



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



***AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE DUAS NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS NA REPRODUÇÃO DE RATOS WISTAR MACHOS***

JOSÉ LUIZ JIVAGO DE PAULA RÔLO

2016



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



***Avaliação dos efeitos duas nanopartículas magnéticas na reprodução
de ratos Wistar machos***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Animal.

2016

Sumário

| | |
|--|-----------|
| Resumo..... | vii |
| Abstract..... | viii |
| Lista de Abreviações..... | ix |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 2. Revisão de Literatura..... | 4 |
| 2.1. Nanotecnologia..... | 4 |
| 2.1.1. Nanopartículas Magnéticas..... | 4 |
| 2.1.2. Nanopartículas De Óxido De Ferro..... | 6 |
| 2.1.3. Coberturas..... | 7 |
| 2.2. Sistema Reprodutor Masculino e Espermatogênese..... | 8 |
| 2.2.1. Barreira Hemato-Testicular..... | 11 |
| 2.2.2. Termorregulação testicular..... | 12 |
| 2.2.3. Controle Da Fertilidade No Macho..... | 13 |
| 2.3. Toxicologia e Nanotoxicologia..... | 22 |
| 2.3.1. Toxicidade No Sistema Reprodutor Masculino..... | 26 |
| 2.4. Magneto-hipertermia..... | 31 |
| 2.5. “Castração Magnética”..... | 32 |
| 3. Justificativa..... | 35 |
| 4. Objetivos..... | 37 |
| 5. Referências Bibliográficas..... | 39 |
| Capítulo 2 - Avaliação Dos Efeitos De Nanopartículas De Maghemita Recobertas Com Citrato Na Reprodução De Ratos Wistar Machos..... | 45 |
| 1. Introdução..... | 45 |
| 2. Material E Métodos..... | 46 |
| 2.1. Preparação E Caracterização Das Partículas:..... | 46 |
| 2.2. Microscopia Eletrônica De Transmissão (MET)..... | 47 |
| 2.3. Zeta Sizer E Potencial Zeta..... | 47 |
| 2.4. Animais:..... | 47 |
| 2.5. Procedimento Experimental..... | 48 |
| 2.6. Análise Estatística..... | 50 |

| | | |
|---|---|----|
| 3. | Resultados..... | 52 |
| 3.1. | Caracterização Da Nanopartícula..... | 52 |
| 3.2. | Avaliação Histológica Dos Testículos: | 54 |
| 3.3. | Morfometria Dos Túbulos Seminíferos..... | 55 |
| 3.4. | Avaliação Dos Espermatozóides | 57 |
| 3.5. | Microscopia Eletrônica De Varredura..... | 57 |
| 4. | Discussão | 60 |
| 5. | Conclusão..... | 62 |
| 6. | Referências Bibliográficas..... | 62 |
| 1. | Introdução..... | 64 |
| 2. | Material e Métodos..... | 65 |
| 2.1. | Síntese e caracterização..... | 65 |
| 2.2. | Preparação da amostra | 65 |
| 2.3. | Protocolo experimental..... | 66 |
| 3. | Resultados..... | 66 |
| 4. | Conclusão..... | 68 |
| 5. | Referências Bibliográficas..... | 69 |
| Capítulo 4 - Castração Magnética: Magneto-hipertermia como possível indutor de infertilidade em machos..... | | 70 |
| 1. | Introdução..... | 70 |
| 2. | Material e Métodos..... | 72 |
| 2.1. | Nanopartícula Magnética | 72 |
| 2.2. | Animais e Desenho Experimental..... | 72 |
| 2.3. | Procedimentos Experimentais..... | 74 |
| 2.4. | Processamento Histológico | 75 |
| 2.5. | Quantificação das NPM por EPR..... | 76 |
| 2.6. | Análise Estatística | 77 |
| 3. | Resultados..... | 77 |
| 3.1. | Aspecto geral e peso dos animais..... | 77 |
| 4. | Discussão | 93 |
| 5. | Conclusão..... | 96 |
| 6. | Referências Bibliográficas..... | 97 |

Agradecimentos

Resumo

No Brasil e no mundo ainda não existem políticas públicas com diretrizes oficiais para o controle populacional de cães e gatos não domiciliados (errantes). No Brasil, isto faz com que muitos municípios negligenciem esse tipo de ação. A expansão da nanotecnologia aumentou o uso de nanomateriais nos procedimentos e pesquisas biomédicas e, conseqüentemente, a sua interação com organismos vivos. Modelos *in vivo* e *in vitro* já foram propostos para o estudo da interação de nanomateriais com os sistemas biológicos. Nanopartículas de óxido de ferro são conhecidas pelo seu efeito não tóxico e eventualmente se quebram para formar a hemoglobina circulante. Informações sobre os efeitos tóxicos *in vivo* de nanopartículas metálicas no aparelho reprodutor masculino e na fisiologia espermiática ainda são escassos. O desenvolvimento de novas tecnologias e abordagens com nanopartículas para o controle populacional de animais errantes é uma nova frente de pesquisa que a nanotecnologia pode proporcionar. Os objetivos desse trabalho foram: Avaliar a capacidade de duas nanopartículas magnéticas afetarem o sistema reprodutor de Ratos Wistar Machos e desenvolver uma nova técnica para a castração desses animais.

Abstract

In Brazil and abroad there are no public policies with official guidelines for population control of dogs not domiciled (wandering). In Brazil, this causes many municipalities neglect this kind of action. The expansion of nanotechnology has increased the use of nanomaterials in procedures and biomedical research, and therefore its interaction with living organisms. *in vivo* and *in vitro* models have been proposed to study the interaction of nanomaterials with biological systems. Iron oxide nanoparticles are known for not toxic effect and eventually broken to form the circulating hemoglobin. The information on toxic effects *in vivo* of metal nanoparticles in the male reproductive system and sperm physiology are still scarce. The development of new technologies and approaches with nanoparticles to control the population of stray animals is a new line of research that nanotechnology can provide. The objectives of this study were to evaluate the ability of two magnetic nanoparticles affect the reproductive system of male Wistar Rats and develop a new technique for induction of infertility in males.

Lista de Abreviações

1. Introdução

Nanociência e nanotecnologia são o estudo de pequenos materiais (na escala de nanômetros, ou seja, 10^{-9} metros) que podem ser utilizados em vários campos da ciência, como a química, biologia, física, ciência dos materiais e engenharia. Em uma perspectiva biológica, os nanomateriais são plataformas altamente customizáveis para o transporte não invasivo de praticamente qualquer tipo de material para uma população celular alvo com propósitos de pesquisa, diagnóstico ou terapêutico (Barkalina et al., 2014).

Os nanomateriais estão mostrando um enorme potencial para aplicações biomédicas incluindo o sistema “*drug delivery*” e para fins de diagnóstico devido suas propriedades tamanho-dependentes. Muitos nanomateriais podem ser funcionalizados para melhorar ou modificar o acesso a células específicas, fornecer informações moleculares e também identificar atividades celulares (Nelson et al., 2010)

Embora o potencial de uso e os benefícios das nanopartículas sejam altos, informações sobre os riscos e segurança desses materiais é extremamente necessária. Novos estudos epidemiológicos sobre partículas ultrafinas dispersas no ar podem ser vistos como as bases para a expansão do campo da nanotoxicologia, que pode ser definida como uma avaliação da segurança de compostos nanoestruturados e nano-dispositivos (Oberdorster et al., 2005).

Vários modelos biológicos *in vitro* e em *in vivo* têm sido propostos para estudar as interações de nano-materiais em sistemas biológicos. Os estudos *in vitro*, que se baseiam na cultura de células, são rápidos, eficientes e de baixo custo. No

entanto, os resultados destes estudos fornecem uma avaliação incompleta das interações com todo o organismo. Estudos utilizando sistemas *in vivo* produzem uma maior confiabilidade, abordam um efeito global sobre a fisiologia e anatomia do organismo, e, assim, fornecem resultados importantes para estudos clínicos (Giannaccini et al., 2014) Os estudos envolvendo nanotecnologia vem tradicionalmente avaliando os efeitos de seus tratamentos sobre o câncer, mas também já é crescente o desenvolvimento para outras aplicações como os sistemas cardiovascular, neurológico, gastrointestinal, inflamações autoimunes, infecções e doenças reprodutivas, embora em bem menor escala(Barkalina et al., 2014).

A avaliação dos riscos para a saúde de produtos químicos industriais, poluentes ambientais e outras substâncias representa um elemento importante na proteção da saúde de toda a população. Estudos aprofundados da natureza e mecanismo de toxicidade são importantes na elaboração de antídotos específicos. Junto com outras ciências, a toxicologia contribui para o desenvolvimento de produtos químicos mais seguros como medicamentos, suplementos alimentares e pesticidas, bem como de muitos produtos químicos úteis. Mesmo quando é identificado um efeito adverso ao esperado podemos utilizar desse dano causado para buscar algumas soluções mais eficazes, como inseticidas, vermífugos, antimicrobianos e métodos contraceptivos (Lu e Kacew, 2009).

Uma situação que se faz de extrema importância para a saúde pública é o desenvolvimento de métodos contraceptivos baratos, rápidos e de fácil manejo para o controle de população de animais domésticos errantes que tem um número crescente e de difícil controle.

O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos das nanopartículas de maghemita recobertas com citrato (NPMs de citrato) na reprodução de ratos Wistar machos e investigar os efeitos da aplicação de magneto-hipertermia em testículo, visando utilizar a técnica como indutor de infertilidade em machos.

2. Revisão de Literatura

2.1. Nanotecnologia

A Nanotecnologia é uma tecnologia emergente que busca explorar os avanços no controle da estrutura de materiais que possuem um tamanho reduzido, com sua escala dimensional sendo próxima a escala de moléculas individuais ou estruturas supramoleculares e suas organizações estruturais (Roszek et al., 2005).

A nanobiotecnologia é o ramo da nanotecnologia, que lida com aplicações e usos biológicos e bioquímicos. Muitas vezes, estuda os elementos existentes de organismos vivos e na natureza para fabricar novos nano-dispositivos. A combinação de Nanobiotecnologias desempenha um papel importante no desenvolvimento de medicamentos e na descoberta de novas drogas (Kawadkar et al., 2011).

2.1.1. Nanopartículas Magnéticas

Nanopartículas magnéticas (NPMs) são nanomateriais bem estabelecidos que quando apresentam diâmetro abaixo de 10 nm exibem uma característica superparamagnética (Correa-Duarte et al., 2005). De acordo com vários autores (revisito por (Pankhurst et al., 2003)), as NPMs apresentam características peculiares que proporcionam possibilidades atraentes para a biomedicina. Primeiro, o tamanho delas pode ser facilmente controlado, variando de alguns nanômetros até dezenas de nanômetros, dimensões que são menores ou comparáveis às de

uma célula (10-100 μ m), um vírus (20-450 nm), uma proteína (5-50 nm) ou de um gene (2 nm de largura e 1-10 nm de comprimento) (Pankhurst et al., 2003).

Em segundo lugar, as nanopartículas são magnéticas, o que significa que elas podem ser manipuladas por um gradiente de campo magnético externo. Esta "ação à distância", combinando com a penetração de campos magnéticos intrínsecos nos tecidos corporais, abre muitas aplicações envolvendo o transporte e/ou imobilização de nanopartículas magnéticas, ou de marcadores biológicos. Deste modo, elas podem ser feitas para o sistema de "delivery" com fármacos anticancerígenos em uma região alvo do corpo (Gubin, 2009).

Terceiro, as nanopartículas magnéticas podem ser feitas para responder a um ressonante magnético variável no espaço de tempo, com resultados vantajosos relacionados com a transferência de energia do campo excitante para a nanopartículas (Pankhurst et al., 2003). Por exemplo, as nanopartículas podem se ligar a células tumorais utilizando-se de ligantes biomoleculares específicos. Em seguida, o calor gerado pelo estímulo das NPMs destrói as células tumorais (Govorov e Richardson, 2007).. Assim, podem ser utilizadas como adjuvantes na quimioterapia e radioterapia, no qual um moderado grau de aquecimento dos tecidos malignos apresenta resultados mais eficazes na destruição das células. Estas e muitas outras aplicações potenciais são disponibilizadas na área da biomedicina (purificação de proteínas, imobilização de enzimas, descontaminação, agente de contraste para ressonância magnética) (Huang e Juang, 2011), como resultado da especial propriedade física de nanopartículas magnéticas (Pankhurst et al., 2003).

As NPMs vêm sendo muito estudadas devido à sua biocompatibilidade e relativamente fácil funcionalização com materiais orgânicos (polímeros) ou metálicos inorgânicos (ouro) ou de óxido (sílica ou alumina), materiais utilizados para conseguir uma boa dispersão e torná-las biocompatíveis e adequadas para funcionalização ainda mediante a incorporação de várias moléculas bioativas (Berry, 2009). Para fins práticos, essas superfícies das nanopartículas devem ser adaptadas para melhorar as propriedades de biocompatibilidade e reduzir a agregação. Sem qualquer modificação da superfície, as nanopartículas podem apresentar superfícies hidrofóbicas com uma grande relação área de superfície/volume e tendem a se aglomerar e formar grupos maiores, resultando em partículas maiores (Gupta e Gupta, 2005).

NPMs de óxido de ferro apresentam vários polimorfismos cristalinos, entre eles o γ - Fe_2O_3 (maghemita) e Fe_3O_4 (magnetita) que são candidatos adequados para várias aplicações biomédicas (Arruebo et al., 2007, Tran e Webster, 2010) devido à sua biocompatibilidade superior com relação a outros materiais magnéticos. Esses requisitos incluem momentos altamente magnéticos, estabilidade química em condições fisiológicas, e baixa toxicidade, e também são materiais fáceis e baratos de se preparar (Figuerola et al., 2010).

2.1.2. Nanopartículas De Óxido De Ferro

As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPION), têm um potencial imenso em uma grande variedade de aplicações biomédicas, tais como a melhoria do contraste em análises por ressonância magnética (MRI), a entrega de drogas alvo ou genes, destruição alvo de tecido tumoral através de hipertermia,

transfecções magnéticas, detecção de ferro, terapia de quelação e engenharia de tecidos (Singh et al., 2010). Nanopartículas superparamagnéticas se tornam magnéticas na presença de um agente magnético externo, mas se reverte para um estado magnetizável o agente externo é retirado. Isso evita um comportamento ativo nas partículas quando não há aplicação de nenhum campo. Esse comportamento dos materiais superparamagnéticos resulta em potenciais vantagens na entrega de agentes terapêuticos em locais específicos sob a influência de um campo magnético externo e pode ser revertido para seu estado não magnético com a retirada do campo magnético externo permitindo que o material seja excretado, pela via de preferência (renal ou hepática) (Park et al., 2010)

2.1.3. Coberturas

Embora tenha havido desenvolvimentos significativos na síntese de nanopartículas magnéticas, manter a estabilidade destas partículas por um longo tempo sem aglomeração ou precipitação é uma questão importante. Estabilidade é uma exigência crucial para quase todas as aplicações das NPMs. Especialmente metais puros, tais como Fe, Co, Ni e suas ligas de metal que são muito sensíveis ao ar (Lu et al., 2007). O uso de nanopartículas magnéticas in vivo precisa de muitas modificações na sua superfície, de modo a protegê-las do sistema reticuloendotelial e aumentar a estabilidade da molécula in vivo (Mody et al., 2014).

A cobertura das NPMs as transforma em uma estrutura *core-shell*, isto é, o núcleo da nanopartícula magnética é revestido por uma “concha”, isolando o núcleo contra o meio ambiente. As estratégias de revestimento das NPMs podem ser

divididas em dois grupos principais: revestimento com materiais orgânicos, incluindo polímeros de surfactante, (Euliss et al., 2003) e revestimento com componentes inorgânicos(Lu et al., 2005), incluindo metais preciosos ou óxidos (Lu et al., 2007).

Os sais de ácido cítrico (citratos) são sais orgânicos que podem ser usados como anticoagulantes, devido à sua capacidade de quelação de cálcio. A estabilização de nanopartículas com citrato já é bem estabelecida e apresentam uma grande vantagem por serem estáveis por muito tempo, mantendo as características da nanopartícula sintetizada, com pouca alteração no decorrer do tempo (Verma et al., 2000, FAPBai et al., 2006, Rashad et al., 2008, Gimenes et al., 2012). Alguns estudos buscando as aplicações biomédicas e *in vivo* utilizando a cobertura de citrato em nanopartículas magnéticas já foram realizados (Kuckelhaus et al., 2004, Carneiro et al., 2013, Cheraghipour et al., 2013)

2.2. Sistema Reprodutor Masculino e Espermatogênese

Os testículos são responsáveis pela espermatogênese e síntese de hormônios sexuais. Estes processos asseguram a fertilidade e o desenvolvimento e manutenção das características sexuais masculinas. Os testículos são constituídos de novelos de tubos finíssimos, em cujas paredes os espermatozoides são formados a partir de células germinativas indiferenciadas. Os túbulos, conhecidos como espermatogênicos ou seminíferos, convergem para uma rede de ductos chamada *rete testis* que, por sua vez, conduz os espermatozoides a um tubo único e fortemente enovelado, o epidídimo, responsável pela etapa final de maturação do gameta masculino(Mello-Aires, 2008).

A espermatogênese é um processo biológico complexo de transformação celular que produz células germinativas haploides masculinas a partir de células espermatogoniais diploides. Este processo ocorre através de ciclos precisamente cronometrados e altamente organizados. Esses ciclos de espermatogênese são essenciais para a produção contínua de espermatozoides, que é dependente de numerosos fatores (Cheng, 2008). A duração desse processo é de 30-75 dias nos mamíferos sendo que no rato é de aproximadamente 58 dias. Esse cálculo é baseado na contagem de 4,5 ciclos espermatogênicos (França et al., 2005).

O processo espermatogênico compreende uma série de divisões mitóticas das espermatogônias, que ao final dão origem aos espermatócitos. O espermatócito é a célula que sofre um longo processo de meiose que se inicia com a duplicação do seu DNA durante a fase de pré-leptóteno, emparelhamento e condensação dos cromossomas durante o paquíteno e, finalmente, culminando nas duas divisões de redução para produzir a espermatíde haploide. A espermatíde começa a vida como uma simples célula arredondada, mas rapidamente sofre uma série de complexas alterações morfológicas. O núcleo se alonga e a cromatina se condensa. O aparato de Golgi produz um grânulo semelhante ao lisossoma que se desenvolve sobre o núcleo para formar o futuro acrossoma. O sistema acrossômico contém enzimas hidrolíticas que são necessárias para a interação espermatozoide-ovócito e fertilização. De importância fundamental para a motilidade da célula espermática, a cauda (ou flagelo). A célula estabelece uma conformação na cauda onde as mitocôndrias ficarão ao redor da parte proximal e há um descarte do citoplasma em excesso (Hess, 1998).

Em uma seção transversal de um túbulo seminífero, as células germinativas estão dispostas em camadas. As espermatogônias situam-se próximo a lâmina basal e os espermatócitos estão dispostos acima delas e, em seguida, uma ou 2 camadas de espermatídes. Quatro gerações de células desenvolvem-se simultaneamente e em sincronia precisa uma com a outra. À medida que cada geração desenvolve, move-se em direção ao lúmen, continuamente suportada pelas células de Sertoli (Fig. 1), até que os espermatozoides totalmente formados são liberados no lúmen tubular (espermição).

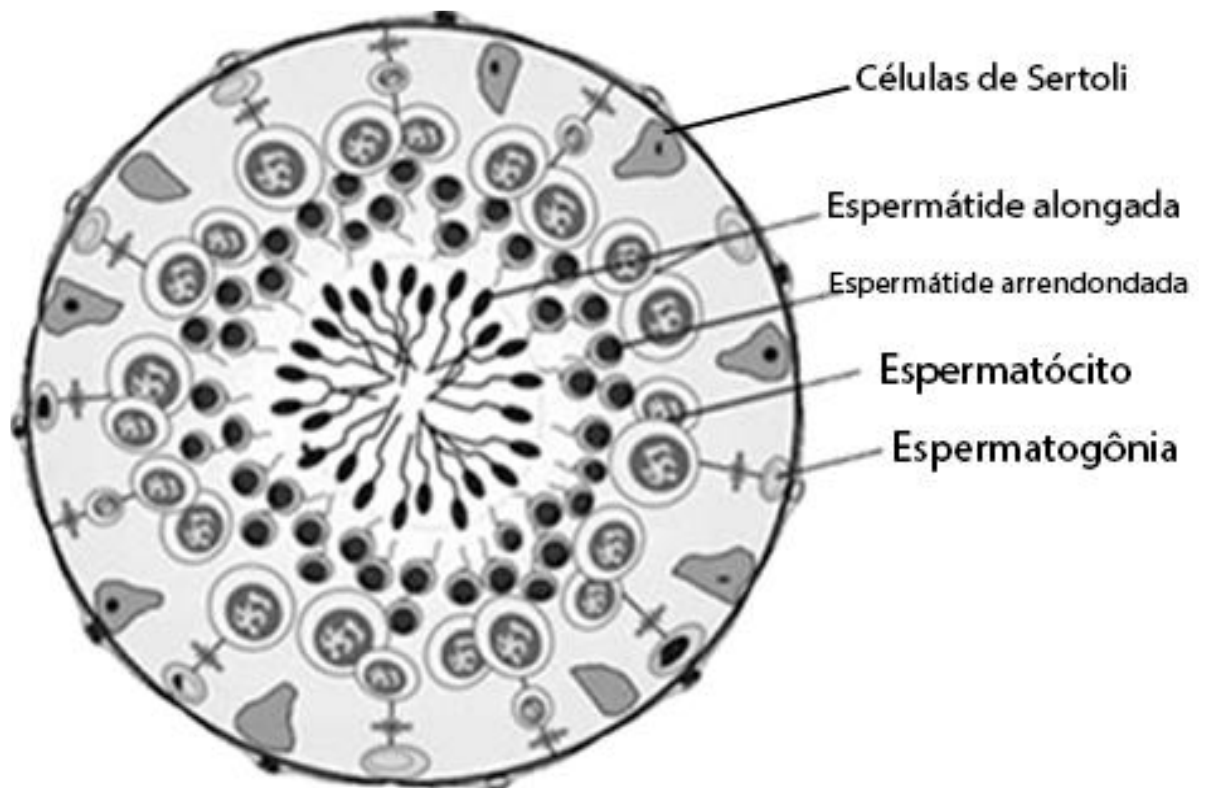


Figura 1. Desenho esquemático de corte transversal de um túbulo seminífero onde podem ser vistas diversas fases do desenvolvimento das células germinativas (Fonte: Adaptado de (Cheng, 2008)).

Espermiacão é o processo pelo qual espermatídes maduras são liberadas a partir das células de Sertoli para dentro do lúmen dos túbulos seminíferos. É um fator determinante do número de espermatozoides que vão entrar no epidídimo, e assim, do conteúdo espermático do ejaculado. A espermiacão é um processo complexo que ocorre ao longo de vários dias (~ 82 horas no rato), e começa com o alinhamento das espermatídes alongadas ao longo da borda luminal do epitélio seminífero. A espermiacão está concluída quando espermatozoides são liberados no lúmen dos túbulos. O restante do citoplasma da espermatíde, conhecido como o corpo residual que possui mitocôndrias, ribossomos, lipídeos, vesículas e outros componentes citoplasmáticos (Cheng, 2008), é fagocitado pelas células de Sertoli. Embora o objetivo principal de espermiacão seja liberar a espermatíde a partir das células de Sertoli, este processo também leva a ampla reestruturação e remodelação da espermatíde para produzir um espermatozoide aerodinâmico. A espermiacão é um alvo conhecido para os contraceptivos masculinos à base de hormônios e, em virtude do seu papel na reestruturação da espermatíde e liberação do espermatozoide é importante para a manutenção da fertilidade (O'Donnell et al., 2011).

2.2.1. Barreira Hemato-Testicular

Nas paredes dos túbulos seminíferos encontram-se as células de Sertoli, que se estendem da lâmina basal até o lúmen tubular e servem de suporte para as células germinativas. Junções estreitas formadas pelas células de Sertoli criam uma barreira com permeabilidade restrita a macromoléculas, similar àquela existente no

sistema nervoso. Esta barreira forma um ambiente bioquímico e hormonal propício nas camadas internas e no fluido luminal dos túbulos seminíferos, de composição diferente do plasma sanguíneo, o que favorece a regulação local da gametogênese e protege as células germinativas de agentes nocivos(Mello-Aires, 2008).

A barreira hemato-testicular (BHT) é uma das barreiras-sangue-tecido mais firmes no organismo mamífero. Ela divide o epitélio seminífero em compartimentos basal e apical (adluminal). As fases que vão do início da meiose até a espermiacção ocorrem num microambiente especializado que fica isolado dos componentes sanguíneos pela BHT, no compartimento apical. Já a renovação de espermatogônias e progressão do ciclo celular até à fase de pré-leptóteno do espermatócito ocorrem fora do BHT, no compartimento basal do epitélio. No entanto, a BHT não é uma estrutura estática. Em vez disso, ela passa por ampla reestruturação durante o ciclo do epitélio seminífero em uma fase da espermatogênese para permitir o trânsito de espermatócitos em pré-leptóteno através da BHT. No entanto, a barreira imunológica conferida pela BHT não pode ser comprometida, mesmo transitoriamente, durante o ciclo do epitélio para evitar a produção de anticorpos contra células germinais meióticas e pós-meióticas, o que pode afetar a fertilidade (Cheng e Mruk, 2012).

2.2.2. Termorregulação testicular

A bolsa escrotal, os testículos e a vasculatura testicular tem um papel muito importante na manutenção da temperatura testicular abaixo da temperatura

corporal, o que é essencial para uma espermatogênese normal. (Kastelic et al., 1997)

Independentemente da razão evolutiva para a localização do testículo e do epidídimo fora do corpo, um aumento na temperatura dos testículos em mamíferos com testículos externos leva à uma redução na produção de espermatozoides, diminuição da motilidade do esperma e um aumento da porcentagem de espermatozoides morfológicamente anormais no ejaculado (Hansen, 2009b). Tais efeitos podem ser observados quando uma fonte de calor local é aplicada diretamente no testículo, o escroto é insulado, os testículos são internalizados (criptorquidismo induzido) ou a temperatura do corpo é aumentada devido a febre ou ao ambiente térmico. As células que são mais suscetíveis ao dano são os espermatócitos e espermátides, apesar de espermatogônias B poderem também ser danificadas (Setchell, 1998). O estresse oxidativo é uma das principais causas de danos térmicos de células espermatogênicas e leva à apoptose e rupturas dos filamentos de DNA (Hansen, 2009b)

2.2.3. Controle Da Fertilidade No Macho

Controle hormonal

O controle hormonal é uma alternativa para a suspensão temporária da fertilidade em animais de reprodução. Hormônios esteroides exógenos suprimem a fertilidade indiretamente via inibição da secreção e liberação de gonadotrofinas (principalmente LH). (Kutzler e Wood, 2006).

Progestinas

Cães

A espermatogênese é regulada pelo hormônio folículo estimulante (FSH) e pelo LH. Baseado nos princípios do *feedback* negativo, as progestinas exógenas podem suprimir a secreção de gonadotrofinas nos machos, fazendo com que a espermatogênese não ocorra. Em cães, o tratamento oral e diário de acetato de megestrol (2mg/kg) por 7 dias não alterou a qualidade seminal e doses maiores (4mg/kg) produziu poucas alterações secundárias nos espermatozoides. Entretanto, a administração subcutânea de Acetato de Medroxiprogesterona (20mg/kg) produziu uma resposta rápida (3 dias), com uma diminuição significativa na motilidade espermática, morfologia e liberação (England, 1997). Por conta da rápida resposta, os autores sugeriram que o efeito foi mediado pela ação direta das progestinas na maturação e transporte do espermatozoide epididimal.

