

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

MARIANA SIMÕES GARCIA

**EFEITO DE EXPOSIÇÃO PRECOCE A BAIXAS
DOSES DE METILMERCURIO E BISFENÓIS
POLICLORINADOS SOBRE PARÂMETROS DE
ESPERMATOGENESE E SOBRE A FORMAÇÃO DE
CORPOS CROMATÓIDES EM RATOS**

BAURU
2016

MARIANA SIMÕES GARCIA

**EFEITO DE EXPOSIÇÃO PRECOCE A BAIXAS
DOSES DE METILMERCURIO E BISFENÓIS
POLICLORADOS SOBRE PARÂMETROS DE
ESPERMATOGENESE E SOBRE A FORMAÇÃO DE
CORPOS CROMATÓIDES EM RATOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação da Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti.

BAURU
2016

G2161e	<p data-bbox="535 1377 1287 1417">Garcia, Mariana Simões</p> <p data-bbox="535 1438 1287 1585">Efeito de exposição precoce a baixas doses de Metilmercúrio e Bisfenóis Policlorados sobre parâmetros de espermatogênese e sobre a formação de Corpos Cromatóide em ratos / Mariana Simões Garcia. -- 2016. 42f. : il.</p> <p data-bbox="535 1638 1287 1669">Orientadora: Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti.</p> <p data-bbox="535 1690 1287 1753">Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.</p> <p data-bbox="535 1774 1287 1869">1. Metilmercúrio. 2. Aroclor. 3. Espermatogênese. 4. Chromatoid Body. 5. Fertilidade. I. Peruquetti, Rita Luiza. II. Título.</p>
--------	--

MARIANA SIMÕES GARCIA

**EFEITO DE EXPOSIÇÃO PRECOCE A BAIXAS DOSES DE
METILMERCURIO E BISFENÓIS POLICLORADOS SOBRE
PARAMETROS DE ESPERMATOGENESE E SOBRE A FORMAÇÃO
DE CORPOS CROMATÓIDES EM RATOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação da Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti.

Banca examinadora

Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini
Unesp/FC

Bauru, 29 de novembro de 2016.

À Marília Montalvão Simões, minha melhor amiga, minha companheira e porto seguro, por toda a sua paciência, seu apoio e principalmente, compreensão. Obrigada por sonhar comigo, por acreditar que poderia dar certo, vibrar com cada conquista e não me deixar desistir. Essência da minha vida. Mãe, obrigada. Espero recompensar com conquistas ainda maiores.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Profa. Dra. Juliana E. Perobelli, por seus conselhos, que se tornaram um projeto, onde construímos uma amizade na base da confiança, que resultou em toda uma mudança na minha vida profissional. Apresentou-me um mundo que eu não conhecia, e se tornou uma grande amiga.

Agradeço, em segundo lugar, a minha amada Profa. Dra. Rita L. Peruquetti, que me aceitou de braços abertos, com sua paciência e todo amor, confiou a mim tantos protocolos, onde alcançamos resultados interessantes. Todo seu ensinamento me ajudará a alcançar voos mais altos no meu futuro profissional. Todo meu amor do mundo para você, profe!

Essa equipe, com a ajuda de outras pessoas, me possibilitou desenvolver um trabalho maravilhoso, com muitos resultados, onde poderemos nos aprofundar para futuras publicações e reconhecimento.

Agradeço, ainda, ao biólogo Wilson Orcini, meu grande companheiro e amigo de horas de bancada, torcendo sempre pelos resultados e sempre disposto a me ajudar. Muito obrigada Will!!

RESUMO

O *chromatoid body* (CB) é uma estrutura citoplasmática de células germinativas masculinas. Todas as evidências indicam que esta estrutura citoplasmática possui um papel na regulação da transcrição de RNAm durante a espermatogênese. Portanto, como a formação e o funcionamento do CB é um evento essencial para a progressão da espermatogênese, que por sua vez pode ser afetado pela exposição à contaminantes ambientais, como o Metilmercúrio (MeHg) e o Aroclor (mistura comercial de Bisfenil Policlorados [PCBs]) associados e em baixas doses, uma avaliação da organização estrutural e molecular dos CBs de animais expostos a esses contaminantes traria informações importantes à área de toxicologia ambiental. Os objetivos principais deste trabalho foram investigar se a exposição de pré-púberes a soluções que contenham Bisfenil Policlorados (PCB) e Metilmercúrio (MeHg), isolados e associados em doses baixas, provoca efeitos imediatos e/ou em longo prazo sobre a organização morfológica e molecular de CBs no epitélio germinativo de ratos. 87 ratos Wistar machos, com 21 dias de idade, foram divididos em 5 grupos: G1 (n = 17, controle negativo), G2 (n = 17, MeHg puro), G3 (n = 17, Aroclor puro), G4 (n = 18, Mistura 1), G5 (n = 18, Mistura 2). Os animais foram tratados diariamente desde o dia pós-natal (DPN) 23 até o dia pós-natal (DPN) 53, por gavagem. No DPN 53 metade dos animais foram eutanasiados. Houve um intervalo de 62 dias sem exposição a produtos químicos e em seguida a outra metade dos animais foram eutanasiados no DPN 115. Nos juvenis (DPN53) houve um aumento na quantidade de proteínas marcadoras de CB (MVH e HSP70) nos túbulos seminíferos dos animais dos grupos G2 e, também, uma queda nas quantidades de outra proteína marcadora de CB (MIWI) e de LXR $\alpha\beta$ nos túbulos seminíferos dos grupos G4. Esses desbalanços parecem não terem afetado diretamente a estrutura dos CBs, visto que os grupos que apresentaram redução da área de CBs foram os animais dos grupos G3, G4 e G5. Os adultos (DPN115) parecem ter sofrido os efeitos da condição experimental utilizada no presente estudo, sendo que o grupo G3 apresentou uma redução mais severa na área de CBs, em conjunto com a redução de outros parâmetros reprodutivos. Estas observações nos permitem sugerir que em longo prazo os dois agentes tóxicos utilizados no presente trabalho parecem exibir mais efeitos deletérios para a espermatogênese quando administrados isoladamente do que quando administrados em conjunto e que o Aroclor foi o mais prejudicial para a organização de CBs.

Palavras-chaves: Metilmercúrio; Aroclor; Espermatogênese; *Chromatoid body*; Fertilidade

ABSTRACT

The chromatoid body (CB) is a cytoplasmic structure of male germ cells. All evidence indicates that this cytoplasmic structure plays a role in the regulation of mRNA transcription during spermatogenesis. Therefore, as the formation and functioning of the CB is an essential event for the progression of spermatogenesis, which in turn can be affected by exposure to environmental contaminants such as Methylmercury (MeHg) and Aroclor (commercial mixture of Biphenyl Polychlorates [PCBs]), an evaluation of the structural and molecular organization of the CBs of animals exposed to these contaminants would bring important information to the area of environmental toxicology. The main objectives of this study were to investigate whether pre-pubertal exposure to solutions containing Bifenil Polychlorinated (PCB) and Methylmercury (MeHg) isolated and associated in low doses causes immediate and / or long-term effects on the morphological and molecular organization of CBs in the germinal epithelium of rats. Male Wistar rats were divided into 5 groups: G1 (n = 17, negative control), G2 (n = 17, MeHg pure), G3 (n = 17, pure Aroclor), G4 = 18, Mixture 1), G5 (n = 18, Mixture 2). The animals were treated daily from the postnatal day (PND) 23 until the postnatal day (PND) 53, by gavage. In the PND 53 half of the animals were euthanized. There was an interval of 62 days without exposure to chemicals and then the other half of the animals were euthanized in the PND 115. In the juveniles (PND53) there was an increase in the amount of CB marker proteins (MVH and HSP70) in the seminiferous tubules of the animals of G2 groups and also a decrease in the amounts of another CB protein marker (MIWI) and LXR $\alpha\beta$ protein in the seminiferous tubules of G4 groups. These unbalances do not seem to have directly affected the structure of the CBs, since the groups that presented reduction of the area of CBs were the animals of groups G3, G4 and G5. Adults (PND 115) appear to have suffered the effects of the experimental condition used in the present study, and the G3 group presented a more severe reduction in the area of CBs, together with the reduction of other reproductive parameters. These observations allow us to suggest that in the long run the two toxic agents used in the present work seem to exhibit more deleterious effects for spermatogenesis when administered alone than when given together and that Aroclor was the most detrimental to the organization of CBs.

Key-words: Methylmercury; Aroclor; Spermatogenesis; Chromatoid body; Fertility

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO e JUSTIFICATIVA	10
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1	ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	15
3.2	AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO PREPUCIAL.....	16
3.3	EVOLUÇÃO DO PESO CORPÓREO DOS ANIMAIS	16
3.4	EUTANÁSIA	17
3.4.1	Primeira Eutanásia – Avaliação Imediata	17
3.4.2	Segunda Eutanásia – Avaliação Tardia	17
3.5	ANÁLISE DA MOTILIDADE, MORFOLOGIA E VIABILIDADE DOS ESPERMATOZÓIDES.....	18
3.6	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DOS ANIMAIS DPN53 E IMUNOBLOT	18
3.7	IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA ANÁLISES MORFOLÓGICAS E NUMÉRICAS DE CBS EM ESPERMÁTIDES INICIAIS DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DOS ANIMAIS DPN53 E DPN115.....	19
3.8	FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	20
4	RESULTADOS	21
4.1	ANÁLISE DA MOTILIDADE E MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES DOS ANIMAIS DPN115	21
4.2	CONTAGEM ESPERMÁTICA NO TESTÍCULO DOS ANIMAIS DPN115	24
4.3	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DOS ANIMAIS DPN53 E IMUNOBLOT	25
4.4	IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA ANÁLISES MORFOLÓGICAS DE CBS.....	28
5	DISCUSSÃO	31
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
	REFERÊNCIAS	37
	ANEXO A – CEUA	42

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, a exposição contínua da população humana a misturas complexas de substâncias potencialmente tóxicas tem sido objeto de crescente interesse na comunidade científica. Dentre estes compostos, o metilmercúrio (MeHg) e os bisfenóis policlorados (PCBs) merecem atenção especial, uma vez que são agentes tóxicos persistentes no ambiente e se acumulam na cadeia alimentar. A principal fonte de exposição da população é através do consumo de peixes e outros frutos do mar contaminados (Mahaffey et al., 2009, Oken et al., 2012, Chen, 2012, Sunderland & Salin, 2013). Uma vez que o MeHg e os PCBs frequentemente ocorrem juntos no ambiente, as possíveis formas de interação destes químicos, tais como efeitos aditivos, sinérgicos ou antagonistas, devem ser amplamente investigadas (Cory-Slechta, 2005).

