



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA  
ANIMAL**



**EFEITOS REPRODUTIVOS DA INJEÇÃO INTRATESTICULAR DE  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

**JULIANA LIS MENDES DE BRITO**

**TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF MARÇO/2019**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

JULIANA LIS MENDES DE BRITO

**EFEITOS REPRODUTIVOS DA INJEÇÃO INTRATESTICULAR DE  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Tese apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do Título de Doutor em  
Biologia Animal pelo Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Animal da  
Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Madeira Lucci

BRASÍLIA, 2019

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à minha orientadora professora Dra. Carolina Madeira Lucci. Por ter me ensinado tanto durante o Mestrado, e ainda querer me ensinar mais ainda durante os 4 anos do Doutorado. Por brigar nas horas necessárias, e escutar quando eu precisava também. Por sempre orientar da melhor forma possível, e fazer de tudo para que a nossa pesquisa sempre fosse feita da melhor forma.

Agradeço a todos os que ajudaram de alguma forma durante esses anos. Ao professor Dr. Ricardo Bentes de Azevedo, por sempre disponibilizar o laboratório para nossas necessidades, e por me indicar para fazer Doutorado sanduiche na Espanha. Agradeço ao aluno Mosar Corrêa pela ajuda, e a técnica Karen Rapp Py Daniel, pela disponibilidade em ajudar e tirar dúvidas sempre.

Ao professor Dr. Sérgio Moya do Centro de Investigación Cooperativa de Biomateriales, CIC biomaGUNE pela oportunidade de fazer parte do meu Doutorado na Espanha, pela bolsa de estudos do projeto Marie Curie HIGRAPHEN. A técnica de laboratório Dorleta Otaegui Ansa, pela análise por ICP do material.

Ao professor Dr. Marcelo Henrique Sousa, por disponibilizar o seu laboratório e equipamentos para o preparo da suspensão de nanopartícula utilizada, além de sempre estar disposto a tirar as minhas dúvidas e dar sugestões ao nosso trabalho.

Agradeço a professora Dra. Emília Celma de Oliveira, do Instituto de Química da UFG, que colaborou com o nosso trabalho com a síntese da nanopartícula utilizada no experimento piloto.

Ao professor Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior por ter disponibilizado o liofilizador para a secagem das amostras, e ao técnico Elias Ferreira Sabiá Junior do Laboratório de

Toxinologia do Instituto de Ciências Biológicas, por gentilmente ter realizado a liofilização das amostras.

A professora Dr. Mônica Pereira Garcia por ter permitido e disponibilizado o uso do microscópio EVOS, para a aquisição das imagens das lâminas. Agradeço também ao Veterinário responsável pelo biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UnB, Dr. Jivago por disponibilizar os animais utilizados, e pelo cuidado com os animais no biotério, e sempre pela amizade desde o mestrado. A técnica Ingrid Gracielle Martins da Silva, por sempre ajudar quando necessário em todas as análises e dúvidas. E também a Paolin Rocio Cáceres-Velez, pela análise por microscopia eletrônica de transmissão, pela amizade e toda ajuda durante o período na Espanha.

Agradeço em especial às amigas do grupo de Reprodução Animal, por todos os dias de trabalho, e por sempre estarem dispostas a ajudar. Marcella Motta, Cecibel León Félix, Vanessa Nicolau e Aline Ramos. E também aos professores colegas do departamento, Fábio Viegas Caixeta, Rafael Souto Maior, Andreza Fabro de Bem e seu aluno de mestrado Wembley.

As agências de fomento, CAPES e CNPq, e INCT, pelo auxílio financeiro.

Agradeço à minha família, meus pais e irmãos, por todo apoio e compreensão por todos esses anos. A minha esposa Vanessa por sempre me aguentar de mau humor e sempre me ajudar e me apoiar durante todos esses anos, e as minhas filhas amadas Natasha e Mel, por fazerem os meus dias mais alegres sempre. E também agradeço a todos os meus animais de estimação, que sempre deixam meus dias mais leves e divertidos.

“Experiência não é o que acontece com um homem;  
é o que um homem faz com o que lhe acontece.”

Aldous Huxley

## RESUMO

O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos de uma injeção intratesticular de nanopartículas de prata (AgNPs) sobre os parâmetros reprodutivos e a saúde de ratos, e avaliar a biodistribuição de AgNPs, visando o desenvolvimento de um potencial agente contraceptivo nanotecnológico. Vinte ratos Wistar receberam uma injeção de 220 µL de solução AgNP (0,46 µg Ag/mL) em cada testículo, e foram eutanasiados 7, 14, 28 e 56 dias após a injeção. A motilidade espermática mostrou uma diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) na porcentagem de espermatozoides móveis no grupo AgNP-D7 (8,8%) em comparação aos grupos Controle (73,3%), e tratamentos AgNP-D14 (86,0%), AgNP-D28 (68,2%) e AgNP-D56 (90,0%). O grupo AgNP-D7 também apresentou uma diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) na porcentagem de espermatozoides normais e um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) na morfologia anormal da peça média em comparação com todos os outros grupos, também um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) em morfologia patológica da cabeça do espermatozoide em comparação ao grupo controle. A análise histológica dos testículos permitiu a identificação de todas as células germinativas nos túbulos seminíferos, bem como os espermatozoides no lúmen dos túbulos para todos os grupos. A análise histológica do epidídimo mostrou que o grupo AgNP-D7 não apresentou espermatozoides nos túbulos, enquanto nos grupos AgNP-D14 e AgNP-D28 alguns espermatozoides são visíveis juntamente com alguns debrís. Todos os parâmetros tubulares avaliados foram significativamente menores ( $P < 0,05$ ) no grupo AgNP-D7 e no grupo placebo. Em geral, todos os animais apresentaram parâmetros hematológicos dentro dos limites de normalidade para a espécie. Todos os animais apresentaram valores bioquímicos de ureia e AST acima do limite normal para a espécie, embora sem correlação com o tratamento. A quantidade de Ag encontrada nos testículos diminuiu com o tempo e sua concentração no epidídimo foi irrelevante. A porcentagem de Ag encontrada nos órgãos sistêmicos sempre foi maior no fígado. Algum efeito tóxico agudo e grave em espermatozoides foi observado após a injeção intracelular de AgNPs, embora este efeito fosse reversível, incapaz de esterilizar os animais tratados. Não foram observados efeitos adversos na saúde dos animais.

**PALAVRAS-CHAVE:** toxicidade reprodutiva, morfologia espermática, motilidade dos espermatozoides, túbulos seminíferos, parâmetros sanguíneos.

## ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the effects of an intratesticular injection of silver nanoparticles (AgNPs) on reproductive parameters and health of rat models, and to evaluate AgNPs biodistribution, aiming at the development of a potential nanotechnological contraceptive agent. Twenty Wistar rats received an injection of 220  $\mu$ L of AgNP solution (0.46  $\mu$ g Ag/mL) in each testicle, and were killed 7, 14, 28 and 56 days after injection. The sperm motility shown a significant decrease ( $P < 0.05$ ) in the percentage of motile sperm in AgNP-D7 group (8.8%) in comparison to Control (73.3%), AgNP-D14 (86.0%), D28 (68.2%) and AgNP-D56 groups (90.0%). The AgNP-D7 group also present a significant decrease ( $P < 0.05$ ) in the percentage of normal spermatozoa and a significant increase ( $P < 0.05$ ) on abnormal morphology of mid piece compared to all other groups, also a significant increase ( $P < 0.05$ ) on pathological morphology of sperm head compared to the Control group. The histological analysis of the testicles allowed the identification of all germline cells in the seminiferous tubules, as well as spermatozoa in the lumen of the tubules for all groups. Histological analysis of the epididymis showed that AgNP-D7 group did not present spermatozoa in the tubules, whereas in AgNP-D14 and AgNP-D28 groups some spermatozoa are visible together with some debris. All tubular parameters evaluated were significantly smaller ( $P < 0.05$ ) on AgNP-D7 group and on Sham group. In general, all animals presented hematological parameters within the limits of normality for the species. All animals presented biochemical values of urea and AST higher than the normal limit for the species, although with no correlation to the treatment. The amount of Ag found in the testicles decreased with time, and its concentration in the epididymis was irrelevant. The percentage of Ag found in the systemic organs was always higher in the liver. Some acute and severe toxic effect in sperm cells was observed following intercellular injection of AgNPs, although this effect was reversible, not capable to neuter the treated animals. No adverse effects in animal's health was however observed.

**KEYWORDS:** reproductive toxicity, sperm morphology, sperm motility, seminiferous tubules, blood parameters.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Metodologia das injeções intratesticulares de AgNP. Um total de 220 µL de AgNP era injetado em cada testículo, sendo duas injeções de 110 µL cada em dois pontos distintos para obter uma melhor distribuição. ....	34
<b>Figura 2:</b> Delineamento experimental. Os 28 animais foram inicialmente divididos em 3 grupos: grupo controle (N=4), grupo placebo (N=4) e grupo tratamento (N=20), sendo que o grupo tratamento foi posteriormente subdividido em 4 sub-grupos (N=5 em cada) de acordo com o dia da eutanásia, a saber – 7 dias (AgNP-D7), 14 dias (AgNP-D14), 28 dias (AgNP-D28) e 56 dias (AgNP-D56) após a injeção. ....	35
<b>Figura 3:</b> Metodologia do processamento dos testículos e epidídimos. ....	36
<b>Figura 4:</b> Medidas túbulos seminíferos. Vermelho = área do túbulo e área da luz do túbulo. Verde = Diâmetro do túbulo. Azul = Diâmetro da luz do túbulo. Amarelo = Altura do epitélio. ....	37
<b>Figura 5:</b> Dados da caracterização das nanopartículas de prata (AgNP) utilizadas. A) Micrografia eletrônica de transmissão representativa da amostra utilizada, mostrando formato esférico/oval. B) Distribuição por intervalo de tamanho (em nm) baseado nas medidas feitas por microscopia eletrônica de transmissão. C) Características das AgNP obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (tamanho), DLS (diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão – PDI) e potencial Zeta.....	40
<b>Figura 6:</b> Peso corporal diário de todos os animais dos grupos controle, placebo, AgNP-D7, AgNP-14, AgNP-D28 e AgNP-D56.....	41
<b>Figura 7:</b> Porcentagem (média ± DP) de espermatozoides móveis no lavado epididimário em cada grupo no dia da eutanásia. A,B - letras diferentes indicam diferença significativa entre colunas (P<0,05).....	44
<b>Figura 8:</b> Porcentagem de espermatozoides normais e com patologia por região espermática, em cada grupo no dia da eutanásia. A,B - letras diferentes indicam diferença significativa entre colunas (P<0,05).....	44
<b>Figura 9:</b> Fotomicrografias dos túbulos seminíferos de cada grupo. Grupo de controle (a); Grupo placebo (b); AgNP-D7 (c); AgNP-D14 (d); AgNP-28 (e); AgNP-D56 (f). (Barras = 10µm).....	48
<b>Figura 10:</b> Fotomicrografias do epidídimo de cada grupo. Grupo de controle (a); Grupo placebo (b); AgNP-D7 (c); AgNP-D14 (d); AgNP-28 (e); AgNP-D56 (f). Barras = 10µm). ....	49



**Figura 11:** Quantidade média ( $\pm$ DP) de prata ( $\mu$ g) nos  $\acute{o}$ rg $\tilde{a}$ os dos animais tratados com AgNP nos dias 7, 14, 28 e 56 ap $\acute{o}$ s a inje $\tilde{c}$ o $\tilde{a}$ o intratesticular, mensurada por ICP-MS. A,B - letras diferentes indicam diferen $\tilde{c}$ a significativa entre colunas (P<0,05). ..... 52

**Figura 12:** Distribuic $\tilde{a}$ o percentual de toda a prata (Ag) encontrada em rim, ba $\tilde{c}$ o, pulm $\tilde{o}$ es e f $\tilde{i}$ gado dos animais tratados com AgNP nos dias 7, 14, 28 e 56 ap $\acute{o}$ s a inje $\tilde{c}$ o $\tilde{a}$ o intratesticular. A,B - letras diferentes indicam diferen $\tilde{c}$ a significativa entre colunas (P<0,05). ..... 52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Peso relativo dos testículos e epidídimos e volume testicular (média ± DP) de cada grupo, obtidos no dia da eutanásia.....	42
<b>Tabela 2:</b> Peso relativo (g) dos órgãos (média ± DP) de cada grupo, obtidos no dia da eutanásia. ....	43
<b>Tabela 3:</b> Valores hematológicos médios (± DP) em sangue periférico (mínimo e máximo) por grupo no dia da eutanásia. ....	46
<b>Tabela 4:</b> Valores bioquímicos médios (± DP) no plasma sanguíneo (mínimo e máximo) por grupo no dia da eutanásia. ....	47
<b>Tabela 5:</b> Morfometria dos túbulos seminíferos (média ± DP) na análise histológica dos testículos de todos os grupos. ....	50

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	11
2.1. Animais errantes .....	11
2.2. Sistema reprodutor masculino .....	13
2.2.1. Espermatogênese .....	14
2.3. Métodos de esterilização.....	16
2.3.1. Castração cirúrgica .....	18
2.3.2. Castração química.....	19
2.4. Nanotecnologia .....	23
2.4.1. Nanopartículas .....	24
2.4.2. Nanopartículas de prata (AgNPs).....	25
2.5. Efeitos reprodutivos da exposição a AgNPs.....	28
3. JUSTIFICATIVA.....	30
4. OBJETIVOS.....	31
4.1. Objetivos Específicos .....	31
5. EXPERIMENTO PRELIMINAR .....	32
6. MATERIAL E MÉTODOS .....	33
6.1. Nanopartícula de prata .....	33
6.2. Desenho experimental.....	33
6.3. Coleta e processamento dos órgãos .....	35
6.4. Processamento histológico.....	36
6.5. Determinação da concentração de prata nos órgãos .....	37
6.6. Análises hematológicas.....	38
6.7. Tratamento Estatístico .....	38
7. RESULTADOS.....	40

8. DISCUSSÃO.....	53
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
10. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	60
APÊNDICE A – Resultados do estudo preliminar.....	74

## 1. INTRODUÇÃO

Animais abandonados podem afetar negativamente a população de diversas formas causando riscos à saúde por ataques, mordidas, queixas de incômodo, atropelamentos, predação de animais selvagens, urina e fezes nas ruas, e transmissão de zoonoses (HAUGHIE, 2001; SLATER, 2001; 2002; SLATER e SHAIN, 2005; FAO, 2014).

É muito difícil saber exatamente quantos animais estão abandonados, a estimativa é de que no mundo existam cerca de 200 milhões de cães e 600 milhões de gatos (WHO, 2017), sendo que 37,1 milhões de cães e 22,3 milhões de gatos apenas no Brasil. Grande parte desses animais são abandonados na rua por seus donos, e nessa situação já existem mais de 4 milhões (IBGE, 2013). O curto período de gestação das fêmeas, e a capacidade reprodutiva dos machos desde a puberdade até o final de sua vida, são fatores que determinam o aumento da população de animais abandonados, permitindo um alto número de filhotes durante a sua vida. Qualquer redução temporária nos níveis populacionais acaba sendo compensada pelo aumento da reprodução e das taxas de sobrevivência entre os cães restantes (FAO, 2014).

A principal forma de controle populacional destes animais está associada com a castração. A forma de esterilização cirúrgica mais utilizada é a retirada total das gônadas, ovariectomia em fêmeas e orquiectomia em machos, porém, não é um método totalmente eficaz por ser mais caro, os animais necessitam de um pós-operatório, e não ser capaz de atender um número muito grande de animais. Os métodos não cirúrgicos de castração surgem, então, como métodos adicionais e promissores para o controle populacional. Um protocolo não cirúrgico seguro, eficaz, acessível, permanente, e administrado por uma única dose ou injeção seria a alternativa ideal para o método castrativo em cães e gatos (CATHEY e MEMON, 2010).

O campo da nanotecnologia está crescendo rapidamente devido aos seus diversos benefícios de utilização (JOHNSTON *et al.*, 2010). As propriedades únicas das nanopartículas de prata (AgNPs) tem chamado atenção das indústrias (PULIT-PROCIAK e BANACH, 2016).

Estas AgNPs possuem efeitos tóxicos já conhecidos, causados por meio de injeções endovenosas, diminuindo o número de espermatozoides e danificando células germinativas (KOMATSU *et al.*, 2008; GROMADZKA-OSTROWSKA *et al.*, 2012; GARCIA *et al.*, 2014). A utilização de uma injeção de AgNPs local, como a injeção intratesticular, pode causar um dano mais severo aos testículos, podendo talvez ser permanentes. Assim, nesta tese o objetivo foi investigar se a injeção intratesticular de AgNP poderia funcionar como uma nova alternativa de esterilização, simples e eficaz. Esta é a primeira vez que a abordagem de usar nanopartículas, especificamente AgNPs, para este fim está sendo investigada, tornando este estudo inovador.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Animais errantes**

Cães e gatos possuem aspectos importantes na sociedade, principalmente como animais de companhia e proteção (FECAVA, 2009; FAO, 2014). Estes animais fazem parte do convívio com humanos aproximadamente há 15 mil anos, como animais de estimação acarretam benefícios à sociedade, mas necessitam de cuidados veterinários frequentes, mantendo a saúde e o bem-estar destes animais e seus donos (ICAM, 2008; MACPHERSON, 2013). Em diversos países o número de animais abandonados ou errantes, sem vacinação e cuidados tem aumentado, gerando uma maior preocupação com a saúde pública dos animais e dos seres humanos (FAO, 2014). Em grande parte dos países, não existem cultura nem políticas de posse responsável de companhia, e como para manter a saúde e o bem estar desses animais podem existir custos elevados, alguns são abandonados pelos seus tutores, aumentando o número de animais errantes, uma população que cresce exponencialmente devido a sua alta taxa reprodutiva (KRUSE *et al.*, 2004).

Os números exagerados de animais em condições de abandono geram problemas de bem-estar e saúde pública (FAO, 2014). O número de zoonoses aumenta, dentre elas a raiva, a leishmaniose, a toxoplasmose, as infecções transmitidas pelo carrapato e os parasitas intestinais. A porcentagem de atropelamentos, ataques contra humanos, predação de animais silvestres e dispersão de lixo, também são transtornos que aumentam de forma considerável. Além disso, o acúmulo de resíduos destes animais, como urina e fezes, que são um incômodo maior do que apenas um problema estético, acrescentando a transmissão de parasitas entre os animais e para humanos (ICAM, 2008; ASPCA, 2009; MACPHERSON, 2013). Não é possível ainda determinar a quantidade exata de animais em situação de abandono atualmente no mundo, o que existem são estimativas. A estimativa mundial é de que existam 600 milhões de cães, e 200 milhões de gatos, sendo que em torno de 200 milhões e 22 milhões respectivamente estão

em situação de abandono (WHO, 2017). O maior problema relacionado à população de animais abandonados é o seu alto potencial reprodutivo. Por exemplo, considerando um casal de gatos gerando 8 filhotes em um ano, em 7 anos eles podem dar origem a 174.760 descendentes (considerando 50% de fêmeas e sem mortalidade dos filhotes), mesmo que cada descendente se reproduza apenas no primeiro ano. Este número aumenta (para 781.250) se considerar que as fêmeas continuem gerando 8 filhotes a cada ano durante os 7 anos (OLSON e JOHNSTON, 1993). Existe também uma página da internet<sup>1</sup> que calcula a estimativa do número de gatos produzidos a partir de um casal em até 10 anos, considerando taxas de mortalidade, tamanho da ninhada, quantas fêmeas nascem por ninhada, etc.

O controle reprodutivo destes animais pode ser capaz de reduzir de forma significativa esta superpopulação limitando a reprodução indesejada, sendo o foco principal do governo de diversos países, que vem definindo de melhor forma as políticas de controle populacional, buscando a eficiência e o bem-estar dos animais (HIBY *et al.*, 2011; ACC&D, 2013; FAO, 2014).

O processo de eutanásia de animais errantes é um método utilizado que ainda é aceito em algumas partes do mundo, porém por ser contra questões humanitárias é uma técnica que tem diminuído muito (ACC&D, 2013). No Brasil, por exemplo, a eutanásia já não é mais realizada como forma de controle populacional, existem leis estaduais que completam 10 anos de existência, e reportagens<sup>2</sup> que mostram como essas leis e o apelo popular mudaram essa conduta. Atualmente a eliminação de cães e gatos ocorre apenas nos casos em que esses animais apresentam doenças graves ou infectocontagiosas incuráveis e que ponham em risco a saúde humana, sendo esta eutanásia justificada por laudo, evitando o extermínio de animais saudáveis.

---

<sup>1</sup> <https://calculate-this.com/420000-kittens-unspayed-cat-kitten-calculator>

<sup>2</sup> <https://emais.estadao.com.br/blogs/comportamento-animal/fim-da-carrocinha-comemora-10-anos/>



Assim, políticas de controle populacional passaram a ser melhor definidas, de forma eficiente e sem causar sofrimento aos animais (FAO, 2014).

Para o controle destes animais, além da eutanásia, outras políticas de controle são programas de adoção responsável de animais abandonados, conscientização populacional para castração, e projetos de castração destes animais. Uma técnica utilizada atualmente é denominada captura, castração e soltura, onde os animais são capturados, castrados e marcados, e soltos de volta ao ambiente. Esta técnica já é utilizada em alguns países como Canadá, Estados Unidos e Reino Unido, e pode trazer benefícios a saúde dos animais e humana (MACPHERSON *et al.*, 2013), sendo que a longo prazo contribui pra desacelerar o aumento da população.

Manter o controle reprodutivo pode diminuir também os comportamentos sexuais, as doenças sexualmente transmissíveis, assim como ajudar a alcançar e manter a cobertura das vacinações. Controlar os agentes infecciosos é mais fácil quando existe o controle da população de cães, da doença de forma direta e das vacinações (MACPHERSON *et al.*, 2013). Castrar os animais machos é imprescindível para o controle de populações de rua, uma vez que um único macho é capaz de acasalar com várias fêmeas, além de produzir espermatozoides da puberdade até o fim da vida e ininterruptamente.

## **2.2. Sistema reprodutor masculino**

O sistema reprodutor masculino é composto por dois testículos, ductos, glândulas acessórias e estruturas de suporte. Os ductos incluem os epidídimos, canal do ducto deferente e a uretra. As glândulas acessórias são as vesículas seminais, a próstata, e as glândulas bulbouretrais. As estruturas que dão suporte ao sistema reprodutor masculino são o escroto e o pênis. Os testículos e epidídimos, local onde ocorre o desenvolvimento e maturação dos espermatozoides, se localizam fora da cavidade abdominal, dentro da bolsa escrotal, onde

mantem uma temperatura mais baixa do que a corporal, que é essencial para a formação e maturação de espermatozoides viáveis (VANPUTTE *et al.*, 2014).

