597.1 |
| <i>Ar</i> (Receptor de andrógeno) | F: GCCATGGGTTGGCGGTCCTT R: AGGTGCCTCATCCTCACGCACT | NM_012502.1 |
| <i>Esr1</i> | F: CCATATCCGGCACATGAGTA | NM_012689.1 |

| | | |
|---------------------------------------------|------------------------------|-------------|
| (Receptor de estradiol 1) | R: TGAAGACGATGAGCATCCAG | |
| <i>Esr2</i> | F: CTCACGTCAGGCACATCAGT | NM_012754.1 |
| (Receptor de estradiol 2) | R: TGTGAGCATTTCAGCATCTCC | |
| <i>Lhcgr</i> | F: AGTGGAGCCTTCCAGGGGGC | NM_012978.1 |
| (Receptor de hormônio luteinizante) | R: AGGAAGACAGGGCGATGAGCGT | |
| <i>Fshr</i> | F: TCACTGGCTGTGTCATTGCTC | NM_199237.1 |
| (Receptor de hormônio folículo estimulante) | R: GAGATCTCTATTTTCTCCAGGTCTC | |
| <i>Rpl19</i> | F: CAATGAAACCAACGAAATCG | NM_031103.1 |
| (Proteína ribossomal L19) | R: TCAGGCCATCTTTGATCAGCT | |

Reação de quantificação por PCR em tempo real

A expressão dos genes relacionados ao eixo hipotalâmico-hipofisário foi avaliada pelo método de PCR quantitativo em tempo real a partir da transcrição reversa (RT-qPCR). O ensaio foi realizado pelo uso do kit Platinum SYBR Green PCR Master Mix (LifeTechnologies, CA, USA). Primeiramente foi realizado um mix onde foi colocado 5µL de Master Mix (2X), *Primer Ford* e *Primer Reverse* 20 µM e completado até 9µL do eppendorf de água. Na placa foi pipetado 1 µL da amostra de cDNA em cada pocinho e 9 µL do Mix. A placa foi devidamente fechada com o selo e colocada no equipamento para amplificação. A amplificação foi realizada com os recursos do equipamento Applied Biosystems Step One Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Singapore) nas seguintes condições de ciclo: 50°C (2 min.), 95°C (2 min.), e 40 ciclos de 95 °C (15 s) e 60°C (30 s). Ao final da reação, foi realizada a curva de dissociação para confirmar a especificidade da reação. Os valores médios de cyclethreshold (Ct) foram automaticamente determinados pelo Step One™ Software v 2.3 (Applied Biosystems) e a quantificação foi realizada pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, como previamente descrito (LIVAK E SCHMITTGEN, 2001).

4.6 Dosagens hormonais

O ensaio para a dosagem sérica de FSH e LH foi realizado através do kit comercial Lincoplex, Millipore, USA no Laboratório de Dosagens Hormonais da Genese Produtos Diagnósticos Ltda. Esse ensaio utiliza a tecnologia Luminex Corporation's xMAP™ (MAP=Multiple Analyte Profiling, x= analitos) que envolve um processo que cora internamente micro esferas de poliestireno com dois fluorocromos espectrais distintos. Cada esfera é conjugada a um anticorpo analito específico. Estas microesferas são então combinadas em um único poço de reação e podem dosar até 100 analitos simultaneamente. Posteriormente é realizada a adição do anticorpo de detecção biotinizado.

Cada conjunto de microesferas está acoplado com anticorpo de captura específico. O anticorpo de captura, por sua vez, liga-se ao analito específico e então o anticorpo de detecção biotinizado se liga ao analito específico. O resultado final é amplificado através de incubação com o conjugado estreptavidina-ficoeritrina (AS-PE reporter), que emite sinal fluorescente. As microesferas são lidas no equipamento Luminex 100 através de sistema duplo de lasers que incide sob as microesferas, à medida que estas fluem através do fluxo celular. Um feixe de laser detecta a microesfera (o código de cor específico para o ensaio) e o outro laser quantifica o sinal de reporter em cada microesfera. As microesferas passam através do fluxo celular Luminex; cada microesfera é identificada, e o sinal SA-PE associado a elas é quantificado.

4.7 Análise estatística

As variáveis foram primeiramente submetidas ao teste de normalidade de Kolmogorov–Smirnov e o teste de homocedasticidade de Bartlett. Aos dados que apontaram para a análise não paramétrica, foi utilizada a análise do Kruskal–Wallis seguida pelo pós-teste de Dunn. E quando os dados apontaram para análise paramétrica, foi utilizada ANOVA seguida pelo pós-teste de Dunnet. O crescimento foi avaliado pela ANOVA multivariada de variâncias (MANOVA) pelo modelo linear generalizado (GLM). Todas as análises foram

realizadas com o auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA). Foram consideradas diferenças estatísticas quando o valor de p foi menor que 0,05.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação do desenvolvimento corporal

A avaliação do peso corporal foi utilizada como indicador de diferença no desenvolvimento corporal entre os grupos em resposta ao tratamento na fase pré púbere com AgNP. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos durante o período experimental, mas houve uma diferença da idade em relação aos pesos (Gráfico 1).