Sabe-se que praticamente todas as espécies de peixe estão contaminadas por poluentes ambientais, em maior ou menor grau. Como consequência, quanto maior o consumo destes alimentos, maior a exposição individual ao MeHg e outros poluentes como os PCBs (Oken et al., 2012). Neste contexto, são necessários estudos que definam as possíveis consequências dessa exposição conjunta sobre os diferentes sistemas e órgãos, utilizando doses relevantes e próximas à exposição ambiental.

O Metilmercúrio (MeHg) é uma forma orgânica do mercúrio inorgânico, convertido pela ação de microorganismos aquáticos (NRC, 2000). A ingestão de MeHg ocorre principalmente através de peixes e outros animais aquáticos. Estudos relataram efeitos adversos da exposição ao MeHg sobre parâmetros reprodutivos no homem e em animais experimentais, incluindo perda de libido, disfunção erétil, hipospermia, apoptose de células germinativas levando a atrofia testicular, baixa níveis de testosterona sérica e infertilidade. Estima-se que 95% do MeHg presente em peixes seja completamente absorvidos pelo organismo humano. Apesar disso, os potenciais efeitos adversos sobre o sistema reprodutor masculino ainda necessitam de maiores investigações (Da Silva et al., 2011).

Segundo um estudo realizado para ser apresentado na Convenção de Estocolmo, os Bisfenóis Policlorados (PCBs) são compostos aromáticos clorados cuja família é constituída por cerca de 710 compostos diferentes. Os produtos comerciais fabricados à base de PCBs são líquidos isolantes elétricos constituídos, e

assim apresentam boas características dielétricas e grande estabilidade térmica e química, motivo pelo qual constituíram a maior aplicação das PCBs (Convenção de Estocolmo, 2004).

Os PCBs, que ocorrem juntamente com o MeHg (Weihe et al., 1996), foram produzidos em larga escala nas décadas de 70 e 80. Porém, sua resistência à degradação e sua alta dispersão global pelo ar e oceanos fizeram deles importantes poluentes ambientais (Polder et al., 2009; Lignell et al., 2009). Normalmente a exposição humana se dá a baixas doses e por períodos prolongados (Haave et al., 2011). Mesmo baixos níveis de PCBs, como aqueles normalmente encontrados em alguns tecidos humanos e no leite materno, são capazes de acarretar efeitos adversos sobre parâmetros reprodutivos e do desenvolvimento (Emmett et al., 1988). Os PCBs são produzidos comercialmente como Aroclor, uma mistura de PCBs (Strużyńska et al., 2012). A administração desta mistura, em condições experimentais, acarretou diminuição nos níveis de hormônios tireoidianos, mesmo em baixas doses, além de causar redução significativa nas reservas espermáticas na cauda do epidídimo (Gray et al., 1993).

Apesar da conhecida necessidade de se investigar a exposição associada do MeHg a outros poluentes como os PCBs, o número de estudos que abordam esta problemática ainda é limitado. Além disso, atenção especial é dada a parâmetros neurocomportamentais e à exposição de indivíduos adultos ou durante a vida pré-natal e lactacional. Neste contexto, observa-se uma escassez de estudos que investiguem aspectos reprodutivos após exposição ao MeHg e PCBs associados, principalmente em modelos de exposição durante a pré e peri-adolescência.

É muito importante que se dê atenção especial à exposição a agente tóxico durante a infância, pois é nesta fase que o indivíduo está em contato, pela primeira vez, com contaminantes ambientais sem o intermédio do metabolismo materno. Por isso, estudos investigando a exposição direta de crianças a agentes químicos potencialmente tóxicos podem originar informações valiosas na caracterização de impactos tardios sobre a vida adulta do indivíduo (Veldhuis et al., 2006). Além disso, os períodos de pré- e peri-adolescência são considerados fases muito importantes para o desenvolvimento sexual masculino, uma vez que é um período de rápidas e interativas mudanças endócrinas e morfológicas (Stoker et al., 2000).

A capacidade reprodutiva do indivíduo está diretamente ligada a diversos eventos de maturação que incluem a diferenciação sexual do cérebro. Alterações

dos níveis de esteroides durante períodos importantes do desenvolvimento podem desregular a maturação puberal e a função gonadal ao longo da vida (Maranghi & Mantovani, 2012). Uma vez que o sistema reprodutivo dos roedores compartilha diversas características com os humanos, eles têm sido extensivamente utilizados como modelos em estudos toxicológicos e biológicos que objetivam esclarecer mecanismos do desenvolvimento e função reprodutiva de mamíferos, incluindo aspectos de instalação da puberdade (Maranghi & Mantovani, 2012). Devido à importância do período pré-puberal na toxicologia do desenvolvimento, o EPA definiu protocolos para estudos de toxicidade juvenil, que visam determinar mecanismos de toxicidade específicos para organismos imaturos, definir estágios mais sensíveis de exposição e as possíveis consequências permanentes até a idade adulta (Stoker et al., 2000; De Schaepdrijver et al., 2008; Zorrilla et al., 2010;).

O *chromatoid body* (CB) é uma estrutura citoplasmática de células germinativas masculinas que foi descrita há aproximadamente 130 anos, como sendo um dos seis tipos de 'nuage' específicos deste tipo celular. 'Nuages' são geralmente compostos por vários componentes proteicos e não proteicos, incluindo RNA helicases, e o CB acumula tanto componentes comuns a estas estruturas quanto outros componentes diversos (Yokota, 2012). O CB apresenta-se como um grânulo citoplasmático de forma irregular que pode ser observado no citoplasma de espermatócitos primários e de espermátides iniciais sendo que nos espermatócitos essa estrutura apresenta-se em número variável, porém nas espermátides iniciais é observado como um grânulo único (Kotaja & Sassone-Corsi, 2007).

Todas as evidências indicam que esta estrutura citoplasmática possui um papel na regulação da transcrição de RNAm durante a espermatogênese, além de participar no controle da expressão gênica por meio do comando da ação de pequenos RNAs não codificantes (RNAmi e RNApi) (Kotaja & Sassone-Corsi, 2007; Nagamori & Sassone-Corsi, 2008; Meikar et al., 2011). Além disto, estudos recentes tem demonstrado que todo esse metabolismo de RNAm mediado por pequenos RNAs não codificantes executado pelo CB é crucial para que o processo de espermatogênese progrida de maneira apropriada, garantindo a formação da célula reprodutora masculina madura (Meikar et al., 2013; Yadav & Kotaja, 2014). Outras evidências apontam para a importância da ação do CB para o processo de espermatogênese, como por exemplo, a detecção de que a presença de mutações ou até mesmo a ausência de algumas proteínas, que são constituintes do CB, como

as proteínas TDR1/MTR-1, MVH e MIWI e no antígeno de histocompatibilidade OX3, causam esterilidade em ratos (Head & Kresge, 1985; Chuma et al., 2006; Deng & Lin, 2002; Toyooka et al., 2000).

As proteínas MIWI e MVH são as mais abundantes e importantes na fisiologia do CB (Meikar et al., 2014). MIWI (*mouse Argonaute/PIWI family RNA-binding proteins*) é uma proteína membro da família Argonauta, que se expressa somente em células da linhagem germinativa para reprimir a expressão de elementos moveis do genoma das células da linhagem reprodutora. Esse tipo de proteínas da família Argonauta são conhecidas por participarem de processos de repressão da expressão gênica por meio da regulação da estabilidade do RNAm e/ou da tradução, via miRNAs e piRNAs (Ender & Meister, 2010). MVH (*mouse VASA homologue*) é uma proteína da família de RNA helicase DEAD-box ATP-dependente essencial para a progressão da espermatogênese (Toyooka et al., 2000; Kim et al., 2015) e que tem o papel de regular ativamente a transcrição de RNAs estocados no CB durante a espermiogênese (Nagamori et al., 2008). As *Heat Shock Proteins* (HSPs) são um grupo de proteínas funcionalmente relacionadas, que são classificadas primariamente de acordo com o seu peso molecular: HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100 e pequenas HSPs (Hartl et al., 2011). A função básica das HSPs é reconhecer seletivamente proteínas em sua conformação não nativa. (Shiber & Ravid, 2014).

LXR é uma proteína que é responsável pela proteção de células da sobrecarga de colesterol, estimulando assim a expressão de enzimas transportadoras de colesterol e a conversão do mesmo em ácidos biliares e a excreção biliar (Betowski & Semczukb, 2010). Além disso, LXR ativa a lipogênese aumentando a expressão da proteína SREBP-1, que por sua vez controla genes chaves envolvidos na biossíntese de ácidos graxos contribuindo para a progressão da gametogênese e para a esteroidogênese nas gônadas (Horton et al., 2002).