O epidídimo é um túbulo de aproximadamente 6 metros em humanos, e é onde os espermatozoides completam a sua maturação, se tornando funcionais. Os testículos são divididos internamente em lóbulos, e tem cerca de 90% do seu volume ocupado pelos túbulos seminíferos (SCANLON e SANDERS, 2007). Entre os túbulos seminíferos, no tecido intersticial, encontram-se as células de Leydig, responsáveis pela produção de testosterona. Internamente, os túbulos seminíferos possuem células de duas origens: as células de Sertoli e as células da linhagem germinativa.

As células de Sertoli, dentro do túbulo seminífero, formam junções oclusivas entre si, o que delimita os compartimentos basal e adluminal. Estas junções estabelecem a chamada barreira hematotesticular. Esta barreira impede que as substâncias presentes no sangue passem entre as células para ganharem entrada no lúmen do túbulo seminífero, desta forma apenas as moléculas selecionadas podem passar pelas células de Sertoli, e assim alcançar o líquido intratubular. A barreira também impede que anticorpos entrem em contato com os espermatozoides altamente diferenciados (SHERWOOD, 2013). A produção de espermatozoides, que ocorre dentro dos túbulos seminíferos, é chamada espermatogênese.

### **2.2.1. Espermatogênese**

A espermatogênese é um processo de diferenciação celular das espermatogônias até os espermatozoides. Estas células são essenciais para a manutenção da fertilidade em machos garantindo a perpetuação da espécie (PRYOR *et al.*, 2000). A espermatogênese é um processo complexo que envolve a divisão mitótica e meiótica bem como o desenvolvimento celular, e pode ser dividida em três fases principais: (1) proliferação e diferenciação de espermatogônias,

(2) meiose e (3) espermiogênese, transformação das espermatídes redondas em espermatozoides (SHARMA e AGARWAL, 2011).

A espermatogênese é uma sequência altamente organizada e complexa de eventos de desenvolvimento que produzem gametas geneticamente distintos para a fertilização. No macho, este processo tem seu início na puberdade e continua ao longo de toda a vida do indivíduo. Ocorre no lúmen dos túbulos seminíferos (SHARMA e AGARWAL, 2011; ESTEVES e MIYAOSKA, 2015). O tempo necessário para o processo de espermatogênese varia de acordo com cada espécie e demora cerca de 64 dias em humanos, 50 dias em ratos, 62 dias em cães e 46,8 dias em gatos (ADLER, 1996; FRANÇA e GODINHO, 2003; PETERSON e TALCOTT, 2012).

A espermatogênese tem início com a multiplicação das espermatogônias por mitose, que em seguida entram em meiose, duplicando seus cromossomos. Este processo, que ocorre no compartimento basal, e as células com DNA duplicado são denominadas espermatócitos primários. Os espermatócitos primários migram para o compartimento adluminal, um compartimento adequado para as divisões meióticas, e passa pela primeira divisão meiótica, tornando-se espermatócito secundário. O processo de mudança para o espermatócito secundário divide os cromossomos, transforma uma célula  $2n$  em uma célula  $n$ , ainda com cada cromossomo possuindo 2 cromátides. Assim os espermatócitos secundários sofrem a segunda divisão meiótica, onde ocorre a separação das cromátides irmãs, dando origem às espermatídes (SHARMA e AGARWAL, 2011). As espermatídes passam pelo processo de espermiogênese. Para isso algumas mudanças morfológicas ocorrem assim que a meiose se completa. O complexo de Golgi e as mitocôndrias se desenvolvem e diferenciam. As espermatídes continuam presas à membrana apical das células de Sertoli, até a completa transformação em espermatozoides. Durante este processo as espermatídes perdem grande parte do seu citoplasma. Uma vesícula acrossomal é criada, assim como o corpo cromatíde, que se

desenvolve no polo oposto ao dessa vesícula. Aparecem então o centríolo proximal e o filamento axial. A formação do acrossoma se completa, e a peça intermediária e a cauda se desenvolvem. Uma condensação progressiva do núcleo ocorre com a inativação do genoma. E assim o espermatozoide é formado, e liberado na luz do túbulo seminífero junto com o líquido secretado (SCHATTEN e CONSTANTINESCU, 2007; SILVERTHORN, 2010; SHARMA e AGARWAL, 2011).

A espermatogênese é dividida em ciclos, denominados ciclos do epitélio seminífero. O ciclo do epitélio seminífero é caracterizado como um evento temporal e sequencial de alterações, levando à progressão da espermatogênese em uma determinada área do túbulo seminífero (LARA *et al.*, 2018). O ciclo do epitélio seminífero também pode ser definido como o intervalo entre o início de um processo de espermatogênese e o próximo ocorrendo num mesmo trecho de túbulo seminífero, e geralmente leva  $\frac{1}{4}$  do tempo total da espermatogênese. Além disso, diferentes trechos de túbulo seminífero não possuem o processo de espermatogênese sincronizado entre si, o que é denominado onda espermatogênica. Ao contrário, cada sessão de túbulo encontra-se num estágio da espermatogênese ligeiramente adiantado ou atrasado em relação à sessão subjacente. Estes dois eventos juntos, ciclo do epitélio seminífero e onda espermatogênica, garantem a produção espermática contínua e diária em qualquer macho púbere (HESS e FRANCA, 2008).

### **2.3. Métodos de esterilização**

Existem diversos métodos de esterilização que visam interromper a produção de espermatozoides em machos: métodos cirúrgicos como a retirada dos testículos (orquiectomia) e a oclusão dos ductos (vasectomia), e métodos não cirúrgicos como terapias hormonais (andrógenos e agonistas de GnRH), imunoesterilização e a esterilização química (revisado por OLIVEIRA, 2012c).

As terapias hormonais utilizam hormônios esteroides exógenos para a supressão temporária da fertilidade, inibindo a produção dos hormônios endógenos, agindo diretamente no bloqueio de eventos mediados por receptores hormonais ou indiretamente via mecanismos de feedback negativo (KUTZLER e WOOD, 2006; CATHEY e MEMON, 2010).

O método de imun contracepção (imunoesterilização ou imunocastração) é utilizado para controlar o próprio sistema imunológico do corpo inibindo a fertilidade por meio de vacinas contraceptivas que induzem a resposta imune, induzindo a produção de anticorpos pelo animal, que irão agir contra os endógenos próprios (hormônios reprodutivos e proteínas) e neutralizar a atividade dos mesmos e inibir o processo de reprodução (WSPA, 2007; CATHEY e MEMON, 2010). A Imun contracepção via vacinação contra GnRH, o receptor do hormônio luteinizante (LH), ou zona proteínas pelúcidas também são possíveis (KUTZLER e WOOD, 2006).

Injeções intratesticulares vem sendo investigadas por mais de seis décadas, como método de esterilização de machos, afetando diretamente a espermatogênese. O procedimento se dá pela injeção intratesticular de um agente, da forma mais homogênea possível. Alguns estudos foram realizados com a injeção de agentes adjuvantes que causam uma resposta inflamatória local fazendo com que as células linfoides cheguem ao tecido testicular, resultando em uma resposta autoimune. Já foram testadas também substâncias como produtos bacterianos e toxinas diretamente injetadas no testículo, porém sem sucesso. Posteriormente, começaram a ser estudados agentes esclerosantes, que injetados no meio intratesticular afetam a espermatogênese. Este processo, quando usado para a esterilização de machos, recebeu o nome de castração química. Dentre estes agentes químicos está o gluconato de zinco, que chegou a ser aprovado pela FDA para ser utilizado para a castração química através da injeção intratesticular (revisado por KUTZLER, 2006).

Métodos adicionais têm sido empregados como ablação térmica, gerando danos à fertilidade. Em nosso grupo de pesquisa, dois estudos envolvendo a hipertermia testicular no intuito de obter o efeito de esterilização de machos, já encontraram resultados promissores (RÔLO, 2016; LIMA, 2019). Porém nenhum outro método estudado ainda é capaz de substituir a eficiência da castração cirúrgica, sendo esta, o método de eleição para a esterilização de animais machos e fêmeas.

### **2.3.1. Castração cirúrgica**

A vasectomia, em homens, é um método popular e bem desenvolvido para a contracepção permanente, mas potencialmente reversível. Também é aplicado em animais de estimação para eliminar o potencial reprodutivo, mantendo a função testicular, e as características masculinas principalmente de competição por fêmeas. Embora eficaz, a vasectomia em cães e gatos é mais dispendiosa do que a retirada total das gônadas e raramente praticada, além de não eliminar o comportamento dos machos (BOWEN, 2008).

O controle populacional de cães e gatos ainda ocorre principalmente pela castração cirúrgica (orquiectomia), que é o método de escolha efetivo e seguro (SAMPAIO *et al.*, 2014). Quando nos deparamos com o problema de superpopulação de animais errantes, a castração com a retirada total das gônadas é o método mais eficaz para a sua redução, pois é capaz de inibir a fertilidade dos machos, e além disso, de ajudar a diminuir a agressividade e a competição por fêmeas, e o comportamento de marcação de território (FOSSUM, 2013, SAMPAIO *et al.*, 2014).

As castrações cirúrgicas necessitam de uma equipe especializada, anestesia geral do animal, equipamentos médicos, um centro cirúrgico, tempo de recuperação do animal após a cirurgia, e existe também a possibilidade de riscos do procedimento cirúrgico, e necessidade de acompanhamento pós-cirúrgico (CATHEY e MEMON, 2010). Além disso, há uma restrição

em relação à efetividade, considerando o tempo mínimo necessário para a realização de uma cirurgia, já que cada procedimento precisa de um tempo mínimo entre 30 a 40 minutos para sua realização, assim uma única equipe de cirurgia é capaz de castrar em torno de 12 animais por dia.

A esterilização cirúrgica pode ser útil em pequena escala para reduzir o número dos animais. Porém, em relação ao problema de superpopulação dos animais errantes, o custo e o tempo para a esterilização cirúrgica desta grande população é provavelmente insustentável (MENEZES, 2008, MASSEI *et al.*, 2016). Assim, os métodos de esterilização não cirúrgicos podem aparecer como boas opções (CATHEY e MEMON, 2010).

### **2.3.2. Castração química**

Agentes químicos podem ser utilizados para esterilização, causando mudanças irreversíveis na função reprodutiva, como perda permanente de fertilidade, do comportamento sexual, assim como algumas formas de comportamento agressivo. Um bom método químico tem que ser seguro, sem efeitos secundários que causem danos ao animal, acessível e rentável (WSPA, 2007).

Um método de castração química envolve a administração de agentes químicos de forma intratesticular (intraepididimal ou intravaso deferente). A esterilização química vem sendo pesquisada por mais de cinco décadas, com o objetivo de interromper a produção de espermatozoides e sua maturação (LICHTLER, 2014). O método ocorre com uma injeção direta nos testículos ou epidídimos, após a sedação ou contenção apropriada. A injeção irá induzir a azoospermia (ausência de células espermáticas no sêmen), provocando a infertilidade permanente em machos (WSPA, 2007; CATHEY e MEMON, 2010).

A castração não cirúrgica possui vantagens, dentre elas uma necessidade menor de equipe técnica, podendo ser realizada por um número menor de profissionais treinados. Não

necessita de um local esterilizado, por não ocorrer nenhum procedimento cirúrgico, evitando a remoção das gônadas. E o tempo de anestesia pode ser reduzido, por se tratar de uma técnica mais rápida (LEVY *et al.*, 2008).

Algumas substâncias já foram estudadas com o objetivo de gerar infertilidade após a injeção intratesticular, como soluções a base de cálcio e cloreto de cálcio (JANA e SAMANTA, 2007), solução salina hipertônica (KWAK e LEE, 2013), glicerol (IMMEGART E THRELFALL, 2000), gluconato de clorexidina (MOHAMMED e JAMES, 2013), soluções a base de zinco e gluconato de zinco (KUTZLER, 2015). As soluções à base de zinco proporcionaram resultados promissores e, portanto, foi o mais estudado.

O zinco é considerado não carcinogênico, não-mutagênico e não teratogênico. É essencial para o crescimento normal, para reprodução e tem efeito benéfico sobre o processo de reparação de tecidos e cicatrização de feridas, é também um componente essencial do sêmen e afeta a motilidade do espermatozoide (LÉONARD *et al.*, 1987). Em baixas concentrações, o zinco é importante para a espermatogênese, uma vez que é incorporado no flagelo nas espermátides tardias e também está localizado nas fibras densas externas da cauda dos espermatozoides (FAHIM *et al.*, 1993). No entanto, em altas concentrações, inibe a divisão e replicação de células germinativas e provoca a fragmentação da membrana celular e do núcleo (FAHIM *et al.*, 1993; BLOOMBERG, 1996). Além disso, o zinco parece desempenhar uma função importante no controle do metabolismo andrógeno celular (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

O gluconato de zinco é um composto que foi amplamente estudado como agente químico para castração de machos. Este composto de zinco, que é neutralizado pela arginina, é administrado por injeção intratesticular, o que resulta em esclerose dos testículos (GRIFFIN, 2013). A FDA aprovou em 2003 a fabricação de uma solução de gluconato de zinco, para ser utilizada como método de castração em cães (LICHTLER, 2014). Mais tarde foi aprovado



apenas para uso em filhotes de 3 a 10 meses de idade com testículos de 10 a 27 mm de largura (LEVY *et al.*, 2008).

Vários trabalhos de pesquisa relatam os efeitos castrativos do gluconato de zinco. Tepsumethanon e colaboradores (2005) injetaram 0,8 a 1 mL de uma solução de gluconato de zinco, com concentração de 13,1 mg zinco/mL em 5 cães. Os testículos tiveram inflamação e edema, um animal apresentou ulceração, nenhum animal apresentou alteração de comportamento. A solução foi tolerada pelos animais e teve como resultado a interrupção da espermatogênese assim como a produção de andrógenos pelos testículos. Outro estudo realizou uma única injeção intratesticular 0,2 mL – 1 mL de solução de gluconato de zinco com 13,1 mg zinco/mL em 5 cães adultos, para verificar sua eficiência como método alternativo para castração de cães machos. A análise por microscopia de luz e eletrônica mostrou degenerações, vacúolos, poucas células germinativas, e ausência de espermátides alongadas, as células de Leydig sofreram degeneração e necrose e os túbulos seminíferos apresentaram somente células de Sertoli, sem espermatogônias (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Oliveira e colaboradores (2012a) injetaram nos testículos de 10 cães uma solução de gluconato de zinco com dosagem de 13,1 mg de zinco/mL, após a injeção uma queda na concentração espermática após 7 dias e 63 dias das injeções, 8 animais apresentaram azoospermia, um animal apresentou irritação na região escrotal e dermatite. O mesmo grupo realizou outro estudo para verificar se a administração de anti-inflamatório via oral afetaria na atuação da injeção intratesticular de 13,1 mg de zinco/mL (0,2 – 1 mL/testículo). Nos 5 animais tratados os espermatozoides foram encontrados até 60 dias após as injeções, depois disso os animais apresentaram azoospermia. Nenhum animal teve febre ou dor na região testicular, e não foram obtidas evidências significativas da ação contraceptiva do zinco (OLIVEIRA *et al.*, 2012b). O gluconato de zinco foi avaliado como método de castração permanente em 11 gatos machos adultos, através de uma injeção intratesticular de gluconato de zinco (1 mL para cada testículo – 0,44 a 0,51 mL). Um gato teve

desconforto na região da injeção entre 2 a 3 horas após a aplicação, e todos os outros apresentaram sudorese na região no dia seguinte, 60 dias após as injeções, todos os gatos apresentaram azoospermia (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Forzán e colaboradores (2014) revisaram estudos de utilização do gluconato de zinco como agente castrativo, para avaliar os efeitos das injeções, e observaram efeitos adversos severos após as injeções com dosagens de 0,7 a 1 mL por 20 mm de testículo, mesmo com a aplicação concomitante de anti-inflamatório nos animais. As ulcerações apareceram 2 a 3 dias após as injeções.

Uma revisão de diversos trabalhos comparou o método de castração clássico cirúrgico com a o método alternativo de injeção intratesticular de gluconato de zinco. Em uma grande amostra (103 cães) que recebeu o gluconato de zinco com diferentes dosagens (0,1 a 1,1 mL) e concentração de 3,1 mg de zinco/mL, foi possível observar algumas complicações como feridas nos locais das injeções, atrofia da bolsa escrotal, necrose, automutilação, reações mais severas do que o método cirúrgico quando comparados (LEVY *et al.*, 2008).

Apesar dos estudos mostrarem resultados do dano das soluções a base de zinco nos parâmetros reprodutivos, e da solução de gluconato de zinco ter sido aprovada para ser utilizada como forma de castração por injeção intratesticular em cães machos, muito efeitos adversos são relatados, além de não ser comprovado se o efeito castrativo é irreversível.

Desta forma, até hoje, os agentes químicos que apareceram no mercado como opção de métodos para castração, não foram capazes de satisfazer todos os critérios de eficácia desejados (CATHEY e MEMON, 2010). Outros agentes devem ser estudados para que novos produtos possam então surgir para controlar o número de animais errantes, e a nanotecnologia pode ser uma opção.

## 2.4. Nanotecnologia

A nanotecnologia está gerando uma mudança em vários materiais, com a capacidade de síntese de materiais em nano escala. Como benefício estes materiais podem ser mais fortes, mais leves e programáveis, podem ter um custo de produção menor, e ter finalidades mais específicas. A nanotecnologia foi nomeada como a sexta verdadeira tecnologia revolucionária introduzida no mundo moderno nos anos 2000 (NSET, 2001).

É uma tecnologia emergente que deve impactar vários campos como o de tratamentos medicinais e da preservação ambiental (KOMATSU *et al.*, 2008). Vem sendo utilizada na área da medicina para a terapia de entrega de medicamentos e também para o desenvolvimento de tratamento para diversas doenças. O avanço da nanotecnologia causa um grande desenvolvimento nestas áreas (FARAJI e WIPF, 2009).

Os nanomateriais possuem como principais características o seu pequeno tamanho, sua grande área de superfície, sua ação direcionada, sua versatilidade e sua estabilidade, que favorecem o seu uso na medicina. Todos estes fatores em conjunto explicam também o crescente interesse no seu uso nas pesquisas clínicas (BARKALINA *et al.*, 2014). Estes materiais podem possuir propriedades químicas diferentes, pois quanto menor é o material uma maior proporção de átomos pode ser encontrada em sua superfície, tornando-os mais reativos do que as partículas maiores (LANONE e BOCZOWSKI, 2006).

As características físicas e químicas são muito importantes para a obtenção dos efeitos biológicos, e por isso vários aspectos como propriedades físico-químicas do material, composição química, tamanho e forma, aglomeração da nanopartícula e fatores externos podem influenciar no processo de sua internalização pelas células (OBERDORSTER *et al.*, 2005; UNFRIED *et al.*, 2007; ARORA *et al.*, 2012). Nanomateriais podem possuir formas diversas, como nano objetos (nanopartículas e nanotubos de carbono), materiais com poros de dimensões

nanométricas (filmes porosos) e outros tipos de materiais com estruturas em nanoescala variadas.

#### **2.4.1. Nanopartículas**

Nanopartículas são um tipo de nanomaterial e possuem as três dimensões na escala nanométrica. Podem ser produzidas intencionalmente e possuem propriedades muito específicas (incluindo propriedades de superfície e química, forma e tamanho). Nanopartículas podem ser à base de metal (ouro, prata e óxidos metálicos reativos, como o dióxido de titânio), e podem ser também compósitos combinados com outros nanomateriais. Estes nanomateriais produzidos possuem propriedades únicas que dão novas características elétricas, catalíticas, magnéticas, mecânicas, térmicas ou de imagem que são altamente desejáveis (LANONE e BOCZOWSKI, 2006). Atualmente as nanopartículas metálicas são as mais estudadas e as que vêm despertando mais interesse entre os pesquisadores (GONG *et al.*, 2007).

Nanopartículas possuem a capacidade de atravessar com facilidade as membranas biológicas, assim como a parede de pequenos capilares e epitélios, o que permite a movimentação dentro do corpo, afetando diferentes tecidos. Podem atravessar também barreiras biológicas existentes como as barreiras hematoencefálica e hematotesticular (DE JONG e BORM, 2008; OBERDORSTER, 2010). Sabe-se que algumas nanopartículas podem atravessar o trato gastrointestinal, sendo eliminadas pelas fezes e urina. Isso mostra que elas podem ser absorvidas pela barreira gastrointestinal, e entrar no sistema circulatório (OBERDORSTER *et al.*, 2005).

Após a entrada das nanopartículas no organismo, elas são deslocadas para diferentes órgãos, tecidos e células, através dos sistemas linfático e circulatório (FISCHER e CHAN, 2007; PANYALA *et al.*, 2008). Com isso é natural que elas consigam afetar fisiologicamente qualquer célula do organismo (BROOKING *et al.*, 2001). Órgãos como fígado e baço podem

ser os principais alvos do acúmulo de nano materiais devido ao grande número de células fagocíticas que eles possuem, estando mais sujeitos ao estresse oxidativo pois estes nanomateriais podem ser produtores de radicais livres (AILLON *et al.*, 2009).

Como são capazes de se ligar às células e também às macromoléculas, como proteínas e DNA (ASHARANI *et al.*, 2009a), quando entram em contato com as células acabam sendo internalizadas por diversos mecanismos e podem (ou não) ativar diferentes processos de sinalização, consequentemente produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS), inflamação e, finalmente, a pausa do ciclo celular ou a morte celular (AHAMED *et al.*, 2010; ASHARANI *et al.*, 2009a).

Estudar as propriedades das nanopartículas é importante para compreender seus efeitos biológicos (POWERS *et al.*, 2006). As nanopartículas são mais tóxicas para a saúde humana quando comparadas com partículas de grande porte da mesma substância química. Algumas nanopartículas já tem o seu efeito tóxico conhecido como óxido de alumínio, óxido de zinco, óxido de titânio, óxido de ferro, nanomateriais à base de carbono e de polímeros, nanopartículas de ouro e nanopartículas de prata (BAHADAR *et al.*, 2016).

#### **2.4.2. Nanopartículas de prata (AgNPs)**

As nanopartículas de prata (AgNPs) estão entre as cinco mais utilizadas atualmente na ciência, na indústria farmacêutica e na indústria química. São utilizadas na fabricação de produtos de consumo como em têxteis, cosméticos, protetores solares, como produtos para limpeza doméstica, purificadores de ar, embalagens de alimentos, revestimento para refrigeradores, e desinfecção da água. São utilizadas também em hospitais, na prática médica geral, em dispositivos médicos, e em curativos para o tratamento de feridas, queimaduras e úlceras, enfim em todas as aplicações onde as bactérias podem exercer um efeito prejudicial, devido as suas propriedades bactericidas e catalíticas. Em suma, as AgNPs vêm fazer parte de

um dos pivôs do desenvolvimento da nanotecnologia (CHOPRA, 2007; SILVESTRY-RODRIGUEZ *et al.*, 2007; CHO *et al.*, 2009; MARAMBIO-JONES e HOEK; 2010; PARK *et al.*, 2010; SHUKLA *et al.*, 2011).