Andrógenos

Cães

Enquanto a administração de progestinas exógenas não interrompe a espermatogênese com eficiências, a administração de andrógenos exógenos tem sido mais efetiva. A administração subcutânea de 5mg/kg de ésteres de testosterona (propionato de testosterona 0,6mg/kg, fenilpropionato de testosterona 1,2mg/kg, isocaproato de testosterona 1,2mg/kg, decanoato de testosterona 2,0mg/kg) em cães resultou num declínio significativo na motilidade espermática (3 semanas após o tratamento) e persistiu por 3 meses.(England, 1997). A

administração oral de 50mg de metiltestosterona em cães por 90 dias diminuiu a produção espermática diária(Freshman et al., 1990). A administração crônica de danazol, um derivado sintético da 17 α -etinil testosterona, em cães, resultou na perda de elementos espermatozoides e azoospermia, com os efeitos revertidos em 60 dias(Dixit, 1977). O uso de antiandrógenos, como a flutamida ou ciproterona, resultou em uma leve e transitória influência na espermatogênese.(Neumann et al., 1976). A administração intramuscular de prolactina exógena (600mg/kg de peso corporal por 6 meses) a cães resultou em uma severa astenozoospermia, teratozoospermia e oligospermia ou azoospermia com 6 semanas de tratamento(Shafik, 1994). A prolactina é um hormônio secretado pela adenohipófise. Em homens, a hiperprolactinemia causada por adenoma na hipófise resulta em oligo ou azoospermia. Ao final dos 3 meses de tratamento nos cães, degenerações dentro dos túbulos seminíferos foram verificadas na biopsia testicular. Depois de 3 meses do último tratamento, a contagem espermática foi normalizada, o acasalamento resultou em prenhez e a ninhada não apresentou nenhuma anormalidade. As concentrações séricas de testosterona, LH e FSH não foram afetadas significativamente pelo tratamento de prolactina. Os autores sugerem que a prolactina pode ter um efeito direto nos testículos em vez de agir por regulação hormonal.

Agonistas do Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH)

O GnRH atua como o principal hormônio reprodutivo pela regulação da liberação de LH e FSH da hipófise. Em machos, o LH regula a síntese de testosterona, enquanto o FSH é necessário para o início e a manutenção da espermatogênese. A

testosterona é necessária para a espermatogênese e para o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários, incluindo características comportamentais como marcação de território, monta e agressividade. Análogos de GnRH vem sendo desenvolvidos para suprimir a fertilidade. A exposição contínua ao GnRH reduz a secreção das gonadotrofinas estimuladas pelo GnRH. Esse mecanismo vem sendo usado para atingir uma contracepção reversível.

Cães

Vários estudos examinaram o uso da deslorelina como um contraceptivo para cães. A administração subcutânea de 6mg de deslorelina, com um implante de liberação lenta, reduziu as concentrações plasmáticas de testosterona e LH a valores indetectáveis em 4 semanas e causou a infertilidade em 6 semanas.(Junaidi et al., 2003). Os efeitos desse tratamento na fertilidade foram completamente revertidos. As concentrações de testosterona e LH retornaram ao normal 60 semanas após a administração do implante. A concentração limiar de deslorelina necessária para suprimir a espermatogênese em cães foi maior que 0,25 mg/kg de peso corporal.(Trigg et al., 2001). Um implante de longa duração de deslorelina está disponível comercialmente (Suprelorin1, Peptech Animal Health) em países como a Austrália e Nova Zelândia. O fabricante garante que o produto resulta em um período contraceptivo de pelo menos 6 meses em 98% dos cães. A administração em série de múltiplos implantes em intervalos de 6 meses não tiveram efeitos colaterais ou a eficácia diminuída(Trigg et al., 2006). Além da deslorelina, injeções subcutâneas diárias de nafarelina (2mg/kg/dia) diminuíram as concentrações basais de testosterona e resultaram em infertilidade dentro de 3 semanas após o início do

tratamento(Vickery et al., 1985). Após 8 semanas do último tratamento, a fertilidade tinha sido recuperada.(Goodpasture et al., 1988). Outros dois agonistas de GnRH já foram usados para métodos contraceptivos em cães. A administração de uma única injeção subcutânea de acetato de leuprolida (1mg/kg) em cães, resultou numa diminuição do volume do ejaculado, aumento na porcentagem de espermatozoides morfologicamente anormais e uma diminuição significativa nas concentrações de testosterona e LH séricos por 6 semanas. O retorno da espermatogênese normal ocorreu após 20 semanas do tratamento.(Lacoste et al., 1989). A administração subcutânea de implantes de buserelina (6,6mg) em cães diminuiu a concentração de testosterona a níveis basais e resultou em infertilidade dentro de 3 semanas da colocação do implante. O efeito contraceptivo permaneceu por 233 dias(Riesenbeck et al., 2002)

Imunoesterilização / imunocastração

Nas últimas décadas, vários esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de uma vacina que possa suprimir a fertilidade em machos canídeos e felídeos. Muitos alvos de imunoesterilização foram identificados como o GnRH, LH e seus receptores e antígenos espermáticos. Os efeitos fisiológicos dos anticorpos contra o GnRH incluem a supressão do comportamento reprodutivo, supressão da síntese e secreção de gonadotrofinas e hormônios esteroides, retenção da gametogênese e atrofia gonadal(Ladd et al., 1994, Jung et al., 2005).

Imunização do LH e seus receptores

Imunocontracepção visando o LH e seus receptores foram bem-sucedidas em carnívoros domésticos. A função reprodutiva em cães imunizados contra o LH foi severamente prejudicada por até um ano(Lunnen et al., 1974)

Imunização de antígenos espermáticos.

Antígenos espermáticos são excelentes alvos para vacinas contraceptivas por essas proteínas são vistas como “estranhas” ao sistema imune do organismo. Anticorpos antiesperma afetam a fertilização e a fertilidade. Entretanto, todos os espermatozoides não podem ser usados para o desenvolvimento de vacinas porque eles dividem vários antígenos com outras células somáticas(Naz et al., 2005). Portanto, as pesquisas recentes têm focado no delineamento de epítomos esperma-específicos apropriados para aumentar a imunogenicidade (especificamente no trato reprodutivo) e eficácia. A Lactato desidrogenase (LDH-C4) e a acrosina já foram isoladas e são dois dos principais antígenos esperma-específicos.(Talwar e Naz, 1981). Não se teve muitos avanços nessa área(Page et al., 2008)

Injeções intra-testiculares, intra-epididimais e intra-vasos deferentes

A castração química é outra abordagem não cirúrgica para a contracepção do macho. Agentes químicos são injetados nos testículos, epidídimos ou vasos deferentes causando a infertilidade por induzir a azoospermia. A técnica não é muito complexa, não é tão cara e é desejável para programas de esterilização em larga escala de cães e gatos.(Pineda et al., 1977), entretanto a cauda do epidídimo em gatos é menor e mais difícil de localizar. A sedação é tipicamente usada para esse procedimento em cães e a anestesia geral é necessária para gatos. Primeiramente,

a área escrotal é limpa e desinfetada. Depois, uma agulha de 22 (cães) ou 27 (gatos) gauge é inserida na estrutura de interesse (testículo, epidídimo ou vaso deferente).

Cães

As injeções intra-testiculares tem sido pesquisadas como meio de induzir a orquite e contracepção masculina por mais de 6 décadas(Freund et al., 1953). O procedimento de injeção intratesticular envolve inserir a agulha da parte caudal até a parte cranial puxando gentilmente e depositando a injeção da forma mais homogênea possível no tecido. Injetando com um agente adjuvante como o *Freund's complete adjuvant* (FCA) ou o *Bacillus Calmette Guerin* (BCG), diretamente no testículo incita uma resposta inflamatória local que permite as células linfoides acessarem o tecido testicular, resultando em uma resposta autoimune. Uma única injeção de FCA ou BCG (10-25 unidades) resultaram em uma oligospermia severa ou azoospermia sem formação de granuloma ou desenvolvimento de anticorpos antiesperma circulantes. Os poucos espermatozoides presentes não tinham motilidade e a infertilidade ocorreu a partir das 6 semanas de tratamento e durou por vários meses(Talwar et al., 1979, Naz e Talwar, 1981).

O FDA (Food and Drug Administration) aprovou um produto elaborado para a castração via injeção intratesticular no cão. O procedimento envolve a injeção de uma quantidade predeterminada de uma solução de zinco. O zinco é considerado não-mutagênico, não-carcinogênico e não teratogênico(Fahim et al., 1993). Achados histopatológicos depois de 2 meses e meio da injeção incluíram fibrose

quase completa dos túbulos seminíferos e das células de Leydig. (Tepsumethanon et al., 2005). A injeção de uma solução de 70% de glicerol não resultou em azoospermia e nem esterilidade em cães. (Immegart e Threlfall, 2000). Como uma alternativa a injeção intratesticular, a zinco arginina pode ser injetada na cauda dos epidídimos. A injeção intra-epididimal de 50mg de zinco arginina (0,5ml/testículo) resultou em azoospermia 90 dias após a injeção. Na avaliação histológica dos testículos, os túbulos seminíferos estavam normais, com uma atrofia da rede testes, ausência de espermatozoides nos epidídimos e ductos deferentes e nenhuma formação de granuloma espermático

Injeções intra-epididimais de solução salina já foram tentadas, mas sem sucesso na tentativa de levar a azoospermia. Neste mesmo estudo, a injeção de agentes esclerosantes (3,5% de formalina em uma solução com tampão fosfato ou 1,5% de gluconato de clorexidina em 50% de DMSO) na cauda dos dois epidídimos dos cães resultaram em uma azoospermia irreversível via oclusão química, com atrofia testicular secundária. Entretanto, o tratamento com a formalina sozinha induziu apenas uma azoospermia ou oligospermia temporária. (Pineda et al., 1977).

Duas injeções bilaterais no epidídimo de clorexidina com DMSO resultou no desenvolvimento de azoospermia após 35 dias do tratamento uma única injeção diretamente nos ductos deferentes com agentes químicos esclerosantes (nitrito de prata 10%, formaldeído em etanol 3,6%, permanganato de potássio 5%, etanol 100% ou formaldeído 3,6%) resultou em infertilidade similar as injeções intra-epididimais com os mesmos agentes (Dixit et al., 1975). Estudos usando esses modelos de contracepção do macho relatam pouco ou nenhum sinal de dor ou

desconforto após a injeção, com uma variação dependendo da rota de administração e do agente usado. Terminações nervosas aferentes associadas com a sensação de dor estão localizadas sobre a pele do escroto e na cápsula do testículo, em vez de dentro do parênquima testicular e epididimal. Um aumento transitório do diâmetro testicular pode ocorrer após a injeção dentro de 24 h, resultando em dor e inchaço secundário podendo persistir de 7-15 dias (Talwar e Naz, 1981).

Reações locais e sistêmicas adicionais foram verificadas após injeções intratesticulares que incluem ulceração escrotal e dermatite, automutilação escrotal, inchaço do prepúcio, vômitos, diarreia, anorexia, letargia e leucocitose. É importante notar que, dependendo do método de tratamento, os cães podem permanecer férteis por até 60 dias pós-injeção devido às reservas espermáticas presentes no epidídimo. Além disso, ao contrário da castração cirúrgica, este tipo de esterilização química não elimina as fontes gonadais de testosterona (Kutzler e Wood, 2006).

Gatos

Injeções intra-epididimais induziram a vasectomia química em gatos domésticos. Uma injeção de uma solução de digluconato de clorexidina 4,5% na cauda de cada epidídimo resultou em azoospermia ou oligospermia severa. Diferente do cão, granulomas espermáticos e espermatocelos foram muito observados em gatos após a injeção. Ademais, um inchaço e dor aparente foram observados por duas semanas após a injeção. (Pineda e Dooley, 1984).

Outros métodos não cirúrgicos

Cães e gatos

Esterilização mecânica não invasiva

O ultrassom é uma forma de vibração acústica com frequências maiores que a faixa auditiva. O ultrassom tem sido usado para suprimir a espermatogênese por meio de um efeito combinado de calor e mecânica. Os testículos dos cães e gatos são tratados com um aparelho de ultrassom de alta intensidade Whitewater Electronics®. Cada tratamento consiste de 1-2W/cm² por 10-15 minutos administrados de 1-3 vezes em intervalos de 2-7 dias. O tratamento suprime significativamente a espermatogênese sem afetar as concentrações de testosterona (Fahim et al., 1977). Em estudos separados, um feixe (20-120s) de ultrassom (3-19W) foi focado no ducto deferente ou no epidídimo de cães anestesiados. O ultrassom induziu uma necrose coagulativa térmica nas estruturas subsuperficiais, resultando em uma oclusão luminal após 2 semanas do tratamento. Entretanto, a queima da pele ocorreu em 20% dos casos (Roberts et al., 2002a, Roberts et al., 2002b).

2.3. Toxicologia e Nanotoxicologia

De uma forma simples e concisa, a toxicologia é o estudo da natureza e dos mecanismos subjacentes aos efeitos tóxicos exercidos por substâncias exógenas nos organismos vivos e outros sistemas biológicos. A toxicologia também trata da avaliação quantitativa dos efeitos adversos em relação à concentração ou dosagem,

duração e frequência da exposição das substâncias nos organismos (Lu e Kacew, 2009).

A avaliação de riscos para a saúde de produtos químicos industriais, poluentes ambientais e outras substâncias representa um elemento importante na proteção da saúde dos trabalhadores e membros das comunidades. Estudos aprofundados da natureza e do mecanismo dos efeitos de substâncias tóxicas são indispensáveis para a invenção de antídotos específicos e de outras medidas de melhoramento. Juntamente com outras ciências, a toxicologia contribui para o desenvolvimento de produtos químicos mais seguros utilizados como drogas, aditivos alimentares, e pesticidas, bem como de muitos produtos químicos industriais úteis. Mesmo os efeitos adversos, por si só são explorados na busca de inseticidas mais eficazes, vermífugos, antimicrobianos e etc. (Lu e Kacew, 2009).

A nanotoxicologia é a avaliação da segurança de nanoestruturas e nano-dispositivos de engenharia, é um campo novo de toxicologia. Materiais que são geralmente inertes podem agir de forma diferente quando introduzidos no corpo como nanomateriais (Takeda et al., 2009). A toxicidade das nanopartículas vem sendo estudada (Buzea et al., 2007, Monge-Fuentes et al., 2011) e, claramente, é uma das questões mais importantes que necessitam de maior investigação. Tem sido difícil relatar a toxicidade das nanopartículas precisamente, visto que a toxicidade depende de numerosos fatores incluindo a dose, composição química, método de administração, tamanho, biodegradabilidade, solubilidade, farmacocinética, biodistribuição, química de superfície, forma e estrutura, dentre outros (Arruebo et al., 2007). A toxicidade também pode ser dependente de vários

fatores, como tipo de revestimento ou seus produtos de degradação, a composição química do meio celular, o estado de oxidação do ferro em SPION e a interação proteína-SPION (Singh et al., 2010).

Vários estudos têm examinado o potencial citotóxico de vários tipos diferentes de SPION com uma gama de revestimentos de superfície e têm geralmente encontrado baixas ou nenhuma citotoxicidade associada a estas NPMs até altas concentrações (>100 µg / ml).

Um estudo investigou o efeito de diferentes revestimentos de superfície sobre o comportamento e morfologia das células *in vitro* e mostrou que NPM de magnetita (Fe₃O₄) cobertas com dextran podem resultar em morte e proliferação celular reduzida semelhante à causada por partículas de óxido ferro não revestidas (Berry et al., 2003). Em um estudo avaliando os efeitos *in vitro* e *in vivo* de um nanocristal de magnetita em um tratamento de hipertermia e de liberação de droga termorresponsivo sincronizados (Li et al., 2013) mostrou que nos ensaios de viabilidade celular e exames patológicos essa sincronização é significativamente mais eficaz *in vitro* e *in vivo* do que a hipertermia ou quimioterapia sozinha. A remissão do tumor em camundongos foi alcançada através da sincronização de radiofrequência de hipertermia e quimioterapia após a nanopartícula ser injetada por via intravenosa.

Um estudo de citotoxicidade (Mahmoudi et al., 2010) sobre uma linhagem de células de fibroblasto (L929 mouse fibroblasts) de rato mostrou que as partículas de magnetita não revestidas induzem uma maior toxicidade do que partículas revestidas pelo álcool polivinílico (PVA). No entanto, a toxicidade induzida por

partículas não revestidas foi significativamente reduzida por substituição de SPIONs com superfície saturada. Os autores relataram também a formação de vesículas de gás após a exposição às partículas não revestidas, resultando em funções de proteínas alteradas e mudanças no equilíbrio iônico dentro das células, que promove também a toxicidade.

Os efeitos tóxicos de NPMs têm sido amplamente estudados, tendo em vista sua grande potencialidade de aplicação em procedimentos biomédicos. Um extenso artigo de revisão feito por Buzea et al. (2007) relata o efeito de nanopartículas em quase todos os sistemas (excretor, circulatório, nervoso, digestório, linfático, dérmico e interações celulares) à exceção do sistema reprodutor. No entanto, o sistema reprodutor só vem recebendo mais atenção nos últimos anos (Fedulov et al., 2008, Noori et al., 2011).

Em uma revisão feita por Sun et al. (2013) focando principalmente o sistema reprodutor feminino pode-se verificar que algumas nanopartículas são capazes de induzir efeitos prejudiciais sobre o sistema reprodutivo de camundongos e *zebrafish*, bem como o seu desenvolvimento fetal e embriolarval, tanto *in vivo* como *in vitro*. Em camundongos, a exposição materna a nanopartículas faz ultrapassar a barreira transplacentária resultando em toxicidade fetal, tais como defeitos físicos, neurotoxicidade e toxicidade reprodutiva na prole. No *zebrafish*, a incubação ou microinjeção de uma dose baixa de nanopartículas induz atraso na eclosão, mortalidade e vários defeitos morfológicos. Embora as consequências de toxicidade nestes dois modelos não sejam diretamente comparáveis, a toxicidade de

nanomateriais em diversas espécies vivas destaca ainda mais a universalidade da nanotoxicidade em animais.

Como pode ser visto, alguns estudos de nanotoxicologia em fêmeas onde se avaliam a capacidade das NPM de ultrapassarem a barreira placentária e atingir a prole foram realizados, mas poucos relatam os efeitos no sistema reprodutor masculino.

2.3.1. Toxicidade No Sistema Reprodutor Masculino

As funções reprodutivas podem ser afetadas por substâncias tóxicas por meio de seus efeitos sobre o sistema reprodutivo de ambos os sexos. No masculino, a formação, desenvolvimento, armazenamento e liberação de espermatozoides podem ser adversamente afetados. Muitos produtos químicos afetam negativamente a espermatogênese e produzem atrofia testicular. Estes incluem corantes alimentares (por exemplo, óleo amarelo AB e óleo amarelo OB)(Allmark et al., 1955), pesticidas (por exemplo, DBCP), plásticos (ftalatos), metais (por exemplo, arsênio, estanho, chumbo, cádmio) e solventes orgânicos. Uma variedade de outros produtos químicos afeta os testículos, tais como hormônios esteroides, agentes alquilantes, ciclohexilamina e hexaclorofeno. Além disso, a contagem de espermatozoides reduzida pode ser resultante de efeitos adversos sobre a espermatogênese, uma substância tóxica pode tornar os espermatozoides defeituosos, menos móveis ou matá-los. Por exemplo, tanto o sulfonato metilmetano (MMS) e busulfan podem produzir mutações letais, mas o MMS afeta as espermatídes e espermatozoides enquanto o busulfan afeta as células pré-

espermio gênicas. Estes agentes alquilantes aparentemente atacam o DNA destas células com diferentes mecanismos de reparação (Lu e Kacew, 2009).

Um dos fatores que podem afetar a produção espermática é o aumento na temperatura dos testículos (Setchell, 2006, Hansen, 2009b). Um estudo clássico envolvendo ratos (Fahim et al., 1975) comparou os efeitos do calor emitido por diversas fontes na espermatogênese e verificou que todas (água quente, ondas infravermelhas, micro-ondas e ultrassom) afetam de alguma forma a produção espermática. Em camundongos, um estudo mostrou que após a parte escrotal ser submetida a um banho de água de temperaturas entre 38 a 42°C por 60 minutos houve uma alteração na espermatogênese, sendo que danos severos foram relatados na temperatura mais alta (Sailer et al., 1997).

Os espermatozoides também podem ser afetados ao serem armazenados no epidídimo. Por exemplo, o agente cloridrina inibe a capacidade de fertilização dos espermatozoides. O gossipol, provavelmente atua através de um mecanismo semelhante (Lu e Kacew, 2009).

O testículo é regulado hormonalmente pelo eixo hipotálamo-hipófise-testículo: O hormônio folículo-estimulante (FSH) é necessário no início da espermatogênese através da produção de Proteínas ligantes de andrógeno (ABP) em células de Sertoli, enquanto que o hormônio luteinizante (LH) atua sobre as células de Leydig estimulando a síntese de testosterona. A substância tóxica pode, assim, afetar a função reprodutiva por afetar a secreção destes hormônios. Um exemplo é DBCP (dibromocloropropano), um fumigante usado na agricultura, que induziu azoospermia e oligospermia entre trabalhadores ocupacionais, juntamente

com elevadas concentrações séricas de LH e FSH (Miller et al., 1987, Lu e Kacew, 2009).

Funções reprodutivas estão também sob a influência do sistema nervoso autônomo. Assim, a droga losulazina, hipotensora, que atua pelo esgotamento da norepinefrina, produz infertilidade reversível em ratos machos, provavelmente através de comportamento sexual alterado e distúrbios ejaculatórios (Mesfin et al., 1989). Guanetidina, uma outra droga hipotensora, permite a produção de espermatozoides mas não conseguem induzir a gravidez, interferindo com a emissão seminal (Palmer, 1976, Lu e Kacew, 2009).

Em resumo, por ser um processo bastante complexo, a produção de espermatozoides e a função reprodutiva no macho pode ser afetada de diferentes formas (reversível ou irreversivelmente, total ou parcialmente, quantitativa ou qualitativamente). Desta forma, o estudo toxicológico de novas substâncias deve abranger seus potenciais efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutor.

Em relação aos efeitos de NPs no sistema reprodutor masculino, há pouquíssimos trabalhos na literatura, alguns deles relatando o efeito direto de nanopartículas sobre os espermatozoides *in vitro*. Em um estudo *in vitro* de Wiwanitkit *et al* (2009), nanopartículas de ouro foram colocadas juntas ao sêmen humano por um período de 15 minutos. Após esse período, o sêmen foi avaliado em relação a sua motilidade e alterações morfológicas. A motilidade seminal foi reduzida em 20% quando comparado ao controle e também foi verificado que alguns espermatozoides estavam fragmentados. Os autores concluíram que essas partículas apresentam toxicidade seminal.

Um estudo de nosso grupo de pesquisa (Caldeira, 2011) verificou que a exposição espermática *in vitro* ao fluido magnético composto por nanopartículas de maghemita revestidas com DMSA não afeta a cinética espermática, não exerce influência na quantidade de espermatozoides viáveis e de espermatozoides com reação acrossomal e não acarreta lesões ultraestruturais de espermatozoides bovinos. Também em espermatozoides bovinos, a incubação de nanopartículas de maghemita recoberta com PVA e concentração de íons de Fe de 7,35mM não acarretou alterações na motilidade espermática e manteve a capacidade de penetração, pois não teve efeito sobre a reação acrossomal (Makhluf et al., 2006). Já um estudo *in vivo* relata as alterações dos níveis hormonais séricos e produção espermática diária em seres humanos que acontecem quando ocorre a aspiração de nanopartículas em forma de resíduos de carbono e que os efeitos deletérios não ocorrem apenas pela quantidade aspirada, mas também pela massa das partículas aspiradas (Yoshida et al., 2009).

Além disso, a nanobiotecnologia produz perspectivas de aplicação em tratamentos para o câncer. Os avanços no tratamento do câncer têm melhorado significativamente as taxas de cura, especialmente no caso de doenças malignas hematológicas e alguns tumores sólidos em pacientes jovens. Os pacientes com câncer hoje têm uma grande chance de cura ou de sobrevivência a longo prazo. No entanto, os danos a outras células do corpo podem ocorrer, e o epitélio germinativo é um órgão-alvo para tratamentos anti-proliferativos. Pacientes jovens tratados com quimioterapia ou radioterapia podem ter uma vida normal, mas também podem sofrer danos significativos para as gônadas. Vida normal não implica vida

reprodutiva normal (Lo Presti et al., 2004). Terapias bem estabelecidas comumente usadas no tratamento de câncer como a cirurgia, quimioterapia, imunoterapia e radioterapia podem ser melhoradas com o uso da nanotecnologia. E também oferece outras oportunidades para esses tratamentos, como a hipertermia localizada ou a produção de espécies reativas de oxigênio (Roszek et al., 2005). Mais uma vez, atesta-se a importância de se conhecer os efeitos reprodutivos das nanopartículas.

Uma vez que as nanopartículas vem sendo utilizadas com mais frequência com diversas finalidades, surge o interesse de estudar se elas possuem efeitos anti-reprodutivos como os tratamentos anticancerígenos convencionais. Isso já vem sendo buscado em novos estudos (Campagnolo et al., 2013, Sun et al., 2013, Qi et al., 2014). Verificando o efeito de nanopartículas de prata que são amplamente utilizadas na indústria farmacêutica, (Gromadzka-Ostrowska et al., 2012) verificaram que com uma dose considera pequena de 5mg/Kg em ratos Wistar já podem causar danos às células germinativas. Garcia et al. (2014) também com nanopartículas de prata, só que com um diâmetro menor (10nm X 20 nm) que o de Gromadzka-Ostrowska et al. (2012) também verificou que doses subagudas podem alterar parâmetros como o diâmetro e o epitélio seminífero de camundongos.

Com o conhecimento adquirido sobre os efeitos desejáveis e/ou indesejáveis das nanopartículas no sistema reprodutivo pode nos levar a explorar novos campos de estudo, como por exemplo, utilizar efeitos anti-reprodutivos no desenvolvimento de mecanismos que levem a infertilidade de animais que possuem a reprodução descontrolada.

2.4. Magneto-hipertermia

A magneto-hipertermia consiste na exposição das nanopartículas magnéticas (NPM) a um campo magnético de frequência alternada (AC), que responderão dissipando calor (Wang et al., 2010). A maghemita é uma NPM a base de óxido de ferro é capaz de se magnetizar (Berry e Curtis, 2003) e de dissipar calor quando submetida a um campo magnético alternado (Wang et al., 2010).

A magneto-hipertermia já vem sendo testada com sucesso nos tratamentos contra câncer (Portilho et al., 2011, Sadhukha et al., 2013), leishmaniose (de Carvalho et al., 2013) e também para o sistema de “drug delivery” (Kumar e Mohammad, 2011). O aquecimento de certos órgãos ou tecidos a temperaturas entre 41°C e 46°C, preferencialmente, para terapia do câncer é chamado de hipertermia. Temperaturas mais elevadas até 56°C, o que leva a uma necrose generalizada, coagulação ou carbonização (dependendo da temperatura) é chamado de “termoablação”.

Atingir essas temperaturas com a magneto-hipertermia pode nos levar a uma nova forma de buscar métodos contraceptivos. Como já é bem estabelecido que os gametas masculinos necessitam de uma temperatura menor do que a temperatura corporal para uma formação normal (Wang et al., 1997), o aquecimento da região testicular pode levar a infertilidade momentânea ou definitiva, dependendo do tempo e da temperatura que é utilizada (Setchell, 2006).

2.5. “Castração Magnética”

O uso de SPION associadas à magneto-hipertermia testicular pode ser uma forma de causar infertilidade em machos, com o intuito de servir como método contraceptivo, o que temos chamado informalmente de “castração magnética”. Esta técnica poderia ser útil para o controle de populações de animais errantes, o que é uma questão de saúde pública.

No Brasil, temos milhões de gatos e cães de rua, que são potenciais transmissores de doenças, além de causarem um desequilíbrio biológico na fauna regional por predação de pequenos animais silvestres (Purswell e Kolster, 2006). Estes animais são frutos do abandono ou provenientes do acasalamento dos próprios animais de rua. Uma única gata, por exemplo, pode ser responsável por cerca de 781 mil descendentes diretos e indiretos no curto período de 7 anos (Beaver, 2003).

Atualmente, a política de controle populacional de animais de rua é baseada na captura pelos Centros de Controles de Zoonoses e eutanásia. Segundo a Sociedade Humanitária dos Estados Unidos da América, a cada ano cerca de 4 milhões de cães e gatos são eutanasiados naquele país (HSUS, 2012). No entanto, esta política tem se mostrado ineficiente, e a grande maioria continua como animais errantes.

Em vista de solucionar esse problema, o Projeto de Lei 1.376/03 dispõe sobre a política de controle da natalidade de cães e gatos e destina verbas governamentais para investir em esterilização dos animais (Brasil, 2012). A esterilização dos animais e educação da população sobre posse responsável são as medidas mais efetivas para controle populacional (Kutzler e Wood, 2006,

Robertson, 2008, Mendes-de-Almeida et al., 2011). Pesquisas têm sido realizadas na tentativa de tornar os métodos de esterilização mais acessíveis para a população e para os projetos governamentais, entretanto, o foco principal sempre foi o controle da fêmea. O fato é que cada macho intacto é um reprodutor em potencial e sua esterilização contribui para o decréscimo do número de fêmeas gestantes (Oliveira et al., 2012). O método de eleição para esterilização de cães e gatos machos ainda é a castração cirúrgica (Kutzler e Wood, 2006).