Portanto, como a formação e o funcionamento do CB é um evento essencial para a progressão da espermatogênese, que por sua vez é um fator que pode ser afetado pela exposição aos compostos que são contaminantes ambientais utilizados nos tratamentos do presente trabalho, uma avaliação da organização estrutural e molecular dos CBs dos animais de todos os grupos experimentais deste projeto traria informações enriquecedoras aos resultados finais do estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo visou investigar se a exposição pré-puberal ao MeHg e PCBs associados e em baixas doses causa repercussões imediatas e/ou tardias sobre a organização morfológica e molecular de CBs no epitélio germinativo de ratos machos, bem como sobre outros parâmetros reprodutivos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar alguns parâmetros reprodutivos gerais nos animais adultos (115 dias de idade), após exposição ao MeHg e Aroclor associados e em baixas doses durante a fase pré-puberal, como: motilidade espermática, morfologia e número de espermatozoides.
2. Investigar se a exposição ao MeHg e Aroclor associados e em baixas doses durante a fase pré-puberal provoca alteração morfológicas/estruturais (número, tamanho e forma) imediata e tardia em CBs de células germinativas pós-meióticas em túbulos seminíferos nos estágios IV-VI do ciclo espermatogênico.
3. Investigar se a exposição ao MeHg e Aroclor associados e em baixas doses durante a fase pré-puberal provoca alteração imediata na expressão de proteínas que estão amplamente localizadas na composição molecular de CBs (MVH, HSP70, MIWI) possuindo diferentes papéis para a manutenção da fisiologia desta organela, bem como da proteína LXR $\alpha\beta$, que possui função da regulação da esteroidogênese das células do epitélio germinativo pois controla genes chaves envolvidos na biossíntese de ácidos graxos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram adquiridas 23 ratas prenhes da linhagem *Wistar* do Biotério da Universidade do Sagrado Coração. Ao nascimento, foi realizada a sexagem dos filhotes por comparação da distância anogenital e redução do número de filhotes por ninhada, uma redução de 8 filhotes por rata, garantindo assim uma nutrição equilibrada. Prioridade foi dada na manutenção dos filhotes machos. Ao final do período de lactação, ou seja, no dia do desmame (dia pós-natal 21 – DPN21), as mães, bem como os filhotes fêmeas, foram encaminhados para eutanásia, sendo mantidos somente os filhotes machos.

Assim, obtivemos no total 87 animais machos. Os animais foram mantidos no biotério durante toda sua fase de crescimento, alocados em gaiolas de polietileno com substrato de maravalha, em condições de luminosidade controlada (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e temperatura média de 23°C. Os animais receberam água e ração para roedores à vontade. Todas as condições ambientais do Biotério foram rigorosamente controladas durante todo o experimento. O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sagrado Coração (Protocolo nº 30/13).

Os ratos machos foram distribuídos em cinco grupos aleatoriamente, conforme especificado na Tabela 1. Como havia ratos irmãos, nos asseguramos que em cada grupo experimental somente ficassem dois ratos irmãos, assim poderíamos eutanasiar em dias diferentes, ou seja, um irmão foi eutanasiado no DPN 53 e o outro no DPN 115. É importante destacar que, para cada grupo, foram criadas caixas com 3 a 5 animais, respeitando o espaço e as condições favoráveis para o desenvolvimento do animal.

As doses escolhidas de MeHg (solução comercial, Merck®) são consideradas baixas doses e foram baseadas em estudos prévios (Passos et al., 2008, Grotto et al., 2011, Guo et al., 2013). A escolha das doses de Aroclor (Sigma Aldrich®) foi baseada na dose NOAEL (*no observed adverse effect level*) deste composto (Gray et al., 1993). O MeHg foi diluído em água destilada e o Aroclor em óleo de milho (volume de 1ml/Kg). O tratamento dos machos foi realizado do DPN 23 ao DPN 53, de acordo com protocolo sugerido pela agência de proteção ambiental dos Estados

Unidos da América (US EPA, 2004), para estudo de toxicidade juvenil. Os animais foram pesados e receberam o tratamento todos os dias, durante 30 dias, sempre no período da manhã.

Tabela 1: Grupos experimentais

<i>Grupos</i>	
<i>Experimentais</i>	
Grupo 1 (G1, n=17)	Controle Negativo. Receberam apenas o veículo (óleo de milho)
Grupo 2 (G2, n=17)	Controle MeHg. Receberam apenas o MeHg, na dose de 0,5mg/Kg/dia
Grupo 3 (G3, n=17)	Controle Aroclor. Receberam apenas o Aroclor, na dose de 1mg/Kg/dia
Grupo 4 (G4, n=18)	Mistura 1: MeHg (0,05mg/Kg/dia) + Aroclor (0,1mg/Kg/dia)
Grupo 5 (G5, n=18)	Mistura 2: MeHg (0,5 mg/Kg/dia) + Aroclor (1,0 mg/Kg/dia)

3.2 AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO PREPUCIAL

Os animais passaram por exames diários a partir do DPN 30 aplicando-se retratação manual do prepúcio para investigação da separação prepucial, considerado um parâmetro físico indicativo de instalação de puberdade (Parker, 2006).

3.3 EVOLUÇÃO DO PESO CORPÓREO DOS ANIMAIS

Durante o tratamento, todos os animais do experimento foram pesados diariamente antes de receber seu respectivo tratamento por gavagem para que a dose pudesse ser ajustada ao peso corpóreo. Após o DPN 53, final do tratamento e eutanásia de parte dos animais, os animais remanescentes foram mantidos até o DPN 115 e pesados a cada dois dias. Estes animais foram eutanasiados após 62 dias sem exposição ao MeHg e Aroclor, intervalo (entre o DPN 53 e DPN 115) que corresponde a uma espermatogênese completa, cuja duração varia de 52 a 53,2 dias, dependendo da linhagem de rato utilizado (Clermont, 1972), e um trânsito

espermático completo através do epidídimo, que apresenta duração aproximada de oito dias em ratos (Amann et al., 1976; França et al., 2005).

3.4 EUTANÁSIA

3.4.1 Primeira Eutanásia – Avaliação Imediata

Ao completar o DPN 53, parte dos animais foi eutanasiada (n= 8 ratos/grupo experimental), para avaliação imediata do peso de órgãos, parâmetros histomorfométricos dos testículos e epidídimo. Os ratos foram anestesiados com associação de xilasina (5mg/kg) com quetamina (50mg/kg), sendo decapitados posteriormente. Os testículos e epidídimos direitos foram imersos em solução fixadora Bouin (30% formaldeído, 70% solução saturada de ácido pícrico, 5% ácido acético glacial). Após uma pré-fixação de 4 horas os órgãos foram fragmentados, seguindo nesta mesma solução até completarem 24h. Após este período, trocou-se a solução fixadora por álcool 70%, até o momento do processamento completo das peças. O processamento histológico consistiu na inclusão do material em paraplast e obtenção de cortes com 5µm de espessura. O testículo e o epidídimo esquerdos foram congelados em nitrogênio líquido, para posterior utilização. Os testículos foram decapsulados e os túbulos seminíferos de cada testículo foram colocados em tubos de 1,5ml, separadamente, e imediatamente congelados em nitrogênio líquido.

3.4.2 Segunda Eutanásia – Avaliação tardia

Ao completarem o DPN 115, os animais remanescentes foram eutanasiados para avaliação tardia do peso de órgãos, parâmetros histomorfométricos dos testículos e epidídimos direitos, conforme descrito no 3.4.1. Adicionalmente, o ducto deferente esquerdo dos animais foi retirado e cuidadosamente lavado com o meio HTF modificado (*“human tubal fluid”*) para obtenção de espermatozoides a serem avaliados quanto a sua motilidade, viabilidade e morfologia. Os testículos e epidídimos esquerdos destes animais foram retirados, limpos e congelados para futura contagem de células germinativas.

3.5 ANÁLISE DA MOTILIDADE E MORFOLOGIA E VIABILIDADE DOS ESPERMATOZÓIDES

A cauda epididimária esquerda foi retirada e colocada sobre uma placa de Petri pequena contendo 2 mL de meio HTF modificado com gentamicina (*Human Tubal Fluid*, IrvineScientific®) a 34°C. Uma alíquota de 10µL da suspensão de espermatozoides em meio HTF foi colocada em câmara de Neubauer e analisada sob microscopia de contraste de fase. Foram avaliados 100 espermatozoides por animal, classificados quanto a sua motilidade em: Tipo A: móvel, com trajeto progressivo; tipo B: móvel, com trajeto não progressivo; tipo C: imóvel (Perobelli et al., 2010).

3.6 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DOS ANIMAIS DPN53 E IMUNOBLLOT

Túbulos seminíferos provenientes de 1 testículo de cada animal no DPN53 de cada grupo experimental (8 amostra/grupo) foram homogeneizados em 1ml de tampão RIPA, contendo inibidores (NaF 1M, *Cocktail* inibidor de protease completo – Roche Diagnostics e PMSF 0.1M). Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 14000xg, por 15 minutos, a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi removido e transferido para novos tubos. A quantificação das proteínas totais extraídas foi realizada pelo método Bradford, utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®). Para que o espectrofotômetro realizasse a normalização das proteínas presentes nas amostras, foi necessária a diluição de 100 µl de amostra com 800 µl de tampão RIPA (concentração de 8:1). As proteínas foram diluídas em tampão RIPA com inibidores, para homogeneização das quantidades, e em seguida diluídas em 2x Laemmli Buffer e armazenadas a -20°C.