São utilizadas também na área de medicina como constituintes de ligas dentais, cateteres, implantes, assim como para tratar infecções relacionadas a feridas e queimaduras e para a distribuição de drogas e medicamentos usados em tratamentos de câncer e terapias de retina (SAMUEL e GUGGENBICHLER, 2004; DURAN *et al.*, 2007; KALISHWARALAL *et al.*, 2010).

A síntese destas AgNPs pode ocorrer de diferentes formas, e isso pode modificar parâmetros como diâmetro, tamanho médio, forma e estabilidade. Alguns agentes tampões são utilizados para que a agregação destas nanopartículas seja reduzida, como citrato, polivinilpirrolidona (PVP) e acetato de polivinila (PVA) (CHALOUPKA *et al.*, 2010).

Conhecer os mecanismos de como a célula capta as AgNPs pode levar ao conhecimento dos mecanismos de toxicidade, assim como a aplicação terapêutica de nanopartículas. A absorção das AgNPs ocorre principalmente através da endocitose, em um processo mediado por clatrina. A sobrevivência celular aos danos mediados pelas nanopartículas depende da capacidade de expulsar estas nanopartículas (ASHARANI *et al.*, 2009b).

As AgNPs possuem uma propriedade antimicrobiana eficiente devido a sua grande área capaz de proporcionar um melhor contato com os microrganismos. Se ligam a membrana celular das bactérias assim como podem penetrar em seu interior. Quando a nanopartícula entra na bactéria ataca preferivelmente a cadeia respiratória e a divisão celular, podendo causar a morte. A liberação dos íons de prata nas células bacterianas aumenta a atividade bactericida destas nanopartículas (FENG *et al.*, 2000; SONDI e SALOPEK-SONDI, 2004; MORONES *et al.*, 2005; SONG *et al.*, 2006; GONG *et al.*, 2007; RAI *et al.*, 2009).

O efeito mais aparente é o estresse oxidativo, as AgNPs de tamanhos e formas distintos se acumulam nas mitocôndrias, provavelmente isso cause um dano mitocondrial, perturbando a cadeia respiratória, gerando ROS e estresse oxidativo (BARTŁOMIEJCZYK, *et al.*, 2013). É possível que as AgNPs (assim como outras nanopartículas) atuem também diretamente no retículo endoplasmático (RE) atrapalhando as moléculas de proteínas se dobrarem para assumir a sua configuração funcional. Assim, as AgNPs podem induzir a apoptose (ZHANG *et al.*, 2012). O estresse oxidativo induzido por AgNP pode causar mutações pontuais, que se não forem reparadas pelo sistema celular podem ser potencialmente carcinogênicas (BARTŁOMIEJCZYK, *et al.*, 2013).

O aumento do estresse ambiental, pode fazer com que a célula aumente a produção de ROS, trazendo um desequilíbrio entre a produção normal de ROS e a capacidade de neutralização deles pelas enzimas antioxidantes. Ocorre um acúmulo de ROS como resposta. O acúmulo de ROS modifica vias de sinalização, entre elas a via de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), liberando citocinas pró-inflamatórias. Os ROS são capazes também de alterar componentes celulares assim como o DNA (BARTŁOMIEJCZYK, *et al.*, 2013). Asharani e colaboradores (2012) observaram através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) que a AgNP atua diretamente no dano mitocondrial e no DNA.

A biodistribuição das AgNPs acontece com a saída delas do sangue após a injeção endovenosa, e sua distribuição para o fígado, rins, baço, cérebro, coração, pulmões e testículos independente do seu tamanho, a biodistribuição das nanopartículas depende fortemente do tempo após a exposição, e também da via de administração (DZIENDZIKOWSKA *et al.*, 2012). Outros estudos mostram que a administração de AgNPs por injeção intra-abdominal ou intravenosa em ratos levam ao acúmulo destas nanopartículas em diversos tecidos incluindo cérebro e testículos, mostrando que elas são capazes de atravessar as barreiras hematoencefálica e hematotesticular (BORM e KREYLING, 2004; CHEN e SCHLUESENER., 2008).

## 2.5. Efeitos reprodutivos da exposição a AgNPs

As AgNPs, assim como várias substâncias químicas e partículas ultrafinas, já mostraram um efeito deletério nos testículos (LUCAS *et al.*, 2009; LUCAS *et al.*, 2012). As alterações das células germinativas causadas pela toxicidade podem ser geneticamente passadas para as próximas gerações. Mesmo com o aumento da preocupação em relação aos efeitos que o uso de nanopartículas pode proporcionar na saúde reprodutiva, poucos estudos estão analisando as células testiculares (ASARE *et al.*, 2012).

Quando as AgNPs penetram no núcleo das células da linhagem germinativa pode fazer com que a espermatogênese não ocorra da forma correta, afetando então a taxa reprodutiva e a saúde dos filhotes (EMA *et al.*, 2010). Nanopartículas possuem efeitos diretos nas células de Leydig, parecidos com os efeitos em células epiteliais, macrófagos e células endodérmicas. O mecanismo pelos quais as nanopartículas causam a disfunção na reprodução de ratos machos pode ser mais esclarecido com um estudo mais aprofundado destes efeitos, sendo úteis para avaliar os efeitos na espermatogênese (KOMATSU *et al.*, 2008).

Gromadzka-Ostrowska e colaboradores (2012) realizaram um estudo onde foi injetado AgNPs (sem informação sobre cobertura) na veia caudal de ratos Wistar. Os animais do tratamento foram divididos em grupos: AgI (5 mg/Kg de AgNP de 20 nm), AgII (10 mg/Kg de AgNP de 20 nm), e AgIII (5 mg/Kg de AgNP de 200 nm). Os autores concluíram que, mesmo uma pequena dosagem de 5 mg/Kg de AgNP de 20 nm é capaz de gerar toxicidade nas células germinativas, diminuindo o número de espermatozoides e aumentando o dano no DNA das células germinativas, ambos de forma significativa. Além disso, um efeito deletério na produção espermática dos ratos foi obtido, e o índice gonadossomático (IGS) entre os grupos tratamento (24h, 7 dias e 28 dias) diminuiu. Em todos os grupos tratados, o número de espermatozoides anormais foi maior 28 dias após a injeção (equivalente à duração de dois ciclos de passagem da célula germinativa através do epidídimo) quando comparado com o número 24



h após a injeção. Este resultado parece refletir o impacto mais forte de AgNPs sobre o epidídimo do que os testículos. No mesmo estudo a taxa de espermatozoides anormais aumentou significativamente em todos os grupos na análise de sete dias após a injeção (GROMADZKA-OSTROWSKA *et al.*,2012). Estes dados mostram que mesmo após a aplicação intravenosa as AgNPs têm capacidade de ultrapassar a barreira hematotesticular, e promover efeitos tóxicos significativos na produção espermática.

Garcia e colaboradores (2014) viram que a injeção intravenosa das nanopartículas de prata, recobertas com citrato, pode causar mudanças morfométricas nos túbulos seminíferos, além de um aumento sutil, porém significativo na apoptose das células germinativas. No entanto, não foi possível perceber uma interação direta das AgNPs nas espermatogônias.

Devido a essa toxicidade na linhagem espermática, pode ser interessante direcionar o uso das AgNPs para os testículos, através de uma injeção intratesticular, com o intuito de gerar infertilidade em machos. O que pode vir a ser uma alternativa aos métodos de castração química já existentes.

### **3. JUSTIFICATIVA**

O número de animais errantes se tornou um problema de saúde pública mundial. Principalmente pelo aumento da transmissão de zoonoses, dos lixos espalhados pelas cidades, a quantidade de fezes e urina, o número de ataques e mordidas, e o número de atropelamentos. A questão mais importante é o aumento exponencial que vem ocorrendo devido às altas taxas reprodutivas destes animais. Métodos de castração eficientes podem ajudar a resolver melhor esse problema. A castração cirúrgica apesar de eficaz, possui um alto custo, e necessita de mão de obra especializada, não sendo capaz de suprir a demanda da superpopulação, e o alto número de animais. Logo, técnicas alternativas de castração podem ser de grande ajuda para o controle do alto número de animais abandonados.

Apesar de nunca ter sido explorada neste sentido, a nanotecnologia pode ser útil para desenvolver métodos alternativos de castração química. AgNPs já mostraram efeito deletério nos espermatozoides quando administradas por via endovenosa. Assim, este projeto propõe investigar os efeitos da administração intratesticular de AgNPs, com o intuito de promover a infertilidade em machos.

## **4. OBJETIVOS**

Analisar os efeitos da injeção intratesticular de AgNP nos parâmetros reprodutivos e fisiológicos de ratos Wistar machos.

### **4.1. Objetivos Específicos**

Avaliar os efeitos da injeção intratesticular de AgNP na morfologia dos testículos e epidídimos, bem como na motilidade espermática e na morfologia espermática;

Avaliar os efeitos da injeção intratesticular de AgNP no peso corporal e parâmetros hematológicas e bioquímicas dos animais;

Verificar a distribuição das AgNP em órgãos vitais (fígado, rins, baço e pulmões) após a injeção intratesticular.

## 5. EXPERIMENTO PRELIMINAR

Foi realizado um primeiro experimento utilizando nanopartículas de prata recobertas com polivinilpirrolidona (PVP), sintetizada pela professora Emília Celma de Oliveira, do Instituto de Química da UFG, com um diâmetro médio de  $17,56 \pm 0,31$  nm. Neste estudo foram utilizados 13 ratos Wistar machos entre 6 a 9 semanas de idade, que receberam injeção intratesticular de 220  $\mu$ l de solução de AgNP na concentração de 0,46 mg Ag/mL. Foram analisados dados de motilidade e morfologia espermática, histologia dos testículos e epidídimos, com morfometria dos túbulos seminíferos, sempre aos 7, 14 e 28 dias após a administração da AgNP. Também foram feitas análises hematológicas dos animais no dia da eutanásia.

Os resultados deste experimento (apresentados no APÊNDICE A) não alcançaram as expectativas, nos levando a optar por executar o experimento proposto utilizando nanopartículas de prata comercial, já utilizada em outros experimentos de toxicidade (CÁCERES-VELEZ, 2017; OLIVEIRA-FILHO, 2019). Além disso, os dados serviram para elaborar um novo desenho experimental otimizado.

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1. Nanopartícula de prata

A suspensão de nanopartículas de prata foi produzida com a dispersão da nanopartícula de prata em pó (Sigma-Aldrich – 576832, CAS: 7440-22-4) com PVP como cobertura, em água ultrapura com uma concentração de 0,46 mg Ag/mL. A suspensão foi sonicada em gelo (Vibra-Cell™ 75042, 20 kHz, 500 W, EUA) por 40 minutos com 750 Watts de potência, pulso 5/3 segundos (ON/OFF) e 20% de amplitude, e mantida como solução mãe.

Esta solução mãe (pH 7,49) foi diluída 1:4 em água ultrapura, o tamanho das nanopartículas e a carga de superfície foram medidos em triplicata com 20 subensaios por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) com um Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Malvern Hills, UK). Amostras desta solução diluída foram gotejadas em uma tela de microscopia eletrônica de cobre de malha 300 previamente recoberta com Formvar®, secas durante a noite à temperatura ambiente e analisadas num microscópio electrónico de transmissão (JEM-2100F, JEOL, Tokio, Japão). As imagens foram gravadas com uma ampliação de 20000x e 50000x e o tamanho de 1000 partículas foi medido.

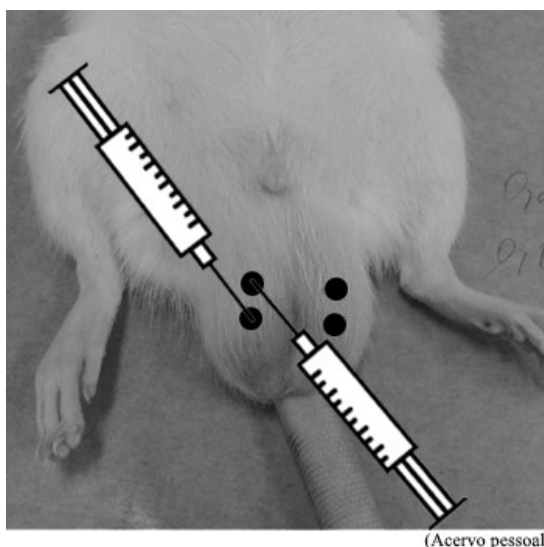
### 6.2. Desenho experimental

Antes de iniciar qualquer procedimento com os animais, o projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA-UnB), UnBDOC nº102854/2015.

Foram utilizados 28 ratos Wistar machos, entre 6 a 9 semanas de idade, acomodados no biotério da Universidade de Brasília, no Instituto de Ciências Biológicas, mantidos em gaiolas de polipropileno forradas com maravalha, sob um ciclo claro / escuro de 12h / 12h com acesso livre a alimento comercial e água *ad libitum*. Inicialmente, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: 1) Animais sem qualquer manipulação (grupo controle - N = 4),

2) animais que receberam injeção intratesticular de solução salina (grupo placebo - N = 4) e 3) animais que receberam injeção intratesticular de solução de AgNP (grupo AgNP - N = 20).

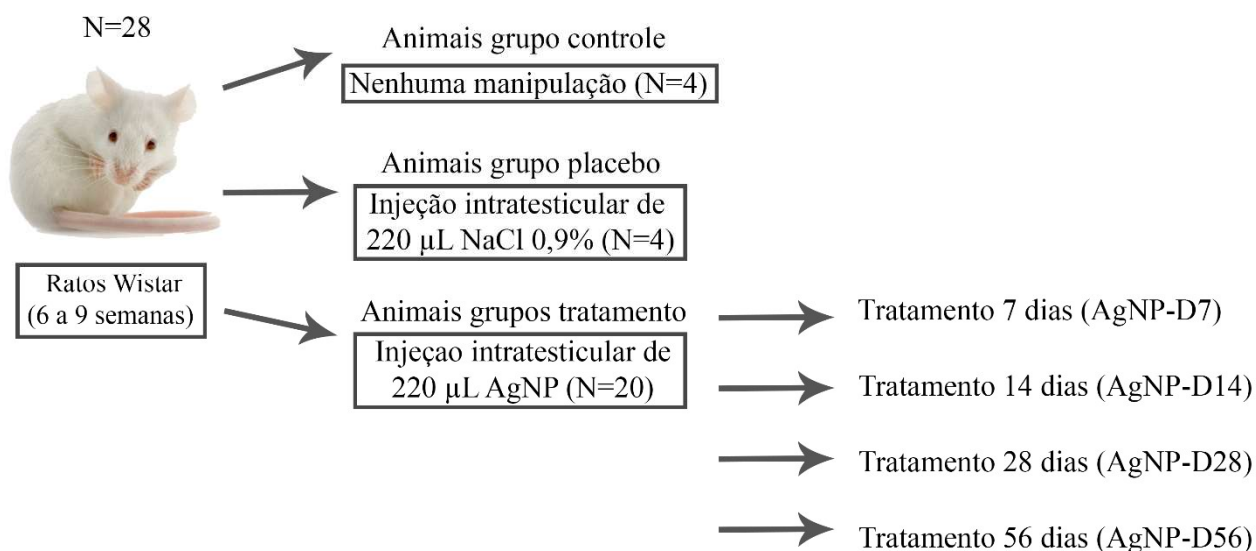
Todos os animais receberam as injeções no mesmo dia, para isso foram anestesiados com Cetamina (90 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg). Os animais do grupo placebo receberam uma injeção de 220  $\mu$ L de solução salina estéril em cada testículo, e os animais do grupo AgNP receberam uma injeção intratesticular de 220  $\mu$ L de solução de AgNP, na concentração de 0,46 mg/mL de AgNP, (correspondendo a 0,10 mg Ag/testículo) em dois pontos distintos para uma melhor distribuição das nanopartículas nos testículos (Figura 1). Os animais do grupo controle não passaram por nenhuma manipulação.



(Acervo pessoal)

**Figura 1:** Metodologia das injeções intratesticulares de AgNP. Um total de 220  $\mu$ L de AgNP era injetado em cada testículo, sendo duas injeções de 110  $\mu$ L cada em dois pontos distintos para obter uma melhor distribuição.

Os animais do grupo tratamento AgNP foram posteriormente subdivididos em 4 subgrupos, de acordo com o dia da eutanásia (D7, D14, D28 e D56, N = 5 em cada subgrupo). Os animais do grupo controle foram eutanasiados no dia 14 e os do grupo placebo foram eutanasiados no dia 7 após o início do tratamento. Um esquema do delineamento experimental está ilustrado na Figura 2.



(Acervo pessoal)

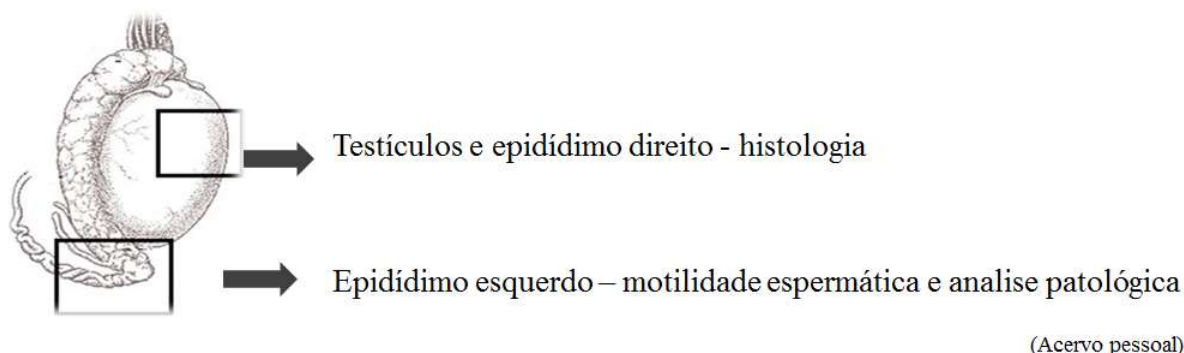
**Figura 2:** Delineamento experimental. Os 28 animais foram inicialmente divididos em 3 grupos: grupo controle (N=4), grupo placebo (N=4) e grupo tratamento (N=20), sendo que o grupo tratamento foi posteriormente subdividido em 4 sub-grupos (N=5 em cada) de acordo com o dia da eutanásia, a saber – 7 dias (AgNP-D7), 14 dias (AgNP-D14), 28 dias (AgNP-D28) e 56 dias (AgNP-D56) após a injeção.

Os animais foram observados diariamente, para análise comportamental e presença de dor ou processo inflamatório, e seu peso aferido e anotado. Todas as alterações observadas foram registradas. Todos os animais foram eutanasiados ao fim do período de observações e coleta de dados. Os animais foram pesados e em seguida eutanasiados, nos respectivos dias, por overdose de anestésicos (Cetamina e Xilazina) e punção cardíaca.

### 6.3. Coleta e processamento dos órgãos

Os testículos e epidídimos foram retirados, separados, medidos e pesados. Os epidídimos esquerdos foram utilizados para a retirada dos espermatozoides (Figura 3). Para isso, cada epidídimo foi macerado em 2 mL de solução salina aquecida (37°C) e uma gota da suspensão foi imediatamente colocada entre lâmina e lamínula e a motilidade espermática total (porcentagem de espermatozoides móveis) foi avaliada de forma subjetiva em microscópio de luz. Em seguida, 1 mL da suspensão resultante foi separado e adicionado a 1 mL de formalina 10%, fixados para posterior análise de morfologia espermática. Para isso, 200 células foram contadas e classificadas quanto à sua morfologia (LINDER *et al.*, 1992; SEED *et al.*, 1996) em

microscópio de luz sob contraste de fase. Os dois testículos e os epidídimos direitos foram fixados inteiros e processados para histologia.



**Figura 3:** Metodologia do processamento dos testículos e epidídimos.

As medidas de comprimento e largura (cm) dos testículos foram utilizadas para determinar seu volume. Para isso foram utilizadas as médias de duas equações matemáticas a do cilindro  $VOLC = 2 \times [(LARG/2)^2 \times \Pi \times (COMP)]$  (FIELDS *et al.*, 1979); e a do prolato esferoide  $VOLP = 2 \times [4/3 \times \Pi \times (LARG/2)^2 \times (COMP/2)]$  (BAILEY *et al.*, 1996), cuja média dos valores fornecem o valor mais próximo do real (LOUVANDINI *et al.*, 2008).

Os pulmões, fígados, rins e baços foram retirados para análises histopatológica e da biodistribuição das AgNPs. Cada órgão foi pesado e dividido, metade de cada órgão foi fixada para a histologia, e a outra metade foi congelada para a quantificação da nanopartícula.

#### **6.4. Processamento histológico**

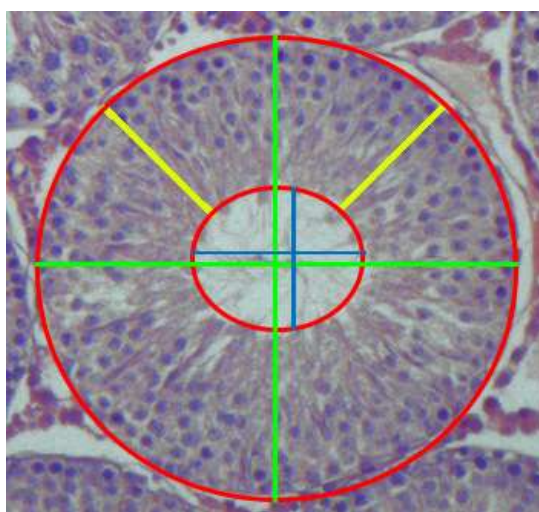
Os testículos e epidídimos foram fixados com uma solução fixadora de Bouin, por 24 horas, e lavados em seguida por 5 vezes com álcool 50%. Após a lavagem foram mantidos em álcool 70%. Os demais órgãos foram fixados com uma solução de formalina 10%, e mantidos posteriormente em álcool 70%. Para o processamento histológico, todos os órgãos passaram pelo seguinte processamento com duração de 1 hora cada passo: álcool 80%, álcool 90%, álcool 100% I, álcool 100% II, álcool 100% III, Xilol I, Xilol II, Xilol III, Parafina I, Parafina II, Parafina III e, então, emblocados em Paraplast ®. Com os órgãos emblocados, cortes



histológicos de 5  $\mu\text{m}$  foram realizados em um micrótomo da Leica®. Cinco lâminas de cada órgão foram montadas e coradas com hematoxilina e eosina para serem avaliadas em microscópio de luz.