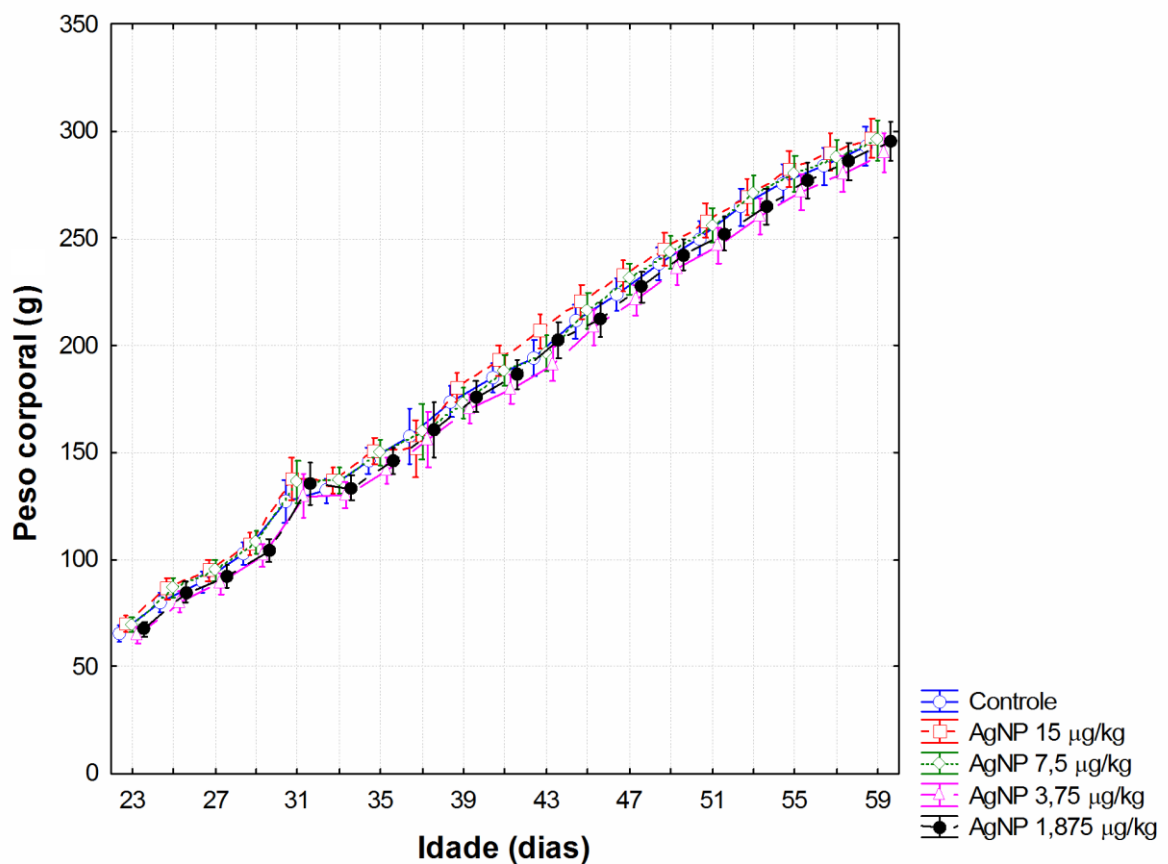


Gráfico 1. Peso corporal (g) no decorrer dos dias em ratos expostos ao AgNP durante o período pré-púbere.

5.2 Puberdade

Foi utilizado o método de separação balanoprepucial para se verificar os efeitos da AgNP na idade à puberdade. Notou-se um atraso na puberdade nos grupos de maior dose (15 e 7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$). O grupo tratado com 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ apresentou o maior peso à puberdade, possivelmente pelo fato de atingirem tardiamente a puberdade (Gráfico 2).

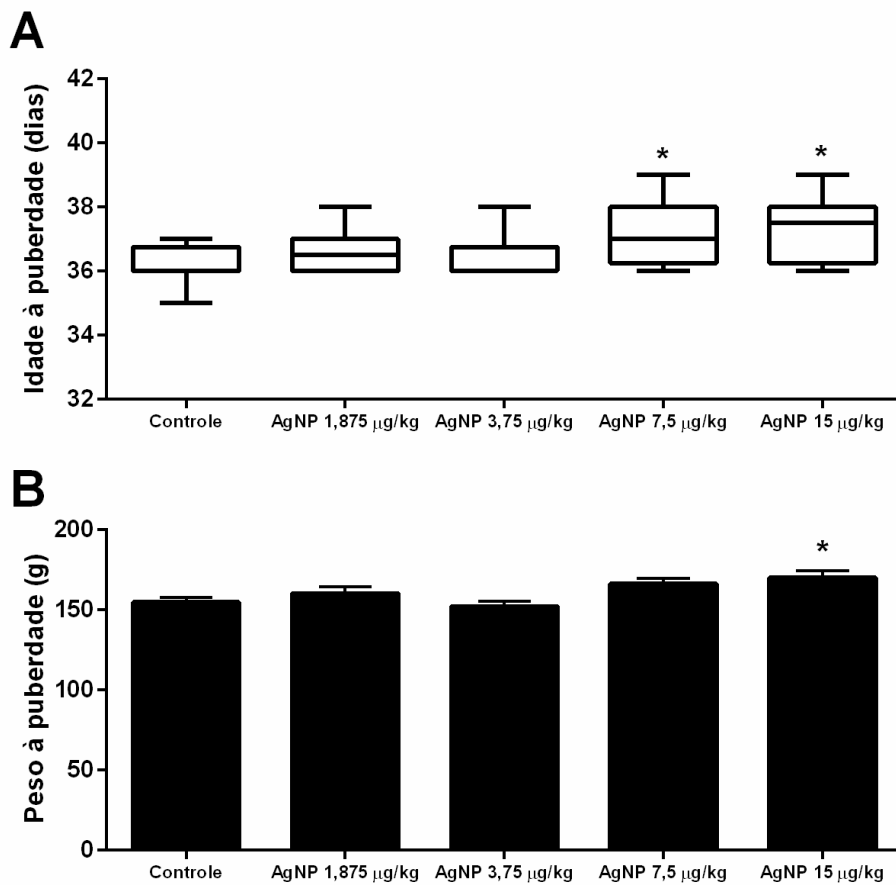


Gráfico 2. **A** Idade à puberdade (dias) e **B** peso à puberdade (g) em ratos expostos ao AgNP durante o período pré-púbere. O asterisco indica a diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$.

5.3 Peso dos tecidos

O peso dos tecidos foi avaliado para verificação do parâmetro de atividade androgênica. Apesar do estudo não ter apresentado diferença no peso do testículo quando comparado com o controle, no grupo com 1,875 µg/kg houve uma tendência a redução ($p = 0,1$) (Gráfico 3).

Os pesos da cabeça e corpo do epidídimo não mostraram diferença em relação ao controle. O mesmo em relação à cauda do epidídimo, apesar de o grupo de 7,5 µg/kg mostrar tendência $p = 0,07$ de redução (Gráfico 3).

Os pesos da vesícula seminal e o líquido seminal não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados (Gráfico 3).