Para preparação para o *imunoblot* foi obtido um *pool* das amostras dos animais de cada grupo experimental, para que todos os animais contribuíssem igualmente para a análise comparativa entre os grupos. Para a realização do *imunoblot*, cerca de 16µg de extrato de proteínas foram separadas em gel 10% SDS-poliacrilamida e transferidas para uma membrana de polivinilideno por meio de *eletroblotting*. Em seguida, as membranas foram lavadas com PBST e incubadas por

1 hora, a temperatura ambiente, em leite desnatado 5%/PBST, para bloqueio de marcações inespecíficas. Após incubação, as membranas foram novamente lavadas em PBST e incubadas com anticorpos primários α DDX4 (MVH): Ab27591 (Abcam); PIWIL1 (N-17): sc-22685; HSP 70 (K-20): sc-1060; LXR $\alpha\beta$ (H-7): sc-377260; α -tubulina (T5168) (Sigma Aldrich), diluídos em leite desnatado 5%/PBST, e incubadas a 4°C, *overnight*. Após incubação com anticorpo primário as membranas foram novamente lavadas em PBST e, em seguida, incubadas com anticorpos secundários: HRP rabbit anti-mouse-Invitrogen 616520 e HRP donkey anti-goat IgG: sc-2020, diluídos em leite desnatado 5%/PBST, por 1 hora, a temperatura ambiente. Finalmente, as membranas foram lavadas em PBST, secas e reveladas por meio de filmes fotográficos. A expressão da tubulina será utilizada como controle da reação para padrão de comparação.

Após a revelação dos *imunoblots* a área da banda observada para cada proteína analisada em cada grupo experimental foi mensurada para determinação da quantidade relativa de proteína, utilizando-se o programa Image J – *Image Processing and Analysis in Java*, Versão 1.51e (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Os valores das quantidades relativas de cada proteína foram comparados entre cada grupo experimental utilizando o teste Kruskal-Wallis ANOVA, com o software StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (*data analysis software system*), version 10. As análises estatísticas foram baseadas em Zar (1999) e a diferença estatística foi considerada quando $p \leq 0,05$.

3.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA ANÁLISES MORFOLÓGICAS E NUMÉRICAS DE CBS EM ESPERMÁTIDES INICIAIS DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DOS ANIMAIS DPN53 E DPN115

Para a imunofluorescência, foram preparadas lâminas histológicas do testículo dos animais DPN53 e DPN115, que se encontram fixados e incluídos em blocos de parafina. Com o uso de Xilol e Álcool as laminas foram desparafinizadas e, logo em seguida, colocadas em PFA/PBS 4% e Triton X100/PBS 0,2%, lavadas em PBS 1X. Após, as laminas permaneceram 1 hora no BSA/PBS 5% (100 μ l por lamina) e posteriormente foram incubadas em anticorpo primário (α DDX4 (MVH):

Ab27591 (Abcam) ou PIWIL1 (N-17): sc-22685), diluídos em BSA (1 μ l:100 μ l), em câmara úmida, *overnight* (4°C), para detecção dos CBs.

No dia seguinte, após lavar as lâminas em PBST 1X, o material foi incubado nos anticorpos secundários (Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse - A-11017; ou Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Goat - A-11055), diluído em BSA/PBS 5% (1 μ l:100 μ l), por 1 hora em temperatura ambiente. Após, adicionou-se a solução DAPI (diluída 1 μ l DAPI em 500 μ l de PBS 1X). Após as laminas foram lavadas em PBS 1X, uma gota de Santa Cruz Mounting Medium foi acrescentada e o material protegido com uma lamínula.

Foram analisados aproximadamente 50 CBs em espermátides iniciais de túbulos seminíferos nos estágios I-VI do ciclo espermatogênico, segundo França et al. (1998), em cada grupo experimental. A área dos CBs foi mensurada utilizando-se o programa Image J – *Image Processing and Analysis in Java*, Versão 1.51e (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). As áreas dos CBs em cada grupo experimental foram comparadas utilizando o teste Kruskal-Wallis ANOVA, com o software StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (*data analysis software system*), version 10. As análises estatísticas foram baseadas em Zar (1999) e a diferença estatística foi considerada quando $p \leq 0,05$.

3.8 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para comparação dos dados obtidos a partir da contagem dos espermatozoides, bem como morfologia e motilidade, foram utilizados os testes estatísticos de análise de variância - ANOVA, com teste “a posteriori” de Dunnett ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com teste “a posteriori” de Dunn, de acordo com a característica de cada variável. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DA MOTILIDADE E MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES DOS ANIMAIS DPN115

A análise quantitativa da motilidade espermática mostrou uma redução estatisticamente significativa na porcentagem de espermatozoides tipo A (móveis com trajetória progressiva) em ratos expostos exclusivamente ao Aroclor (grupo 3), quando comparados ao controle (grupo 1). Os demais grupos apresentaram padrão de motilidade comparável ao controle (Figura 1).

Para a análise relativa à morfologia dos espermatozoides foram determinados o número de espermatozoides normais, com má formação de cabeça, com má formação de cauda e com presença ou ausência de gota citoplasmática, em cada grupo experimental. Diferença estatística só foi observada quando o número de espermatozoides com má formação de cabeça, no grupo G3, foi comparado ao seu controle (Figura 2). Todos os demais critérios foram semelhantes entre os grupos experimentais.

Figura 1: Motilidade espermática dos animais experimentais. A: Espermatozoides móveis com trajetória progressiva (espermatozoides tipo A); B: Espermatozoides móveis, porém sem trajetória progressiva (espermatozoides tipo B); C: Espermatozoides imóveis (espermatozoides tipo C). Valores expressos em mediana e intervalos interquartis. Kruskal Wallis com *a posteriori* test of Dun. G1: Controle Negativo (n = 9); G2: Controle MeHg (n = 9); G3: Controle Aroclor (n = 9); G4: Mistura 1 (n = 10); G5: Mistura 2 (n = 10). *p < 0.05.

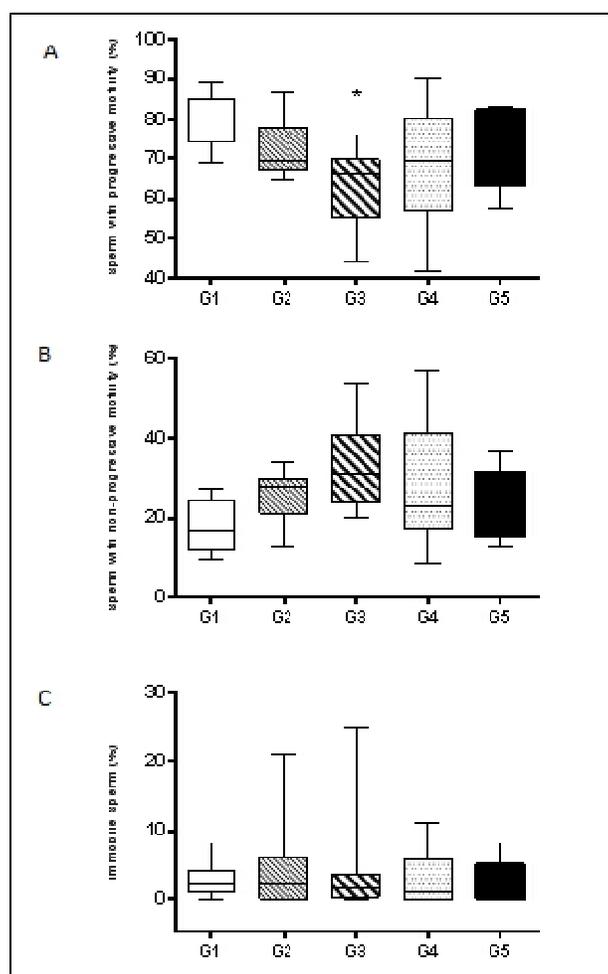
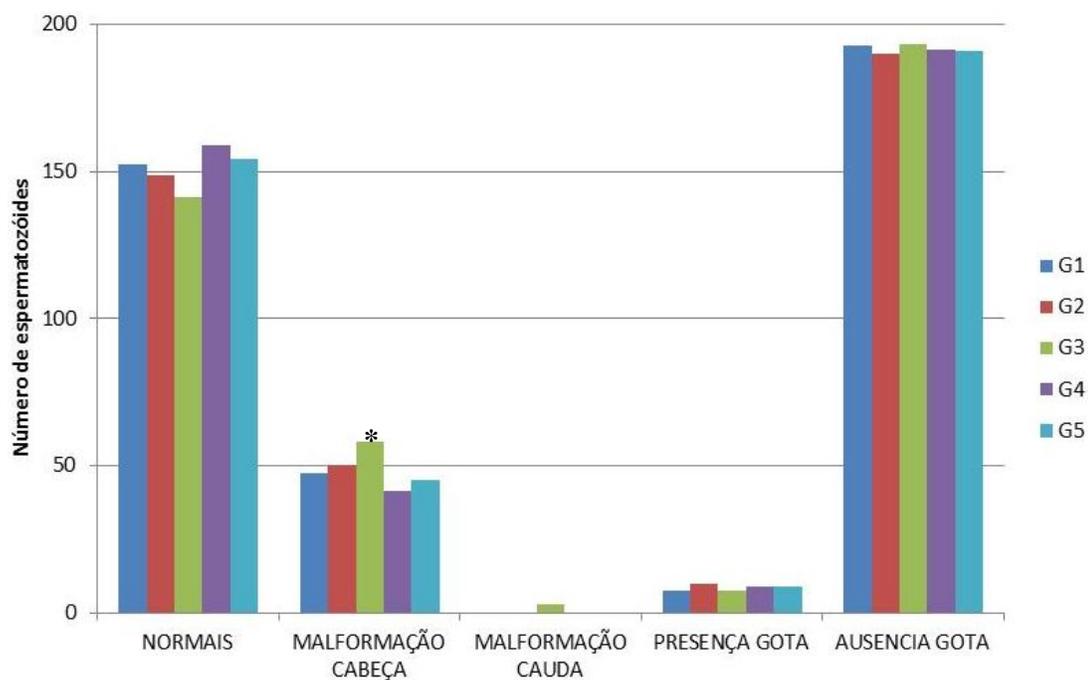


