



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CRISTINA CAPUCHO

**“AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DA PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA DE
INDUZIR E DE REVERTER DANOS ESTRUTURAIS E METABÓLICOS EM
TESTÍCULO DE RATOS WISTAR.”**

**“COULD BRASILIAN GREEN PROPOLIS ALTER STRUCTURAL AND METABOLIC
DAMAGE TO WISTAR RAT TESTES.”**

CAMPINAS

2019

CRISTINA CAPUCHO

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DA PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA DE
INDUZIR E DE REVERTER DANOS ESTRUTURAIS E METABÓLICOS EM
TESTÍCULO DE RATOS WISTAR**

**COULD BRASILIAN GREEN PROPOLIS ALTER STRUCTURAL AND
METABOLIC DAMAGE TO WISTAR RAT TESTES**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do Título de Doutora em Biologia Celular e
Estrutural na área de Biologia Tecidual.*

*Thesis presented to the Institute of Biology of
the University of Campinas in partial
fulfillment of the requirements for a doctorate
degree in Cellular and Structural Biology, in
the area of Tissue Biology.*

Orientadora: MARY ANNE HEIDI DOLDER

Coorientadora: GRASIELA DIAS DE CAMPOS SEVERI AGUIAR

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA CRISTINA CAPUCHO E
ORIENTADA PELA Dra. MARY ANNE HEIDI DOLDER

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C175a Capucho, Cristina, 1981-
Avaliação da capacidade da própolis verde brasileira de induzir e reverter estruturas e metabólicos em testículo de ratos Wistar / Cristina Capucho. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Mary Anne Heidi Dolder.

Coorientador: Grasiela Dias de Campos Severi Aguiar.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Testículos. 2. Contagem de espermatozoides. 3. Morfometria. 4. Estereologia. 5. *Western blotting*. I. Dolder, Mary Anne Heidi, 1943-. II. Severi-Aguiar, Grasiela Dias de Campos. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Could Brazilian green propolis alter structural and metabolic damage to Wistar rat testes

Palavras-chave em inglês:

Testis

Sperm count

Morphometrics

Stereology

Western blotting

Área de concentração: Biologia Tecidual

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Mary Anne Heidi Dolder [Orientador]

Rejane Maira Góes

Bruna Fontana Thomazini

Raquel Vaz Hara Jardim

Larissa Akemi Kido de Barros

Data de defesa: 10-10-2019

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-0896-7331>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8857423954611195>

Campinas, 10 de outubro de 2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Mary Anne Heidi Dolder

Dra. Rejane Maira Góes

Dra. Bruna Fontana Thomazini

Dra. Raquel Vaz Hara Jardim

Dra. Larissa Akemi Kido de Barros

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Biologia Celular e Estrutural da Unidade do Instituto de Biologia.

Agradecimentos

À **Deus e à vida** por me permitir esta oportunidade e direito de conquistar e realizar um sonho de vida

A minha **Mãe, Dada e Tio Bo**, por sempre me darem força e suporte para que eu consiga conquistar meus sonhos e realizações

Ao meu filho **Marcelo** por entender minha ausência e compreender minhas conquistas. E ao meu filho **Miguel**, por aguantar firme e forte e nascer somente após a defesa do doutorado. Obrigada meus amores

Ao meu companheiro, **Anderson**. Obrigada por tudo

À minha orientadora **Dra. Mary-Anne Heidi Dolder**, por me acolher em seu laboratório e por se tornar minha amiga de conversa, de viagens, uma companheira e por ser a vovó de meu Miguelzinho

A minha coorientadora **Grasiela Dias de Campos Severi Aguiar**, meu muito obrigada por me incentivar, me empurrar, me cobrar, me dar broncas e por ser minha amiga, sem ela eu nunca chegaria até essa conquista. Grasiela foi um anjo que entrou em minha vida para, simplesmente, me orientar.

Aos meus amigos do **Laboratório Microscopia e Biologia da Reprodução**, **Livia Leite Cuqueto** por contribuírem direta e indiretamente na realização deste trabalho e **Ianny Brum Reis e Jhonne Torres** pela parceria em todos os trabalhos, conversas, risadas. Estamos juntos!!! E obrigada pelas viagens, momentos de descontrações e exemplos de vida

Aos funcionários do **Departamento de Biologia Estrutural e Funcional** pela contribuição direta e indireta para a execução deste trabalho.

À **Universidade Estadual de Campinas** por me proporcionar com excelência o acesso ao saber durante os anos de pós-graduação.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural** à sua coordenação pelo incentivo à pesquisa científica e ao aprimoramento acadêmico de seus alunos.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo fomento financeiro (Processo 141438/2018-5).

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio financeiro (Processo 2016/18202-0).

À **Fundação de Apoio ao Estudante, à Pesquisa e Extensão da Unicamp (Faepex)** pelo apoio financeiro juntamente com as fundações anteriormente citadas (Processo 3324/17).

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo auxílio financeiro (Projeto PROEX0231088).

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001.

Resumo

Baccharis dracunculifolia D. C. (Asteraceae) é uma planta originária do sudeste da América Latina, conhecida por alecrim do campo e utilizada pela população na medicina tradicional cujos seus metabólitos secundários são coletados pela abelha *Apis mellifera* para a produção de própolis verde brasileira, que é de grande importância para as indústrias alimentícia e farmacêutica, uma vez que exibe propriedades anticâncer, antibacteriana, anti-inflamatória e antiulcerosa, entre outros. Alguns compostos fenólicos estão presentes em sua composição e têm sido descritos, por exemplo, os efeitos adversos dos fitoestrógenos sobre a saúde humana reprodutiva. A falta de uma supervisão de um profissional sobre a dose e o período de ingestão pode expor os consumidores de produtos naturais a riscos. Por outro lado, a infertilidade masculina é um problema comum e complexo e neste sentido, muitas pesquisas nessa área são realizadas para e em muitos casos, as causas são desconhecidas. Há descrição na literatura de muitos produtos naturais que são usados na medicina popular para o tratamento de disfunções sexuais masculinas. Sendo um desses produtos a própolis que parece induzir aumento do nível de testosterona, é capaz de aumentar a produção de espermatozoides e interferir na morfologia do segmento inicial da cabeça do epidídimo. Por outro lado, a dispersão de agrotóxicos no ambiente tem sido associada ao aumento na frequência de distúrbios na saúde, inclusive na fertilidade. A ametrina é um exemplo desses agrotóxicos, que seu efeito na reprodução demonstrou modificações intersticiais testiculares evidentes, com decréscimo no número de células de Leydig e no número de espermatozoides. Como o herbicida afeta negativamente parâmetros reprodutivos, seria interessante avaliar ação da própolis na possível reversão dessas alterações. Portanto, o objetivo dessa tese foi avaliar os testículos de ratos Wistar sobre o efeito protetor da própolis sobre os danos causados pela ametrina em animais adultos; o efeito da própolis em animais expostos, desde o desmame até a fase adulta de reprodução; o efeito da própolis da geração F1 machos, de fêmeas prenhas expostas durante a gestação. Em todos os resultados, foi observada alterações nos resultados. E como conclusão, nos animais adultos, pode-se inferir que tanto a ametrina quanto a própolis alteraram a fisiologia testicular reduzindo a PDE e os níveis de testosterona séricos. Quando usadas juntas, o efeito foi mais grave pois houve redução do nível de testosterona e indução de peroxidação lipídica, evidenciando que a própolis não teve um efeito protetor ao dano causado ao tecido testicular pelo agroquímico. Nos animais expostos após o desmame, a própolis afetou o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos masculinos, prejudicando a fertilidade masculina durante a vida adulta. Portanto, o presente estudo indica que a ingestão

de própolis (6mg/kg/dia) pode representar um risco para a reprodução masculina, afetando a esteroidogênese e a PDE de ratos. E na exposição intrauterina, mostramos pela primeira vez uma ligação entre os macrófagos estimulados e a deterioração celular de Leydig causada pelo estresse oxidativo e destaca a possível implicação da Art-C nesse processo.

Palavras chave: testículo; contagem de espermatozoides; morfometria; estereologia; *Western blot*.

Abstract

Baccharis dracunculifolia D. C. (Asteraceae) is native of Southeast Latin America, known as “alecrin do campo” and used in traditional medicine by people whose secondary metabolites are collected by *Apis mellifera* bees for the production of Brazilian green propolis, which is of great importance for food and pharmaceutical industries, as it displays among others anticancer, antibacterial, anti-inflammatory and anti-ulcer properties. Some phenolic compounds are present in their composition and have been described, for example, adverse effects of estrogens on the reproductive human health. The lack of professional supervision on the dose and time of ingestion may expose consumers to risks of natural products and the aim of this trial was to investigate the effect of Brazilian green propolis on the production of sperm and number of spermatozoa in the epididymis and morphology the epididymis. Male infertility is a common and complex problem and in this regard, much research has been is conducted since, in many cases, the causes are unknown. There are descriptions in the literature of many natural products that are used in folk medicine for the treatment of male sexual dysfunction. One such product is propolis, which appears to induce increased testosterone levels, is capable of increasing sperm production and interfering with the morphology of the initial epididymis head segment. On the other hand, the spread of pesticides in the environment has been associated with increased frequency of health disturbances, including fertility. Amethrin is an example of such a pesticide that has caused evident testicular interstitial modifications, with a decrease in Leydig cell number and lower sperm count. As the herbicide negatively affects reproductive parameters, it would be interesting to evaluate whether propolis could influence a possible reversal of these changes. Therefore, the objective of this thesis was to evaluate the testicles of Wistar rats as to the protective effect of propolis in relation to damage caused by amethrin in adult animals; the effect of propolis on exposed animals, from weaning to a reproductive adult; the effect on male F1 offspring of pregnant females exposed to propolis during pregnancy. In all experiments, changes of the germinative tissues were observed. And as a conclusion, in adult animals, both amethrin and propolis altered testicular physiology resulting in reduced PDE and serum testosterone levels. When used together, the effect was more severe, as there was a reduction in testosterone level and induction of lipid peroxidation, demonstrating that propolis did not have a protective effect on the damage caused to the testicular tissue by the agrochemical. In animals exposed after weaning, propolis affected the development of male reproductive organs, impairing male fertility during adulthood. Therefore, the present study

indicates that propolis intake (6mg / kg / day) may pose a risk to male reproduction, affecting rat steroidogenesis and PDE. In relation to intrauterine exposure, we show for the first time a link between stimulated macrophages and Leydig cell deterioration that is caused by oxidative stress and highlights the possible implication in this process of Artepelin C, a component of propolis.

Keywords: testis; sperm count; morphometry; stereology; *Western blot*.

Sumário

a. Introdução	14
b. Objetivos	18
b.a Objetivo Geral	18
b.b. Objetivos específicos.....	19
c. Materiais e Métodos	19
c.a. Animais experimentais	19
c.b. Eutanásia e coleta das amostras	21
c.c. Microscopia de luz	22
c.c.a. Morfometria e estereologia testicular.....	22
c.d. Biometria (MONTEIRO et al., 2008).....	23
c.e. Contagem espermática.....	23
c.f. Quantificação do Estresse Oxidativo no Testículo	24
c.f.a Quantificação de proteínas totais	24
c.f.b Avaliação da atividade da enzima Catalase (CAT)	24
c.f.c Avaliação da atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD).....	24
c.f.d Determinação da peroxidação lipídica (TBARs)	25
c.f.e Avaliação da atividade da Glutathione-S-transferase (GST).....	25
c.f.f Determinação dos níveis de Glutathione Reduzida (GSH)	26
c.g Immunoblotting ou Western blotting.	26
c.h Coleta do sangue e dosagem de testosterona sérica.....	27
c.i Análises Estatísticas	27
c.j Preparo do material para análise em microscopia eletrônica de transmissão	28
d. Referências Bibliográficas	29
e. Capítulo I – Artigo Tratamento animais Recém Desmamados	33
Abstract	33
Introdução.....	34
Material e Método	37
Animais experimentais e extrato de própolis	37
Estudo Fitoquímico e Isolamento de Constituintes da Própolis Verde.....	37
Eutanásia e coleta das amostras	38
Biometria.....	39
Microscopia de luz	39

Morfometria e estereologia testicular	39
Contagem espermática	40
Avaliação do estresse oxidativo testicular	41
Immunoblotting ou Western blotting	42
Microscopia eletrônica de transmissão	43
Análises Estatísticas.....	43
Resultados	44
Contagem espermática e GSI	45
Análise Ultraestrutural	46
Quantificação do Estresse Oxidativo no Testículo	48
Discussão	52
Referências Bibliográficas	57
f. Capítulo II – Artigo Tratamento animais Intrauterinos.....	63
Abstract	64
Introduction	65
Material and Methods	67
Treatment and tissue collection.....	67
Biometry, morphometry and stereology	68
Daily sperm production (DSP) and DSP per gram of testis	69
Evaluation of testicular oxidative stress	69
Immunoblotting or Western blotting.....	70
Statistical analysis	71
Phytochemical Study and Isolation of Green Propolis Constituents	71
Results	72
Biometric and morphometric data.....	72
Discussion	82
Conclusion	87
Acknowledgements	87
Conflict of interest.....	87
References.....	87
g. Dados adicionais.....	92
h. Resultados	92
h.a Morfometria, Biometria e Estereologia	92
h.b Morfometria e estereologia	93

h.c Microscopia Eletrônica de Transmissão	97
h.d Contagem espermática	101
h.e Quantificação do Estresse Oxidativo no Testículo	102
h.f. Quantificação por Immunoblotting	103
h.g. Quantificação dos componentes da Própolis.....	105
i. Discussão	105
j. Referências Bibliográficas resultados complementares	108
k. Conclusão geral	110
l. Bibliografia Geral.....	112
Anexo 1: Certificado de Bioética e/ou Biossegurança	120
Anexo 2: Declaração de Direitos Autorais.....	122

a. Introdução

A infertilidade masculina é um problema comum e complexo que afeta 1 em cada 20 homens. Apesar das muitas pesquisas nessa área, em muitos casos, as causas são desconhecidas (DADA et al., 2012). Há descrição na literatura de muitos produtos naturais que são usados na medicina popular para o tratamento de disfunções sexuais masculinas (SOLIMAN et al., 2012, MBONGUE et al., 2011).

Yousef e Salama (2009) descreveram aumento da atividade da enzima 17-ketosteroid redutase e nos níveis de testosterona em ratos tratados com 50 mg de própolis/kg de peso corporal e sugeriram aumento da esteroidogênese, melhorando a produção de espermatozoides e, conseqüentemente, aumento da fertilidade. Além disso, ElMazoud et al. (2011) e Yousef et al. (2010) mostraram um aumento nos níveis de testosterona para ratos e coelhos tratados com própolis.

Em ambas as situações descritas acima, foram demonstradas que a própolis parece induzir aumento do nível de testosterona. Capucho et al. (2012), descreveram que a própolis foi capaz de aumentar a produção de espermatozoides e interferiu na morfologia do segmento inicial da cabeça do epidídimo. Estes eventos podem ser consequência de níveis elevados de testosterona, mas os mecanismos moleculares exatos pelos quais a própolis afeta o sistema reprodutivo permanecem sob investigação.

Própolis é uma substância natural coletada por abelhas de brotos de plantas que secretam substâncias, nas folhas e rebentos, gomas e resinas (SAID, 2009). Usada na colmeia como uma barreira protetora contra seus inimigos é uma substância utilizada pelo homem desde os tempos remotos. Atualmente a medicina popular utiliza-se dela para fins preventivos e curativos. Na literatura encontram-se publicações sobre a sua composição química, atividades biológicas e farmacológicas (KUMAZAWA et al. 2004).

Para coletar a própolis as abelhas utilizam as patas traseiras e o aparelho bucal, com o qual raspam a resina e adicionam saliva tornando-a maleável. A resina mascada é moldada em pelotas que com o auxílio das patas são fixadas nas corbículas e transportadas até a colméia. Ao chegarem à colméia, as forrageadoras passam as pelotas às operárias, que constroem a colônia e cobrem as células de mel (BURDOCK, 1998).

A própolis é resultante do processo de digestão do pólen pela abelha e por isso não é considerada um fitoterápico e sim um produto da abelha. As camadas externas do pólen contêm substâncias oleaginosas e balsâmicas, inclusive resinas. Ao

preparar uma mistura de mel e pólen (pão de abelha) para suas larvas, as abelhas separam a parte digerível do pólen e as substâncias balsâmicas resinosas, usando-as em forma de própolis. Ela mistura ainda suas enzimas salivares, cera, pólen e materiais inorgânicos para a confecção final deste produto. A própolis bruta encontra-se no estado sólido, sendo dura a 15°C e maleável a partir dos 30°C. Suas propriedades físicas, como cor, odor e faixa de fusão (60° - 70°C) variam de uma amostra para outra. Suas propriedades terapêuticas e composição química dependem da origem da planta, localização geográfica e procedência, porém sua estrutura microscópica não apresenta diferenças, mesmo sendo de diversas regiões ou diferentes épocas do ano (MISSIMA, 2007; BURDOCK, 1998).

A própolis verde brasileira tem sua composição obtida da *Baccharis dracunculifolia* D. C., conhecida popularmente como alecrim do campo ou vassourinha, que é um arbusto lenhoso dióica (2-3 m de altura) distribuído por todo sul do Brasil. O gênero *Baccharis* (Asteraceae), com cerca de 500 espécies estimadas, é distribuído principalmente nas áreas tropicais da América do Sul, incluindo o sul do Brasil, Uruguai, norte da Argentina, Paraguai e Bolívia. Muitas destas espécies são amplamente utilizadas na medicina popular no tratamento ou prevenção de distúrbios digestivos, reumatismo e diabetes, entre outras aplicações (RODRIGUES et al., 2009). Também foram relatadas atividades antiúlcera e citotóxicas contra células de leucemia. O produto do metabolismo secundário dessa planta é uma fonte de resina para própolis brasileira (própolis verde) após serem coletados pelas abelhas *Apis mellifera*, espécie que poliniza essa planta atraída pelos terpenos e outros produtos voláteis que ela produz. Estudos toxicológicos *in vitro* utilizando própolis verde revelaram que baixas concentrações têm efeito antimutagênico e, altas concentrações efeitos mutagênicos. Análises *in vivo* confirmam que altas doses produzem efeitos mutagênicos (PEREIRA et al., 2008).

Através do método de HPLC realizado por Souza (2009), analisando sete compostos fenólicos importantes ao longo de um ano em amostras de *Baccharis dracunculifolia*, observou que em sua composição são encontrados ácido caféico (CAPE), ácido ferúlico, aromadendrin-40-methyl ether (AME), isosakuranetina, artemillina C, baccharina e ácido 2,2-dimethyl-6-carboxyethenyl-2H-1-benzopyran (DCBEN). Segundo Rodrigues et al (2009), estudos fitoquímicos, nessa espécie, demonstraram a presença de flavonóides (flavona e subgrupos, principalmente flavonol), diterpenos (principalmente diterpenos labdane e clerodano) e triterpenos, que

tem sido apontada como a mais importante fonte botânica da própolis verde. Para se obter melhor qualidade e maior quantidade desses produtos fenólicos, a melhor época do ano para se coletar essa planta seria entre dezembro e abril (SOUZA et al., 2009), embora segundo Sforcin (2007), não tenham sido observadas diferenças sazonais na própolis brasileira, apenas variações quantitativas ao longo do ano.

Flavonoides e ácidos fenólicos possuem ação antibacteriana, antifúngica, antiviral, antineoplásica, hepatoprotetora, imunomoduladoras, e propriedades anti-inflamatórias. Seu uso tem aprovação benéfica em alergias, diabetes, asma, hipertensão, micro sangramento, etc. Muitos dos efeitos desses compostos podem ser associados com atividade antioxidante. Por isso, as propriedades das atividades antioxidantes são as mais estudadas dos polifenóis (MEDIC-SARIC et al., 2009).

Por outro lado, a dispersão de agrotóxicos no ambiente tem sido associada ao aumento na frequência de distúrbios na saúde, inclusive na fertilidade (MOSTAFALOU e ABDOLLAHI, 2013; MEEKER, 2012; MAGNUSSON e LJUNGVALL, 2013). A ametrina é um herbicida do tipo triazina, com ação de inibir a fotossíntese das plantas que, em sua composição química possui um anel aromático contendo átomos de azoto tri-como. A dose letal oral (DL 50) de ametrina é e 508 mg/kg em ratos (TAKAYASU, 2010) e ela é considerada moderadamente tóxica para ingestão oral (EPA, 2005). Esse agrotóxico é amplamente utilizado em muitos países como herbicida seletivo para o controle de folhas largas e gramíneas invasoras em culturas agrícolas de milho e cana-de-açúcar, e existem poucas informações sobre seus efeitos subletais.

Pesquisa recente, feitas pelo nosso grupo de pesquisa, para a investigação da ação da ametrina na reprodução de ratos machos Wistar, demonstrou que houve modificações intersticiais testiculares evidentes mostrando decréscimo no número de células de Leydig e no número de espermatozoides (DANTAS et al., 2015). Como o herbicida afeta negativamente parâmetros reprodutivos, seria interessante avaliar ação da própolis na possível reversão dessas alterações.

De maneira semelhante, um estudo realizado por Rizk (2014) avaliou o efeito protetor do extrato de própolis sobre lesão testicular induzido por Doxorubicina (Dx), um agente anticancerígeno eficaz, capaz de prejudicar a função testicular levando à infertilidade. Dx induziu redução da contagem de espermatozoides, nos marcadores da função testicular, esteroidogênese e expressão gênica testicular de 3 e 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β -HSD e 17 β -HSD) e da proteína reguladora aguda

esteroidogênica (StAR). Além disso, houve um aumento do estresse oxidativo testicular, inflamatório e marcadores de apoptose. Estudos morfométricos e histopatológicos apoiaram os achados bioquímicos. Com a administração de extrato de própolis em ratos normais houve um aumento no nível de testosterona juntamente com o aumento das atividades e expressão gênica de 3β -HSD e 17β -HSD. Portanto, o extrato de própolis pode proteger o testículo de toxicidade induzida por Doxorubicina, sem reduzir o seu potencial anticancerígeno.

No estudo feito por Ivell (2013), com objetivo de investigar o desenvolvimento precoce do sistema reprodutor masculino de seus filhotes machos, com a modificação da expressão dos genes específicos na formação das células de Leydig, fêmeas foram expostas a xenobióticos estrogênicos ou ftalatos durante a gestação e/ou lactação. Houve mortalidade perinatal, diminuição no número da ninhada, diminuição no peso dos ratos tratados comparados com os do controle, aumento no número de células de Leydig e diminuição no peso testicular.

Diante de tais pesquisas, fazemos os seguintes questionamentos:

- A ingestão de própolis pelas fêmeas durante a gestação, afetaria os testículos dos ratos machos (F1) na idade adulta?
- A ingestão de própolis por ratos machos desde o nascimento até a idade adulta, afetaria os testículos dos mesmos?
- A ingestão de própolis durante a vida adulta seria capaz de reverter danos causados ao testículo por um xenobiótico, como um herbicida?

Buscando respostas a essas perguntas, foram avaliados quatro principais mecanismos testiculares: biossíntese de testosterona, morte celular, manutenção das junções intercelulares e resposta ao estresse.

Sabe-se que os andrógenos são produzidos principalmente pelas células de Leydig e que muitas enzimas, como as proteínas 3 e 17β -hidroxiesteroide desidrogenase (3β -HSD e 17β -HSD), CYP11A1, StAR e P450scc, estão envolvidos na regulação da produção de testosterona (Pogrmic-Majkic et al., 2010). A forma funcional de StAR e P450scc estão localizadas na membrana mitocondrial, e sua função está intimamente relacionada com a mitocôndria, além disso a proteína StAR é uma enzima importante na taxa de limitação e na regulação da biossíntese de testosterona nas células de Leydig. Tem sido demonstrado que as espécies reativas de oxigênio (EROs) inibem a expressão de StAR e produção de testosterona nas células de Leydig (LI et al. 2011).

Todavia, produzir hormônio com qualidade e em quantidade suficiente não garante que ele efetivamente irá realizar sua função. É necessário que se ligue aos receptores da célula-alvo. Receptores nucleares de esteroides sexuais são controlados por heterocomplexos que contêm proteínas de choque térmico (HSPs). Uma função crítica do complexo é facilitar o dobramento no domínio de ligação ao hormônio (HBD) dos receptores para ocorrer uma ligação de alta afinidade. A HSP90 interage diretamente com o HBD dos receptores nucleares, uma associação que parece ser responsável pela repressão da função do receptor, mas que é relaxada mediante a ligação do hormônio. Esta capacidade do hormônio para controlar a interação HBD-chaperona é considerada como o primeiro evento no caminho molecular de ação de hormônios esteroides (PRATT and TOFT, 1997). Sendo assim, este seria um aspecto interessante a ser avaliado, buscando os mecanismos de ação da própolis.

Mesmo que o hormônio esteja presente, que ele se ligue ao alvo, essas mesmas proteínas, as HSPs podem ter atividade pró e antiapoptótica (GARRIDO et al., 2001), estando, assim, envolvidas, também, no processo de morte celular. Sabe-se que existem três possíveis mecanismos de morte celular que podem ocorrer, inclusive, em resposta ao estresse: apoptose, necrose e macro autofagia, e atualmente são conhecidos diferentes marcadores para cada um desses eventos como as proteínas casp-9, LC3 e Beclin (YEFIMOVA et al., 2013).

Um aspecto interessante, é que o início do processo apoptótico está geralmente associado com drásticas alterações na concentração de cálcio que é intercelularmente modificada via junções comunicantes, onde são encontrados os conexons constituídos de conexinas. Há evidências de indução e inibição de morte celular pela presença de conexinas (VINKEN et al., 2006). Hejmej et al. (2012) descreveram que mudanças na expressão de proteínas de junções celulares foram acompanhadas de alterações intratesticulares no balanço andrógeno-estrógeno, embora a expressão do receptor de andrógeno não estivesse alterada.

b. Objetivos

b.a Objetivo Geral

Avaliar o efeito da ingestão crônica de própolis nos testículos de ratos, expostos em diferentes fases de vida e investigar sua capacidade de reverter alterações causados pela Ametrina em animais adultos.

b.b. Objetivos específicos

O objetivo específico desta tese foi realizar três experimentos em fases de vida diferentes: (1) a intrauterina, cujas ratas prenhas receberam própolis e os testículos dos ratos machos adultos da geração F1 foram analisados; (2) após o desmame, cujos ratos machos, com 21 dias, começaram a receber própolis até a fase adulta de reprodução e; (3) na vida adulta, com própolis e/ou ametrina em ratos machos com 90 dias de vida.

E as análises propostas para esses experimentos foram: Estudar as alterações nos níveis do hormônio testosterona e alterações na biometria, morfometria e estereologia do testículo; Quantificar o número de espermatozoides testicular; Identificar alterações testiculares por microscopia eletrônica de transmissão (MET); Avaliar a indução de Estresse Oxidativo no Testículo quantificando proteínas totais, enzima Catalase (CAT), a atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD), determinação da peroxidação lipídica (TBARs), avaliação da atividade da Glutathione-S-transferase (GST) e determinação dos níveis de Glutathione Reduzida (GSH); Estudar nos testículos alterações na expressão de marcadores de estereoidogênese como CYP11A1 e StAR por Western Blotting; Estudar nos testículos alterações na expressão de marcadores de morte celular como casp-3 e Beclin, usando Western Blotting; Estudar alterações nos níveis das proteínas de choque térmico HSPs70 and 90 (heat shock proteins) e de comunicação celular como a conexina 43 e n-caderina usando Western blotting.

c. Materiais e Métodos

c.a. Animais experimentais

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética da Unicamp, nº 4009-1. Os tratamentos foram realizados em ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) e administrados por gavagem em três períodos de vida: intra uterina, recém-desmamados e adultos com 90 dias de vida. O tratamento intra uterino foi realizado no Centro de Experimentação Animal da Fundação Hermínio Ometto, e os outros tratamentos no Biotério da Unicamp, onde permaneceram por todo o período experimental, à temperatura de 25°C e umidade do ar a 60%, em ciclo claro e escuro de 12 horas. As ratas prenhas e os filhotes machos do tratamento intra uterino foram alimentados com ração PURINA e água *ad libitum* e os outros grupos recém-desmamados e adultos alimentados com ração QUINTIA e água *ad libitum*.

O tratamento intra uterino foi feito com ratas fêmeas, sendo um grupo controle (n=5) tratado somente com água e outro grupo exposto (n=5) a própolis na concentração de 6mg/kg/dia, concentração baseada em Capucho et al. (2012), e foram analisados somente os ratos machos resultantes dos cruzamentos após 90 dias de vida.

No tratamento dos recém-desmamados, o tratamento foi em dois grupos: o grupo controle Co (n=12) que recebeu apenas água e o grupo G1 (n=12) exposto a própolis, 6mg/kg/dia. O tempo experimental foi de 69 dias, período escolhido para o início da fase reprodutiva do animal. Iniciou com 21 dias de vida, até os 90 dias de vida.

Os animais adultos com idade de 90 dias, indicados para tratamento com Própolis e/ou Ametrina, foram mantidos sob experimentação por 56 dias, período de um ciclo espermatogênico, sendo os grupos divididos em: grupo controle Co (n=12) que recebeu apenas água; P (n=12) exposto à própolis na concentração de 6mg/kg/dia; A (n=12) exposto à ametrina na concentração de 15mg/kg/dia, concentração baseada no artigo de Dantas (2015); P+A (n=12) exposto à própolis e à ametrina nas concentrações de 6mg/kg/dia e 15mg/kg/dia, respectivamente.

A própolis utilizada no tratamento Intra uterino foi coletada na reserva de APP da Usina Moreno, em Luís Antônio, Rod SP-253 Km 160 – Rural, CEP:14210-000 e foi preparada no Laboratório de Química da Universidade Paulista UNIP. Já dos outros dois tratamentos, a própolis foi coletada na região do Paraná e preparada no Laboratório de Biologia da Reprodução, no Departamento de Biologia Celular e Estrutural da Unicamp. O preparo foi através de homogeneização de 30g de própolis em água destilada, completando o volume para 100mL, e mantida sob agitação moderada

por 7 dias, em refrigeração e na ausência de luz. Em seguida, a solução foi filtrada e utilizada como extrato aquoso de própolis (modificada de Sforcin et al. 2000). A concentração foi obtida com o peso seco, uma alíquota do extrato aquoso foi colocada em estufa para evaporação da água. A concentração final de própolis foi de 40mg/ml e posteriormente foi calculado a quantidade a ser administrada aos animais.

O herbicida utilizado foi FARMETRIN 500 SC (FARMEX, S.A.), 500 g/L, com fórmula empírica $C_6H_{17}N_5S$ e DL50 oral aguda para ratas indicada a 2500 mg/kg e com classificação toxicológica é na categoria III. A dose a ser administradas foi escolhida baseando-se no trabalho feito por Dantas et al., 2015.

c.b. Eutanásia e coleta das amostras

Todos os animais foram anestesiados por via intramuscular com uma solução de xilasina 2% (0,5ml/kg) e ketamina 10% (0,9ml/kg).

Metade deles, os de números pares, tiveram seus testículos coletados a fresco, sendo o direito congelado a $-4^{\circ}C$ e posteriormente submetido à dissociação e homogeneização para a contagem dos espermatozoides, e o esquerdo congelado a $-80^{\circ}C$ para posterior análise bioquímica e molecular.