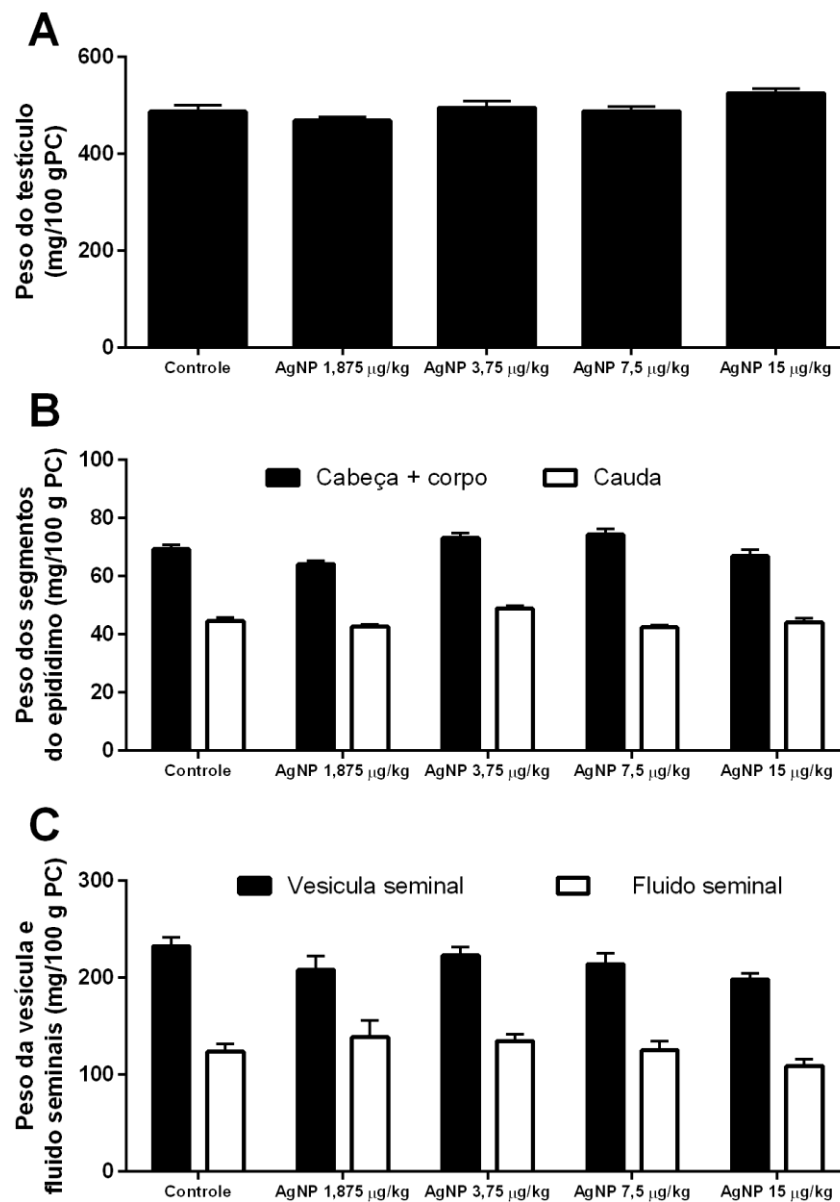


Gráfico 3. A Peso do testículo (mg); B Peso dos segmentos do epidídimo (cabeça+corpo e cauda) em mg; C Peso da vesícula e dos fluidos seminais (mg) em ratos expostos ao AgNP durante o período pré-púbere.

5.4 Expressão de genes relacionados ao controle da função hipotalâmica-hipofisária-testicular e perfil sérico hormonal.

A expressão relativa do *Gnrh* no grupo tratado com 3,75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ foi maior que o controle ($p < 0,05$). O grupo de 3,75 $\mu\text{g}/\text{kg}$, apresentou LH sérico mais elevado, com um $p < 0,05$. O FSH, mostrou-se aumentado no grupo com 1,875 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p < 0,05$). Não houveram diferenças nas avaliações de *Gnrhr*, *Lhb* e *Fshb* (Gráfico 4 e Quadro 2).

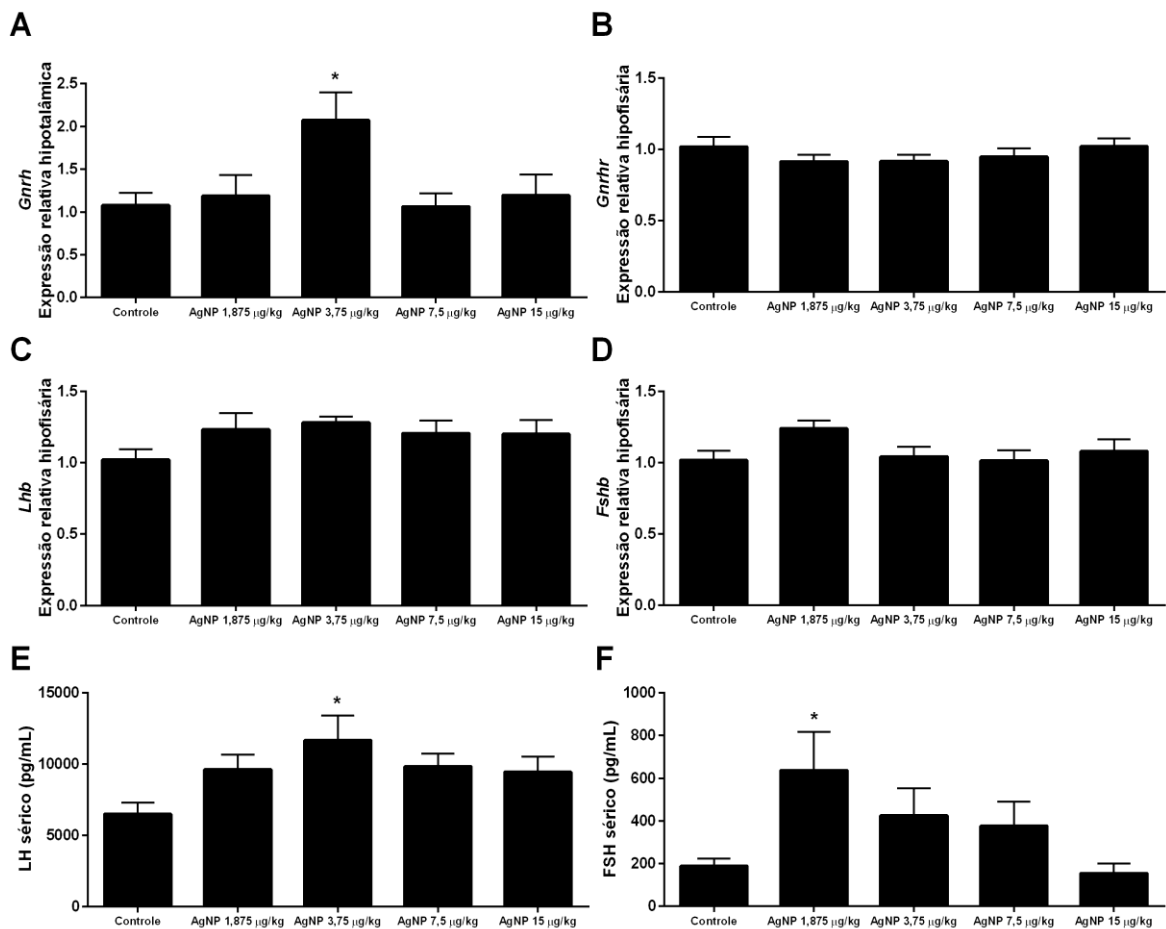


Gráfico 4. A Expressão relativa hipotalâmica do *Gnrh*; B Expressão relativa hipofisária do *Gnrhr*; C Expressão relativa hipofisária do *Lhb*; D Expressão relativa hipofisária do *Fshb*; E LH sérico (pg/mL); F FSH sérico (pg/mL) em ratos expostos ao AgNP durante o período pré-púbere. O asterisco indica a diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$.

A expressão do *Ar* na hipófise foi menor nos grupos tratados com 1,875, 3,75 e 7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AgNP que no controle ($p < 0,003$), enquanto a expressão do *Ar* no hipotálamo não mostrou diferença. O *Esr1* no hipotálamo foi reduzido no grupo de 7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p < 0,05$). No entanto, na hipófise não ocorreu esta diferença. A expressão do *Esr2* no hipotálamo nos grupos de 1,875, 3,75 e 7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AgNP também foi diminuída ($p < 0,01$). A *Esr2* na hipófise foi reduzida nos grupos 1,875 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p < 0,01$), 3,75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p < 0,001$) e 7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p < 0,05$). Não houve diferença no *Ar* no hipotálamo e no *Esr1* na hipófise como mostram o Gráfico 5 e o Quadro 2.