Os cortes histológicos de testículos foram analisados quanto à presença de todos os tipos celulares da linhagem espermatogênica, identificar as células de Sertoli e Leydig, e avaliar a morfologia do epitélio seminífero em busca de alterações que afetam a espermatogênese. Os túbulos seminíferos tiveram os parâmetros da área do túbulo, área da luz do túbulo ( $\mu\text{m}^2$ ), diâmetro do túbulo, diâmetro da luz do túbulo e altura do epitélio ( $\mu\text{m}$ ) medidos nos túbulos mais circulares o possível, com suas médias e desvios padrões calculados (Figura 4).

Os demais órgãos foram avaliados para evidenciar possíveis danos causados pelas AgNP.



**Figura 4:** Medidas túbulos seminíferos. Vermelho = área do túbulo e área da luz do túbulo. Verde = Diâmetro do túbulo. Azul = Diâmetro da luz do túbulo. Amarelo = Altura do epitélio.

#### **6.5. Determinação da concentração de prata nos órgãos**

Um rim e metade de cada um dos outros órgãos que havia sido congelado foram liofilizados (Liofilizador L101 - Liobras, São Carlos, São Paulo, Brasil) e utilizados para quantificação e análise de biodistribuição de Ag. A concentração total de prata foi medida por

Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) com um protocolo de digestão de dois passos, de acordo com ASHOKA e colaboradores (2009). Resumidamente, são adicionados 2 mL de ácido nítrico 70% aos órgãos, deixados para digerir por 3 dias à temperatura ambiente dentro de uma capela de exaustão. Todas as amostras digeridas foram diluídas para atingir a concentração de 1,94% de ácido nítrico. Portanto, 285 µL de cada amostra foram diluídos em 10 mL de água ultrapura, em seguida as amostras foram prontamente analisadas por ICP-MS (iCAP™ Q ICP-MS Thermo Scientific™; CICBiomaGUNE - San Sebastián, Espanha).

#### **6.6. Análises hematológicas**

O sangue foi coletado em tubos específicos para análise hematológica (tubos com adição de EDTA - tampa vermelha) e bioquímica (tubos sem adição de EDTA + gel separador – tampa amarela). Os seguintes parâmetros hematológicos foram avaliados, Células brancas ( $10^3/\mu\text{L}$ ); Células vermelhas ( $10^6/\mu\text{L}$ ); Hemoglobinas (g/dL); Hematócrito (%); Volume corpuscular médio (fL); Hemoglobina corpuscular média (pg); Concentração de hemoglobina corpuscular média; Plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ ), utilizando um analisador hematológico automatizado (Sysmex pocH-100iV™). Também foram determinados os parâmetros bioquímicos de alanina aminotransferase (ALT), aspartame aminotransferase (AST) para função hepática e Ureia e creatinina para função renal, utilizando kits de análise específicos (Labmax 100 - Labtest®) em um analisador automático (Chem Well T – Labtest).

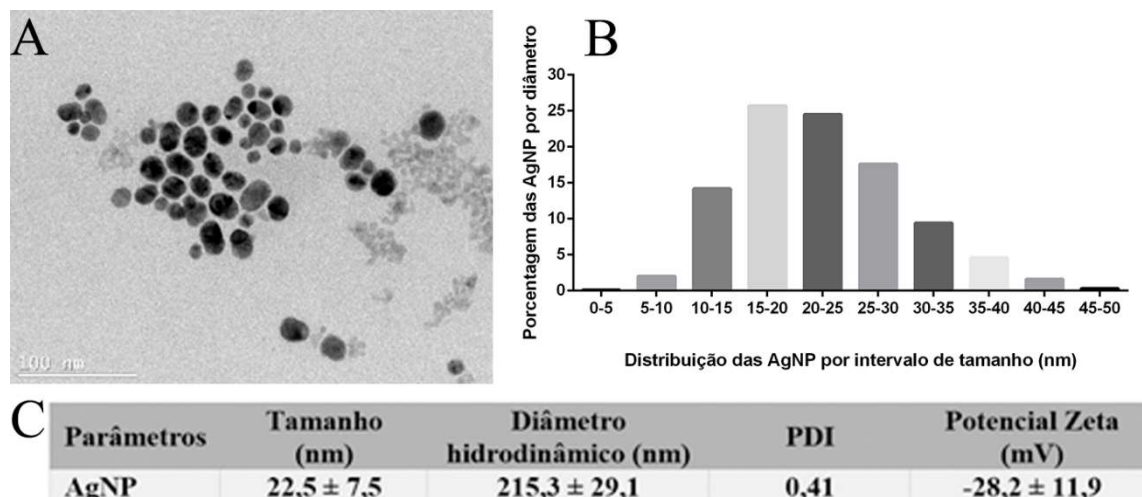
#### **6.7. Tratamento Estatístico**

Os resultados foram expressos pela Média  $\pm$  Desvio Padrão da Média. Antes de qualquer análise os dados tiveram a sua normalidade avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para a análise

estatística foi empregada a Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey. O critério de significância foi de 5% ( $P < 0,05$ ). Foram feitas comparações dos dados obtidos entre os grupos.

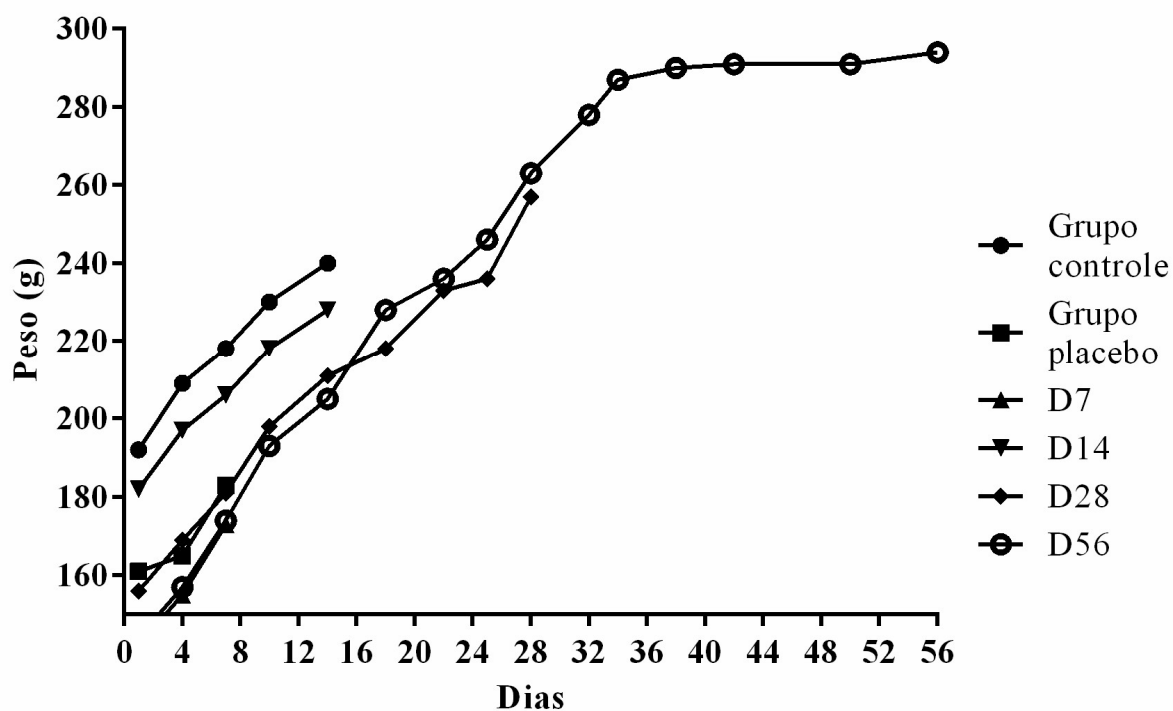
## 7. RESULTADOS

De acordo com a microscopia eletrônica de transmissão, as AgNPs apresentam forma esférica a oval, com diâmetro médio de  $22,5 \pm 7,5$  nm (variando de 2,9 nm a 46,4 nm), diâmetro hidrodinâmico de 215,3 nm, PDI = 0,41 e potencial zeta = -28,2, apresentados na figura 5.



**Figura 5:** Dados da caracterização das nanopartículas de prata (AgNP) utilizadas. A) Micrografia eletrônica de transmissão representativa da amostra utilizada, mostrando formato esférico/oval. B) Distribuição por intervalo de tamanho (em nm) baseado nas medidas feitas por microscopia eletrônica de transmissão. C) Características das AgNP obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (tamanho), DLS (diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão – PDI) e potencial Zeta.

Em geral, todos os animais exibiram ganho de peso normal (Figura 6) e condições saudáveis durante todo o estudo. Além disso, nenhum animal apresentou sinal de processo inflamatório ou dor, durante o experimento



**Figura 6:** Peso corporal diário de todos os animais dos grupos controle, placebo, AgNP-D7, AgNP-14, AgNP-D28 e AgNP-D56.

O peso relativo dos testículos e epidídimos não mostrou diferenças significativas entre os grupos (Tabela 1). Os volumes do testículo esquerdo nos grupos AgNP-D14, AgNP-D28, e AgNP-D56 foram significativamente maiores ( $P < 0,05$ ) do que nos grupos AgNP-D7 e placebo.

**Tabela 1:** Peso relativo dos testículos e epidídimos e volume testicular (média ± DP) de cada grupo, obtidos no dia da eutanásia.

	<b>Grupo controle</b>	<b>Grupo placebo</b>	<b>AgNP-D7</b>	<b>AgNP-D14</b>	<b>AgNP-D28</b>	<b>AgNP-D56</b>
<b>Testículo direito (g)</b>	0,56±0,01	0,58±0,06	0,49±0,17	0,56±0,05	0,56±0,05	0,54±0,07
<b>Testículo esquerdo (g)</b>	0,58±0,03	0,57±0,05	0,52±0,15	0,56±0,06	0,55±0,04	0,49±0,06
<b>Epidídimo direito (g)</b>	0,26±0,04	0,22±0,06	0,31±0,19	0,24±0,06	0,24±0,04	0,29±0,07
<b>Epidídimo esquerdo (g)</b>	0,31±0,16	0,30±0,03	0,27±0,04	0,22±0,02	0,25±0,03	0,29±0,05
<b>Volume testículo direito (cm<sup>3</sup>)</b>	2,20±0,69	4,47±2,72	2,41±0,45	2,94±0,29	2,54±0,27	2,96±0,30
<b>Volume testículo esquerdo (cm<sup>3</sup>)</b>	2,08±0,21 <sup>A</sup>	2,82±0,23 <sup>AB</sup>	2,07±0,67 <sup>A</sup>	3,48±0,45 <sup>B</sup>	3,45±0,49 <sup>B</sup>	3,10±0,50 <sup>B</sup>

AB - letras diferentes indicam diferença significativa na mesma linha (P<0,05).

O peso relativo do baço apresentou um valor significativamente maior ( $p < 0,05$ ) para o grupo AgNP-D28 em comparação com os demais grupos, exceto o grupo placebo. O peso relativo do fígado também mostrou um valor significativamente maior ( $p < 0,05$ ) no grupo AgNP-D7 quando comparado com outros grupos, exceto o grupo placebo (Tabela 2).

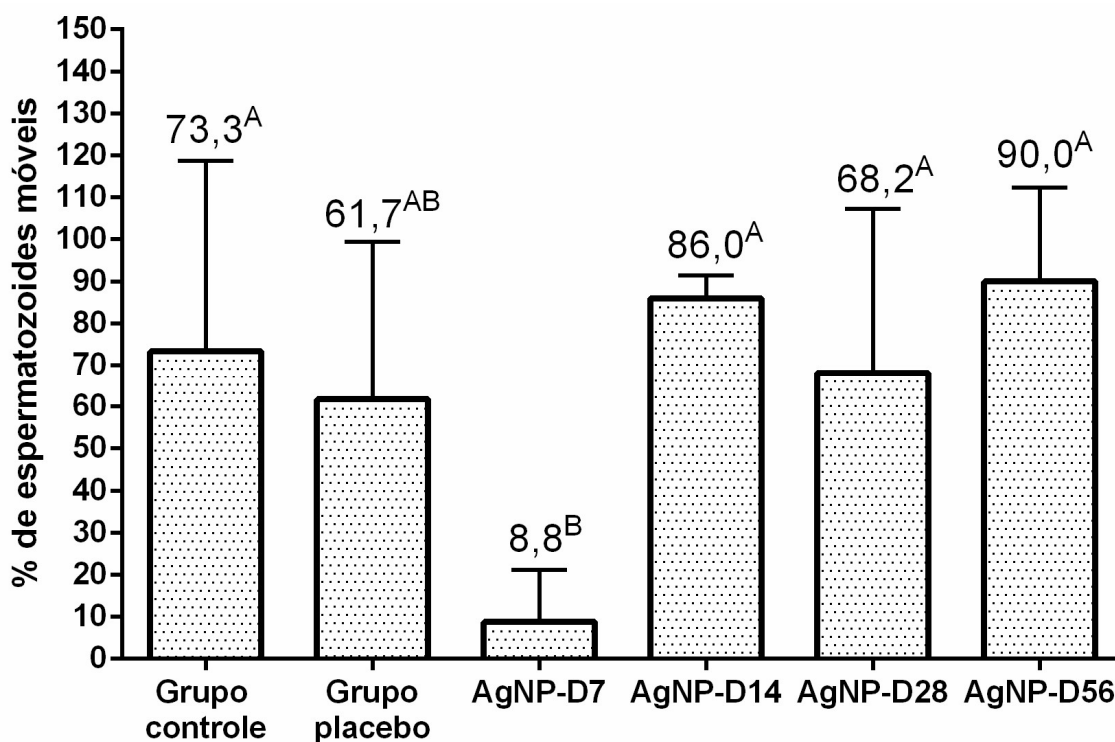
**Tabela 2:** Peso relativo (g) dos órgãos (média  $\pm$  DP) de cada grupo, obtidos no dia da eutanásia.

	<b>Grupo controle</b>	<b>Grupo placebo</b>	<b>AgNP D7</b>	<b>AgNP D14</b>	<b>AgNP D28</b>	<b>AgNP D56</b>
<b>Rim</b>	0,40 $\pm$ 0,03	0,45 $\pm$ 0,08	0,46 $\pm$ 0,04	0,50 $\pm$ 0,17	0,44 $\pm$ 0,03	0,38 $\pm$ 0,02
<b>Baço</b>	0,27 $\pm$ 0,04 <sup>A</sup>	0,41 $\pm$ 0,13 <sup>AB</sup>	0,39 $\pm$ 0,06 <sup>A</sup>	0,31 $\pm$ 0,03 <sup>A</sup>	0,57 $\pm$ 0,05 <sup>B</sup>	0,37 $\pm$ 0,12 <sup>A</sup>
<b>Fígado</b>	4,70 $\pm$ 0,26 <sup>A</sup>	4,87 $\pm$ 0,69 <sup>AB</sup>	5,96 $\pm$ 1,09 <sup>B</sup>	4,56 $\pm$ 0,37 <sup>A</sup>	4,39 $\pm$ 0,37 <sup>A</sup>	3,69 $\pm$ 0,12 <sup>A</sup>
<b>Pulmão</b>	0,66 $\pm$ 0,09	0,63 $\pm$ 0,07	0,67 $\pm$ 0,23	0,70 $\pm$ 0,13	0,65 $\pm$ 0,06	0,59 $\pm$ 0,09

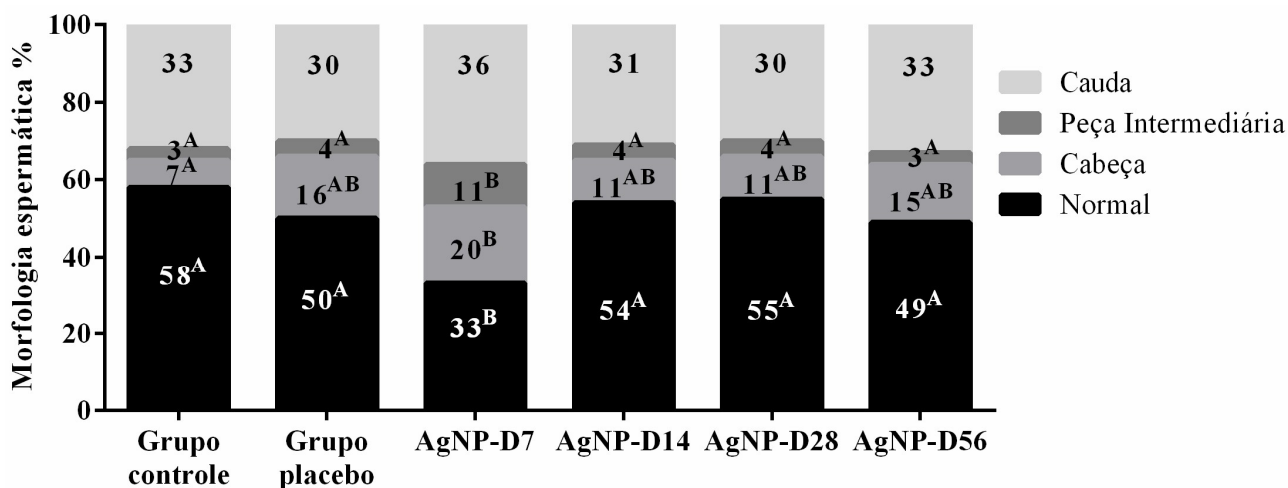
A, B - letras diferentes indicam diferença significativa na mesma linha ( $P < 0,05$ ).

Um efeito importante da injeção intratesticular de AgNP foi observado na motilidade espermática, com uma diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) na porcentagem de espermatozoides móveis no grupo AgNP-D7 em comparação a todos os outros grupos, exceto o grupo placebo (Figura 7).

Além disso, um decréscimo significativo ( $P < 0,05$ ) na porcentagem de espermatozoides normais foi observado no grupo AgNP-D7 quando comparado a todos os outros grupos (Figura 8). Este grupo (AgNP-D7) também mostrou um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) na porcentagem de espermatozoides com anormalidade da peça intermediária quando comparado a todos os outros grupos, e um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) na porcentagem de patologias da cabeça do espermatozoide comparado ao grupo controle. (Figura 8).



**Figura 7:** Porcentagem (média  $\pm$  DP) de espermatozoides móveis no lavado epididimário em cada grupo no dia da eutanásia. A,B - letras diferentes indicam diferença significativa entre colunas ( $P < 0.05$ ).



**Figura 8:** Porcentagem de espermatozoides normais e com patologia por região espermática, em cada grupo no dia da eutanásia. A,B - letras diferentes indicam diferença significativa entre colunas ( $P < 0,05$ ).

Os valores médios ( $\pm$  DP), com mínimo e máximo, dos dados da análise hematológica de cada grupo estão apresentados na Tabela 3. Os dados de cada animal foram analisados individualmente e, em geral, todos os animais apresentaram parâmetros hematológicos dentro



dos limites de normalidade para as espécies (última coluna na Tabela 3). Em alguns casos, foram vistas alterações em parâmetros específicos, mas sem correlação com o tratamento.

Valores médios ( $\pm$ DP), com mínimo e máximo, para a análise bioquímica de cada grupo estão apresentados na Tabela 4, com os limites de normalidade para as espécies na última coluna. Analisando cada animal individualmente, todos os animais apresentaram valores de creatinina e ALT dentro dos limites de normalidade para a espécie. No entanto, todos os animais (tratados e controles) apresentaram valores de uréia e AST superiores aos limites normais para a espécie.

A análise histológica dos testículos permitiu a identificação de todas as células germinativas nos túbulos seminíferos, bem como os espermatozoides no lúmen dos túbulos, e arquitetura normal do túbulo seminífero, com o epitélio germinativo em diferentes estágios de desenvolvimento, para os animais do grupo controle, grupo placebo e AgNP-D56. Nos grupos AgNP-D7, AgNP-D14 e AgNP-D28 é possível perceber que a arquitetura do túbulo seminífero é normal, embora haja alguns debris celulares no lúmen e poucos espermatozoides (Figura 9).

A histologia do epidídimo mostrou espermatozoides no lúmen dos grupos controle e placebo, bem como no grupo AgNP-D56. No grupo AgNP-D7, não é possível ver nenhum espermatozoide, enquanto nos grupos AgNP-D14 e AgNP-D28 alguns espermatozoides são visíveis juntamente com alguns debris (Figura 10).

Comparado ao grupo controle, todos os parâmetros tubulares avaliados foram significativamente menores ( $P < 0,05$ ) no grupo AgNP-D7 e no grupo placebo (Tabela 5). Além disso, uma altura do epitélio significativamente menor no grupo AgNP-D28 e um diâmetro da luz significativamente menor em AgNP-D14 foram observados quando comparados aos valores do grupo controle ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 3:** Valores hematológicos médios ( $\pm$  DP) em sangue periférico (mínimo e máximo) por grupo no dia da eutanásia.