Nos demais animais, os de números ímpares, foram realizados laparotomia medial, rebatendo-se a arcada dorsal, visualizando-se o coração. Identificada a área cardíaca correspondente ao ventrículo esquerdo, foi feita a punção cardíaca e, depois, foi identificada a artéria pulmonar e introduzida uma agulha, conectada ao sistema de perfusão. A drenagem da solução foi obtida pela artéria secção do átrio direito. Iniciou, então, a perfusão, com 100mL de líquido pré-perfusão constituído por salina heparinizada à 1%. Em seguida foram perfundidos com solução Karnovsky (glutaraldeídos 2% e paraformaldeído a 2%), por 30 minutos (MONTEIRO et al., 2008) e fragmentos de testículos foram imersos em solução fixadora composta por tampão cacodilato a 0,1M, pH 7,2, e fixador como acima descrito, por 24h, para a microscopia eletrônica.

c.c. Microscopia de luz

Os testículos imersos na solução fixadora de Karnovsky, por 24 horas permaneceram sob refrigeração e foram submetidos à desidratação em concentrações crescentes de álcool com trocas a cada trinta minutos. Após a desidratação, os testículos foram incluídos em resina glicol metacrilato e seccionados na espessura de 3µm, em micrótomo rotativo, com navalhas de vidro. Realizava-se 5 secções e coletava-se a sexta, que foram aderidas em lâminas e foram coradas com Hematoxilina e Eosina. Este material foi utilizado para realização das análises morfométricas e estereológicas (MONTEIRO et al., 2008).

c.c.a. Morfometria e estereologia testicular

As imagens do parênquima testicular foram capturadas com câmera digital acoplada ao microscópio *Leica DM2000* e as análises morfométricas e estereológicas foram feitas utilizando o software *Image ProPlus*.

c.c.a.a. Proporções volumétricas (%) e volumes dos componentes do parênquima testicular

Estas proporções são estimadas a partir da contagem de 3000 pontos (por animal) projetados sobre imagens capturadas em campos aleatórios, em aumento de 400x e 1000x, com uma grade de 494 pontos. Os elementos quantificados foram: túbulo seminífero, onde são diferenciados lâmina própria, epitélio germinativo e lúmen, enquanto no espaço intersticial, são quantificados: células de Leydig, vasos sanguíneos, espaço linfático, macrófagos e tecido conjuntivo. O volume de cada componente do parênquima testicular, expresso em mL, foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume total líquido do parênquima testicular. O valor deste último será obtido subtraindo-se do volume do testículo o volume da túnica albugínea. Segundo França (1991), como a densidade do testículo é em torno de 1 (1,03 a 1,04), a massa testicular é considerada igual ao seu volume.

c.c.a.b. Diâmetro tubular, altura do epitélio dos túbulos seminíferos e comprimento total dos túbulos seminíferos

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 30 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentam contorno o mais circular possível, em aumento de 400x. Segundo França & Russel (1998) o diâmetro tubular permanece relativamente constante em animais sexualmente maduros, não sazonais, portanto, estas medidas não levarão em consideração o estágio do ciclo. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi mensurada a altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada da membrana basal até a luz tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio em cada túbulo representou a média de duas medidas tomadas de forma diametralmente opostas.

c.d. Biometria (MONTEIRO et al., 2008)

Um dos testículos, o direito, foi dissecado para obtenção do peso da albugínea e do parênquima testicular. Com base nos pesos corporais e testiculares obtidos após a eutanásia dos animais, foi obtido o índice gonadossomático (GSI) calculado a partir da fórmula $GSI = MO / MC \times 100$. Onde MC significa massa corporal e MO, massa total das gônadas.

Os órgãos reprodutivos foram cuidadosamente libertos de tecido circundante, consistindo de gordura e conjuntivo e pesados. Um testículo foi dissecado para remover a túnica albugínea. O GSI, isto é, a percentagem de massa corporal atribuído ao testículo, foi obtido a partir da massa total das gônadas dividido pelo peso corporal de cada animal $\times 100$.

c.e. Contagem espermática

A túnica albugínea foi removida do testículo e o parênquima testicular foi homogeneizado em 5mL de salina-Triton (0,15 M NaCl, 0,05% (v/v) Triton X-100) em homogeneizador por 2 minutos. Foram contados núcleos de espermátides alongadas resistentes a homogeneização com característica de estágio 19. Foram contados 4 campos por animal em câmara de Neubauer. O número de núcleos de espermátides por

testículos e por grama de testículos foi calculado e os valores divididos por 6,1 dias para convertê-los em produção diária de espermatozoides (ROBB et al., 1978).

c.f. Quantificação do Estresse Oxidativo no Testículo

c.f.a Quantificação de proteínas totais

A concentração de proteína foi medida de acordo com o método do biureto (GORNALL et al., 1949). Para a determinação de proteínas totais, curva de calibração a partir de diferentes concentrações de albumina 22 % foi preestabelecida. O tecido foi homogeneizado em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4, por meio do homogeneizador de tecidos modelo IKA T-18, marca (Biovera). As proteínas quantificadas com leituras de absorvâncias em 540nm. Os valores obtidos foram inseridos na equação da reta preestabelecida e foi determinada a concentração proteica para cada tecido.

c.f.b Avaliação da atividade da enzima Catalase (CAT)

Os ensaios para dosagem da atividade da CAT foram conduzidos de acordo com o método de Aebi (1974). Foi adicionando 0,1 mg de proteínas em 2mL de tampão fosfato 50mM, pH 7.0. A reação foi iniciada pela adição de 100 µL de peróxido de hidrogênio 10 volumes. A velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio foi monitorada espectrofotometricamente por 2 minutos e 30 segundos em intervalos de 30 segundos por meio da variação da absorvância em 240nm. A atividade foi expressa em unidades de absorvância/minuto.

c.f.c Avaliação da atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pelo método de autooxidação do pirogalol descrito por Marklund e Marklund (1974). O ensaio foi desenvolvido com 0,1 mg de proteína, 2mL de tampão TRIS- HCl, 25mM com EDTA 20mM, pH 8.5 e 200µl de pirogalol 15mM. A solução foi incubada a 25° C por 10 minutos. Após a incubação,

foram adicionados 200µl de HCl 1N para parar a reação. A absorbância foi lida em 440nm. Uma unidade de SOD foi determinada como a quantidade de enzima que inibiu a oxidação do pirogalol em 50%. A atividade foi expressa em unidades de absorbância/minuto.

c.f.d Determinação da peroxidação lipídica (TBARs)

Uma das técnicas mais utilizadas para se avaliar a oxidação lipídica é o teste do malondialdeído (MDA). O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados. É volátil, possui baixo peso molecular ($C_3H_4O_2$, P.M. = 72,07), tem uma cadeia curta 1,3-dicarbonil e é um ácido moderadamente fraco ($pK_a = 4,46$). Em condições apropriadas de incubação (meio ácido e aquecimento), reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos para produzir cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível (JANERO, 1990; BENZIE, 1996).

O nível de peroxidação lipídica foi avaliado misturando-se 5 mg de proteínas do homogenato de testículo com 1,0mL de água destilada, 1mL de ácido tiobarbitúrico (TBARs) 0,67 % preparado em NaOH 50mM, 10µl de NaOH 10 M e 0,5mL de H_3PO_4 20%. Essa mistura foi aquecida em banho-maria por 15 minutos e resfriada em gelo. Na sequência, foi adicionado 3,0mL de n-butanol para extração do cromógeno e a mistura foi vigorosamente agitada. A fase orgânica (com cromógeno) foi separada por centrifugação (5 minutos, 3000rpms) e a absorbância foi lida em 535nm. A concentração de malondialdeído (MDA) foi calculada usando $\lambda_{535} = 149.000 M^{-1}cm^{-1}$ (BUEGE; AUST, 1978; GORNALL et al., 1949).

c.f.e Avaliação da atividade da Glutathione-S-transferase (GST)

A atividade da GST foi avaliada seguindo o método de Habig et al. (1974). A mistura analisada é constituída de 2,7mL de tampão fosfato, 400 µL de GSH 0,1mM, 400µL de CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) 0,1mM e 1 mg de proteína. O aumento

na absorbância foi medido a 340nm por 5 minutos com 1 minuto de intervalo. O resultado foi expresso como absorbância/minuto.

c.f.f Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)

Os níveis de GSH foram quantificados utilizando-se o tecido homogeneizado com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 por meio dos procedimentos descritos por Ellman (1959). Foi adicionado 5 mg de proteínas ao mesmo volume de ácido tricloroacético (TCA 20 %, EDTA 1mM). A mistura permaneceu em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente para precipitação das proteínas. Em seguida, foi centrifugada por 5 minutos a 3500 rpms e 100 µL do sobrenadante foi misturado em 2mL de tampão TRIS- HCl 25mM, com EDTA 1mM, pH 8.2. A absorbância foi lida em 412nm, imediatamente após a adição de 20 µL DNTB 10mM e uma segunda leitura foi realizada após 15 minutos do início. Os níveis de GSH foram calculados por meio da equação $(\text{Abs final} - \text{Abs inicial}) \times 1,57 \text{ (mM)}$ (ALLAMEH et al., 1997).

c.g Immunoblotting ou Western blotting.

Os testículos foram homogeneizados em Solução de Buffer Lise (50mM Tris-HCL, 150mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP40, 0,25% Deoxicolato de Sódio) com os inibidores (100 µg / ml PMSF, 2mM Na₃VO₄. 5mM NaF; 10µg / ml Leupeptina) . O tecido foi centrifugado a 15000 rpm 4°C. Alíquotas do sobrenadante foram misturadas no tampão da amostra para Western blotting (312,5 Mm Tris-HCl, 10% SDS sólido, 50% glicerol, quantidades vestigiais Bromophenol Blue, H₂O_d) de acordo com a proporção de 1: 5, fervida e corrida em poliacrilamida Gel -SDS (PAGE), no tampão Running para Western Blotting, usando BioRad equipment. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose em tampão de transferência Western Blotting Semi-dry (Tris-HCl a 0,25 M, metanol a 20%, SDS a 0,05%, glicina a 0,2 M). Após transferência, as membranas foram lavadas em tampão TBS-T (Tris-HCl 25mM (pH 8,0), NaCl 125mM, HCl para ajuste, Tween 20 a 0,05%) e bloqueadas durante 40 minutos em BSA a 5% em tampão TBS-T. As membranas foram então lavadas em tampão TBS-T, incubadas com anticorpos primários específicos em BSA a

3% em Tampão Basal de TBS-T, durante a noite a 4 ° C, com agitação constante. As membranas foram lavadas 3 vezes durante 15 minutos em TBS-T, depois incubadas durante 2 horas num anticorpo secundário em BSA a 1% adicionadas a TBS-T no Tampão Basal de TBS-T, à temperatura ambiente. Finalmente, as membranas foram fotografadas no fotodocumentador UVITECH, desenvolvido pelo “Clarity Max Western ECL substrate”. A intensidade da banda foi lida pelo densitômetro usando o programa *Image J*. (Santos et al, 2011)

Os anticorpos primários aplicados foram: anti-Beclin (0,5: 1000; policlonal de coelho, ab62557, marcador Abcam); anti-caspase-3 (1: 500; policlonal de coelho, ab13847, marcador Abcam-autofagia marcador Abcam-autofagia); CYP11A1 (1: 1000; Rabbit, D8F4F, Cell Sigma - marcador da via esteroidogênica; anticorpo anti-Hsp70 (1: 1000; anticorpo monoclonal, ab2787, Abcam - proteínas de choque térmico); e anticorpo anti-Hsp90 (1: 1000; monoclonal de camundongo) , Ab13492, Abcam - proteínas de choque térmico), Anti-conexina 43 (1: 8000, policlonal de coelho, ab11370, proteínas de comunicação celular Abcam), Anti-StAR (1: 1000, monoclonal de mouse, ab58013, marcador Abcam) e Anti-N Cadherin antibody [EPR1791-4] (1: 5000, Rabbit monoclonal, ab76011, marcador Abcam)

Os anticorpos secundários foram: anti-rato IgG H & L (HRP) ab6789, Abcam e Anti-Rabbit IgG, 170-6515, representante da Bio-Rad.

c.h Coleta do sangue e dosagem de testosterona sérica

Após feito a punção cardíaca, o sangue coletado dos animais adultos, foi enviado ao Laboratório São Lucas na Cidade de Rio Claro. A quantificação dos níveis séricos de testosterona foi feita pelo método de radioimunoensaio.

c.i Análises Estatísticas

Os resultados estatísticos são obtidos com a avaliação dos dados de distribuição, se são paramétricos ou não-paramétricos, e a partir dos parâmetros comparados entre os grupos tratados e controle, é analisado a variância, que pode ser

feita com análise por via (ANOVA) com pós-teste de Tukey para avaliação de quatro grupos paramétricos, com grau de significância de 5%.

c.j Preparo do material para análise em microscopia eletrônica de transmissão

Pequenos fragmentos de testículo dos três grupos foram pós-fixados por imersão em glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2. Nova pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio 1%, e posteriormente o material foi desidratado em série crescente de acetona. Finalmente, o material foi infiltrado e incluído em resina Epon 812. Após a obtenção de cortes ultrafinos com navalha de diamante e contrastação com acetato de uranila e citrato de chumbo, o material será observado através de microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss; Leo 906 – da UNICAMP) e fotodocumentado.

c.k Estudo Fitoquímico e Isolamento dos Constituintes da Própolis Verde

As análises fitoquímicas e identificação dos constituintes químicos do extrato aquoso da Própolis foram conduzidas pela Profa. Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya (FCF-UNICAMP).

A análise cromatográfica foi realizada utilizando o equipamento UHPLC-MS Acquity da Waters. Os extratos filtrados (0,22µm), 7µL foram analisados usando coluna C18 (50mm x 2.1 mm, 1.7µm partícula) mantida a 30° C e um fluxo de 200µL/min nas seguintes condições: Fase móvel A – Água purificada com 0,1 % ácido fórmico, Fase B – metanol grau HPLC. Início com 10 % B, rampa até 100 % B em 9 minutos, mantido em 100% até 11 minutos, retorno às condições iniciais e estabilizado até 12 minutos. As condições do MS foram ionização por eletrospray em modo negativo com capilar em 3 kV e cone em 30 V, temperatura da fonte em 150°C e dessolvatação em 350° C.

d. Referências Bibliográficas

AEBI, H. in: BERGMAYER, H. V., 1974, *Methods in Enzymatic analysis*, New York: Academic press; vol.2, p. 674-684.

ALLAMEH, A., VANSOUN, E. Y., ZARGHI, A. Role of glutathione conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Mechanisms of Ageing and Development*, Vol. 95. Issues 1-2, April 1997, Pages 71-79, [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(97\)01862-9](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(97)01862-9).

BENZIE, I.F, STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996 Jul 15;239(1):70-6.

BUEGE J.A., AUST, S.D., 1978, Microsomal lipid peroxidation. *Methods and Enzymology*, v. 52, pp. 302-310.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem. Toxicol.*, Florida, v.36, n.4, p.347-363, 1998.

CAPUCHO, C.; SETTE, R.; PREDES, F.S.; MONTEIRO, J.C.; PIGOSO, A.A.; BARBIERI, R.; DOLDER, M.A.H.; SEVERI-AGUIAR, G.D.C., 2012. Green Brazilian propolis effects on sperm count and epididymal morphology and oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology* 50, p. 3956–3962.

DADA, R, et al., 2012. Epigenetics and its role in male infertility. *J. Assist. Reprod Genet*. 29(3), 213-23.

DANTAS, T.A. et al. Leydig cell number and sperm production decrease induced by chronic ametryn exposure: a negative impact on animal reproductive health. *Environmental Science and Pollution Research* 2015; DOI 10.1007/s11356-014-4010-5.

ELLMAN, G. L., 1959, Tissue sulphydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 82, p. 70-77.

ELMAZOU DY, R.H., ATTIA, A.A., EL-SHENAWY, N.S., 2011. Protective role of propolis against reproductive toxicity of chlorpyrifos in male rats. *Pest.Biochem. Physiol.*, 175–181.

FRANÇA, L.R., 1991. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. 185f. Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D., 1998. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J.; MARTINEZ-GARCIA, R. (Eds.) *Male reproduction: A multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Livingstone, p.197-219.

GARRIDO, C., GURBUXANI, S., RAVAGNAN, L., KROEMER, G., 2001. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 286, 433-442.

GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J., DAVID, M.M., 1949, Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal Biological Chemistry*, v.177, n 2, p. 751-766.

HABIG, W.H, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem. 1974 Nov 25;249(22):7130-9.

HEJMEJ, A., KOPERA, I., KOTULA-BALAK, M., LYDKA, M., LENARTOWICZ, M., BILINSKA, B. 2012. Are expression and localization of tight and adherens junction proteins in testes of adult boar affected by foetal and neonatal exposure to flutamide? Int. J. Androl 35, 340-362.

IVELL, R., HENG, K., NICHOLSON, H., ANAND-IVELL, R., 2013, Brief maternal exposure of rats to the xenobiotics dibutyl phthalate or diethylstilbestrol alters adult-type Leydig cell development in male offspring. Asian Journal of Andrology 15, 261–268.

JANERO D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Radic Biol Med. 1990;9(6):515-40.

KUMAZAWA,S. HAMASAKA,T. NAKAYAMA,T. Antioxidant activit of própolis of various geographic origins. Food Chemistry, Japão, v. 84, n. 3, p. 329–339, 2004.

LI, W. R., CHEN, L, CHANG, Z. J., XIN, H., LIU, T., ZHANG, Y. Q., LI, G. Y., ZHOU, F., GONG, Y. Q., GAO Z. Z., XIN, Z. C. 2011. Autophagic deficiency is related to steroidogenic decline in aged rat Leydig cells. Asian Journal of Andrology 13, 881–888.

MARKLUND S, MARKLUND G., Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem. 1974 Sep 16;47(3):469-74.

MAGNUSSON, U., LJUNGVALL, K. 2013. Environmental pollutants and dysregulation of male puberty – A comparison among species. Reproductive Toxicology. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.002>.

MBONGUE, G. Y. F., KAMTCHOUING, P., DIMO, T. 2011. Effects of the aqueous extract of dry seeds of *Aframomum melegueta* on some parameters of the reproductive function of mature male rats. Andrologia 44, 53–58.

MEDIĆ-SARIĆ M, RASTIJA V, BOJIĆ M, MALES Z., From functional food to medicinal product: Systematic approach in analysis of polyphenolics from propolis and wine, Nutrition Journal, Croacia, v. 8, 2009, doi:10.1186/1475-2891-8-33.

MEEKER, J. D., 2012. Exposure to Environmental Endocrine Disruptors and Child Development. Arch Pediatr Adolesc Med. 166(6): E1–E7. doi:10.1001/archpediatrics.2012.241.

MONTEIRO, J. C., PREDES, F., MATTA, S. L. P., DOLDER, H., 2008. *Heteropterys aphrodisiaca* infusion reduces the collateral effects of cyclosporine A on the testis. The anatomical Record 291, 809-817.

MOSTAFALOU, S., ABDOLLAHI, M. 2013. Pesticides and Human Chronic Diseases; Evidences, Mechanisms, and Perspectives. Toxicol Appl Pharmacol 268(2), 157-177.

PEREIRA, A.D., DE ANDRADE, S.F., DE OLIVEIRA SWERTS, M.S.,D MAISTRO, E.L. First in vivo evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by

comet assay and micronucleus test. Food Chem. Toxicol., Alfenas, v. 46, n. 7, p. 2580-2584, 2008.

POGRMIC-MAJKIC, K., FA, S., DAKIC, V., KAISAREVIC, S., KOVACEVIC, R., 2010. Upregulation of Peripubertal Rat Leydig Cell Steroidogenesis Following 24 h In Vitro and In Vivo Exposure to Atrazine. Toxicol. Sci. 118(1), 52–60.

PRATT, W., TOFT, D. O., 1997. Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones. Endocrine Reviews 18(3), 306-360.

ROBB, G.W., AMANN, R.P., KILLIAN, G.J., 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. J. Reprod.Fert. 54, 103-107.

RODRIGUES, C.R., DIAS, J.H., SEMEDO, J.G., DA SILVA, J., FERRAZ, A.B., PICADA, J.N. Mutagenic and genotoxic effects of *Baccharis dracunculifolia* (D.C.), Journal of Ethnopharmacology, Canoas, v. 124, n. 2, p. 321–324, 2009.

RIZK, S.M., ZAKI, H.Z., MINA, M.A.M., 2014. Propolis Attenuates Doxorubicin-Induced Testicular Toxicity in Rats, Food and Chemical Toxicology 67, 176–186.

RUSSELL, L. D., ETTLIN, R. A., SINHA HILIN, A. P., CLEGG, E. D., 1990. Mammalian spermatogenesis. In: Russel L L. D, Griswold M. D, editors. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River Press, p. 1-38.

SAID, R.A., GRASSI, T.F., SCOLASTICI, C., ALVES DE LIMA, R.O., DARROS, B.R., BARBISAN, L.F., DE CAMARGO, J.L. Absence of chemo preventive influence of propolis on the rat liver altered foci development. Exp Toxicol Pathol., Ilhéus, v. 62, n. 4, p. 405-12, 2010.

SANTOS, A.M.; SCHECHTMAN, D.; CARDOSO, A.C.; CLEMENTE, C.F.M.Z.; SILVA, J.C. et al. FERM domain interaction with myosin negatively regulates FAK in cardiomyocyte hypertrophy. Nature Chemical Biology, 2012, vol 8, p. 102–110.

SFORCIN, J.M., FERNANDES JR, A., LOPES, C. A. M., BANKOVA, V., FUNARI, S. R. C., 2000. Seasonal effects of Brazilian propolis antibacterial activity. J. of Ethnopharmacol., Botucatu, v. 73, p. 243-249.

SOLIMAN G. A., DONIAAEL R., AWAAD A. S., ALQASOUMI S. I., YUSUFOGLU H. 2012. Effect of *Emex spinosa*, *Leptadenia pyrotechnica*, *Haloxylon salicornicum* and *Ochradenus baccatus* extracts on the reproductive organs of adult male rats. Pharm. Biol. 50(1), 105-12.

SOUZA, J.P.B., LEITE, M. F., JORGE, R.F., RESENDE, D.O., SILVA FILHO, A.A., FURTADO, N.A.J. C., SOARES, A.E. E., SPADARO, A. C. C., MAGALHÃES, P.M., BASTOS, J.K. Seasonality Role on the Phenolics from Cultivated *Baccharis dracunculifolia*, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Campinas v. 2011, doi:10.1093/ecam/nep077

TAKAYASU, T., ISHIDA, Y., KIMURA, A., NOSAKA, M., KAWAGUCHI, M., KONDO, T. 2010. Postmortem Distribution of Ametryn in the Blood and Organ Tissues of an Herbicide-Poisoning Victim. J. Analyt. Toxic. 34, 2010. 287-291p.

VINKEN, M., VANHAECKE, T. PEPELEU, P., SNYKERS, S., HENKENS, T, ROGIERS, V. 2006. Connexins and their channels in cell growth and cell death. *Cellular Signalling* 18, 592-600.

YEFIMOVA, M. G., MESSADDEQ, N., HARNOIS, T., MEUNIER, AC., CLARHAUT, J., NOBLANC, A., WEICKERT, JL., CANTEREAU, A., PHILIPPE, M., BOURMEYSTER, N., BENZAKOUR, O. 2013. A chimerical phagocytosis model reveals the recruitment by Sertoli cells of autophagy for the degradation of ingested illegitimate substrates. *Autophagy* 9(5), 653–666.

YOUSEF, M. I., KAMEL, K. I., HASSAN, M. S., EL-MORSY, A.M.A., 2010. Protective role of propolis against reproductive toxicity of triphenyltin in male rabbits. *Food and Chemical Toxicology*, Egito, v. 48, n. 7, p. 1846–185.

YOUSEF M.I., SALAMA A.F., 2009. Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food Chem. Toxicol.* 47, 1168–1175.

e. Capítulo I – Artigo Tratamento animais Recém Desmamados

Ingestão de própolis verde por ratos Wistar causa alteração de parâmetros reprodutivos na vida adulta

Capucho, C¹.; Severi-Aguiar, G. D. C.¹; Reis, I. B. ²; Silva, F. J. T. N.¹; and Dolder, M. A. H.¹.

1-Reproductive Biology Laboratory, Structural and Functional Biology Department, State University of Campinas - UNICAMP, CP. 6109, Campinas, São Paulo, CEP 13083-863, Brazil

2- Anatomy, Cell Biology and Physiology and Biophysics Department, Urogenital carcinogenesis and Immunotherapy Laboratory, State University of Campinas - UNICAMP, CP. 6109, Campinas, São Paulo, CEP 13083-865, Brazil

Abstract

A própolis verde brasileira poderia interferir na maturação dos testículos de ratos Wistar, levando ao comprometimento de sua estrutura e de suas funções na fase adulta o que poderia até afetar sua infertilidade? Nosso objetivo é investigar essa suposição em ratos Wistar recém-desmamados, expondo-os, por via oral, própolis, até atingirem a fase adulta. Para isso usamos as seguintes análises: morfológica, morfométrica, estereológica, contagem de espermatozoides, produção diária de espermatozoides, indução de estresse oxidativo e Western Blotting. E como resultado, observamos que o estresse oxidativo aumentou os níveis de peroxidação lipídica e a síntese de enzimas antioxidantes, como a GST e CAT. Reduziu a expressão de proteínas localizadas na membrana mitocondrial das células de Leydig, que participam da esteroidogênese como StAR e CYP11A1, além de redução na expressão da proteína Beclin, de mitocôndrias, adensamento do espaço citoplasmático com aumento de REL, alterações essas associadas a alterações na síntese de esteroides. Provocou aumento do epitélio germinativo, retardou o amadurecimento e alterou a estrutura das células germinativas levando à redução da produção diária de espermatozoides e à formação de espermatozoides mal formados na região luminal. E como conclusão, nossos resultados apontam que a própolis interfere no processo de esteroidogênese.

Palavras-chave: testículo; contagem de espermatozoides; morfometria; estereologia; western blot;

Introdução

A puberdade marca a maturação sexual do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG), é o auge dos perfis hormonais dos adultos e alterações físicas que são essenciais para o bom desenvolvimento reprodutivo. Neste momento, o eixo HPG estimula a produção de esteroides sexuais gonadais, o que leva ao desenvolvimento de características sexuais secundárias, crescimento acelerado e obtenção de fertilidade (Marshall & Tanner 1970).

O início da puberdade em humanos depende de uma série de fatores, como genética, nutrição e condições socioeconômicas (Parent, 2003). Atualmente, alguns estudos observaram uma diminuição da idade de início da puberdade, caracterizado não geneticamente, mas devido à alterações no estado nutricional, como em casos de obesidade, ou então ao impacto da poluição química do meio ambiente (Buck Louis et al 2008; Maranghi and Mantovani 2012; Mouritsen et al. 2010; Schoeters et al. 2008; Toppari and Juul 2008).

Lee (2019) descreve que o início do desenvolvimento puberal em meninas pode ocorrer mais cedo, devido a disponibilidade de energia suficiente e adiposidade e também a fatores ambientais, tais como produtos químicos de desregulação endócrina (EDCs), que podem afetar não só o controle do balanço energético, mas também a puberdade e reprodução. EDCs constituem substâncias hormonalmente ativas que podem perturbar a puberdade, agindo tanto periféricamente nos órgãos-alvo, tais como o tecido adiposo ou glândulas supra-renais, e /ou centralmente sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gónadas (HPG). Dependendo se a exposição ocorre mais cedo durante a vida fetal e neonatal ou mais tarde durante a primeira infância, EDCs podem levar a resultados diferentes através de diferentes mecanismos. Evidências de associações entre exposições a desreguladores endócrinos e alterado sincronismo da puberdade sugere uma relação entre eles.

Nesse sentido, existem na literatura descrições sobre o desenvolvimento puberal, suas implicações, menarcas precoces, e alguns motivos para sua ocorrência. Essas pesquisas são, principalmente, voltadas ao gênero feminino e as alterações observadas são devidas a ação de poluentes ambientais na reprodução animal (Lee, 2019)

Por outro lado, disruptores endócrinos químicos (DEQs) incluem compostos capazes de alterar, mimetizar ou antagonizar o funcionamento normal do sistema

endócrino por interferir na síntese, no metabolismo, na ligação a receptores e na resposta celular a hormônios endógenos. Os principais riscos dos DEQs são consequência de sua habilidade em induzir efeitos sutis, mesmo em doses bem abaixo das preconizadas, promovendo efeitos detrimenais nos processos reprodutivos e do desenvolvimento, além de poder causar tumorigênese e teratogênese. Há evidências de que a exposição humana aos DEQs resulta da ingestão de compostos com traços contaminantes nos alimentos ou por altos níveis de fitoquímicos em frutas, grãos e vegetais (DE FALCO et al., 2007), pelo uso de medicamentos, da contaminação ambiental por metais pesados e outros elementos e por exposição ocupacional (SIU et al., 2009; CHANDRA et al., 2007; ANAHARA et al., 2008)

Esforços em identificar e caracterizar os DEQs revelaram que um número relativamente grande deles tem atividade estrogênica, antiestrogênica ou anti-androgênica e que, em contraste, poucos deles tem sido associados com atividade androgênica, apesar do consenso sobre a influência de fatores ambientais na saúde reprodutiva masculina (CHEN et al., 2008), porém, esses compostos são difíceis de serem investigados porque agem silenciosamente com efeitos adversos latentes graves.

Goyal et al. (2007) descreveram aumentos significativos nos níveis de licopeno no sangue e no plasma seminal humano após sua suplementação na dieta, resultando em um aumento da capacidade de sequestrar radicais livres. Espécies reativas de oxigênio são prejudiciais à saúde e função dos espermatozoides. O sêmen contém mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de defesa para combater tais espécies, e o licopeno, que é um antioxidante, constituiria uma arma não-enzimática. Al-Yahya et al. (2006) demonstraram que camundongos suíços albinos tratados com Ginkgo biloba mostraram alterações significativas no peso da cauda do epidídimo e da próstata, aberrações cromossômicas, na taxa de gravidez e na perda gestacional pré-implantação. No entanto, a motilidade, a contagem de espermatozoides e morfologia dos espermatozoides não foram afetadas. Parâmetros bioquímicos mostraram depleção de ácidos nucleicos e aumento do MDA (malondialdeído) o que elucidou o papel de espécies reativas de oxigênio nas mudanças induzidas nos cromossomos do testículo e na função reprodutiva desses animais.

Chandra et al. (2011) demonstraram que o chá verde, preparado a partir de folhas secas do arbusto *Camellia sinensis*, quando ingerido em doses relativamente altas pode causar comprometimento morfológico e funcional do testículo em roedores.

Russo et al. (2006) aventaram a possível utilização da própolis na prevenção e no tratamento da infertilidade masculina, devido a sua capacidade de proteger o DNA dos espermatozoides humanos contra o dano oxidativo induzido por espécies de oxigênio reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Outros autores demonstraram que a própolis oferece proteção contra a infertilidade, melhorando a produção, a motilidade, a contagem e a qualidade dos espermatozoides de ratos, e que ela foi capaz de ativar o processo de esteroidogênese e, portanto, a produção de testosterona (YOUSEF E SALAMA, 2009). Segundo Yousef et al. (2010), esse produto natural pode ser eficaz na proteção contra a toxicidade reprodutiva induzida por um disruptor endócrino chamado trifeniltina, causando melhorias significativas nas características do esperma de coelho. ElMazoudy et al. (2011) demonstraram que a administração prévia de própolis em animais tratados com clorpirifos, um inseticida organofosforado (CPF) que tem sido relacionado a deformidades genitais, melhora o dano testicular e alivia os efeitos tóxicos do CPF na função reprodutiva em ratos machos. No entanto, eles também demonstraram que nos grupos tratados com própolis foram observados aumento nos níveis de testosterona (ELMAZOUUD et al., 2009; YOUSEF E SALANA, 2009), na produção total de espermatozoides, motilidade espermática e no número de espermatozoides móveis (YOUSEF et al, 2010), nos níveis de 17-ketosteroide redutase e no conteúdo de proteína testicular (YOUSEF E SALANA, 2009), o que torna evidente que a própolis também é capaz de interferir na função reprodutiva.