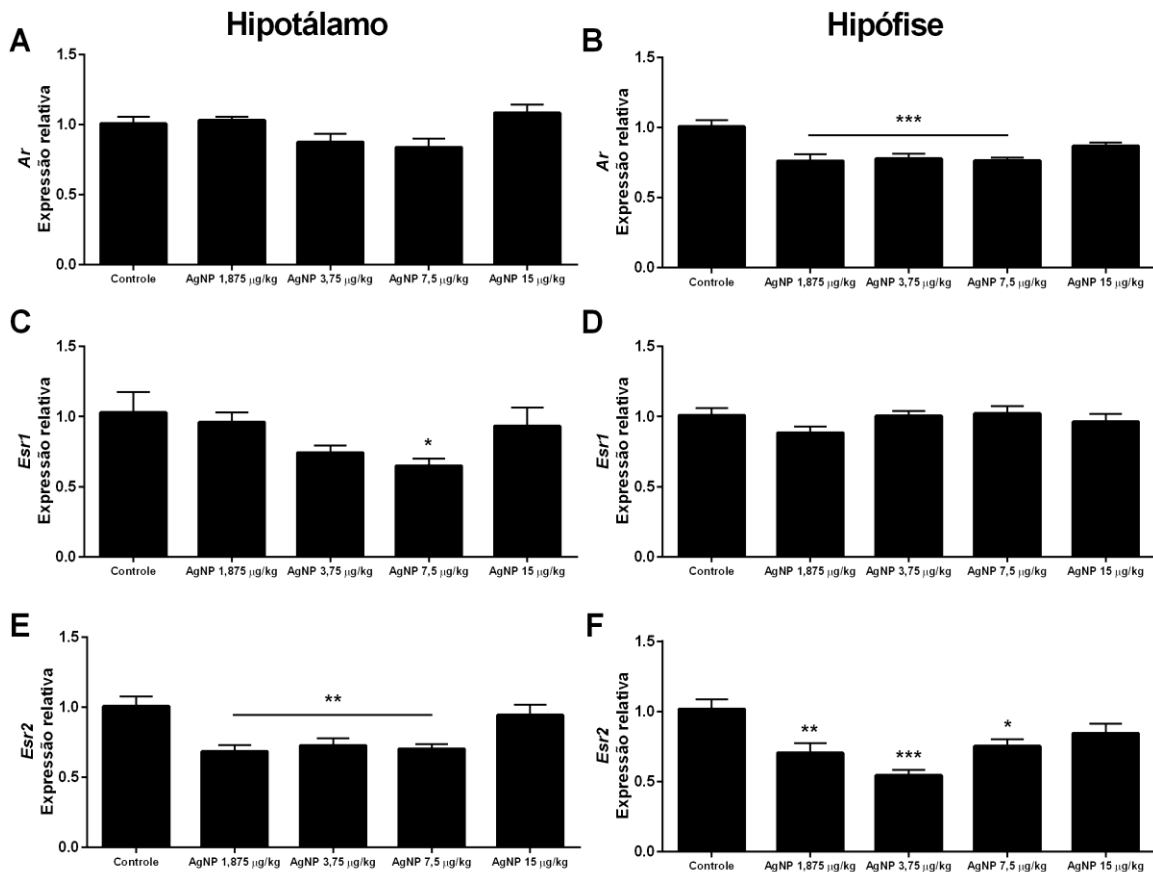


Gráfico 5. **A** Expressão relativa hipotalâmica do *Ar*; **B** Expressão relativa hipofisária do *Ar*; **C** Expressão relativa hipotalâmica do *Esr1*; **D** Expressão hipofisária relativa do *Esr1*; **E** Expressão relativa hipotalâmica do *Esr2*; **F** Expressão relativa hipofisária do *Esr2* em ratos expostos ao AgNP durante o período pré-púbere. Os asteriscos indicam a diferença significativa em relação ao controle, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,003$.

Com relação às expressões testiculares, houve aumento na *Inhbb* no grupo tratado com 7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p < 0,05$). Na avaliação de *Lhcgr* e de *Fshr* não foram encontradas diferenças significativas (Gráfico 6 e Quadro 2).

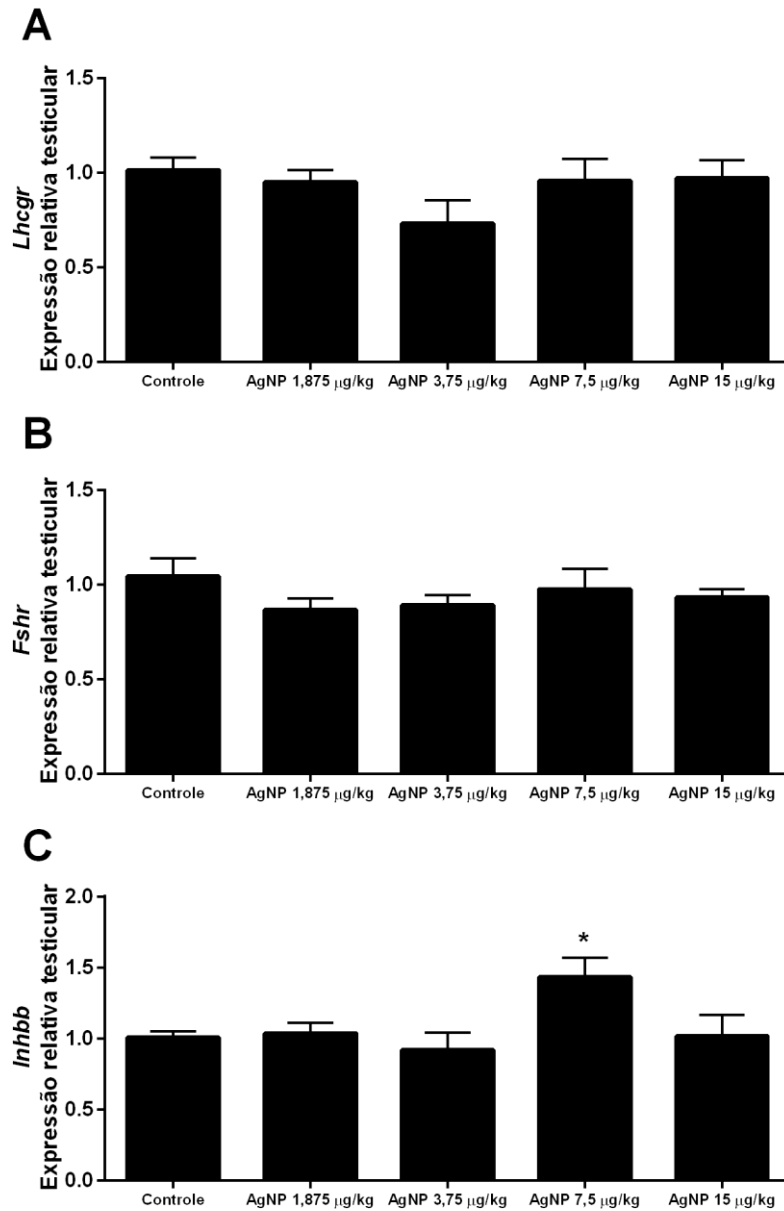


Gráfico 6. A Expressão relativa testicular *Lhcgr*; B Expressão relativa testicular *Fshr*; C Expressão relativa testicular da *Inhbb* em ratos expostos a AgNP durante o período pré-púbere. O asterisco indica a diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$.