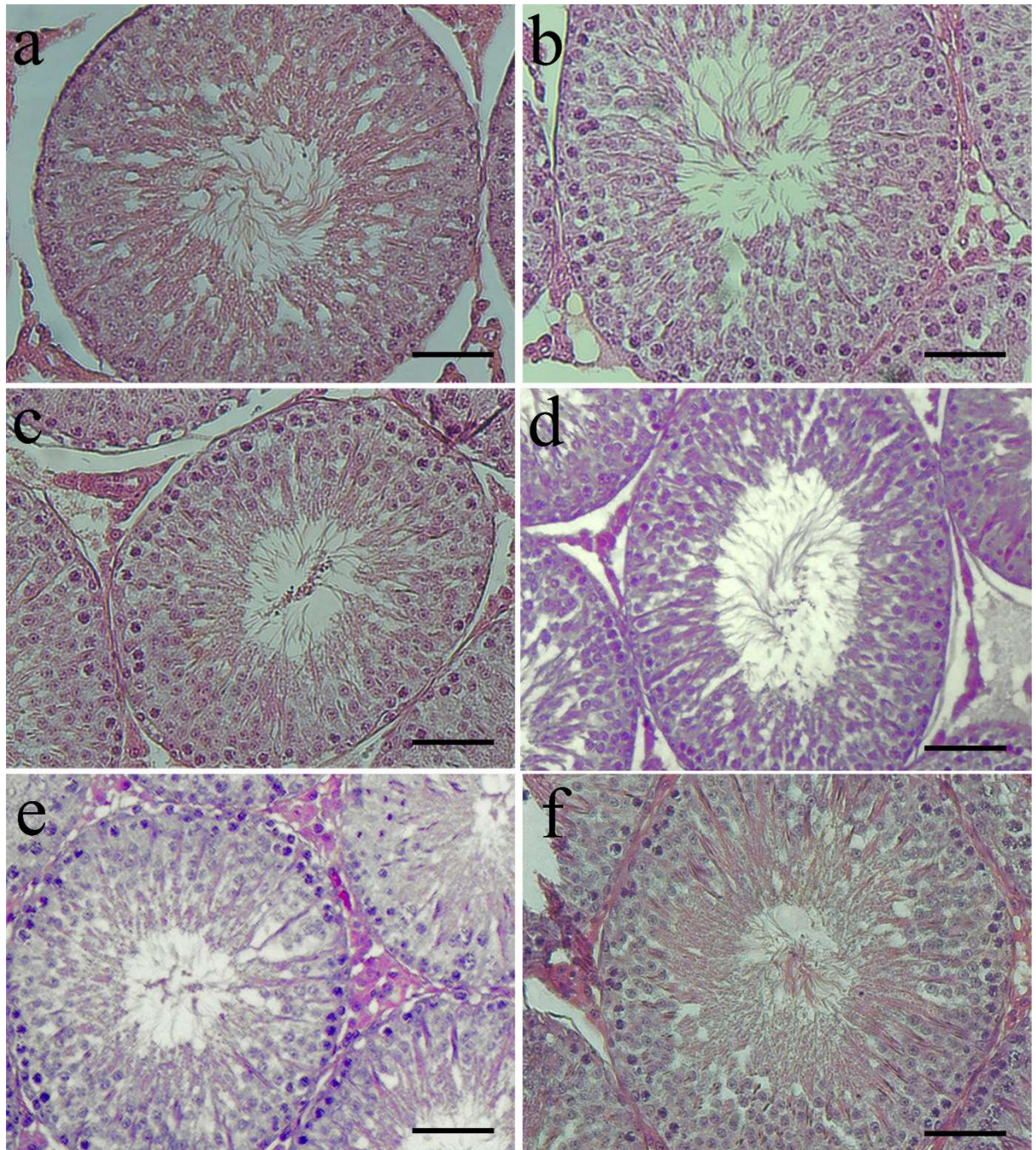
Parâmetros	Grupo controle	Grupo placebo	AgNP-D7	AgNP-D14	AgNP-D28	AgNP-D56	Limites de normalidade*
<b>CB (<math>10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	3,75 $\pm$ 1,6 (2,5 – 6,2)	4,45 $\pm$ 5,4 (0,8 – 12,5)	3,68 $\pm$ 1,7 (1,7 – 5,8)	5,58 $\pm$ 3,7 (1,2 – 9,7)	4,40 $\pm$ 1,0 (3,1 – 5,8)	5,46 $\pm$ 1,9 (2,4 – 7,4)	6,0 - 15,0
<b>CV (<math>10^6/\mu\text{L}</math>)</b>	5,45 $\pm$ 0,7 (4,6 – 6,3)	3,90 $\pm$ 2,3 (1,2 – 6,8)	5,50 $\pm$ 1,9 (2,6 – 7,8)	6,14 $\pm$ 1,5 (3,5 – 7,3)	5,78 $\pm$ 0,9 (4,2 – 6,5)	7,38 $\pm$ 1,2 (5,3 – 8,3)	6,0 - 10,0
<b>HB (g/dL)</b>	11,55 $\pm$ 1,5 (9,6 – 13,2)	7,95 $\pm$ 4,7 (2,5 – 13,9)	10,88 $\pm$ 3,9 (5,0 – 15,3)	12,98 $\pm$ 3,5 (7,2 – 15,7)	12,02 $\pm$ 2,1 (8,5 – 13,6)	14,56 $\pm$ 2,6 (10,2 -16,4)	11,0 - 19,5
<b>HTC (%)</b>	31,68 $\pm$ 4,4 (26,3 – 36,9)	25,53 $\pm$ 15,6 (8,0 – 26,7)	32,20 $\pm$ 11,4 (14,5 – 44,9)	35,44 $\pm$ 8,8 (20,3 – 41,9)	33,72 $\pm$ 5,7 (24,6 – 38,0)	40,20 $\pm$ 6,3 (29,5 – 44,9)	39 - 55
<b>VCM (fL)</b>	58,13 $\pm$ 0,70 (57,5 – 59,0)	65,15 $\pm$ 2,9 (60,8 – 67,1)	58,40 $\pm$ 1,6 (56,0 - 59,8)	57,88 $\pm$ 0,6 (57,1 – 58,5)	58,52 $\pm$ 2,1 (55,0 – 60,4)	54,56 $\pm$ 1,0 (53,1 – 55,7)	46,0 - 65,0
<b>HCM (pg)</b>	21,22 $\pm$ 0,7 (20,7 – 22,3)	20,45 $\pm$ 0,2 (20,3 – 20,7)	19,74 $\pm$ 0,4 (19,3 – 20,4)	21,08 $\pm$ 0,6 (20,5 – 24,5)	20,84 $\pm$ 0,5 (20,2 – 21,6)	19,68 $\pm$ 0,3 (19,2 – 20,1)	18,0 - 23,0
<b>CHCM (g/dL)</b>	36,5 $\pm$ 1,0	31,4 $\pm$ 1,33	33,8 $\pm$ 0,7	36,5 $\pm$ 1,1	36,5 $\pm$ 0,9	36,1 $\pm$ 1,2	31,0 - 40,0
<b>PLT (<math>10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	266,5 $\pm$ 338,6	133,3 $\pm$ 166,3	298,6 $\pm$ 255,8	239,2 $\pm$ 88,4	329,6 $\pm$ 275,0	286,3 $\pm$ 235,8	200 - 1500

CB: células brancas; CV: Células vermelhas; HB: Hemoglobina; HTC: Hematócrito; VCM: Volume corpuscular médio; HCM: Hemoglobina corpuscular média; CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média; PLT: Plaquetas. \*Cubas et al., 2014.

**Tabela 4:** Valores bioquímicos médios ( $\pm$  DP) no plasma sanguíneo (mínimo e máximo) por grupo no dia da eutanásia.

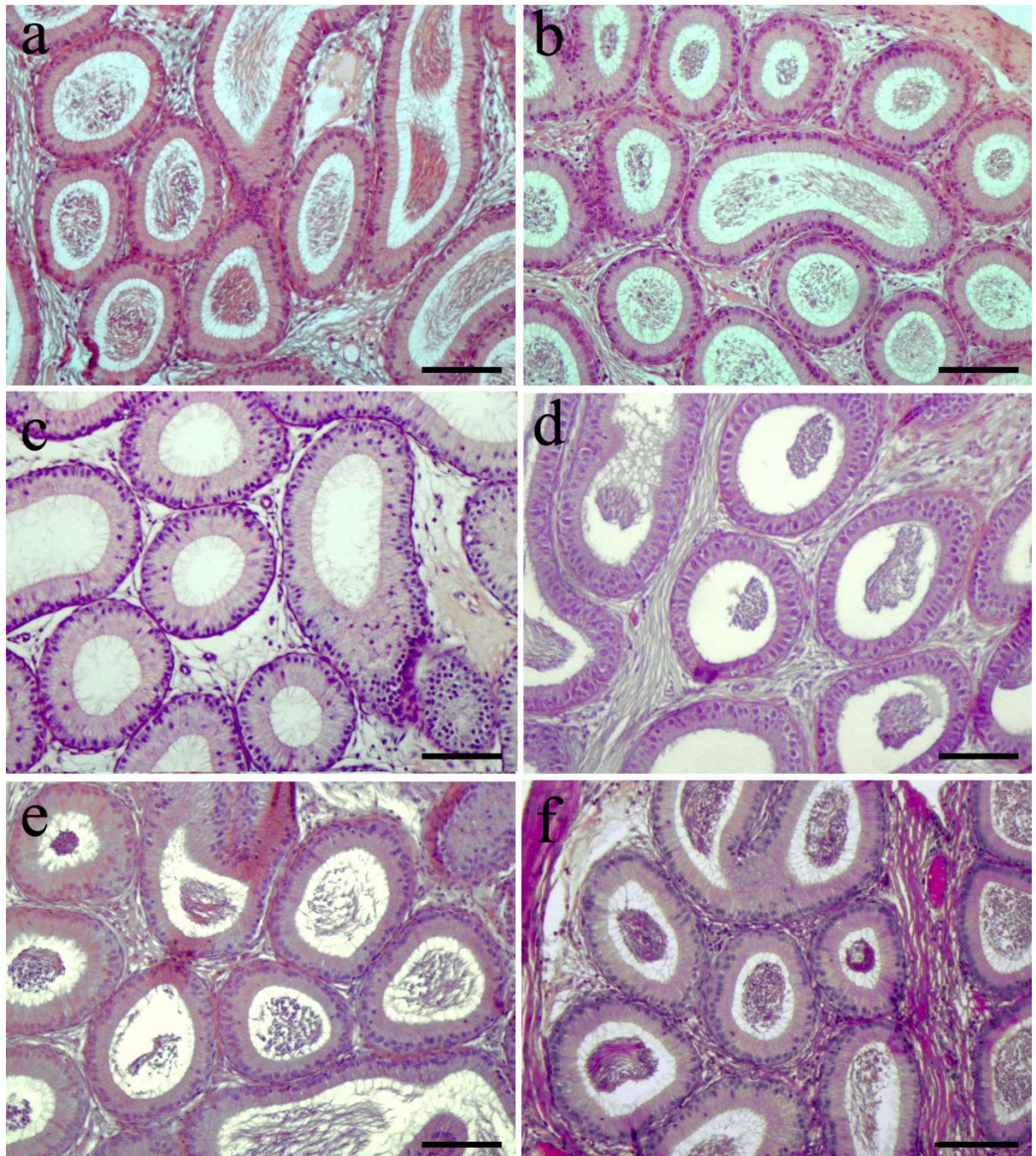
Parâmetros	Grupo controle	Grupo placebo	AgNP-D7	AgNP-D14	AgNP-D28	AgNP-D56	Limites de normalidade*
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,70 $\pm$ 0,07 (0,61 – 0,77)	0,71 $\pm$ 0,05 (0,66 – 0,78)	0,59 $\pm$ 0,04 (0,54 – 0,66)	0,41 $\pm$ 0,17 (0,20 – 0,63)	0,45 $\pm$ 0,08 (0,32 – 0,55)	0,58 $\pm$ 0,04 (0,53 – 0,61)	0,2 – 0,8
<b>Ureia (mg/dL)</b>	65 $\pm$ 16 (44 - 80)	43 $\pm$ 3 (43 - 49)	64 $\pm$ 10 (52 - 74)	77 $\pm$ 8 (64 - 84)	82 $\pm$ 4 (76 - 88)	78 $\pm$ 4 (73 - 84)	15 - 21
<b>ALT (U/L)</b>	55 $\pm$ 17 (43 - 78)	120 $\pm$ 62 (58 - 178)	55 $\pm$ 54 (18 - 151)	51 $\pm$ 16 (29 - 71)	48 $\pm$ 9 (34 - 60)	65 $\pm$ 21 (39 - 89)	17 - 224
<b>AST (U/L)</b>	186 $\pm$ 66 (108 - 269)	225 $\pm$ 127 (115 - 390)	170 $\pm$ 98 (93 - 313)	158 $\pm$ 47 (84 - 198)	129 $\pm$ 26 (100 - 169)	294 $\pm$ 72 (220 - 393)	39 -92

\*Cubas et al., 2014.



**Figura 9:** Fotomicrografias dos túbulos seminíferos de cada grupo. Grupo de controle (a); Grupo placebo (b); AgNP-D7 (c); AgNP-D14 (d); AgNP-28 (e); AgNP-D56 (f). (Barras = 10µm).





**Figura 10:** Fotomicrografias do epidídimo de cada grupo. Grupo de controle (a); Grupo placebo (b); AgNP-D7 (c); AgNP-D14 (d); AgNP-28 (e); AgNP-D56 (f). Barras = 10 $\mu$ m).

**Tabela 5:** Morfometria dos túbulos seminíferos (média ± DP) na análise histológica dos testículos de todos os grupos.

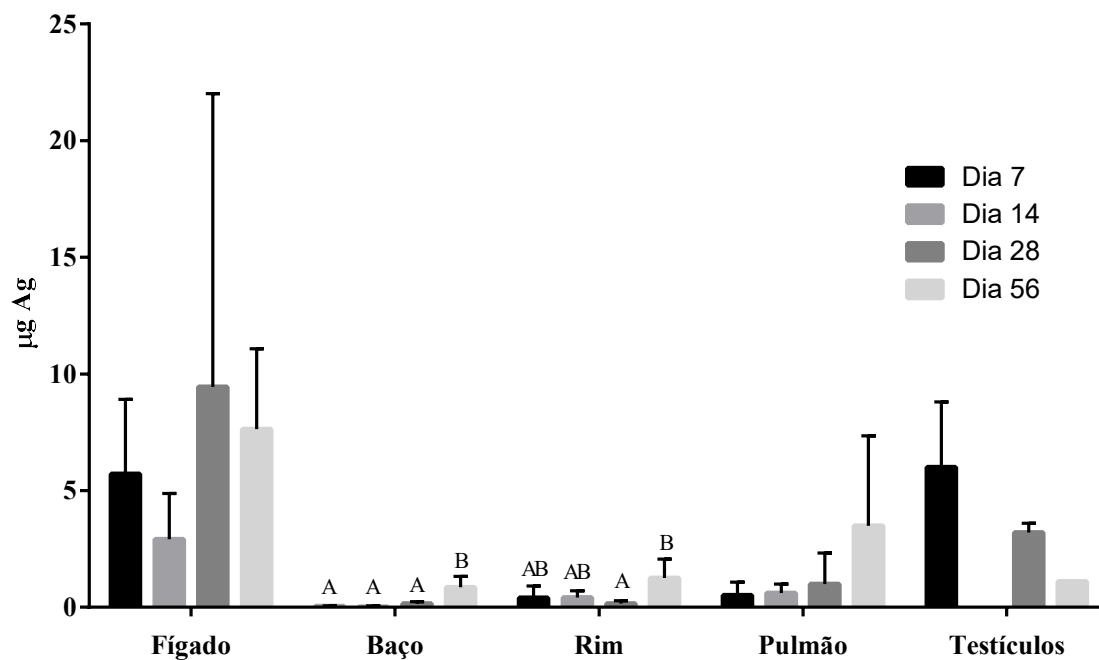
	<b>Grupo controle</b>	<b>Grupo placebo</b>	<b>AgNP-D7</b>	<b>AgNP-D14</b>	<b>AgNP-D28</b>	<b>AgNP-D56</b>
<b>Área do túbulo (µm<sup>2</sup>)</b>	33166±3684 <sup>CD</sup>	30514±3020 <sup>B</sup>	29213±2994 <sup>A</sup>	33144±4174 <sup>CD</sup>	32549±3552 <sup>C</sup>	33979±4372 <sup>D</sup>
<b>Área da luz do túbulo (µm<sup>2</sup>)</b>	14378±3853 <sup>A</sup>	12841±3172 <sup>B</sup>	11342±3106 <sup>C</sup>	13820±3944 <sup>A</sup>	14676±3433 <sup>A</sup>	14504±3935 <sup>A</sup>
<b>Diâmetro do túbulo (µm)</b>	275,56±54,90 <sup>BC</sup>	249,83±71,73 <sup>A</sup>	246,88±49,31 <sup>A</sup>	272,73±67,12 <sup>BC</sup>	268,77±60,40 <sup>B</sup>	279,95±61,22 <sup>C</sup>
<b>Diâmetro da luz do túbulo (µm)</b>	106,49±37,54 <sup>A</sup>	96,64±38,41 <sup>B</sup>	74,78±34,69 <sup>C</sup>	97,31±44,29 <sup>B</sup>	104,60±40,73 <sup>AB</sup>	103,76±53,93 <sup>AB</sup>
<b>Altura do epitélio (µm)</b>	90,35±20,40 <sup>A</sup>	82,22±14,88 <sup>B</sup>	86,02±20,13 <sup>B</sup>	94,41±29,85 <sup>C</sup>	83,62±16,83 <sup>B</sup>	93,19±19,97 <sup>AC</sup>

ABCD - letras diferentes indicam diferença significativa na mesma linha (P<0,05).

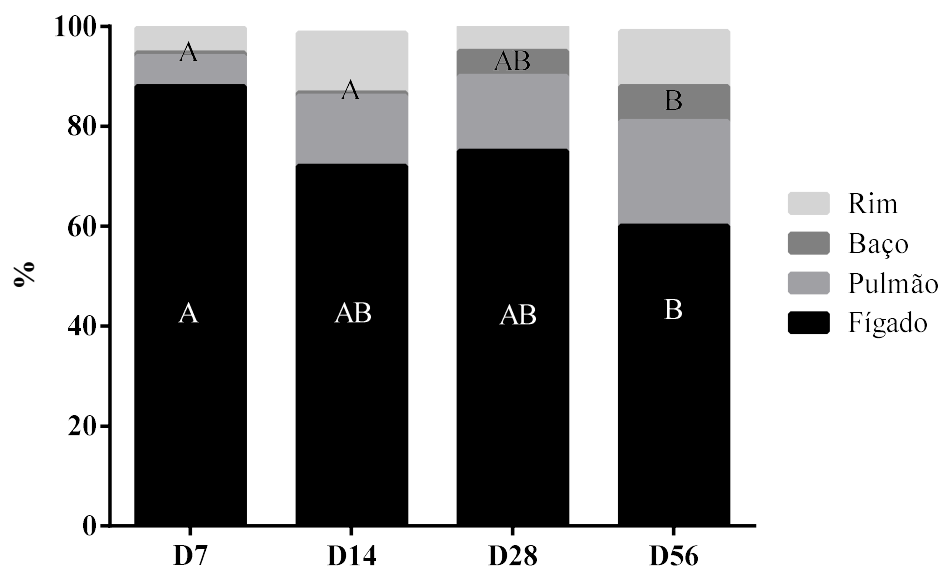
A aparência geral do fígado, baço, rins e pulmões estava normal durante a eutanásia. Não foram observadas diferenças no aspecto, cor ou formato. A quantidade total de Ag nos órgãos (fígado, baço, rim, pulmão e testículo), determinada por ICP-MS, é mostrada na Figura 11, e a porcentagem de Ag encontrada em cada órgão (exceto testículos) é mostrada na Figura 12. Após a injeção intratesticular, Ag foi encontrado principalmente no fígado em todos os tempos de avaliação, tanto quando a quantidade total (2,9-9,4 µg) quanto a porcentagem (60-88%) foram consideradas.

No testículo, a quantidade média de Ag encontrada não mostrou diferença significativa. A quantidade de Ag encontrada no epidídimo foi irrelevante (variando de 0,004 a 0,014 µg). A quantidade média de Ag encontrada no fígado não mostrou diferença significativa ao longo do experimento. No baço, a quantidade de Ag foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) no AgNP-D56 comparado ao AgNP-D7, AgNP-D14 e AgNP-D28, e no rim um valor significativamente maior ( $P < 0,05$ ) foi encontrado no AgNP-D56 em comparação ao AgNP-D28. Nos pulmões, embora tenha havido um aumento na quantidade de Ag em AgNP-D56, não foi estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) (Figura 11).

Considerando a quantidade total de Ag encontrada nos órgãos (excluindo testículos), foi calculada a porcentagem presente em cada órgão. A porcentagem de Ag encontrada no fígado foi significativamente maior no AgNP-D7 do que no AgNP-D56 ( $P < 0,05$ ). Pelo contrário, a porcentagem de Ag encontrada no baço foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) no AgNP-D56 do que no AgNP-D7 e AgNP-D14 (Figura 12), embora a quantidade de Ag ainda fosse baixa (0,86 µg).



**Figura 11:** Quantidade média ( $\pm$ DP) de prata ( $\mu\text{g}$ ) nos órgãos dos animais tratados com AgNP nos dias 7, 14, 28 e 56 após a injeção intratesticular, mensurada por ICP-MS. A,B - letras diferentes indicam diferença significativa entre colunas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 12:** Distribuição percentual de toda a prata (Ag) encontrada em rim, baço, pulmões e fígado dos animais tratados com AgNP nos dias 7, 14, 28 e 56 após a injeção intratesticular. A,B - letras diferentes indicam diferença significativa entre colunas ( $P < 0,05$ ).



## 8. DISCUSSÃO

Este estudo pretendia avaliar a toxicidade das AgNPs no sistema reprodutivo de machos, visando a esterilização de machos por administração intratesticular. Após o tratamento observamos uma redução severa na motilidade e no número de espermatozoides com morfologia normal 7 dias após o tratamento, embora esses achados não tenham sido duradouros. Os parâmetros espermáticos tiveram o início da sua recuperação em 14 dias e retornaram ao normal 56 dias após a injeção. Já foi demonstrado que as AgNPs causam danos aos espermatozoides. Ahmed et al. (2016) observaram uma redução significativa na contagem e na motilidade de espermatozoides, juntamente com um aumento na anormalidade espermática em animais que receberam injeção intraperitoneal de AgNP com PVP como dispersante durante 7 e 28 dias. Baki et al. (2014) também observaram uma diminuição significativa na motilidade espermática e no número de espermatozoides com morfologia normal em ratos Wistar machos que foram alimentados com AgNP (sem informação de cobertura). Gromadzka-Ostrowska et al. (2012), observaram uma diminuição no número de espermatozoides do epidídimo e um aumento no número de espermatozoides mortos, juntamente com um dano significativamente maior no DNA de células germinativas, após injeção intravenosa de AgNP (sem informação de cobertura), mais evidente na concentração de 100 e 200 mg/kg. In vitro, Terzuoli et al. (2012) mostraram que espermatozoides expostos a AgNPs, com PVP como agente estabilizante, tinham motilidade diminuída. Todos esses autores também apontam que os efeitos prejudiciais de AgNP nos espermatozoides são mais proeminentes com o aumento da dose e duração da exposição (GROMADZKA-OSTROWSKA *et al.*, 2012; BAKI *et al.*, 2014; AHMED *et al.*, 2016). Além disso, esses estudos não avaliaram os resultados ao longo do tempo, de modo que não há menção sobre os resultados serem permanentes ou temporários.

Estudos mostraram que a AgNP afeta a membrana da célula espermática e pode penetrar nas células. A prata é conhecida por aumentar a produção de radicais livres, incluindo ROS,

que levam à diminuição da motilidade e viabilidade dos espermatozoides e podem prejudicar a estrutura da membrana e do flagelo dessas células (AZIZ *et al.*, 2004; BRAYDICH-STOLLE *et al.*, 2005; YOSHIDA *et al.*, 2008). Também foi demonstrado que AgNP pode induzir necrose, apoptose e disfunção mitocondrial em células-tronco de espermatogônias de camundongos (BRAYDICH-STOLLE *et al.*, 2005). No entanto, em nosso estudo, os efeitos negativos sobre as células germinativas masculinas não foram duradouros, sugerindo que as espermatogônias não foram afetadas. De fato, a maioria dos efeitos do AgNP neste trabalho parece ter sido nos espermatozoides do epidídimo. Isso pode explicar os parâmetros normais observados 56 dias após o tratamento, o que corresponde a um processo completo de espermatogênese (RUSSELL *et al.*, 1993; MCCARREY, 1993; CREASY, 1997). Da mesma forma, Gromadzka-Ostrowska *et al.* (2012) sugerem que os efeitos sistêmicos de genotoxicidade das AgNPs observados em seu trabalho são pronunciados em espermatozoides maduros no epidídimo.