Com relação a alterações em parâmetros reprodutivos de machos, resultados do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a própolis verde brasileira alterou a função reprodutiva de ratos, afetando a produção de espermatozoides e a morfologia do epidídimo quando administrada oralmente na dose de 6 mg/kg/dia, durante 56 dias (Capucho et al. 2012). Além disso, foi observado aumento significativo no volume das células de Leydig (LCs) e na produção diária de espermatozoide (PDE). Quando utilizado 10 mg de própolis/ kg/dia ocorreu maior expressão de conexina 43 (Cx43) e indução de morte celular. Em ambas as concentrações foram observados danos morfológicos às células germinativas, células de Sertoli e LCs (Severi-Aguiar et al., 2017). Tais achados refletem que a própolis foi capaz de alterar a homeostase reprodutiva dos animais, apesar dos diversos efeitos benéficos que ela induz.

Diferentemente do exposto acima, os produtos naturais são geralmente usados na medicina popular para o tratamento de disfunções sexuais masculinas (SOLIMAN et al., 2012, MBONGUE et al., 2011) e não como indutores das mesmas.

Há na literatura várias descrições de infertilidade masculina, um problema comum e complexo que afeta 1 em cada 20 homens. Apesar das muitas pesquisas nessa área, em muitos casos, as causas são desconhecidas (DADA et al., 2012).

Com base nessas informações, surgiu o questionamento se a própolis verde brasileira poderia interferir na maturação dos testículos de ratos Wistar, levando ao comprometimento de sua estrutura e de suas funções na fase adulta o que poderia até afetar sua infertilidade. Poderia esse produto natural comportar-se como um EDC? A fim de investigar essas suposições, ratos Wistar recém-desmamados receberam própolis até atingirem a fase adulta, que neste trabalho consideramos com 90 dias de vida.

Material e Método

Animais experimentais e extrato de própolis

A exposição ao extrato de própolis foi realizada em 24 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), assim que foram desmamados, por gavagem. Foram divididos em dois grupos: o grupo controle Co (n=12) que recebeu apenas água e o grupo P (n=12) exposto a 6mg/kg/dia. O tempo experimental foi de 69 dias, para completar os 90 dias de vida, início da fase reprodutiva.

A própolis utilizada no experimento foi coletada na região do Paraná e preparada no Laboratório de Biologia da Reprodução, no Departamento de Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP. O preparo foi através de homogeneização de 30g de própolis em água destilada, completando o volume para 100mL, e mantida sob agitação moderada por 7 dias, em refrigeração e na ausência de luz. Em seguida, a solução foi filtrada e utilizada como extrato aquoso de própolis (modificada de Sforcin et al. 2000). Uma alíquota do extrato aquoso foi colocada em estufa para evaporação da água e a concentração foi obtida com o peso seco. A concentração final de própolis foi de 40mg/ml e posteriormente foi calculado a quantidade a ser administrada aos animais.

Estudo Fitoquímico e Isolamento de Constituintes da Própolis Verde

A análise fitoquímica e a identificação de constituintes químicos do extrato aquoso de própolis foram realizadas pela professora doutora Alexandra Christine Elena Frankland Sawaya (FCF-UNICAMP).

A análise cromatográfica foi feita utilizando o equipamento UHPLC-MS Acquity equipment of Waters. Os extratos filtrados (0,22 μ m), 7 μ L foram analisados usando uma coluna C18 (50mm x 2,1mm, partículas de 1,7 μ m) mantida a 30 ° C e um fluxo de 200 μ L/min nas seguintes condições: Fase móvel A - Água purificada com 0,1% de ácido fórmico, Fase B - HPLC metanol. A iniciação foi com 10% B, com inclinação para 100% B em 9 minutos, mantida a 100% por 11 minutos, retornando às condições iniciais e estabilizando em até 12 minutos. As condições de MS foram a ionização por eletrospray em modo eletrodo negativo com um tubo capilar de 3 kV e um cone de 30 V, a temperatura da fonte foi de 150 ° C e a dessolvatação a 350 ° C.

Eutanásia e coleta das amostras

A eutanásia dos animais foi feita com idade de 90 dias, tratados por 69 dias (RUSSELL et al, 1990). Todos os animais receberam por via intramuscular uma solução de xilasina 2% (0,5ml/kg) e ketamina 10% (0,9ml/kg).

Metade deles, os de números pares, tiveram seus testículos coletados a fresco, sendo o direito congelado a -4°C e posteriormente submetido à dissociação e homogeneização para a contagem dos espermatozoides, e o esquerdo congelado a -80°C para posterior análise bioquímica (estresse oxidativo e western blotting).

Nos demais animais, os de números ímpares, foi realizada laparotomia medial, rebatendo-se a arcada dorsal, visualizando-se o coração. Identificada a área cardíaca correspondente ao ventrículo esquerdo, foi feita a punção cardíaca e, depois, foi identificada a artéria pulmonar e introduzida uma agulha, conectada ao sistema de perfusão. A drenagem da solução foi obtida pela artéria secção do átrio direito. Iniciou, então, à perfusão, com 100mL de líquido pré-perfusão constituído por salina heparinizada à 1%. Em seguida foram perfundidos com solução Karnovsky (glutaraldeídos 2% e paraformaldeído a 2%), por 30 minutos (Monteiro et al., 2008) e fragmentos de testículos foram imersos em solução fixadora composta por tampão

cacodilato a 0,1M, pH 7,2, e fixador como acima descrito, por 24h, para a microscopia eletrônica.

Biometria

Um dos testículos, o direito, foi dissecado para obtenção do peso da albugínea e do parênquima testicular. Com base nos pesos corporais e testiculares obtidos após a eutanásia dos animais, foi obtido o índice gonadossomático (GSI) dividindo a massa total das gônadas (MO) pela massa corporal (MC) x 100 (MONTEIRO et al., 2008).

Microscopia de luz

Os testículos fixados foram submetidos à desidratação. Após, foram incluídos em resina glicol metacrilato e seccionados, em micrótomo rotativo. As secções obtidas foram coradas com Hematoxilina/Eosina. Posteriormente, foram feitas as análises morfológicas, morfométricas e estereológicas (MONTEIRO et al., 2008).

Morfometria e estereologia testicular

As imagens do parênquima testicular foram capturadas com câmera digital acoplada ao microscópio Leica DM2000 e as análises morfométricas e estereológicas foram realizadas utilizando o software *Image ProPlus*. As primeiras análises foram as proporções volumétricas (%) e volumes dos componentes do parênquima testicular, cujas proporções são estimadas a partir da contagem de 3000 pontos (por animal) projetados sobre imagens capturadas em campos aleatórios, em aumento de 200x e 1000x, com uma grade de 494 pontos. Os elementos quantificados foram: túbulo seminífero, onde são diferenciados lâmina própria, epitélio germinativo e lúmen, enquanto no espaço intersticial, são quantificados: células de Leydig, vasos sanguíneos, espaço linfático, macrófagos e tecido conjuntivo. O volume de cada componente do parênquima testicular, expresso em mL, foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume total

líquido do parênquima testicular. O valor deste último será obtido subtraindo-se do volume do testículo o volume da túnica albugínea. Segundo França (1991), como a densidade do testículo é em torno de 1 (1,03 a 1,04), a massa testicular é considerada igual ao seu volume. E a segunda o Diâmetro tubular, altura do epitélio dos túbulos seminíferos e comprimento total dos túbulos seminíferos. O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 30 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentam contorno o mais circular possível, em aumento de 200x. Segundo França & Russel (1998) o diâmetro tubular permanece relativamente constante em animais sexualmente maduros, não sazonais, portanto, estas medidas não levarão em consideração o estágio do ciclo. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi mensurada a altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada da membrana basal até a luz tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio em cada túbulo representou a média de duas medidas tomadas de forma diametralmente opostas. O comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) por testículo, expresso em metros, será estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal. A seguinte fórmula foi empregada: $CT = VTS / \pi R^2$ Onde:

VTS = volume total de túbulos seminíferos; πR^2 = área da secção transversal dos túbulos seminíferos.

Contagem espermática

A túnica albugínea foi removida do testículo direito e o parênquima testicular foi homogeneizado em 5mL de salina-Triton (0,15M NaCl, 0,05% (v/v) Triton X-100) em homogeneizador por 2 minutos. Foram contados núcleos de espermátides alongadas resistentes a homogeneização com característica de estágio 19. Foram contados 4 campos por animal em câmara de Neubauer. O número de núcleos de espermátides por testículos e por grama de testículos foi calculado e os valores divididos por 6,1 dias para convertê-los em produção diária de espermatozoides (ROBB et al., 1978).

Avaliação do estresse oxidativo testicular

O estresse oxidativo do testículo esquerdo coletado de animais não-fixados foi avaliado pela determinação da atividade da catalase (CAT), dos níveis reduzidos do grupo sulfidril (-SH) e da peroxidação lipídica pela formação de TBARS. A avaliação da atividade antioxidante foi realizada para as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutationa-S-transferase (GST) e glutationa reduzida (GSH).

A concentração de proteína foi medida de acordo com o método do biureto (Gornall et al., 1949). A atividade da CAT foi testada de acordo com o método de Aebi (1974). Os níveis de grupos reduzidos de proteína total (-SH) foram medidos usando 1,0mg de homogeneizado de testículo de proteína em tampão Tris-HCl 25mM, EDTA 1mM e pH 8,2, como descrito por Ellman (1959). A absorbância foi medida imediatamente e após 15 min a 412nm. A concentração dos grupos -SH foi calculada usando a equação (Absfinal - Absinicial) x 1,57 e relatada como mM (Allameh et al., 1997). O ensaio de peroxidação lipídica foi utilizado como descrito por Buege e Aust (1978).

A atividade da SOD foi avaliada pelo método de auto oxidação do pirogalol descrito por Marklund e Marklund (1974) e expresso em absorbância por minuto. Para determinação da atividade de GST, foi utilizado 1,0 mg de homogeneizado de proteína testicular, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, GSH 0,1mM e CDNB 0,1mM (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) como descrito por Habig et al. (1974). A absorbância foi monitorizada durante 5 minutos em intervalos de minuto a minuto a 340nm.

Os níveis de GSH foram quantificados pelos procedimentos descritos por Ellman (1959). Para isso, 5 mg de proteínas foram adicionados em um mesmo volume de ácido tricloroacético a 20% (TCA) contendo 1mM de EDTA. O sobrenadante foi misturado com tampão Tris-HCl 25mM, EDTA 1mM e pH 8,2. As análises procederam da mesma forma que os grupos -SH.

Immunoblotting ou Western blotting.

Os testículos foram homogeneizados em Solução de Buffer Lise (50mM Tris-HCL, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP40, 0,25% Deoxicolato de Sódio) com os inibidores (100 µg / ml PMSF, 2mM Na₃VO₄, 5mM NaF; 10µg / ml Leupeptina) . O tecido foi centrifugado a 1500 rpm e 4 ° C. Alíquotas do sobrenadante foram misturadas no tampão da amostra para Western blotting (312,5 Mm Tris-HCl, 10% SDS sólido, 50% glicerol, quantidades vestigiais Bromophenol Blue, H₂O_d) de acordo com a proporção de 1: 5, fervida e corrida em poliacrilamida Gel -SDS (PAGE), no tampão Running para Western Blotting, usando BioRad equipment. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose em tampão de transferência Western Blotting Semi-dry (Tris-HCl a 0,25 M, metanol a 20%, SDS a 0,05%, glicina a 0,2 M). Após transferência, as membranas foram lavadas em tampão TBS-T (Tris-HCl 25mM (pH 8,0), NaCl 125mM, HCl para ajuste, Tween 20 a 0,05%) e bloqueadas durante 40 minutos em BSA a 5% em tampão TBS-T. As membranas foram então lavadas em tampão TBS-T, incubadas com anticorpos primários específicos em BSA a 3% em Tampão Basal de TBS-T, durante a noite a 4 ° C, com agitação constante. As membranas foram lavadas 3 vezes durante 15 minutos em TBS-T, depois incubadas durante 2 horas num anticorpo secundário em BSA a 1% adicionadas a TBS-T no Tampão Basal de TBS-T, à temperatura ambiente. Finalmente, as membranas foram fotografadas no fotodocumentador UVITECH, desenvolvido pelo “Clarity Max Western ECL substrate”. A intensidade da banda foi lida pelo densitômetro usando o programa *Image J*. (Santos et al, 2011)

Os anticorpos primários utilizados foram: anti-Beclin (0.5:1000; Rabbit polyclonal, ab62557, Abcam- marcador de autofagia); CYP11A1 (1:1000; Rabbit, D8F4F, Cell Sigma - marcadores da via esteroidogênica); StAR (1:2500; Mouse monoclonal, ab58013, Abcam - marcadores da via esteroidogênica); Anti-Hsp70 antibody (1:1000; Mouse monoclonal, ab2787, Abcam - heat shock proteins); e Anti-Hsp90 antibody (1:1000; Mouse monoclonal, ab13492, Abcam - heat shock proteins); Anti-conexina 43 (1:5000, Rabbit polyclonal, ab11370, Abcam - cellular communication proteins); Anti-N Cadherin antibody (1:8000, Rabbit monoclonal, ab76011, Abcam, cell communication). E os anticorpos secundários foram: Goat, Anti-

Mouse IgG H&L (HRP) ab6789, Abcam; e Goat, Anti-Rabbit IgG, 170-6515, Bio-Rad representative.

Microscopia eletrônica de transmissão

Pequenos fragmentos de testículo foram pós-fixados por imersão em glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2. Nova pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio 1%, e posteriormente o material foi desidratado em série crescente de acetona. Finalmente, o material foi infiltrado e incluído em resina Epon 812. Após a obtenção de cortes ultrafinos com navalha de diamante e contrastação com acetato de uranila e citrato de chumbo, o material será observado através de microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss; Leo 906 – da UNICAMP) e fotodocumentado.

Análises Estatísticas

A comparação dos valores dos grupos controle e exposto foi realizada pela análise estatística de variância pelo teste t de Student, para comparação das variáveis paramétricas. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Para todos os valores, a média do desvio padrão (média $\pm$) foi calculada.

Resultados

As análises morfométricas e estereológicas realizadas são apresentadas na Tabela 1 e os achados morfológicos são mostrados na Figura 1.

Tabela 1

Dados morfométricos e estereológicos obtidos de testículos de ratos Wistar. Co- Grupo Controle; P- Exposto a própolis (média±SD).

Parâmetros [1:6]	Grupos experimentais		Valor de P
	Co	P	
Altura Ep. Túbulo Semin.	104,6±8,988	113,8±7,289*	0,0115
Diâmetro Túbulo Semin.	331,1±14,96	303,5±18,27* ¹	0,0017
Proporção Testículo (%)			
Túbulo Semin.	72,05±4,690	69,78±5,345	0,2807
Lúmen	23,02±2,23	23,15±2,958	0,3630
Interstício	16,75±5,169	18,84±5,624	0,3539

Co – Controle; P – Própolis - * p=0,0115 e *¹p=0,0017- Dados com distribuição normal – Paramétricos. Teste T – dados não pareados.

Foi observado aumento significativo da altura do epitélio dos animais expostos comparado com o grupo controle. Esses resultados são confirmados após a análise microscópica das secções histológicas mostrada na figura 1. Nos túbulos do grupo controle (imagens DC1 e DC2), podemos observar que, próximo à região do lúmen, as células do epitélio germinativo (*) mostram predominância de áreas menos coradas características de regiões citoplasmáticas em relação a áreas de coloração mais acentuadas dos núcleos dos espermátócitos e espermátides. Comparando com o grupo exposto (imagem DP1 e DP2), essas células estão com menos citoplasma, na mesma região do lúmen, e com aspecto desorganizado (*1). A análise qualitativa das imagens em microscopia de luz sugere aumento no número de núcleos dos espermátócitos, espermátides e espermátogônias (círculo branco) no grupo que recebeu própolis, o que seria explicado pelo aumento significativo da altura do epitélio seminífero nesse grupo. Assim, a própolis, poderia ter estimulado o aumento dessas células no epitélio germinativo.

Nas proporções dos componentes testiculares, nenhum resultado significativo foi observado. Todavia, ocorreu significativa redução no diâmetro dos túbulos seminíferos.

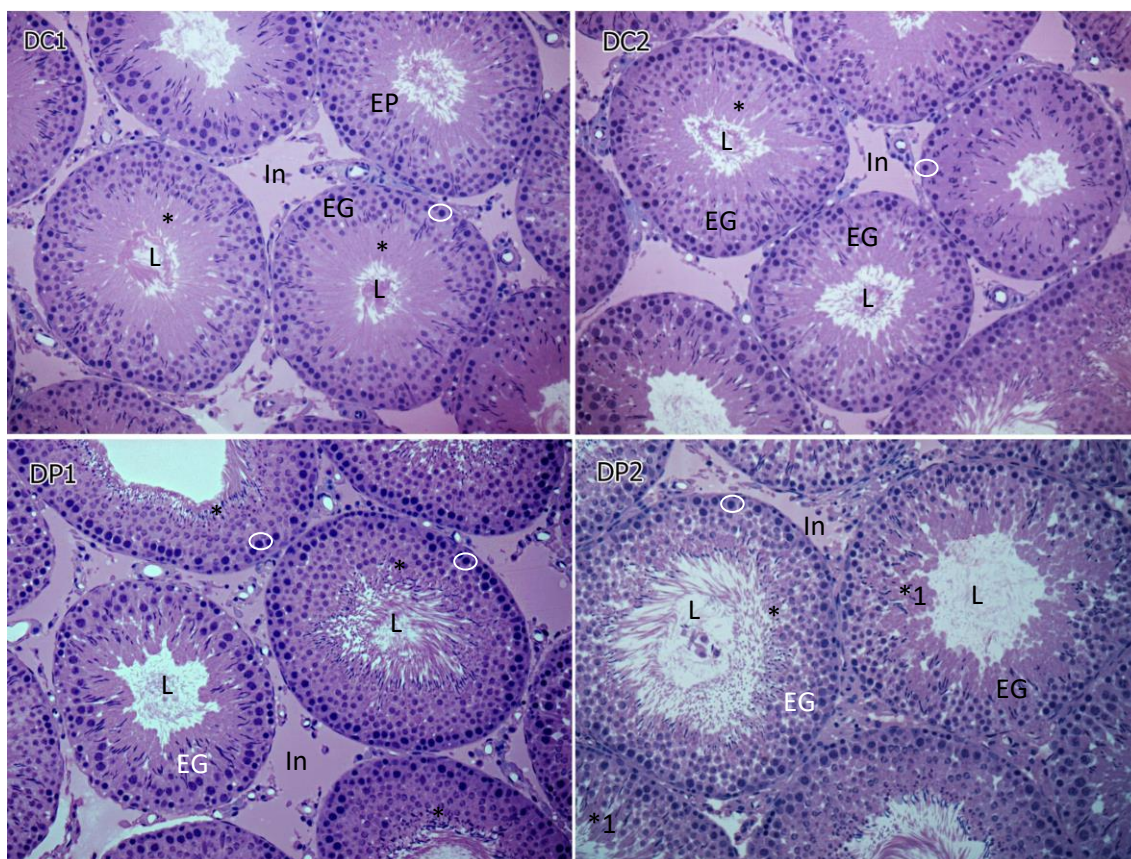


Figura 1 - Imagens dos túbulos seminíferos de testículos de ratos Wistar. Grupos: DC1 e DC2- Controle; DP1 e DP2- Animais expostos à Própolis. Siglas: (L) Lúmen; (EG) Epitélio Germinativo; (In) Interstício; (*) Citoplasma das células do Epitélio Germinativo próximo ao Lúmen; (círculo branco) Espermatogônias. Coloração HE. Aumento de 200x.

Contagem espermática e GSI

Foi observada diminuição significativa de espermatozoides em todas as análises realizadas, como mostrado a tabela 2. Quando comparado ao grupo controle, o grupo exposto mostrou significativa redução no número de espermatozoides por testículo, número de espermatozoides por grama de testículo e na produção diária de espermatozoides (PDE). Todavia, não houve alteração significativa no GSI.

Tabela 2

GSI e Contagem espermática em testículos de ratos Wistar (média±SD)

Parâmetros [1:6]	Grupos experimentais		Valor de P
	Co	P	
GSI	0,3704±0,04	0,381±0,0234	0,4432
Nº Esperm/Testículo	142,9±26,76	106,6±18,80*	0,0029
Nº Esperm/g de Testículo	125,0±9,335	93,09±16,98* ¹	P<0.0001
Produção Diária Esperm.	23,43±4,387	17,47±3,082* ²	0,0025

Co – Controle; P – Própolis. Dados com distribuição normal – Paramétricos. Teste T – dados não pareados. *=0,0029; *¹<0,0001; *²=0,0025.

Análise Ultraestrutural

Após análises da ultraestrutura dos testículos dos animais do grupo controle (figura 2) e exposto a própolis (figura 3) foi possível observar desorganização na barreira testicular nos animais do segundo grupo (fig. 3k, l, m, s) quando comparado aos animais controle (fig. 2a, b, c). Espaços entre os espermátócitos são visualizados, indicando fragmentação dos prolongamentos das células de Sertoli, o que explicaria a desorganização observada nas espermatogônias nas imagens de microscopia de luz, mostrada na Figura 1, cuja posição e número dessas células diferem se comparadas com o grupo controle.

Na região do lúmen, os flagelos estão com excesso de citoplasma, indicando um desenvolvimento atrasado dos espermatozoides, como apontado nas setas da imagem 3n comparando com a imagem 2d. Na imagem 3o, podem ser observados espermatozoides com alterações morfológicas e na imagem 3p, atraso no desenvolvimento das espermátides, com grandes quantidades de restos citoplasmáticos. Essas alterações podem ser comparadas com as imagens 2e e 2f. Esse resultado corrobora o que observamos nas imagens de luz, que mostra uma borda do epitélio germinativo irregular e com aspecto degradado e, também, com a contagem dos espermatozoides com uma diminuição no número dessas células. E isso explicaria por que há um aumento dos espermátócitos e espermátides próximo a região do lúmen.

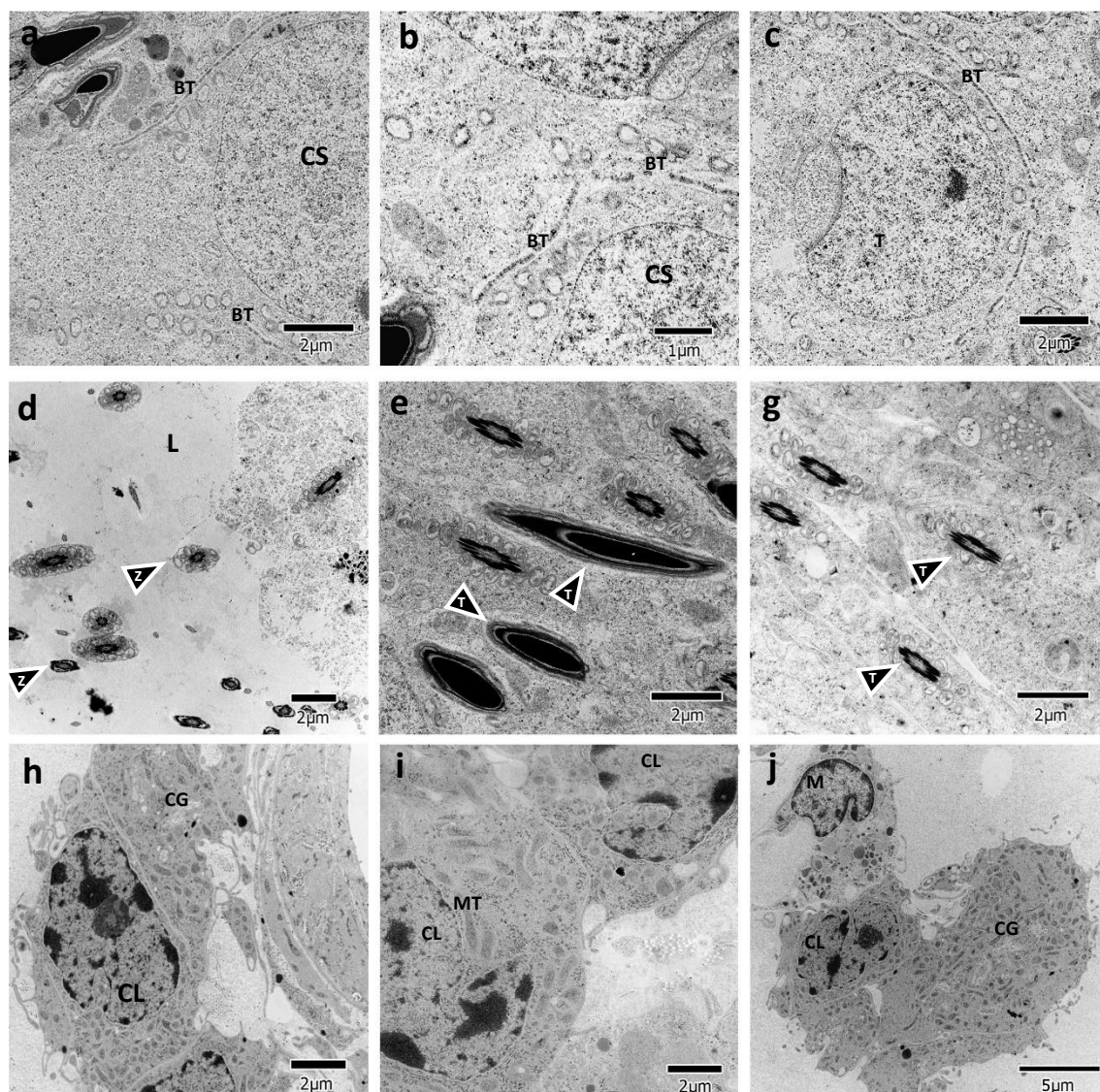


Figura 2. Ultraestrutura de testículo de ratos Wistar - Grupo Controle - a, b, c, d, e, f, g, h, i, j – (CG) Complexo de Golgi; (CL) Célula de Leydig; (CS) Célula de Sertoli; (CT) espermátide redonda (com acrossomo inicial). (L) Lúmen; (cabeça de setas Z) Espermatozoides; (cabeça de setas T) espermátides; (BT) Barreira Testicular; (M) Macrófago; (MT) Mitocôndrias.

As células de Leydig (CL) no grupo exposto estão com uma quantidade de mitocôndrias reduzidas, espaço citoplasmático mais denso e um aumento de REL. Essas alterações ultra estruturais podem ser associadas a alterações na síntese de esteroides ou à atividade de detoxificação.

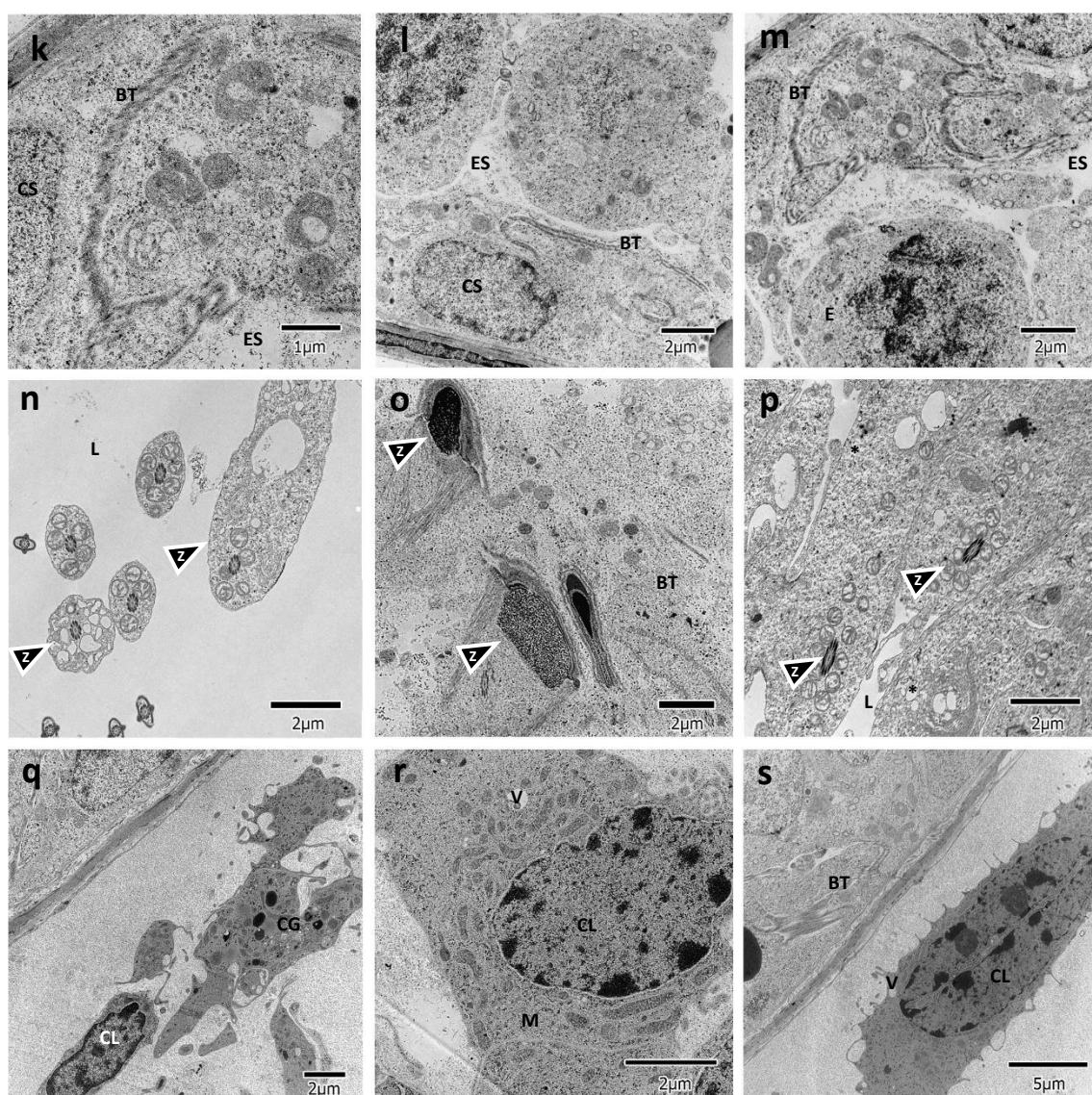


Figura 3. Ultraestrutura de testículo de ratos Wistar – Grupo Exposto a Própolis - k, l, m, n, o, p, q, r, s – (CG) Complexo de Golgi; (CL) Célula de Leydig; (CS) Célula de Sertoli; (L) Lúmen; (cabeça de setas Z) Espermatozoides; (BT) Barreira Testicular; (E) espermatócito; (ES) Espaços; (V) Vesícula; (MT) Mitocôndria, (*) Fragmento citoplasmático de Células de Sertoli.

Quantificação do Estresse Oxidativo no Testículo

Para avaliação de indução de estresse oxidativo testicular pela própolis foram quantificadas a atividade das enzimas Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD) e Glutathione-S-transferase (GST) e foram também determinados os níveis de peroxidação lipídica (TBARs) e de Glutathione Reduzida (GSH). Os resultados estão resumidos na tabela 3.

Tabela 3

Indicadores de Estresse Oxidativo em Testículo de ratos Wistar (média±SD).