A castração cirúrgica é muito eficaz, e consiste na retirada dos testículos cirurgicamente. No entanto, exige alguns pré-requisitos, como um centro cirúrgico e equipe altamente especializada. Além disso, em um dia, um único cirurgião só é capaz de castrar cerca de 12 machos, o que torna a técnica pouco efetiva em termos de atender ao grande número de animais existentes.

Alternativamente, existe a castração química, que é realizada com injeção intratesticular de agentes que promovem esclerose do tecido testicular. O agente mais utilizado é o gluconato de zinco, que confere a esterilização após uma única aplicação. Suas vantagens em relação à cirurgia são a rapidez para execução da técnica, o baixo custo, a recuperação rápida, sem dor e sem riscos de contaminação e/ou hemorragias, além de não necessitar de ambiente cirúrgico e equipe especializada (Kutzler e Wood, 2006, Oliveira et al., 2013). No entanto, ainda não se conhecem os efeitos a longo prazo deste procedimento.

Considerando que a produção de gametas nos machos é dependente da manutenção de baixas temperaturas nos testículos, a hipertermia poderia ser uma alternativa para causar infertilidade. A exemplo do que tem sido proposto para

tratamento de tumores, a magneto-hipertermia poderia ser utilizada intencionalmente para provocar danos ao tecido testicular. Desta forma, uma injeção intratesticular de uma SPION e a aplicação de um campo magnético externo poderiam elevar a temperatura local temporariamente a ponto de danificar o epitélio germinativo levando à infertilidade. Este procedimento pode ser uma alternativa aos métodos já existentes e até apresentar vantagens em relação a eles, e neste sentido merece ser testado.

3. Justificativa

Com o advento da nanotecnologia, o uso de nanopartículas vem sendo testado para diversos tratamentos em humanos, e estudos relacionados à toxicologia dessas partículas também vem sendo realizados. Os tecidos avaliados em relação a biocompatibilidade normalmente são pulmões, fígado, baço, intestinos, coração, rins e cérebro. Uma vez que a barreira hemato-encefálica é ultrapassada, devemos também avaliar a capacidade das NPMs de atravessar a barreira hemato-testicular, pois, podem causar efeitos indesejados no sistema reprodutor. O sistema reprodutor feminino já foi avaliado em alguns relatos e também a capacidade de algumas NPMs atravessarem a barreira placentária e causarem efeitos deletérios no sistema reprodutor e nervoso da ninhada (Yoshida et al., 2009). Porém, como citado anteriormente, os estudos que envolvem diretamente a biocompatibilidade das nanopartículas magnéticas em relação ao sistema reprodutor masculino são escassos (Yoshida et al., 2009).

Estudos envolvendo a biocompatibilidade e efeitos adversos que as NPMs podem causar no sistema reprodutor masculino são muito importantes. É sabido que os tratamentos convencionais contra o câncer (radioterapia, quimioterapia) podem levar o paciente à infertilidade (Lee et al., 2006), mas ainda não se tem relatos de quanto esse sistema pode ser afetado em uma terapia que utilize NPMs. A terapia pode ajudar a manutenção da vida do organismo, mas também é importante que um animal ou ser humano tratado sejam capazes de se reproduzir.

Independentemente do resultado encontrado em relação à toxicidade das NPMs ao sistema reprodutor é imprescindível conhecer estes efeitos. A

nanotecnologia e o uso de NPMs pode ser útil inclusive se for capaz de causar danos ao tecido gonadal. Neste sentido, outra abordagem deste trabalho será a de tentar estabelecer um protocolo de castração por meio da magneto-hipertermia testicular. Sendo possível o desenvolvimento desse método, ele poderá ser uma alternativa para o controle populacional de animais domésticos errantes.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

Investigar a biocompatibilidade e a toxicidade de NPMs de maghemita recoberta com citrato no sistema reprodutor masculino de ratos Wistar administrada por via endovenosa e intratesticular e a castração magnética por via da magneto-hipertermia

4.1.1. Objetivos específicos

Avaliar a capacidade de NPMs de maghemita recoberta com citrato administradas de forma sistêmica em ultrapassar a barreira hemato-testicular;

Avaliar os efeitos da administração sistêmica de NPMs de maghemita recoberta com citrato nos túbulos seminíferos;

Avaliar os efeitos da administração sistêmica de NPMs de maghemita recoberta com citrato sobre a produção e a qualidade espermática;

Avaliar os efeitos da injeção intratesticular de NPMs de ferrita de manganês funcionalizada com citrato e da magneto-hipertermia testicular nos túbulos seminíferos dos ratos;

Avaliar os efeitos da injeção intratesticular de NPMs de ferrita de manganês funcionalizada com citrato e da magneto-hipertermia testicular sobre a produção e a qualidade espermática.

5. Referências Bibliográficas

- ALLMARK, M. G., GRICE, H. C. & LU, F. C. 1955. Chronic Toxicity Studies on Food Colours .1. Observations on the Toxicity of Fd and C Yellow No3 (Oil Yellow Ab) and Fd and C Yellow No4 (Oil Yellow Ob) in Rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7, 591-603.
- ARRUEBO, M., FERNÁNDEZ-PACHECO, R., IBARRA, M. R. & SANTAMARÍA, J. 2007. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today*, 2, 22-32.
- BARKALINA, N., CHARALAMBOUS, C., JONES, C. & COWARD, K. 2014. Nanotechnology in reproductive medicine: Emerging applications of nanomaterials. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10, e921-e938.
- BEAVER, B. V. G. 2003. *Feline Behavior: A Guide for Veterinarians*, SAUNDERS W B Company.
- BERRY, C. C. 2009. Progress in functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 42.
- BERRY, C. C. & CURTIS, A. S. G. 2003. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 36, R198-R206.
- BERRY, C. C., WELLS, S., CHARLES, S. & CURTIS, A. S. G. 2003. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 24, 4551-4557.
- BUZEA, C., PACHECO, I. I. & ROBBIE, K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2, Mr17-Mr71.
- CALDEIRA, D. F. 2011. *Viabilidade dos espermatozoides bovinos após exposição a nanopartículas de maghemita recobertas com DMSA*. Mestrado, Universidade de Brasília.
- CAMPAGNOLO, L., MASSIMIANI, M., PALMIERI, G., BERNARDINI, R., SACCHETTI, C., BERGAMASCHI, A., VECCHIONE, L., MAGRINI, A., BOTTINI, M. & PIETROIUSTI, A. 2013. Biodistribution and toxicity of pegylated single wall carbon nanotubes in pregnant mice. *Part Fibre Toxicol*, 10, 21.
- CARNEIRO, M. L. B., PEIXOTO, R. C. A., JOANITTI, G. A., OLIVEIRA, R. G. S., TELLES, L. A. M., MIRANDA-VILELA, A. L., BOCCA, A. L., VIANNA, L. M. S., DA SILVA, I. C. R., DE SOUZA, A. R., LACAVA, Z. G. M. & BAO, S. N. 2013. Antitumor effect and toxicity of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer. *Journal of Nanobiotechnology*, 11.
- CHENG, C. Y. 2008. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, Springer.
- CHENG, C. Y. & MRUK, D. D. 2012. The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception. *Pharmacological Reviews*, 64, 16-64.
- CHERAGHIPOUR, E., TAMADDON, A. M., JAVADPOUR, S. & BRUCE, I. J. 2013. PEG conjugated citrate-capped magnetite nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 328, 91-95.
- CORREA-DUARTE, M. A., GRZELCZAK, M., SALGUEIRINO-MACEIRA, V., GIERSIG, M., LIZ-MARZAN, L. M., FARLE, M., SIERAZDKI, K. & DIAZ, R. 2005. Alignment of carbon nanotubes under low magnetic fields through attachment of magnetic nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, 109, 19060-19063.
- DE CARVALHO, R. F., RIBEIRO, I. F., MIRANDA-VILELA, A. L., DE SOUZA FILHO, J., MARTINS, O. P., CINTRA E SILVA DDE, O., TEDESCO, A. C., LACAVA, Z. G., BAO, S. N. & SAMPAIO, R. N. 2013. Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA-DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. *Experimental Parasitology*, 135, 217-22.
- DIXIT, V. P. 1977. Chemical sterilization: effects of danazol administration on the testes and epididymides of male rabbit. *Acta Biol Med Ger*, 36, 73-8.

- DIXIT, V. P., LOHIYA, N. K., ARYA, M. & AGRAWAL, M. 1975. The effects of chemical occlusion of vas deferens on the testicular function of dog: a preliminary study. *Acta Eur Fertil*, 6, 348-53.
- ENGLAND, G. C. W. 1997. Effect of progestogens and androgens upon spermatogenesis and steroidogenesis in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 123-138.
- EULISS, L. E., GRANCHAROV, S. G., O'BRIEN, S., DEMING, T. J., STUCKY, G. D., MURRAY, C. B. & HELD, G. A. 2003. Cooperative assembly of magnetic nanoparticles and block copolypeptides in aqueous media. *Nano Letters*, 3, 1489-1493.
- FAHIM, M. S., FAHIM, Z., DER, R., HALL, D. G. & HARMAN, J. 1975. Heat in Male Contraception (Hot Water 60 Degrees, Infrared, Microwave, and Ultrasound). *Contraception*, 11, 549-562.
- FAHIM, M. S., FAHIM, Z., HARMAN, J., THOMPSON, I., MONTIE, J. & HALL, D. G. 1977. Ultrasound as a new method of male contraception. *Fertil Steril*, 28, 823-31.
- FAHIM, M. S., WANG, M., SUTCU, M. F., FAHIM, Z. & YOUNGQUIST, R. S. 1993. Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. *Contraception*, 47, 107-22.
- FAPBAI, Y., ZHOU, J., GUI, Z. & LI, L. 2006. Phase formation process, microstructure and magnetic properties of Y-type hexagonal ferrite prepared by citrate sol-gel auto-combustion method. *Materials Chemistry and Physics*, 98, 66-70.
- FEDULOV, A. V., LEME, A., YANG, Z., DAHL, M., LIM, R., MARIANI, T. J. & KOBZIK, L. 2008. Pulmonary Exposure to Particles during Pregnancy Causes Increased Neonatal Asthma Susceptibility. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 38, 57-67.
- FIGUEROLA, A., DI CORATO, R., MANNA, L. & PELLEGRINO, T. 2010. From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. *Pharmacological Research*, 62, 126-143.
- FRANÇA, L. R., AVELAR, G. F. & ALMEIDA, F. F. L. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, 63, 300-318.
- FRESHMAN, J. L., OLSON, P. N., AMANN, R. P., CARLSON, E. D., TWEDT, D. C. & BOWEN, R. A. 1990. The Effects of Methyltestosterone on Reproductive Function in Male Greyhounds. *Theriogenology*, 33, 1057-1073.
- FREUND, J., LIPTON, M. M. & THOMPSON, G. E. 1953. Aspermatogenesis in the Guinea Pig Induced by Testicular Tissue and Adjuvants. *Journal of Experimental Medicine*, 97, 711-&.
- GARCIA, T. X., COSTA, G. M. J., FRANCA, L. R. & HOFMANN, M. C. 2014. Sub-acute intravenous administration of silver nanoparticles in male mice alters Leydig cell function and testosterone levels. *Reproductive Toxicology*, 45, 59-70.
- GIANNACCINI, M., CUSCHIERI, A., DENTE, L. & RAFFA, V. 2014. Non-mammalian vertebrate embryos as models in nanomedicine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*.
- GIMENES, R., BALDISSERA, M. R., DA SILVA, M. R. A., DA SILVEIRA, C. A., SOARES, D. A. W., PERAZOLLI, L. A., DA SILVA, M. R. & ZAGHETE, M. A. 2012. Structural and magnetic characterization of $Mn_xZn_{1-x}Fe_2O_4$ ($x=0.2; 0.35; 0.65; 0.8; 1.0$) ferrites obtained by the citrate precursor method. *Ceramics International*, 38, 741-746.
- GOODPASTURE, J. C., BERGSTROM, K. & VICKERY, B. H. 1988. Potentiation of the gonadotoxicity of Cytoxan in the dog by adjuvant treatment with a luteinizing hormone-releasing hormone agonist. *Cancer Res*, 48, 2174-8.
- GOVOROV, A. O. & RICHARDSON, H. H. 2007. Generating heat with metal nanoparticles. *Nano Today*, 2, 30-38.
- GROMADZKA-OSTROWSKA, J., DZIENDZIKOWSKA, K., LANKOFF, A., DOBRZYNSKA, M., INSTANES, C., BRUNBORG, G., GAJOWIK, A., RADZIKOWSKA, J., WOJEWODZKA, M. & KRUSZEWSKI, M. 2012. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicology Letters*, 214, 251-258.
- GUBIN, S. P. 2009. *Magnetic Nanoparticles*.

- GUPTA, A. K. & GUPTA, M. 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26, 3995-4021.
- HANSEN, P. J. 2009. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 364, 3341-3350.
- HESS, R. A. 1998. Spermatogenesis, Overview. In: NEILL, E. K. A. J. D. (ed.) *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego: Academic Press.
- HUANG, S. H. & JUANG, R. S. 2011. Biochemical and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles: a review. *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 4411-4430.
- IMMEGART, H. M. & THRELFALL, W. R. 2000. Evaluation of intratesticular injection of glycerol for nonsurgical sterilization of dogs. *Am J Vet Res*, 61, 544-9.
- JUNAIDI, A., WILLIAMSON, P. E., CUMMINS, J. M., MARTIN, G. B., BLACKBERRY, M. A. & TRIGG, T. E. 2003. Use of a new drug delivery formulation of the gonadotrophin-releasing hormone analogue Deslorelin for reversible long-term contraception in male dogs. *Reproduction Fertility and Development*, 15, 317-322.
- JUNG, M. J., MOON, Y. C., CHO, I. H., YEH, J. Y., KIM, S. E., CHANG, W. S., PARK, S. Y., SONG, C. S., KIM, H. Y., PARK, K. K., MCORIST, S., CHOI, I. S. & LEE, J. B. 2005. Induction of castration by immunization of male dogs with recombinant gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-canine distemper virus (CDV) T helper cell epitope p35. *J Vet Sci*, 6, 21-4.
- KASTELIC, J. P., COOK, R. B. & COULTER, G. H. 1997. Contribution of the scrotum, testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. *Anim Reprod Sci*, 45, 255-61.
- KAWADKAR, J., CHAUHAN, M. K. & MAHARANA, M. 2011. Nanobiotechnology: Application Of Nanotechnology In Diagnosis, Drug Discovery And Drug Development. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 4, 23-28.
- KUCKELHAUS, S., REIS, S. C., CARNEIRO, M. F., TEDESCO, A. C., OLIVEIRA, D. M., LIMA, E. C. D., MORAIS, P. C., AZEVEDO, R. B. & LACAVAL, Z. G. M. 2004. In vivo investigation of cobalt ferrite-based magnetic fluid and magnetoliposomes using morphological tests. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 272, 2402-2403.
- KUMAR, C. S. & MOHAMMAD, F. 2011. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 63, 789-808.
- KUTZLER, M. & WOOD, A. 2006. Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, 66, 514-525.
- LACOSTE, D., DUBE, D., TRUDEL, C., BELANGER, A. & LABRIE, F. 1989. Normal gonadal functions and fertility after 23 months of treatment of prepubertal male and female dogs with the GnRH agonist [D-Trp6, des-Gly-NH2(10)]GnRH ethylamide. *J Androl*, 10, 456-65.
- LADD, A., TSONG, Y. Y., WALFIELD, A. M. & THAU, R. 1994. Development of an Antifertility Vaccine for Pets Based on Active Immunization against Luteinizing-Hormone-Releasing Hormone. *Biology of Reproduction*, 51, 1076-1083.
- LEE, S. J., SCHOVER, L. R., PARTRIDGE, A. H., PATRIZIO, P., WALLACE, W. H., HAGERTY, K., BECK, L. N., BRENNAN, L. V. & OKTAY, K. 2006. American Society of Clinical Oncology Recommendations on Fertility Preservation in Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology*, 24, 2917-2931.
- LI, T. J., HUANG, C. C., RUAN, P. W., CHUANG, K. Y., HUANG, K. J., SHIEH, D. B. & YEH, C. S. 2013. In vivo anti-cancer efficacy of magnetite nanocrystal-based system using locoregional hyperthermia combined with 5-fluorouracil chemotherapy. *Biomaterials*, 34, 7873-7883.
- LO PRESTI, A., RUVOLO, G., GANCITANO, R. A. & CITTADINI, E. 2004. Ovarian function following radiation and chemotherapy for cancer. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 113, S33-S40.

- LU, A. H., LI, W. C., MATOUSSEVITCH, N., SPLIETHOFF, B., BONNEMANN, H. & SCHUTH, F. 2005. Highly stable carbon-protected cobalt nanoparticles and graphite shells. *Chem Commun (Camb)*, 98-100.
- LU, A. H., SALABAS, E. L. & SCHUTH, F. 2007. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie-International Edition*, 46, 1222-1244.
- LU, F. C. & KACEW, S. 2009. *Lu's Basic Toxicology: Fundamentals, Target Organs, and Risk Assessment, Fifth Edition*, Taylor and Francis.
- LUNNEN, J. E., FAULKNER, L. C., HOPWOOD, M. L. & PICKETT, B. W. 1974. Immunization of Dogs with Bovine Luteinizing-Hormone. *Biology of Reproduction*, 10, 453-460.
- MAHMOUDI, M., SIMCHI, A., IMANI, M., SHOKRGOZARD, M. A., MILANI, A. S., HAFELI, U. O. & STROEVE, P. 2010. A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 75, 300-309.
- MAKHLUF, S. B. D., QASEM, R., RUBINSTEIN, S., GEDANKEN, A. & BREITBART, H. 2006. Loading magnetic nanoparticles into sperm cells does not affect their functionality. *Langmuir*, 22, 9480-9482.
- MELLO-AIRES, M. 2008. *FISIOLOGIA*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- MENDES-DE-ALMEIDA, F., REMY, G. L., GERSHONY, L. C., RODRIGUES, D. P., CHAME, M. & LABARTHE, N. V. 2011. Reduction of feral cat (*Felis catus* Linnaeus 1758) colony size following hysterectomy of adult female cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 13, 436-440.
- MESFIN, G. M., MORRIS, D. F., SEAMAN, W. J. & MARKS, T. A. 1989. Testicular Lesions in Rats Treated with a Sympatholytic Hypotensive Agent (Losulazine). *Journal of the American College of Toxicology*, 8, 525-538.
- MILLER, R. K., KELLOGG, C. K. & SALTZMAN, R. A. 1987. Reproductive and perinatal toxicology. *Handbook of Toxicology*. Washington, DC:: Hemisphere.
- MODY, V., COX, A., SHAH, S., SINGH, A., BEVINS, W. & PARIHAR, H. 2014. Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor. *Applied Nanoscience*, 4, 385-392.
- MONGE-FUENTES, V., GARCIA, M. P., TAVARES, M. C. H., VALOIS, C. R. A., LIMA, E. C. D., TEIXEIRA, D. S., MORAIS, P. C., TOMAZ, C. & AZEVEDO, R. B. 2011. Biodistribution and biocompatibility of DMSA-stabilized maghemite magnetic nanoparticles in nonhuman primates (*Cebus* spp.). *Nanomedicine*, 6, 1529-1544.
- NAZ, R. K., GUPTA, S. K., GUPTA, J. C., VYAS, H. K. & TALWAR, G. P. 2005. Recent advances in contraceptive vaccine development: a mini-review. *Human Reproduction*, 20, 3271-3283.
- NAZ, R. K. & TALWAR, G. P. 1981. Immunological Sterilization of Male Dogs by Bcg. *International Journal of Andrology*, 4, 111-128.
- NELSON, S. M., MAHMOUD, T., BEAUX, M., SHAPIRO, P., MCILROY, D. N. & STENKAMP, D. L. 2010. Toxic and teratogenic silica nanowires in developing vertebrate embryos. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 6, 93-102.
- NEUMANN, F., DIALLO, F. A., HASAN, S. H., SCHENCK, B. & TRAORE, I. 1976. The influence of pharmaceutical compounds on male fertility. *Andrologia*, 8, 203-35.
- NOORI, A., PARIVAR, K., MODARESI, M., MESSRIPOUR, M., YOUSEFI, M. H. & AMIRI, G. R. 2011. Effect of magnetic iron oxide nanoparticles on pregnancy and testicular development of mice. *African Journal of Biotechnology*, 10, 1221-1227.
- O'DONNELL, L., NICHOLLS, P. K., O'BRYAN, M. K., MCLACHLAN, R. I. & STANTON, P. G. 2011. Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis*, 1, 14-35.

- OBERDORSTER, G., OBERDORSTER, E. & OBERDORSTER, J. 2005. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113, 823-839.
- 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, V. A. 2013. Intratesticular injection of a zinc-based solution for contraception of domestic cats: A randomized clinical trial of efficacy and safety. *Veterinary Journal*, 197, 307-310.
- OLIVEIRA, E. C. S., MOURA, M. R. P., DE SA, M. J. C., SILVA, V. A., KASTELIC, J. P., DOUGLAS, R. H. & MARQUES, A. P. 2012. Permanent contraception of dogs induced with intratesticular injection of a Zinc Gluconate-based solution. *Theriogenology*, 77, 1056-1063.
- PAGE, S. T., AMORY, J. K. & BREMNER, W. J. 2008. Advances in male contraception. *Endocrine Reviews*, 29, 465-493.
- PALMER, A. K. 1976. Assessment of Current Test Procedures. *Environmental Health Perspectives*, 18, 97-104.
- PANKHURST, Q. A., CONNOLLY, J., JONES, S. K. & DOBSON, J. 2003. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 36, R167-R181.
- PARK, J. H., SARAVANAKUMAR, G., KIM, K. & KWON, I. C. 2010. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 28-41.
- PINEDA, M., REIMERS, T., FAULKNER, L., HOPWOOD, M. & SEIDEL JR, G. 1977. Azoospermia in dogs induced by injection of sclerosing agents into the caudae of the epididymides. *American journal of veterinary research*, 38, 831-838.
- PINEDA, M. H. & DOOLEY, M. P. 1984. Surgical and chemical vasectomy in the cat. *Am J Vet Res*, 45, 291-300.
- PORTILHO, F. A., ESTEVANATO, L. L. C., MIRANDA-VILELA, A. L., ALMEIDA-SANTOS, M. F. M., DE OLIVEIRA-CAVALCANTI, C. E., LACAVAL, B. M., SIMIONI, A. R., TEDESCO, A. C., MORAIS, P. C. & LACAVAL, Z. G. M. 2011. Investigation of a magnetohyperthermia system efficacy. *Journal of Applied Physics*, 109.
- PURSWELL, B. J. & KOLSTER, K. A. 2006. Immunocontraception in companion animals. *Theriogenology*, 66, 510-513.
- QI, W., BI, J., ZHANG, X., WANG, J., WANG, J., LIU, P., LI, Z. & WU, W. 2014. Damaging effects of multi-walled carbon nanotubes on pregnant mice with different pregnancy times. *Sci Rep*, 4, 4352.
- RASHAD, M. M., MOHAMED, R. M. & EL-SHALL, H. 2008. Magnetic properties of nanocrystalline Sm-substituted CoFe₂O₄ synthesized by citrate precursor method. *Journal of Materials Processing Technology*, 198, 139-146.
- RIESENBECK, A., KLEIN, R. & HOFFMANN, B. 2002. Downregulation, a new and reversible approach to eliminate testicular function in the dog. *Praktische Tierarzt*, 83, 512-520.
- ROBERTS, W. W., CHAN, D. Y., FRIED, N. M., WRIGHT, E. J., NICOL, T., JARRETT, T. W., KAVOUSSI, L. R. & SOLOMON, S. B. 2002a. High intensity focused ultrasound ablation of the vas deferens in a canine model. *J Urol*, 167, 2613-7.
- ROBERTS, W. W., WRIGHT, E. J., FRIED, N. M., NICOL, T., JARRETT, T. W., KAVOUSSI, L. R. & SOLOMON, S. B. 2002b. High-intensity focused ultrasound ablation of the epididymis in a canine model: a potential alternative to vasectomy. *J Endourol*, 16, 621-5.
- ROBERTSON, S. A. 2008. A review of feral cat control. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10, 366-375.
- ROSZEK, B., JONG, W. H. D. & GEERTSMA, R. E. 2005. Nanotechnology in medical applications: state-of-the-art in materials and devices. *The National Institute for Public Health and the Environment*. Bilthoven, The Netherlands.

- SADHUKHA, T., WIEDMANN, T. S. & PANYAM, J. 2013. Inhalable magnetic nanoparticles for targeted hyperthermia in lung cancer therapy. *Biomaterials*, 34, 5163-71.
- SAILER, B. L., SARKAR, L. J., BJORDAHL, J. A., JOST, L. K. & EVENSON, D. P. 1997. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *Journal of Andrology*, 18, 294-301.
- SETCHELL, B. P. 1998. The Parkes Lecture Heat and the testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 114, 179-194.
- SETCHELL, B. P. 2006. The effects of heat on the testes of mammals. *Animal Reproduction*, 3, 81-91.
- SHAFIK, A. 1994. Prolactin Injection, a New Contraceptive Method - Experimental-Study. *Contraception*, 50, 191-199.
- SINGH, N., JENKINS, G. J., ASADI, R. & DOAK, S. H. 2010. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Rev*, 1.
- SUN, J., ZHANG, Q., WANG, Z. & YAN, B. 2013. Effects of nanotoxicity on female reproductivity and fetal development in animal models. *Int J Mol Sci*, 14, 9319-37.
- TAKEDA, K., SUZUKI, K. I., ISHIHARA, A., KUBO-IRIE, M., FUJIMOTO, R., TABATA, M., OSHIO, S., NIHEI, Y., IHARA, T. & SUGAMATA, M. 2009. Nanoparticles Transferred from Pregnant Mice to Their Offspring Can Damage the Genital and Cranial Nerve Systems. *Journal of Health Science*, 55, 95-102.
- TALWAR, G. P. & NAZ, R. K. 1981. Immunological Control of Male-Fertility. *Archives of Andrology*, 7, 177-185.
- TALWAR, G. P., NAZ, R. K., DAS, C. & DAS, R. P. 1979. Practicable Immunological Approach to Block Spermatogenesis without Loss of Androgens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 5882-5885.
- TEPSUMETHANON, V., WILDE, H. & HEMACHUDHA, T. 2005. Intratesticular injection of a balanced zinc solution for permanent sterilization of dogs. *J Med Assoc Thai*, 88, 686-9.
- TRAN, N. & WEBSTER, T. J. 2010. Magnetic nanoparticles: biomedical applications and challenges. *Journal of Materials Chemistry*, 20, 8760-8767.
- TRIGG, T. E., DOYLE, A. G., WALSH, J. D. & SWANGCHAN-UTHAI, T. 2006. A review of advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. *Theriogenology*, 66, 1507-1512.
- TRIGG, T. E., WRIGHT, P. J., ARMOUR, A. F., WILLIAMSON, P. E., JUNAIDI, A., MARTIN, G. B., DOYLE, A. G. & WALSH, J. 2001. Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. *Advances in Reproduction in Dogs, Cats and Exotic Carnivores*, 255-261.
- VERMA, A., GOEL, T. C., MENDIRATTA, R. G. & KISHAN, P. 2000. Magnetic properties of nickel-zinc ferrites prepared by the citrate precursor method. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 208, 13-19.
- VICKERY, B. H., MCRAE, G. I., BRIONES, W. V., ROBERTS, B. B., WORDEN, A. C., SCHANBACHER, B. D. & FALVO, R. E. 1985. Dose-Response Studies on Male Reproductive Parameters in Dogs with Nafarelin Acetate, a Potent Lhrh Agonist. *Journal of Andrology*, 6, 53-60.
- WANG, C., MCDONALD, V., LEUNG, A., SUPERLANO, L., BERMAN, N., HULL, L. & SWERDLOFF, R. S. 1997. Effect of increased scrotal temperature on sperm production in normal men. *Fertility and Sterility*, 68, 334-339.
- WANG, J., CHEN, Y., CHEN, B. A., DING, J. H., XIA, G. H., GAO, C., CHENG, J. A., JIN, N., ZHOU, Y., LI, X. M., TANG, M. & WANG, X. M. 2010. Pharmacokinetic parameters and tissue distribution of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles in mice. *International Journal of Nanomedicine*, 5, 861-866.
- WIWANITKIT, V., SEREEMASPUN, A. & ROJANATHANES, R. 2009. Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: the first world report. *Fertility and Sterility*, 91, E7-E8.