Em relação à histologia dos testículos, em nenhum momento foram observados dano ou ausência de qualquer tipo de célula germinativa. Apenas uma redução na quantidade de espermatozoides e a presença de debris celulares dentro do lúmen dos túbulos seminíferos no grupo AgNP-D7. Da mesma forma, não foi possível observar espermatozoides no lúmen do epidídimo de animais do grupo AgNP-D7, enquanto alguns espermatozoides e debris foram encontrados no epidídimo dos grupos AgNP-D14 e AgNP-D28. Lafuente *et al.* (2016) também não encontraram alterações significativas na morfologia dos testículos e epidídimos de ratos tratados por via oral com AgNP recobertas com PVP. Em contraste, Gromadzka-Ostrowska *et al.* (2012) observaram danos no epitélio seminífero, espaços intercelulares mais amplos e vacuolização após injeção intravenosa de AgNP. Considerando que usamos uma injeção local de AgNP, esperávamos observar mudanças mais significativas na morfologia testicular. Nossos achados sugerem que somente os espermatozoides espermiados estão sendo afetados, seja

dentro dos túbulos seminíferos ou no epidídimo. Alguns estudos sobre toxicologia reprodutiva classificaram numerosas substâncias químicas que são tóxicas para os testículos e podem alterar a quantidade e a qualidade dos espermatozoides produzidos durante espermatogênese e a quantidade e qualidade dos espermatozoides que entram no epidídimo, identificando o epidídimo como um alvo independente do testículo. Além disso, existem várias substâncias químicas que produzem redução especificamente no número de espermatozoides da cauda do epidídimo, sem alteração no número de espermatozoides testiculares (KEMPINAS e KLINEFELTER 2014a, 2014b).

Os espermatozoides são células mais sensíveis ao estresse oxidativo que outros tipos de célula (VERNET *et al.*, 2004). Já é sabido que a Ag aumenta a produção de radicais livres e alguns trabalhos mencionam que a Ag reduz o potencial antioxidante nos espermatozoides do epidídimo (LATCHOUMYCANDANE *et al.*, 2003). Assim, no presente estudo, é possível que as AgNPs presentes nos testículos tenham aumentado a produção local de radicais livres e este estresse oxidativo tenha afetado os espermatozoides nos túbulos seminíferos e epidídimos. Além disso, já foi visto que AgNP podem causar danos ao DNA dos espermatozoides (GROMADZKA-OSTROWSKA *et al.*, 2012). As células de mamíferos (incluindo células germinativas) possuem vários mecanismos de reparo de DNA. Este reparo pode ser realizado em um curto período de tempo, mantendo a integridade genômica das células (OZTURK & DEMIR, 2011). No entanto, espermatozoides espermiados não possuem capacidade de reparo de DNA (GONZÁLEZ-MARÍN, 2012). Isso pode justificar a ausência de danos às espermatogônias e demais células da linhagem germinativa (excetuando os espermatozoides) observado em nosso estudo.

A análise morfométrica dos túbulos seminíferos mostrou que todos os parâmetros tubulares avaliados apresentaram redução significativa no grupo AgNP-D7 e no grupo placebo, enquanto não houve diferença entre AgNP-D14, AgNP-D28 e AgNP-D56 e o grupo controle.

Resultados semelhantes foram relatados por Fathi et al. (2018), que relataram que uma injeção intraperitoneal de AgNP (125 mg/kg; sem informação de cobertura) causou uma redução significativa no diâmetro, área e circunferência dos túbulos seminíferos. Em contraste, o aumento do diâmetro, área e circunferência dos túbulos seminíferos em animais tratados com AgNP foi observado por Gromadzka-Ostrowska et al. (2012). No entanto, Miresmaeili et al. (2013) não encontraram alterações significativas no diâmetro dos túbulos seminíferos em animais tratados pela administração oral de AgNP em doses variando de 25 a 200 mg/kg após 48 dias. Estas diferenças podem ser devidas às diferentes rotas de administração utilizadas. Além disso, não observamos diferenças entre o peso relativo dos testículos e dos epidídimos nos animais tratados com AgNP. O mesmo foi observado em outros estudos com diferentes vias de administração do AgNP sem alterações significativas no corpo, testículos ou outros pesos relativos de órgãos de ratos machos (SUNG *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2010; GROMADZKA-OSTROWSKA *et al.*, 2012; GARCIA *et al.*, 2014).

Independentemente da via de administração, as nanopartículas podem atravessar barreiras corporais e cair na corrente sanguínea através dos sistemas circulatório, linfático e excretor, se deslocando da circulação sanguínea para os principais órgãos, como rins, baço, fígado, pulmões e cérebro (DE JONG *et al.*, 2008; SINGH e LILLARD 2009; DZIENDZIKOWSKA *et al.*, 2012). Assim, avaliamos os animais quanto às funções sistêmicas, e não foram observadas alterações no consumo de água e alimentos e os animais ganharam peso conforme o esperado. Estudos anteriores mostraram que o consumo de comida e água, assim como o peso corporal e de órgãos, não diferiram entre animais tratados com AgNPs e grupos controle (SUNG *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2010).

Em nosso estudo todos os animais apresentaram parâmetros hematológicos dentro dos limites de normalidade para a espécie (CUBAS *et al.*, 2014), alguns parâmetros específicos foram alterados, mas sem correlação com os tratamentos. Da mesma forma, outros autores não

observaram mudanças significativas nos parâmetros hematológicos para ratos expostos ao AgNP (Sung *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2017). No presente trabalho, observamos parâmetros bioquímicos de ALT e creatinina dentro dos limites de normalidade das espécies (CUBAS *et al.*, 2014) para todos os animais, e valores aumentados de ureia e AST para todos os animais, nos grupos controle e tratado, que não foram correlacionados com o tratamento. É importante notar que a literatura apresenta dados bastante discrepantes para os limites de normalidade dos parâmetros bioquímicos em ratos. Por exemplo, os limites para AST são descritos como 63 - 175 (QUESENBERRY e CARPENTER, 2012) ou 39 - 92 (CUBAS *et al.*, 2014). Da mesma forma, para a ureia os limites são descritos como 26 - 58 (LIMA *et al.*, 2014) ou 15 - 21 (CUBAS *et al.*, 2014). Outros estudos também não relatam alterações significativas nos parâmetros bioquímicos sanguíneos em animais tratados com AgNP (SUNG *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2017), embora a maioria dos trabalhos não utilize esse tipo de análise.

Também analisamos a presença de Ag por ICP-MS no fígado, baço, rim e pulmões após a injeção intratesticular de AgNP. Uma quantidade mínima de AgNP foi encontrada em todos os órgãos analisados (baço, rim, fígado e pulmão), mas a quantidade e a porcentagem de Ag encontrada foram sempre maiores no fígado do que nos outros órgãos. De fato, outros autores descrevem que o fígado é o órgão alvo na distribuição tecidual do AgNP (KIM *et al.*, 2010; LANKVELD *et al.*, 2010; LOESCHNER *et al.*, 2011; VAN DER ZANDE *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2017), independente da rota de administração. Diferentemente, Xue *et al.* (2012) encontraram os maiores níveis de prata no baço, seguido pelo fígado, pulmões e rins quando da administração endovenosa. Quando administrada oralmente, a prata é excretada principalmente pelas fezes, e a análise da prata total mostrou o acúmulo no fígado (JIMÉNEZ-LAMANA *et al.*, 2014). As nanopartículas de prata também são excretadas pelas fezes quando injetadas por via endovenosa, e os autores sugerem que são excretadas pela bile (PARK *et al.*, 2011). Apesar

de encontrar Ag em órgãos sistêmicos, nenhum sinal de prejuízo na função dos órgãos foi observado nos animais do presente estudo.

A biodistribuição da AgNP permitiu observar que junto com o aumento da presença de prata nos fígados, houve uma diminuição em sua quantidade nos testículos. Ao mesmo tempo que a AgNP foi biodistribuída dos testículos para os outros órgãos do corpo, ocorreu uma diminuição do efeito tóxico e deletério das AgNPs nas células testiculares. Tiwari e colaboradores (2011), estudando especialmente fígado e rins de animais que receberam AgNP endovenosa, observaram que doses altas (superiores a 10 mg/kg) são tóxicas para estes órgãos nos estágios iniciais do tratamento, mas o efeito tóxico diminui com o tempo. Portanto, o efeito deletério da AgNP às células germinativas, neste estudo, que ocorreu no início e conforme o tempo passou foi se dissipando, possibilita uma correlação do efeito deletério da AgNP com a sua presença nos testículos.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível observar que a injeção intratesticular de AgNP causou alguns efeitos negativos na motilidade espermática, e também causou algumas alterações na morfologia dos espermatozoides. No entanto, nenhum efeito severo e irreversível foi observado, sendo incapaz de tornar inférteis os animais tratados. Nenhum efeito adverso foi observado nos órgãos vitais como fígado, rins, pulmão e baço durante o período avaliado.

Embora o efeito esperado de castração não tenha sido alcançado através das nanopartículas de prata, a utilização de nanopartículas com esse objetivo parece promissor. Talvez outras doses poderiam ser estudadas na tentativa de atingir o efeito castrativo desejado. Considerando o efeito temporário que a AgNP possui, e a ausência de efeitos adversos, a injeção intratesticular de AgNP também poderia ser estudada como um método contraceptivo temporário, para machos.

## 10. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ACC&D. Contraception and Fertility Control in Dogs and Cats. Acesso em 22/02/2017 <<http://www.acc-d.org/resource-library/e-book>>, 2013

ADLER, I.D. Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mutation Research* 352: 169- 172, 1996.

AHAMED, M., ALSALHI, M.S., SIDDIQUI, M.K.J. Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica Chimica Acta*, 411: 1841–1848, 2010. (doi: 10.1016/j.cca.2010.08.016)

AHMED, S.M., ABDELRAHMAN, S., SHALABY, S.M. Evaluating the effect of silver nanoparticles on testes of adult albino rats (histological, immunohistochemical and biochemical study). *Journal of Molecular Histology*, 48 (1): 9-27, 2016. (doi:10.1007/s10735-016-9701-4)

AILLON, K.L., XIE, Y., EL-GENDY, N., BERKLAND, C.J., FORREST, M.L. Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61: 457–466, 2009. (doi: 10.1016/j.addr.2009.03.010)

ARORA, S., RAJWADE, J.M., PAKNIKAR, K.M. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258: 151–165, 2012. (doi: 10.1016/j.taap.2011.11.010)

ASARE, N., INSTANES, C., SANDBERG, W.J., REFSNES, M., SCHWARZE, P., KRUSZEWSKI, M., BRUNBORG, G. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology*, 291, 65–72, 2012. (doi: 10.1016/j.tox.2011.10.022)

ASHARANI, P.V., MUN, G.L.K., PRAKASH, H.M., VALIYAVEETIL, S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *American Chemical Society*, 3 (2): 279–290, 2009a. (doi: 10.1021/nn800596w)

ASHARANI, P.V., PRAKASH, H.M., VALIYAVEETIL, S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biology*, 10 (65): 1-14, 2009b. (doi:10.1186/1471-2121-10-65)

ASHARANI, P., SETHU, S., LIM, H.K., BALAJI, G., VALIYAVEETIL, S., HANDE, MP. Differential regulation of intracellular factors mediating cell cycle, DNA repair and inflammation following exposure to silver nanoparticles in human cells. *Genome Integrity*, 3: 2, 2012. (doi: 10.1186/2041-9414-3-2)



ASHOKA, S., PEAKE, B.M., BREMNER, G., HAGEMAN, K.J., REID, M.R. Comparison of digestion methods for ICP-MS determination of trace elements in fish tissues. *Analytica Chimica Acta*, 653, 191–199, 2009. (doi:10.1016/j.aca.2009.09.025)

ASPCA. American Society for the Prevention of Cruelty to Animals. <<https://www.aspca.org/animal-homelessness/shelter-intake-and-surrender/pet-statistics/>> acesso em 24/02/2017, 2009.

AZIZ, N., SALEH R.A., SHARMA, R.K., LEWIS-JONES, I., ESFANDIARI, N., THOMAS, A.J., AGARWAL, A. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertility and Sterility*, 81, 349–354, 2004. (doi:10.1016/j.fertnstert.2003.06.026)

BAHADAR, H., MAQBOOL, F., NIAZI, K., ABDOLLAHI, M. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. *Iranian Biomedical Journal*, 20(1): 1-11, 2016. (doi: 10.7508/ibj.2016.01.001)

BAILEY, T.L., MONKE, D., HUDSON, R.S., WOLFE, D.F., CARSON, R.L., RIDDELL, M.G. Testicular shape and its relationship to sperm production in mature Holstein bulls. *Theriogenology*, 46 (3): 881-887, 1996.

BAKI, M.E., MIREMAILI, S.M., POURENTEZARI, M., AMRAII, E., YOUSEFI, V., SPENANI, H. R., TALEBI, A.R., ANVARI, M., FAZILATI, M., FALLAH, A.A., MANGOLI, E. Effects of silver nanoparticles on sperm parameters, number of Leydig cells and sex hormones in rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 12 (2): 139-44, 2014.

BARKALINA, N., CHARALAMBOUS, C., JONES, C., COWARD, K. Nanotechnology in reproductive medicine: Emerging applications of nanomaterials. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10 (5): 921-938. (10.1016/j.nano.2014.01.001)

[www.aaem.pl](http://www.aaem.pl) REVIEW ARTICLE

BARTŁOMIEJCZYK, T., LANKOFF, A., KRUSZEWSKI, M., SZUMIEL, I. Silver nanoparticles – allies or adversaries? *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 20 (1): 48-54, 2013.

BLOOMBERG, M.S. Surgical neutering and nonsurgical alternatives. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 208 (4): 517-519, 1996.

BORM, P.J.A., KREYLING, W. Toxicological Hazards of Inhaled Nanoparticles—Potential Implications for Drug Delivery. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 4 (6), 2004. (doi:10.1166/jnn.2004.081)

BOWEN, R.A. Male contraceptive technology for nonhuman male mammals. *Animal Reproduction Science*, 105: 139-143, 2008. (doi:10.1016/j.anireprosci.2007.11.022)

BRAYDICH-STOLLE., HUSSAIN, S.M., SCHLAGER, J.J., HOFMANN, M. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicology. Science*, 88, 412–419, 2005. (doi:10.1093/toxsci/kfi256)

BROOKING, J., DAVIS, S., ILLUM, L. Transport of nanoparticles across the rat nasal mucosa. *Journal of Drug Target*, 9 (4): 267-79, 2001.

CÁCERES-VELEZ, P.R. Nanopartículas de prata na presença de ácido húmico em meio aquoso: caracterização físico-química e avaliação toxicológica em modelo zebrafish (*Danio rerio*). (Doutorado em Biologia Animal)—Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

CATHEY, M., MEMON, M.A. Nonsurgical methods of contraception in dogs and cats: where are we now? *Veterinary Medicine*, 105 (1): 12–17, 2010.

CHALOUPIKA, K., MALAM, Y., SEIFALIAN, A.M. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, 28 (11): 580-588, (doi:10.1016/j.tibtech.2010.07.006)

CHEN, X., SCHLUESENER, H.J. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters*, 176: 1-12, 2008. (doi:10.1016/j.toxlet.2007.10.004)

CHO, W.S., CHO, M., JEONG, J., CHOI, M., CHO, H.Y., HAN, B.S., KIM, S.H., KIM, H.O., LIM, Y.T., CHUNG, B.H., JEONG, J. Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236: 16–24, 2009. (doi: 10.1016/j.taap.2008.12.023)

CHOPRA, I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 587–590, 2007. (doi:10.1093/jac/dkm006)

CREASY, D.M. Evaluation of Testicular Toxicity in Safety Evaluation Studies: The Appropriate Use of Spermatogenic Staging. *Toxicologic Pathol.* 25, 119–131, 1997. (doi:10.1177/019262339702500201)

CUBAS, Z.S., SILVA, J.C.R., CATÃO-DIAS, J.L. *Tratado de Animais Selvagens*. Editora Roca, São Paulo, 2014.

DE JONG, W.H., BORM, P.J. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, 3 (2): 133-49, 2008.

DE JONG, W.H., HAGENS, W.I., KRYSTEK, P., BURGER, M.C., SIPS, A.J.A.M., GEERTSMA, R.E. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials*, 29 (12): 1912–1919, 2008. (doi:10.1016/j.biomaterials.2007.12.037)

DURAN, N., MARCARTO, P.D., DE SOUZA, G.I.H., ALVES, O.L., ESPOSITO, E. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3: 203–208, 2007. (doi:10.1166/jbn.2007.022)

DZIENDZIKOWSKA, K., GROMADZKA-OSTROWSKA, J., LANKOFF, A., OCZKOWSKI, M., KRAWCZYŃSKA, A., CHWASTOWSKA, J., SADOWSKA-BRATEK, M., CHAJDUK, E., WOJEWÓDZKA, M., DUŠINSKÁ, M., KRUSZEWSKI, M. Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats. *Journal of Applied Toxicology*, 32, 920–928, 2012. (doi:10.1002/jat.2758)

EMA M., KOBAYASHI N., NAYA M., HANAI S., and NAKANISHI J. (2010). Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. *Reproductive Toxicology*, 30, 343–352. (doi:10.1016/j.reprotox.2010.06.002)

ESTEVEZ, S.C., MIYAOSKA, R. Sperm Physiology and Assessment of Spermatogenesis Kinetics In Vivo. Em: *Handbook of Fertility*, Elsevier, 2015

FAHIM, M.S., WANG, M., SUTCU, M.F., FAHIM, Z., YOUNGQUIST, R.S. Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. *Contraception* 47:107-122, 1993.

FARAJI, A.H., WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17: 2950–2962, 2009. (doi:10.1016/j.bmc.2009.02.043)

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *FAO Animal production and health: dog population management. Report of the FAO/WSPA/IZSAM expert meeting - Banna, Italy, 14-19 March 2011. Animal Production and Health Report. No. 6. Rome, 2014.*

FATHI, N., HOSEINIPANAH, S.M., ALIZADEH, Z., ASSARI, M.J., MOGHIMBEIGI, A., MORTAZAVI, M., HOSSEINI, M.H., BAHMANZADEH, M. The effect of silver nanoparticles on the reproductive system of adult male rats: A morphological, histological and DNA integrity study. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 28 Epub ahead of print ,2018. (doi:10.17219/acem/81607)

FECAVA. “Health Benefits (Socioeconomic Value) of Companion Animals,” March:1–11, 2009.

FENG, Q.L., WU, J., CHEN, G.Q., CUI, F.Z., KIM, T.N., KIMM J.O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Material Research*, 52(4): 662–668, 2000.

FIELDS, M.J.; BURNS, W.C.; WARNIC, A.C. Age, season and breed effects on testicular volume and semen traits in young beef bulls. *Journal of Animal Science*, 48(6): 1299-1304, 1979.

FISCHER, H.C., CHAN, W.C.W. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 565–571, 2007.

FORZÁN, M.J., GARDE, E., PÉREZ, G.E., VANDERSTICHEL, R.V. Necrosuppurative orchitis and scrotal necrotizing dermatitis following intratesticular administration of a zinc gluconate neutralized with arginine (Esterisol) in 2 mixed-breed dogs. *Veterinary Pathology*, 51 (4): 820-823, 2014. (doi: 10.1177/030098581350587)

FOSSUM, T.W. *Small animal surgery*. 4th edition, Elsevier, USA, 2013.

FRANÇA, L.R; GODINHO, C.L. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biology of Reproduction*, 68 (5): 1554-1561, 2003.

GARCIA, T.X., COSTA, G.M.J., FRANÇA, L.R., HOFMANN, M.C. Sub-acute intravenous administration of silver nanoparticles in male mice alters Leydig cell function and testosterone levels. *Reproductive Toxicology*, 45, 59–70, 2014. (doi:10.1016/j.reprotox.2014.01.006)

GONG, P., LI, H., HE, X., WANG, K., HU, J., TAN, W., ZHANG, S., YANG, X. Preparation and antibacterial activity of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ag nanoparticles. *Nanotechnology*, 28 (18): 604–611, 2007.

GONZÁLEZ-MARÍN, C; GOSÁLVEZ, J; ROY, R. Types, Causes, Detection and Repair of DNA Fragmentation in Animal and Human Sperm Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 14026-14052, 2012. (doi:10.3390/ijms131114026)

GRIFFIN, B. *Nonsurgical Sterilization of Cats and Dogs*. ‘Shelter medicine for veterinarians and staff’. (Ed S Miller, M; Zawistowski), Wiley-Blackwell, pp. 689–696, 2013.

GROMADZKA-OSTROWSKA, J., DZIENDZIKOWSKA, K., LANKOFF, A., DOBRZYŃSKA, M., INSTANES, C., BRUNBORG, G., GAJOWIK, A., RADZIKOWSKA,

J., WOJEWÓDZKA, M., KRUSZEWSKI, M. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicology. Letters*, 214 (3), 251–258, 2012. (doi:10.1016/j.toxlet.2012.08.028)

HAUGHIE, A. Early age neutering – a veterinary perspective concentrating on cats (with some references to dogs). *World Society for the Protection of Animals*, 1-6, 1991.

HESS, R.A., FRANCA, L.R. *Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. Em: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, Cheng, C.Y. Springer Science, 2008.

HIBY, L.R., REECE, J.F., WRIGHT, R., JAISINGHANI, R., SINGH, B., HIBY, E.F. A mark-resight survey method to estimate the roaming dog population in three cities in Rajasthan, India. *BMC Veterinary Research* 7 (1). 46, 2011. (doi:10.1186/1746-6148-7-46)

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-tematicas/insumos-agropecuarios/ibge-populacao-de-animais-de-estimacao-no-brasil-2013-abinpet-79.pdf>> acesso em:22/02/2017, 2013.

ICAM Coalition. 2008. “Humane Dog Population Management Guidelines.” [www.icam-coalition.org](http://www.icam-coalition.org).

IMMEGART, H.M., THRELFALL, W.R. Evaluation of intratesticular injection of glycerol for nonsurgical sterilization of dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 61, (5): 544-549, 2000.