Parâmetros [1:6]	Grupos experimentais		Valor de P
	Co	P	
CAT (Abs 240nm/min)	10,33±2,366	18,51±4,967*	0,0004
SOD (Abs 440nm/min.)	1,193±0,1360	1,248±0,0766	0,2401
TBARs (mol/Lx10 ⁻⁹)	0,0691±0,01046	0,1286±0,02133* ¹	P<0.0001
GST (Abs340nm/min.)	0,1840±0,03334	0,21±0,01143* ²	0,0180
GSH (mmol/L)	0,0106±0,01254	0,0095±0,0121	0,8276

Co – Controle; P – exposto a Própolis. *p=0,0004; *¹p<0,0001; *²p=0,0180. Dados com distribuição normal – Paramétricos. Teste T – dados não pareados.

Foi observado aumento significativo do grupo exposto a própolis em relação ao controle na atividade da enzima Catalase (CAT), da determinação da peroxidação lipídica (TBARs) e da atividade da Glutathione-S-transferase (GST) o que evidencia que a própolis induziu estresse oxidativo testicular. Os demais parâmetros não apresentaram diferença significativa.

Quantificação dos componentes da Própolis

O método de quantificação utilizado no presente estudo permitiu identificar no extrato utilizado os compostos apresentados na tabela 4.

Tabela 4

Compostos identificados no extrato aquoso de própolis verde obtidos por UHPLC-MS.

Composto Sugerido	m/z	Tempos de retenção (min)	[] µg/ml
ac. 3-prenil-4-(2-metilpropioniloxi) cinâmico	301	7	1,02
dihidrocanferida	301	5,66	3,68
pinobanksina	271	5,77	1,35
canferida	299	7,3	1,68
ac p cumarico	163	3,77	0,14
artepillin C	299	8,4	1,31

m/z – massa do composto; [] µg/ml – concentração em microgramas por mililitros dos compostos sugeridos na tabela.

Avaliação da expressão tecidual de proteínas por Immunoblotting

Para a avaliação da expressão testicular de proteínas foram utilizados anticorpos específicos contra autofagia (Beclin-1) (figura 4), de comunicação celular como a conexina 43 e a n-caderina (figura 5), das proteínas de choque térmico HSP70 e HSP90 (figura 6) e de duas proteínas que atuam na mitocôndria das células de Leydig possibilitando a conversão do colesterol em pregnenolona, CYP11A1 e StAR (figura 7). As médias dos valores obtidos no grupo exposto (P) foram comparados com o grupo controle (Co) e quando mostraram diferença significativa foram assinalados com asterisco.

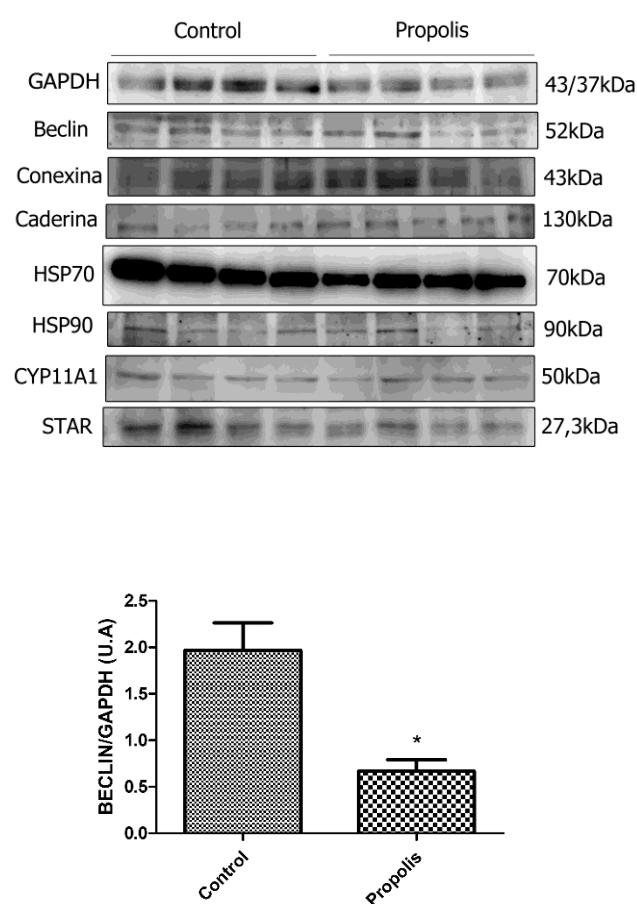


Figura 4. O gráfico apresenta a leitura densitométrica (n=4) do immunoblotting realizado com marcador de morte celular por autofagia Anti-Beclin 1 ($p=0,0012$) em testículos de ratos Wistar expostos a Própolis e normalizado pelo immunoblotting realizado com GAPDH.

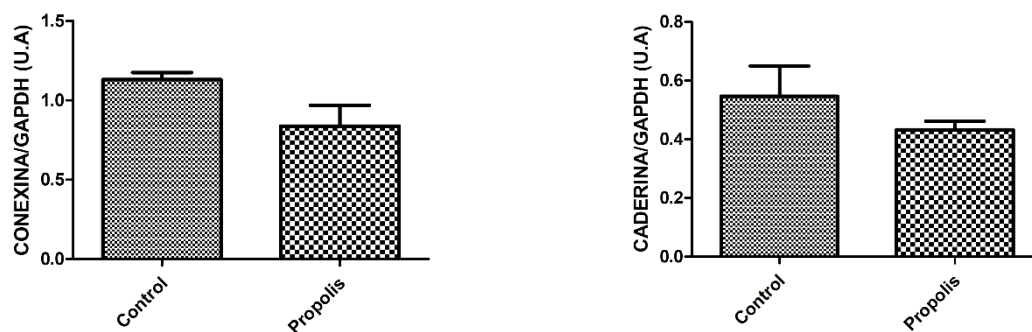


Figura 5. Os gráficos apresentam a leitura densitometrica (n=4) do imunoblotting realizado para os níveis de conexina e caderina em testículos de ratos Wistar expostos e não expostos a Própolis e normalizado pelo imunoblotting realizado com GAPDH.

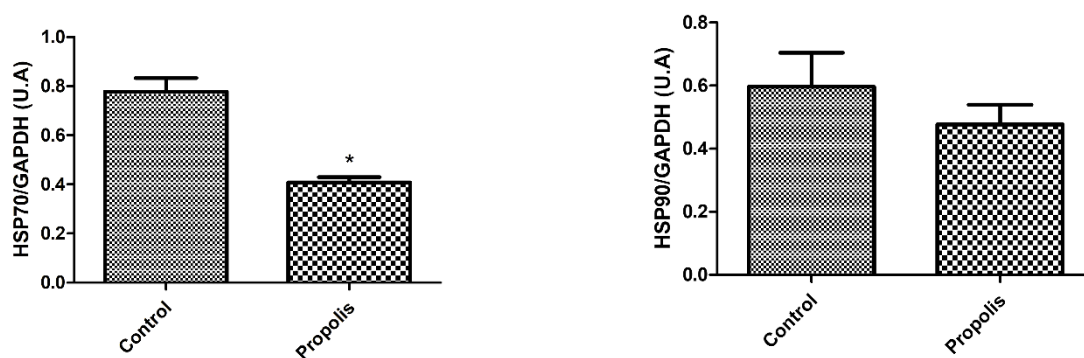


Figura 6. Os gráficos apresentam a leitura densitometrica (n=4) do imunoblotting realizado para os níveis de-Hsp70 ($p<0,0001$) em testículos de ratos Wistar expostos e não expostos a Própolis e normalizado pelo imunoblotting realizado com GAPDH.

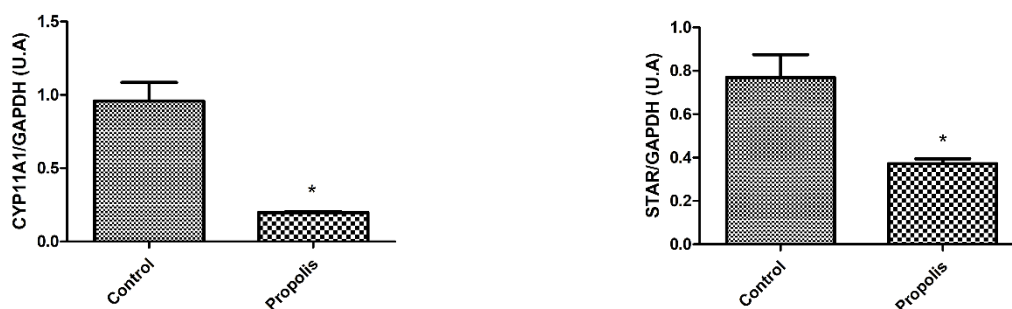


Figura 7. Os gráficos apresentam a leitura densitometrica (n=4) do imunoblotting realizado com marcadores de esteroidogênese CYP11A1 ($p<0,0001$) e Anti-StAR ($p=0,0026$) em testículos de ratos Wistar expostos e não expostos a Própolis e normalizado pelo imunoblotting realizado com GAPDH.

Discussão

A partir do objetivo proposto nesse trabalho, foi possível verificar pela primeira vez na literatura, que a própolis foi capaz de alterar a estrutura e a função testicular de ratos, quando ingerida durante o desenvolvimento desse órgão até a sua maturação na fase adulta.

Em resumo, ela induziu aumento nos níveis de peroxidação lipídica e na atividade das enzimas antioxidantes, como a GST e CAT. Reduziu a expressão de proteínas localizadas na membrana mitocondrial das células de Leydig, que participam da esteroidogênese como StAR e CYP11A1, além de redução na expressão da proteína Beclin, de mitocôndrias, adensamento do espaço citoplasmático com aumento de REL, alterações essas associadas a alterações na síntese de esteroides. Provocou aumento do epitélio germinativo, promoveu a retenção e alterou a estrutura das células germinativas levando à redução da produção diária de espermatozoides e à formação de espermatozoides mal formados na região luminal.

Buscando compreender como esses eventos ocorreram, podemos iniciar pela indução de estresse oxidativo pela própolis, pelo aumento significativo nos níveis de GST no grupo que recebeu esse composto. Essa enzima pertence a uma família multigênica de isoenzimas que catalisam a conjugação de compostos eletrofílicos à GSH. A família destas enzimas é caracterizada por ter uma ampla especificidade de substrato com baixa afinidade. Esta baixa eficiência catalítica tem importante papel na evolução das GSTs como agente detoxificador de amplo espectro, tanto de componentes endógenos quanto exógenos (TEW *et al.*, 1999), como no caso da própolis. O aumento observado caracteriza-se provavelmente como um mecanismo de proteção exercida pelo organismo na detoxificação desse composto.

Todavia, mesmo diante desse mecanismo, a própolis induziu significativo aumento nos níveis de CAT, enzima responsável pela inativação, no interior da célula, do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), impedindo uma cascata de formação de novos subprodutos decorrentes da sucessiva redução monovalente destes intermediários oxidantes. A produção excessiva de H_2O_2 , resultante de uma situação persistente, pode causar lesão tecidual direta, peroxidação lipídica das membranas celulares, carbonilação das proteínas, citoesqueletólise e alterações do DNA (FERRO *et al.*, 2010). Os

resultados obtidos demonstraram aumento de peroxidação lipídica, pelo aumento significativo de TBARs, muito provavelmente decorrente da excessiva produção de H_2O_2 evidenciado pelo aumento da CAT.

A peroxidação lipídica deve ter desencadeado desorganização da membrana plasmática, evidente nas áreas da barreira testicular; modificações na membrana das células de Sertoli que levou à perda de adesão das células da linhagem germinativa, demonstrada na microscopia de luz e eletrônica, cujas células ainda imaturas, se soltaram e atingiram o lúmen dos túbulos como células malformadas e, muito possivelmente não funcionais, comprometendo a capacidade reprodutiva desses animais na idade adulta, uma vez que a PDE foi significativamente reduzida.

Podemos inferir também que a ação desses radicais nas membranas das células de Leydig possa responder pela redução significativa na expressão de duas proteínas mitocondriais que participam da esteroidogênese. A StAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) que media a transferência de colesterol da membrana mitocondrial externa para a interna, sendo crucial para o transporte de colesterol para a mitocôndria onde a síntese de esteroides tem início. E a CYP11A1 pertencente à família do citocromo P450 que catalisa a reação de clivagem do colesterol em pregnenolona. A biossíntese de testosterona é ilustrada na figura 8 onde podem ser identificadas as enzimas supracitadas e visualizadas as vias enzimáticas.

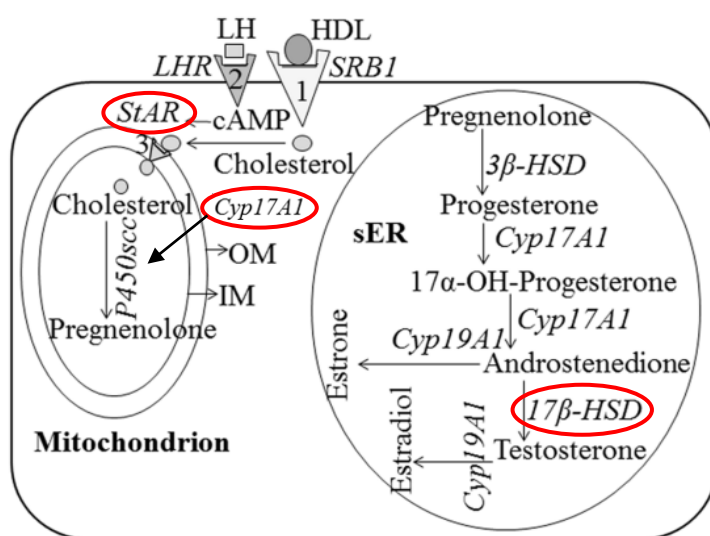


Figura 8. Biossíntese de testosterona nas células de Leydig, mostrando a via enzimática da transformação do colesterol em testosterona (fonte: KILARKAJE, 2014)

Interessantemente, Li et al. (2011) enunciaram que a expressão de proteína StAR e a produção de testosterona foram reduzidas em células primárias de Leydig em ratos quando expostos a H_2O_2 , o que demonstra os efeitos nocivos de espécies reativas de oxigênio (ROS) na esteroidogênese. Esses autores demonstraram que as células de Leydig envelhecidas têm uma deficiência autofágica, um aumento no número de mitocôndrias disfuncionais e um aumento no nível de EROs. Eles propuseram que a deficiência autofágica pode resultar em acúmulo de ROS, levando a um declínio na esteroidogênese em células de Leydig de ratos idosos.

Eles atribuíram a ligação entre baixos níveis de testosterona e a expressão de StAR e a deficiência autofágica em células de Leydig envelhecidas com o acúmulo intracelular de ROS gerado a partir de mitocôndrias disfuncionais ou envelhecidas (Li et al., 2011). Da mesma forma, nossos resultados demonstraram diminuição na expressão de proteínas de StAR e Beclin em ratos expostos à própolis

A autofagia surgiu como um mecanismo homeostático que recicla os constituintes intracelulares. Acredita-se que a autofagia seja uma forma não apoptótica de morte celular programada; A maioria das evidências suporta a autofagia como um caminho de sobrevivência necessário para a viabilidade celular. A função da autofagia nos testículos está atualmente sob investigação e tem sido demonstrada como associada à espermatogênese, morte das células germinativas, função espermática e secreção de testosterona. Beclin1, o ortólogo de levedura em mamíferos, Atg6/Vps30, é um regulador crítico da formação de autofagossomos e um eficiente biomarcador de autofagia (Zhang et al., 2016).

Zhang et al. (2016) sugeriram um papel potencial de autofagia defeituosa na toxicidade testicular após a exposição ao fluoreto no período de desenvolvimento. Nesse contexto, observamos diminuição na expressão de Beclin após exposição à própolis. Este evento poderia ser responsável pela desorganização do epitélio germinativo detectado por microscopia de luz e eletrônica.

A ultraestrutura das células de Leydig evidenciam números reduzido de mitocôndrias e aumento do retículo endoplasmático. Estudos demonstram que qualquer dano nas mitocôndrias, em que ocorre a maior parte da biossíntese de testosterona, pode prejudicar a biossíntese deste hormônio e, portanto, pode resultar em disfunção dos testículos (Ylmaz, Korkut & Erkan, 2018).

Adicionalmente, segundo Arun et al. (2018) baixos níveis de expressão de maquinário esteroidogênico crucial em células de Leydig, como StAR, CYP11A1 e hidroxisteróide desidrogenase podem causar reduções nos níveis de testosterona de ratos sob estresse.

Em conjunto, nossos resultados apontam que a própolis interfere no processo de esteroidogênese. A esteroidogênese depende da disponibilidade de colesterol na membrana mitocondrial interna. Embora outras proteínas possam estar envolvidas no reabastecimento do colesterol mitocondrial, há abundantes evidências bioquímicas, clínicas e genéticas para implicar o StAR como um mediador proteico lábil para o processo (Premalatha et al., 2013). Nossos dados demonstraram que os ratos expostos à própolis tiveram uma regulação negativa significativa de StAR, sugerindo um prejuízo na testosterona.

Além disso, a testosterona é produzida principalmente pelas células de Leydig e é fundamental para as funções de desenvolvimento e reprodução no homem. A função das células de Leydig está supostamente prejudicada por uma diminuição na produção de testosterona (T) como consequência das atividades suprimidas de CYP11A1, CYP17A1, 3 β -HSD e 17 β -HSD (Premalatha et al., 2013; Ylmaz, Korkut & Erkan, 2018). Neste estudo relatamos uma diminuição significativa na expressão de CYP11A1 em ratos expostos à própolis. Assim, podemos sugerir que estes animais tenham apresentado uma provável redução nos níveis de T.

Nossos resultados corroboram indiretamente essa observação, embora não possamos quantificar os níveis de T em nossos animais experimentais. Redução do número de espermatozoides e PDE e espermatozoides incompatíveis no grupo exposto sinalizando uma ruptura na esteroidogênese. Alguns estudos procurando identificar potenciais biomarcadores para a avaliação da qualidade do esperma e infertilidade masculina incluem genes e proteínas da família HSP70 em sua avaliação (Liu, Shen & Liu, 2016; Ayaz et al., 2018).

A HSP70 foi significativamente diminuída em ratos expostos à própolis em nosso estudo. Sonmez et al. (2016) encontraram uma diminuição significativa na expressão de HSP70 no campo intersticial e aumento significativo na expressão de HSP70 em células germinativas em testículos de ratos expostos à própolis. Este evento teria um efeito protetor na lesão induzida por metotrexato estudada para eles. No

entanto, os autores comentaram que a HSP70 está envolvida na divisão celular e na diferenciação celular no epitélio germinativo. Também está envolvido na regulação da síntese de hormônios esteroides em células de Leydig. A HSP70 participa da crinofagia nas células de Leydig e sua diminuição leva ao distúrbio da síntese de testosterona. Neste contexto, a redução nos níveis de HSP-70 poderia responder por ruptura na esteroidogênese e PDE em nosso estudo.

De acordo com uma recente revisão apresentada por Sabir, Akhtar e Saleem (2019), os disruptores endócrinos são substâncias exógenas que têm potencial para alterar a função do sistema endócrino e induzir efeitos adversos à saúde em um organismo. Uma grande variedade de substâncias é notada como desreguladores endócrinos, incluindo pesticidas, subprodutos industriais, poluentes ambientais, plásticos, metais, contaminantes de alimentos, produtos de higiene pessoal e produtos farmacêuticos.

Ylmaz, Korkut e Erkan (2018) mostraram que vários produtos químicos perturbadores endócrinos reduzem significativamente a expressão do gene Star nas células de Leydig, afetando negativamente a biossíntese de testosterona. Com base nos dados obtidos em nosso estudo, levantamos a seguinte questão: a própolis poderia ser considerada um disruptor endócrino?

Outros estudos serão desenvolvidos para elucidar essa suposição. Uma alternativa interessante seria realizar essas análises utilizando compostos isolados da própolis. Souza (2009), analisando sete compostos fenólicos importantes ao longo de um ano em amostras de *Baccharis dracunculifolia*, observou que em sua composição são encontrados ácido caféico (CAPE), ácido ferúlico, aromadendrin-40-methyl ether (AME), isosakuranetina, artepillina C, baccharina e ácido 2,2-dimethyl-6-carboxyethenyl-2H-1-benzopyran (DCBEN). Segundo Rodrigues et al (2009), estudos fitoquímicos, nessa espécie, demonstraram a presença de flavonóides (flavona e subgrupos, principalmente flavonol), diterpenos (principalmente diterpenos labdane e clerodano) e triterpenos.

De qualquer forma, os resultados encontrados neste estudo mostraram que a própolis afeta o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos masculinos, prejudicando a fertilidade masculina durante a vida adulta. Portanto, o presente estudo indica que a

ingestão de própolis pela ingestão de água (6mg / kg / dia) pode representar um risco para a reprodução masculina, afetando a esteroidogênese e a PDE de ratos.

Referências Bibliográficas

AEBI, H. in: BERGMAYER, H. V., 1974, Methods in Enzymatic analysis, New York: Academic press; vol.2, p. 674-684.

ALLAMEH, A.; VANSOUN, E.; ZARGHI, A. Role of glutathione conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity. Mech. Ageing Dev., 95 (1997), pp. 71-79

AL-YAHYA AA, AL-MAJED AA, AL-BEKAIRI AM, AL-SHABANAH OA, QURESHI S. Studies on the reproductive, cytological and biochemical toxicity of Ginkgo biloba in Swiss albino mice. J Ethnopharmacol 2006; 107 (2): 222-8.

ANAHARA R, TOYAMA Y, MORI C. Review of the histological effects of the anti-androgen, flutamide, on mouse testis. Reprod Toxicol 2008; 25 (2): 139-43.

ARMSTRONG D, BROWNE R. The analysis of the free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. Adv Exp Med Biol. 1994; 366(43):58.

ARN, S. BURAWAT, J., YANNASITHINON, S. SUKHORUM, W., LIMPONGSA, A., IAMSAARD, S. 2018. Phyllanthus emblica leaf extract ameliorates testicular damage in rats with chronic stress. Biomed & Biotechnol, 19(12):948-959.

AYAZ, A., AGARWAL, A., SHARMA, R., KOTHANDARAMAN, N., CAKAR, Z. SIKKA, S. Proteomic analysis of sperm proteins in infertile men with high levels of reactive oxygen species. 2018. Andrologia: e13015-25.

BUCK LOUIS, G.M.; GRAY JR., L.E.; MARCUS, M.; OJEDA, S.R.; PESCOVITZ, O.H.; WITCHEL, S.F.; et al. Environmental factors and puberty timing: expert panel research needs. Pediatrics, 121 (Suppl. 3) (2008), pp. S192-S207

BUEGE J.A., AUST, S.D., 1978, Microsomal lipid peroxidation. Methods and Enzymology, v. 52, pp. 302-310.

CAPUCHO, C.; SETTE, R.; PREDES, F.S.; MONTEIRO, J.C.; PIGOSO, A.A.; BARBIERI, R.; DOLDER, M.A.H.; SEVERI-AGUIAR, G.D.C., 2012. Green Brazilian propolis effects on sperm count and epididymal morphology and oxidative stress. Food and Chemical Toxicology 50, p. 3956–3962.

CHANDRA AK, CHOUDHURY SR, De N, SARKAR M. Effect of green tea (Camellia sinensis L.) extract on morphological and functional changes in adult male gonads of albino rats. Indian J Exp Biol 2011; 49 (9): 689-97.

CHANDRA AK, GHOSH R, CHATTERJEE A, SARKAR A. Vanadium-induced testicular toxicity and its prevention by oral supplementation of zinc sulphate. *Toxicol Mech Methods* 2007; 17(4): 175-87.

CHEN J, AHN KC, GEE NA, AHMED MI, DULEBA AJ, ZHAOL., GEE SJ, HAMMOCK BD, LASLEY BL. Triclorocarban enhances testosterone action: a new type of endocrine disruptor? *Endocrinol* 2008; 149 (3): 1173-1179.

DADA R, et al., 2012. Epigenetics and its role in male infertility. *J. Assist. Reprod Genet.* 29(3), 213-23.

DE FALCO M, SCIARRILLO R, CAPALDO A, RUSSO T, GAY F, VALIANTE S, VARANO L, LAFORGIA V. The effects of the fungicide methyl thiophanate on adrenal gland morphophysiology of the lizard, *Podarcis sicula*. *Arch Environ Contam Toxicol* 2007; 53 (2): 241-8.

DEVEQUI-NUNES, D.; MACHADO, B.A.S.; BARRETO, G.A.; SILVA, J.R.; SILVA, D.F.; ROCHA, J. L.C.; BRANDÃO, H. N.; BORGES, V.M.; UMSZA-GUEZ, M.A. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PLOS ONE* | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207676> December 4, 2018. p 1-20.

DEVASAGAYAM, T.P.; TILAK, J.C.; BOLOOR, K.K.; SANE, K.S.; GHASKADBI, S.S.; LELE, R.D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicians of India*, v.52, p.794-804, 2004.

ELLMAN, G. L., 1959, Tissue sulphydril groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 82, p. 70-77.

ELMAZOU DY RH, ATTIA AA, EL-SHENAWY NS. Protective role of propolis against reproductive toxicity of chlorpyrifos in male rats. *Pest Biochem Physiol* 2011; 101: 175–81.

FRANÇA, L.R., 1991. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. 185f. Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D., 1998. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J.; MARTINEZ-GARCIA, R. (Eds.) *Male reproduction: A multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Livingstone, p.197-219.

FERRO, C. DE O.; CHAGAs, V. L. A.; OLIVEIRA, M. F. et al. Catalase activity in lung, kidney and small bowel non-ischemic in rats after intestinal reperfusion, *Rev. Col. Bras. Cir.* 2010; 37(1): 031-038

GOLUB, M.S.; COLLMAN; G.W.; FOSTER, P.M.; KIMMEL, C.A.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; REITER, E.O.; SHARPE, R.M.; SKAKKEBAEK, N.E.; TOPPARI; J. 2008 Public health implications of altered puberty timing. *Pediatrics* 121(Suppl 3) S218–S230. (doi:10.1542/peds.2007-1813G)

GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J., DAVID, M.M., 1949, Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal Biological Chemistry*, v.177, n 2, p. 751-766.

GOYAL A, CHOPRA M, LWALEED BA, BIRCH B, COOPER AJ. The effects of dietary lycopene supplementation on human seminal plasma. *BJU Int.* 2007; 99 (6): 1456–1460.

HABIG WH, PABST MJ, JAKOBY WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974 Nov 25;249(22):7130-9.

HIMES JH. Examining the evidence for recent secular changes in the timing of puberty in US children in light of increases in the prevalence of obesity. *Mol Cell Endocrinol* 2006;25:254–5, 13–21.

KILARKAJE N., Effects of combined treatment of α -tocopherol, l-ascorbic acid, selenium and zinc on bleomycin, etoposide and cisplatin-induced alterations in testosterone synthesis pathway in rats. 2014. **Cancer Chemother Pharmacol.** 4(6): 1175-89.

LEE, J.E.; JUNG, H.W.; LEE, Y.J.; LEE, Y.A. Early-life exposure to endocrine-disrupting chemicals and pubertal development in girls. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism.* 2019. <https://doi.org/10.6065/apem.2019.24.2.78>.

LI, W. R., CHEN, L, CHANG, Z. J., XIN, H., LIU, T., ZHANG, Y. Q., LI, G. Y., ZHOU, F., GONG, Y. Q., GAO Z. Z., XIN, Z. C. 2011. Autophagic deficiency is related to steroidogenic decline in aged rat Leydig cells. *Asian Journal of Andrology* 13, 881–888.

LIU, X. X., SHEN, X. F., LIU, F. J. 2016. Screening targeted testis-specific genes for molecular assessment of aberrant sperm quality. *MOL. MED. REP.*, 14: 1594-1600.

JEONG EUN LEE; HAE WOON JUNG; YUN JEONG LEE; YOUNG AH LEE. Early-life exposure to endocrine-disrupting chemicals and pubertal development in girls. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 2019;24:78-91.

MACHADO, B.A.; SILVA, R.P.; BARRETO, G.D.E.A.; COSTA, S.S.; SILVA, D.F.; BRANDÃO, H.N.; et al. (2016) Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. *PLoS One.* 2016 Jan 8;11(1):e0145954. doi: 10.1371/journal.pone.0145954. eCollection 2016.

MARANGHI, F.; MANTOVANI, A.; Targeted toxicological testing to investigate the role of endocrine disrupters in puberty disorders. *Reprod Toxicol*, 33 (3) (2012), pp. 290-296

MARKLUND S, MARKLUND G., Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 1974 Sep 16;47(3):469-74.

- MARQUELE, F.D.; DI MAMBRO, V.M.; GEORGETTI, S.R.; CASAGRANDE, R.; VALIM, Y.M.; Fonseca, M.J. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.39, n.3/4, p.455-462, 2005.
- MARSHALL, W.A.; TANNER, J.M. 1970. Variações no padrão de alterações puberais em meninos. *Arquivos de Doenças na Infância* 45:13-23. (doi: 10.1136 / adc.45.239.13)
- MBONGUE, G. Y. F., KAMTCHOUING, P., DIMO, T. 2011. Effects of the aqueous extract of dry seeds of *Aframomum melegueta* on some parameters of the reproductive function of mature male rats. *Andrologia* 44, 53–58.
- MCGARVEY, C., C. CATES, P.N. BROOKS, A. SWANSON, I.R. MILLIGAN, W. COEN, et al. 2001. Phytoestrogens and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity and pituitary luteinizing hormone release in the rat. *Endocrinology* 142:1202-1208.
- MONTEIRO, J. C., PREDES, F., MATTA, S. L. P., DOLDER, H., 2008. *Heteropterys aphrodisiaca* infusion reduces the collateral effects of cyclosporine A on the testis. *The anatomical Record* 291, 809-817.
- MORENO, M.I.N.; ISLA, M.I.; SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M.A. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, v.71, p.109-114, 2000.
- MOURITSEN, A.; AKSGLAEDE, L.; SØRENSEN, K.; MOGENSEN, S.S.; LEFFERS, H.; MAIN, K.M.; et al. Hypothesis: exposure to endocrine-disrupting chemicals may interfere with timing of puberty. *Int J Androl*, 33 (2) (2010), pp. 346-359
- PARENT, A.S.; TEILMANN, G.; JUUL, A.; SKAKKEBAEK, N.E.; TOPPARI, J.; BOURGUIGNON, J.P. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr Ver* 2003;24(5):668–93
- PARK YK, ALENCAR SM, AGUIAR CL. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. *J Agric Food Chem*. 2002 Apr 24;50(9):2502-6.
- PREMALATHA, R., JUBENDRADASS, R., RANI, S. J. A., SRIKUMAR, K., MATHUR, P. P. 2013. A Phytooxysterol, 28-Homobrassinolide Modulates Rat Testicular Steroidogenesis in Normal and Diabetic Rats. *Reprod. Sci.* 20(5): 589-596.
- ROBB, G.W., AMANN, R.P., KILLIAN, G.J., 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J. Reprod.Fert.* 54, 103-107.
- RODRIGUES CRF, DIAS JH, SEMEDO JG, SILVA J, FERRAZ ABF, PICADA JN. Mutagenic and genotoxic effects of *Baccharis dracunculifolia* (D.C.). *J Ethnopharmacol* 2009; 124(2): 321-4.
- RUSSELL, L. D., ETTLIN, R. A., SINHA HILIN, A. P., CLEGG, E. D., 1990. Mammalian spermatogenesis. In: Russel L L. D, Griswold M. D, editors. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Clearwater: Cache River Press, p. 1-38.