YOSHIDA, S., HIYOSHI, K., ICHINOSE, T., TAKANO, H., OSHIO, S., SUGAWARA, I., TAKEDA, K. & SHIBAMOTO, T. 2009. Effect of nanoparticles on the male reproductive system of mice. *International Journal of Andrology*, 32, 337-342.

Capítulo 2 - Avaliação Dos Efeitos De Nanopartículas De Maghemita

Recobertas Com Citrato Na Reprodução De Ratos Wistar Machos

1. Introdução

A expansão da nanotecnologia aumentou o uso de nanomateriais nos procedimentos e pesquisas biomédicas e, conseqüentemente, a sua interação com organismos vivos. Modelos *in vivo* e *in vitro* já foram propostos para o estudo da interação de nanomateriais com os sistemas biológicos. Estudos *in vitro* são rápidos, eficientes e de baixo custo. Entretanto, os resultados não fornecem informações completas sobre a distribuição nos tecidos, acúmulo nos órgãos de destino ou difusão pelas barreiras biológicas, como a barreira hematoencefálica e a barreira hematotesticular. (Giannaccini et al., 2014).

Nanopartículas de óxido de ferro são conhecidas pelo seu efeito não tóxico e eventualmente se quebram para formar a hemoglobina circulante (Gupta and Gupta, 2005). A nanopartícula de maghemita funcionalizada com citrato (Magh-citrato) é uma nanopartícula de óxido férrico com uma cobertura orgânica testada por Brugin (2007). Nos seus testes, Brugin verificou que a amostra de Magh-citrato tinha várias características indicando a sua biocompatibilidade, como a ausência de mudanças na viabilidade dos macrófagos peritoneais e nenhuma geno/citotoxicidade nos eritrócitos da medula óssea de camundongos. Durante o intervalo experimental, não ocorreram mortes dos animais tratados com a Magh-citrato

Alguns efeitos deletérios na espermatogênese e alterações histopatológicas nos testículos já foram reportadas em estudos envolvendo nanopartículas de prata (Gromadzka-Ostrowska et al., 2012, Garcia et al., 2014). Entretanto, informações sobre os efeitos tóxicos *in vivo* de nanopartículas metálicas no aparelho reprodutor masculino e na fisiologia espermática ainda são escassos. Especialmente para nanopartículas magnéticas, não há informação disponível sobre o potencial efeito reprodutivo.

Os objetivos desse trabalho foram:

Avaliar a capacidade de NPMs de maghemita recoberta com citrato administradas de forma sistêmica em ultrapassar a barreira hemato-testicular;

Avaliar os efeitos da administração sistêmica de NPMs de maghemita recoberta com citrato nos túbulos seminíferos;

Avaliar os efeitos da administração sistêmica de NPMs de maghemita recoberta com citrato sobre a produção e a qualidade espermática

2. Material E Métodos

2.1. Preparação E Caracterização Das Partículas:

Um fluido magnético das NPMs de maghemita recoberta com citrato foi preparado no Laboratório da Professora Emilia Celma de Oliveira Lima no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. O fluido é constituído por nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$), estabilizadas pela cobertura de citrato, com diâmetro médio de 10 nm. A concentração de Fe no fluido foi diluída até

atingirmos uma concentração de 5,0 mg/mL e a quantidade de partículas seja de $2,6 \times 10^{15}$. As nanopartículas magnéticas (NPMs) serão previamente caracterizadas pelas técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Zeta Sizer.

2.2. Microscopia Eletrônica De Transmissão (MET)

Para Microscopia Eletrônica de Transmissão, 5 μ L da solução contendo as NPM-citrato em telinhas de cobre de 300 mesh previamente cobertas com resina Formvar® e deixadas secar overnight dentro de placas de Petri. Essas telas foram posteriormente analisadas e fotografadas com aumentos de 100.000x e 200.000x. A partir da aquisição das imagens as NPMs foram mensuradas pelo programa Image Pro-Plus 5.1® e ajustadas por distribuição log-normal para obtenção do diâmetro modal das amostras de FM-Citrato.

2.3. Zeta Sizer E Potencial Zeta

As medidas de distribuição de tamanho das nanopartículas do fluido magnético e a carga de superfície existente entre a superfície das partículas e o dispersante (Potencial Zeta) foram feitas utilizando o ZetaSizer Nano-ZS90/Malvern, pela medida do movimento Browniano das partículas suspensa em água e PBS por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e pela movimentação das partículas quando aplicada um campo elétrico (NanoSight Malvern, Worcestershire WR14 1XZ, United Kingdom).

2.4. Animais:

Ratos Wistar machos já com maturidade reprodutiva (8-14 semanas) produzidos e mantidos no Biotério do IB com água e ração *ad libitum*.

O uso dos animais foi autorizado sob os protocolos da CEUA-UnB N^{os} 2468/2013 e 138067/2013.

2.5. Procedimento Experimental

Efeito das NPMs de citrato no sistema reprodutor do macho

Foram utilizados 30 ratos machos, divididos em 6 grupos (5 animais por grupo), a saber: 7, 21, 35, 49 e 70 dias pós injeção das NPMs de citrato administradas por via endovenosa, e Grupo Controle (injeção de solução salina).

Os machos receberam uma dose única do fluido magnético na concentração de 5,0 mg de Fe/ml via endovenosa num volume de 100µl (Chaves et al., 2002), enquanto o grupo controle recebeu uma injeção de mesmo volume de solução salina também por via endovenosa, no dia 1 do experimento. Os animais foram observados diariamente durante a primeira semana em relação ao comportamento para verificarmos se algum indício de dor ou desconforto seria apresentado, ou alterações de estado corporal, consumo de alimentos ou aparência geral alterada. Na sequência dos grupos, ao chegar em cada um dos dias determinados (7, 21, 35, 49 e 70 pós injeção) os animais de cada grupo foram eutanasiados por overdose de barbitúricos e tiveram seus testículos e epidídimos retirados. Para o grupo controle, os animais foram eutanasiados no dia 7 após a injeção. Imediatamente após a eutanásia, um fragmento da cauda do epidídimo esquerdo de aproximadamente 1mm³ foi dissecado e os espermatozoides contidos nesse fragmento foram colocados em meio de cultivo (M199) aquecido a 37^o C e avaliados quanto a sua vitalidade e motilidade progressiva em microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse Ci-S). O testículo direito foi inteiramente fixado para microscopia de luz.

Os espermatozoides foram avaliados em relação a sua vitalidade (vivos ou mortos) e quanto a sua motilidade progressiva. Para classificação de motilidade foram utilizados graus de 1 a 3, onde o Grau 1 representava um espermatozoide com motilidade alta (atravessando a lâmina rapidamente e em trajetória reta e), o Grau 2 para motilidade média (não conseguia atravessar a lâmina, mas apresentava boa movimentação e vigor na cauda) e Grau 3 onde o espermatozóide não conseguia se deslocar (mas apresentava movimento de cauda)(Seed et al., 1996).

Para a microscopia de luz os testículos foram fixados em solução de Bouin por 5 horas e depois lavados em álcool 50% (3-5 banhos de uma hora) e depois colocados em álcool 70% e submetidos aos processos de desidratação (soluções com concentrações crescentes de álcool, 80%, 90% e 100%), diafanização (em xilol) e inclusão em parafina (Histosec, Merck). Foram feitos cortes seriados de espessura de 5 μ m e os cortes foram montados em lâminas e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas foram avaliadas em microscópio de luz (Nikon Eclipse Ci-S) e 10 túbulos seminíferos de cada animal tiveram suas medições realizadas (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). As medidas aferidas foram diâmetro menor do túbulo, altura do epitélio seminífero e diâmetro menor do lúmen (Figura 2.1).

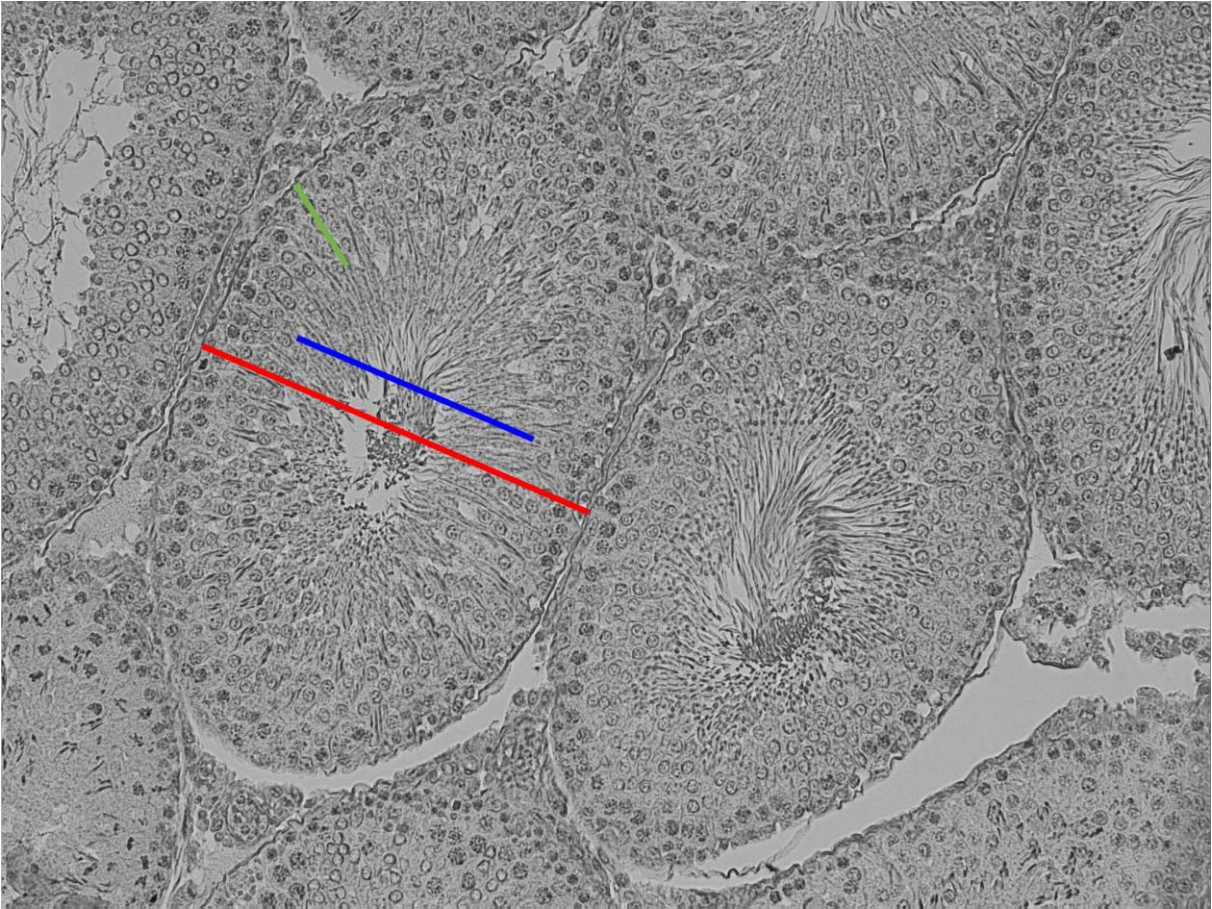


Figura 2.1. Imagem representativa das medidas feitas dos túbulos seminíferos: Vermelho= diâmetro menor do túbulo, Azul= Diâmetro menor do Lúmen, e Verde= altura do epitélio seminífero.

Uma lâmina de cada grupo foi desparafinizada e rehidratada, seca ao ponto crítico, recobertas com ouro e levada ao microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM-7001F) para utilização do sistema EDS e verificação de presença do componente ferro (Fe) nos cortes.

2.6. Análise Estatística

As médias das medidas aferidas para os túbulos seminíferos e para a motilidade dos espermatozóides foi calculada e os dados foram analisados

no software BIOESTAT 5.0 onde foi utilizada a ANOVA e o Teste de Tukey. Foi considerado o nível mínimo de 1% de significância.

3. Resultados

3.1. Caracterização Da Nanopartícula

Na microscopia eletrônica de transmissão (Figura 2.2) as NPMs de citrato em geral apresentaram morfologia esférica e diâmetro médio de 10nm.

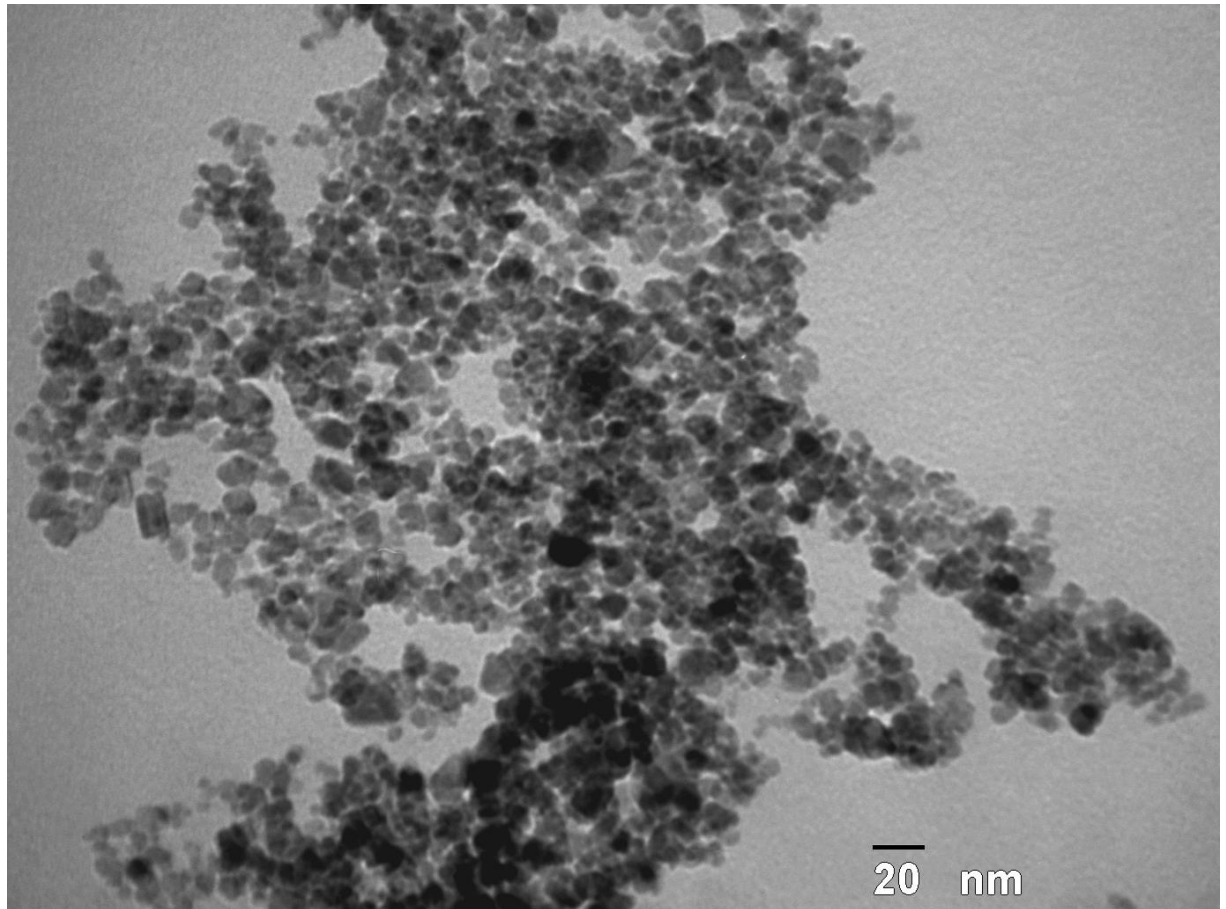


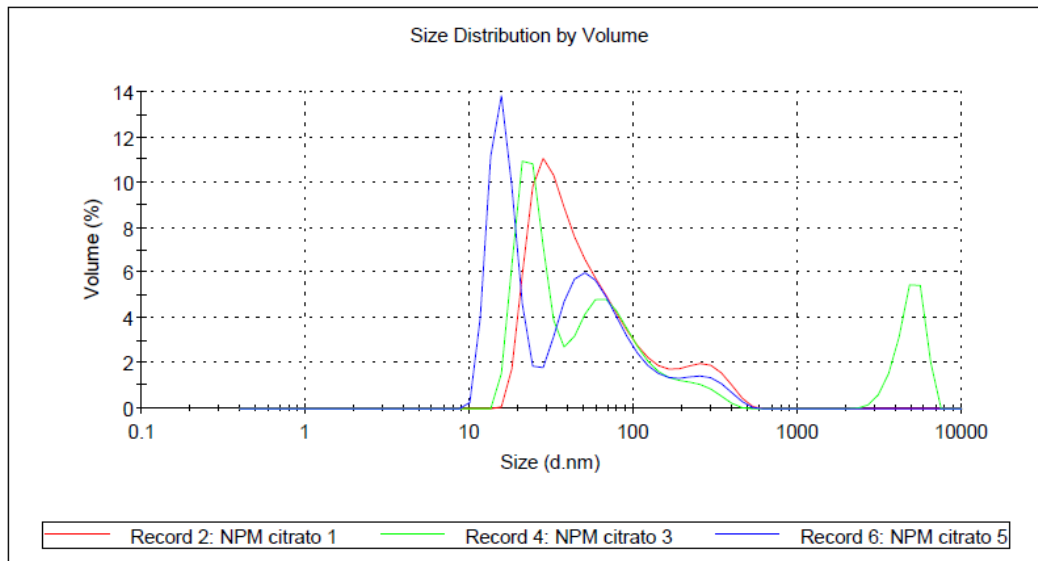
Figura 2.2: Micrografia eletrônica das nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato.

O diâmetro hidrodinâmico médio determinado pelo cálculo do espalhamento dinâmico da luz no Zeta Sizer, o índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta das nanopartículas de maghemita recobertas com citrato foi de 111,3 nm, 0,235 e -36,0mV, respectivamente (Figura 2.3).

Results

| | Size (d.n... | % Volume | Width (d.n... |
|--------------------------------|----------------------|----------|---------------|
| Z-Average (d.nm): 111,3 | Peak 1: 16,67 | 45,9 | 3,837 |
| Pdl: 0,235 | Peak 2: 70,21 | 46,5 | 38,00 |
| Intercept: 0,939 | Peak 3: 280,5 | 7,5 | 76,35 |

Result quality **Good**



| | Mean (mV) | Area (%) | Width (mV) |
|------------------------------------|----------------------|----------|------------|
| Zeta Potential (mV): -36,0 | Peak 1: -38,3 | 90,5 | 12,1 |
| Zeta Deviation (mV): 14,2 | Peak 2: -9,70 | 9,5 | 4,92 |
| Conductivity (mS/cm): 0,197 | Peak 3: 0,00 | 0,0 | 0,00 |

Result quality See result quality report

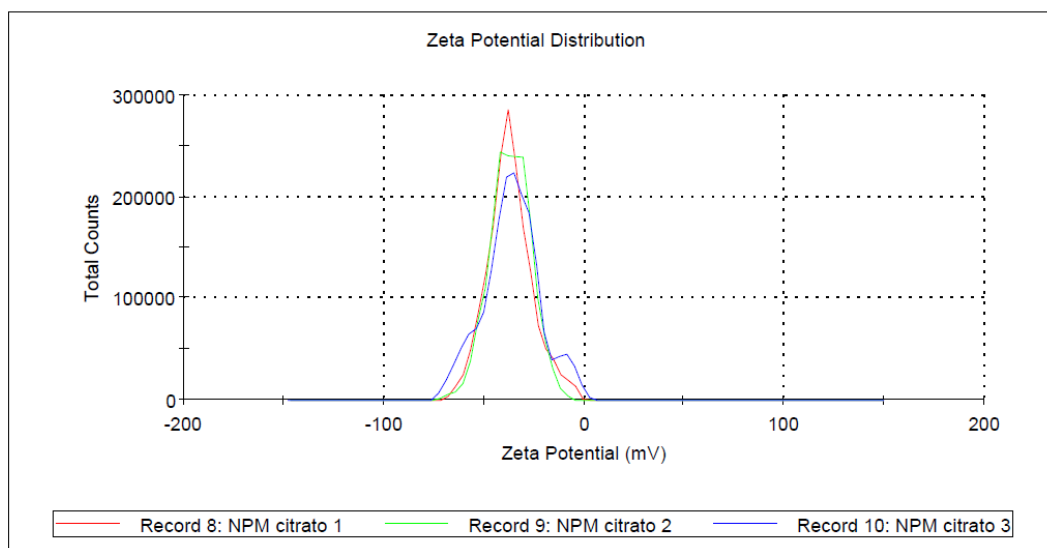


Figura 2.3: Resultados da avaliação de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas de Magh-citrato

3.2. Avaliação Histológica Dos Testículos:

Os testículos dos animais que receberam injeção de NPMs Citrato não apresentaram alterações morfológicas em nenhum dos dias avaliados quando comparadas ao controle. A Figura 2.4 mostra imagens de túbulos seminíferos dos diferentes grupos analisados. Pode-se observar que os túbulos apresentam semelhança estrutural, e não há nenhum sinal que possam ter sofrido efeitos deletérios pela aplicação do fluido. Espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozóides puderam ser observados em todos os animais de todos os grupos avaliados.

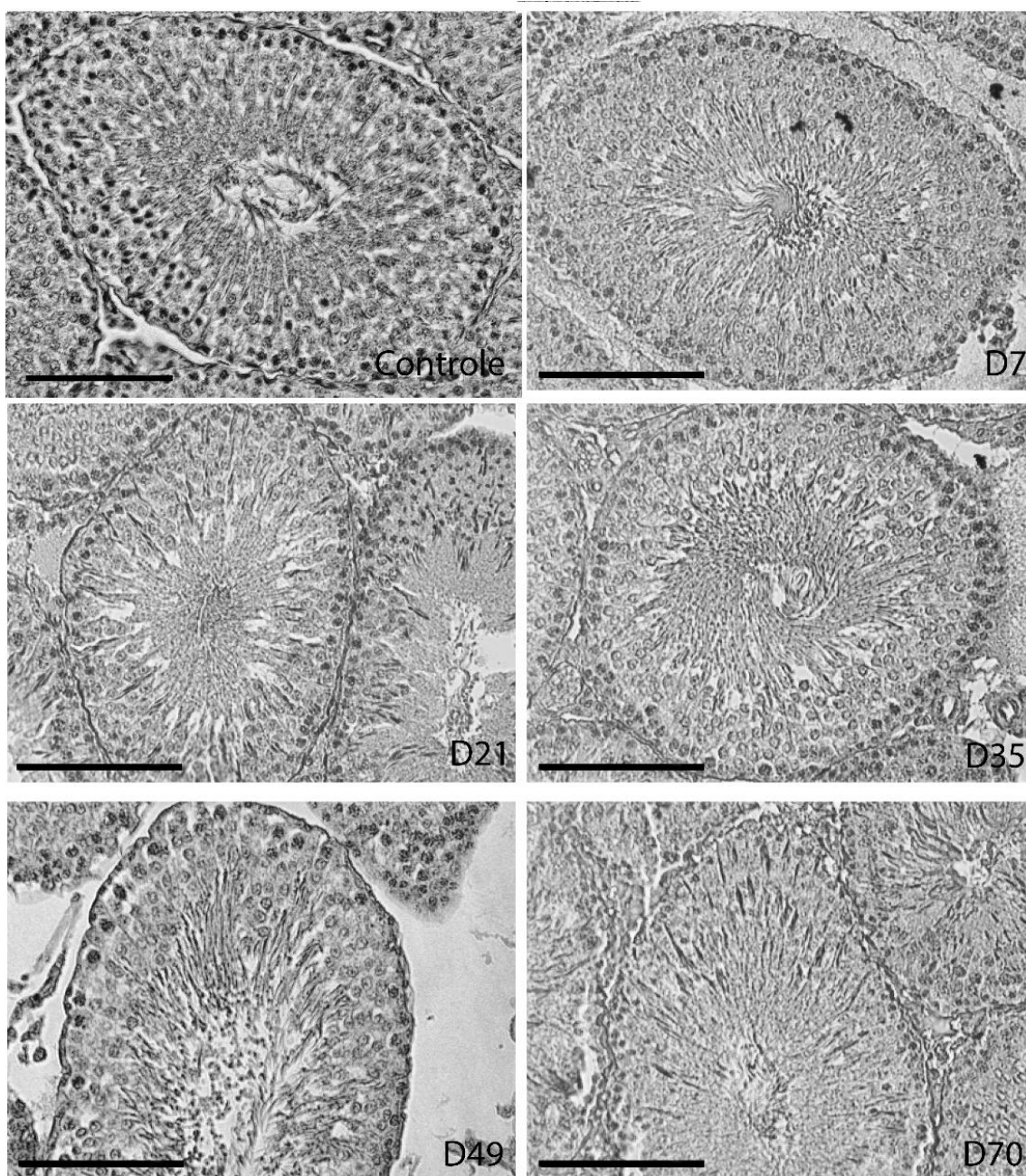


Figura 2.4: Imagens representativas dos túbulos seminíferos dos animais do grupo controle e após 7, 21, 35, 49 e 70 dias da administração da nanopartícula. Barras = 100 μ m

3.3. Morfometria Dos Túbulos Seminíferos

As medidas dos túbulos seminíferos são mostradas na Figura 2.5. Diferenças estatísticas foram encontradas nos diâmetros dos túbulos e lúmen e também no

epitélio seminífero. Os grupos D7, D21 e D35 tiveram os túbulos e apresentaram a altura do epitélio seminífero significativamente ($P < 0,01$) menores, mas apresentaram um diâmetro do lúmen maior que os outros grupos. Embora essas diferenças apresentem significância estatística, nenhum dos grupos apresentou túbulos seminíferos de tamanho ou proporções que sugerissem alteração significativa na biologia do órgão, como pode ser visto em um esquema feito (Figura 2.6) utilizando proporcionalmente as médias das medidas dos grupos. Além disso, não foi observado nenhuma alteração morfológica que remetesse a um efeito deletério do tratamento na espermatogênese, visto que grande parte dos túbulos avaliados estavam com espermatozoides em seu lúmen (Figura 2.4).

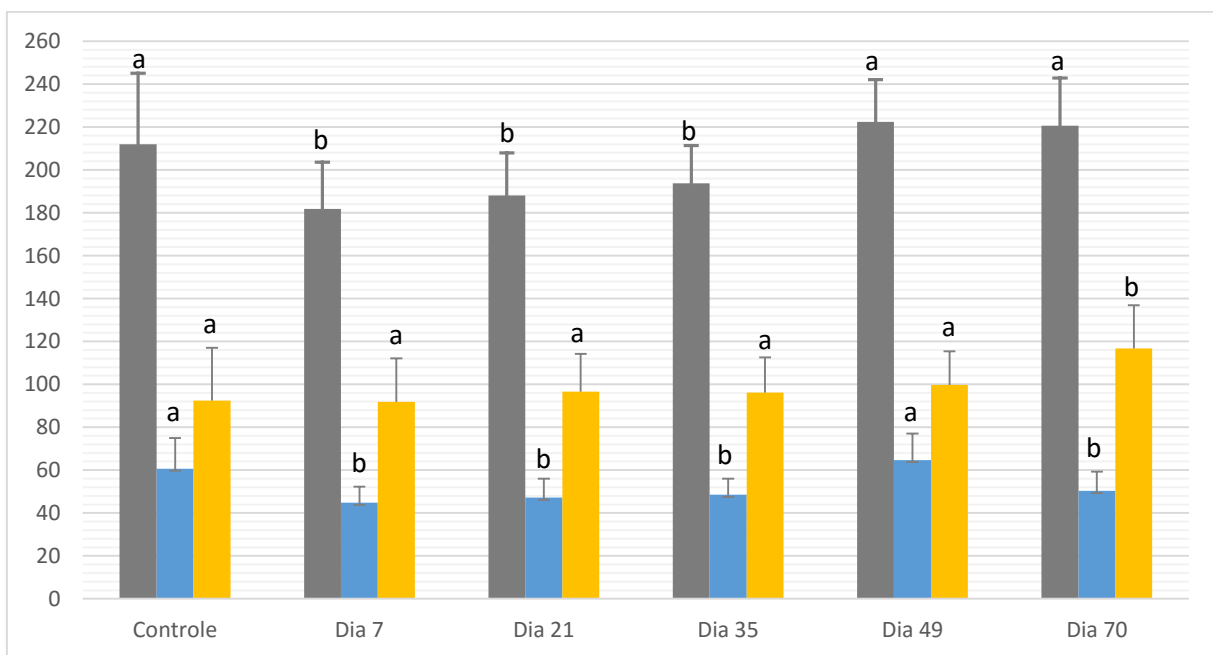


Figura 2.5: Médias das medidas (μm) do diâmetro externo do túbulo (verde), altura do epitélio seminífero (azul) e diâmetro do lúmen (amarelo).

a, b: letras diferentes nas barras de mesma cor indicam diferença estatística ($p < 0,01$)

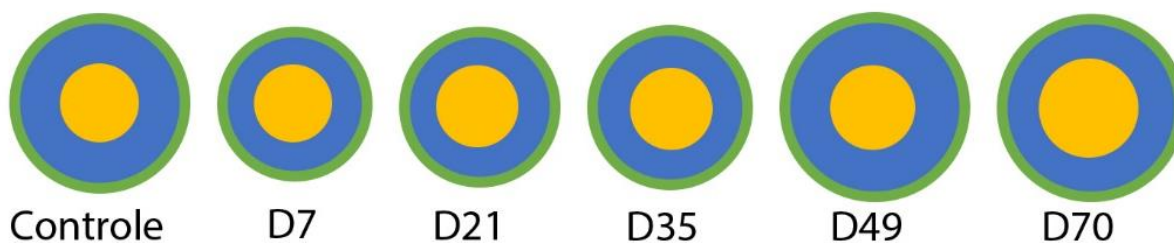


Figura 2.6: Representação proporcional da média das medidas dos túbulos seminíferos nos diferentes grupos. Limite externo do túbulo seminífero (verde), epitélio seminífero (azul) e lúmen (amarelo)

3.4. Avaliação Dos Espermatozóides

A Tabela 1 mostra as porcentagens de espermatozoides vivos em cada grupo, bem como em cada grau de motilidade (média \pm DP). Para essa classificação não foi encontrada diferença estatística entre os grupos.