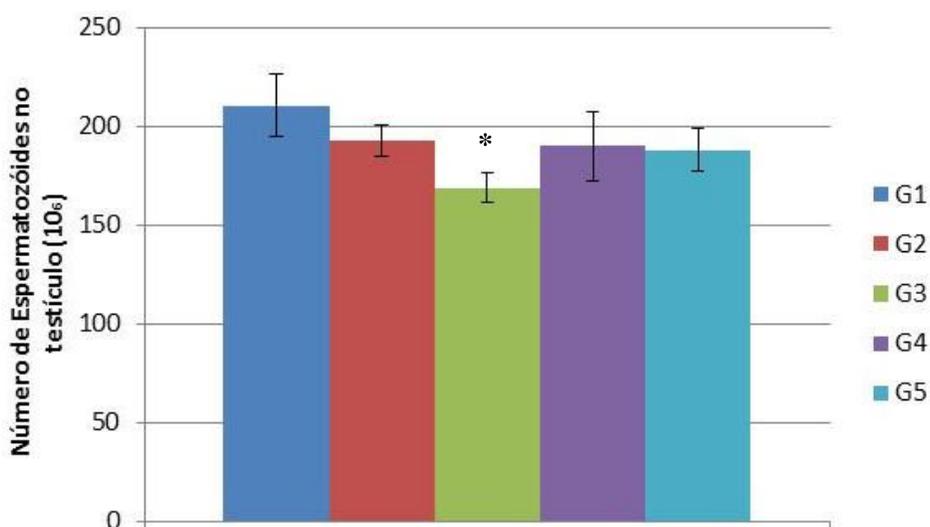
Figura 2: Análise de Morfologia Espermática dos animais DPN115. O gráfico representa a morfologia dos espermatozoides. G1: Controle Negativo (n=17); G2: Controle MeHg (n=17); G3: controle Aroclor (n=17); G4: mistura 1 (n=18); G5: mistura 2 (n=18).



4.2 CONTAGEM ESPERMÁTICA NO TESTÍCULO DOS ANIMAIS DPN115

A análise quantitativa da contagem espermática mostrou uma redução significativa no número de espermatozoides em ratos após 62 dias da finalização da exposição ao Aroclor (Grupo 3), quando comparados ao controle (Grupo 1) ($p=0,0253$). Os demais grupos apresentaram número de espermatozoides comparável ao controle (Figura 3).

Figura 3: Contagem Espermática no Testículo dos animais DPN115. O gráfico representa o número de espermatozoides expresso em milhões por mL, que multiplicado pelas diluições utilizadas, resultará no número de espermatozoides/órgão. G1: Controle Negativo (n=17); G2: Controle MeHg (n=17); G3: controle Aroclor (n=17); G4: mistura 1 (n=18); G5: mistura 2 (n=18).



4.3 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DOS ANIMAIS DPN53 E IMUNOBLLOT

As revelações dos *imunoblots* para detecção das proteínas avaliadas no presente trabalho em cada grupo experimental para os animais no DPN53 podem ser observadas na Figura 4a.

As quantificações das quantidades relativas das proteínas associadas ao metabolismo de CBs em cada grupo experimental nos permitiram observar que o grupo G2 apresentou uma maior expressão de MVH quando comparado ao grupo controle (Figura 4b) e uma maior expressão de HSP70 quando comparado ao grupo controle (G1) e, também, ao grupo G5 (Figura 4d). O grupo G4 apresentou uma queda na expressão de MIWI, quando comparado aos grupos G1 e G3 (Figura 4c).

Já em relação à proteína LXR $\alpha\beta$ foi possível observar que o grupo G4 apresentou uma queda na expressão da referida proteína quando comparado ao grupo controle (Figura 4e).

Não houve diferença no padrão de expressão de Tubulina entre os grupos experimentais, o que comprova que as alterações observadas não foram produzidas por utilização de quantidades menores de proteínas na separação por eletroforese, mas sim um padrão real de cada grupo experimental (Figura 4f). Todos os valores da quantidade média de cada proteína obtida em cada grupo experimental bem como os valores dos resultados dos testes estatísticos podem ser encontrados na Tabela 2.

Figura 4: *Imunoblot* para detecção da expressão das proteínas MVH (b), MIWI (c), HSP70 (d), LXR $\alpha\beta$ (e) e Tubulina (f). *Pool* de proteínas totais do tecido testicular de cada grupo experimental dos animais DPN53.

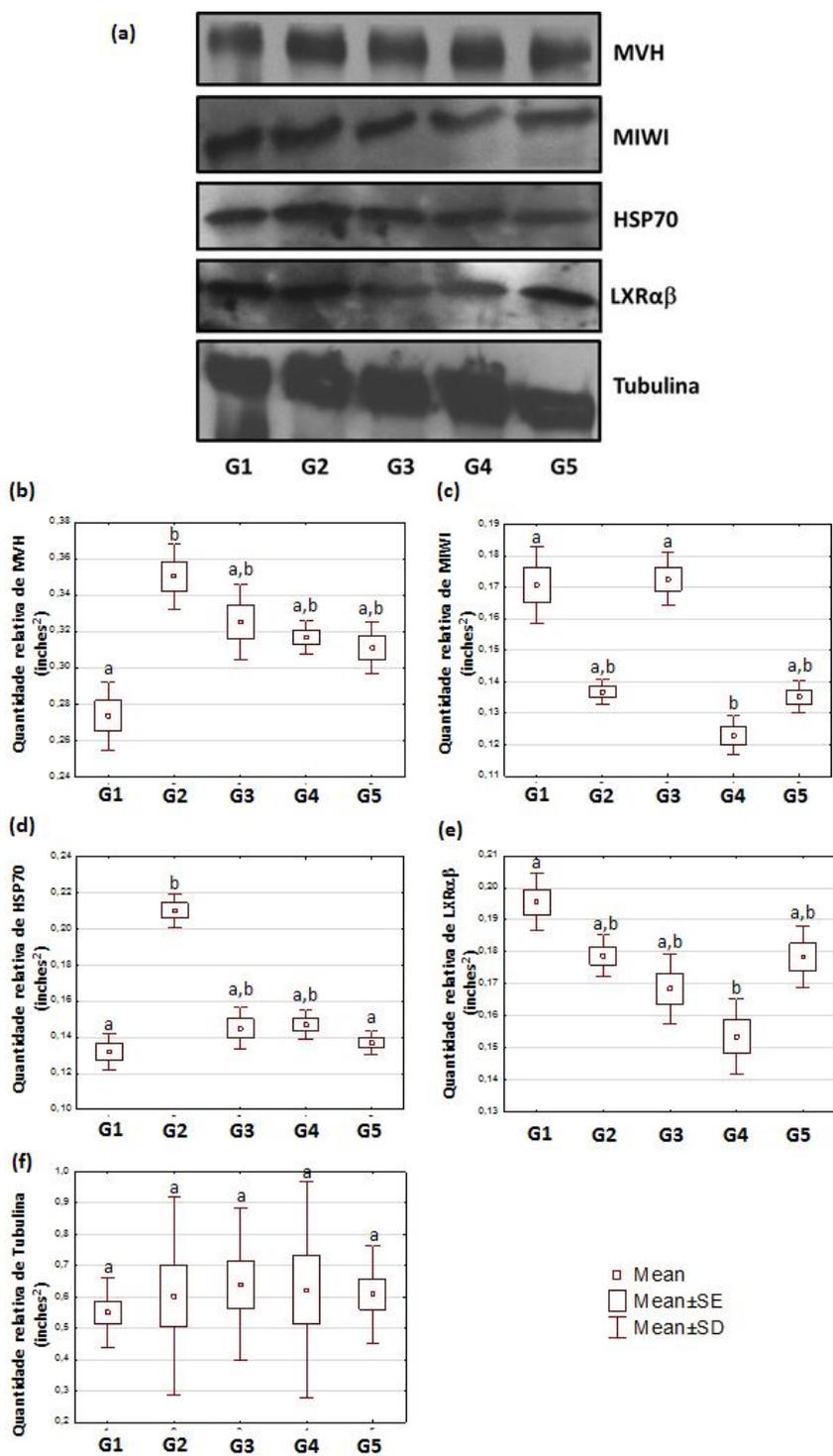


Tabela 2: Análise estatística da expressão das proteínas MVH, HSP70, MIWI, LXR $\alpha\beta$ e Tubulina. Todos os valores foram comparados entre os grupos através do teste Kruskal-Wallis ANOVA.