RUSSO A, TRONCOSO N, SANCHEZ F, GARBARINO JA, VANELLA A. Propolis protects human spermatozoa from DNA damage caused by benzo[a]pyrene and exogenous reactive oxygen species. *Life Sci* 2006; 78 (13): 1401–1406.

SABIR S, AKHTAR MF, SALEEM A. Endocrine disruption as an adverse effect of non-endocrine targeting pharmaceuticals. *Environ Sci Pollut Res Int* 2019; 26(2): 1277–86.

SALATINO, A, TEIXEIRA, EW, NEGRI, G, MESSAGE, D. 2005. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2: 33–38.

SANTOS AM, SCHECHTMAN D, CARDOSO AC, CLEMENTE CFMZ, SILVA JC, FIORAMONTE M, PEREIRA MBM, MARIN TM, OLIVEIRA PSL, FIGUEIRA ACM, OLIVEIRA SHP, TORRIANI IL, GOZZO FC, NETO JX, FRANCHINI KG. FERM domain interaction with myosin negatively regulates FAK in cardiomyocyte hypertrophy. *Nat Chem Biol* 2011; 8: 102–10.

SENA-LOPES, Â.; BEZERRA, F.S.B.; DAS NEVES, R.N.; DE PINHO, R.B.; SILVA, M.T.O.; SAVEGNAGO, L. et al. Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. *PLoS One*. 2018 Feb 1;13(2):e0191797. doi: 10.1371/journal.pone.0191797. eCollection 2018.

SEVERI-AGUIAR GD, PINTO SJ, CAPUCHO C, OLIVEIRA CA, DIAMANTE MA, BARBIERI R, et al. Chronic intake of green propolis negatively affecting the rat testis. *Phcog Res* 2017; 9:27–33.

SCHOETERS, G.; DEN HOND, E.; DHOOGHE, W.; VAN LAREBEKE, N.; LEIJS, M. Endocrine disruptors and abnormalities of pubertal development. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 102 (2) (2008), pp. 168–175

SFORCIN, J.M., FERNANDES JR, A., LOPES, C. A. M., BANKOVA, V., FUNARI, S. R. C., 2000. Seasonal effects of Brazilian propolis antibacterial activity. *J. of Ethnopharmacol., Botucatu*, v. 73, p. 243–249.

SIU ER, MRUK DD, PORTO CS, CHENG CY. Cadmium-induced testicular injury. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 238 (3): 240–9.

SOLIMAN G. A., DONIAAEL R., AWAAD A. S., ALQASOUMI S. I., YUSUFOGLU H. 2012. Effect of *Emex spinosa*, *Leptadenia pyrotechnica*, *Haloxylon salicornicum* and *Ochradenus baccatus* extracts on the reproductive organs of adult male rats. *Pharm. Biol.* 50(1), 105–12.

SÖNMEZ, M. F., ÇİLENK, K. T., KARABULUT, D., ÜNALMIŞ, S., DELİGÖNÜL, E., ÖZTÜRK, I., KAYMAK, E. 2016. Protective effects of propolis on methotrexate-induced testis injury in rat. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 79: 44–51.

SOUZA DGS, VIEIRA AT, PINHO V, SOUSA LP, ANDRADE AA, BONJARDIM CA, MCMILAN M, KAHN M, TEIXEIRA MM. NF- κ B plays a major role during the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. *Br J Pharmacol.* 2005;145(2):246–54.

TEW, K. D.; RONAI, ZE'EV. GST function in drug and stress response. *Drug Resistance Updates*, v.2, p. 143-147, 1999.

TOPPARI, J.; JUUL, A. Trends in puberty timing in humans and environmental modifiers. *Mol Cell Endocrinol*, 324 (1/2) (2010), pp. 39-44

TORETI, VC, SATO, HH, PASTORE, GM, PARK, YK. 2013. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 1– 13.

URQUIAGA, I. & LEIGHTON, F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*, v.33, n.2, p.55- 64, 2000.

YAGI, K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol*. 1998; 108:101-6.

YOUSEF MI, KAMEL KI, HASSAN MS, EL-MORSY AM. Protective role of propolis against reproductive toxicity of triphenyltin in male rabbits. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 1846-52.

YOUSEF MI, SALAMA AF. Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food Chem. Toxicol* 2009; 47: 1168–1175.

WALTER, M.F.; JACOB, R.F.; JEFFERS, B.; GHADANFAR, M.M.; PRESTON, G.M.; BUCH, J.; MASON, P. Serum levels of thiobarbituric acid reactive substances predict cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease: A longitudinal analysis of the prevent study. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 44:1996-2002.

Ylmaz, B. O., Korkut, A., Erkan, M. 2018. Sodium fluoride disrupts testosterone biosynthesis by affecting the steroidogenic pathway in TM3 Leydig cells. *Chemosphere*, vol. 212, 2018, Pages 447-455, p. 447-455 doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.08.112.

WILLIAM ZAWATSKI1 AND MARY M Lee. Male pubertal development: are endocrine-disrupting compounds shifting the norms. *Journal of Endocrinology*. (2013) 218, R1–R12. DOI: 10.1530/JOE-12-0449.

ZHANG, S., NIU, Q., GAO, H. et al. 2016. Excessive apoptosis and defective autophagy contribute to developmental testicular toxicity induced by fluoride. *Environ. Poll.*, 212: 97-104.

f. Capítulo II – Artigo Tratamento animais Intrauterinos

Testicular Alterations in *Rattus norvegicus* Offspring Induced by *in utero* Exposition to Propolis

Capucho, C^{1*}; Severi-Aguiar, G. D. C.¹; Reis, I. B.²; Silva, F. J. T. N.¹; Campos-Pereira, F. D.³; Novello, A.¹, Misson, H.¹, Santos, A.M.¹, Frankland-Sawaya, A.C.⁴ and Dolder, M. A. H.^{1*}.

1-Reproductive Biology Laboratory, Structural and Functional Biology Department, State University of Campinas - UNICAMP, CP. 6109, Campinas, São Paulo, CEP 13083-863, Brazil

2- Anatomy, Cell Biology and Physiology and Biophysics Department, Urogenital carcinogenesis and Immunotherapy Laboratory, State University of Campinas - UNICAMP, CP. 6109, Campinas, São Paulo, CEP 13083-865, Brazil

3-São Paulo State University (UNESP), Department of Biology, Institute of Biosciences, Avenida 24-A, nº 1515, Bela Vista, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brazil.

4- Faculty of Pharmaceutical Sciences - State University of Campinas - UNICAMP, Rua Cândido Portinari, 200, Zeferino Vaz University City, Campinas / São Paulo - CEP: 13083-871, Brazil

*corresponding author

Abstract

During mammalian development, physiological factors are required to promote proper maturation of the fetal organ. In males reproductive development requires the action of testosterone. In rodents, the differentiation of male gonads occurs between the gestational days 12 and 19, with differentiation and proliferation of germ cells and immature Sertoli cells in the seminiferous tubules, and differentiation of Leydig cells in the interstitial tissue of the gonad. The object of this work was to evaluate the action of Brazilian green propolis, BGP, on fetal development of male gonads. The study was based on the morphological, morphometrical, stereological, sperm count, daily sperm production, Western Blotting and oxidative stress induction. And the results showed us increased GSI, tubular diameter, as a possible consequence of the blood testis barrier disorganization and presence of large spaces between germ cells. In stereological analysis, an increase in the proportion of interstitium was revealed due to increase in interstitial connective tissue, the number of macrophages and proportion of Leydig cell cytoplasm. The Leydig cells showed increased mitochondrial number and decrease of Golgi complex cisterns. BGP induced a higher macrophage proportion in the P group and in SH-groups indicating oxidative stress induction. In the quantification of connexin 43 and heat shock proteins there was a significant increase. With the quantification of CYP11A1 e Star, proteins of testicular steroidogenesis, we observed a significant decrease. In conclusion, our work showed the link between stimulated macrophages and Leydig cell deterioration caused by oxidative stress and highlights the possible implication of Artepelin-C in this process.

key-words: testis; sperm count; morphometry; stereology; western blot;

Introduction

The developmental origins of disease hypothesis states that adverse events or influences early in life can lead to permanent changes in physiology and predispose adults to disease (Jones et al., 2015). Reproductive disorders of newborn (cryptorchidism and hypospadias) and young adult males (testicular germ cell cancer and infertility) are common and/or increasing in incidence (Shen et al., 2016).

Vander Borgh and Wyns (2018) developed a review about fertility and infertility and the authors pointed out that the semen decline, increasingly observed over the years, may be due to testicular and post-testicular deficiencies. As male fertility can be influenced by a variety of factors, one possible explanation for the declining trend would be that there are environmental and/or occupational factors along with lifestyle practices that contribute to the deterioration of semen quality (Durairajanayagam, 2018).

During mammalian development, many physiological factors, including hormones, are required to promote the appropriate maturation of the fetal tissues, organ and systems (Stark, 2018). For example, male reproductive development requires the action of sexual hormones such as testosterone, a steroid hormone synthesized mainly by the gonads (Haschek, 2010; Joseph, 2018).

In rodents, the critical period of reproductive development that occurs between the gestational days 12 and 19 involves the differentiation of male gonads, with differentiation and proliferation of germ cells and immature Sertoli cells in the seminiferous tubules, and differentiation of Leydig cells in the interstitial tissue of the gonad (Svingen, 2013). The testosterone produced by the Leydig cells is responsible for the virilization of Wolffian duct, which differentiates into epididymis and vas deferens (Haschek, 2010; Svingen, 2013; Joseph, 2018). In the final days of this period the sexual differentiation of the nervous system also occurs, when a peak of testosterone promoted by the Leydig cells acts in the process of defeminization and masculinization of the hypothalamus, which leads to the typical male behavior pattern (Ward, 1972; Ward; Weisz, 1984).

Among lifestyle practices is the diet. Many people take propolis indiscriminately without a dose prescription and for a prolonged period, including

during pregnancy. Previous work from our laboratory demonstrated that male reproductive homeostasis was altered by prolonged intake of Brazilian green propolis (BGP). We demonstrated a dose-dependent response mechanism. Six milligrams of propolis/kg/day increased cell proliferation and Leydig cell (LC) volume, probably leading to increased DSP (daily sperm production). On the other hand, 10 mg of propolis/kg/day induced Cx43 (connexin-43) upregulation and cell death. Both concentrations caused morphological damage to germ cells, Sertoli cells, and LCs (Severi-Aguiar et al., 2017).

Propolis is made from a sticky substance that honeybees (*Apis mellifera*) produce by mixing their own waxes with resinous sap obtained from the bark and leaf-buds of certain trees. The color of propolis can be green, red, brown, or almost black depending on the plants from which the resinous substance is collected. The properties and constituents of propolis also differ with its geographical origin. Propolis presents numerous biological and pharmacological properties, such as anti-bacterial, anti-inflammatory, and anti-oxidative activity (Ueda et al., 2017).

BGP has been reported to contain many biologically active compounds, including cinnamic acid derivatives (e.g., artepillin C, baccharin, drupanin, and p-coumaric acid) and flavonoids (e.g., kaempferol, and kaempferide). Flavonoids are considered as an important part of the antioxidants in food. Kaempferol and kaempferide are known to have an anti-oxidative activity. Recent research claims that kaempferol also induced autophagy, although the mechanism is unclear (Ueda et al., 2017).

In this context, we have some questions. Could propolis induce testicular alterations during gestational development? In this case, would these alterations cause testicular imbalance in adult F1 rats? To answer these questions, we administered BGP to pregnant rats and evaluated the testis of adult rat progeny using different parameters: morphological, morphometrical, stereological, sperm count, daily sperm production and oxidative stress induction.

Material and Methods

Treatment and tissue collection

Ten pregnant Wistar rats were purchased from the Central Animal Raising Unit of UNICAMP (State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil) and kept on a 12L:12D photoperiod with *ad libitum* access to food and water. To address long-term alterations in testis development and function, pregnant rats were treated daily from Gestational Day 1 to parturition by gavage with water (control group-Co; n=5) or 6 mg of propolis/kg/day (exposed group-P; n=5). This dose was selected from previous dose-response studies in which we had examined the long-term effects of exposure to propolis in adult Wistar rat testis (Capucho et al., 2012; Severi-Aguiar et al., 2017).

BGP extract was obtained according to Capucho et al. (2012) and Severi-Aguiar et al. (2017). Propolis was produced by *A. mellifera* L. bees in the apiary located in Luis Antonio city (region of Ribeirão Preto, SP, Brazil) and harvested using plastic nets in April 2014.

Treatment doses were adjusted according to changes in the dams' weights. Gestationally treated male offspring were raised on a normal diet to adult ages, sacrificed, and analyzed. Male offspring were weighed and received ketamine (70 mg/BW) and xylazine (10 mg/BW) before euthanasia at Postnatal Day 90.

Animals were handled according to Guide for Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of UNICAMP (4009-1). The chest cavity was opened. The animals were first perfused with saline (0.9%) to clear the testis vascular bed, then with Karnovsky (2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde 0.2 M in cacodylate buffer pH 7.2), for at least 20 min. The right testicle was removed and weighed with an analytical scale (Ohaus®, Barueri, São Paulo, Brazil). The organs were postfixed overnight in the same solution. The following day, small blocks of the right testicle were embedded in glycol methacrylate. They were sectioned at 3 µm thickness and stained with toluidine blue/1% sodium borate, for light microscopy analyses. For ultrastructural analysis, samples were postfixed in osmium tetroxide (1%), dehydrated in acetone and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections were obtained and stained with uranyl acetate (3%) and lead

citrate (0.2%), before observation with a transmission electron microscope (Zeiss, Leo 906-Oberkochen, Germany).

And the other part of the animals had their testicles fresh, the right being frozen at -4°C and subjected to dissociation and homogenization for the counting of spermatozoa, and the left frozen at -80°C for subsequent biochemical and molecular analysis.

Biometry, morphometry and stereology

Body weight gain was obtained by subtracting the animal's weights at the end of the experiment from their initial weights. The relative testis weight, known as the gonadosomatic index (GSI), was calculated dividing total testis weight by total BW (Gomes et al., 2011). To obtain a more precise parenchyma weight, the albuginea weight was subtracted. The weight of the testicular parenchyma was obtained subtracting the mass occupied by the albuginea from the total right testis weight, thus providing the net weight of the organ's functional portion.

Representative areas of testicular tissue were photographed with a Leica DM2000 microscope and subjected to morphometrical and stereological analyses with an imaging system Pro-Plus software version 4.5 (Media Cybernetics). The seminiferous tubule epithelium height and tubule diameter were measured in 15 tubules per animal at $\times 200$ magnification (Russell, 1990). The stereological analysis of the testis was made for 30 random testis cross-sections per animal. This analysis was performed with a 494 point grid to determine the proportion of the testis components (epithelium, lumen, and interstitium) in the experimental groups (Mori, 1980).

The volumetric proportions of the Leydig cells (LCs) were assessed using a grid mask of 494 points placed over microscope fields for each animal at $\times 1000$ magnification, counting points over nucleus and cytoplasm until completing 1000 points per animal. The volumetric proportions of the intertubular space components (lymphatic space, connective tissue, blood vessels, macrophages, and LCs) were assessed using a grid mask of 494 points placed over microscope fields for each animal at $1000\times$ magnification, until completing 3000 points per animal. The volume, expressed in

milliliters, of each component described above was determined as the product of the testicular volume and volumetric proportions. Since the specific gravity of the testis is nearly 1.0, its volume was considered the same as its weight (Mori, 1980). To obtain a more precise liquid testis volume, 6.5% of its weight, relative to the tunica albuginea, was excluded from this organ's weight (Russell, 1990).

The proportion between nucleus and cytoplasm of LCs was assessed using a grid mask with 494 points placed over images at $\times 1000$ magnification. One thousand points over nuclei and cytoplasm of LCs was counted per animal. The nuclear diameter of LCs was obtained assessing 30 nuclei/animal. The nuclear volume was calculated and the individual volume of LCs was obtained from the nuclear volume and the proportion between nucleus and cytoplasm. The number of LCs per testis was obtained dividing the total nuclear volume of these cells by the average individual nuclear volume (Mori, 1980).

Daily sperm production (DSP) and DSP per gram of testis

The left testicle of unfixed rats was weighed and homogenized for 3 min, using a Ultra-Turrax T18 (IKA) homogenizer, in ice-cold saline-triton (0.9% NaCl and 0.05% Triton X 100 v/v), at 24,000 rpm, after removal of the albuginea (Robb et al., 1978). The homogenate was used to count the number of homogenization-resistant spermatids/sperm in each sample, analyzed in duplicate using a Neubauer hemocytometer (Kempinas et al., 1998). DSP was calculated by dividing the total number of spermatids per testis by 6.1 days, which is the duration of step 19 spermatids in the seminiferous tubules (Robb et al., 1978).

Evaluation of testicular oxidative stress

Oxidative stress of the unfixed right testicle evaluated by determining catalase activity (CAT), reduced sulphhydryl group levels ($-SH$) and lipid peroxidation by TBARS formation. The antioxidant activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST) and reduced glutathione (GSH) was investigated.

Protein concentration was measured according to the biuret method (Gornall et al., 1949). CAT activity was assayed according to the method of Aebi (1974). The levels of reduced groups of total protein (-SH) were measured using 1.0 mg protein testicle homogenate in 25 mM Tris-HCl buffer, 1 mM EDTA and pH 8.2, as described by Ellman (1959). Absorbance was measured immediately and after 15 min at 412 nm. The concentration of -SH groups was calculated using the equation $(\text{Abs}_{\text{final}} - \text{Abs}_{\text{initial}}) \times 1.57$ and reported as mM (Allameh et al., 1997). The lipid peroxidation assay was used as described by Buege and Aust (1978).

The SOD activity was evaluated by the pyrogallol autoxidation method described by Marklund and Marklund (1974) and expressed in absorbance per minute. For determination of GST activity, 1.0 mg of testicular protein homogenate was added to 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), 0.1 mM GSH and 0.1 mM CDNB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene) as described by Habig et al. (1974). The absorbance was monitored for 5 minutes in one-minute intervals at 340 nm.

GSH levels were quantified by the procedures described by Ellman (1959). For this analysis, 5 mg of testicular proteins were added to the same volume of 20% trichloroacetic acid (TCA) containing 1 mM EDTA. The supernatant was mixed with 25 mM Tris-HCl buffer and 1 mM EDTA at pH 8.2. The analysis proceeded in the same way as the -SH groups, detailed above.

Immunoblotting or Western blotting.

The tissues were homogenated in the Working Solution Preparation Lysis Buffer (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP40, 0.25% Sodium Deoxycholate) with the inhibitors (100µg/mlPMSF, 2mM Na₃VO₄, 5mM NaF; 10µg/ml Leupeptin). The tissue was centrifuged at 1500 rpm and 4°C. Aliquots of the supernatant were mixed in the Sample buffer for Western blots (312.5 mM Tris-HCl, 10% Solid SDS, 50% Glycerol, trace amounts Bromophenol Blue, H₂O) according to the proportion of 1:5, boiled and run in polyacrilamide-SDS gel (PAGE), in the Running Buffer for Western Blotting, using BioRad equipment. After the run, the proteins were transferred to nitrocellulose membranes in Western Blotting Semi-dry transfer buffer

(0.25M Tris-HCl, 20% methanol, 0.05% SDS, 0.2M glycine). After transfer, the membranes were washed in TBS-T Buffer (25mM Tris-HCl (pH8.0), 125mM NaCl, 0.05% Tween20), and blocked for 40 minutes in 5% BSA in TBS-T buffer. The membranes were then washed in TBS-T buffer, incubated with specific primary antibodies in 3% BSA in TBS-T Basal Buffer, overnight at 4°C, with constant shaking. The membranes were washed 3 times for 15 minutes in TBS-T, then incubated during 2 hours in a secondary antibody in 1% BSA added to TBS-T in the TBS-T Basal Buffer, at room temperature. Finally, the membranes were photographed in a UVITECH photodocumenter, developed by the “Clarity Max Western ECL substrate”. The band intensity was read by the densitometer using the Image J program. (Santos *et al*, 2011)

The primary antibodies applied were: anti-Beclin (0.5:1000; Rabbit polyclonal, ab62557, Abcam- autophagy marker); anti-caspase-3 (1:500; Rabbit polyclonal, ab13847, Abcam-autophagy marker); CYP11A1 (1:1000; Rabbit, D8F4F, Cell Sigma - steroidogenic pathway marker; Anti-Hsp70 antibody (1:1000; Mouse monoclonal, ab2787, Abcam - heat shock proteins); e Anti-Hsp90 antibody (1:1000; Mouse monoclonal, ab13492, Abcam - heat shock proteins); Connexin (1:8000, Rabbit polyclonal, ab11370, Abcam - cell communication proteins). The secondary antibodies were: Goat, Anti-Mouse IgG H&L (HRP) ab6789, Abcam; and Goat, Anti-Rabbit IgG, 170-6515, Bio-Rad representative.

Statistical analysis

Comparison of the values of control and treated groups was carried out by statistical variance analysis by Student's test t, were used for comparison of parametric variables. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. For all values, the standard deviation mean (means $\pm$) was calculated.

Phytochemical Study and Isolation of Green Propolis Constituents

Phytochemical analysis and identification of chemical constituents of the aqueous extract of Propolis were carried out by Professor Doctor Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya (FCF- UNICAMP).

The chromatographic analysis was made using the UHPLC-MS Acquity equipment of Waters. The filtered extracts (0.22 μmum), 7 μL were analyzed using a C18 column (50mm x 2.1mm, 1.7 μm particles) maintained at 30°C and a flux of 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ in the following conditions: Mobile phase A - Purified water with 0.1% formic acid, Phase B - HPLC methanol. Initiation was with 10% B, inclining to 100% B in 9 minutes, maintained at 100% for 11 minutes, returning to initial conditions and stabilizing up to 12 minutes. The MS conditions were ionization by electrospray in electro negative mode with a 3kV capillary tube and a 30V cone; source temperature was 150° C and solvation at 350° C.

Results

Biometric and morphometric data

Data are shown in Table 1. GSI was significantly increased in the P group. Tubular diameter and epithelium height were significantly increased in the P group when compared to the Co group.

Table 1. GSI and Testicular Morphometry of Testis of Wistar rats that received propolis during Intra Uterine development

Parameter [N° Ex]	Control	Propolis	P Value
GSI [1:8]	0.387 $\pm$ 0.0226	0.419 $\pm$ 0.0243*	0.0114
Tubule diameter (μm) [1:6]	327.8 $\pm$ 26.89	352.6 $\pm$ 16.53*	0.0127
Epithelium height (μm) [1:6]	110.5 $\pm$ 9.483	122.1 $\pm$ 5.836*	0.0016

* Significant difference from the control group. Data with normal Parametric distribution. Student's t-test- data not paired. Values expressed as mean $\pm$ SEM.

Stereological evaluations

A non-significant difference was observed for the tubular component percentage (Table 2). With respect to interstitial components, BGP decreased LC percentage and blood vessel percentage, while it increased the macrophage percentage and extracellular matrix percentage (Table 2).

Analysis of LC components showed no alteration of nuclear diameter but a significant decrease in nuclear percentage and an increase of cytoplasmatic percentage was found (Table 2).

Table 2. Stereology of testicle Wistar rats that received propolis during the development Intrauterine

Parameter [N° Ex]	Control	Propolis	P Value
Volumetric density of the testicle			
Túbule % [1:6]	72.3±6.073	73.18±5.159	0.7541
Lumen % [1:6]	18.2±6.805	16.79±7.863	0.7066
Interstitial % [1:6]	9.5±2.771	10.01±3.498	0.7501
Volumetric density of interstitium components			
Leydig Cell % [1:6]	25±3.773	17.16±6.263*	0.008
Macrophage % [1:6]	1.5±0.5203	3.313±1.247*	0.0027
Blood and/or Lymphatic space % [1:6]	10±3.155	4.545±4.744*	0.016
Other comp. connective tissue % [1:6]	63.5±5.446	74.99±6.867*	P<0.0001
Leydig Cell			
Nuclear diameter (µm) [1:7]	0.736±0.0823	0.792±0.058	0.1685
Cytoplasmic proportion % [1:7]	66.47±1.481	67.33±3.15*	0.0105
Nuclear proportion % [1:7]	33.53±1.481	32.67±3.150*	0.0105

* Significant difference in relation to the control group. Data with normal distribution - Parametric. Student's t- test- data not paired. Values expressed as mean ± SEM.

Light microscopy

In histological sections of the testicle of Wistar rats of the Control groups (TC1 and TC2), the parenchyma is well preserved, while that of the F1 generation of the females that received propolis during pregnancy (TP1 and TP2) shows a thickened interstitium with fewer blood vessels. This has also been demonstrated by morphometric and stereologic analyses.

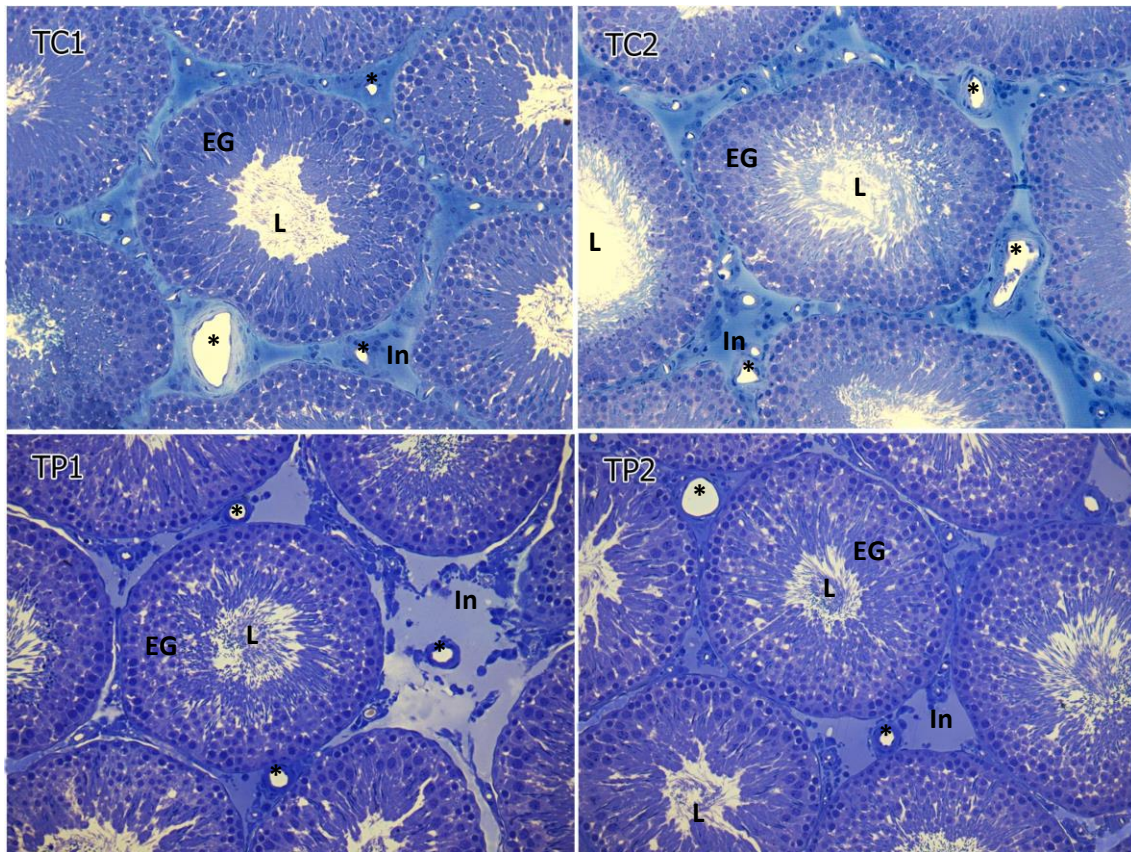


Figure 1 – Images of seminiferous tubules of Wistar rats. Groups: TC1 and TC2. Control groups. (TP1 and TP2) are testicles of animals that received própolis during their intra-uterine development. Abbreviations: (L) Lumen; (EG) Germinal epithelium; (In) Interstitium; (*) Blood vessels. Toluidine blue stain. Magnification 200X.

Figure 2 details the interstitial region of both experimental groups. Visually they do not appear to be altered but the morphometrical data for this region is statistically significant, revealing a smaller number of Leydig cells, fewer blood vessels and a greater number of macrophages and increased extracellular matrix.

The Leydig cells were measured to define the nuclear proportion of the treated group which was significantly reduced while the cytoplasmic proportion increased. This cannot be observed visually since these alterations are statistically very small.

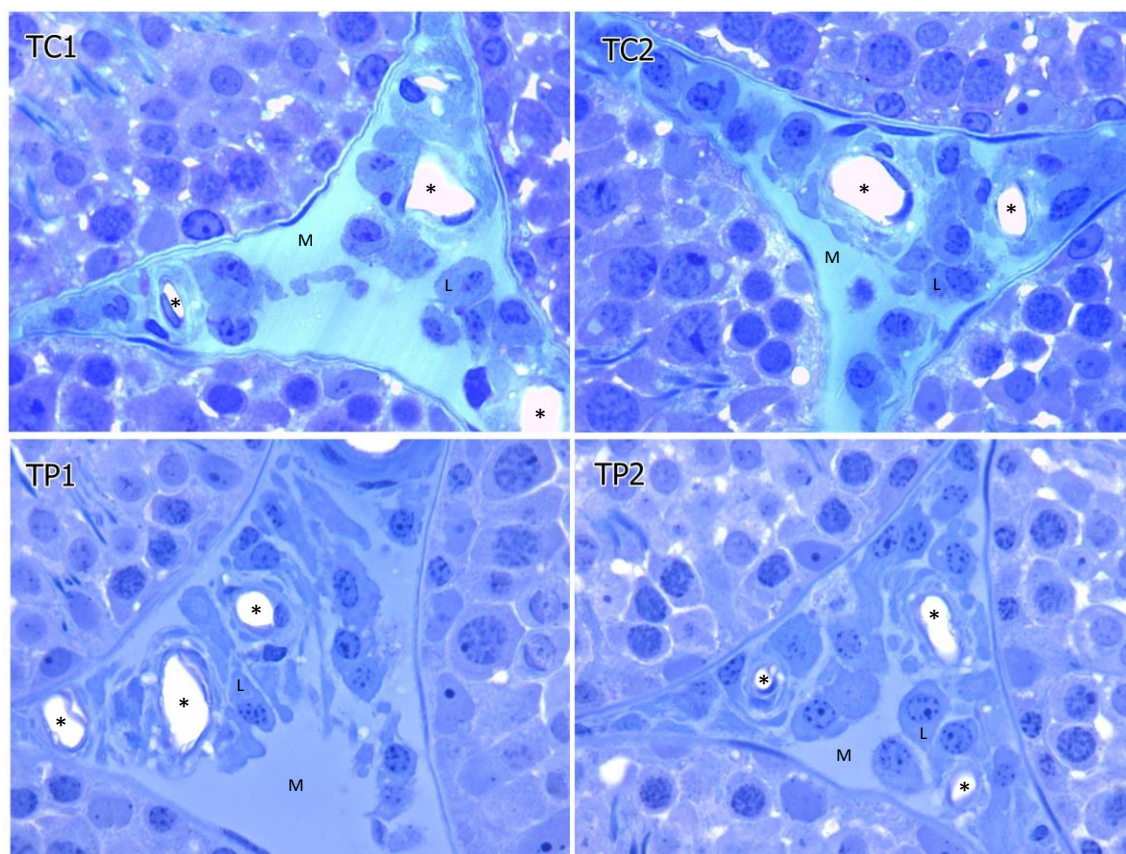


Figure 2 Images of the interstitial region of testicles of Wistar rats. Control groups (TC1 and TC2) and (TP1 and TP2) groups treated with propolis during their intra-uterine development. Abbreviations: (M) extracellular matrix; (*) blood vessels; (L) Leydig cells. Toluidine blue staining. Magnification 200X.