Tabela 1: Média da vitalidade e motilidade progressiva dos espermatozoides (%)

| | Vitalidade (% Vivos) | Grau 1 | Grau 2 | Grau 3 |
|----------|-------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| Controle | 85.00 \pm 10.00 | 71.00 \pm 7.42 | 17.00 \pm 4.47 | 12.00 \pm 5.70 |
| D7 | 91.00 \pm 4.18 | 82.00 \pm 4.47 | 10.00 \pm 3.53 | 8.00 \pm 2.74 |
| D21 | 85.00 \pm 5.77 | 75.00 \pm 5.77 | 15.00 \pm 5.77 | 10.00 \pm 0 |
| D35 | 87.00 \pm 6.71 | 82.00 \pm 8.37 | 8.00 \pm 5.70 | 10.00 \pm 6.12 |
| D49 | 87.00 \pm 4.47 | 80.00 \pm 8.16 | 12.5.00 \pm 6.45 | 7.5.00 \pm 2.89 |
| D70 | 88.00 \pm 5.70 | 76.00 \pm 11.40 | 12.00 \pm 10.37 | 12.00 \pm 5.70 |

Grau 1 representa um espermatozoide com motilidade alta (atravessando a lâmina rapidamente e em trajetória reta e), Grau 2 um espermatozoide com motilidade média (não conseguia atravessar a lâmina, mas apresentava boa movimentação e vigor na cauda) e Grau 3 um espermatozoide que não conseguia se deslocar, mas apresentava movimento de cauda..

3.5. Microscopia Eletrônica De Varredura

Usando o método EDS, foi possível constatar que o elemento ferro foi pouco detectado e somente em algumas amostras, enquanto vários outros elementos

puderam ser detectados, incluindo carbono, nitrogênio, oxigênio, sódio, potássio, magnésio, cálcio e etc. A Figura 2.7 mostra a região avaliada pelo EDS e as distribuições de ferro e carbono, respectivamente. Os elementos identificados em maior quantidade em todos os grupos foram carbono (~27%), nitrogênio (~8%) e oxigênio (~40%), e vários outros elementos também foram identificados em menor quantidade. O elemento ferro (Fe) só foi encontrado nas amostras de testículo em quantidades pequenas, variando de 0 a 0,46% dos elementos avaliados. Um demonstrativo geral de todos os elementos detectados nos cortes de testículo nos diferentes dias avaliados é apresentado no Anexo 1.

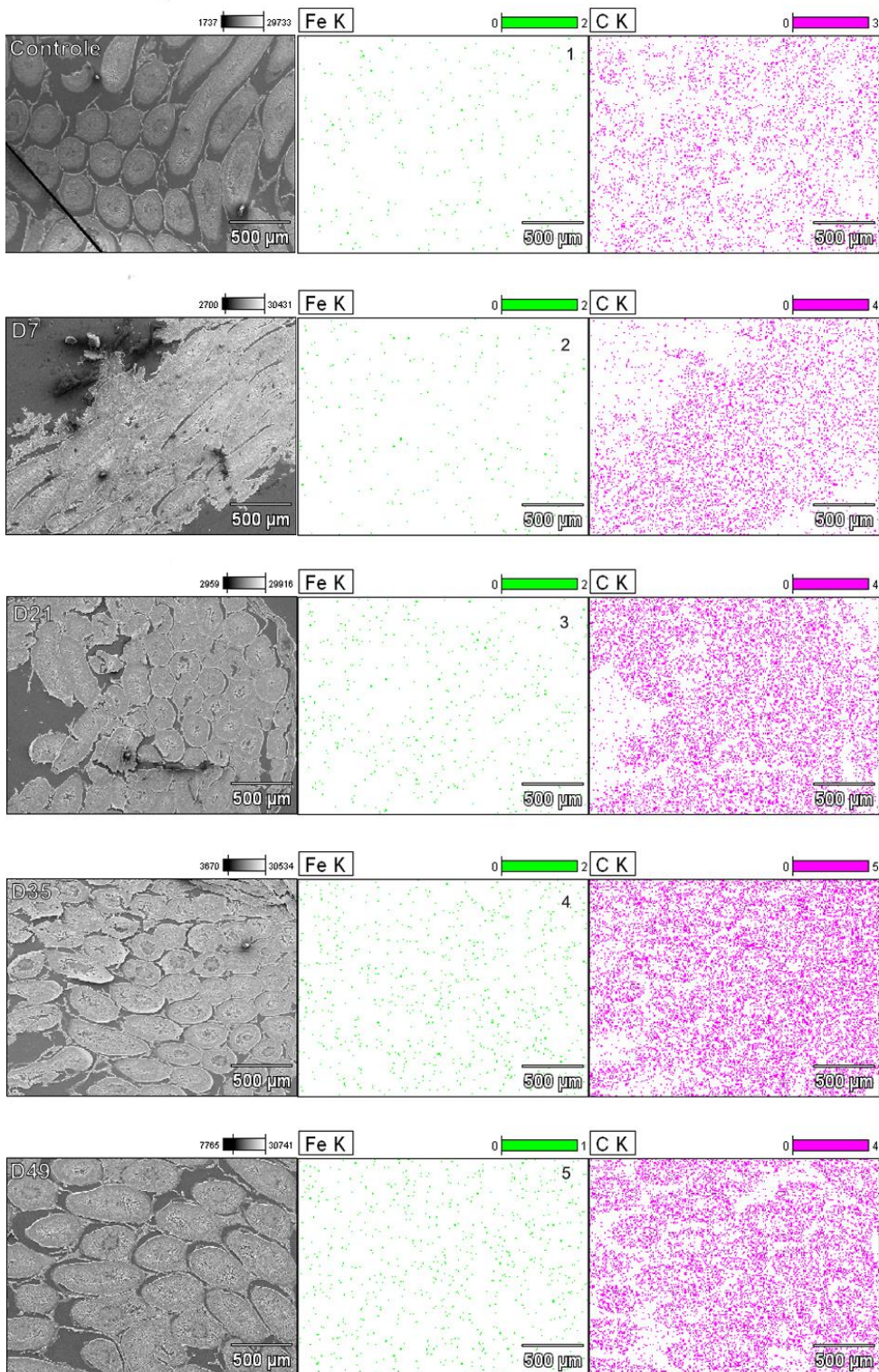


Figura 2.7. Distribuição de ferro e carbono em amostras de testículo, avaliadas pelo método EDS. A primeira coluna mostra a área dos testículos que foi escaneada pelo microscópio eletrônico de varredura; a segunda coluna mostra a detecção de Ferro e a terceira coluna mostra a detecção de carbono como um parâmetro de comparação.

4. Discussão

Nosso trabalho foi o primeiro com o enfoque no efeito da Magh-citrato nos testículos. A toxicidade reprodutiva de nanomateriais é uma parte importante para o estudo da nanotoxicologia (Gromadzka-Ostrowska et al., 2012, Hougaard et al., 2015). Estudos nessa área estão em expansão (Garcia et al., 2014). O conhecimento sobre a toxicidade no sistema reprodutor masculino é importante para prevenir danos que podem levar a infertilidade.

A análise morfométrica mostrou diferenças significativas entre alguns grupos, mas, essas diferenças não apresentaram um efeito biológico *per se*. Nós podemos ver uma redução do diâmetro do túbulo nos grupos D7, D21 e D35, retornando ao diâmetro normal nos dois últimos tratamentos. Embora essa alteração tenha sido observada, a morfologia dos túbulos permaneceu normal quando comparada ao grupo controle, e fomos capazes de identificar espermatozoides e as células germinativas em todos os tratamentos. Diferentemente, Gromadzka-Ostrowska et al. (2012) verificaram que nanopartículas de prata causam mudanças significativas na morfologia testicular, com um aumento no diâmetro, área e circunferência dos túbulos seminíferos de animais tratados. Eles concluíram que mesmo pequenas quantidades de nanopartículas de prata tem um efeito tóxico nas células germinativas, causando danos nos túbulos. A concentração e a frequência da nossa injeção talvez possa ocasionar uma resposta rápida, mas sem prejudicar o sistema reprodutivo.

A Magh-citrato é uma formulação particularmente nova e tem sido estudada quanto a sua biocompatibilidade e possíveis efeitos adversos. Nós não observamos

nenhum dano nos testículos. Da mesma forma, Brugin (2007) testou a Magh-citrato *in vitro* e *in vivo* e concluiu que ela não causa mudanças histológicas significativas no fígado, pulmões, baço e rins, exceto pela presença de infiltrados celulares associados com aglomerados de partículas. A formulação de Magh-Citrato pode ser considerada segura e biocompatível, alguns estudos já a utilizaram até com grupo controle em um estudo (Carneiro et al., 2013)

Embora venha se confirmando que as nanopartículas magnéticas tenham uma baixa toxicidade (Lan e Yang, 2012) é importante ressaltar que a cobertura é fundamental para a biocompatibilidade. Em um estudo (Hanini et al., 2011) *in vivo*, a maghemita (Fe_2O_3) sem cobertura apresentou citotoxicidade nos animais. Isso também foi verificado com a magnetita (Fe_3O_4) sem cobertura (Parivar et al., 2016). A chance de uma nanopartícula magnética com cobertura apresentar toxicidade é bem menor (Valdiglesias et al., 2015). Em nosso estudo não foi verificado nenhum tipo de dano ocasionado pela partícula, provavelmente por conta da cobertura de citrato, como citado anteriormente.

Nós escolhemos a via endovenosa de administração da NP porque ela é a via mais relevante para simular a forma que ela será utilizada em um tratamento ou diagnóstico com humanos. Essa mesma via de administração foi utilizada também em ratos Wistar com nanopartículas de prata (Gromadzka-Ostrowska et al., 2012) e, diferente da nossa observação, os animais apresentaram danos nas células germinativas e diminuição no número espermático.

A análise pelo sistema EDS não identificou uma alta concentração de partículas de Fe em cortes do testículo dos animais de qualquer grupo, o que sugere que o Ferro

presente na nanopartícula administrado pela via endovenosa não ultrapassa a barreira hematotesticular. Usando várias concentrações de outras nanopartículas magnéticas (ferrita de cobalto – 50nm de diâmetro) injetados intraperitonealmente, Kim et al. (2006) verificaram a presença dessa nanopartícula em altas concentrações nos testículos, mas sem nenhum efeito adverso. Em nosso experimento também não identificamos nenhum efeito biológico deletério.

Analisando a motilidade e vitalidade dos espermatozoides coletados do epidídimo nós não verificamos diferenças entre os grupos em relação ao controle. Esses resultados indicam que a espermatogênese não foi afetada, pois, se isso tivesse ocorrido, em algum ponto do experimento, ela teria sido observada. A exposição dos gametas à nanopartículas pode prejudicar as funções reprodutivas ou levar à patologias as próximas gerações (Campagnolo et al., 2013).

5. Conclusão

Em conclusão, o uso de nanopartículas de maghemita funcionalizada com citrato administradas por via endovenosa em uma dose única não afeta o sistema reprodutor de ratos machos.

6. Referências Bibliográficas

- CAMPAGNOLO, L., MASSIMIANI, M., PALMIERI, G., BERNARDINI, R., SACCHETTI, C., BERGAMASCHI, A., VECCHIONE, L., MAGRINI, A., BOTTINI, M. & PIETROIUSTI, A. 2013. Biodistribution and toxicity of pegylated single wall carbon nanotubes in pregnant mice. *Part Fibre Toxicol*, 10, 21.
- CARNEIRO, M. L. B., PEIXOTO, R. C. A., JOANITTI, G. A., OLIVEIRA, R. G. S., TELLES, L. A. M., MIRANDA-VILELA, A. L., BOCCA, A. L., VIANNA, L. M. S., DA SILVA, I. C. R., DE SOUZA, A. R., LACAVALA, Z. G. M. & BAO, S. N. 2013. Antitumor effect and toxicity of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer. *Journal of Nanobiotechnology*, 11.

- CHAVES, S. B., LACAVAL, L. M., LACAVAL, Z. G. M., SILVA, O., PELEGRINI, F., BUSKE, N., GANSAU, C., MORAIS, P. C. & AZEVEDO, R. B. 2002. Light microscopy and magnetic resonance characterization of a DMSA-coated magnetic fluid in mice. *Ieee Transactions on Magnetics*, 38, 3231-3233.
- GARCIA, T. X., COSTA, G. M. J., FRANCA, L. R. & HOFMANN, M. C. 2014. Sub-acute intravenous administration of silver nanoparticles in male mice alters Leydig cell function and testosterone levels. *Reproductive Toxicology*, 45, 59-70.
- GIANNACCINI, M., CUSCHIERI, A., DENTE, L. & RAFFA, V. 2014. Non-mammalian vertebrate embryos as models in nanomedicine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*.
- GROMADZKA-OSTROWSKA, J., DZIENDZIKOWSKA, K., LANKOFF, A., DOBRZYNSKA, M., INSTANES, C., BRUNBORG, G., GAJOWIK, A., RADZIKOWSKA, J., WOJEWODZKA, M. & KRUSZEWSKI, M. 2012. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicology Letters*, 214, 251-258.
- HANINI, A., SCHMITT, A., KACEM, K., CHAU, F., AMMAR, S. & GAVARD, J. 2011. Evaluation of iron oxide nanoparticle biocompatibility. *Int J Nanomedicine*, 6, 787-94.
- LAN, Z. & YANG, W. X. 2012. Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood-testis barrier. *Nanomedicine*, 7, 579-596.
- PARIVAR, K., MALEKVAND FARD, F., BAYAT, M., ALAVIAN, S. M. & MOTAVAF, M. 2016. Evaluation of Iron Oxide Nanoparticles Toxicity on Liver Cells of BALB/c Rats. *Iran Red Crescent Med J*, 18, e28939.
- 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, L. D. 1996. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: A consensus report. *Reproductive Toxicology*, 10, 237-244.
- VALDIGLESIAS, V., KILIC, G., COSTA, C., FERNANDEZ-BERTOLEZ, N., PASARO, E., TEIXEIRA, J. P. & LAFFON, B. 2015. Effects of iron oxide nanoparticles: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Environ Mol Mutagen*, 56, 125-48.

Capítulo 3 – Avaliação da Eficiência na Geração de Calor de Duas Nanopartículas

1. Introdução

A magneto-hipertermia é uma abordagem terapêutica particularmente atrativa para várias áreas médicas, e é baseada na indução de calor das NPMs sob a aplicação de um campo magnético alternado. (Kim et al., 2015). Essa técnica vem sendo desenvolvida principalmente na área de terapia anticancerígena para manter temperaturas na região tumoral entre 40-46 °C para inibir os processos de regulação e crescimento das células tumorais (Roti Roti, 2008).

O experimento do Capítulo 2 identificou que a nanopartícula de maghemita recoberta com citrato não causou nenhum dano aos animais quando aplicada pela via endovenosa, o que indicou que a partícula poderia ser um bom candidato ao uso na magneto-hipertermia. Fez-se necessário então, um estudo para identificar se estas nanopartículas conseguiriam chegar a temperatura desejada quando submetidas a um campo magnético. O objetivo foi quantificar a geração de calor das nanopartículas de maghemita recobertas com citrato quando submetidas a um campo magnético alternado. Foi utilizada uma nanopartícula de ferrita de manganês, sabidamente eficiente na geração de calor em procedimentos de magneto-hipertermia (Branquinho et al., 2013), para efeito de comparação.

2. Material e Métodos

2.1. Síntese e caracterização

Foram utilizadas dois fluidos magnéticos de nanopartículas: Fe_2O_3 -citrato (Magh-cit) e MnFe_2O_4 -citrato (MnFerrit-cit).

A Magh-cit foi produzida por Emília Celma Oliveira Lima, do IQ/UFG, e consiste de nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$), estabilizadas pela cobertura de citrato, com diâmetro médio de 10 nm. Caracterizações prévias indicaram espalhamento dinâmico da luz no Zeta Sizer, o índice de polidispersão (Pdl) e o potencial zeta das nanopartículas de Magh-cit foi de 111,3 nm, 0,235 e -36,0mV, respectivamente, além de uma concentração de 8 mg de Fe/mL (Equivalente a concentração de 23 mg de Fe_2O_3 /mL).

A MnFerrit-cit foi sintetizada por Nicholas Zufelato, do IF/UFG, pelo método de coprecipitação, passivada e recoberta com citrato como relatado por (Branquinho et al., 2013), com diâmetro médio de 11.36 nm o espalhamento dinâmico da luz no Zeta Sizer, o índice de polidispersão (Pdl) de MNFerrit-cit foi de 273nm e 0,210 respectivamente e uma concentração entre ~30-50 mg de MnFe_2O_4 /mL.

2.2. Preparação da amostra

Para utilizar concentrações semelhantes das duas amostras de fluidos magnéticos, a amostra MnFerrit-cit foi diluída 1:1 em solvente (água destilada). Aproximadamente 100 μL de cada uma das amostras foi levada ao porta-amostras do equipamento nanoTherics, modelo magneTherm (Nanotherics Ltd, Newcastle, UK), sem nenhuma outra preparação.

2.3. Protocolo experimental

Ambas as amostras foram expostas a campos alternados de diferentes intensidades ou amplitudes (100 Oe, 125 Oe e 150 Oe) com frequência de 331 kHz por aproximadamente dois minutos (120 s) e seu resfriamento foi acompanhado por mais um minuto (60 s). Um sensor de temperatura de fibra ótica foi mergulhado na amostra e outro foi colocado nas proximidades do porta-amostra para ser usado como referência com relação ao aquecimento do equipamento (bobina, isolamento, etc).

3. Resultados

Ambas as amostras responderam ao estímulo do campo alternado promovendo variação de temperatura. Entretanto a amostra Magh-cit apresentou uma eficiência de aquecimento baixa, com variações de temperatura menores que 3 °C no período estudado. As razões para esse comportamento estão relacionadas às propriedades físicas do próprio material, ao diâmetro pequeno e à baixa concentração. Por outro lado, a amostra de MnFerrit-cit promoveu aquecimentos de quase 40 °C no mesmo período. Os gráficos das curvas de aquecimento são mostrados nas Figura 3.1. A Tabela 3.1 mostra a eficiência de cada uma das amostras em termos do $SLP = (p_{total} / \varphi p_{fonte}) \Delta T / \Delta t$.

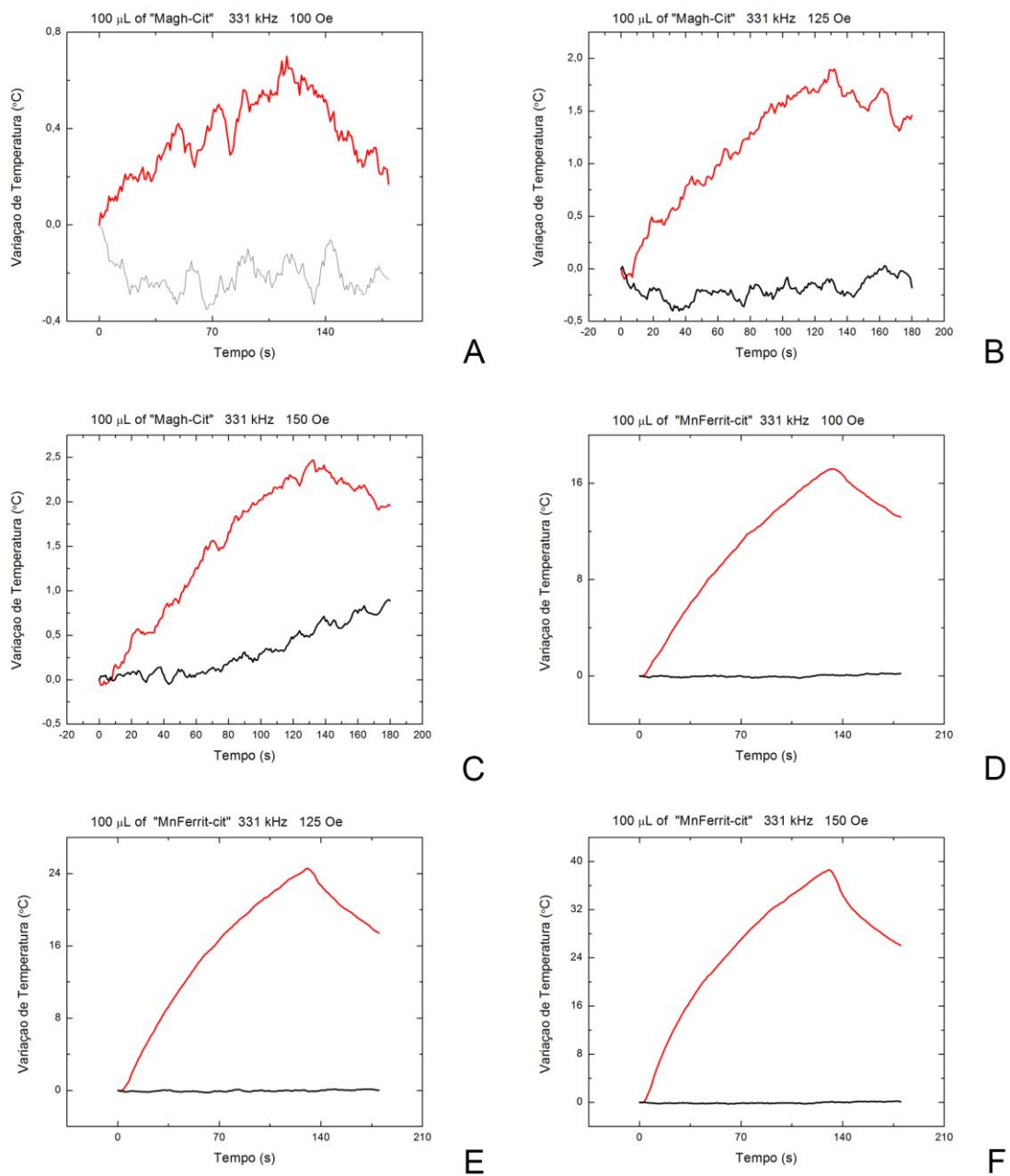


Figura 3.1. Gráficos das curvas de aquecimento para as nanopartículas Magh-cit (A-C) e MnFerrit-cit (D-F) submetidas aos campos alternados de 100 Oe, 125 Oe e 150 Oe.

Tabela 3.1. Demonstrativo do SLP (perda específica de potência) nos 3 diferentes campos.

| Campo (Oe) | SLP de Magh-cit (w/g) | SLP de MnFerrit-cit (w/g) |
|-------------------|------------------------------|----------------------------------|
| 100 | 0,74 | 25,5 |
| 125 | 2,73 | 37,1 |
| 150 | 4,00 | 76,2 |

4. Conclusão

A nanopartícula Magh-cit não foi capaz de gerar calor suficiente para ser usada em um procedimento de magneto-hipertermia nestas condições experimentais, enquanto a nanopartícula MnFerrit-cit gerou quantidade de calor suficiente, esse fato pode se confirmar pela medição da eficiência de geração de calor (SLP) que em todos os campos alternados se mostraram bem maiores para a MnFerrit-cit, podendo então, ser utilizada em magneto-hipertermia.

5. Referências Bibliográficas

- BRANQUINHO, L. C., CARRIAO, M. S., COSTA, A. S., ZUFELATO, N., SOUSA, M. H., MIOTTO, R., IVKOV, R. & BAKUZIS, A. F. 2013. Effect of magnetic dipolar interactions on nanoparticle heating efficiency: implications for cancer hyperthermia. *Sci Rep*, 3, 2887.
- KIM, H. C., KIM, E., JEONG, S. W., HA, T. L., PARK, S. I., LEE, S. G., LEE, S. J. & LEE, S. W. 2015. Magnetic nanoparticle-conjugated polymeric micelles for combined hyperthermia and chemotherapy. *Nanoscale*, 7, 16470-80.
- ROTI ROTI, J. L. 2008. Cellular responses to hyperthermia (40-46 degrees C): cell killing and molecular events. *Int J Hyperthermia*, 24, 3-15.

Capítulo 4 - Castração Magnética: Magneto-hipertermia como possível indutor de infertilidade em machos

1. Introdução

No Brasil e no mundo ainda não existem políticas públicas com diretrizes oficiais para o controle populacional de cães não domiciliados (errantes). No Brasil, isto faz com que muitos municípios negligenciem esse tipo de ação. Apesar de alguns municípios realizarem algum tipo de ação de controle, estas ações são muitas vezes isoladas e geralmente carentes de avaliação (Moutinho et al., 2015). Embora ocorra essa negligência atual em relação ao controle populacional animal, há uma tentativa de transformar o Projeto de Lei 1.376/03 que dispõe sobre a política de controle da natalidade de cães e gatos e destina verbas governamentais para investir em esterilização dos animais (Brasil, 2012). A esterilização dos animais e educação da população sobre posse responsável são as medidas mais efetivas para controle populacional (Kutzler e Wood, 2006, Robertson, 2008, Mendes-de-Almeida et al., 2011). Pesquisas têm sido realizadas na tentativa de tornar os métodos de esterilização mais acessíveis para a população e para os projetos governamentais.

O método de eleição para esterilização de cães e gatos machos é a castração cirúrgica (Kutzler e Wood, 2006), que é muito eficaz e consiste na remoção dos testículos. No entanto, exige alguns pré-requisitos, como um centro

cirúrgico e equipe altamente especializada. Além disso, em um dia, um único cirurgião só é capaz de castrar cerca de 12 machos, o que torna a técnica pouco efetiva em termos de atender ao grande número de animais existentes. Métodos alternativos à castração cirúrgica vem sendo estudados, dentre os quais o controle hormonal com o uso de progestinas, andrógenos e agonistas do GnRH e a imunoesterilização (Shafik, 1994, England, 1997, Jung et al., 2005, Kutzler e Wood, 2006), e a castração química, que consiste na injeção intratesticular ou intra-epididimal de substâncias que podem ocasionar a infertilidade (Fahim et al., 1993, Oliveira et al., 2012, Oliveira et al., 2013).

Uma outra forma de abordagem que pode levar a infertilidade no macho é a de aproveitar-se da sensibilidade dos gametas masculinos às temperaturas mais altas que a do corpo (Hansen, 2009a). Em um experimento clássico foi testado o efeito do calor emitido por diversas fontes (água quente, luz infravermelha, micro-ondas e ultrassom), com resultados variáveis. Os autores afirmam que é possível obter infertilidade a longo prazo (10 meses) em ratos quando os testículos dos animais são submetidos a temperatura de 45 °C por 15 minutos ou 60 °C por 5 minutos, utilizando um aparelho de ultrassom para gerar calor (Fahim et al., 1975). Um problema dessa técnica é que para algumas espécies o ultrassom é muito eficaz, como para cães (Leoci et al., 2015) e ratos (Tsuruta et al., 2012), mas ainda não é para outras (VandeVoort e Tollner, 2012).