Proteína detectada por WB	Grupos	Quantidade relativa (inches ²) média \pm dp	p
MVH	G1	0.273 \pm 0.018 ^a	0.001
	G2	0.350 \pm 0.017 ^b	
	G3	0.325 \pm 0.020 ^{a,b}	
	G4	0.316 \pm 0.009 ^{a,b}	
	G5	0.311 \pm 0.014 ^{a,b}	
MIWI	G1	0.171 \pm 0.012 ^a	0.000
	G2	0.137 \pm 0.004 ^{a,b}	
	G3	0.173 \pm 0.008 ^a	
	G4	0.123 \pm 0.006 ^b	
	G5	0.135 \pm 0.005 ^{a,b}	
HSP70	G1	0.132 \pm 0.010 ^a	0.003
	G2	0.210 \pm 0.009 ^b	
	G3	0.145 \pm 0.012 ^{a,b}	
	G4	0.147 \pm 0.008 ^{a,b}	
	G5	0.137 \pm 0.006 ^a	
LXR $\alpha\beta$	G1	0.196 \pm 0.009 ^a	0.002
	G2	0.179 \pm 0.006 ^{a,b}	
	G3	0.168 \pm 0.011 ^{a,b}	
	G4	0.154 \pm 0.012 ^b	
	G5	0.178 \pm 0.009 ^{a,b}	
Tubulina	G1	0.550 \pm 0.112 ^a	0.977
	G2	0.603 \pm 0.314 ^a	
	G3	0.640 \pm 0.241 ^a	
	G4	0.622 \pm 0.345 ^a	
	G5	0.609 \pm 0.154 ^a	

4.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA ANÁLISES MORFOLÓGICAS DE CBS

As lâminas histológicas do testículo dos animais DPN53 e DPN115 foram incubadas em anticorpos primários (MIWI ou MVH), para detecção de CBS. Foram analisados túbulos seminíferos nos estágios I-VI do ciclo espermatogênico, pois são os túbulos que possuem as espermátides iniciais que são células que exibem CBS totalmente organizados e ativos. A análise qualitativa da organização dos CBS em cada grupo em cada está representada na Figura 5. Após a mensuração das áreas de aproximadamente 50 CBS em cada grupo experimental em cada idade foi possível detectar que nos animais DPN53 os CBS dos grupos G3, G4 e G5 apresentaram CBS com áreas menores, quando comparados ao grupo controle (G1) (Figura 6a). Nos animais DPN115 foi possível observar que o grupo G2 apresenta CBS com menores áreas quando comparados ao grupo controle (G1), e que o grupo G3 apresenta CBS com menores áreas quando comparados aos grupos G1, G4 e G5 (Figura 6b).

Todos os valores das áreas médias de CBS obtida em cada grupo experimental em cada idade, bem como os valores dos resultados dos testes estatísticos podem ser encontrados na Tabela 3.

Figura 5: Imunofluorescência para detecção de CBs, por meio da imunomarcação da proteína MIWI/MVH, em túbulos seminíferos dos animais DPN53 e DPN115 de cada grupo experimental.

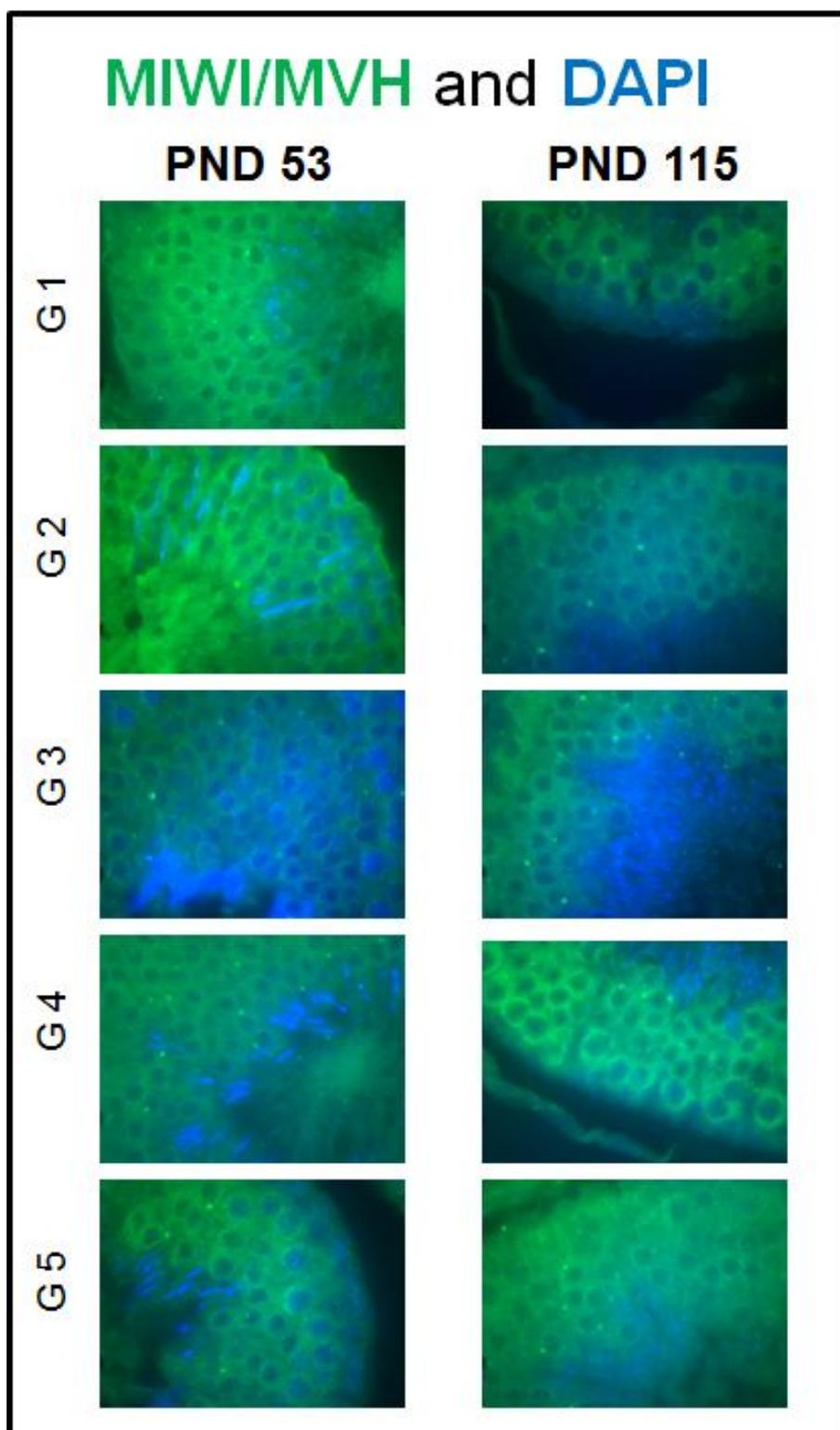


Figura 6: Representação da análise quantitativa das áreas de CBs detectados por meio da imunomarcação das proteínas MIWI/MVH, em túbulos seminíferos dos animais DPN53 (a) e DPN115 (b) de cada grupo experimental.

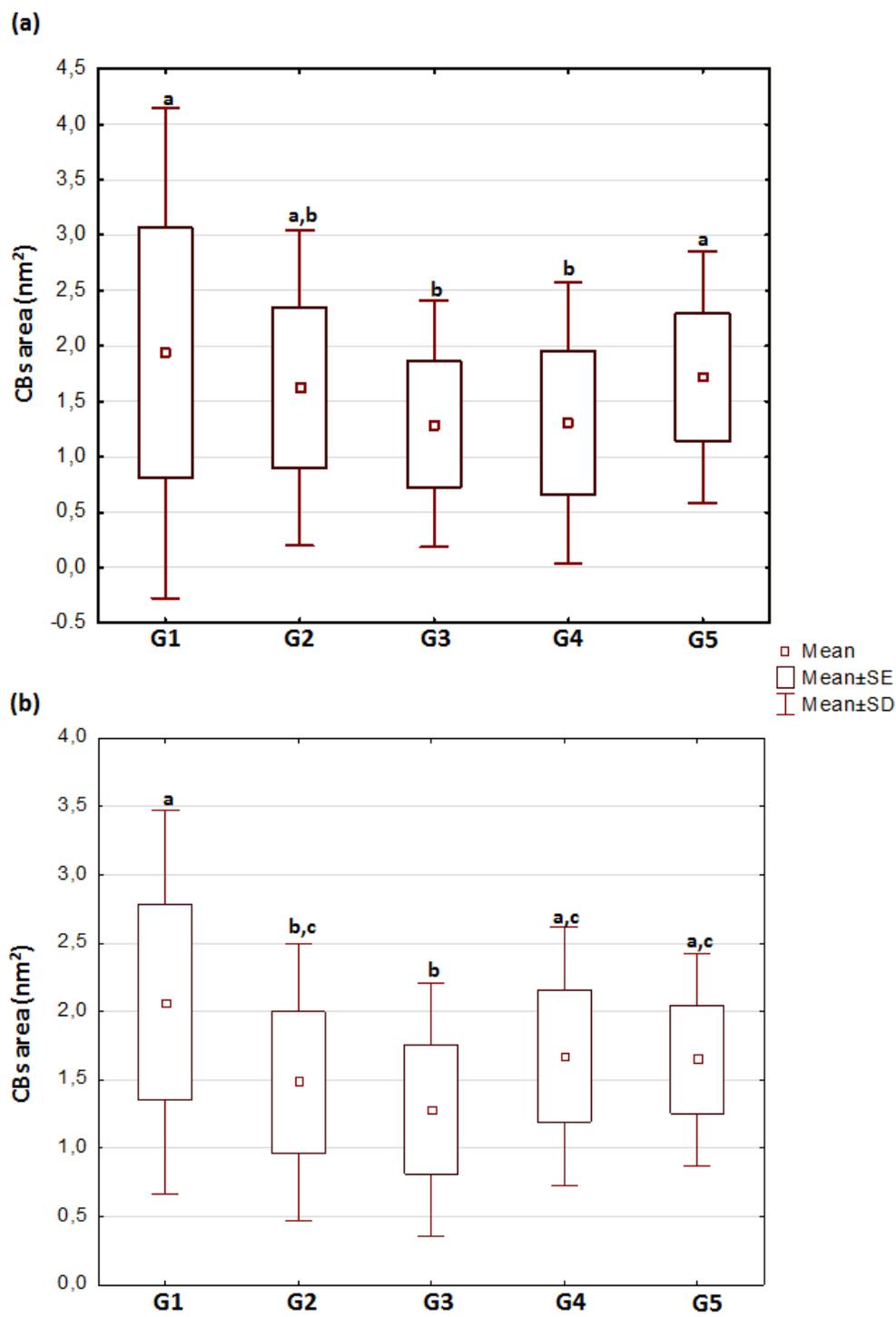


Tabela 3: Estatística da análise quantitativa realizada por meio da imunomarcção da proteína MIWI/MVH, em túbulos seminíferos dos animais DPN53 e DPN115. Todos os valores foram comparados entre os grupos através do teste Kruskal-Wallis ANOVA.