Transmission electron microscopy (TEM) analyses

The Co group showed the expected tissue architecture for these animals. In the tubular compartment, Sertoli cells were distributed just inside the tunic, together with the spermatogonia. Normal development of spermatogenesis was observed. In the interstitium, blood vessels, lymphatic space, Leydig cells and macrophages were verified as typically described for these rats. In these groups, the Leydig cells were morphologically normal and organized in clusters of polymorphic cells. These clusters were, in most of the sections, associated with blood vessels and some macrophages. An overview of this architecture can be found in Figure 3 (TC1, TC2). On the other hand, the P group sections showed enlargement of interstitial regions with reduced blood vessels (Fig. 4 - TP1, TP2).

Normal testis ultrastructure of Co group was shown in Figure 3. The interstitial Leydig cell demonstrated large euchromatic nuclei with peripherally

condensed chromatin. Mitochondria, endoplasmic reticulum (ER) and Golgi complex (GC) were noted in its cytoplasm (fig. 3a). A spermatocyte, spermatids (fig. 3b,e) and spermatogonia (fig. 3c) adhered to the Sertoli cell membrane. The Sertoli cell laying on the basement membrane showed a nucleus with a prominent nucleolus (fig. 3c). Its cytoplasm contained mitochondria, ER, and lipid droplets. It is possible to observe the blood testicular barrier (fig. 3c, d) and spermatozoa in the tubule lumen (fig. 3f).

Ultrastructure of the P group animals showed Leydig cells with reduced GC and a greater mitochondrial number (fig. 4h). Large spaces between germ cells, apparently left by the degeneration of Sertoli cell prolongations, were observed (fig. 4i, j, k). It was possible to note a disorganization of the testis barrier (fig. 4k, j). A greater quantity of cytoplasm was seen in the spermatids in lumen (fig. 4l, m).

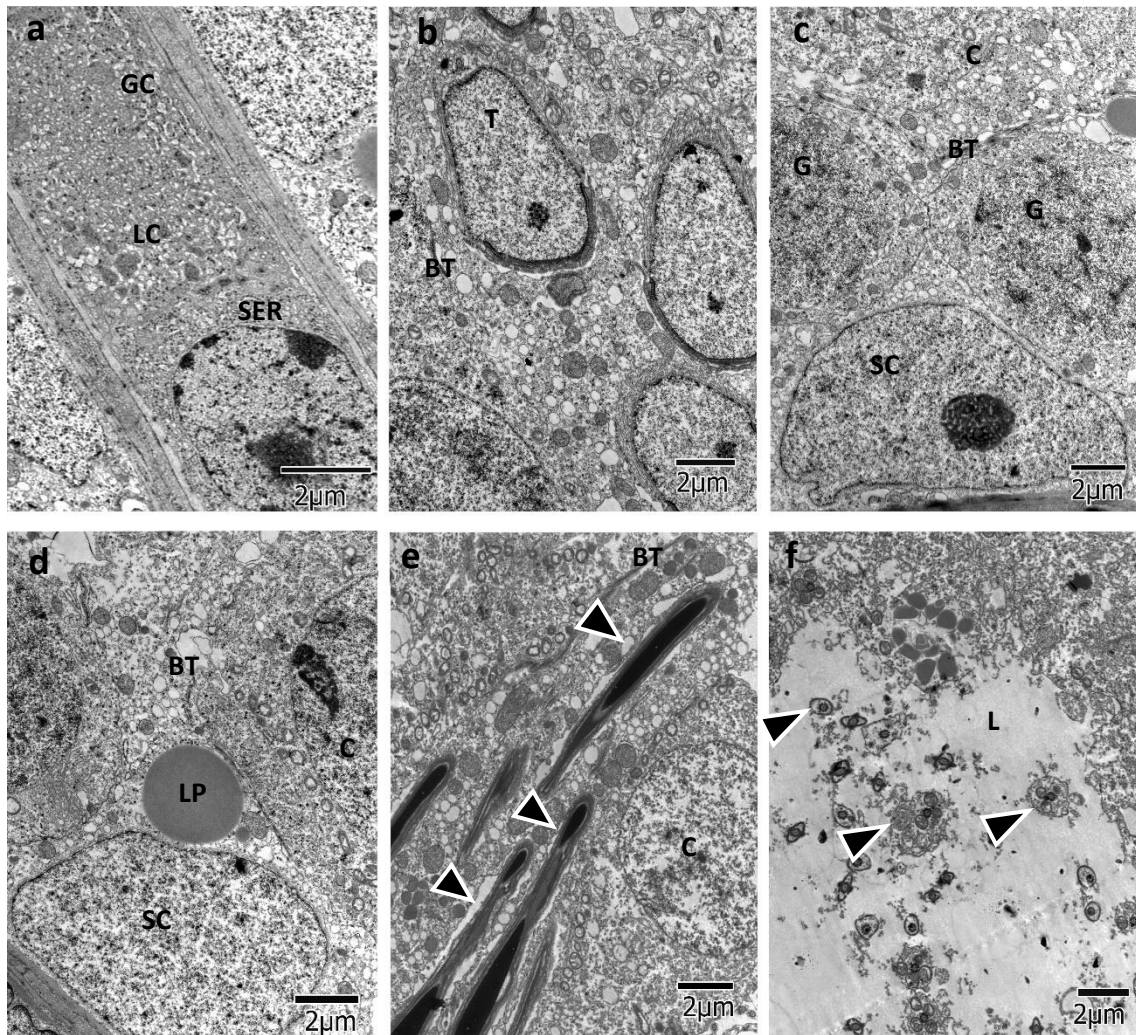


Figure 3. Testicular structure of Wistar rats – control group (Co). a-f. In 3a, the interstitium and a Leydig cell can be seen. Spermatogonia and Sertoli cells are seen at the epithelium base, Figs 3a, c, d. Spermatid heads initiating elongation occur in 3b, and advanced elongation in 3e. Sperm tails are seen in the lumen (f) with varied amounts of cytoplasm, called “cytoplasmic droplet”. Abbreviations: (BT) blood testicular barrier, (C) Spermatocytes, (GC) Golgi complex, (G) spermatogonium, (LC) Leydig cell, (L) lumen, (LP) lipid droplet, (SC) Sertoli cell, (SER) smooth endoplasmic reticulum, (T) spermatids, (arrow heads pointing down) head region of elongated spermatids, (arrow heads pointing up) spermatozoon tails.

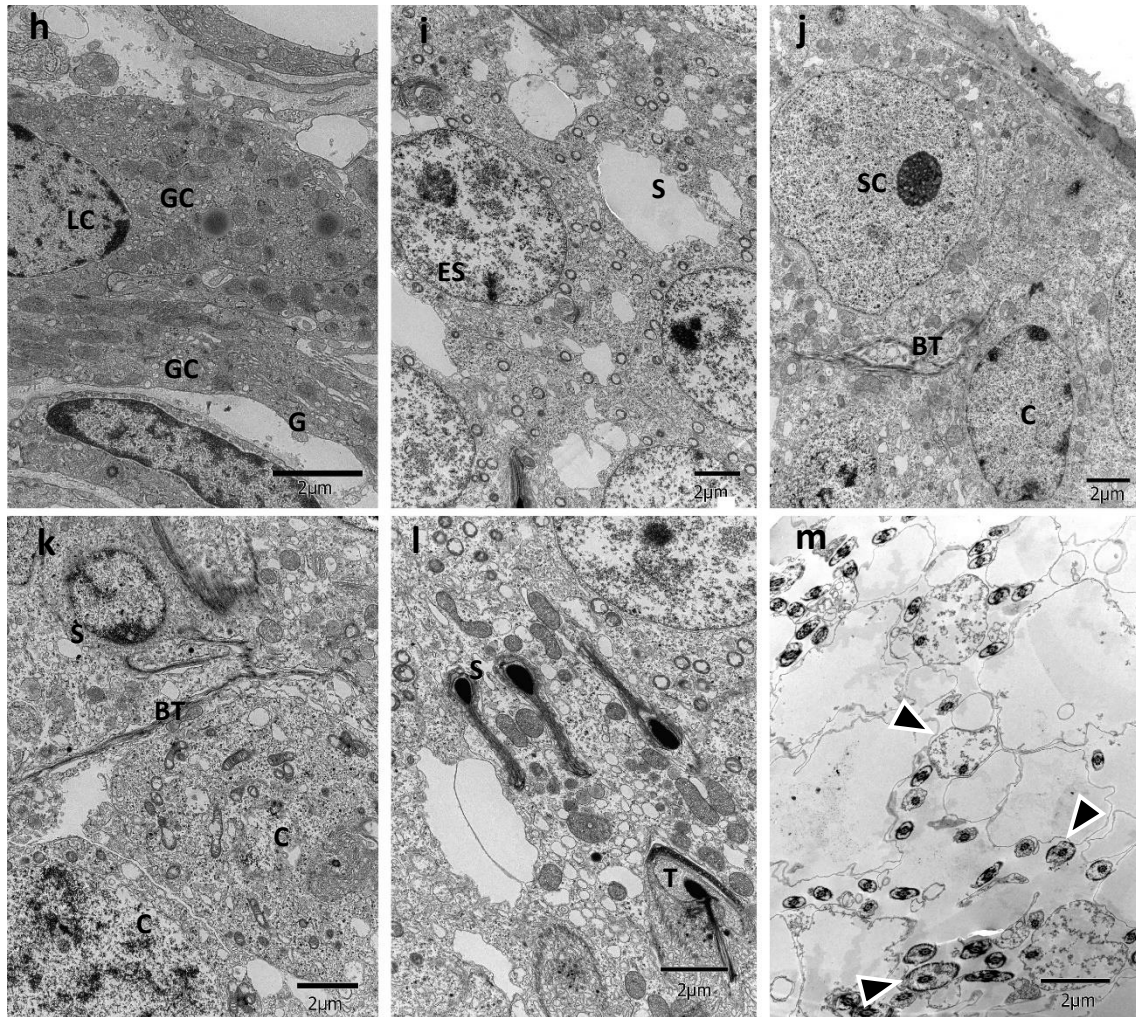


Figure 4. Testicle of Wistar rats that received propolis during intra-uterine development. 4h shows the interstitium with a large, dense Leydig cell. Large spaces occur between the spermatocytes in 4i, k, l. The blood testicular barrier is disrupted in j and k. Spermatids in 4l are misshapen and the cytoplasmic droplet more frequent and larger in spermatozoa tails of the lumen in 4m. Abbreviations: (BT) Blood testicular barrier; (C) spermatocytes; (G) spermatogonia; (GC) Golgi complex; (L) lumen; (LC) Leydig cell; (SC) Sertoli cell; (S) spaces between germinal epithelial cells; (T) spermatids; Arrow heads in 4m point to spermatozoa tails.

Sperm count

Total number of sperm per testis, total number of sperm per gram per testis and daily sperm production (DSP) did not have significant alterations (Table 3).

Table 3. Sperm count in testicles of Wistar rats receiving propolis during intrauterine development

Parameter	Control (n=8)	Propolis (n=8)	P Value
N° Esperm/Testicle	258.7±24.94	265.1±29.21	0.6424
N° Esperm/g of Testicle	158.1±25.54	152.4±20.07	0.6271
Daily Production Sperm.	42.41±4.089	43.46±4.788	0.6424

Data with normal distribution – Parametric. Student's t-test-data not paired. Values expressed as mean ± SEM. No significant differences were found.

Oxidative stress markers

Among all parameters assayed (CAT, SOD, TBARS, GST, GSH, SH-groups), only GSH and SH-groups showed a significant increase for the P group when compared with the Co group (Table 4).

Table 4. Quantification of Oxidative Stress of Testis of Wistar rats of the F1 generation of females who received propolis orally during pregnancy

Parameter	Control (n=8)	Propolis (n=8)	P Value
CAT (Abs 240nm/min)	0.055±0.011	0.056±0.0072	0.1823
SOD (Abs 440nm/min.)	0.136±0.041	0.1055±0.0334	0.0591
TBARS (mol/Lx10 ⁻⁹)	91.67±15.28	120±70.58	0.1879
GST (Abs340nm/min.)	0.0507±0.0075	0.049±0.005	0.2387
GSH (mmol/L)	0.245±0.025	0.285±0.055*	0.0353
-SH total (mmol/L)	0.0312±0.007	0.037±0.0028*	0.0156

* Significant difference in relation to the control group. Data with normal distribution - Parametric. Student's t- test- data not paired. Values expressed as mean ± SEM.

Quantification of propolis components

The data related to the phytochemical study and isolation of the chemical constituents of Propolis are shown in table 5.

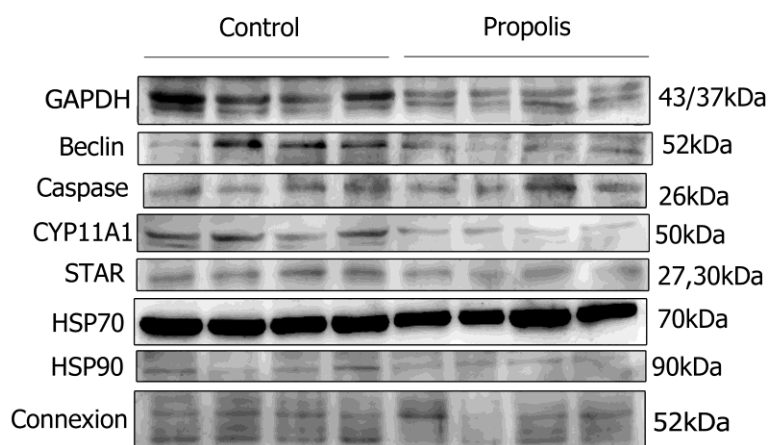
Table 5. Compounds identified in the aqueous extract of green propolis obtained by UHPLC-MS.

Suggested Compound	m / z	Retention times (min)	[] µg/ml
3-prenil-4-(2-metilpropioniloxi) cinnamic acid	301	6.97	2.3
pinobanksina	271	5.71	1.29
canferida	299	7.3	2.35
pcoumaric acid	163	3.74	1.22
artepillin C	299	8.2	2.28

m / z mass of the compound; [] µg / ml - concentration in micrograms per milliliters of the compounds suggested in the table.

Quantification of Immunoblotting

No significant difference on expression of autophagy (Beclin) was found for the animals that received propolis during fetal development (Figure 5A). At other hand, the proteins involved in apoptosis - caspase-3 - showed significant increase in exposed animals (Figure 5B).



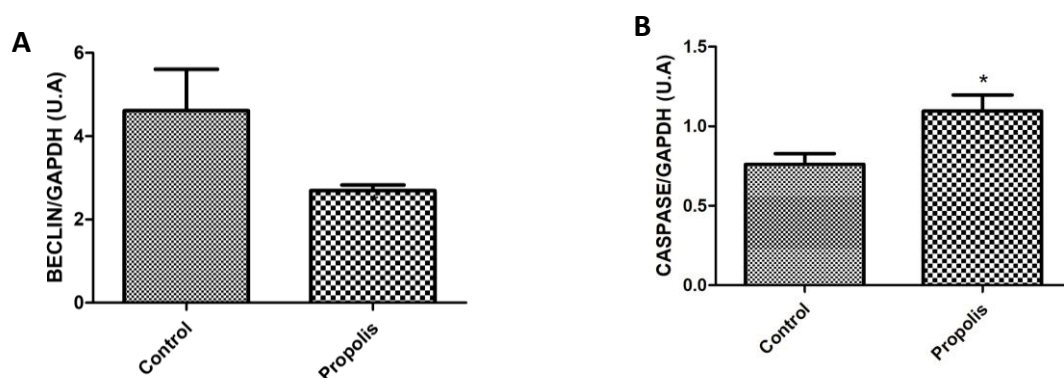


Figure 5. The graphs represent the densitometry reading (n=4) of the *immunoblotting* using the cell death markers: Anti-Beclin 1 antibody and Anti-Caspase-3 antibody in the testicles of Wistar rats exposed to propolis during fetal development. The *immunoblotting* was normalized by GAPDH. *A (p=0.4937) and B (p=0.1773) vs Control.

Considering the markers for the steroidogenic pathway, there was a significant reduction of both markers, CYP11A1 and StAR, in the animals that received propolis (figure 6).

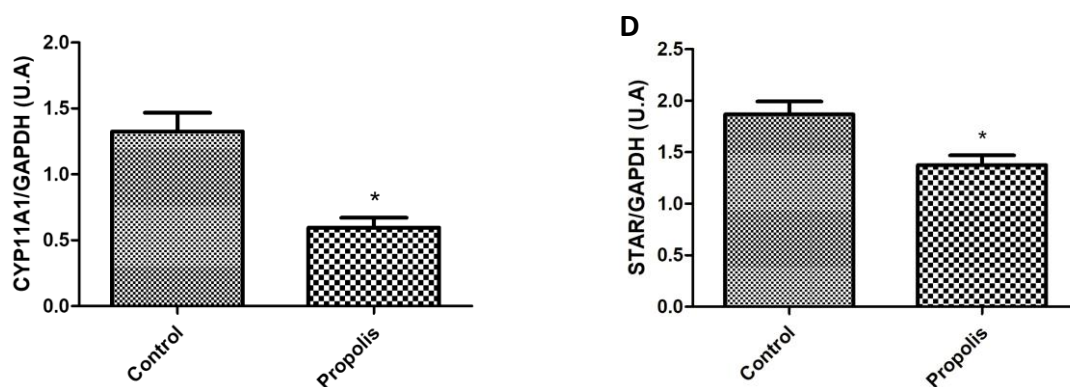


Figure 6. The graphs represent the densitometry reading (n=4) of the *immunoblotting* using the markers of testicular steroidogenesis: CYP11A1 and Anti-StAR antibody in the testicles of Wistar rats exposed to propolis during fetal development. The *immunoblotting* was normalized by GAPDH. * C (p=0,0005) e D (p=0.1773) vs Control.

For the markers of heat shock proteins, HSP70 and HSP90, a significant increase of these proteins occurred in the animals that received propolis (figure 7).

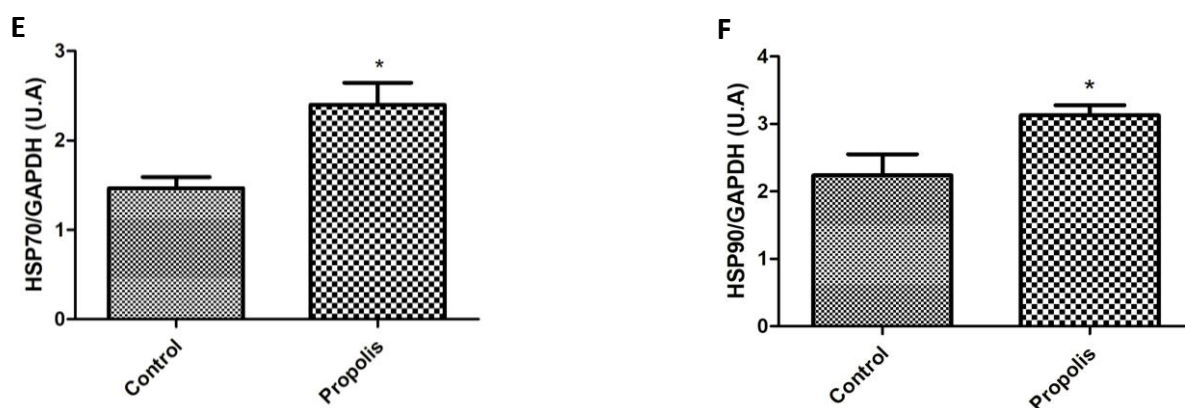


Figure 7. The above graphs show the densitometric reading (n=4) of the *immunoblotting* carried out to measure the levels of heat shock proteins, Anti-Hsp70 antibody and Anti-Hsp90 antibody in Wistar rat testicles treated with propolis. They were normalized by GAPDH. * E (p=0,0048) e F (p=0,0225) vs Control.

In the group that received propolis there was also a significant increase in the expression of the cell junction protein, connexin (Figure 8).

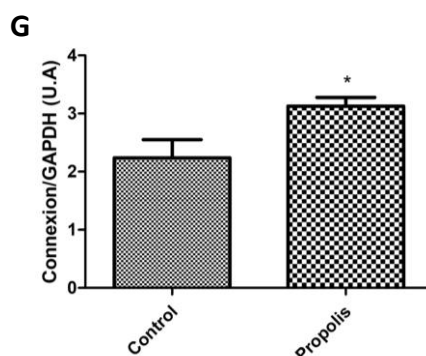


Figure 8. The graph presents the densitometry reading (n=4) of the *immunoblotting* that measured the levels of the communication proteins, Connexin, in Wistar rat testicles treated with propolis. It was normalized by the immunoblotting of GAPDH. * G (p=0,0225) vs Control.

Discussion

Data obtained with methodologies and assays employed in this study lead us to answer our initial questions and to conclude that when pregnant rats were exposed to BGP a variety of male reproductive alterations were induced in the F1 adult male rats.

GSI was significantly increased in the P group, demonstrating testicular parenchyma hypertrophy. Morphometric analyses detected significant increase in

tubular diameter and epithelial height. These events could be the consequence of the blood testis barrier disorganization and the presence of large spaces between germ cells. However, no significant alteration in sperm number and DSP was observed.

The stereological analyses revealed an increase in the proportion of interstitial space. It occurred because of the increase in interstitial connective tissue, number of macrophages and proportion of Leydig cell cytoplasm. Ultrastructural view of Leydig cells showed increase of mitochondrial number and decrease of Golgi complex cisterns. So far, Leydig cell nuclear proportion and Leydig cell proportion were diminished in P group showing a loss of these cells, suggesting that they were eliminated by apoptosis, once caspase-3 levels were significantly increased.

How BGP would induce these effects? To answer this question, we need know propolis composition and its biological action. The principal constituents of Brazilian green propolis (BGP) are caffeic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, naringenin, kaempferol, isorhamnetin, sakurametin, pinocembrin, kaempferide and artemillin C (Art-C). Higher quantities of polyphenolic compounds are exhibited in ethanolic extracts from green propolis, when compared with the red and brown extracts demonstrating that green propolis exhibit the highest amount of this class of compounds (Andrade, 2017). Our phytochemical analysis is in accordance with this information.

Moreover, the differences in the antioxidant capacity of polyphenolic compounds are dependent on their chemical structure, regarding the number and position of phenolic hydroxyl groups. Antioxidant activity of phenolic acids and their esters with more phenolic hydroxyl substitutions, especially when they are 3, 4-ortho-substituted, could be more prominent. For flavonoids, the maximum antioxidant effectiveness requires the 3-OH group to be attached to the 2,3-double bond and adjacent to the 4-carbonyl in the C-ring in addition to the catechol-type structure in the B ring. Thus, it is not surprising that kaempferol has the most potent activity among other compounds (Zhang et al., 2017).

In addition, caffeoylquinic acids and Art-C might be effective components for quality control of Brazilian green propolis due to their specificity and strong antioxidant activity (Zhang et al., 2017). These compounds have been reported in the literature as beneficial for human health. Some authors have attributed

antibacterial, antitumoral and anti-inflammatory activities for Art-C and p-coumaric acid including other therapeutic properties (Andrade et al. 2017).

Artepellin-C is attracting attention as a material for complementary alternative medicine for cancer treatments, since its anticancer effect was demonstrated *in vivo*. In addition to the above biological activities, autophagy-inducing activity has been recently reported in the ethanol extracts of Chinese and Brazilian propolis. Artepellin-C has also induced apoptosis as revealed by DNA fragmentation and increases in cleaved caspase-3 and poly ADP-ribose polymerase (Endo et al., 2018). Our results are in accordance with these previous demonstration because they showed increase on caspase-3 expression in rats exposed to propolis although nor Beclin cellular expression alteration have been noted. However, further studies using Artepellin-C on isolated form will be important to confirm this possible cause-effect relation.

A surprising result obtained by our evaluation was the significant increase in the macrophage proportion in the P group. Testicular macrophages form intimate associations with Leydig cells. Macrophages provide essential growth and differentiation factors for Leydig cells (Mahan et al., 2016). Macrophages secrete hydrogen peroxide (H_2O_2), which can suppress or stimulate cell death by apoptosis (Gautman et al., 2006). Gautman et al. (2006) confirmed apoptosis among 8% of the Leydig cells exposed to H_2O_2 at a physiological concentration although no gross morphological alterations were apparent during microscopical examinations. However, the expression of genes involved in apoptosis such as FasL was confirmed.

We did not quantify H_2O_2 levels but in our study, we demonstrated that BGP induced a significant increase in SH-groups indicating oxidative stress induction. Furthermore, we observed a significant increase in GSH level in the P group. GSH systems contribute to the antioxidant defense of cells from the destructive influence of oxidative stress, which causes formation of intra- and intermolecular disulfide bonds in proteins, oxidation of functional SH-groups with sulfonic acid formation, and subsequent proteasomal degradation of proteins (Kalinina et al., 2008).

Still unclear, however, is how propolis induces reactive oxygen species production. Lima et al. (2018) in a study using neutrophils hypothesized that propolis might induce active oxygen species-forming enzymes, such as MPO

(Myeloperoxidase), an abundant heme-containing enzyme present in neutrophils, monocytes, and macrophages, produced in high levels during inflammation, and associated with poor reproductive outcome (Shaeib et al., 2016). MPO generates hypochlorous acid (HOCl), a damaging reactive oxygen species (ROS) utilizing hydrogen peroxide (H₂O₂) and chloride (Cl⁻). At inflammatory conditions, HOCl not only destroys invading pathogens but can also cause damage through its capacity to react with other biomolecules, including aromatic chlorination, aldehyde generation, chloramine formation, and oxidation of thiols (Shaeib et al., 2016).

In work done by Severi-Aguiar (2017), all treated groups presented a significant decrease in LC nuclear proportion and a significant increase in LC cytoplasmic proportion and volume when compared to the control group. LC nuclear volume was significantly increased in group treated with 10 mg/kg/day. LC volume was significantly increased in the group treated with 6 mg/kg/day and 10 mg/kg/day and the LC number showed a significant decrease in the group treated with 10 mg/kg/day. And no RT-PCR assay showed a significant increase in the expression of Cx43 transcripts in the group treated with 10 mg/kg/day as compared to the control group. In contrast, N-cad transcript levels decreased significantly in all exposed groups. In our results, the quantification of connexin 43, had a significant increase. These results can explain the lower number of Leydig cells and the lower level of steroidogenic proteins, even though the number of spermatozoa was unaltered, differing from the diminished spermatozoa number found by Severi-Aguiar (2017). The connexin 43 is the most common and most important isoform of the protein in the male reproductive system (Cyr, 2011; Ameixa, 2000). It plays an essential role in testicular development (differentiation of Sertoli cells in genital ridges, colonization of the seminiferous cords by gonocytes, germ cell multiplication and apoptosis, that influence postnatal expansion of the male germ line) (Cyr, 2011; Carette, 2010; Juneja, 1999; Roscoe, 2001; Gilleron, 2009) and is important for the initiation and maintenance of spermatogenesis in adults (Pointis, 2010; Roscoe, 2001; Brehm, 2007). Connexin is widely expressed in diverse testicular cells (Leydig, Sertoli, germ and myoid cells) (Roscoe, 2001; Brehm, 2007; Bravo-Moreno, 2001). Its expression within the seminiferous epithelium has a temporal and spatial pattern (Lee, 2007; Hejmej, 2007) depending on androgen levels, age (Knapczyk-Stwora, 2003; Hejmej, 2009), and stage of the SE cycle (Batias, 2000; Bravo-Moreno, 2001; Hejmej, 2007), and is crucial for the formation and functioning of the blood-testis barrier

(Carette, 2010; Li, 2009). The data on knockout mice demonstrate that, if lacking, Connexin 43 cannot be replaced by other types of connexins (Cx26 or Cx32) (Winterhager, 2007), and homozygous Connexin 43-deficient (cx43^{-/-}) mice show severe germ cell deficiencies (Ameixa, 2000).

In the analyses of the protein of cell death, Beclin 1, no alteration was observed, but the heat shock proteins showed a significant increase. Heat shock protein (HSP) are a conserved family of cellular proteins that are found in all organisms, ranging from bacteria to higher mammals (Ding et al., 2013; Liu et al., 2012). HSP, acting as molecular chaperones, are involved in protein folding, apoptosis, development, embryogenesis, and spermatogenesis (Ding et al., 2013; Tedeschi et al., 2015; Connolly and Hall, 2008; Fang et al., 2012). HSP expression is significantly upregulated when organisms are subjected to stressors, such as changes in heavy metal concentrations, dissolved oxygen levels, and temperature, as well as microbial infections. HSP up-regulation exerts protective effects against these insults and allows organisms to maintain their homeostasis (Liu et al., 2014; Liu et al., 2015; Wang et al., 2015a; Zhang et al., 2009). According to Du (2019) heat shock protein 90 (HSP90), which functions as a molecular chaperone, plays an important role in reproduction and cellular defense. Many types of cell stress, including extreme temperature, hypoxia, inflammation, ischemia, oxidative stress and toxic compounds, cause the synthesis of heat shock proteins (HSPs) (Ciocca, 2005). The response of synthesis of these proteins could be an answer to the induction of oxidative stress in the animals that received propolis.

With the quantification of CYP11A1 and Star, proteins of testicular steroidogenesis, we observed a significant decrease. In the work of Liu (2018), that studied the gestational exposition to ziram, an endocrine disruptor and causing birth abnormality of the male reproductive system, they evaluated the development of Leydig cells. Ziram had effects on fetal Leydig cell-specific gene expression, decreased expression of Star, Cyp11a1 at 8 mg/kg. Ziram is used worldwide as an agricultural fungicide to prevent the spread of fungal infections (Caldas et al., 2001).

We suggest that the increase in connective tissue in the interstitium is a compensatory responsive mechanism to macrophage activation and proportional decrease of Leydig cells. Further studies are necessary to corroborate our hypothesis,

but our results raise speculations about the oxidizing capacity of antioxidant compounds, taking into account their concentrations and intake period.

Conclusion

In conclusion, our current work showed for the first time the effects in F1 rats of green propolis ingestion during pregnancy. The link between stimulated- macrophages and Leydig cell deterioration with oxidative stress and the possible implication of Art-C in this process are hypothesized and open new perspectives in these area.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian Agency CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Projeto PROEX0231088), CNPq (National Council for Scientific and Technological Development, process number 141438/2018-5), FAEPEX (Teaching, Research and Extension Support Fund, process number 3324/17)-Unicamp and FAPESP (process number (2016/18202-0) for the financial support.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- AEBI, H. in: BERGMAYER, H. V., 1974, Methods in Enzymatic analysis, New York: Academic press; vol.2, p. 674-684.
- ALLAMEH, A.; VANSOUN, E. Y.; ZARGHI, A. Role of glutathione conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity.

Mechanisms of Ageing and Development, Vol. 95. Issues 1-2, April 1997, Pages 71-79, [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(97\)01862-9](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(97)01862-9).

AMEIXA, C.; BRICKELL, P.M. Characterization of a chicken retinoid X receptor- γ gene promoter and identification of sequences that direct expression in retinal cells. 2000. *Biochem. J.* 347, 485–490.

ANDRADE, J.K.S. et al. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidante activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Research International*, v. 101, p. 129-138, 2017.