| | Grupos | | | |
|----------|--------|-------|-------|----|
| | 1.875 | 3.75 | 7.5 | 15 |
| GnrhR | - | ↑ * | - | - |
| GnrhR | - | - | - | - |
| Lhb | - | - | - | - |
| Fshb | - | - | - | - |
| LH | - | ↑ * | - | - |
| FSH | ↑ * | - | - | - |
| Ar hpt | - | - | - | - |
| Ar hpf | ↓ *** | ↓ *** | ↓ *** | - |
| Esr1 hpt | - | - | ↓ * | - |
| Esr1 hpf | - | - | - | - |
| Esr2 hpt | ↓ ** | ↓ ** | ↓ ** | - |
| Esr2 hpf | ↓ ** | ↓ *** | ↓ * | - |
| Lhcgr | - | - | - | - |
| Fshr | - | - | - | - |
| Inhbb | - | - | ↑ * | - |

Quadro 2. Resumo de resultados da expressão relativa hipotalâmica (*Gnrh*, *Ar*, *Esr1* e *Esr2*), hipofisária (*Gnrhr*, *Lhb*, *Fshb*, *Ar*, *Esr1* e *Esr2*), testicular (*Lhcgr*, *Fshr* e *Inhbb*), LH sérico e FSH sérico em ratos expostos ao AgNP durante o período pré-púbere. Os asteriscos indicam a diferença significativa em relação ao controle, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,003$.

6. DISCUSSÃO

Os efeitos de AgNPs em ratos Wistars machos expostos no período pré-púbere, uma importante janela de diferenciação e sensibilidade reprodutiva. A fase pré-púbere é o período onde os neurônios GnRH no rato sofrem alterações morfológicas, ocorrendo uma série de modificações no eixo HHT, que alteramos níveis hormonais tanto séricos quanto celulares e que favorecem o início da puberdade animal (GUYTON e HALL, 2006; STOKER et al., 2000).

As AgNPs são capazes de funcionar como um potencial desregulador endócrino, principalmente em relação à espermatogênese (KIM et al., 2010; SLEIMAN et al., 2013; MATHIAS et al., 2014), mas ainda são poucos os trabalhos que relatam os efeitos sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal.

A escolha das concentrações foi baseada em estudos realizados em nosso laboratório que recebiam como sua menor dose de 15 µg/kg de AgNP e demonstraram que mesmo nessa dose houve alteração no desenvolvimento reprodutivo em ratos Wistar pré-púberes, como alterações nos parâmetros espermáticos no adulto, além de reduções na integridade do acrossomo, da membrana plasmática, da atividade mitocondrial e atraso na puberdade (MATHIAS et al., 2014; SLEIMAN et al., 2013).

A aferição do peso foi feita diariamente a partir de 21 até 60 dias de idade para a avaliação do seu crescimento, onde se observou que peso do crescimento dos animais não foi afetado pela AgNP (Gráfico 1). O mesmo foi encontrado em um estudo semelhante realizado por Sleiman et al. (2013) que apresentou efeitos reprodutivos de AgNPs em ratos tratados com 15, e 50 µg/kg de AgNPs e de Mathias et al. (2014), com 15 e 30 µg/kg.

Em coelhos utilizados como modelos, as nanopartículas de prata administrada intravenosa a 0,6 mg/kg por longo período, também não apresentaram nenhum efeito sobre o peso corporal. Mas com doses mais elevadas (125 mg/kg e 500 mg/kg de prata a 56 nm), observou-se uma diferença no crescimento linear (KIM et al., 2010). Isto demonstra que provavelmente doses mais elevadas podem influenciar no crescimento dos ratos.

Observou-se uma diferença da idade em relação aos pesos destes animais, mas não uma diferença entre os grupos e os pesos. Sabe-se que estado nutricional e o peso têm efeitos

na reprodução e na puberdade, e que algumas substâncias tóxicas administradas durante a puberdade podem resultar em reduções ou aumentos no peso corporal, e por isso, o peso corporal e estado metabólico no início da puberdade não podem ser descartados (STOCKER et al., 2000).

Esse estudo apresentou um atraso na puberdade nos grupos de maiores doses (15 e 7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) em relação ao controle (Gráfico 2). Desta maneira, o grupo tratado com 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ também apresentou a maior média de peso ao atingir a puberdade, pelo fato deles terem entrado mais tardiamente à puberdade, ou seja, animais mais velhos e conseqüentemente mais pesados. Sleiman et al. (2013) e Mathias et al. (2014), também encontraram um atraso na puberdade nos grupos de 15 e 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e de 15 e 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente. A liberação de pulso de GnRH duplica entre a infância até a puberdade do rato, liberando seus produtos para o sangue portal hipofisário, e quando há um contato com substâncias que desregulam essa liberação, podem atrasar ou adiantar a puberdade (STOCKER et al., 2000). Devido a isso, as AgNPs podem atrasar a puberdade em ratos quando submetidos a concentrações a partir de 7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

O sistema nervoso central (SNC) é o principal iniciador do início da puberdade em ratos (STOCKER et al., 2000). A separação do prepúcio do pênis a partir da glândula, separação baloprepucial, é um indicador da progressão da puberdade e isso ocorre entre 40 e 50 dias de idade (KORENBROT et al., 1977). O período de exposição mais sensível é durante o desenvolvimento embrionário e neonatal, mas a exposição durante o desenvolvimento a puberdade também pode produzir efeitos endócrinos e de desenvolvimento. As ações de FSH nas células de sertoli ajudam a coordenar o aparecimento e progressão da puberdade, mas o andrógeno é o principal condutor do processo (OJEDA E SKINNER, 2006). A puberdade aqui encontrada não foi influenciada pelo aumento significativo do FSH sérico no grupo tratado com 1,875 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AgNP.

A pesagem dos tecidos foi realizada para determinar o parâmetro de atividade androgênica. O peso testicular é influenciado pelo número de células de sertoli (SHARPE et al., 1998) e quem estabelece o número de célula de sertoli é o FSH (CORRADI et al., 2016). O crescimento das gônadas é influenciado pelas secreções dos hormônios. As alterações na secreção de hormônios da hipófise antecedem a maturação dos testículos e o crescimento testicular segue em paralelo com o aumento do FSH (OJEDA E SKINNER, 2006).

O peso do testículo não apresentou diferença significativa do grupo controle em relação aos grupos tratados, apesar do grupo com 1,875 µg/kg ter tendência a ser menor ($p=0,1$) (Gráfico 3). Do mesmo modo Gromadzka-Ostrowska et al. (2012) não encontrou diferença no peso do testículo. Apenas Sleiman et al. (2012) observaram um aumento aos 53 dias no peso do testículo no grupo com 50 µg/kg de AgNP, no entanto aos 90 dias, essa diferença não persistiu. Outras observações só contataram diferenças após 90 dias em uma dose considerada muito elevada, de 500 mg/kg (KIM et al., 2010).