A magneto-hipertermia consiste em aumentar a temperatura de nanopartículas magnéticas (NPM) devido a interação dos momentos magnéticos com um campo magnético alternado. A magneto-hipertermia já vem sendo testada

com sucesso em tratamentos contra câncer (Portilho et al., 2011, Sadhukha et al., 2013). Esta técnica pode elevar as temperaturas até mais de 47 °C ocasionando uma destruição dos tecidos por meio de necrose aguda, coagulação ou carbonização do tecido (Webster, 2010). Sabendo que o aquecimento da região testicular pode levar a infertilidade momentânea ou definitiva, dependendo do tempo e da temperatura que é utilizada (Setchell, 2006), os objetivos desse trabalho foram de avaliar os efeitos da magneto-hipertermia testicular nos túbulos seminíferos e na produção e a qualidade espermática de ratos.

2. Material e Métodos

2.1. Nanopartícula Magnética

Para o estudo foi utilizado fluido magnético composto de NPM de ferrita de manganês funcionalizada com citrato, com diâmetro médio de 11.36 nm, sintetizadas conforme descrito por Rodrigues et al. (2013), na concentração de 28,5 mg Fe/mL.

2.2. Animais e Desenho Experimental

Os procedimentos a seguir foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso Animal sob o número UnBDOC 138067/2012.

Para esta etapa foram utilizados 22 ratos Wistar machos, já com maturidade reprodutiva (6-7 semanas) produzidos e mantidos no Biotério do IB com água e ração *ad libitum*. Os animais foram divididos em 6 grupos experimentais, a saber:

O grupo Controle Salina (n=2) recebeu uma injeção intratesticular de solução salina. O grupo Controle NPM (n=2) recebeu injeção da nanopartícula sem ser submetido à magneto-hipertermia. Três grupos receberam injeção da nanopartícula e foram submetidos a magneto-hipertermia sendo avaliados em 3 momentos diferentes após a magneto-hipertermia: Grupos D7, D28 e D56 (n=5 para cada). Um grupo foi apenas submetido ao equipamento para produzir magneto-hipertermia, sem receber nenhuma injeção – Controle Magneto (n=3). O dia das injeções e/ou magneto-hipertermia foi considerado o Dia 1 do experimento e um desenho esquemático está mostrado na Figura 3.1.

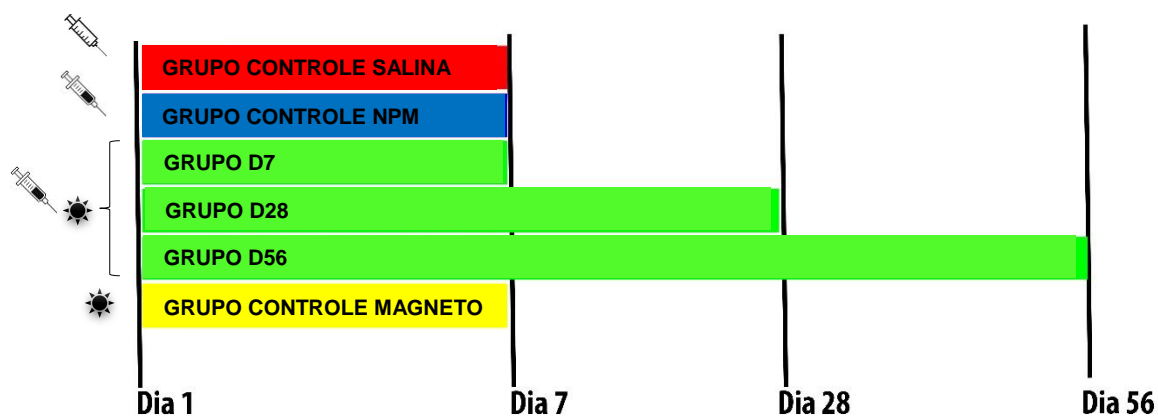


Figura 3.1. Desenho esquemático do delineamento experimental.

injeção de solução salina; injeção de NPM; aplicação do campo magnético

2.3. Procedimentos Experimentais

O protocolo anestésico utilizado foi a combinação de Quetamina 90mg/kg e Xilazina 10 mg/kg para todos os animais. A partir da verificação do plano anestésico (ausência de reflexos e resposta a sons), os animais entraram em experimentação.

Os animais dos Grupos D7, D28, D56 e Controle NPM receberam uma injeção intratesticular de 150 μ L do fluido magnético em cada testículo, dividido igualmente e aplicado em três regiões ao longo do testículo. Imediatamente após a aplicação os testículos dos animais dos Grupos D7, D28, D56 foram expostos ao gradiente gerado pelo campo magnético em procedimento descrito por Rodrigues et al. (2013) para ativar as nanopartículas. A temperatura dos testículos foi monitorada por termômetro de fibra ótica em ambos os testículos e o procedimento de magneto-hipertermia foi mantido por 15 minutos após atingir a temperatura de 45 °C. A temperatura retal dos animais também foi monitorada (Figura 3.2). O Grupo Controle Magneto foi também submetido ao campo magnético por 15 minutos, como descrito acima.

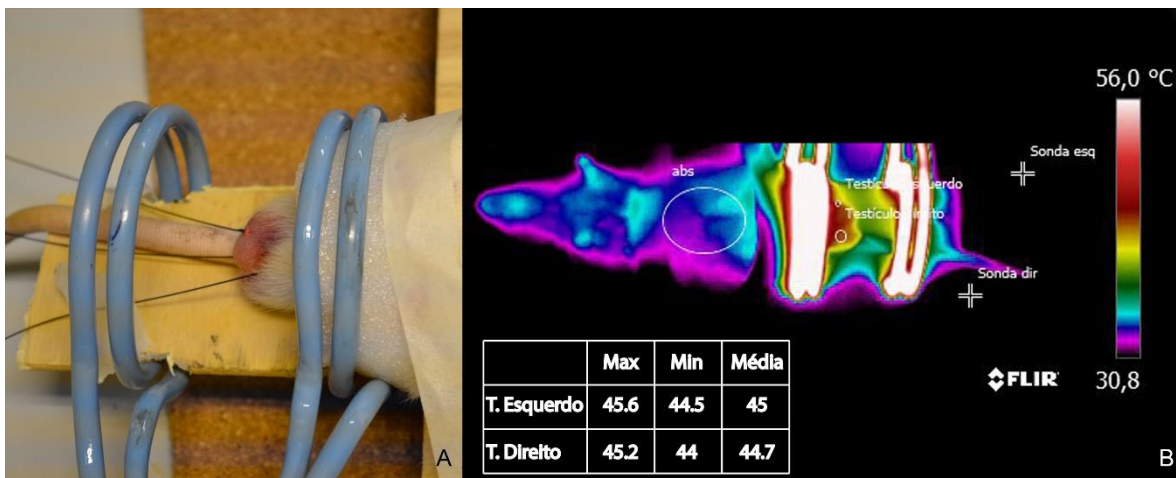


Figura 3.2. Posicionamento das sondas de fibra óptica para medição da temperatura testicular e retal (A) e termografia durante o procedimento de magneto-hipertermia (B).

Após o tratamento, os animais que receberam injeções do fluido magnético receberam uma dose única de analgésico e anti-inflamatório (Banamine - 1,1mg/kg SC). Durante os 7 primeiros dias, todos os animais foram observados em relação ao comportamento, consumo de alimentos e peso, para verificar se algum indício de dor ou desconforto, ou alguma mudança na aparência geral do animal foi apresentado.

Os animais dos grupos D7, D28 e D56, foram eutanasiados respectivamente, 7, 28 e 56 dias após a magneto-hipertermia. Os animais dos outros grupos foram eutanasiados com 7 dias do início do tratamento experimental. A eutanásia se deu por overdose de barbitúricos e punção cardíaca. De todos os animais fígado, rins, pulmões, baço e testículos foram retirados. Os testículos direito e esquerdo foram medidos e pesados e ambos processados para as análises histopatológicas. Os demais órgãos foram pesados e divididos, uma parte destinada às análises histopatológicas e a outra à quantificação das NPM por Ressonância Eletrônica Paramagnética (EPR).

2.4. Processamento Histológico

Para a microscopia de luz os órgãos foram fixados em solução de Bouin por 5 horas e depois lavados em álcool 50% (2-3 banhos de uma hora) e depois colocados em

álcool 70% e submetidos aos processos de desidratação (soluções com concentrações crescentes de álcool, 80%, 90% e 100%), diafanização (em xilol) e inclusão em parafina (Histosec, Merck). Foram feitos cortes à espessura de 5µm que foram montados em lâminas e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas foram avaliadas em microscópio de luz (Nikon Eclipse Ci-S).

Nos testículos foi avaliada a estrutura geral do órgão, com ênfase na organização dos túbulos seminíferos, presença de células da linhagem germinativa, integridade da lâmina basal (barreira hemato-testicular) e possíveis alterações no parênquima e estroma testicular. Os outros órgãos (baço, fígado, pulmões e rins) foram avaliados quanto à sua estrutura e integridade gerais.

2.5. Quantificação das NPM por EPR

Para a quantificação e verificação de possível sinalização das nanopartículas por EPR foi utilizado o equipamento EMXPlus™ Bruker Banda X 9.5 GHz (Bruker, Alemanha).

Para a análise no EPR, os órgãos dos animais de todos os grupos, (com exceção do Grupo Controle Salina) foram macerados e homogeneizados completamente com o equipamento T 10 basic ULTRA-TURRAX® (IKA® Werke Staufen/Alemanha) e liofilizados (L101, Liotop, São Carlos, SP, Brasil). Após a liofilização, uma quantidade do material dos órgãos (fígado, rim, baço e pulmão) foi colocada em capilares de vidro e selados. Para um bom controle da massa de órgão avaliada no equipamento, foi feita a medida da massa do capilar vazio e depois do capilar com o material.

O material foi levado ao EPR e submetido, em temperatura ambiente, a uma modulação de 10G com 2mW de potência e um escaneamento para verificar o sinal de ferro proveniente da nanopartícula.

2.6. Análise Estatística

As médias das medidas e peso aferidos para os testículos e peso do demais órgãos foram calculadas para cada grupo e os dados foram analisados no por ANOVA e Teste de Scheffè (software Statview 5.0). Foi considerado o nível mínimo de 5% de significância.

Os dados da análise por EPR são apresentados como Unidades Arbitrárias (U.A.) de nanopartícula por grama de órgão seco. Os resultados foram comparados entre os órgãos e entre os tratamentos, sendo utilizado também ANOVA e teste de Scheffè (Statview 5.0).

3. Resultados

3.1. Aspecto geral e peso dos animais

Em todos os grupos não foi observada dor ou incômodo contínuos. No dia do tratamento um animal do grupo D7 apresentou um comportamento anormal de lambidas constantes na bolsa escrotal, mas no dia seguinte, o comportamento já não existia. No terceiro dia de avaliações, um outro animal do grupo D7 apresentou vários espasmos, inchaço, dificuldade respiratória e veio a óbito.

No início do experimento (Dia 1) o peso médio dos animais foi de $244,1 \pm 31,6$ (variando de 200 a 300g) o que está de acordo com a idade dos animais (6-7

semanas de vida). Alguns animais apresentaram perda de peso nos primeiros dias pós-tratamento, com exceção dos grupos Controle Salina e Controle Magneto, e nunca maior que 30g. Todos os animais apresentaram ganho de peso esperado para a idade durante o resto do período (Figura 3.3), sem diferença significativa entre os grupos ($P>0,05$). O peso individual dos animais por grupo é apresentado no Anexo 1.

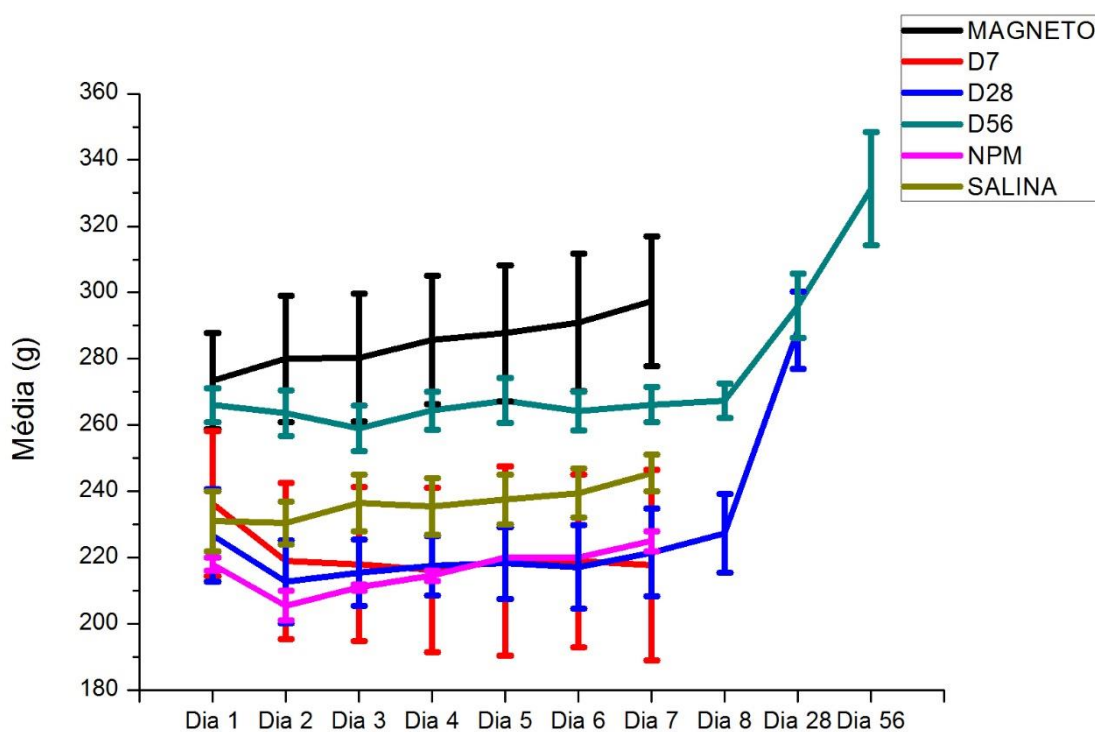


Figura 3.3. Média (\pm SEM) do peso dos animais por grupo, nos primeiros 7 dias e nos dias 28 e 56 após o tratamento.

Alterações Testiculares macroscópicas

Os animais dos grupos Controle Salina e Controle Magneto apresentavam a bolsa escrotal com as características normais (Figura 3.4A), na posição caudo-ventral, com o tecido bem frouxo, sem aderências e sem aspecto de lesões e com uma coloração semelhante a todo o restante da pele corporal. Os animais não apresentaram sinais de dor ou desconforto. No grupo Controle NPM os testículos apresentavam-se escurecidos, o que era visível mesmo com eles ainda na bolsa escrotal, mas com todas as outras características normais.

Todos os animais que foram submetidos à magneto-hipertermia (Grupos D7, D28 e D56) apresentaram um aumento de volume/inchaço da bolsa escrotal nos primeiros 7 dias (Figura 3.4B) e a pele aparentou estar mais delgada (semelhante a uma bolha de queimadura). Também foi possível verificar o aparecimento de necrose na base da bolsa escrotal em 64% dos animais (Figura 3.4B e C). Ao longo do tempo, houve progressão do processo inflamatório e resolução das feridas macroscópicas antes dos 15 dias. Foi observada também uma atrofia dos testículos e da bolsa escrotal (Figura 3.4D). Um animal do grupo D56 apresentou necrose completa da bolsa escrotal e testículos, que “caíram” no dia 20 após o tratamento, e apresentava um material amorfo (Figura 3.5).

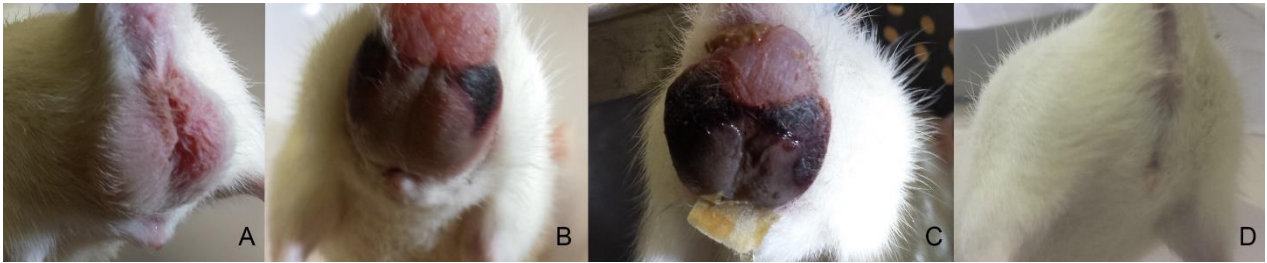


Figura 3.4. Fotografias das bolsas escrotais dos animais ainda vivos. A) GRUPO Controle Magneto aos 7 dias. B) Grupo D7 aos 4 dias C) Grupo D56 com 7 dias D) Grupo D56 no dia da eutanásia.



Figura 3.5. Material amorfo que possivelmente era a bolsa escrotal e testículos de um dos animais.

No momento da necropsia do Grupo D7, pode-se observar uma grande aderência dos testículos à pele escrotal (Figura 3.6A), além de grande escurecimento nos testículos (Figura 3.6B). No Grupo D28, após a abertura da bolsa, pode-se observar uma atrofia testicular e a ausência do testículo esquerdo em um dos animais. No Grupo D56, os testículos, quando presentes, apresentavam tamanho muito reduzido e aderidos à pele. Um animal, cuja bolsa escrotal foi perdida (vide acima) não apresentava testículos e outro animal não apresentou o

testículo esquerdo (Figura 3.6C e D). Os Grupos Controle Magneto e Controle Salina não apresentaram qualquer alteração macroscópica nos testículos à necropsia. O Grupo Controle NPM apresentou apenas escurecimento dos testículos.

Após a retirada dos testículos da bolsa escrotal, tentou-se a coleta de espermatozoides por maceração do epidídimo, mas em todos os animais tratados essa coleta não foi bem-sucedida. Todos os espermatozoides, quando presentes, que puderam ser visualizados, além de pouca quantidade, estavam mortos. A exceção ocorreu nos grupos Controle Salina e Controle Nanopartícula onde pode se ver espermatozoides vivos e normais.

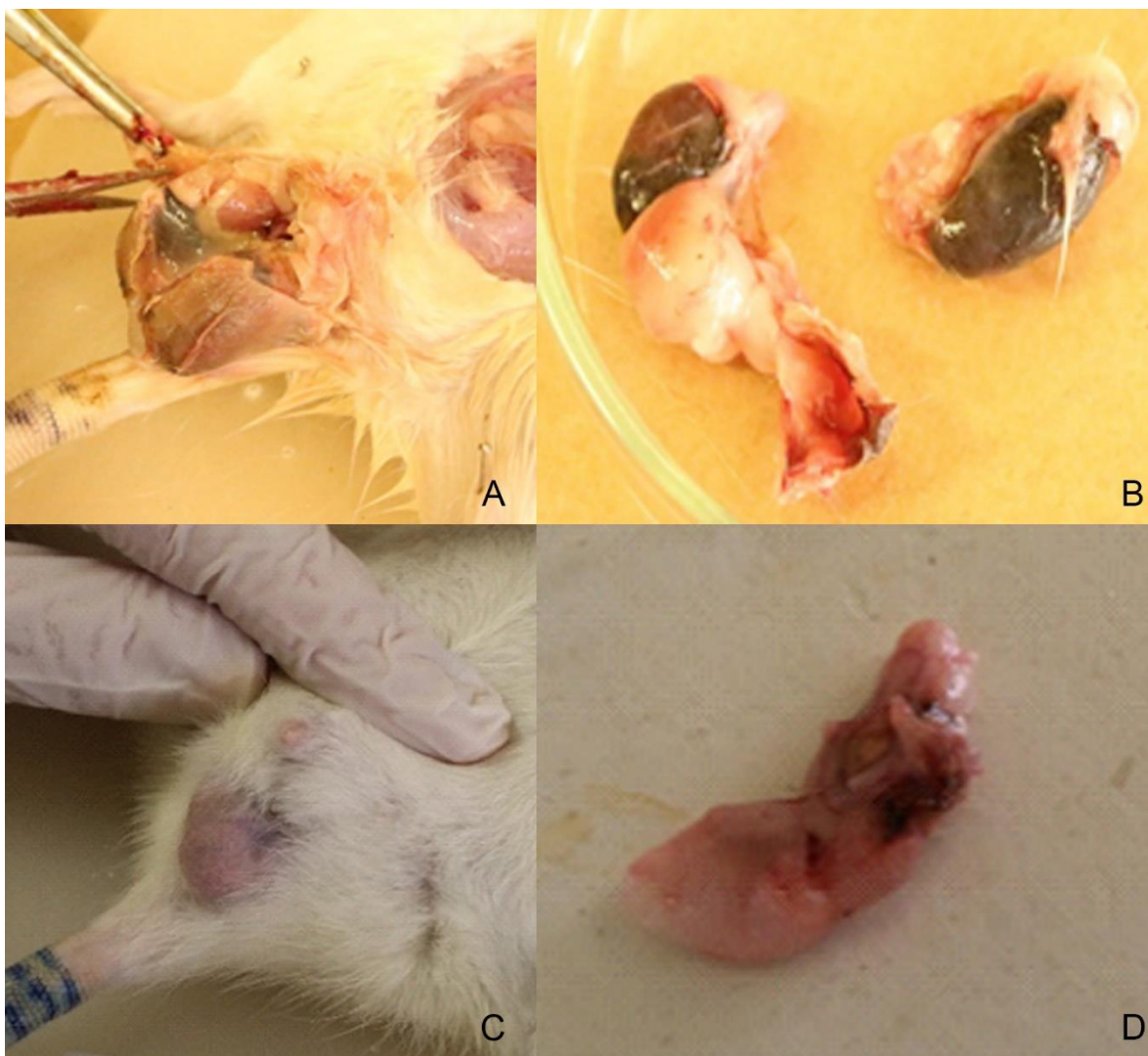


Figura 3.6. Testículos de animal do grupo D7 à necropsia, mostrando aderência à pele (A) e escurecimento (B); e de animal do grupo D56 mostrando a ausência do testículo esquerdo antes da eutanásia (C) e à necropsia (D).

As medidas e o peso dos testículos foram obtidos após eutanásia e são apresentados na Tabela 3.2. De modo geral, houve diminuição significativa ($P < 0,05$) de todos os parâmetros do testículo direito no grupo D56 em relação aos grupos

controle e D7. Já para o testículo esquerdo, houve diminuição significativa nos três parâmetros analisados somente entre os grupos D56 e Controle Magneto.

Tabela 3.1. Médias (\pm DP) das medidas de comprimento e espessura e do peso dos testículos direito e esquerdo de cada grupo.

| Grupo | N | TD | | | N | TE | | |
|-------------------|---|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | Comprimento | Espessura | Peso* | | Comprimento | Espessura | Peso* |
| C. Magneto | 3 | 20,7 \pm 2,5 ^a | 9,7 \pm 1,5 ^a | 2,8 \pm 0,1 ^a | 3 | 22,3 \pm 3,0 ^a | 10,0 \pm 0,0 ^a | 2,0 \pm 0,4 ^a |
| C. NPM | 2 | 18,5 \pm 0,7 ^{ab} | 10,0 \pm 0 ^a | 1,7 \pm 0,4 ^{ab} | 2 | 17,5 \pm 0,7 ^{ab} | 9,5 \pm 0,7 ^{ab} | 1,7 \pm 0,6 ^{ab} |
| C. Salina | 2 | 17,5 \pm 2,1 ^{ab} | 9,5 \pm 0,7 ^a | 1,5 \pm 0,0 ^b | 2 | 17,0 \pm 1,4 ^{ab} | 8,5 \pm 0,7 ^{ab} | 1,4 \pm 0,0 ^{ab} |
| D7 | 4 | 12,2 \pm 0,5 ^{bc} | 7,0 \pm 0,8 ^a | 1,8 \pm 0,3 ^b | 4 | 12,2 \pm 2,8 ^{ab} | 6,5 \pm 1,3 ^{ab} | 1,6 \pm 0,3 ^{ab} |
| D28 | 5 | 9,6 \pm 2,2 ^{cd} | 6,6 \pm 1,7 ^{ab} | 1,0 \pm 0,5 ^{bc} | 4 | 9,7 \pm 2,6 ^b | 6,2 \pm 1,5 ^{ab} | 0,8 \pm 0,6 ^{ab} |
| D56 | 4 | 6,2 \pm 2,2 ^d | 4 \pm 0,8 ^b | 0,3 \pm 0,2 ^{cd} | 3 | 8,3 \pm 3,5 ^b | 4,7 \pm 1,1 ^b | 0,4 \pm 0,6 ^b |

* Peso do testículo direito com o epidídimo e peso do testículo esquerdo sem o epidídimo.

^{abcd} Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (P<0,05).

Alterações Testiculares Microscópicas

Os grupos Controle Magneto e Controle Salina apresentaram todos os tipos celulares que podem ser visualizados em um túbulo seminífero: espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozóides (Figura 3.8). A estrutura tubular estava intacta e não apresentava nenhum sinal de lesão ou ruptura. Também não foi identificado nenhum tipo de infiltrado inflamatório ou presença de células do sistema imune. O grupo Controle NPM apresentou as mesmas características

morfológicas dos outros Controles, porém com a presença de grande quantidade de NPM no tecido intersticial (Figura 3.8B).

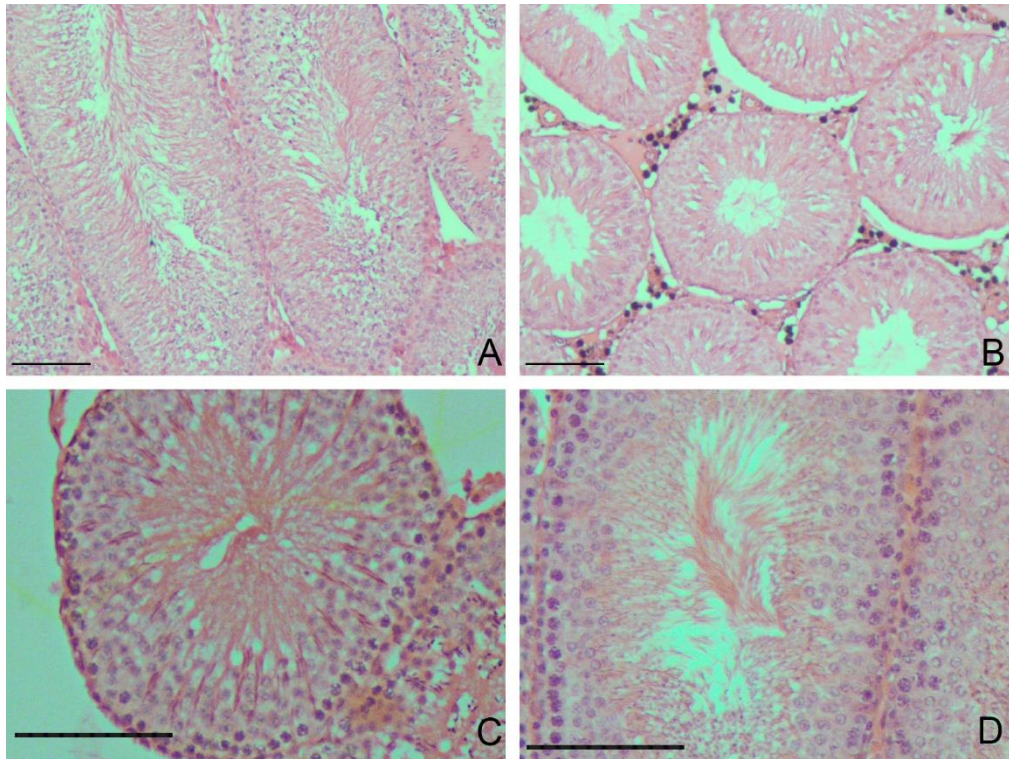


Figura 3.7. Fotomicrografias representativas de túbulos seminíferos de animais dos grupos Controle Magneto (A), Controle NPM (B), e Controle Salina (C e D) todos com aparência normal e onde podem ser vistos todos os tipos celulares da linhagem germinativa. Barras = 10 μ m.