BRAVO-MORENO J.F.; DÍAZ-SÁNCHEZ V.; MONTOYA-FLORES J.G.; LAMOYI, E.; SAÉZ J.C.; PÉREZ-ARMENDARIZ, M. Expression of connexin43 in mouse Leydig, Sertoli, and germinal cells at different stages of postnatal development. *Anat Rec.* 2001; 264:13–24. [PubMed]

BREHM, R.; ZEILER, M.; RÜTTINGER, C. et al. Sertoli cell-specific knockout of connexin 43 prevents initiation of spermatogenesis. *Am J Pathol.* 2007; 171:19–31. [PMC free article] [PubMed]

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.

CALDAS, E.D.; CONCEIÇÃO, M.H.; MIRANDA, M.C.; DE SOUZA, L.C.; LIMA, J.F. Determinação de resíduos de fungicidas ditiocarbamatos em alimentos por método espectrofotométrico utilizando sistema de reação dissulfeto vertical. *J. Agric. Food Chem.* , 49 (2001) , pp. 4521 – 4525.

CAPUCHO, C.; SETTE, R.; DE SOUZA PREDES, F.; DE CASTRO MONTEIRO, J.; PIGOSO, A.A.; BARBIERI, R. et al. Green Brazilian propolis effects on sperm count and epididymis morphology and oxidative stress. *Food Chem Toxicol* 2012; 50: 3956-62

CARETTE, D.; WEIDER, K.; GILLERON, J. et al. Major involvement of connexin 43 in seminiferous epithelial junction dynamics and male fertility. *Dev Biol.* 2010; 346: 54–67. [PubMed]

CIOCCA, D.R.; CALDERWOOD, S.K. Proteínas de choque térmico no câncer: implicações diagnósticas, prognósticas, preditivas e de tratamento. *Cell Stress Chaperones* , 10 (2005) , pp. 86 – 103

CYR DG. Connexins and pannexins. Coordinating cellular communication in the testis and epididymis. *Spermatogenesis.* 2011;1:325–38. [PMC free article] [PubMed]

DU, CHEN; YING-LI HAN; CONG-CONG HOU; JUN-QUAN ZHU. Expression pattern of heat shock protein 90AB (HSP90AB) and stress inducible protein 1 (Stip1) during spermatogenesis of mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* Volume 231, May 2019, Pages 42-51.

DURAIRAJANAYAGAM, D. Lifestyle causes of male infertility. *Arab Journal of Urology* (2018) 16, 10–20.

ELLMAN, G. L., 1959, Tissue sulphydril groups. Arch. Biochem. Biophys., v. 82, p. 70-77.

ENDO, S. et al. Autophagy inhibition enhances anticancer efficacy of artemisinin C, a cinnamic acid derivative in Brazilian green propolis. Biochemical and biophysical research communications, 2018.

GAUTAM, D. K.; MISRO, M. M.; CHAKI, S. P.; SEHGAL, N. H₂O₂ at physiological concentrations modulates Leydig cell function inducing oxidative stress and apoptosis. Apoptosis. 2006, vol. 11 (1). p. 39-46. DOI: 10.1007/s10495-005-3087-1

GILLERON, J.; CARETTE, D.; DURAND, P.; POINTIS, G.; SEGRETAIN, D. Connexin 43 a potential regulator of cell proliferation and apoptosis within the seminiferous epithelium. Int J Biochem Cell Biol. 2009; 41:1381–90. [PubMed]

GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J., DAVID, M.M., 1949, Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. Journal Biological Chemistry, 1949 Feb; 177(2):751-66.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem. 1974 Nov 25; 249(22):7130-9.

HASCHEK, W.M.; ROUSSEAUX, C.G.; WALLING, M.A. Chapter 14 - Male Reproductive System, Fundamentals of Toxicologic Pathology, 2nd Ed., 2010, pp. 553-597, 10.1016/ISBN 978-0-12-370469-6.00018-0.

HEJMEJ, A.; KOTULA-BALAK, M.; SADOWSKA, J.; BILIŃSKA, B. Expression of connexin 43 protein in testes, epididymides and prostates of stallions. Equine Vet J. 2007;39:122–7. [PubMed]

HEJMEJ, A.; KOPERA, I.; KOTULA-BALAK, M.; GIŻEJEWSKI, Z.; BILIŃSKA, B. Age-dependent pattern of connexin43 expression in testis of European Bison (Bison bonasus, L.) J Exp Zool A Ecol Genet Physiol. 2009;311A:667–75. [PubMed]

JOSEPH, D.B.; VEZINA, C.M. Male reproductive tract: development overview, Ref. Module Biomed. Sci., 2018, 10.1016/ISBN978-0-12-801238-3.64366-0

JUNEJA, S.C.; BARR, K.J.; ENDERS, G.C.; KIDDER, G.M. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin 43. Biol Reprod. 1999;60:1263–70. [PubMed]

KALININA, E. V.; CHERNOV, N. N.; SAPRIN, A. N. Involvement of Thio-, Peroxi-, and Glutaredoxins in Cellular Redox-Dependent Processes. Biochemistry. 2008, vol. 73 (13), pp. 1493-1510.

KEMPINAS, W.G. et al., 1998. Rat epididymal sperm quantity, quality and transit time after guanethidine-induced sympathectomy. Biol. Reprod. 59, 890–896.

KNAPCZYK-STWORA, K.; DURLEJ-GRZESIAK, M.; DUDA, M.; SŁOMCZYŃSKA, M. Expression of connexin 43 in the porcine foetal gonads during development. Reprod Domest Anim. 2013; 48:272–7.

LEE, N.P.; YEUNG, W.S.; LUK, J.M. Junction interaction in the seminiferous epithelium: regulatory roles of connexin-based gap junction. *Front Biosci.* 2007; 12:1552–62.

LI, M.W.; MRUK, D.D.; LEE, W.M.; CHENG, C.Y. Connexin 43 and plakophilin-2 as a protein complex that regulates blood–testis barrier dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106:10213–8. [PMC free article]

LIMA-CAVENDISH, R.; SANTOS, J.S.; BELO-NETO, R.; PAIXÃO, A.O.; OLIVEIRA, A.O.; VALÉRIA, J. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 173 (2015) 127–133.

LIU, X.X., SHEN, X.F.; LIU, F.J. Screening targeted testis-specific genes for molecular assessment of aberrant sperm quality. *Molecular Medicine Reports*, 14: 1594-1600, 2016.

LIU, JIANPENG; WANG, YIYAN; FANG, YINGHUI; NI, CHAOBO; MA, LEIKAI; ZHENG, WENWEN et al. Gestational exposure to ziram disrupts rat fetal Leydig cell development. *Chemosphere*, vol. 203, July 2018, Pages 393-401.

LIU, Q.; WANG, Y.; GU, J.; YUAN, Y.; LIU, X.; ZHENG, W.; HUANG, Q.; LIU, Z.; BIAN, J. 2014. Zearalenone inhibits testosterone biosynthesis in mouse Leydig cells via the crosstalk of estrogen receptor signaling and orphan nuclear receptor Nur77 expression. *Toxicol. In Vitro* 28, 647-656.

MARKLUND S, MARKLUND G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 1974 Sep 16; 47(3):469-74.

MORI, H.; CHRISTENSEN, A.K. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *J Cell Biol* 1980; 84:340-54.

ROBB, G.W.; AMANN, R.P.; KILLIAN, G.J. 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J. Reprod. Fertil.* 54, 103–107.

RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHAHILIN, A.P.; CLEGG, E.D. Mammalian spermatogenesis. In: Russel LD, Griswold, MD, editors. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Clearwater: Cache River Press; 1990. p. 1-38.

SANTOS, A.M.; SCHECHTMAN, D.; CARDOSO, A.C.; CLEMENTE, C.F.M.Z.; SILVA, J.C. et al. FERM domain interaction with myosin negatively regulates FAK in cardiomyocyte hypertrophy. *Nature Chemical Biology*, 2012, vol 8, p. 102–110.

SEVERI-AGUIAR, G. D. C.; PINTO, S. J.; CAPUCHO C.; OLIVEIRA, C.A.; DIAMANTE, M. A.; BARBIERI, R.; PREDES, F. S.; HEIDI DOLDER. Chronic Intake of Green Propolis Negatively Affecting the Rat Testis. *MedKnow Ed., Pharmacogn. Res.*, 2017; ISSN 0976-4836.

SHAEIB, F.; KHAN, S.N.; THAKUR, M.; KOHAN-GHADR, H-R.; DREWLO, S.; SAED. G.M.; PENNATHUR, S.; ABU-SOUD, H.M. The Impact of Myeloperoxidase

and Activated Macrophages on Metaphase II Mouse Oocyte Quality. 2016. *Journal Plos One*. 11(3). p. 1-20.

POINTIS, G; GILLERON, J; CARETTE, D; SEGRETAİN, D. Physiological and physiopathological aspects of connexins and communicating gap junctions in spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2010; 365:1607–20. [PMC free article]

ROSCOE, W.A.; BARR, K.J.; MHAWI, A.A.; POMERANTZ, D.K.; KIDDER, G.M. Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin 43. *Biol Reprod*. 2001; 65:829–38.

STARK, R.; GIBB, R. Chapter 14 - Hormones and Development. *The neurobiology of brain and behavioral development*. Elsevier Editors (2018), pp. 391-412, 10.1016/ ISBN 978-0-12-804036-2.00014-5.

SVINGEN, T., KOOPMAN, P. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes Dev.*, 27 (2013), pp. 2409-2426, 10.1101/gad.228080.113

UEDA, T. et al. The effects of Brazilian green propolis that contains flavonols against mutant copper-zinc superoxide dismutase-mediated toxicity. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 2882, 2017.

WARD, I.L.. Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. *Science*, 175 (4017) (1972), pp. 82-84, 10.1126/science.175.4017.82

WARD, I.L., WEISZ, J. Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone, and testosterone in male and female rat fetuses and their mothers. *Endocrinology*, 114 (5) (1984), pp. 1635-1644, 10.1210/endo-114-5-1635

WINTERHAGER, E.; PIELENSTICKER, N.; FREYER, J. et al. Replacement of connexin 43 by connexin 26 in transgenic mice leads to dysfunctional reproductive organs and slowed ventricular conduction in the heart. *BMC Dev Biol*. 2007;7:26. [PMC free article] [PubMed]

ZHANG, C.; SHEN, X.; CHEN, J.; JIANG, X.; HU, F. Identification of Free Radical Scavengers from Brazilian Green Propolis Using Off-Line HPLC-DPPH Assay and LC-MS. *J Food Sci*. 2017. 82(7):1602-1607. doi: 10.1111/1750-3841.13730.

g. Dados adicionais

Título: A própolis pode melhorar os danos induzidos nos testículos pela ametrina?

h. Resultados

h.a Morfometria, Biometria e Estereologia

A Tabela 1 apresenta os resultados do GSI, diâmetro de túbulo seminífero, altura do epitélio germinativo, proporção dos componentes dos túbulos seminíferos, quantificação de componentes de Células de Leydig, diâmetro do núcleo da célula de Leydig e da quantificação dos níveis séricos de testosterona.

Tabela 1

Morfometria e Estereologia Testicular e Quantificação de Testosterona - (média±SD)

Parâmetros [1:6]	Grupos experimentais				Valor de P
	Co	P	A	P+A	
GSI	0,306±0,036	0,329±0,0374	0,288±0,036 ^{*2}	0,34±0,0368 ^{*3}	0,0075
Diâm. Túbulo Semin.	303,1±24,7	327,5±60,74 ^{*1}	300,8±32,69 ^{*2}	292,1±22,46 ^{*1,*2}	P<0.0001
Altura Ep. Túbulo Semin.	116,3±15,58	117,1±14,81	117,8±17,09	109,0±11,32 ^{*1,*2,*3}	P<0.0001
Proporção testículo (%)					
Túbulo Semin.	73,2±3,161	71±4,257	71,7±2,988	68,90±3,938 ^{*1}	0,0388
Lúmen	8,6±1,247	10±1,997	9,5±1,911	9,093±0,859	0,1412
Interstício	18,2±4,134	18±2,599	18,8±3,239	22,09±4,352	0,0527
Cel. de Leydig					
Diâm. Núcleo (µm)	6,68±0,98	6,81±0,83	6,71±0,699	6,63±0,498	0,9488
Proporção (%)					
Núcleo	26,98±2,287	27,13±2,66	28,05±1,482	24,93±1,323 ^{*2,*3}	0,004
Citoplasma	73,02±2,287	72,87±2,66	71,95±1,482	75,07±1,323 ^{*2,*3}	0,004
Testosterona	552,5±138,1	222±53,35 ^{*1}	285,8±40,79 ^{*1}	157,3±42,83 ^{*1,*3}	0,0017

Co – Controle; P – Própolis; A – Ametrina; P+A - Própolis+Ametrina - Diferença significativa em relação ao grupo controle (*1); Diferença significativa em relação ao grupo própolis (*2); Diferença significativa em relação ao grupo ametrina (*3) - One-way ANOVA com pós teste em Tukey – dados paramétricos.

O GSI do grupo A reduziu significativamente em relação ao grupo P, e o GSI do grupo P+A aumentou significativamente em relação ao grupo A.

O diâmetro dos túbulos mostrou diminuição significativa no grupo P+A comparado ao grupo C e nos grupos A e P+A comparados ao grupo tratado com P. No

grupo tratado com P ocorreu aumento significativo no diâmetro tubular quando comparado com o grupo C.

A altura do epitélio germinativo diminuiu significativamente no grupo tratado com P+A em relação a todos os outros grupos.

Na quantificação das proporções de componentes testiculares ocorreu diminuição significativa da proporção de epitélio germinativo no grupo P+A quando comparado ao C.

Com relação às células de Leydig, houve diminuição significativa na proporção de núcleo e um aumento significativo na proporção de citoplasma quando comparado o grupo P+A com os grupos P e A.

Os níveis séricos de testosterona mostraram redução significativa nos três grupos estudados em relação ao grupo C e do grupo P+A em relação A.

h.b Morfometria e estereologia.

Na figura 1 são apresentadas as secções histológicas coradas com HE e observadas na microscopia de luz. O parênquima testicular é composto por túbulos seminíferos, cujo lúmen é revestido pelo epitélio germinativo; e pelo interstício onde são encontrados vasos sanguíneos e linfáticos, células de Leydig e macrófagos, incluídos no tecido conjuntivo.

No grupo P podemos observar que em muitos túbulos aparecem as espermátides, com aspecto circular (EG – imagem GP1 e GP2), próximo a região do Lúmen, dando-nos evidências que há um atraso na espermiogênese. Observamos também, que nessas regiões, nas margens epiteliais na região do Lúmen, há formação de grumos, possivelmente devido ao acúmulo de citoplasma celular e a incapacidade das células de Sertoli em remover este material. O tamanho do Lúmen, parece aumentado, comparando com o grupo C, embora não tenha sido observado aumento significativo pelas análises estereológicas.

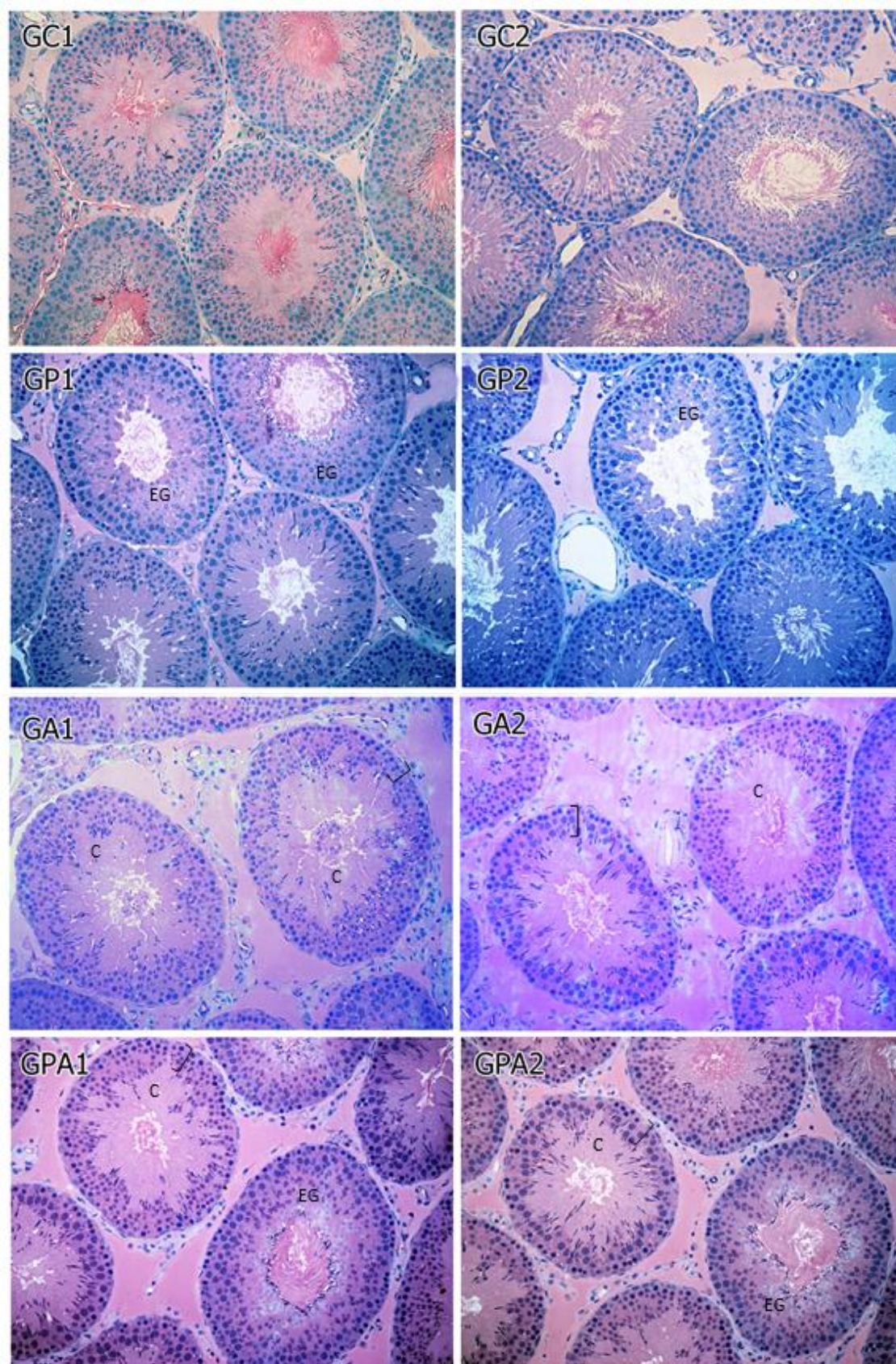


Figura 1 - Imagens de Túbulos Seminíferos de testículos de ratos Wistar. Grupos: GC- Testículo Controle; GP- Testículo Tratado com Própolis; GA- Testículo Tratado com Amdin; GPA- Testículo Tratado com P+A. Siglas: (EG) epitélio germinativo; (C) camada citoplasmática; (Chaves) camada de células do epitélio. Coloração HE. Aumento de 200x.

Já no grupo tratado com A (GA1 e GA2), a parede do epitélio germinativo está com uma menor quantidade de células (como mostra nas chaves) e a camada mais próxima ao Lúmen com um aumento citoplasmático (C). Esse aspecto nos sugere que está havendo um possível acúmulo citoplasmático das espermatídes devido a atrasos na espermiogênese e consequentemente uma diminuição no número de espermatozoides. Na região do Lúmen, observamos que ele diminuiu em relação ao grupo P, mas esse resultado não está estatisticamente comprovado. Na região intersticial observamos aumento da quantidade de matriz extracelular, quando comparamos com os grupos C e tratado com P.

Já no grupo tratado com P mais A (GPA1 e GPA2), observamos características morfológicas muito parecidas com as dos grupos tratados com P e com A. Aparece um epitélio germinativo mais delgado (chaves) e citoplasma amplo na região do Lúmen (C). Apenas uma diferença foi observada na região do interstício, que é uma menor quantidade de matriz extracelular quando comparamos com o grupo tratado com A e maior quantidade quando comparado com o grupo C.

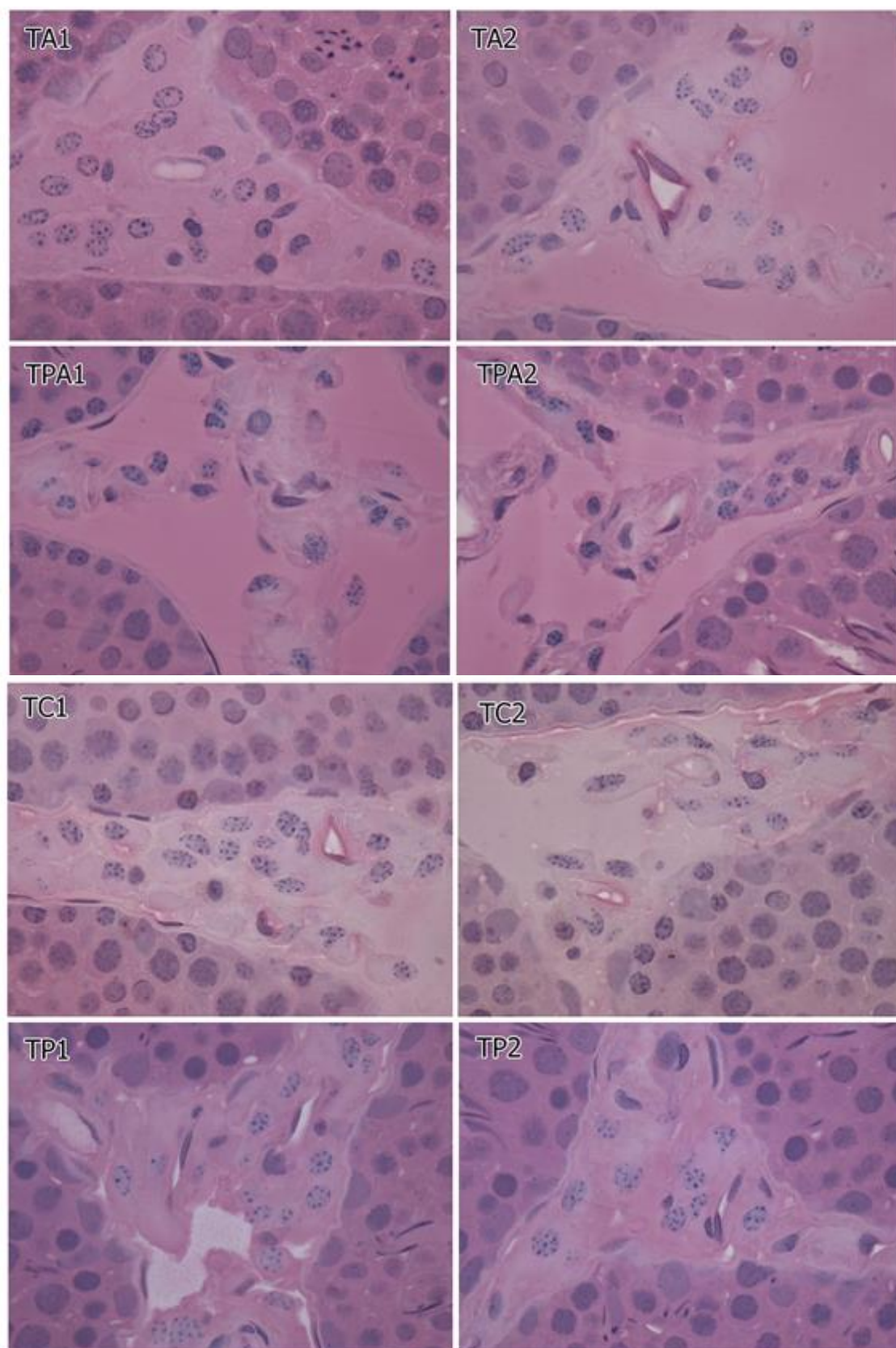


Figura 2 - Imagens dos Interstícios de testículos de ratos Wistar. Grupos TC- Testículo Controle; TP- Testículo Própolis; TA- Testículo Ametrina; TPA- Testículo P+A. Coloração HE. Aumento de 1000x.

h.c Microscopia Eletrônica de Transmissão.

No Grupo C (figura 3), observamos muitos espermatozoides na região do Lúmen e próximo as espermatídes (3 d, e, f). A barreira testicular é muito marcada (3 a, b, c). As células de Leydig apresentam Complexo de Golgi bem definido, muitas vesículas de secreção, grandes quantidades de REL, citoplasma abundante (3 g, h, i). E no interstício, algumas vesículas de lipídio (3 g).

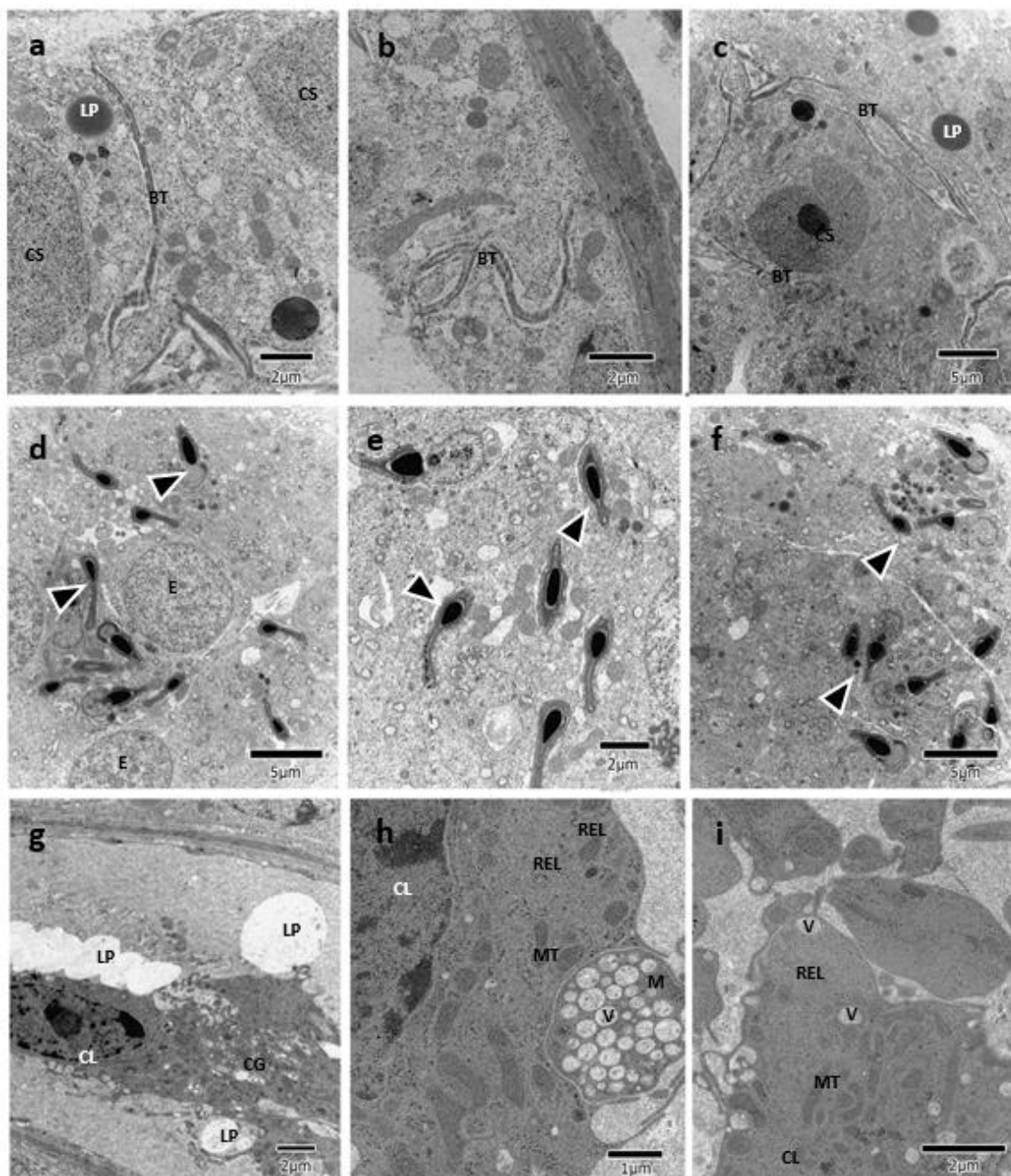


Figura 3. Ultraestrutura de testículo de ratos Wistar - Grupo Controle - Imagens a, b, c, d, e, f, g, h & i — Siglas: (CG) Complexo de Golgi; (CL) Célula de Leydig; (CS) Célula de Sertoli; (E) Espermatócito; (cabeça de setas) Espermátides; (BT) Barreira Testicular; (MT) Mitocôndrias; (REL) Retículo Endoplasmático Liso; (V) Vesícula; (M) Macrófago; (E) Espermatócito; (LP) Lipídio.

Nos animais que receberam própolis (fig. 4) é possível observar a barreira testicular interrompida e/ou fragmentada, citoplasma fibroso e poucas mitocôndrias (4 m). Espermátócitos bastante espaçados provavelmente devido a fragmentação dos prolongamentos das células de Sertoli e mitocôndrias alteradas (4 k, l). Quando comparado com as pranchas de luz, vemos uma região próxima luminal, com muitos espermátócitos e espermátides com núcleos redondos e aumento do citoplasma e restos citoplasmáticos.

Pode também ser observada fragmentação das células da borda do lúmen e descontinuidade dessas células (4 n, o, p) e espermátócitos com muitas vesículas. Nas imagens de luz, observamos uma margem luminal com grumos, possivelmente, devido a esse acúmulo de espermátócitos. No interstício, observou maior quantidade de células de Leydig com o citoplasma mais denso, o REL e CG menos desenvolvidos e uma reduzida quantidade de vesícula de secreção (4 q, r, s) quando comparado com o grupo C.

Nos animais expostos à ametrina (fig. 5) observamos espermatozoides e espermátides com muito citoplasma na região da cauda e cabeça (5d1, e1, f1). Os espermátócitos mostram várias alterações: vesículas na região luminal do túbulo seminífero, degradação celular, e muitos restos celulares, possivelmente, devido a degradação celular de espermátócitos, além de desenvolvimento atrasado.

No epitélio germinativo observa-se poucas regiões com a barreira testicular e a presença de muitos espaços entre os espermátócitos (5a1, b1, c1).

Já nas imagens das Células de Leydig (5-g1, h1 & i1) há uma reduzida quantidade de citoplasma. As mitocôndrias aparecem pequenas e em número reduzido. O citoplasma aparece denso e com reduzida quantidade de REL, poucas vesículas e ausência do Complexo de Golgi.

No tratamento P+A, as imagens mostram o epitélio germinativo com a barreira testicular alterada, desestruturada e descontínua (6k1, l1, m1), bem parecido com os resultados obtidos com o grupo tratado com P.

Poucos espermátides aparecem com excesso de citoplasma (6n1, o1). São entremeados por restos celulares e muitas espermátides. Devido à desorganização do epitélio, não foi possível identificar o limite luminal.

Já as Células de Leydig apresentam citoplasma denso, com mitocôndrias pequenas e em número reduzido. Poucos CG e vesículas de secreção foram encontrados, e sim um bom número de vesículas de conteúdo variado que poderiam ser lisossomos (6q1, r1, s1). Resultado muito próximo ao grupo tratado com A.