A pesagem das porções dos epidídimos não demonstraram diferenças significativas em relação ao grupo controle (Gráfico 3) diferindo de estudos em ratos com a exposição de 15 e 50 µg/kg de AgNP, nos quais os pesos dos epidídimos diminuiu em ambos os grupos (SLEIMAN et al., 2013). Gromadzka-Ostrowska et al. (2012) também não encontraram diferenças entre os grupos em relação aos pesos dos epidídimos.

Em relação à vesícula seminal repleta e ao líquido seminal extraído, não houve diferença (Gráfico 3), mas no estudo de Sleiman et al. (2012), encontraram aos 53 dias de tratamento uma queda de peso da vesícula em relação ao controle ($p < 0,05$). Após os 90 dias essa diferença não foi mais detectada.

Alguns órgãos quando submetidos ao uso crônico de algumas substâncias podem apresentar alteração no seu peso. Quando o LH está elevado, ele pode provocar uma queda no peso dos animais (STOCKER et al., 2000). Nesse estudo não houve alterações dos pesos destes órgãos mesmo com um aumento significativo do LH sérico no grupo com 3,75 µg/kg de AgNP (Gráfico 4).

Alterações em ações de GnRH com substâncias que perturbam a ligação do receptor de GnRH, assim como os antagonistas que alteram entrada neural para os neurônios de GnRH, pode retardar a puberdade em ratos do sexo masculino (STOCKER et al., 2000). A pulsação do GnRH estimula a liberação do LH o qual, induz a secreção da testosterona (JEONG E KAISER, 2006), como visto neste estudo onde o aumento significativo da expressão do mRNA de *Gnrh* no grupo tratado com 3,75 µg/kg de AgNP, indicando que as AgNPs podem perturbar a função hipotalâmica.

FSH facilita e proporciona uma ótima função quantitativa ao testículo e tem capacidade de aumentar os receptores de LH (LHR) testicular (OJEDA E SKINNER, 2006),

que pode estar associada com o aumento do número de células de Leydig, em vez do aumento do número de LHR por célula (STOCKER et al., 2000). Em nosso estudo a concentração sérica do FSH sérico foi maior no grupo com 1,875 µg/kg de AgNP mas a expressão do *Lhcgr* não foi afetada.

Na hipófise o *Fshb* e *Lhb* são produzidas pela ligação entre GnRH e seu receptor (GnRHR) (JEONG E KAISER, 2006). Classificação limite para a produção hormonal é a transcrição de genes *Fshb* e *Lhb* que codificam. Assim, o contexto genômico e genético dos genes *Fshb* e *Lhb* afetam o perfil da produção hormonal. Grandes variações na expressão de *Lhb* podem levar a hipogonadismo, infertilidade e vários outros distúrbios endócrinos em ambos os sexos como pode ser observado em pacientes com mutações no gene *Lhb* (NAGIRNAJA et al., 2010). No presente estudo não foram encontradas diferenças significativas da expressão de mRNA do *Gnrhr*, *Fshb* e *Lhb*.

O receptor de FSH (FSHR) pode ser encontrado na membrana das células de sertoli no compartimento basal do epitélio seminífero, provavelmente para permitir o acesso de FSH a partir da circulação. Já o receptor de LH é encontrado nas células de Leydig onde intervém o LH no número de células de Leydig, na função e na esteroidogênese (O'DONNELL et al., 2006). A expressão do mRNA do *Fshr* e do *Lhcgr* nesta pesquisa não foram diferentes em relação ao controle.

Os androgênios são produzidos pelas células de Leydig e regulam a espermatogênese ligando se aos ARs intracelulares (O'DONNELL et al., 2006). Os ARs são responsáveis por ações centrais e periféricas da testosterona e a DHT, ou seja, são ativados após se ligar com a testosterona ou DHT (HANDA E WEISER, 2014) e a testosterona regula positivamente seu próprio receptor. Os ERs, assim como ARs, são membros da família de receptores de hormônios esteróides, e modulam a transcrição ligando-se a elementos de resposta ao estrogênio na região promotora de genes que respondem ao estrogênio. O testículo é o principal local de produção de estrogênio no macho. ER β (*Esr2*) atua para modular atividade de transcrição do ER α (*Esr1*), e a expressão relativa de ambos os subtipos é fundamental para determinar as respostas celulares a ligações estrogênicas (O'DONNELL et al., 2006).

Na hipófise ocorreu uma queda da expressão do mRNA do AR nos grupos de 1,875, 3,75 e 7,5 µg/kg e os mesmos grupos demonstraram valores menores na expressão do mRNA do *Esr2* em relação ao grupo controle. Já na hipófise, o *Esr1* diferiu no grupo de 7,5 µg/kg

sendo esse menor que o controle e o *Esr2* foi menor nos grupos de 1,875, 3,75 e 7,5 µg/kg. Esses resultados mostram que a AgNP em ratos altera a expressão gênica do hipotálamo e da hipófise.

A inibina é uma glicoproteína dimérica que inibe a secreção de FSH da hipófise (O'CONNOR et al., 2004). As células de sertoli adultas são capazes de produzir inibina em resposta ao FSH, indicando que as células de sertoli retêm certo grau de capacidade de resposta FSH. Existem duas formas de inibina, a inibina A e a inibina B (*Inhbb*). A regulação da produção de inibina B é mediada por uma interação entre FSH, células de sertoli, células de Leydig, e as células germinativas (O'DONNELL et al., 2006). No testículo a expressão do mRNA da *Inhbb* do grupo com 7,5 µg/kg foi aumentada.

Em estudos anteriores com diferentes doses de AgNP encontraram problemas com a espermatogênese, o peso e a puberdade em ratos. Neste estudo podem ser encontrados resultados que até em baixas doses afetam o eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular. Como esses produtos são encontrados em diversos produtos de consumo, como medicamentos, água, alimentos e cosméticos, estudos são importantes para auxiliar no entendimento de como essas substâncias podem provocar alterações na endocrinologia e reprodução de gerações futuras.

7. CONCLUSÃO

O tamanho de 60 nm é um tamanho relativamente grande comparado com o utilizado em outros estudos, e que por isso não se deve atribuir essa toxicidade somente ao tamanho. A exposição pré-pubere de AgNP em ratos altera a expressão gênica no hipotálamo do *Gnrh*, *Esr1* e *Esr2*, da hipófise o *Ar* e o *Esr2* e do testículo a *Inhbb*. Além da expressão gênica a AgNP também atrasa idade à puberdade nos machos e aumenta os níveis séricos do LH e FSH.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que as nanopartículas de prata mesmo em baixas concentrações provocam um desequilíbrio no funcionamento do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal em machos, provocando um desequilíbrio endócrino.