O grupo D7 apresentou aparência bastante distinta em relação ao grupo controle. Os túbulos seminíferos ainda puderam ser distinguidos (Figura 3.8A), porém o epitélio seminífero estava completamente descaracterizado. Havia extravasamento de sangue para o compartimento tubular (necrose coagulativa - B e C), e apenas algumas poucas células germinativas puderam ser observadas,

majoritariamente espermatogônias, em alguns túbulos (D). Quando presentes, foi possível observar espaçamento entre as células e vacuolização do citoplasma (D). Espermatozoides não foram mais vistos nos túbulos seminíferos. Foi notada a presença de infiltrado inflamatório no interstício (B), bem como de nanopartículas também no interstício (E e F). É visível a ruptura da parede dos túbulos seminíferos (barreira hemato-testicular danificada - D).

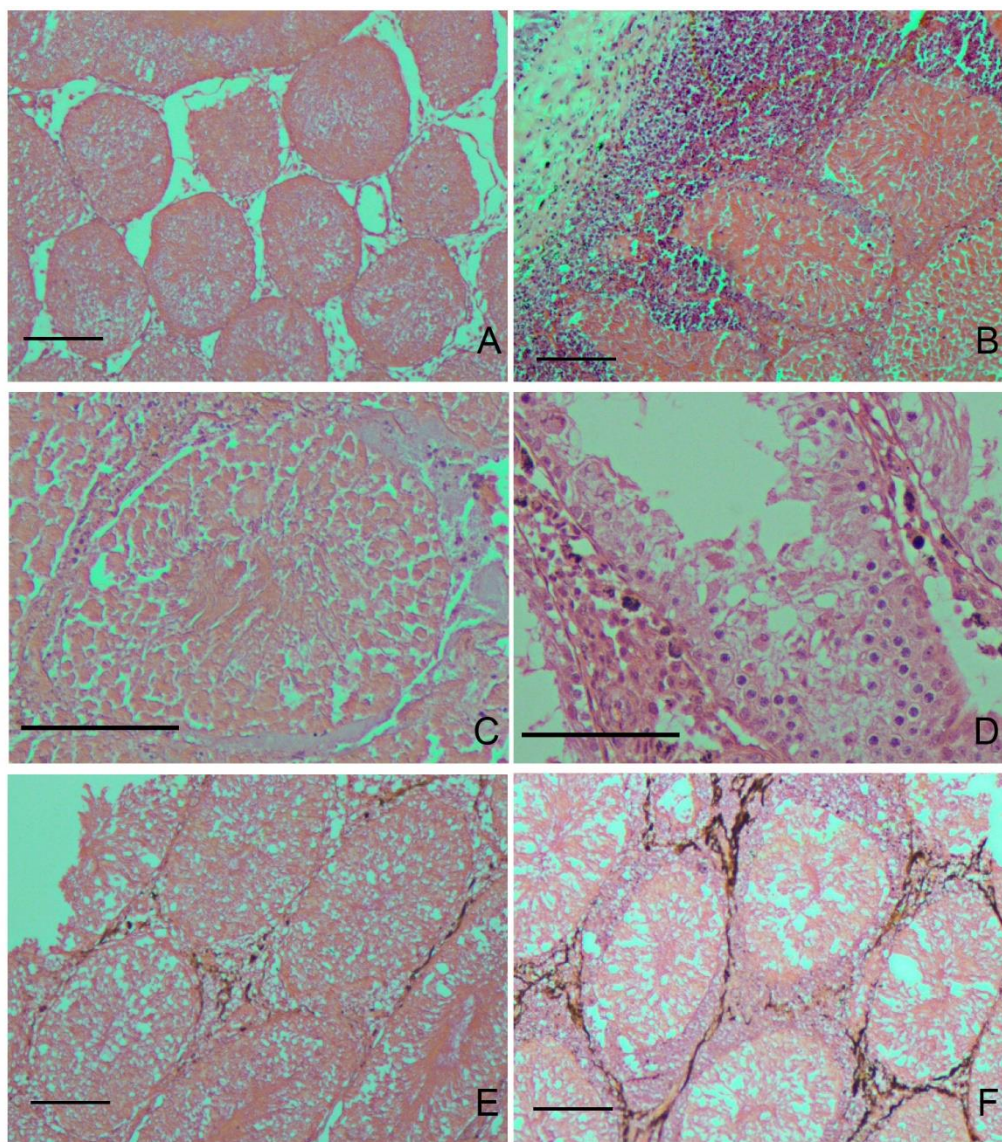


Figura 3.8. Fotomicrografias representativas de túbulos seminíferos de animais do grupo D7, mostrando os túbulos seminíferos ainda identificáveis (A), porém com extravasamento de sangue para o lúmen tubular – necrose coagulativa (B e C). O epitélio germinativo e a membrana basal estavam danificados (D), e apenas espermatogônias puderam ser vistas dentre as células da linhagem germinativa (D). Infiltrado inflamatório (B) e NPM (E e F) estavam presentes no interstício. Setas mostram ruptura na parede dos túbulos seminíferos. * Infiltrado inflamatório. Barras = 10 μ m

No grupo D28, a região dos túbulos ainda pode ser identificada (Figura 3.9A), mas sem a estrutura típica de um túbulo seminífero. O sangue extravasado para o lúmen indica que ocorreu uma necrose coagulativa (B). O interstício mostra proliferação de tecido conjuntivo (C) e parece ter começado a haver um preenchimento do lúmen dos túbulos seminíferos também com tecido conjuntivo (D). Algumas poucas células, aparentemente de Sertoli, puderam ser vistas em alguns túbulos. Células germinativas não foram mais identificadas. É visível a ruptura da parede dos túbulos seminíferos (barreira hemato-testicular danificada – Figura 3.8B). É possível identificar a presença de nanopartículas (A, B e C), mas em uma quantidade menor que no D7.

As alterações microscópicas dos testículos do grupo D56 (Figura 3.10) foram uma evolução das apresentadas pelo grupo D28. Foi observada perda da definição dos túbulos seminíferos, substituição das células tubulares pelo que aparenta ser tecido conjuntivo, sendo que em alguns animais essa troca pareceu ser completa. Infiltrado inflamatório e nanopartículas ainda foram visualizados.

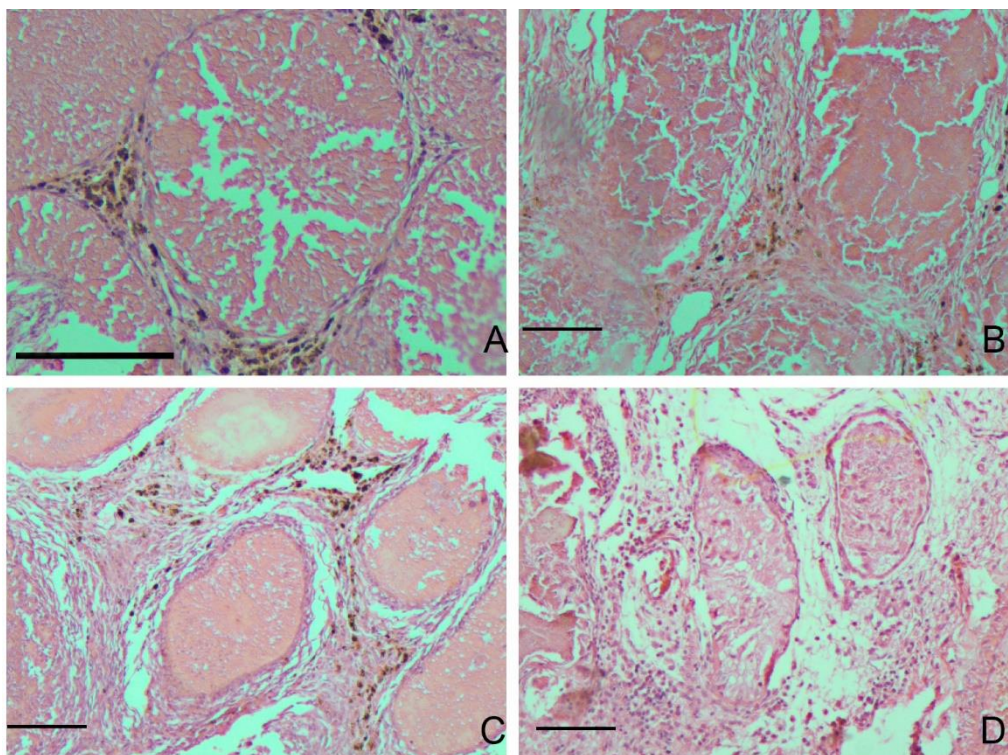


Figura 3.9. Fotomicrografias representativas de túbulos seminíferos de animais do grupo D28. Os túbulos seminíferos ainda podem ser identificados (A), porém com necrose coagulativa (A e B). O interstício aparece com maior presença de tecido conjuntivo (C), e alguns túbulos seminíferos também apareceram preenchidos com tecido conjuntivo (D). NPM ainda podem ser vistas no interstício (A, B e C). Setas mostram ruptura na parede dos túbulos seminíferos. Barras = 10 μ m

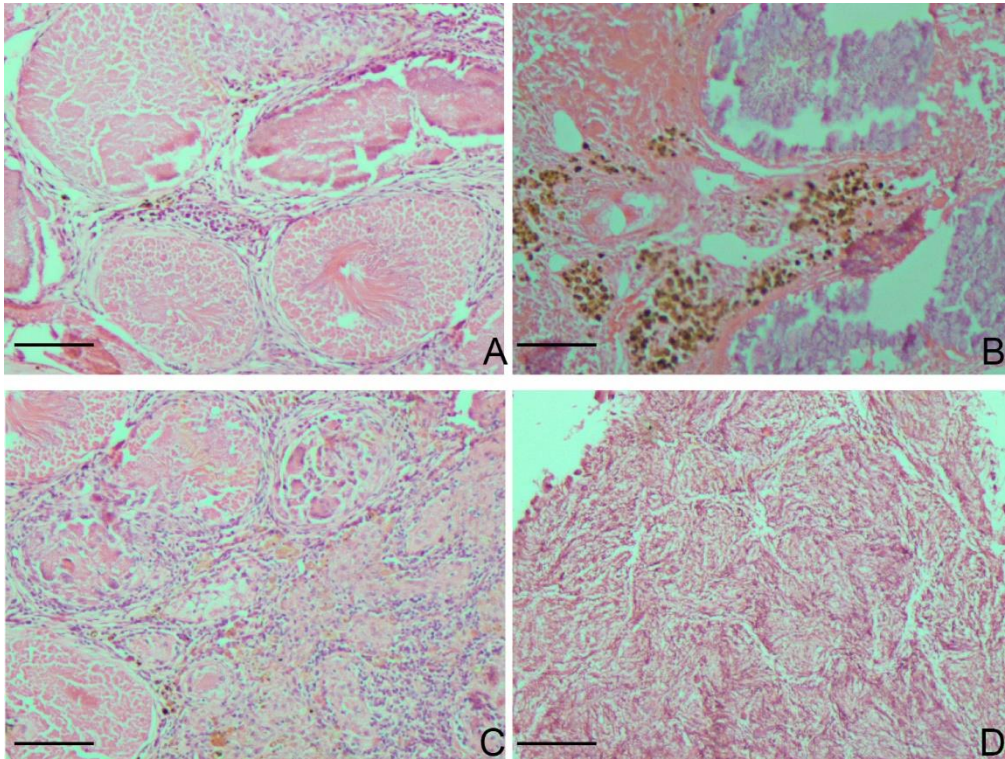


Figura 3.10. Fotomicrografias representativas de túbulos seminíferos de animais do grupo D56. Túbulos seminíferos ainda puderam ser identificados em alguns casos (A), bem como NPM (B). Mas em alguns casos houve perda da definição dos túbulos seminíferos (C), e substituição das células tubulares pelo que aparenta ser tecido conjuntivo (D). * Infiltrado inflamatório. Barras = 10 μ m

Efeitos nos órgãos vitais

Na aparência macroscópica dos outros órgãos (fígado, baço, pulmões e rins) foi semelhante em todos os grupos. O peso absoluto dos órgãos (fígado, baço, rim e pulmões), bem como o peso dos órgãos em relação ao peso vivo dos animais é apresentado na Tabela 3.2. Só houve diferença estatística no peso relativo do

fígado, onde o grupo D56 mostrou valor significativamente inferior ao grupo D7 ($P<0,05$), mas nenhum deles foi diferente dos grupos controle.

Tabela 3.2. Média (\pm DP) dos pesos (g) dos animais e dos órgãos dos animais no dia da eutanásia. Entre parênteses o valor relativo (%) do peso do órgão em relação ao peso total do animal.

| Grupo | Peso Vivo (g) | Peso total (g) e relativo (%) dos órgãos | | | |
|-------------------|------------------|---|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | | Fígado | Baço | Rim | Pulmão |
| C. Magneto | 297,3 \pm 33,9 | 10,6 \pm 1,8 (3,5 \pm 0,4) ^{ab} | 1,0 \pm 0,1 (0,3 \pm 0,0) | 1,4 \pm 0,2 (0,5 \pm 0,0) | 1,9 \pm 0,5 (0,6 \pm 0,2) |
| C. Salina | 245,5 \pm 7,8 | 10,7 \pm 0,3 (4,4 \pm 0,0) ^{ab} | 1,2 \pm 0,2 (0,5 \pm 0,1) | 1,0 \pm 0,1 (0,4 \pm 0,0) | 1,5 \pm 0,0 (0,6 \pm 0,0) |
| C. NPM | 225,0 \pm 4,2 | 9,5 \pm 0,5 (4,2 \pm 0,1) ^{ab} | 1,4 \pm 0,1 (0,6 \pm 0,1) | 1,0 \pm 0,1 (0,4 \pm 0,0) | 1,4 \pm 0,1 (0,6 \pm 0,0) |
| D7 | 217,7 \pm 57,4 | 9,7 \pm 2,2 (4,5 \pm 2,2) ^a | 1,2 \pm 0,4 (0,6 \pm 0,1) | 1,1 \pm 0,4 (0,5 \pm 0,2) | 1,6 \pm 0,9 (0,7 \pm 0,2) |
| D28 | 281,0 \pm 13,7 | 11,0 \pm 1,2 (3,9 \pm 0,4) ^{ab} | 1,3 \pm 0,2 (0,5 \pm 0,1) | 1,2 \pm 0,1 (0,4 \pm 0,0) | 1,5 \pm 0,2 (0,5 \pm 0,1) |
| D56 | 339,0 \pm 31,5 | 11,1 \pm 1,1 (3,3 \pm 0,2) ^b | 1,2 \pm 0,1 (0,4 \pm 0,0) | 1,4 \pm 0,3 (0,4 \pm 0,0) | 1,7 \pm 0,2 (0,5 \pm 0,1) |

a,b – Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P<0,05$).

À análise microscópica, fígados, baços rins e pulmões mostraram aparência geral normal e semelhante em todos os grupos (Figura 3.11). Fígados (Figura 3.11A) mostravam elementos da tríade hepática, ramos da veia porta, um ramo da artéria hepática e um ducto biliar pequeno. Os hepatócitos estavam dispostos em placas, e são vistos irradiando das regiões de vênulas centrais e estendendo-se para as áreas do portal. Baços (Figura 3.11B) apresentavam distinção clara entre polpa vermelha e polpa branca. A polpa vermelha apresenta muitos cordões esplênicos entre os quais se localizam os sinusoides. A polpa branca é constituída

pelo tecido linfático, predominantemente linfócitos. Foi possível verificar a presença de aglomerados da nanopartículas nos baços dos animais dos grupos Controle NPM e D7 (Figura 3.11B). Os rins (Figura 3.11C) apresentavam todas as estruturas íntegras, como os corpúsculos renais e os túbulos contorcidos, proximais e distais. Os pulmões (Figura 3.11D) de todos os animais estavam semelhantes ao grupo controle, onde pode-se observar alvéolos pulmonares, sacos alveolares, bronquíolos e vasos sanguíneos pulmonares.

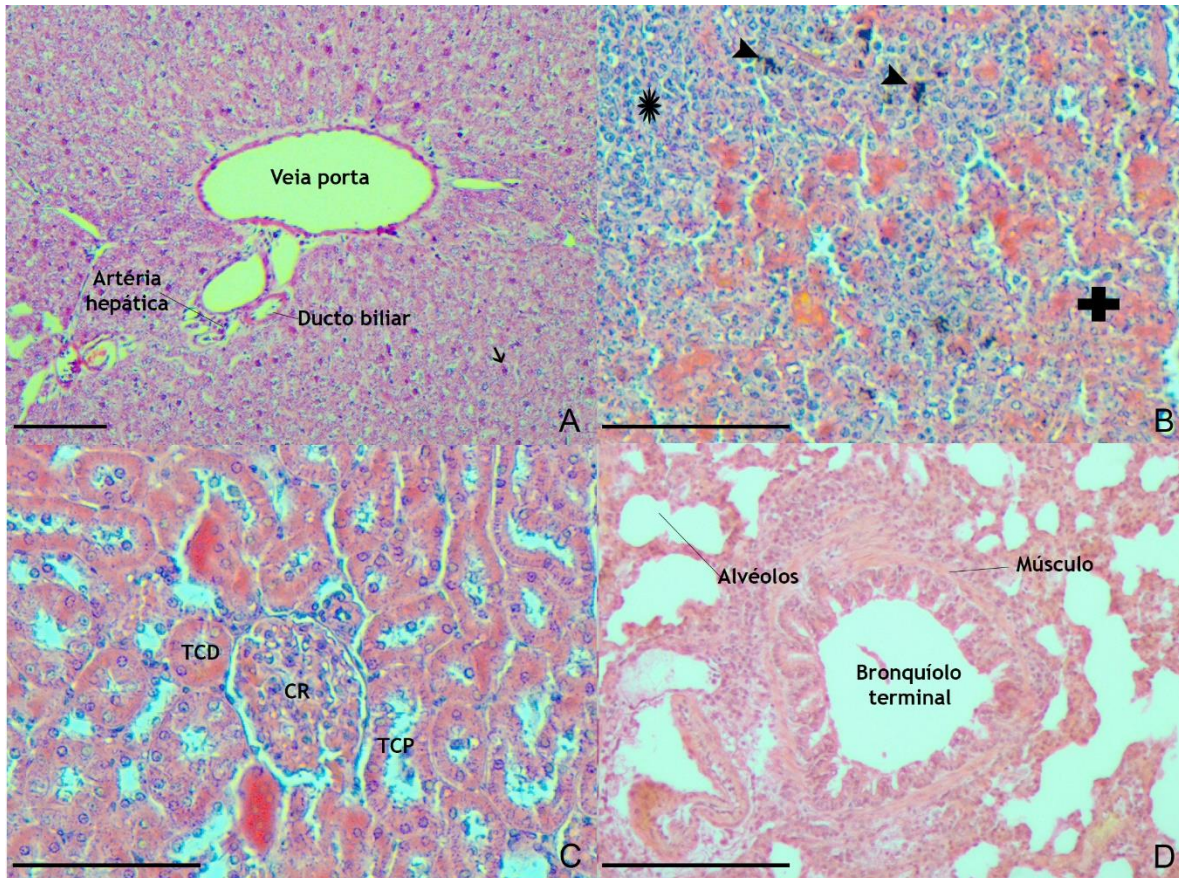


Figura 3.11. Aparência geral dos órgãos dos animais avaliados. A) Fígado de um animal controle, B) baço de um animal do grupo D7, apresentando ainda resíduos de nanopartículas, C) rim de um animal do grupo D56, e D) Pulmão de um animal do grupo D56. Barras=10µm. Símbolos: seta: núcleo do hepatócito, ponta de seta: agregados de nanopartículas, asterisco: polpa branca, cruz: polpa vermelha, CR: Corpúsculo renal, TCP: túbulo contorcido proximal, TCD: túbulo contorcido distal.

Distribuição das NPM nos órgãos

Os dados obtidos na quantificação das NPM por EPR no fígado, baço, rim e pulmão dos animais dos diferentes grupos é mostrado na Tabela 3.3. Houve uma grande diferença individual nos valores medidos pelo EPR mesmo em animais do mesmo grupo. Em relação ao sinal das NPM no fígado, o grupo D7 mostrou valor significativamente maior que o grupo Controle Magneto ($P<0,05$). No baço, os grupos Controle NPM e D7 apresentaram valores maiores que os demais grupos ($P<0,05$). Não houve diferença entre os grupos para rim e pulmão.

Comparando os valores obtidos no EPR para os órgãos dentro de cada grupo, não houve diferença para o grupo Controle Magneto. No grupo Controle NPM e D56 o valor obtido para fígado foi significativamente maior do que para os demais órgãos ($P<0,05$). No grupo D7, o valor para fígado foi significativamente maior do que para rim ($P<0,05$), e no grupo D28, o valor para fígado foi significativamente maior do que para rim e pulmão ($P<0,05$).

Gráficos representativos do sinal obtido para os diferentes órgãos dos animais em todos os grupos são apresentados no Anexo 2.

Tabela 3.3. Sinal das NPM quantificado por EPR (Unidade Arbitrária) nos diferentes órgãos (Média \pm DP).

| Grupos | Fígado | Baço | Rim | Pulmão |
|-------------------|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| C. Magneto | 79,2 \pm 30,4 ^b | 44,6 \pm 16,8 ^b | 69,3 \pm 52,3 | 110,95 \pm 0,0 |
| C. NPM | 4793,6 \pm 1198,8 ^{abA} | 963,8 \pm 21,7 ^{aB} | 32,5 \pm 23,6 ^B | 121,3 \pm 51,1 ^B |
| D7 | 5971,3 \pm 3984,3 ^{aA} | 827,6 \pm 313,9 ^{aAB} | 51,3 \pm 45,3 ^B | 889,7 \pm 1241,5 ^{AB} |
| D28 | 1376,4 \pm 1322,9 ^{abA} | 239,9 \pm 129,8 ^{bAB} | 63,8 \pm 59,4 ^B | 54,5 \pm 36,4 ^B |
| D56 | 1735,0 \pm 968,1 ^{abA} | 221,9 \pm 199,5 ^{bB} | 33,3 \pm 31,9 ^B | 67,7 \pm 58,5 ^B |

ab – Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P<0,05$).

AB – Letras diferentes indicam diferença significativa entre os órgãos ($P<0,05$).

4. Discussão

Os resultados obtidos com o procedimento de magneto-hipertermia testicular utilizado mostraram que houve um processo progressivo de indução de infertilidade nos animais. Esta infertilidade provavelmente é irreversível, tendo em vista a completa desorganização do epitélio seminífero e o desaparecimento total das células da linhagem germinativa observados. Os lúmens dos túbulos seminíferos foram inicialmente preenchidos por sangue (necrose coagulativa) e posteriormente por tecido conjuntivo.

Outros trabalhos já foram realizados na tentativa de provocar infertilidade em machos utilizando o aumento da temperatura testicular, com bons resultados em ratos (Fahim et al., 1975,1977) e cães (Leoci et al., 2015). Da mesma forma, a injeção intratesticular de diferentes substâncias químicas também tem sido testado como método de indução da infertilidade (Fahim et al., 1993; Emir et al., 2008; Kwak e Lee, 2013).

No presente trabalho, já aos 7 dias os animais apresentavam lesões extensas nos túbulos seminíferos, caracterizadas principalmente por necrose coagulativa. Não havia espermatozoides presentes na luz dos túbulos nem uma quantidade de células germinativas (espermatogônias) que sugerissem que a espermatogênese pudesse ser retomada. Isso também foi verificado no estudo de

Fahim et al. (Fahim et al., 1975) após 15 dias para os tratamentos envolvendo o aquecimento testicular com infravermelho ou com micro-ondas.

Os achados do dia 28 mostram que além da necrose coagulativa, já começa a ocorrer uma substituição do epitélio seminífero e o preenchimento dos túbulos por tecido conjuntivo, sinalizando uma perda irreversível da funcionalidade reprodutiva. Da mesma forma, também aos 28 dias (Kwak e Lee, 2013) verificaram uma destruição severa do tecido testicular, com uma grande presença de infiltrado inflamatório, utilizando uma solução salina hipertônica (20%) em ratos.

No decorrer do experimento, aos 28 e 56 dias, pode-se observar que não havia mais indícios de que os túbulos seminíferos viessem a retomar a sua função de produção de gametas. Em alguns casos, pode-se observar uma completa substituição do tecido germinativo por tecido conjuntivo. Achados semelhantes foram obtidos por (Leoci et al., 2015) ao avaliar testículos de cães submetidos ao aquecimento com ultrassom. Segundo Fahim et al. (1977), o tratamento por ultrassom suprime significativamente a espermatogênese sem afetar as concentrações de testosterona por pelo menos 10 meses após o tratamento. No presente trabalho não foi feita a dosagem de testosterona nos animais, mas houve uma atrofia testicular significativa aos 56 dias do tratamento, inclusive com o completo desaparecimento do testículo em 3 casos. Possivelmente, com mais tempo pós-hipertermia, ocorreria o desaparecimento das gônadas em todos os animais, o que levaria à queda nos níveis séricos de testosterona. Para o controle populacional de animais errantes, a baixa produção de testosterona pode ser

interessante, pois leva a perda do comportamento sexual nos machos e a uma diminuição na agressividade dos animais, o que facilita possíveis adoções.

No presente trabalho, durante o tempo do experimento não foram observados sinais de perda de higidez dos animais, sugerindo que o procedimento de magneto-hipertermia testicular pode ser aplicado sem grandes consequências para a saúde dos animais. Foi observada perda de peso nos dois primeiros dias após o tratamento. Esta perda de peso pode ter sido decorrente do desconforto causado pelo inchaço e pelas lesões de pele gerados pela hipertermia, já que as terminações nervosas aferentes associadas com a sensação de dor estão localizadas sobre a pele do escroto e na cápsula do testículo, e não dentro do parênquima testicular (Tawar & Naz, 1981). De qualquer forma, este efeito foi transitório e houve resolução das lesões de pele e subsequente ganho de peso condizente com a idade dos animais até o final do experimento.

A única reação adversa observada com a hipertermia testicular foi a ulceração escrotal em alguns animais. O tratamento com ultrassom também induziu a queima da pele em 20% dos casos (Roberts et al., 2002a, Roberts et al., 2002b). Já o procedimento de castração química diversas reações locais e sistêmicas foram verificadas em cães após a injeção intratesticular de gluconato de zinco, que incluem: ulceração escrotal, dermatite, automutilação escrotal, inchaço do prepúcio, vômitos, diarreia, anorexia, letargia e leucocitose (Kutzler e Wood, 2006).

A quantificação de sinal magnético da NPM por EPR mostrou que 7 dias após a administração a nanopartícula utilizada estava presente em maior grau no fígado

e em segundo lugar no baço, não aparecendo de forma significativa nos rins ou nos pulmões. Além disso, o sinal foi menor aos 28 e 56 dias tanto no fígado quanto no baço, sugerindo que a NPM está sendo gradativamente eliminada do organismo. A mesma nanopartícula de ferrita de manganês coberta com citrato já teve sua biodistribuição descrita quando administrada por via endovenosa (Próspero et al., 2015) também apresentando sua maior concentração no fígado. No entanto, com a via endovenosa, o segundo maior sinal foi observado nos pulmões. Certamente, esta diferença se deve à diferença na via de administração das NPM (endovenosa x intratesticular). Embora tenha sido verificado (Próspero et al., 2015) que a meia-vida da partícula na corrente sanguínea é curta (181 segundos), observamos que após 56 dias, o sinal ainda era alto no fígado dos animais e ainda eram visíveis agregados de NPM no tecido testicular. É importante lembrar que a saúde dos animais não foi prejudicada, o que foi confirmado pelo aspecto geral e ganho de peso observados ao longo do experimento.

5. Conclusão

Em conclusão, o uso da magneto-hipertermia testicular utilizando nanopartículas de ferrita de manganês funcionalizadas com citrato para a indução da infertilidade em ratos se mostrou eficiente em curto prazo (56 dias), sem efeitos colaterais graves. Estudos de longo prazo são necessários para confirmar que o tratamento causa a infertilidade irreversível.