Idade	Grupos	Área dos CBs (nm²) média±dp	<i>p</i>
DPN53	G1	1.937±1.128 ^a	0.000
	G2	1.620±0.726 ^{a,b}	
	G3	1.296±0.567 ^b	
	G4	1.305±0.647 ^b	
	G5	1.717±0.579 ^a	
DPN115	G1	2.068±0.717 ^a	0.000
	G2	1.482±0.518 ^{b,c}	
	G3	1.286±0.472 ^b	
	G4	1.675±0.481 ^{a,c}	
	G5	1.652±0.396 ^{a,c}	

5 DISCUSSÃO

O *chromatoid body* (CB) é uma organela citoplasmática de células germinativas masculinas cuja principal função está relacionada com o estoque de RNA e proteínas para a diferenciação final dos espermatozoides (Saunders et al., 1992). Algumas análises realizadas durante a espermiogênese de ratos relataram a presença dos CBs próximos às vesículas do complexo de Golgi. Ainda, foi possível analisar que estão na mesma posição em espermátides finais, o que permite concluir que o CB auxilia na formação das caudas dos espermatozoides (Peruquetti et al., 2010). Muitos experimentos tem revelado que o CB é sensível a drogas e tratamentos (Parvinen, 2005). Ainda segundo o referido autor, algumas drogas administradas *in vivo* ou *in vitro* podem causar um aumento no volume de CB em todos os estágios onde o mesmo é normalmente encontrado.

O metilmercúrio (MeHg) e os bisfenóis policlorinados (PCBs, mistura comercial Aroclor) são agentes tóxicos persistentes no ambiente e se acumulam na cadeia alimentar. A principal fonte de exposição da população é através do consumo de peixes e outros frutos do mar contaminados (Mahaffey et al., 2009, Oken et al., 2012, Chen, 2012, Sunderland & Salin, 2013). Os PCBs são agentes tóxicos ambientais lipofílicos caracterizados como desreguladores endócrinos, apresentando baixo grau de biodegradação (Krishnamoorthy et al., 2007). Estudos toxicológicos já realizados demonstraram que o PCB pode alterar, principalmente, as funções reprodutivas dos organismos. Em testes realizados foi possível observar distúrbios na maturação sexual (Penteado et al, 2001). Testes realizados em fêmeas também detectaram infertilidade nos casos de intoxicação por PCBs (Bastos, 2013).

O testículo aparentemente é um importante órgão-alvo para os PCBs. A exposição ao Aroclor resultou numa diminuição significativa na contagem de esperma no testículo em animais DPN115, corroborando com os resultados apresentados por Jiali Cai et al. (2011). Em seu experimento, os pesos corporais e os pesos absolutos testiculares dos ratos não foram afetados. No entanto, os dados sobre a toxicidade testicular de Aroclor em doses baixas são ainda limitados. Ainda, foi demonstrado que animais DPN115 do G3 apresentaram redução no número de espermatozoides tipo A, ou seja, espermatozoides com motilidade progressiva.

Singh et al. (2016) realizou um estudo com aves, onde foi observado em seus resultados que os animais tratados com BPA em baixas doses apresentaram um

aumento do volume do sêmen, mas um declínio na contagem espermática, onde o autor conclui que poderia ser um mecanismo de compensação para manter a capacidade fértil do animal. Ainda, foi observada uma redução na motilidade espermática dos animais tratados com altas doses de BPA (5mg/kg) (Singh et al., 2016).

O número crescente de deficiência nas funções reprodutivas em humanos e animais observados ao longo das últimas décadas têm levantado preocupações sobre determinados produtos químicos em nosso ambiente conhecido como compostos derivados de plástico que são disruptor endócrino (Li et al., 2016). Em seus estudos, esses mesmos autores confirmaram que os efeitos do BPA sobre a qualidade do esperma diminuem a densidade do esperma, sua atividade e taxa de sobrevivência, enquanto a taxa de anormalidade aumentou com o aumento das concentrações de BPA.

Resultados das análises de *Western blot* para detecção das proteínas relacionadas ao metabolismo de CBs (MVH, MIWI e HSP70), no presente trabalho, demonstrou que os grupos que mais sofreram alterações imediatas, em relação ao grupo controle, foram os grupos 2 (aumento da expressão de MVH e HSP70) e 4 (redução na expressão de MIWI e de LXR $\alpha\beta$). Esses resultados indicam que os agentes tóxicos utilizados no presente trabalho, isolados ou associados em diferentes concentrações, podem causar efeitos diversos no metabolismo regulado por CBs em ratos.

No modelo experimental utilizado no presente estudo foi detectado uma queda da expressão de LXR $\alpha\beta$ no grupo G4, grupo que também apresentou queda na expressão de MIWI. A redução destas duas proteínas de vias diferentes que regulam a espermatogênese pode indicar uma resposta imediata das células germinativas frente ao estresse químico ao qual estão sendo submetidas (Horton et al., 2002).

Sabe-se que o CB é crucial para que o processo de espermatogênese progrida de maneira apropriada, garantindo a formação da célula reprodutora masculina madura (Meikar et al., 2013; Yadav et al., 2014), portanto, como encontramos no presente trabalho redução do número de espermatozoides e aumento na má formação da cabeça de espermatozoides após a exposição ao Aroclor, procuramos por alterações em eventos fisiológicos relacionados ao CB.

O parâmetro escolhido para análise da organização do CB foi morfologia, visto que é característico que CBs em espermátides iniciais são estruturas citoplasmáticas únicas, esféricas e localizadas em regiões adjacentes ao núcleo (Parvinen, 2005). É interessante observar que todos os grupos tratados nos animais DPN53 apresentaram redução no tamanho dos CBs, com exceção do grupo G2. Também é interessante lembrar que o grupo G2, nos animais DPN53, foi o grupo que apresentou aumento da expressão de dois importantes componentes do CB (MVH e HSP70), fato que pode ter causado essa não observação na queda do tamanho da estrutura no presente trabalho.

Nos animais DPN115 foi observado que os grupos G2 e G3, foram os que apresentaram redução no tamanho de CBs, sendo que os grupos G4 e G5 voltaram a apresentar valores semelhantes ao controle. Estas observações nos permitem sugerir que em longo prazo os dois agentes tóxicos utilizados no presente trabalho parecem exibir mais efeitos deletérios para a espermatogênese quando administrados isoladamente do que quando administrados em conjunto.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dados analisados até o presente momento apontam que houve uma diferença da influência das condições experimentais utilizadas no presente trabalho em cada uma das duas idades analisadas (DPN53 e DPN115). Nos juvenis (DPN53) houve um aumento na quantidade de proteínas marcadoras de CB (MVH e HSP70) nos túbulos seminíferos dos animais dos grupos G2 (metilmercúrio puro) e, também, uma queda nas quantidades de outra proteína marcadora de CB (MIWI) e de LXR $\alpha\beta$ nos túbulos seminíferos dos grupos G4 (metilmercúrio e Aroclor, associados em doses mais baixas). Esses desbalanços parecem não terem afetado diretamente a estrutura dos CBs, visto que os grupos que apresentaram redução da área de CBs foram os animais dos grupos G3, G4 e G5.

Os adultos (DPN115) apresentaram propensão aos efeitos da condição experimental utilizada no presente estudo, sendo que o grupo G3 (grupo que recebeu tratamento somente com Aroclor) apresentou uma redução mais severa na área de CBs, tendo também demonstrado outras alterações em parâmetros reprodutivos, tais como, redução do número de espermatozoides Tipo A, redução na produção espermática diária (PDEr) e aumento do número de espermatozoides com má formação da cabeça.

Apesar das diferenças encontradas em relação ao Aroclor, mais estudos são necessários para melhor elucidar os efeitos do Aroclor sobre a qualidade espermática e, possivelmente, sobre a função testicular, bem como os possíveis efeitos da mistura em estudo sobre parâmetros moleculares do sistema reprodutor masculino.

REFERÊNCIAS

- AMANN, R. P. et al. Daily spermatozoal production, epididymal spermatozoal reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the rhesus monkey. **Biology of reproduction**, v. 15, n. 5, p. 586-592, 1976.
- BASTOS, Ana Marcia Xavier et al. Organochlorine compound levels in fertile and infertile women from Rio de Janeiro, Brazil. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, n. 5, p. 346-353, 2013
- BEŁTOWSKI, Jerzy; SEMCZUK, Andrzej. Liver X receptor (LXR) and the reproductive system—a potential novel target for therapeutic intervention. **Pharmacological Reports**, v. 62, n. 1, p. 15-27, 2010.
- BJÖRNDAHL, L.; SÖDERLUND, I.; KVIST, U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. **Human reproduction**, v. 18, n. 4, p. 813-816, 2003.
- CAI, Jiali et al. Disruption of spermatogenesis and differential regulation of testicular estrogen receptor expression in mice after polychlorinated biphenyl exposure. **Toxicology**, v. 287, n. 1, p. 21-28, 2011.
- CHEN, Celia. Methylmercury effects and exposures: who is at risk? **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 6, p. a224, 2012.
- CHUMA, Shinichiro et al. Tdrd1/Mtr-1, a tudor-related gene, is essential for male germ-cell differentiation and nuage/germinal granule formation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 43, p. 15894-15899, 2006.
- CLERMONT, Yves. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiological reviews**, v. 52, n. 1, p. 198-236, 1972.
- CORY-SLECHTA, Deborah A. Studying toxicants as single chemicals: does this strategy adequately identify neurotoxic risk?. **Neurotoxicology**, v. 26, n. 4, p. 491-510, 2005.
- DA SILVA, Daniela A. Fossato et al. Effects of methylmercury on male reproductive functions in Wistar rats. **Reproductive Toxicology**, v. 31, n. 4, p. 431-439, 2011.
- DE SCHAEFDRIJVER, Luc et al. Real life juvenile toxicity case studies: the good, the bad and the ugly. **Reproductive Toxicology**, v. 26, n. 1, p. 54-55, 2008.
- DENG, Wei; LIN, Haifan. Miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. **Developmental cell**, v. 2, n. 6, p. 819-830, 2002.
- EMMETT, Edward A. et al. Studies of transformer repair workers exposed to PCBs: II. Results of clinical laboratory investigations. **American journal of industrial medicine**, v. 14, n. 1, p. 47-62, 1988.
- ENDER, Christine; MEISTER, Gunter. Argonaute proteins at a glance. **J Cell Sci**, v. 123, n. 11, p. 1819-1823, 2010.