8. BIBLIOGRAFIA

- AHAMED, M.; ALSALHI, M. S.; SIDDIQUI, M. K. J. Silver nanoparticle applications and human health. **Clinica chimica acta**, v. 411, n. 23, p. 1841-1848, 2010.
- ASARE, N. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. **Toxicology**, v. 291, n. 1, p. 65-72, 2012.
- ASHARANI, P. V. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS nano**, v. 3, n. 2, p. 279-290, 2008.
- BACHLER, G.; VON GOETZ, N.; HUNGERBÜHLER, K. A physiologically based pharmacokinetic model for ionic silver and silver nanoparticles. **International journal of nanomedicine**, v. 8, p. 3365, 2013.
- BEER, C. et al. Toxicity of silver nanoparticles—nanoparticle or silver ion?. **Toxicology letters**, v. 208, n. 3, p. 286-292, 2012.
- BENN, T. M.; WESTERHOFF, P. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. **Environmental science & technology**, v. 42, n. 11, p. 4133-4139, 2008.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química nova**, v. 30, n. 3, p. 651, 2007.
- BUTTERMAN, W. C.; HILLIARD, Henry E. **Mineral commodity profiles: Silver**. P. 1-40, 2005.
- CARLSON, C. et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. **The journal of physical chemistry B**, v. 112, n. 43, p. 13608-13619, 2008.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.
- CORRADI, P. F.; CORRADI, R. B.; GREENE, L. W. Physiology of the Hypothalamic Pituitary Gonadal Axis in the Male. **Urologic Clinics of North America**, New York, v. 43, n. 2, p. 151-162, 2016.
- CREWS, D. Epigenetics and its implications for behavioral neuroendocrinology. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 29, n. 3, p. 344-357, 2008.
- DĄBROWSKA-BOUTA, B. et al. Influence of a low dose of silver nanoparticles on cerebral myelin and behavior of adult rats. **Toxicology**, v. 363, p. 29-36, 2016.
- DOBIAS, J.; BERNIER-LATMANI, R. Silver release from silver nanoparticles in natural waters. **Environmental science & technology**, v. 47, n. 9, p. 4140-4146, 2013.
- DREW, R.; HAGEN, T. Potential Health Risks Associated with Nanotechnologies in Existing Food Additives. p. 1-106, 2016.
- ELECHIGUERRA, J. L. et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. **Journal of nanobiotechnology**, v. 3, n. 1, p. 1, 2005.
- EMA, M.; GAMO, M.; HONDA, K. Developmental toxicity of engineered nanomaterials in rodents. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 299, p. 47-52, 2016.

- FABREGA, J. et al. Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. **Environment international**, v. 37, n. 2, p. 517-531, 2011.
- FARD, J.K.; JAFARI, S.; EGHBAL, M. A. A review of molecular mechanisms involved in toxicity of nanoparticles. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 5, n. 4, p. 447, 2015.
- FUNG, M. C.; BOWEN, D. L. Silver products for medical indications: risk-benefit assessment. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 119-126, 1996.
- FURTADO, L. M.; BUNDSCHUH, M.; METCALFE, C. D. Monitoring the fate and transformation of silver nanoparticles in natural waters. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 97, n. 4, p. 449-455, 2016.
- GARCÍA-ALONSO, J. et al. Cellular internalization of silver nanoparticles in gut epithelia of the estuarine polychaete *Nereis diversicolor*. **Environmental science & technology**, v. 45, n. 10, p. 4630-4636, 2011.
- GLIGA, A. R. et al. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. **Particle and fibre toxicology**, v. 11, n. 1, p. 1, 2014.
- GORE, A. C. et al. Introduction to endocrine disrupting chemicals (edcs) a guide for public interest organizations and policy-makers. **Endocrine Society**, p. 1- 56, 2014
- GORE, A. C. Introduction to endocrine-disrupting chemicals. **Endocrine-Disrupting Chemicals**. Humana Press, p. 3-8, 2007.
- GROMADZKA-OSTROWSKA, J. et al. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. **Toxicology letters**, v. 214, n. 3, p. 251-258, 2012.
- GUGGENBICHLER, J.-P. et al. A new technology of microdispersed silver in polyurethane induces antimicrobial activity in central venous catheters. **Infection**, v. 27, n. 1, p. S16-S23, 1999.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E.; GUYTON, A. C. Tratado de fisiologia médica. **Elsevier**, 2006.
- GUZMÁN, M. G.; DILLE, J.; GODET, S. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. **Int J Chem Biomol Eng**, v. 2, n. 3, p. 104-111, 2009.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Reprodução animal. **Reprodução animal**, 2004.
- HANDA, R. J.; WEISER, M. J. Gonadal steroid hormones and the hypothalamo–pituitary–adrenal axis. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 35, n. 2, p. 197-220, 2014.
- Iavicoli, I. et al. The effects of nanomaterials as endocrine disruptors. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 8, p. 16732-16801, 2013.
- JEONG, G. N. et al. Histochemical study of intestinal mucins after administration of silver nanoparticles in Sprague–Dawley rats. **Archives of toxicology**, v. 84, n. 1, p. 63-69, 2010.
- JEONG, K. H.; KAISER, U. B. Gonadotropin-releasing hormone regulation of gonadotropin biosynthesis and secretion. **Elsevier Inc.** p. 1635-1701, 2006.
- KALISHWARALAL, K. et al. Silver nanoparticles inhibit VEGF induced cell proliferation and migration in bovine retinal endothelial cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 1, p. 51-57, 2009.

- KIM, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 95-101, 2007.
- KIM, Y. S. et al. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. **Particle and fibre toxicology**, v. 7, n. 1, p. 1, 2010.
- KIM, Y. S. et al. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. **Inhalation toxicology**, v. 20, n. 6, p. 575-583, 2008.
- KORENBROT, C. C.; HUHTANIEMI, I. T.; WEINER, R. I. Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. **Biology of reproduction**, v. 17, n. 2, p. 298-303, 1977.
- KUIRI-HÄNNINEN, T.; SANKILAMPI, U.; DUNKEL, L. Activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in infancy: minipuberty. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 82, n. 2, p. 73-80, 2014.
- KULTHONG, K. et al. Determination of silver nanoparticle release from antibacterial fabrics into artificial sweat. **Particle and fibre toxicology**, v. 7, n. 1, p. 1, 2010.
- LAFUENTE, A. et al. Pubertal and postpubertal cadmium exposure differentially affects the hypothalamic-pituitary-testicular axis function in the rat. **Food and chemical toxicology**, v. 38, n. 10, p. 913-923, 2000.
- LANSDOWN, A. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. **Biofunctional textiles and the skin**. Karger Publishers, 2006. p. 17-34.
- LARESE, F. F. et al. Penetração de pele humana de nanopartículas de prata através da pele intacta e danificada. **Toxicologia**, v. 255, n. 1, p.33-37, 2009.
- LEBLANC, G. A.; BAIN, L. J.; WILSON, V. S. Pesticides: multiple mechanisms of demasculinization. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 126, n. 1, p. 1-5, 1997.
- LIN, Z.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; RIVIERE, J. E. Pharmacokinetics of metallic nanoparticles. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 7, n. 2, p. 189-217, 2015
- LIU, Wei et al. Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. **Nanotoxicology**, v. 4, n. 3, p. 319-330, 2010.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- MATHIAS, F. T. et al. Daily exposure to silver nanoparticles during prepubertal development decreases adult sperm and reproductive parameters. **Nanotoxicology**, v. 9, n. 1, p. 64-70, 2014.
- MUELLER, N. C.; NOWACK, B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. **Environmental science & technology**, v. 42, n. 12, p. 4447-4453, 2008.
- MUNGER, M. A. et al. In vivo human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2014.
- NAGIRNAJA, L. et al. Genomics and genetics of gonadotropin beta-subunit genes: unique FSHB and duplicated LHB/CGB loci. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 329, n. 1, p. 4-16, 2010.