JANA, K., SAMANTA, P.K. Sterilization of male stray dogs with a single intratesticular injection of calcium chloride: a dose-dependent study. *Contraception* 75: 390–400, 2007. (doi:10.1016/j.contraception.2007.01.022)

JIMÉNEZ-LAMANA, J., LABORDA, F., BOLEA, E., ABAD-ÁLVARO, I., CASTILLO, J.R., BIANCA, J., HE, M., BIERLA, K., MOUNICOU, S., OUERDANE, L., GAILLET, S., ROUANE, T.J.M., SZPUNAR, J. An insight into silver nanoparticles bioavailability in rats. *Metallomics*, 6, 2242–2249, 2014. (doi:10.1039/c4mt00200h)

JOHNSTON, H.J., HUTCHISON, G., CHRISTENSEN, F.M., PETERS, S., HANKIN, S., STONE, V. A Review of the in Vivo and in Vitro Toxicity of Silver and Gold Particulates: Particle Attributes and Biological Mechanisms Responsible for the Observed Toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 40 (4): 328–346, 2010. (doi:10.3109/10408440903453074)

KALISHWARALAL, K., BARATHMANIKANTH, S., PANDIAN, S.R.K., DEEPAK, V., GURUNATHAN, S. Silver nano — A trove for retinal therapies. *Journal of Controlled Release* 145: 76–90, 2010. (doi:10.1016/j.jconrel.2010.03.022)

KEMPINAS, W.G., and KLINEFELTER, G.R. Interpreting histopathology in the epididymis. *Spermatogenesis* 4 (2), 2014a. (doi: 10.4161/21565562.2014.979114)

KEMPINAS, W.G., and Klinefelter, G.R. The Epididymis as a Target for Toxicants. Reference Module in Biomedical Research, 2014b. (doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.02140-1)

KIM, Y.S., SONG, M.Y., PARK, J.D., SONG, K.S., RYU, H.R., CHUNG, Y.H., CHANG, H.K., LEE, J.H., OH, K.H., KELMAN, B.J., HWANG, I.K., YU, I.J. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*, 7, 11, 2010. (doi:10.1186/1743-8977-7-20)

KOMATSU, T., TABATA, M., KUBO-IRIE, M., SHIMIZU, T., SUZUKI, K., NIHEI, Y., TAKEDA, K. The effects of nanoparticles on mouse testis Leydig cells in vitro. *Toxicology in Vitro*, 22 (8): 1825-1831, 2008. (doi:10.1016/j.tiv.2008.08.009)

KRUSE, H., KIRKEMO, A.M., HANDELAND, K. Wildlife as source of zoonotic infections. *Emerging Infectious Diseases*, 10 (12): 2067–2072, 2004. (doi:10.3201/eid1012.040707)

KUTZLER, M.A. intratesticular and intraepididymal injections to sterilize male cats: From calcium chloride to zinc gluconate and beyond. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 17: 772–776, 2015. (doi: 10.1177/1098612X15594991)

KUTZLER, M., WOOD, A. Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, 66: 514–525, 2006.

KWAK, B.K., LEE, S.H. Intratesticular Injection of Hypertonic Saline: Non-Invasive Alternative Method for Animal Castration Model. *Development & Reproduction*, 17(4): 435–440, 2013. (doi: 10.12717/DR.2013.17.4.435)

LAFUENTE, D., GARCIA, T., BLANCO, J., SÁNCHEZ, D.J., SIRVENT, J.J., DOMINGO, J.L., GÓMEZ, M. Effects of oral exposure to silver nanoparticles on the sperm of rats. *Reprod. Toxicol.* 60, 133–139, 2016. (doi:10.1016/j.reprotox.2016.02.007)

LANKVELD, D.P.K., OOMEN, A.G., KRYSTEK, P., NEIGH, A., TROOST, J.A., NOORLANDER, C.W., VAN EIJKEREN, J.C.H., GEERTSMA, R.E., DE JONG, W.H. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials* 31, 8350–8361, 2010. (doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.045)

LANONE, S., BOCZKOWSKI, J. Biomedical Applications and Potential Health Risks of Nanomaterials: Molecular Mechanisms. *Current Molecular Medicine*, 6: 651-663, 2006.

LARA, N.L.M., COSTA, G.M.J., AVELAR, G.F., LACERDA, S.M.S.N. Testis Physiology - Overview and Histology. Em: Encyclopedia of Reproduction, 2nd edition, Volume 1, Eslevier, 2018. (doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.64567-1)

LATCHOUMYCANDANE, C; CHITRA, K.C; MATHUR, P.P. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p -dioxin (TCDD) induces oxidative stress in the epididymis and epididymal sperm of adult rats. Archives Toxicology, 77: 280–284, 2003. (doi 10.1007/s00204-003-0439-x)

LEVY, J.K., CRAWFORD, C., APPEL, L.D., CLIFFORD, E.L. Comparision of intratesticular injection of zinc gluconate versus surgical castration to sterilize male dogs. American Journal of Veterinary Research, 69 (1): 140-143, 2008.

LÉONARD, A., GERBER, G.B., LÉONARD, F. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of zinc. Mutation Research, 168: 343-353, 1986.

LICHTLER, J. Castração precoce em pequenos animais: técnica, vantagens e roscos e uso no controle populacional. (Monografia de Medicina Veterinária) – Porto Alegre, 2014.

LIMA, C.M., LIMA, A.K., MELO, M.G.D., DÓRIA, G.A.A., LEITE, B.L.S., SERAFINI, M.R., ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C., ARAÚJO, A.A.S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. Scientia Plena, 10, 1–9, 2014. (10.1158/0008-5472.CAN-05-4569)

LIMA, V.N. fotohipertermia como possível indutora de infertilidade em ratos wistar machos. (Dissertação de Mestrado em Biologia Animal) - Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

LINDER, R.E; STRADER, L.F; SLOTT, V.L; SUAREZ, J.D. Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short Duration exposures to fourteen Reproductive toxicants. Reproductive Toxicology. 6: 491-505, 1992.

LOESCHNER, K., HADRUP, N., QVORTRUP, K., LARSEN, A., GAO, X., VOGEL, U., MORTENSEN, A., LAM, H.R., LARSEN, E.H. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. Particle and Fibre Toxicology, 8, 1–14, 2011. (doi:10.1186/1743-8977-8-18)

LOUVANDINI, H., MCMANUS, C., MARTINS, R.D., LUCCI, C.M., CORREA, P.S. Características biométricas testiculares em carneiros Santa Inês submetidos a diferentes regimes de suplementação proteica e tratamentos anti-helmínticos. Ciência Animal Brasileira, 9(3): 638-647, 2008.

LUCAS, B.E., FIELDS, C., HOFMANN, M. Signaling Pathways in Spermatogonial Stem Cells and Their Disruption by Toxicants. *Birth Defects Res C*; 87 (1): 35–42, 2009.

LUCAS, B.E., FIELDS, C., JOSHI, N., HOFMANN, M.C. Mono-(2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) affects ERK-dependent GDNF signalling in mouse stem-progenitorspermatogonia. *Toxicology*, 299: 10–19, 2012.

MACPHERSON, C.N.L., FRANCOIS-XAVIER, M., WANDELER, A.I. *Dogs, Zoonoses and Public Health*. Edited by Alexander I. Wandeler Calum N.L. Macpherson, Francois-Xavier Meslin. 2 ed. CAB International, 2013.

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

MASSEI, G., FOOKS, A.R., HORTON, D.L., CALLABY, R., SHARMA, K., DHAKAL, I.P., DAHAL, U. Free-Roaming Dogs in Nepal: Demographics, Health and Public Knowledge, Attitudes and Practices. *Zoonoses and Public Health*, 64, 29–40, 2016.

MCCARREY, J. Development of the germ cell. *Em: Cell and molecular biology of the testis*. (Ed EL Desjardins C.) Oxford University Press: New York, pp. 58–89, 1993.

MENEZES, R. Rabies in India. *Canadian Medical Association Journal*, 178: 564–566, 2008.

MIRESMAEILI, S.M., HALVAEI, I., FESAHAAT, F., FALLAH, A., NIKONAHAD, N., TAHERINEJAD, M. Evaluating the role of silver nanoparticles on acrosomal reaction and spermatogenic cells in rat. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 11, 423–430, 2013.

MOHAMED, A., JAMES, F.O. Chemical castration by a single bilateral intra-testicular injection of chlorhexidine gluconate and cetrime in bucks. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, Volume 11 (1): 62-65, 2013. (doi: 10.4314/sokjvs.v11i1.10)

MORONES, J.R., ELECHIGUERRA, J.L., CAMACHO, A., HOLT, K., KOURI, J.B., RAMÍREZ, J.T., YACAMAN, M.J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16: 2346–2353, 2005. (doi:10.1088/0957-4484/16/10/059)

NSET. *Nanoscale Science, Engineering, and Technology*. NSET Workshop Report, Editores ROCO, M & BAINBRIDGE, W.S, 2001.

OBERDORSTER, G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of Internal Medicine*, 267(1):89-105, 2010. (doi: 10.1111/j.1365-2796.2009.02187.x.)

OBERDORSTER, G., MAYNARD, A., DONALDSON, K., CASTRANOVA, V.,



FITZPATRICK, J., AUSMAN, K., CARTER, J., KARN, B., KREYLING, W., LAIIL, D., OLIN, S., MONTEIRO-RIVIERE, N., WARHEIT, D., YANG, H. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanoparticles: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology*, 2 (8): 1-35, 2005.

OLIVEIRA, E.C.S., MOURA, M.R.P., SÁ, M.J.C, SILVA JUNIOR, V.A., KASTELIC, J.P., DOUGLAS, R.H., JUNIOR, A.P.M. Permanent contraception of dogs induced with intratesticular injection of a zinc gluconated-based solution. *Theriogenology*, 77: 1056-1063, 2012a.

OLIVEIRA, E.C.S., MULLER, P.M., SILVA, F.L.M., NERY, L.T.B., SÁ, M.J.C, GUERRA, M.M.P., OLIVEIRA-ESQUERRE, K.P., KASTELIC, J.P., DOUGLAS, R.H. Oral administration of an anti-inflammatory does not compromise the efficacy of intratesticular injection of a zinc gluconate as a contraceptive for dogs. *Animal Reproduction Science*, 132: 207-212, 2012b.

OLIVEIRA, B.A.S., ROCHA, L.M, MÓL, B., VALLE, G.R. Métodos não cirúrgicos de contracepção masculina em cães. *Sinapse Múltipla*, 1 (1): 1-14, 2012c.

OLIVEIRA, E.C.S., FAGUNDES, A.K.F., MELO, C.C.S., NERY, L.T.B., REVOREDO, R.G., ANDRADE, T.F.G., OLIVEIRA-ESQUERRE, K., KASTELIC, J.P., SILVA JUNIOR, V.A. Intratesticular injection of a zinc-based solution for contraception of domestic cats: a randomized clinical trial efficacy and safety. *The Veterinary Journal*, 197: 307-310, 2013.

OLIVEIRA, E.C.S., MOURA, M.R.P., JUNIOR, V.A.S., PEIXOTO, C.A., SARAIVA, K.L.A., SÁ, M.J.C., DOUGLAS, R.H., JUNIOR, A.P.M. Intratesticular injection of a zinc-based solution as a contraceptive for dogs. *Theriogenology*, 68: 137-145, 2007.

OLIVEIRA-FILHO, E.C., MUNIZ, D.H.F., CARVALHO, E.L., CÁCERES-VELEZ, P.R., FASCINELI, M.L., AZEVEDO, R.B., GRISOLIA, C.K. Effects of AgNPs on the Snail *Biomphalaria glabrata*: Survival, Reproduction and Silver Accumulation. *Toxics*, 7, 12, 2019. (doi:10.3390/toxics7010012)

OLSON, P.N., JOHNSTON, S.D. New developments in small animal population control. *Journal of American Veterinary Association*, 202 (6): 904-909, 1993.

OZTURK, S; DEMIR, N. DNA repair mechanisms in mammalian germ cells. *Histology and Histopathology*, 26: 505-517, 2011.

PANYALA, N.R., PENA-MENDEZ, E.M., HAVEL, J. Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health? *Journal of Applied Biomedicine*, 6,

117–129, 2008.

PARK, E.J., YI, J, KIM, Y, CHOI, K, PARK, K. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicology in Vitro*, 24(3):872-878, 2010. (doi: 10.1016/j.tiv.2009.12.001)

PARK K., Park E. J., Chun I. K., Choi K., Lee S. H., Yoon J., and Lee B. C. (2011). Bioavailability and Toxicokinetics of citrate-coated silver nanoparticles in rats. *Arch. Pharm. Res.* 34, 153–158. (doi:10.1007/s12272-011-0118-z)

PETERSON, M.E; TALCOTT, P.A. *Small animal toxicology*. Saunders, 2 edição, 2012.

POWERS, K.W; BROWN, S.C; KRISHNA, V.B; WASDO, S.C; MOUDGIL, B.M; ROBERTS, S.M. *Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials. Part VI. Characterization of Nanoscale Particles for Toxicological Evaluation. Toxicological Sciences* 90(2): 296–303, 2006. (doi:1 01093/toxsci/kfj099)

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

PULIT-PROCIAK, J., BANACH, M. Silver nanoparticles - A material of the future...? *Open Chem.* 14, 76–91, 2016. (doi:10.1515/chem-2016-0005)

QUESENBERRY, K.E., Carpenter, J.W. *FERRETS, RABBITS, and RODENTS Clinical Medicine and Surgery*. (Elsevier), 2012.

Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials

RAI, M., YADAV, A., GADE, A. *Biotechnology Advances*, 27: 76–83, 2009. (doi:10.1016/j.biotechadv.2008.09.002)

RÔLO, J. L. P. *Avaliação dos efeitos de dois fluidos magnéticos na reprodução de ratos wistar machos (Tese de Doutorado em Biologia Animal) - Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.*

RUSSELL, L.D., ETTLIN, R.A., HIKIM, A.P.S., CLEGG, E.D. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. *International Journal of andrology*, 16:83, 1993. (doi: 10.1111/j.1365-2605.1993.tb01156.x)

SAMPAIO, G.R., SILVA, F.R.C., SALAN, M.O. *Controle Populacional de Caninos e Felinos por meio da Esterilização Cirúrgica. IX Congresso de Extensão da UFLA, realizado entre 27 e 31 de outubro de 2014.*

SAMUEL, U., GUGGENBICHLER, J.P. *Prevention of catheter-related infections: the*

potential of a new nano-silver impregnated cateter. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23S1: S75–S78, 2004. (doi:10.1016/j.ijantimicag.2003.12.004)

SCANLON, V.C., SANDERS, T. *Essentials of Anatomy and Physiology*. 5ed. F. A. Davis Company, 2007.

SCHATTEN, H., CONSTANTINESCU, G.M. *Comparative Reproductive Biology*. Blackwell, 2007.

SEED, J; CHAPIN, R.E; CLEGG, E.D; DOSTAL, L.A; FOOTE, R.H; HURTT, M.E; KLINEFELTER, G.R MAKRIS, S.L; PERREAULT, S.D; SCHRADER, S; SEYLER, D; SPRANDO, R; TREINEN,K.A; VEERAMACHANENI, D.N.R; WISE, D. Methods for assessing sperm motility, morphology, and Counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reproductive Toxicology*, 10 (3): 237-244, 1996.

SHUKLA, R.K., KUMAR1, A., PANDEY, A.K., SINGH, S.S., DHAWAN, A. Titanium Dioxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress-Mediated Apoptosis in Human Keratinocyte Cells. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 7: 100–101, 2011. (doi:10.1166/jbn.2011.1221)

SHARMA, R., AGARWAL, A. *Spermatogenesis: An Overview. Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*, Springer, 2011.

SHERWOOD, L. *Human physiology: from cells to systems*. 8a edição, USA, 2013.

SILVERTHORN, D.U. *Fisiologia Humana*. 5ed, Artmed, 2010.

SILVESTRY-RODRIGUEZ, N., SICAIROS-RUELAS, E.E., GERBA, C.P., BRIGHT, K.R. Silver as a disinfectant. Em: Ware, G.W. ed. *Reviews of environmental Contamination and Toxicology*, 191. Springer, New York, pp. 23–45, 2007.

SINGH, R., LILLARD J.W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*, 86, 215–223, 2009. (doi:10.1016/j.yexmp.2008.12.004)

SLATER M.R. The role of veterinary epidemiology in the study of free-roaming dogs and cats. *Preventive Veterinary Medicine*, 48 (4):273–86, 2001. (10.1016/S0167-5877(00)00201-4)

SLATER, M.R. *Community Approaches to Feral Cats: Problems, Alternatives, and Recommendations (Public Policy Series)*. 1sted. Humane Society of the US, 2002.

SLATER, M.R., SHAIN, S. Feral cats: An overview. ‘The state of the animals III’. (Ed Salem & A.N. Rowan) pp. 43–53. (Humane Society Press.: Washington DC), 2005.

SONDI, I., SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case

study on *E. coli* as a model for gram-negative bacteria. *Journal of Colloid Interface Science*, 275 177–82, 2004.

SONG, H.Y., KO, K.K., OH, I.H., LEE, B.T. Fabrication of Silver Nanoparticles and Their Antimicrobial Mechanisms. *European Cells and Materials*, 11(1), 2006.

SUNG, J.H., JI, J.H., PARK, J.D., YOON, J.U., KIM, D.S., JEON, K.S., SONG, M.Y., JEONG, J., HAN, B.S., HAN, J.H., CHUNG, Y.H., CHANG, H.K., LEE, J.H., CHO, M.H., KELMAN, B.J., YU, I.J. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 108, 452–461, 2009. (doi:10.1093/toxsci/kfn246)

TEPSUMETHANON, V., WILDE, H., HEMACHUDHA, T. Intratesticular injection of a balanced zinc solution for permanent sterilization of dogs, *Journal of the Medical Association of Thailand*, 88 (55): 686-689, 2005.

TERZUOLI, G., IACOPONI, F., MORETTI, E., RENIERI, T., BALDI, G., COLLODEL, G. In Vitro Effect of Silver Engineered Nanoparticles on Human Spermatozoa. *Journal of the Siena Academy of Sciences*, 3, 27, 2012. (doi:10.4081/jsas.2011.27)

TIWARI, D.K., JIN, T., BEHARI, J. Dose-dependent in-vivo toxicity assessment of silver nanoparticle in Wistar rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 21(1): 13–24, 2011.

UNFRIED, K., ALBRECHT, C., KLOTZ, L.O., MIKECZ, A.V., GREYER-BECK, S., SCHINS, R.P.F. Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology*, 1(1): 52-71, 2007. (doi: 10.1080/00222930701314932)

VAN DER ZANDE, M., VANDEBRIEL, R.J., VAN DOREN, E., KRAMER, E., HERRERA RIVERA, Z., SERRANO-ROJERO, C.S., GREMMER, E.R., MAST, J., PETERS, R.J.B., HOLLMAN, P.C.H., HENDRIKSEN, P.J.M., MARVIN, H.J.P., PEIJNENBURG, A. A.C.M., BOUWMEESTER, H. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano* 6, 7427–7442, 2012. (doi:10.1021/nn302649p)

VANPUTTE, C., REGAN, J., RUSSO, A., DEELEY, R., STEPHENS, T., TATE, P. *Seeley's Anatomy & Physiology*. 10th ed, McGraw-Hill, 2014.

WHO. World Health Organization. Expert Consultation on Rabies: Second Report. Geneva: World Health Organization, 2017.

WSPA. World Society for the protection of the animals. TASKER, L. Non-surgical methods for controlling the reproduction of dogs and cats. 2007.

XUE, Y., ZHANG, S., HUANG, Y., ZHANG, T., LIU, X., HU, Y., ZHANG, Z., TANG, M. Acute toxic effects and gender-related biokinetics of silver nanoparticles following

an intravenous injection in mice. *Journal of Applied Toxicology*, 32, 890–899, 2012. (doi:10.1002/jat.2742)

YANG, L., KUANG, H., ZHANG, W., AGUILAR, Z.P., WEI, H., XU, H. Comparisons of the biodistribution and toxicological examinations after repeated intravenous administration of silver and gold nanoparticles in mice. *Scientific Reports*, 1–12, 2017. (doi:10.1038/s41598-017-03015-1)

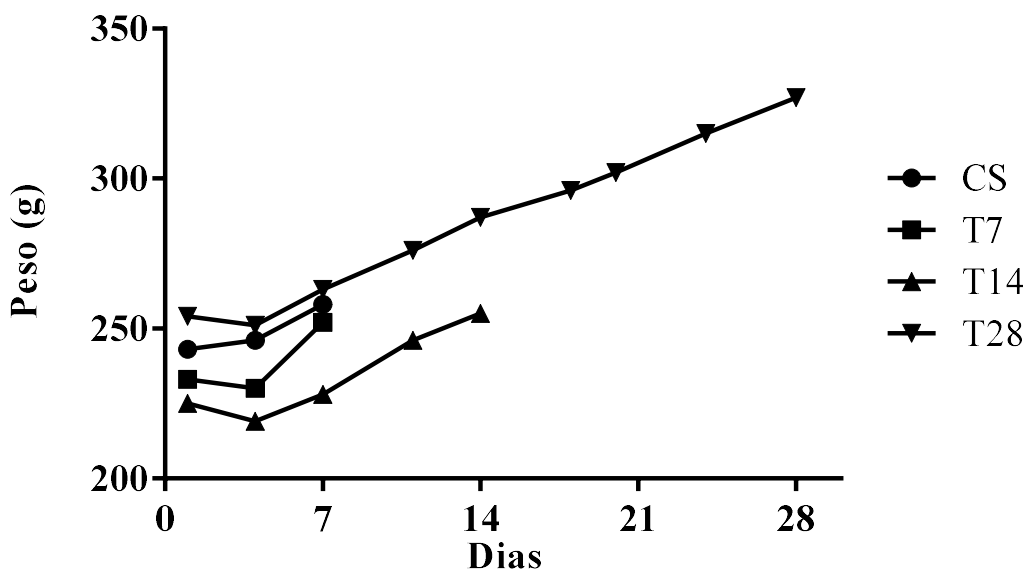
YOSHIDA, S., HIYOSHI, K., ICHINOSE, T., TAKANO, H., OSHIO, S., SUGAWARA, I., TAKEDA, K., SHIBAMOTO, T. Effect of nanoparticles on the male reproductive system of mice. *International Journal of Andrology*, 32, 337–342, 2008. (doi:10.1111/j.1365-2605.2008.00865.x)

ZHANGA, R., PIAOA, M.J., KIMA, K.C., KIMA, A.D., CHOIB, J.Y., CHOIC, J., HYUNA, J.W. Endoplasmic reticulum stress signaling is involved in silver nanoparticles-induced apoptosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44: 224– 232, 2012. (doi:10.1016/j.biocel.2011.10.019)

## APÊNDICE A – Resultados do estudo preliminar.

### ESTUDO PRELIMINAR– RESULTADOS

Todos os animais foram observados diariamente e seu peso corporal foi registrado preferivelmente no período da manhã (Figura A1). Foi possível observar que logo após as injeções de AgNP nos grupos tratados, houve uma queda no peso corporal no primeiro dia após a injeção, mas em seguida os animais voltaram a ganhar peso normalmente. Já o grupo controle salina teve um ganho de peso equilibrado, sem essa queda inicial. Os animais não tiveram inflamações na região escrotal, nem úlceras evidentes.