6. Referências Bibliográficas

- ALLMARK, M. G., GRICE, H. C. & LU, F. C. 1955. Chronic Toxicity Studies on Food Colours .1. Observations on the Toxicity of Fd and C Yellow No3 (Oil Yellow Ab) and Fd and C Yellow No4 (Oil Yellow Ob) in Rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7, 591-603.
- ARRUEBO, M., FERNÁNDEZ-PACHECO, R., IBARRA, M. R. & SANTAMARÍA, J. 2007. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today*, 2, 22-32.
- BARKALINA, N., CHARALAMBOUS, C., JONES, C. & COWARD, K. 2014. Nanotechnology in reproductive medicine: Emerging applications of nanomaterials. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10, e921-e938.
- BEAVER, B. V. G. 2003. *Feline Behavior: A Guide for Veterinarians*, SAUNDERS W B Company.
- BERRY, C. C. 2009. Progress in functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 42.
- BERRY, C. C. & CURTIS, A. S. G. 2003. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 36, R198-R206.
- BERRY, C. C., WELLS, S., CHARLES, S. & CURTIS, A. S. G. 2003. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 24, 4551-4557.
- BRANQUINHO, L. C., CARRIAO, M. S., COSTA, A. S., ZUFELATO, N., SOUSA, M. H., MIOTTO, R., IVKOV, R. & BAKUZIS, A. F. 2013. Effect of magnetic dipolar interactions on nanoparticle heating efficiency: implications for cancer hyperthermia. *Sci Rep*, 3, 2887.
- BUZEA, C., PACHECO, I. I. & ROBBIE, K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2, Mr17-Mr71.
- CALDEIRA, D. F. 2011. *Viabilidade dos espermatozoides bovinos após exposição a nanopartículas de maghemita recobertas com DMSA*. Mestrado, Universidade de Brasília.
- CAMPAGNOLO, L., MASSIMIANI, M., PALMIERI, G., BERNARDINI, R., SACCHETTI, C., BERGAMASCHI, A., VECCHIONE, L., MAGRINI, A., BOTTINI, M. & PIETROIUSTI, A. 2013. Biodistribution and toxicity of pegylated single wall carbon nanotubes in pregnant mice. *Part Fibre Toxicol*, 10, 21.
- CARNEIRO, M. L. B., PEIXOTO, R. C. A., JOANITTI, G. A., OLIVEIRA, R. G. S., TELLES, L. A. M., MIRANDA-VILELA, A. L., BOCCA, A. L., VIANNA, L. M. S., DA SILVA, I. C. R., DE SOUZA, A. R., LACAVA, Z. G. M. & BAO, S. N. 2013. Antitumor effect and toxicity of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer. *Journal of Nanobiotechnology*, 11.
- CHAVES, S. B., LACAVA, L. M., LACAVA, Z. G. M., SILVA, O., PELEGRINI, F., BUSKE, N., GANSAU, C., MORAIS, P. C. & AZEVEDO, R. B. 2002. Light microscopy and magnetic resonance characterization of a DMSA-coated magnetic fluid in mice. *Ieee Transactions on Magnetics*, 38, 3231-3233.
- CHENG, C. Y. 2008. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, Springer.
- CHENG, C. Y. & MRUK, D. D. 2012. The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception. *Pharmacological Reviews*, 64, 16-64.
- CHERAGHIPOUR, E., TAMADDON, A. M., JAVADPOUR, S. & BRUCE, I. J. 2013. PEG conjugated citrate-capped magnetite nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 328, 91-95.
- CORREA-DUARTE, M. A., GRZELCZAK, M., SALGUEIRINO-MACEIRA, V., GIERSIG, M., LIZ-MARZAN, L. M., FARLE, M., SIERAZDKI, K. & DIAZ, R. 2005. Alignment of carbon nanotubes under low magnetic fields through attachment of magnetic nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, 109, 19060-19063.

- DE CARVALHO, R. F., RIBEIRO, I. F., MIRANDA-VILELA, A. L., DE SOUZA FILHO, J., MARTINS, O. P., CINTRA E SILVA DDE, O., TEDESCO, A. C., LACAVAL, Z. G., BAO, S. N. & SAMPAIO, R. N. 2013. Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA-DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. *Experimental Parasitology*, 135, 217-22.
- DIXIT, V. P. 1977. Chemical sterilization: effects of danazol administration on the testes and epididymides of male rabbit. *Acta Biol Med Ger*, 36, 73-8.
- DIXIT, V. P., LOHIYA, N. K., ARYA, M. & AGRAWAL, M. 1975. The effects of chemical occlusion of vas deferens on the testicular function of dog: a preliminary study. *Acta Eur Fertil*, 6, 348-53.
- ENGLAND, G. C. W. 1997. Effect of progestogens and androgens upon spermatogenesis and steroidogenesis in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 123-138.
- EULISS, L. E., GRANCHAROV, S. G., O'BRIEN, S., DEMING, T. J., STUCKY, G. D., MURRAY, C. B. & HELD, G. A. 2003. Cooperative assembly of magnetic nanoparticles and block copolypeptides in aqueous media. *Nano Letters*, 3, 1489-1493.
- FAHIM, M. S., FAHIM, Z., DER, R., HALL, D. G. & HARMAN, J. 1975. Heat in Male Contraception (Hot Water 60 Degreesc, Infrared, Microwave, and Ultrasound). *Contraception*, 11, 549-562.
- FAHIM, M. S., FAHIM, Z., HARMAN, J., THOMPSON, I., MONTIE, J. & HALL, D. G. 1977. Ultrasound as a new method of male contraception. *Fertil Steril*, 28, 823-31.
- FAHIM, M. S., WANG, M., SUTCU, M. F., FAHIM, Z. & YOUNGQUIST, R. S. 1993. Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. *Contraception*, 47, 107-22.
- FAPBAI, Y., ZHOU, J., GUI, Z. & LI, L. 2006. Phase formation process, microstructure and magnetic properties of Y-type hexagonal ferrite prepared by citrate sol-gel auto-combustion method. *Materials Chemistry and Physics*, 98, 66-70.
- FEDULOV, A. V., LEME, A., YANG, Z., DAHL, M., LIM, R., MARIANI, T. J. & KOBZIK, L. 2008. Pulmonary Exposure to Particles during Pregnancy Causes Increased Neonatal Asthma Susceptibility. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 38, 57-67.
- FIGUEROLA, A., DI CORATO, R., MANNA, L. & PELLEGRINO, T. 2010. From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. *Pharmacological Research*, 62, 126-143.
- FRANÇA, L. R., AVELAR, G. F. & ALMEIDA, F. F. L. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, 63, 300-318.
- FRESHMAN, J. L., OLSON, P. N., AMANN, R. P., CARLSON, E. D., TWEDT, D. C. & BOWEN, R. A. 1990. The Effects of Methyltestosterone on Reproductive Function in Male Greyhounds. *Theriogenology*, 33, 1057-1073.
- FREUND, J., LIPTON, M. M. & THOMPSON, G. E. 1953. Aspermatogenesis in the Guinea Pig Induced by Testicular Tissue and Adjuvants. *Journal of Experimental Medicine*, 97, 711-&.
- GARCIA, T. X., COSTA, G. M. J., FRANCA, L. R. & HOFMANN, M. C. 2014. Sub-acute intravenous administration of silver nanoparticles in male mice alters Leydig cell function and testosterone levels. *Reproductive Toxicology*, 45, 59-70.
- GIANNACCINI, M., CUSCHIERI, A., DENTE, L. & RAFFA, V. 2014. Non-mammalian vertebrate embryos as models in nanomedicine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*.
- GIMENES, R., BALDISSERA, M. R., DA SILVA, M. R. A., DA SILVEIRA, C. A., SOARES, D. A. W., PERAZOLLI, L. A., DA SILVA, M. R. & ZAGHETE, M. A. 2012. Structural and magnetic characterization of $Mn_xZn_{1-x}Fe_2O_4$ ($x=0.2; 0.35; 0.65; 0.8; 1.0$) ferrites obtained by the citrate precursor method. *Ceramics International*, 38, 741-746.
- GOODPASTURE, J. C., BERGSTROM, K. & VICKERY, B. H. 1988. Potentiation of the gonadotoxicity of Cytoxan in the dog by adjuvant treatment with a luteinizing hormone-releasing hormone agonist. *Cancer Res*, 48, 2174-8.

- GOVOROV, A. O. & RICHARDSON, H. H. 2007. Generating heat with metal nanoparticles. *Nano Today*, 2, 30-38.
- GROMADZKA-OSTROWSKA, J., DZIENDZIKOWSKA, K., LANKOFF, A., DOBRZYNSKA, M., INSTANES, C., BRUNBORG, G., GAJOWIK, A., RADZIKOWSKA, J., WOJEWODZKA, M. & KRUSZEWSKI, M. 2012. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicology Letters*, 214, 251-258.
- GUBIN, S. P. 2009. *Magnetic Nanoparticles*.
- GUPTA, A. K. & GUPTA, M. 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26, 3995-4021.
- HANINI, A., SCHMITT, A., KACEM, K., CHAU, F., AMMAR, S. & GAVARD, J. 2011. Evaluation of iron oxide nanoparticle biocompatibility. *Int J Nanomedicine*, 6, 787-94.
- HANSEN, P. J. 2009a. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364, 3341-50.
- HANSEN, P. J. 2009b. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 364, 3341-3350.
- HESS, R. A. 1998. Spermatogenesis, Overview. In: NEILL, E. K. A. J. D. (ed.) *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego: Academic Press.
- HUANG, S. H. & JUANG, R. S. 2011. Biochemical and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles: a review. *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 4411-4430.
- IMMEGART, H. M. & THRELFALL, W. R. 2000. Evaluation of intratesticular injection of glycerol for nonsurgical sterilization of dogs. *Am J Vet Res*, 61, 544-9.
- JUNAIDI, A., WILLIAMSON, P. E., CUMMINS, J. M., MARTIN, G. B., BLACKBERRY, M. A. & TRIGG, T. E. 2003. Use of a new drug delivery formulation of the gonadotrophin-releasing hormone analogue Deslorelin for reversible long-term contraception in male dogs. *Reproduction Fertility and Development*, 15, 317-322.
- JUNG, M. J., MOON, Y. C., CHO, I. H., YEH, J. Y., KIM, S. E., CHANG, W. S., PARK, S. Y., SONG, C. S., KIM, H. Y., PARK, K. K., MCORIST, S., CHOI, I. S. & LEE, J. B. 2005. Induction of castration by immunization of male dogs with recombinant gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-canine distemper virus (CDV) T helper cell epitope p35. *J Vet Sci*, 6, 21-4.
- KASTELIC, J. P., COOK, R. B. & COULTER, G. H. 1997. Contribution of the scrotum, testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. *Anim Reprod Sci*, 45, 255-61.
- KAWADKAR, J., CHAUHAN, M. K. & MAHARANA, M. 2011. Nanobiotechnology: Application Of Nanotechnology In Diagnosis, Drug Discovery And Drug Development. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 4, 23-28.
- KIM, H. C., KIM, E., JEONG, S. W., HA, T. L., PARK, S. I., LEE, S. G., LEE, S. J. & LEE, S. W. 2015. Magnetic nanoparticle-conjugated polymeric micelles for combined hyperthermia and chemotherapy. *Nanoscale*, 7, 16470-80.
- KUCKELHAUS, S., REIS, S. C., CARNEIRO, M. F., TEDESCO, A. C., OLIVEIRA, D. M., LIMA, E. C. D., MORAIS, P. C., AZEVEDO, R. B. & LACAVAL, Z. G. M. 2004. In vivo investigation of cobalt ferrite-based magnetic fluid and magnetoliposomes using morphological tests. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 272, 2402-2403.
- KUMAR, C. S. & MOHAMMAD, F. 2011. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 63, 789-808.
- KUTZLER, M. & WOOD, A. 2006. Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, 66, 514-525.
- KWAK, B. K. & LEE, S. H. 2013. Intratesticular injection of hypertonic saline : non-invasive alternative method for animal castration model. *Dev Reprod*, 17, 435-40.

- LACOSTE, D., DUBE, D., TRUDEL, C., BELANGER, A. & LABRIE, F. 1989. Normal gonadal functions and fertility after 23 months of treatment of prepubertal male and female dogs with the GnRH agonist [D-Trp6, des-Gly-NH2(10)]GnRH ethylamide. *J Androl*, 10, 456-65.
- LADD, A., TSONG, Y. Y., WALFIELD, A. M. & THAU, R. 1994. Development of an Antifertility Vaccine for Pets Based on Active Immunization against Luteinizing-Hormone-Releasing Hormone. *Biology of Reproduction*, 51, 1076-1083.
- LAN, Z. & YANG, W. X. 2012. Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood-testis barrier. *Nanomedicine*, 7, 579-596.
- LEE, S. J., SCHOVER, L. R., PARTRIDGE, A. H., PATRIZIO, P., WALLACE, W. H., HAGERTY, K., BECK, L. N., BRENNAN, L. V. & OKTAY, K. 2006. American Society of Clinical Oncology Recommendations on Fertility Preservation in Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology*, 24, 2917-2931.
- LEOCI, R., AIUDI, G., SILVESTRE, F., LISSNER, E. A., MARINO, F. & LACALANDRA, G. M. 2015. Therapeutic Ultrasound as a Potential Male Dog Contraceptive: Determination of the Most Effective Application Protocol. *Reproduction in Domestic Animals*, 50, 712-718.
- LI, T. J., HUANG, C. C., RUAN, P. W., CHUANG, K. Y., HUANG, K. J., SHIEH, D. B. & YEH, C. S. 2013. In vivo anti-cancer efficacy of magnetite nanocrystal-based system using locoregional hyperthermia combined with 5-fluorouracil chemotherapy. *Biomaterials*, 34, 7873-7883.
- LO PRESTI, A., RUVOLO, G., GANCITANO, R. A. & CITTADINI, E. 2004. Ovarian function following radiation and chemotherapy for cancer. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 113, S33-S40.
- LU, A. H., LI, W. C., MATOUSSEVITCH, N., SPLIETHOFF, B., BONNEMANN, H. & SCHUTH, F. 2005. Highly stable carbon-protected cobalt nanoparticles and graphite shells. *Chem Commun (Camb)*, 98-100.
- LU, A. H., SALABAS, E. L. & SCHUTH, F. 2007. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie-International Edition*, 46, 1222-1244.
- LU, F. C. & KACEW, S. 2009. *Lu's Basic Toxicology: Fundamentals, Target Organs, and Risk Assessment, Fifth Edition*, Taylor and Francis.
- LUNNEN, J. E., FAULKNER, L. C., HOPWOOD, M. L. & PICKETT, B. W. 1974. Immunization of Dogs with Bovine Luteinizing-Hormone. *Biology of Reproduction*, 10, 453-460.
- MAHMOUDI, M., SIMCHI, A., IMANI, M., SHOKRGOZARD, M. A., MILANI, A. S., HAFELI, U. O. & STROEVE, P. 2010. A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 75, 300-309.
- MAKHLUF, S. B. D., QASEM, R., RUBINSTEIN, S., GEDANKEN, A. & BREITBART, H. 2006. Loading magnetic nanoparticles into sperm cells does not affect their functionality. *Langmuir*, 22, 9480-9482.
- MELLO-AIRES, M. 2008. *FISIOLOGIA*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- MENDES-DE-ALMEIDA, F., REMY, G. L., GERSHONY, L. C., RODRIGUES, D. P., CHAME, M. & LABARTHE, N. V. 2011. Reduction of feral cat (*Felis catus* Linnaeus 1758) colony size following hysterectomy of adult female cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 13, 436-440.
- MESFIN, G. M., MORRIS, D. F., SEAMAN, W. J. & MARKS, T. A. 1989. Testicular Lesions in Rats Treated with a Sympatholytic Hypotensive Agent (Losulazine). *Journal of the American College of Toxicology*, 8, 525-538.
- MILLER, R. K., KELLOGG, C. K. & SALTZMAN, R. A. 1987. Reproductive and perinatal toxicology. *Handbook of Toxicology*. Washington, DC:: Hemisphere.

- MODY, V., COX, A., SHAH, S., SINGH, A., BEVINS, W. & PARIHAR, H. 2014. Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor. *Applied Nanoscience*, 4, 385-392.
- MONGE-FUENTES, V., GARCIA, M. P., TAVARES, M. C. H., VALOIS, C. R. A., LIMA, E. C. D., TEIXEIRA, D. S., MORAIS, P. C., TOMAZ, C. & AZEVEDO, R. B. 2011. Biodistribution and biocompatibility of DMSA-stabilized maghemite magnetic nanoparticles in nonhuman primates (*Cebus* spp.). *Nanomedicine*, 6, 1529-1544.
- MOUTINHO, F. F. B., NASCIMENTO, E. R. D. & PAIXÃO, R. L. 2015. PERCEPÇÃO DA SOCIEDADE SOBRE A QUALIDADE DE VIDA E O CONTROLE POPULACIONAL DE CÃES NÃO DOMICILIADOS. *Ciência Animal Brasileira*, 16, 574-588.
- NAZ, R. K., GUPTA, S. K., GUPTA, J. C., VYAS, H. K. & TALWAR, G. P. 2005. Recent advances in contraceptive vaccine development: a mini-review. *Human Reproduction*, 20, 3271-3283.
- NAZ, R. K. & TALWAR, G. P. 1981. Immunological Sterilization of Male Dogs by Bcg. *International Journal of Andrology*, 4, 111-128.
- NELSON, S. M., MAHMOUD, T., BEAUX, M., SHAPIRO, P., MCILROY, D. N. & STENKAMP, D. L. 2010. Toxic and teratogenic silica nanowires in developing vertebrate embryos. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 6, 93-102.
- NEUMANN, F., DIALLO, F. A., HASAN, S. H., SCHENCK, B. & TRAORE, I. 1976. The influence of pharmaceutical compounds on male fertility. *Andrologia*, 8, 203-35.
- NOORI, A., PARIVAR, K., MODARESI, M., MESSRIPOUR, M., YOUSEFI, M. H. & AMIRI, G. R. 2011. Effect of magnetic iron oxide nanoparticles on pregnancy and testicular development of mice. *African Journal of Biotechnology*, 10, 1221-1227.
- O'DONNELL, L., NICHOLLS, P. K., O'BRYAN, M. K., MCLACHLAN, R. I. & STANTON, P. G. 2011. Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis*, 1, 14-35.
- OBERDORSTER, G., OBERDORSTER, E. & OBERDORSTER, J. 2005. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113, 823-839.
- 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, V. A. 2013. Intratesticular injection of a zinc-based solution for contraception of domestic cats: A randomized clinical trial of efficacy and safety. *Veterinary Journal*, 197, 307-310.
- OLIVEIRA, E. C. S., MOURA, M. R. P., DE SA, M. J. C., SILVA, V. A., KASTELIC, J. P., DOUGLAS, R. H. & MARQUES, A. P. 2012. Permanent contraception of dogs induced with intratesticular injection of a Zinc Gluconate-based solution. *Theriogenology*, 77, 1056-1063.
- PAGE, S. T., AMORY, J. K. & BREMNER, W. J. 2008. Advances in male contraception. *Endocrine Reviews*, 29, 465-493.
- PALMER, A. K. 1976. Assessment of Current Test Procedures. *Environmental Health Perspectives*, 18, 97-104.
- PANKHURST, Q. A., CONNOLLY, J., JONES, S. K. & DOBSON, J. 2003. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 36, R167-R181.
- PARIVAR, K., MALEKVAND FARD, F., BAYAT, M., ALAVIAN, S. M. & MOTAVAF, M. 2016. Evaluation of Iron Oxide Nanoparticles Toxicity on Liver Cells of BALB/c Rats. *Iran Red Crescent Med J*, 18, e28939.
- PARK, J. H., SARAVANAKUMAR, G., KIM, K. & KWON, I. C. 2010. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 28-41.
- PINEDA, M., REIMERS, T., FAULKNER, L., HOPWOOD, M. & SEIDEL JR, G. 1977. Azoospermia in dogs induced by injection of sclerosing agents into the caudae of the epididymides. *American journal of veterinary research*, 38, 831-838.

- PINEDA, M. H. & DOOLEY, M. P. 1984. Surgical and chemical vasectomy in the cat. *Am J Vet Res*, 45, 291-300.
- PORTILHO, F. A., ESTEVANATO, L. L. C., MIRANDA-VILELA, A. L., ALMEIDA-SANTOS, M. F. M., DE OLIVEIRA-CAVALCANTI, C. E., LACAVAL, B. M., SIMIONI, A. R., TEDESCO, A. C., MORAIS, P. C. & LACAVAL, Z. G. M. 2011. Investigation of a magnetohyperthermia system efficacy. *Journal of Applied Physics*, 109.
- PRÓSPERO, A. G., FIDELIS-DE-OLIVEIRA, P., QUINI, C. C., GOBBI, J. I. F., MATOS, J. F., ZUFELATO, N., BAKUZIS, A. F. & MIRANDA, J. R. A. 2015. Time of Permanence in the Bloodstream and Biodistribution of MnFe₂O₄ in Rats: Preliminary Results. In: BRAIDOT, A. & HADAD, A. (eds.) *VI Latin American Congress on Biomedical Engineering CLAIB 2014, Paraná, Argentina 29, 30 & 31 October 2014*. Cham: Springer International Publishing.
- PURSWELL, B. J. & KOLSTER, K. A. 2006. Immunocontraception in companion animals. *Theriogenology*, 66, 510-513.
- QI, W., BI, J., ZHANG, X., WANG, J., WANG, J., LIU, P., LI, Z. & WU, W. 2014. Damaging effects of multi-walled carbon nanotubes on pregnant mice with different pregnancy times. *Sci Rep*, 4, 4352.
- RASHAD, M. M., MOHAMED, R. M. & EL-SHALL, H. 2008. Magnetic properties of nanocrystalline Sm-substituted CoFe₂O₄ synthesized by citrate precursor method. *Journal of Materials Processing Technology*, 198, 139-146.
- RIESENBECK, A., KLEIN, R. & HOFFMANN, B. 2002. Downregulation, a new and reversible approach to eliminate testicular function in the dog. *Praktische Tierarzt*, 83, 512-520.
- ROBERTS, W. W., CHAN, D. Y., FRIED, N. M., WRIGHT, E. J., NICOL, T., JARRETT, T. W., KAVOUSSI, L. R. & SOLOMON, S. B. 2002a. High intensity focused ultrasound ablation of the vas deferens in a canine model. *J Urol*, 167, 2613-7.
- ROBERTS, W. W., WRIGHT, E. J., FRIED, N. M., NICOL, T., JARRETT, T. W., KAVOUSSI, L. R. & SOLOMON, S. B. 2002b. High-intensity focused ultrasound ablation of the epididymis in a canine model: a potential alternative to vasectomy. *J Endourol*, 16, 621-5.
- ROBERTSON, S. A. 2008. A review of feral cat control. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10, 366-375.
- RODRIGUES, H. F., MELLO, F. M., BRANQUINHO, L. C., ZUFELATO, N., SILVEIRA-LACERDA, E. P. & BAKUZIS, A. F. 2013. Real-time infrared thermography detection of magnetic nanoparticle hyperthermia in a murine model under a non-uniform field configuration. *International Journal of Hyperthermia*, 29, 752-767.
- ROSZEK, B., JONG, W. H. D. & GEERTSMA, R. E. 2005. Nanotechnology in medical applications: state-of-the-art in materials and devices. *The National Institute for Public Health and the Environment*. Bilthoven, The Netherlands.
- ROTI ROTI, J. L. 2008. Cellular responses to hyperthermia (40-46 degrees C): cell killing and molecular events. *Int J Hyperthermia*, 24, 3-15.
- SADHUKHA, T., WIEDMANN, T. S. & PANYAM, J. 2013. Inhalable magnetic nanoparticles for targeted hyperthermia in lung cancer therapy. *Biomaterials*, 34, 5163-71.
- SAILER, B. L., SARKAR, L. J., BJORDAHL, J. A., JOST, L. K. & EVENSON, D. P. 1997. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *Journal of Andrology*, 18, 294-301.
- 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, L. D. 1996. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: A consensus report. *Reproductive Toxicology*, 10, 237-244.

- SETCHELL, B. P. 1998. The Parkes Lecture Heat and the testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 114, 179-194.
- SETCHELL, B. P. 2006. The effects of heat on the testes of mammals. *Animal Reproduction*, 3, 81-91.
- SHAFIK, A. 1994. Prolactin Injection, a New Contraceptive Method - Experimental-Study. *Contraception*, 50, 191-199.
- SINGH, N., JENKINS, G. J., ASADI, R. & DOAK, S. H. 2010. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Rev*, 1.
- SUN, J., ZHANG, Q., WANG, Z. & YAN, B. 2013. Effects of nanotoxicity on female reproductivity and fetal development in animal models. *Int J Mol Sci*, 14, 9319-37.
- TAKEDA, K., SUZUKI, K. I., ISHIHARA, A., KUBO-IRIE, M., FUJIMOTO, R., TABATA, M., OSHIO, S., NIHEI, Y., IHARA, T. & SUGAMATA, M. 2009. Nanoparticles Transferred from Pregnant Mice to Their Offspring Can Damage the Genital and Cranial Nerve Systems. *Journal of Health Science*, 55, 95-102.
- TALWAR, G. P. & NAZ, R. K. 1981. Immunological Control of Male-Fertility. *Archives of Andrology*, 7, 177-185.
- TALWAR, G. P., NAZ, R. K., DAS, C. & DAS, R. P. 1979. Practicable Immunological Approach to Block Spermatogenesis without Loss of Androgens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 5882-5885.
- TEPSUMETHANON, V., WILDE, H. & HEMACHUDHA, T. 2005. Intratesticular injection of a balanced zinc solution for permanent sterilization of dogs. *J Med Assoc Thai*, 88, 686-9.
- TRAN, N. & WEBSTER, T. J. 2010. Magnetic nanoparticles: biomedical applications and challenges. *Journal of Materials Chemistry*, 20, 8760-8767.
- TRIGG, T. E., DOYLE, A. G., WALSH, J. D. & SWANGCHAN-UTHAI, T. 2006. A review of advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. *Theriogenology*, 66, 1507-1512.
- TRIGG, T. E., WRIGHT, P. J., ARMOUR, A. F., WILLIAMSON, P. E., JUNAI, A., MARTIN, G. B., DOYLE, A. G. & WALSH, J. 2001. Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. *Advances in Reproduction in Dogs, Cats and Exotic Carnivores*, 255-261.
- TSURUTA, J. K., DAYTON, P. A., GALLIPPI, C. M., O'RAND, M. G., STREICKER, M. A., GESSNER, R. C., GREGORY, T. S., SILVA, E. J., HAMIL, K. G., MOSER, G. J. & SOKAL, D. C. 2012. Therapeutic ultrasound as a potential male contraceptive: power, frequency and temperature required to deplete rat testes of meiotic cells and epididymides of sperm determined using a commercially available system. *Reprod Biol Endocrinol*, 10, 7.
- VALDIGLESIAS, V., KILIC, G., COSTA, C., FERNANDEZ-BERTELEZ, N., PASARO, E., TEIXEIRA, J. P. & LAFFON, B. 2015. Effects of iron oxide nanoparticles: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Environ Mol Mutagen*, 56, 125-48.
- VANDEVOORT, C. A. & TOLLNER, T. L. 2012. The efficacy of ultrasound treatment as a reversible male contraceptive in the rhesus monkey. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10.
- VERMA, A., GOEL, T. C., MENDIRATTA, R. G. & KISHAN, P. 2000. Magnetic properties of nickel-zinc ferrites prepared by the citrate precursor method. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 208, 13-19.
- VICKERY, B. H., MCRAE, G. I., BRIONES, W. V., ROBERTS, B. B., WORDEN, A. C., SCHANBACHER, B. D. & FALVO, R. E. 1985. Dose-Response Studies on Male Reproductive Parameters in Dogs with Nafarelin Acetate, a Potent Lhrh Agonist. *Journal of Andrology*, 6, 53-60.
- WANG, C., MCDONALD, V., LEUNG, A., SUPERLANO, L., BERMAN, N., HULL, L. & SWERDLOFF, R. S. 1997. Effect of increased scrotal temperature on sperm production in normal men. *Fertility and Sterility*, 68, 334-339.

- WANG, J., CHEN, Y., CHEN, B. A., DING, J. H., XIA, G. H., GAO, C., CHENG, J. A., JIN, N., ZHOU, Y., LI, X. M., TANG, M. & WANG, X. M. 2010. Pharmacokinetic parameters and tissue distribution of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles in mice. *International Journal of Nanomedicine*, 5, 861-866.
- WEBSTER, T. J. 2010. *Nanotechnology Enabled In situ Sensors for Monitoring Health*, Springer New York.
- WIWANITKIT, V., SEREEMASPUN, A. & ROJANATHANES, R. 2009. Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: the first world report. *Fertility and Sterility*, 91, E7-E8.
- YOSHIDA, S., HIYOSHI, K., ICHINOSE, T., TAKANO, H., OSHIO, S., SUGAWARA, I., TAKEDA, K. & SHIBAMOTO, T. 2009. Effect of nanoparticles on the male reproductive system of mice. *International Journal of Andrology*, 32, 337-342.