- O'CONNOR, A. E.; DE KRETZER, D. M. Inhibins in normal male physiology. In: **Seminars in reproductive medicine**. New York, v. 22, n. 3, p. 177-185, 2004.
- O'DONNELL, L.; MEACHEM, S. J.; STANTON, P. G.; MCLACHLAN, R. I. Endocrine Regulation of Spermatogenesis. In: **Elsevier Inc.** p. 1017-1069, 2006.
- OGAR, A.; TYLKO, G.; TURNAU, K. Antifungal properties of silver nanoparticles against indoor mould growth. **Science of the Total Environment**, v. 521, p. 305-314, 2015.
- OJEDA, S.; SKINNER, M. K. Puberty in the rat. In: **Elsevier Inc.** 2006.
- PARK, E.-J. et al. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 30, n. 2, p. 162-168, 2010.
- PARK, K. et al. Bioavailability and toxicokinetics of citrate-coated silver nanoparticles in rats. **Archives of pharmacal research**, v. 34, n. 1, p. 153-158, 2011.
- PASCHOALINO, M. P. et al. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, 2010.
- PETHKAR, A. V.; PAKNIKAR, K. M. Thiosulfate biodegradation–silver biosorption process for the treatment of photofilm processing wastewater. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 855-860, 2003.
- QUIGLEY, C. A. The androgen receptor: physiology and pathophysiology. In: **Testosterone**. Springer Berlin Heidelberg, p. 33-106, 1998.
- REZAEI-ZARCHI, S.; TAGHAVI-FOUMANI, H.; NEGAHDARY, M. Effect of Silver Nanoparticles on the LH, FSH and Testosterone Hormones in Male Rat. **Journal of Babol University of Medical Sciences**, v. 15, n. 1, p. 25-29, 2013.
- ROGERS, J. V.; PARKINSON, C. V.; CHOI, Y. W.; SPESHOCK, J. L.; HUSSAIN, S. M. A preliminary assessment of silver nanoparticle inhibition of monkeypox virus plaque formation. **Nanoscale Res. Lett.** 3, 129-133, 2008.
- ROSÁRIO, F. et al. Death and cell cycle progression is differently conditioned by the AgNP size in osteoblast-like cells. **Toxicology**, 2016.
- SAMBERG, M. E.; OLDENBURG, S. J.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A. Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes in vitro. **Environmental health perspectives**, v. 118, n. 3, p. 407, 2010.
- SCHETTLER, T.; SOLOMON, G.; VALENTI, M.; HUDDLE, A. Generations at Risk. Reproductive Health and the Environment. **MIT Press**, p.414, 2000.
- SCHLUESENER, J. K.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: application and novel aspects of toxicology. **Archives of toxicology**, v. 87, n. 4, p. 569-576, 2013.
- SHAHARE, B.; YASHPAL, M.; SINGH, G. Toxic effects of repeated oral exposure of silver nanoparticles on small intestine mucosa of mice. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 23, n. 3, p. 161-167, 2013.
- SHARPE, R. M. et al. Abnormalities in functional development of the Sertoli cells in rats treated neonatally with diethylstilbestrol: a possible role for estrogens in Sertoli cell development. **Biology of reproduction**, v. 59, n. 5, p. 1084-1094, 1998.
- SHINOGI, M.; MAEIZUMI, S. Effect of preinduction of metallothionein on tissue distribution of silver and hepatic lipid peroxidation. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 16, n. 4, p. 372-374, 1993.

- SIQUEIRA, M. C. et al., Caracterização E Avaliação Da Toxicidade De Polimérica Para Uso Em Embalagens De Alimentos. **VII Workshop on Nanotechnology Applied to Agribusiness, Rede AgroNano**. p. 542-544, 2013.
- SIRONMANI, A.; DANIEL, K. Silver Nanoparticles-Universal Multifunctional Nanoparticles for Bio Sensing, Imaging for Diagnostics and Targeted Drug Delivery for Therapeutic Applications. **INTECH Open Access Publisher**, p. 465-488, 2011.
- SLEIMAN, H. K. **Efeitos reprodutivos de nanopartículas de sais de prata em ratos wistar expostos durante a puberdade**. 2012, (Mestrado em Farmácia), Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná, Guarapuava.
- SLEIMAN, H. K. et al. Effects of prepubertal exposure to silver nanoparticles on reproductive parameters in adult male Wistar rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 76, n. 17, p. 1023-1032, 2013.
- SOLOMON, G. M.; SCHETTLER, T. Environment and health: 6. Endocrine disruption and potential human health implications. **Canadian Medical Association Journal**, v. 163, n. 11, p. 1471-1476, 2000.
- SOUZA, G. D. de et al. Prata: Breve histórico, propriedades e aplicações. **Educación química**, v. 24, n. 1, p. 14-16, 2013.
- STOKER, T. E. et al. Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations. **Critical reviews in toxicology**, v. 30, n. 2, p. 197-252, 2000.
- STOKER, T. E. et al. The effect of atrazine on puberty in male Wistar rats: an evaluation in the protocol for the assessment of pubertal development and thyroid function. **Toxicological Sciences**, v. 58, n. 1, p. 50-59, 2000.
- SUNG, J. H. et al. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. **Toxicological Sciences**, v. 108, n. 2, p. 452-461, 2009.
- TERZUOLI, G. et al. In vitro effect of silver engineered nanoparticles on human spermatozoa. **Journal of the Siena Academy of Sciences**, v. 3, n. 1, p. 27-29, 2011.
- US EPA IRIS (1996). Silver (CASRN 7440-22-4) Oral RfD Assessment. **United States Environmental Protection Agency Integrated Risk Information System**.
- VAN DER ZANDE, M. et al. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. **ACS nano**, v. 6, n. 8, p. 7427-7442, 2012.
- WALDHAUSER, F. et al. Pulsatile secretion of gonadotropins in early infancy. **European journal of pediatrics**, v. 137, n. 1, p. 71-74, 1981.
- World Health Organization (WHO), State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals, p. 23-237, 2012.
- XUE, Y. et al. Acute toxic effects and gender-related biokinetics of silver nanoparticles following an intravenous injection in mice. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32, n. 11, p. 890-899, 2012.
- ZHOU, Y.-G.; REES, N. V.; COMPTON, R. G. The electrochemical detection and characterization of silver nanoparticles in aqueous solution. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 18, p. 4219-4221, 2011.