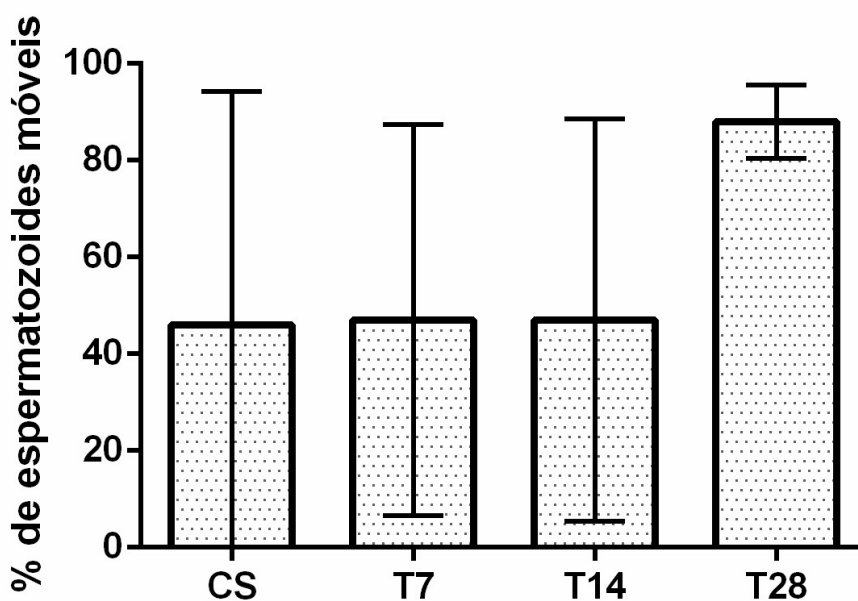
**Figura A1:** Peso corporal diário de todos os animais.

Os testículos e epidídimos foram pesados e também medidos (Tabela A1) no momento da eutanásia. Não foi observada nenhuma diferença significativa em relação ao peso dos testículos e epidídimos entre os animais dos grupos controle e tratamentos. O volume testicular também não apresentou diferenças significativas entre os grupos.

**Tabela A1:** Peso (g) dos testículos e epidídimos, e volume dos testículos (cm<sup>3</sup>) (médias ± DP) de todos os animais.

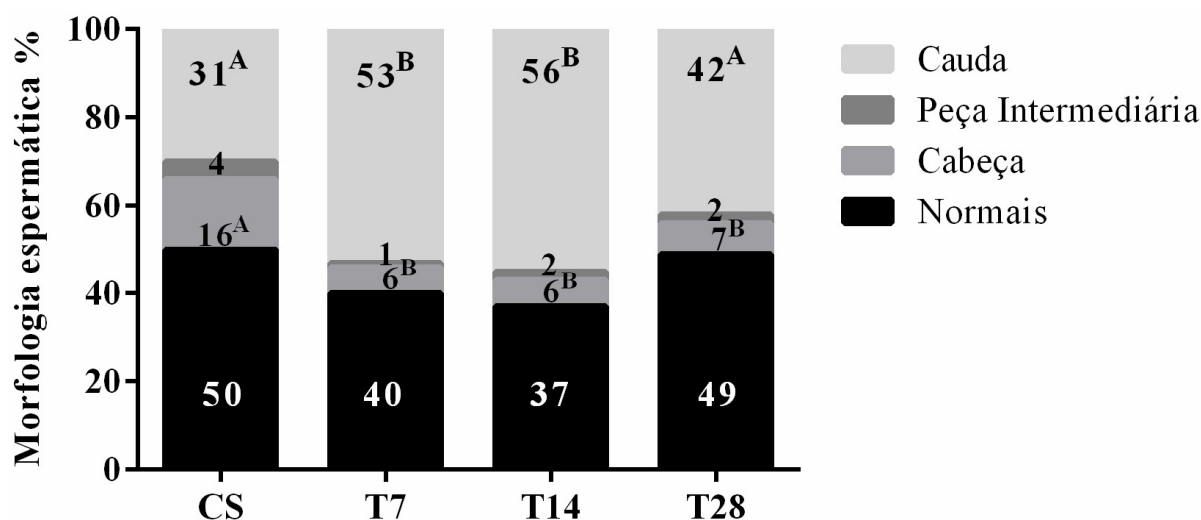
Medidas	Controle salina	Tratamento 7 dias	Tratamento 14 dias	Tratamento 28 dias
Peso testículo direito (g)	1,29±0,22	1,63±0,02	1,54±0,10	1,54±0,10
Peso testículo esquerdo (g)	1,28±0,30	1,61±0,05	1,48±0,21	1,51±0,09
Volume testículo direito (cm <sup>3</sup> )	2,2±0,7	2,8±0,9	2,2±0,9	2,0±0,1
Volume testículo esquerdo (cm <sup>3</sup> )	2,1±0,2	2,4±0,3	1,7±0,2	2,2±0,3
Peso epidídimo direito (g)	0,50±0,22	0,71±0,10	0,69±0,09	0,86±0,15
Peso epidídimo esquerdo (g)	0,70±0,23	0,64±0,05	0,74±0,09	0,91±0,17

Após a eutanásia, o epidídimo esquerdo foi medido e pesado, e macerado em 2 mL de solução salina aquecida (lavado do epidídimo) e mantida em uma placa de petri em uma placa aquecedora, 1 gota foi colocada em uma lâmina com lamínula para a avaliação da motilidade espermática, que foi baixa e praticamente igual entre os grupos CS, T7 e T28, mas no grupo T28 a porcentagem de células vivas aumenta significativamente, voltando para um padrão normal (Figura A2).



**Figura A2:** Motilidade espermáticas (%) dos animais de todos os grupos.

O lavado do epidídimo, após análise de motilidade espermática, teve uma adição de 1 mL de formalina 10% e armazenado para a contagem de espermatozoides com morfologia normal e anormal. Foi possível observar uma leve diminuição na porcentagem de espermatozoides normais entre o grupo controle salina e nos grupos T7 e T14, com uma tendência a normalizar no T28 (Figura A3). Para uma melhor compreensão das patologias, elas foram separadas em patologias de cabeça, peça intermediária e cauda. As patologias de cabeça tiveram uma redução significativa entre o grupo controle salina e os grupos T7, T14 e T28, e as patologias de cauda tiveram um aumento significativo em relação ao grupo controle salina e os grupos T7, T14 e T28 dias. Foi possível também observar que mesmo no grupo controle com solução salina a porcentagem de espermatozoides com patologias foi relativamente alta ( $50 \pm 10,3$ ).

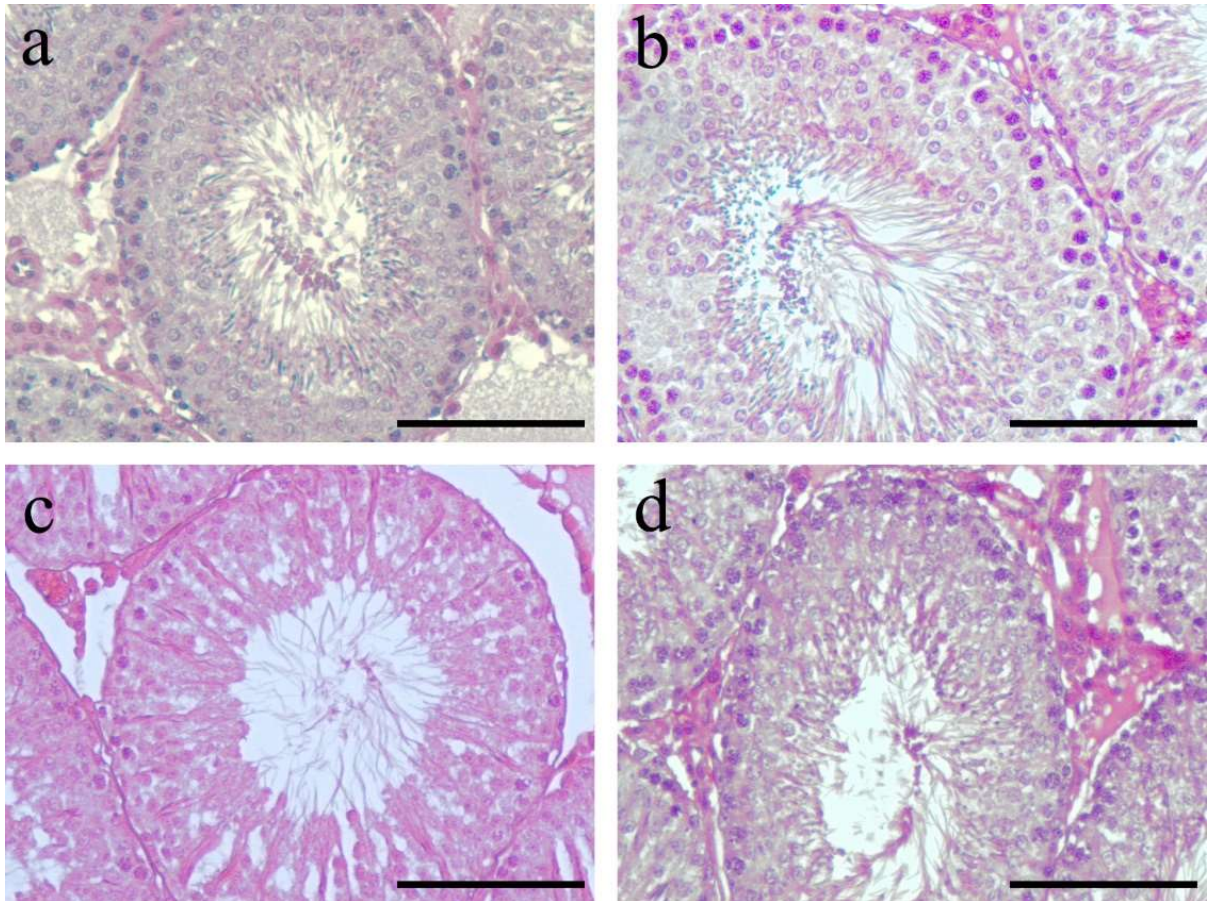


**Figura A3:** Espermatozoides com morfologia normal e anormalidades (%) por região espermática dos animais de todos os grupos. A,B - letras diferentes indicam diferença significativa entre colunas ( $P < 0,05$ ).

Os testículos e epidídimo foram fixados com solução fixadora Bouin, e processados para a análise histológica, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina. Durante a análise histológica dos testículos foi possível identificar todos os tipos celulares da linhagem germinativa dentro dos túbulos seminíferos, inclusive espermatozoides, assim como as células



de Sertoli, e células de Leydig e no tecido intersticial (Figura A4). O dano esperado pela toxicidade da AgNP não foi observado na histologia do tecido testicular.



**Figura A4:** Fotomicrografias representativas de túbulos seminíferos de cada grupo da fase 1: (a) Controle salina; (b) Tratamento 7 dias; (c) Tratamento 14 dias; (d) Tratamento 28 dias Barras = 10  $\mu\text{m}$ .

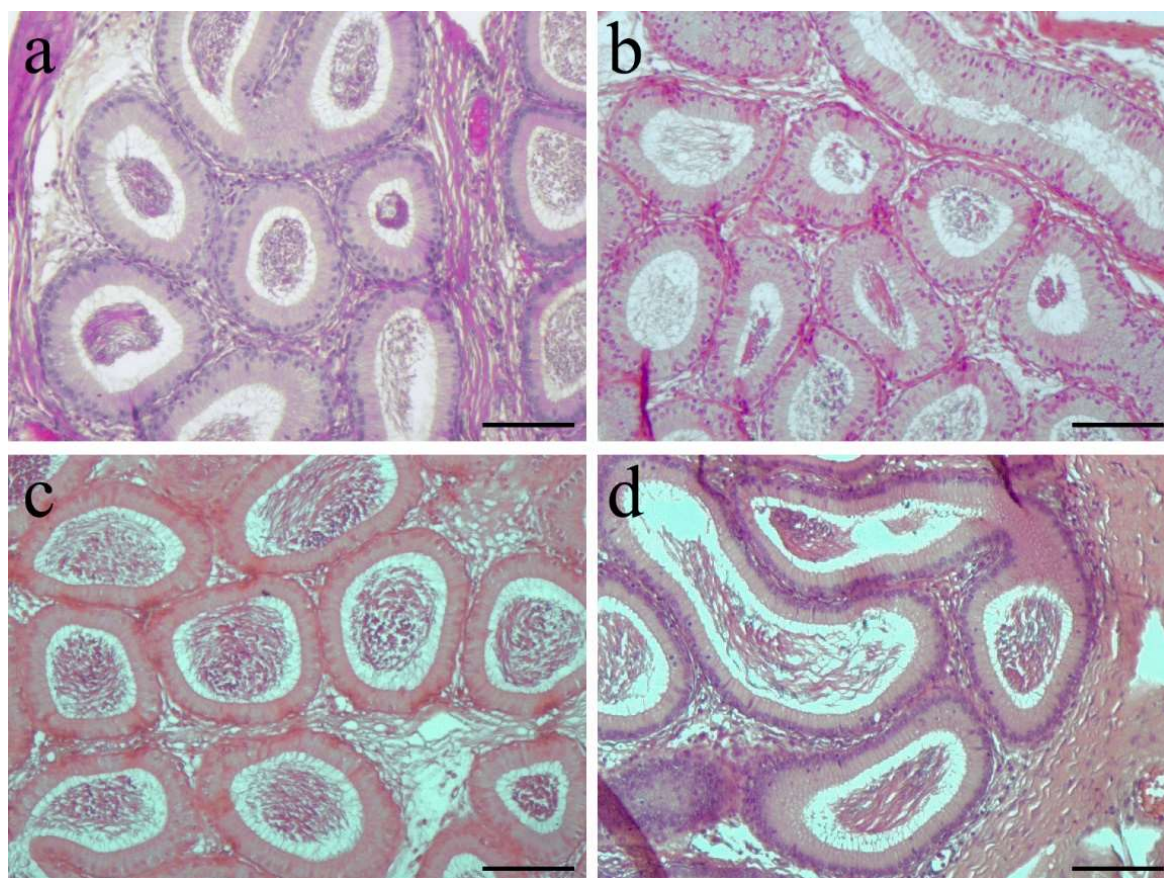
Imagens das lâminas dos testículos foram feitas por microscopia de luz, e a morfometria dos túbulos foi realizada. Estas medidas dos túbulos seminíferos (Tabela A2) mostraram algumas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre o grupo controle e os grupos tratados, porém sem nenhuma alteração que afetasse a espermatogênese.

**Tabela A2:** Medidas túbulos seminíferos (Média ± DP e variação) dos grupos.

Parâmetros	Controle Salina	Tratamento 7 dias	Tratamento 14 dias	Tratamento 28 dias
Área do túbulo ( $\mu\text{m}^2$ )	30020±4528 <sup>A</sup>	32793±4367 <sup>B</sup>	32288±5191 <sup>B</sup>	31866±4055 <sup>B</sup>
Área da luz do túbulo ( $\mu\text{m}^2$ )	13334±3964 <sup>A</sup>	14479±3432 <sup>BC</sup>	14151±4219 <sup>AB</sup>	15407±3933 <sup>C</sup>
Diâmetro do túbulo ( $\mu\text{m}$ )	249,82±71,73 <sup>A</sup>	270,05±70,02 <sup>B</sup>	264,65±67,08 <sup>B</sup>	261,68±73,31 <sup>AB</sup>
Diâmetro da luz do túbulo ( $\mu\text{m}$ )	96,63±38,41 <sup>A</sup>	103,36±50,49 <sup>AB</sup>	98,84±44,72 <sup>AB</sup>	107,92±45,78 <sup>B</sup>
Altura do epitélio ( $\mu\text{m}$ )	82,22±14,88 <sup>A</sup>	84,00±15,15 <sup>A</sup>	84,36±17,65 <sup>A</sup>	77,96±25,39 <sup>B</sup>

A,B,C - letras diferentes indicam diferença significativa na mesma linha ( $P < 0,05$ ).

A análise histológica das lâminas dos epidídimos permitiu observar a presença de espermatozoides na luz dos túbulos dos animais dos grupos tratamentos (Figura A5).



**Figura A5:** Imagens representativas da morfologia da cabeça dos epidídimos de cada grupo da fase 1: (a) Controle salina; (b) Tratamento 7 dias; (c) Tratamento 14 dias; (d) Tratamento 28 dias. Barras = 10  $\mu\text{m}$ .

Os outros órgãos baços, rins, fígados e pulmões, também foram pesados no momento da eutanásia, analisando estes pesos, foi possível observar que apenas o baço mostrou um aumento significativo ( $P<0,05$ ) no peso do tratamento 28 dias comparado ao controle salina (Tabela A3).

**Tabela A3:** Peso (g) dos órgãos (médias  $\pm$  DP) dos animais dos grupos.

<b>Órgãos</b>	<b>Controle salina</b>	<b>Tratamento 7 dias</b>	<b>Tratamento 14 dias</b>	<b>Tratamento 28 dias</b>
<b>Baço</b>	0,98 $\pm$ 0,53 <sup>A</sup>	0,77 $\pm$ 0,13 <sup>AB</sup>	0,78 $\pm$ 0,07 <sup>AB</sup>	1,31 $\pm$ 0,50 <sup>B</sup>
<b>Rim direito</b>	0,98 $\pm$ 0,09	0,98 $\pm$ 0,14	1,03 $\pm$ 0,09	1,16 $\pm$ 0,04
<b>Fígado</b>	7,47 $\pm$ 4,82	10,53 $\pm$ 1,18	10,67 $\pm$ 0,75	12,66 $\pm$ 0,31
<b>Pulmão</b>	1,41 $\pm$ 0,33	1,33 $\pm$ 0,23	1,74 $\pm$ 0,27	2,00 $\pm$ 0,36

A,B - letras diferentes indicam diferença significativa na mesma linha ( $P<0,05$ ).

Durante a punção cardíaca no momento da eutanásia, o sangue foi coletado para análise de hemograma completo. A análise sanguínea permitiu observar uma redução significativa ( $P<0,05$ ) do número de linfócitos e um aumento no número de monócitos no grupo T7 dias controle salina em relação ao grupo controle salina, ambos os parâmetros voltaram a se normalizar nos grupos T14 e T28, sem correlação com o tratamento (Tabela A4).

**Tabela A4:** Análise sanguínea (Média ± DP e variação) dos grupos.

Parâmetros	Controle salina	Tratamento 7 dias	Tratamento 14 dias	Tratamento 28 dias
CB (10 <sup>3</sup> /μL)	4,4±5,4 (0,8 – 12,5)	2,5±0,1 (2,3 – 2,6)	5,6±4,3 (0,6 – 8,5)	5,1±1,7 (3,6 – 6,9)
CV (10 <sup>6</sup> /μL)	3,9±2,3 (1,2 – 6,8)	5,7±0,9 (4,6 – 6,3)	6,2±2,1 (3,8 – 7,9)	6,9±0,1 (6,9 – 7,0)
CHCM (g/dL)	7,95±4,7 (2,5 – 13,9)	11,5±1,7 (9,5 – 12,5)	12,6±4,2 (7,9 – 16,1)	14,1±0,2 (13,9 – 14,3)
HTC (%)	25,5±15,6 (8,0 – 45,8)	35,0±5,3 (28,8 – 38,3)	34,3±11,3 (21,7 – 43,5)	47,4±1,1 (46,4 – 48,5)
VCM (fL)	65,1±2,9 <sup>AB</sup> (60,8 – 67,1)	61,7±0,8 <sup>B</sup> (60,7 – 62,2)	55,8±1,7 <sup>C</sup> (54,6 – 57,7)	68,8±2,1 <sup>A</sup> (66,7 – 70,8)
HCM (pg)	20,4±0,2 (20,3 – 20,7)	20,2±0,5 (19,7 – 20,5)	20,5±0,5 (20,1 – 21,0)	20,4±0,5 (20,0 – 20,9)
Linfócitos (%)	78,0±7,6 <sup>A</sup> (71,8 – 88,8)	65,5±2,1 <sup>B</sup> (63,0 – 66,9)	71,7±3,7 <sup>AB</sup> (68,1 – 75,4)	79,2±4,5 <sup>A</sup> (74,1 – 82,8)
Monócitos (%)	22,0±7,6 <sup>A</sup> (11,2 – 28,2)	34,5±2,1 <sup>B</sup> (33,1 – 37,0)	28,3±3,7 <sup>AB</sup> (24,6 – 31,9)	20,8±4,5 <sup>A</sup> (17,2 – 25,9)

CB: Células brancas; CV: Células vermelhas; CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média; HTC: Hematócrito; VCM: Volume corpuscular médio; HCM: Hemoglobina corpuscular média. A,B,C - letras diferentes indicam diferença significativa na mesma linha (P<0,05). \*O número de plaquetas foi desconsiderado devido a presença de coagulação sanguínea nas amostras.

O sangue coletado também foi analisado para os parâmetros bioquímicos de alanina aminotransferase (ALT), aspartame aminotransferase (AST) para função hepática e Ureia e creatinina para função renal. A análise dos parâmetros bioquímicos só apresentou um aumento significativo de ALT entre o grupo CS e T7 (Tabela A5), sem correlação com o tratamento.

**Tabela A5:** Análise bioquímica (Média ± DP e variação) dos grupos.

Parâmetros	Controle Salina	Tratamento 7 dias	Tratamento 14 dias	Tratamento 28 dias
Creatinina (mg/dL)	0,70±0,07 (0,61 – 0,77)	0,79±0,05 (0,75 – 0,82)	0,69±0,07 (0,63 – 0,77)	0,69±0,06 (0,62 – 0,75)
Uréia (mg/dL)	65,5±16,58 (44 - 80)	77±11,31 (69 - 85)	82,33±6,50 (76 - 89)	76,67±5,13 (71 - 81)
ALT (U/L)	55,25±16,74 <sup>A</sup> (43 - 79)	115,00±36,77 <sup>B</sup> (89 - 141)	92,67±22,74 <sup>AB</sup> (74 - 118)	63,67±5,77 <sup>AB</sup> (57 - 67)
AST (U/L)	186±66,15 (108 - 269)	246,00±134,35 (151 - 341)	184,33±67,28 (144 - 262)	137,00±19,47 (115 - 152)

A,B - letras diferentes indicam diferença significativa na mesma linha (P<0,05).



O esperado era que a injeção das nanopartículas de prata nos testículos fosse capaz de gerar um dano irreversível na espermatogênese dos animais, impossibilitando a produção de espermatozoides, levando a uma infertilidade permanente. Com os resultados obtidos pudemos observar um leve dano causado pelas AgNPs, principalmente nos animais do grupo T7, mas já nos animais do grupo T28 os danos começaram a diminuir. Por esse motivo resolvemos realizar o estudo com uma AgNP comercializada, com o objetivo de averiguar o efeito tóxico da AgNP na reprodução de machos, após a injeção intratesticular, visando causar a infertilidade.