Estudo sobre as Bifenilas Policloradas. Proposta para Atendimento à “Convenção de Estocolmo, Anexo A – Parte II. Disponível em http://www.mma.gov.br/estruturas/sqa_prorisc_upml/_arquivos/estudo_sobre_as_bifenilas_policloradas_82.pdf

FDA (Food and Drug Administration) and US EPA (US Environmental Protection Agency). 2004. What you need to know about mercury in fish and shellfish. Disponível:<http://www.fda.gov/downloads/food/resourcesforyou/consumers/UCM182158.pdf>.

FRANÇA, Luiz R.; AVELAR, Gleide F.; ALMEIDA, Fernanda FL. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 300-318, 2005.

GRAY, L. Earl et al. Reproductive and thyroid effects of low-level polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) exposure. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 20, n. 3, p. 288-294, 1993.

GROTTO, Denise et al. Evaluation of toxic effects of a diet containing fish contaminated with methylmercury in rats mimicking the exposure in the Amazon riverside population. **Environmental Research**, v. 111, n. 8, p. 1074-1082, 2011

GUO, Bao-Qiang et al. Low level prenatal exposure to methylmercury disrupts neuronal migration in the developing rat cerebral cortex. **Toxicology**, v. 304, p. 57-68, 2013.

HARTL, Ulrich; BRACHER, Andreas; HAYER-HARTL, Manajit. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 324-332, 2011.

HAAVE, Marte et al. Long-term effects of environmentally relevant doses of 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl (PCB153) on neurobehavioural development, health and spontaneous behaviour in maternally exposed mice. **Behavioral and Brain Functions**, v. 7, n. 1, p. 1, 2011.

HEAD, JUDITH R.; KRESGE, CHARLES K. Reaction of the chromatoid body with a monoclonal antibody to a rat histocompatibility antigen. **Biology of reproduction**, v. 33, n. 4, p. 1001-1008, 1985.

HORTON, Jay D.; GOLDSTEIN, Joseph L.; BROWN, Michael S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 9, p. 1125-1131, 2002.

KIM, Jim Young; JUNG, Hye Jim; YOON, Mi-rae. Vasa (DDX4) is a putative marker for spermatogonia, spermatocytes and round spermatids in stallions. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 6, p. 1032-1038, 2015.

KOTAJA, Noora; SASSONE-CORSI, Paolo. The chromatoid body: a germ-cell-specific RNA-processing centre. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 8, n. 1, p. 85-90, 2007.

KRISHNAMOORTHY, Gurumoorthy et al. Ameliorative effect of vitamins (α -tocopherol and ascorbic acid) on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in rat epididymal sperm. **Reproductive Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 239-245, 2007.

LI, Juan et al. Exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of ERK signal pathway. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 26, n. 3, p. 180-188, 2016.

LIGNELL, Sanna et al. Persistent organochlorine and organobromine compounds in mother's milk from Sweden 1996–2006: compound-specific temporal trends. **Environmental Research**, v. 109, n. 6, p. 760-767, 2009.

MAHAFFEY, Kathryn R.; CLICKNER, Robert P.; JEFFRIES, Rebecca A. Adult women's blood mercury concentrations vary regionally in the United States: association with patterns of fish consumption (NHANES 1999-2004). **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 1, p. 47, 2009.

MARANGHI, Francesca; MANTOVANI, Alberto. Targeted toxicological testing to investigate the role of endocrine disrupters in puberty disorders. **Reproductive toxicology**, v. 33, n. 3, p. 290-296, 2012.

MEIKAR, Oliver; DA ROS, Matteo; KOTAJA, Noora. Epigenetic regulation of male germ cell differentiation. In: **Epigenetics: Development and Disease**. Springer Netherlands, 2013. p. 119-138.

MEIKAR, Oliver et al. Chromatoid body and small RNAs in male germ cells. **Reproduction**, v. 142, n. 2, p. 195-209, 2011.

MEIKAR, Oliver et al. An atlas of chromatoid body components. **Rna**, v. 20, n. 4, p. 483-495, 2014.

MEIKAR, Oliver; KOTAJA, Noora. Isolation of chromatoid bodies from mouse testis as a rich source of short RNAs. **Animal Endo-SiRNAs: Methods and Protocols**, p. 11-25, 2014.

NAGAMORI, Ippei; SASSONE-CORSI, Paolo. The chromatoid body of male germ cells: epigenetic control and miRNA pathway. **Cell Cycle**, v. 7, n. 22, p. 3503-3508, 2008.

NRC (National Research Council) 2000. **Toxicological effects of methylmercury**. Washington, DC: National Academy Press

OKEN, Emily et al. Which fish should I eat? Perspectives influencing fish consumption choices. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 6, p. 790, 2012.

PARKER, Robert M. Testing for reproductive toxicity. **Developmental and reproductive toxicology. A practical approach**, p. 425-487, 2006.

PARVINEN, Martti. The chromatoid body in spermatogenesis. **International Journal of Andrology**, v. 28, n. 4, p. 189-201, 2005.

PASSOS, Carlos José Sousa et al. Daily mercury intake in fish-eating populations in the Brazilian Amazon. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 18, n. 1, p. 76-87, 2008.

PENTEADO, José Carlos Pires; VAZ, Jorge Moreira. O legado das bifenilas policloradas (PCBs). **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 390-398, 2001.

PEROBELLI, Juliana Elaine et al. Decreased sperm motility in rats orally exposed to single or mixed pesticides. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 73, n. 13-14, p. 991-1002, 2010.

PERUQUETTI, Rita Luiza et al. Characterization of Mongolian gerbil chromatoid bodies and their correlation with nucleolar cycle during spermatogenesis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 3, p. 399-406, 2010.

POLDER, Anuschka et al. Levels of chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in Norwegian breast milk (2002–2006), and factors that may predict the level of contamination. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 16, p. 4584-4590, 2009.

SAUNDERS, Phillipa et al. Stage-specific expression of rat transition protein 2 mRNA and possible localization to the chromatoid body of step 7 spermatids by in situ hybridization using a nonradioactive riboprobe. **Molecular Reproduction and Development**, v. 33, n. 4, p. 385-391, 1992.

SHIBER, Ayala; RAVID, Tommer. Chaperoning proteins for destruction: diverse roles of Hsp70 chaperones and their co-chaperones in targeting misfolded proteins to the proteasome. **Biomolecules**, v. 4, n. 3, p. 704-724, 2014.

SINGH, Ram P. et al. Effects of bisphenol-A on male reproductive success in adult Kadaknath chicken. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 128, p. 61-66, 2016.

STOKER, Tammy E. et al. Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations. **Critical reviews in toxicology**, v. 30, n. 2, p. 197-252, 2000.

STRUŻYŃSKA, Lidia; SULKOWSKI, Grzegorz; DĄBROWSKA-BOUTA, Beata. Aroclor 1254 selectively inhibits expression of glial GLT-1 glutamate transporter in the forebrain of chronically exposed adult rat. **Toxicology**, v. 300, n. 1, p. 12-18, 2012.

SUNDERLAND, Elsie M.; SELIN, Noelle E. Future trends in environmental mercury concentrations: implications for prevention strategies. **Environmental Health**, v. 12, n. 1, p. 1, 2013.

TOYOOKA, Yayoi et al. Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. **Mechanisms of Development**, v. 93, n. 1, p. 139-149, 2000.

VELDHUIS, Johannes D. et al. Somatotropic and gonadotropic axes linkages in infancy, childhood, and the puberty-adult transition. **Endocrine reviews**, v. 27, n. 2, p. 101-140, 2006.

WEIHE, Pál et al. Health implications for Faroe Islanders of heavy metals and PCBs from pilot whales. **Science of the Total Environment**, v. 186, n. 1, p. 141-148, 1996.

YADAV, Ram Prakash; KOTAJA, Noora. Small RNAs in spermatogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 498-508, 2014.

YOKOTA, Sadaki. Nuage proteins: their localization in subcellular structures of spermatogenic cells as revealed by immunoelectron microscopy. **Histochemistry and cell biology**, v. 138, n. 1, p. 1-11, 2012.

ZAR, Jerrold. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice Hall, 1999.

ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO (CEUA PROTOCOLO Nº 30/13)



**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA - USC**

CERTIFICADO

PROTOCOLO Nº 30/13

A CEUA USC dentro de suas competências e seguindo normas vigentes no Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal – CONCEA, analisou o projeto "EXPOSIÇÃO PRÉ-PUBERAL A BAIXAS DOSES DE METIL MERCÚRIO E AROCLOR ASSOCIADOS: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS REPRODUTIVOS E ENDÓCRINOS DE RATOS PÚBERES E ADULTOS", sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Juliana E. Perobelli e o considerou APROVADO com as seguintes recomendações:

1. Enviar ao biotério da USC o protocolo de descarte de resíduos e procedimentos para descontaminação, caso necessário.

Bauru, 16 de dezembro de 2013.

Dra. Dulce H. J. Constantino
Presidente CEUA - USC

Francine Souza
Secretária CEUA - USC