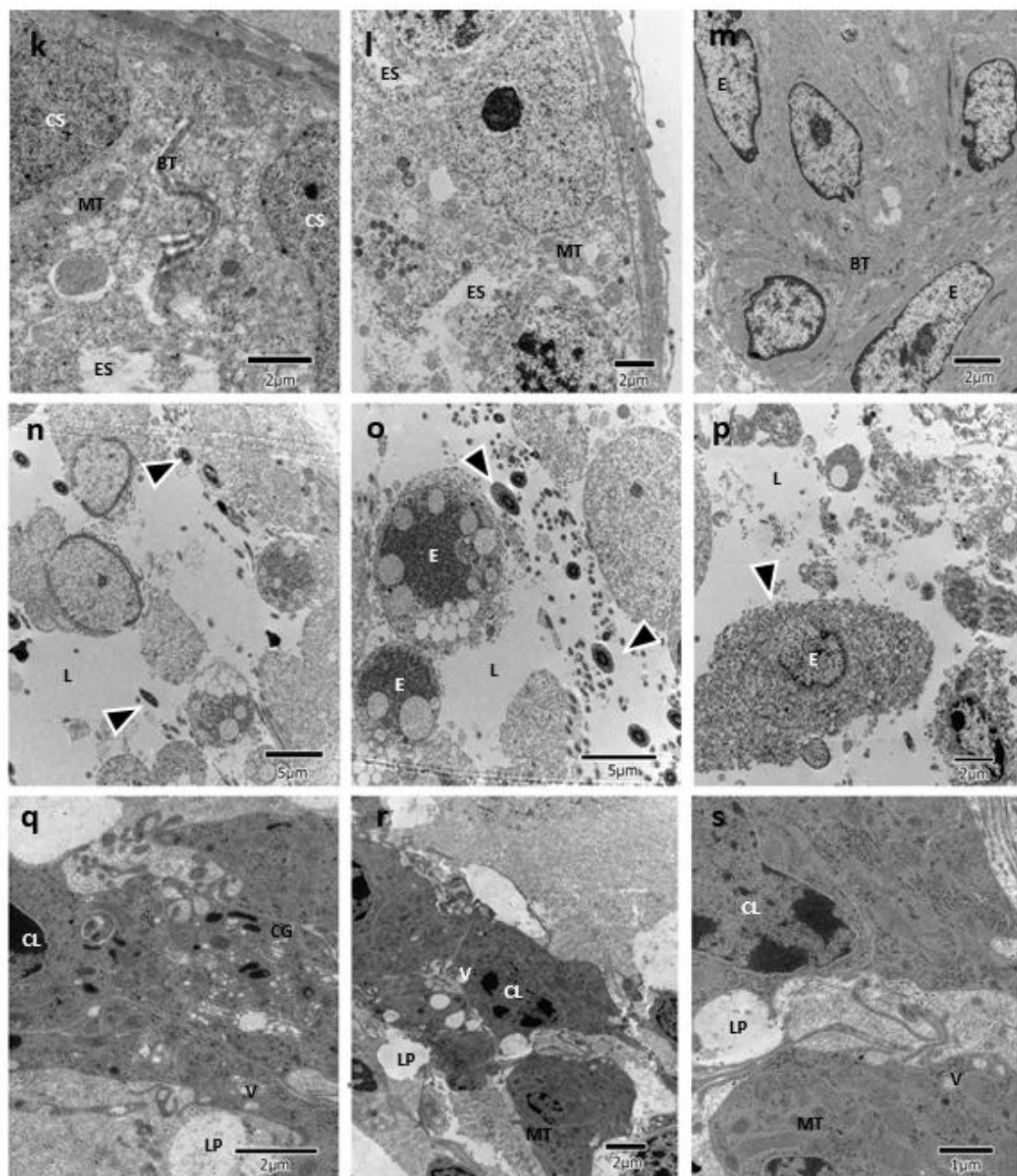


Figura 4. Ultraestrutura de testículo de ratos Wistar - Grupo Tratado com Própolis - Imagens k, l, m, n, o, p, q, r & s – Siglas: (CG) Complexo de Golgi; (CL) Célula de Leydig; (CS) Célula de Sertoli; (L) Lúmen; (cabeça de setas) Espermatozoides; (BT) Barreira Testicular; (E) espermatócito; (ES) Espaços; (V) Vesícula; (MT) Mitocôndria.

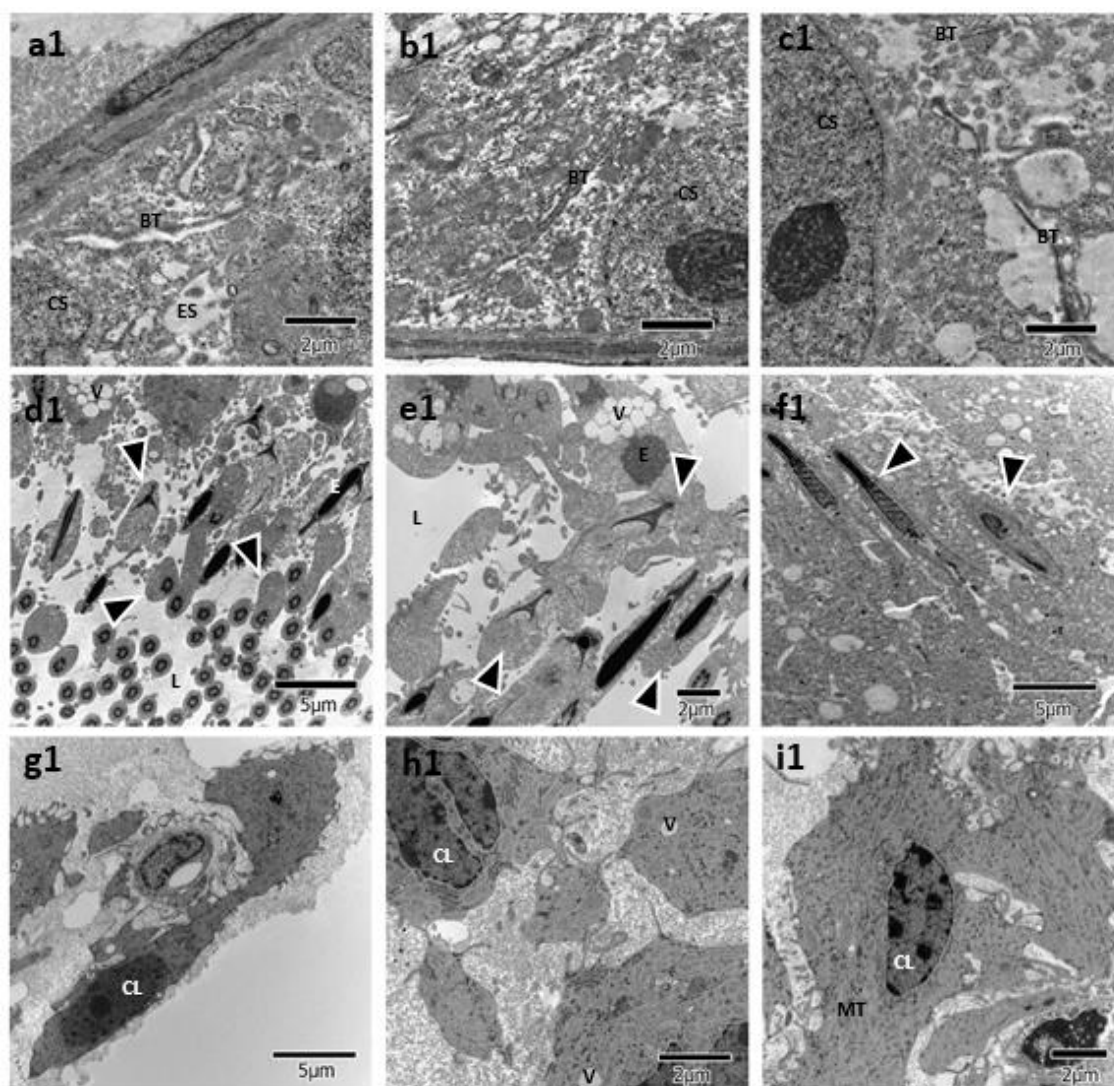


Figura 5. Ultraestrutura de testículo de ratos Wistar - Grupo Tratado com Atrina - Imagens a1, b1, c1, d1, e1, f1, g1, h1 & i1 – Siglas: (CG) Complexo de Golgi; (CL) Célula de Leydig; (CS) Célula de Sertoli; (L) Lúmen; (cabeça de setas) Espermatozoides; (BT) Barreira Testicular; (E) espermatócito; (ES) Espaços; (V) Vesícula; (MT) Mitocôndria.

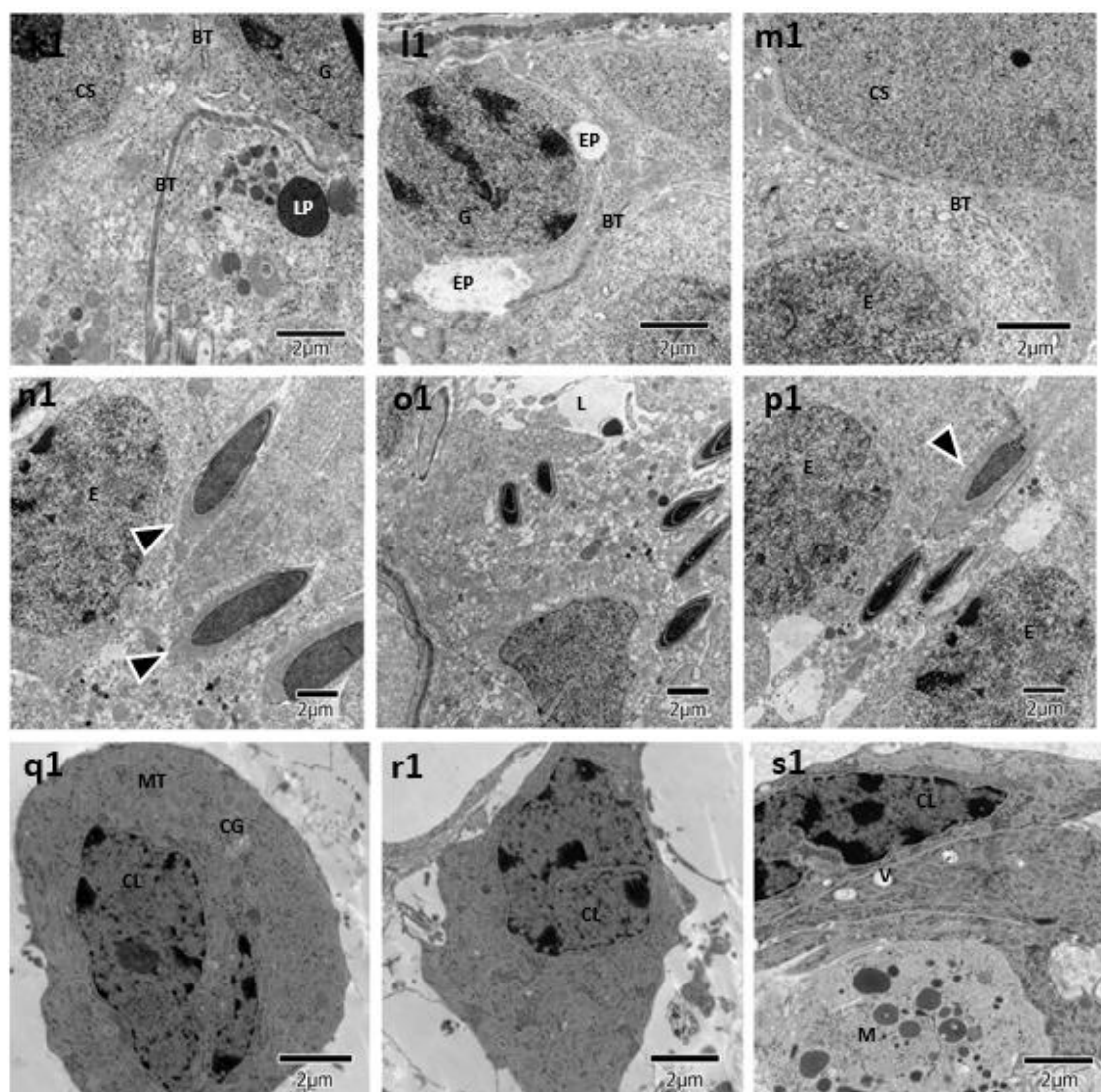


Figura 6. Ultraestrutura de testículo de ratos Wistar — Grupo Tratado com P+A - Imagens k1, l1, m1, n1, o1, p1, q1, r1 & s1 – Siglas: (CG) Complexo de Golgi; (CL) Célula de Leydig; (CS) Célula de Sertoli; (L) Lúmen; (cabeça de setas) Espermatozoides; (BT) Barreira Testicular; (E) espermatócito; (ES) Espaços; (V) Vesícula; (MT) Mitocôndria; (G) Espermatogônia; (M) Macrófago.

h.d Contagem espermática

Nos resultados mostrados na tabela 2, com as contagens dos espermatozoides tivemos vários resultados significativos. Na análise do número de espermatozoides por testículo observamos uma diminuição significativa do grupo tratado com A em relação ao grupo C e o grupo P. Em relação ao grupo P+A, observamos uma diminuição significativa em relação aos grupos C e P, mas um aumento significativo em relação ao grupo A.

Na análise de número de espermatozoides por grama de testículo e na produção diária de espermatozoides, tanto o grupo tratado com A como o grupo tratado com P+A, também observamos uma diminuição significativa em relação aos grupos C e exposto com P. Mas observamos um aumento significativo da produção diária de espermatozoide do grupo exposto com P+A, quando comparamos com o grupo tratado com A.

Isso nos mostra que a própolis juntamente com a ametrina, ameniza em uma pequena porcentagem, o efeito deletério da ametrina na produção de espermatozoides, mostrando que a própolis alterou o efeito danoso da ametrina. Todos os resultados foram paramétricos, comparados estatisticamente por teste T, com grau de significância de 5%.

Tabela 2

Contagem espermática em testículos de ratos Wistar expostos à própolis e à ametrina (média±SD)

Parâmetros [Nº Ex]	Grupos experimentais				Valor de P
	Co	P	A	P+A	
Nº Esperm/Test [1:6]	223,3±34,31	201,9±15,09	154,7±15,52 ^{*1,*2}	179,1±16,94 ^{*1}	P<0.0001
Nº Esperm/g de Test [1:6]	148,3 ± 21,11	133,8 ± 7,399	119,9 ± 7,366 ^{*1}	121,2 ± 4,658 ^{*1}	0,0001
Prod. Diária Esperm.[1:6]	36,60±5,624	33,10±2,475	25,36±2,544 ^{*1,*2}	29,35±2,778 ^{*1}	P<0.0001

Co – Controle; P – Própolis; A – Ametrina; P+A - Própolis+Ametrina - Diferença significativa em relação ao grupo controle (*1); Diferença significativa em relação ao grupo própolis (*2) - One-way ANOVA com pós teste em Tukey – dados paramétricos.

h.e Quantificação do Estresse Oxidativo no Testículo

A Tabela 3 apresenta os resultados da avaliação da atividade das enzimas Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD) e da Glutathione-S-transferase (GST); determinação da peroxidação lipídica (TBARs) e determinação dos níveis de Glutathione Reduzida (GSH), nos grupos estudados.

Tabela 3

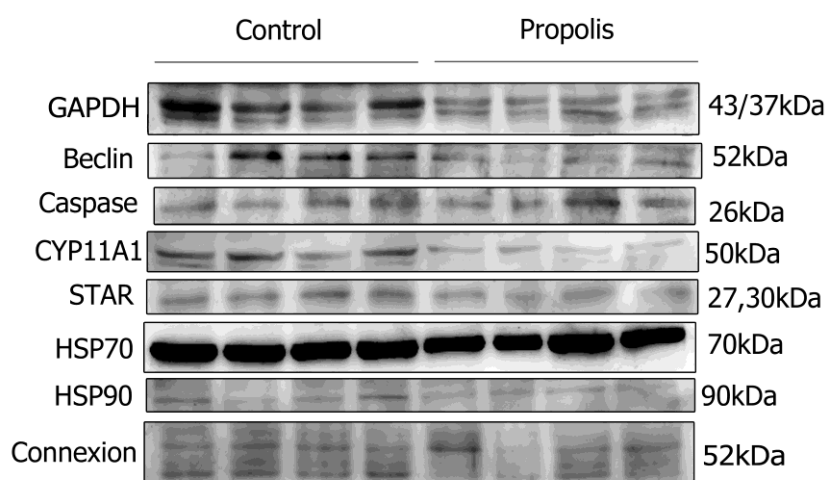
Quantificação do Estresse Oxidativo do Testículo de ratos Wistar tratados com Própolis e/ou Ametrina (média±SD)

Parâmetros [1:6]	Grupos experimentais				Valor de P
	Co	P	A	P+A	
CAT (Abs 240nm/min)	6,875±0,875	6,739±1,166	7,743±0,63 ^{*1,*2}	7,436±0,63	0,0274
SOD (Abs 440nm/min.)	0,6358±0,033	0,6048±0,0811	0,6427±0,082	0,6637±0,04522	0,0107
TBARs (mol/Lx10 ⁻³)	204±25,72	212,8±46,21	238,9±29,69	256,2±45,04 ^{*1}	0,2351
GST (Abs340nm/min.)	0,1262±0,016	0,1182±0,015	0,109±0,01633 ^{*1}	0,1115±0,0239	0,2024
GSH (mmol/L)	0,0044±0,00134	0,0043±0,0022	0,003±0,0013	0,068±0,017 ^{*1,*2,*3}	P<0.0001

Co – Controle; P – Própolis; A – Ametrina; P+A – Própolis+Ametrina - Diferença significativa em relação ao grupo controle (*1); Diferença significativa em relação ao grupo própolis (*2) - One-way ANOVA com pós teste em Tukey – dados paramétricos.

h.f. Quantificação por Immunoblotting

Nas análises de Immunoblotting, observamos aumento significativo na expressão da proteína envolvida em autofagia (Beclin) no grupo P+A e redução significativa na expressão de caspase-3, marcadora de morte celular, nos três grupos estudados (Figure 7). Na figura 8 também observamos redução significativa na expressão da proteína CYP11A1 no grupo que recebeu A. A figura 10 mostra que a expressão da conexina 43 aumentou significativamente nos animais que receberam P; ficou muito próxima do grupo C nos animais que receberam A e aumentou significativamente naqueles que receberam P+A. Não houve alteração significativa na expressão das HSPs e da proteína StAR (figuras 9 e 8).



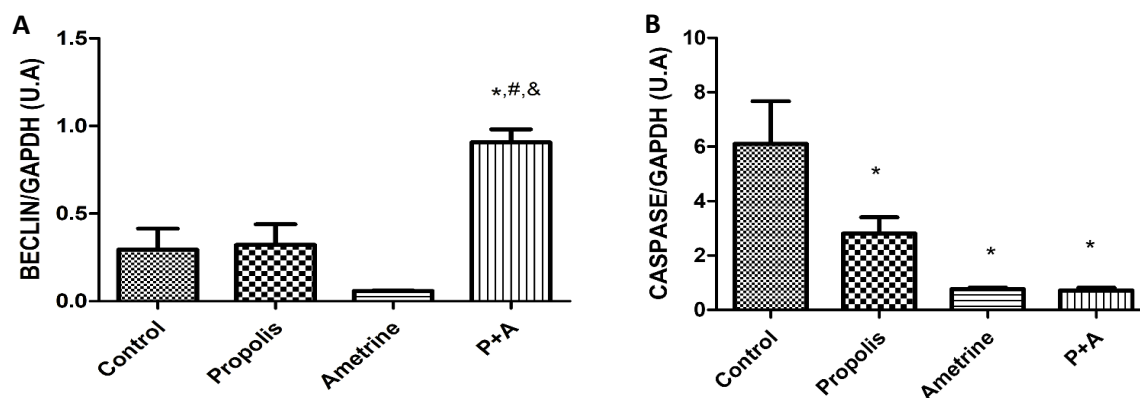


Figure 7. Os gráficos representam a leitura densitométrica ($n = 4$) do Immunoblotting utilizando os marcadores de morte celular: anticorpo Anti-Beclin 1 e anticorpo Anti-Caspase-3 em testículos de ratos Wistar tratados com Própolis e Ametrina e normalizado pelo Immunoblotting realizado com GAPDH. * resultado significativo em relação ao grupo controle; # resultado significativo em relação ao grupo própolis; & resultado significativo em relação ao grupo ametrina. A ($p < 0,0001$) e B ($p = 0,0002$).

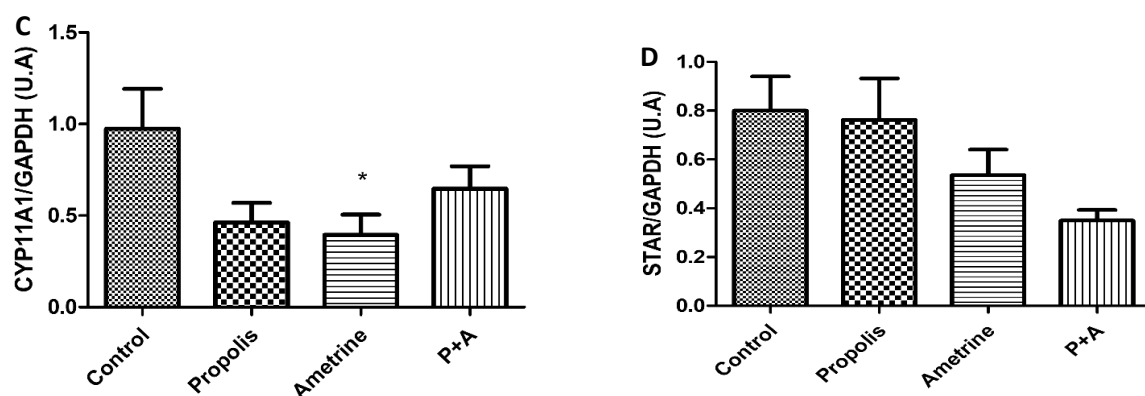


Figura 8. Os gráficos apresentam a leitura densitométrica ($n=4$) do Immunoblotting realizado com marcadores de esteroidogênese testicular, CYP11A1 e Anti-StAR antibody em testículos de ratos Wistar tratados com Própolis e Ametrina e normalizado pelo Immunoblotting realizado com GAPDH. * resultado significativo em relação ao grupo controle. C ($p=0,0377$).

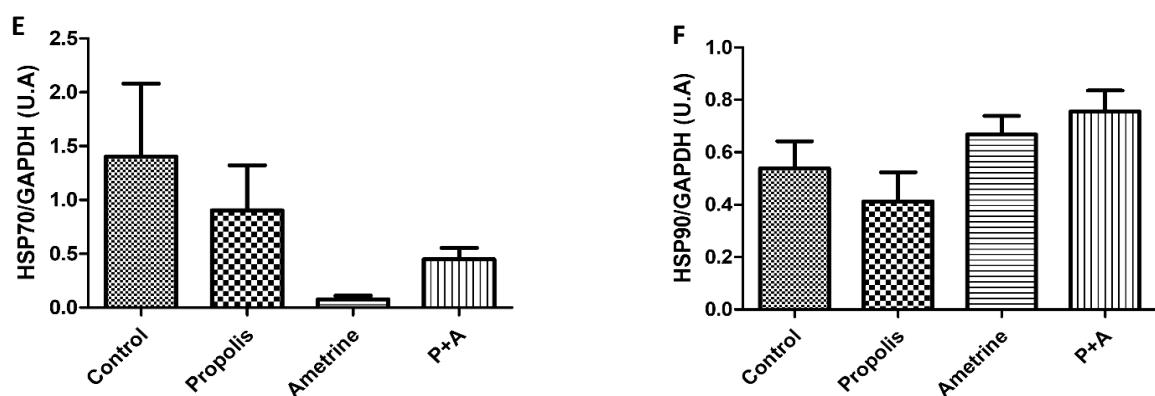


Figura 9. Os gráficos apresentam a leitura densitométrica ($n=4$) do Immunoblotting realizado nos níveis das heat shock proteins, Anti-Hsp70 antibody e Anti-Hsp90 antibody em testículos de ratos Wistar tratados com Própolis e Ametrina e normalizado pelo Immunoblotting realizado com GAPDH.

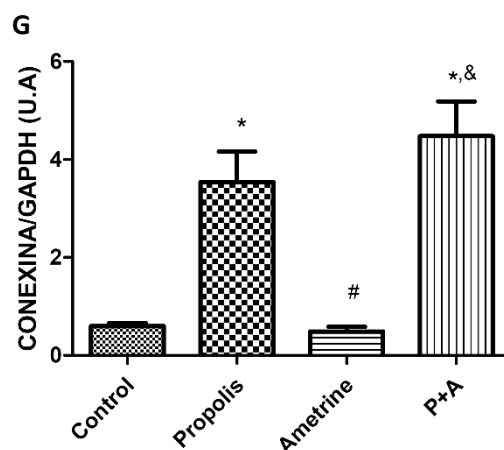


Figura 10. O gráfico apresenta a leitura densitométrica (n=4) do Immunoblotting realizado nos níveis das cellular communication proteins, a Connexina em testículos de ratos Wistar tratados com Própolis e Ametrina e normalizado pelo Immunoblotting realizado com GAPDH. * resultado significativo em relação ao grupo controle; # resultado significativo em relação ao grupo própolis; & resultado significativo em relação ao grupo ametrina. G ($p < 0.0001$).

h.g. Quantificação dos componentes da Própolis

Tabela 4 - Compostos identificados no extrato aquoso de própolis verde obtidos por UHPLC-MS.

Composto Sugerido	m/z	Tempos de retenção (min)	[] µg/ml
ac. 3-prenil-4-(2-metilpropioniloxi) cinâmico	301	7	1,02
dihidrocanferida	301	5,66	3,68
pinobanksina	271	5,77	1,35
canferida	299	7,3	1,68
ac p cumarico	163	3,77	0,14
artepillin C	299	8,4	1,31

m/z – massa do composto; [] µg/ml – concentração em microgramas por mililitros dos compostos sugeridos na tabela.

i. Discussão

Resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram dois eventos importantes. Primeiro, que a própolis é capaz de alterar parâmetros reprodutivos de ratos adultos (Capucho et al, 2012; Severi-Aguiar, et al., 2017) e, segundo que a ametrina, um agroquímico bastante utilizado nas lavouras de cana-de-açúcar no Brasil, também afeta os mesmos marcadores biológicos, de maneira negativa (Dantas et al., 2015).

Todavia, como a própolis tem sido associada a diferentes propriedades terapêuticas (Soliman et al., 2012, Mbongue et al., 2011, Capucho et al., 2012, Yousef e Salama, 2009) levantamos a suposição de que ela pudesse minimizar os danos celulares causados pela ametrina no testículo de ratos adultos. Porém, nossa hipótese inicial não foi corroborada pelos resultados obtidos nesse estudo. Com exceção do IGS que mostrou uma recuperação significativa.

A começar pela análise das imagens obtidas, tanto de microscopia de luz como eletrônica, foi possível verificar que as alterações celulares e teciduais observadas são muito semelhantes entre os grupos P+A e A. A barreira testicular mostrou-se danificada e os espermatócitos apresentaram alterações estruturais.

Sabe-se que as células de Sertoli do epitélio seminífero apresentam diferentes junções de adesão compostas de actina, chamadas de especializações ectoplasmáticas apicais (EA) e basais (EB) (Anahara et al., 2008). As primeiras fazem a adesão célula-célula, ou seja, da membrana dessas células às membranas das células da linhagem germinativa e, a segunda, célula-matriz, mantendo a célula de Sertoli aderida aos componentes da lâmina própria do túbulo seminífero, permitindo a integridade da BHT (barreira hemato-testicular). Entende-se que as EA constituem um dos sítios mais sensíveis no epitélio dos túbulos seminíferos à exposição de compostos exógenos. Isso decorre do fato de a presença de actina desempenhar importante papel no desenvolvimento dos espermatozoides, por manter as células da linhagem germinativa associadas à célula de Sertoli que lhes provê nutrientes e hormônios permitindo, assim, a diferenciação das células da linhagem germinativa. Há evidências de que quando ocorre desequilíbrios tanto de estrógeno como de testosterona nos testículos também podem causar mudanças na dinâmica das EA (Anahara et al., 2008).

De acordo com Ilani et al. (2012), a testosterona promove a integridade da barreira sangue-testículo *in vivo e in vitro*, aprimorando a reciclagem de proteínas internalizadas na superfície celular e realocando essas proteínas para remontar e vedar a barreira. Em ratos, a privação testicular de andrógeno induzida por implantes de testosterona e estradiol resulta em perda de células germinativas, mas a integridade da barreira sangue-testículo é mantida por um aumento nas proteínas da junção estanque.

Em nossas análises, a quantidade de testosterona diminuiu significativamente nos três grupos estudados. No grupo P+A essa redução foi mais acentuada, inclusive inferior ao

grupo A. É provável que a redução nos níveis de testosterona resulte de um sinergismo entre esses dois compostos. De qualquer maneira, como resultado ocorreu significativa redução na PDE nos grupos A e P+A. No grupo P, embora tenha ocorrido redução na PDE, ela não foi significativa. Juntos, esses resultados sugerem que esses compostos, tanto a própolis como a ametrina, afetam a esteroidogênese e consequentemente a reprodução dos animais.

Como demonstrado, devido à desintegração da barreira das células de Sertoli, muitos espermátócitos se soltaram da membrana da mesma, tendo seu desenvolvimento afetado de modo a permitir a presença de células próximas a região luminal ou a formação de espermatozoides com acúmulo de material, caracterizando eventos alterados durante a espermatogênese e espermiogênese.

Além disso, no grupo P+A as células de Leydig sofreram hipotrofia dos núcleos e hipertrofia do citoplasma, embora seu volume total tenha se mantido. Todavia, a quantidade de retículo endoplasmático liso (REL) e mitocôndrias mostrou-se diminuída na análise ultraestrutural, além de presença de vesículas de conteúdo variado e aparência vazia, sugerindo que poderiam ser lisossomos.

Essas observações podem ser um indicativo de que elas estão realizando autofagia, processo intracelular responsável pela entrega das macromoléculas da própria célula, aos lisossomos (ou vacúolos) para degradação e reciclagem (Iyyathurai et al., 2016). De fato, no grupo P+A houve aumento significativo do marcador de autofagia Beclin-1, mostrando que esse processo de fato foi ativado após a exposição concomitante da própolis e da ametrina. Nesse grupo ocorreu também, assim como nos grupos P e A separadamente, a redução significativa do marcador de apoptose (capase-9), demonstrando que as células não ativaram eventos de morte celular por essa via.

Numa revisão realizada por Iyyathurai et al. (2016), os autores descrevem brilhantemente que autofagia e conexinas estão interrelacionadas. Todavia, eles discutem que a autofagia emerge como uma importante via de degradação de conexina, não somente em condições basais e normais de crescimento, mas também em condições de provação de nutrientes e de doenças. No nosso estudo, nós encontramos aumento significativo na expressão de conexina-43 no grupo P+A, que também evidenciou aumento na expressão de Beclin-1, ou seja, de autofagia, o que iria na contramão da discussão dos autores citados.

Com relação aos marcadores de estresse oxidativo, foi observado que a exposição casada da ametrina e da própolis reverteu o aumento significativo de CAT e a redução significativa de GST induzida pela ametrina, porém, acabou por induzir aumento significativo nos níveis de TBARs e GSH. A peroxidação lipídica provocada pode responder pelos danos nas membranas das células de Sertoli, como também, nas mitocôndrias e nas cisternas do RE, respondendo pelos efeitos observados.

Em conclusão, pode-se inferir que tanto a ametrina quanto a própolis alteraram a fisiologia testicular reduzindo a PDE e os níveis de testosterona séricos. Quando usadas juntas, o efeito foi mais grave pois houve redução do nível de testosterona e indução de peroxidação lipídica, evidenciando que a própolis não teve um efeito protetor ao dano causado ao tecido testicular pelo agroquímico.

j. Referências Bibliográficas resultados complementares

ANAHARA R., TOYAMA Y., MORI C. Review of the histological effects of the anti-androgen, flutamide, on mouse testis. **Reproductive Toxicology**, v. 25, p.139-143. 2008.

CAPUCHO, C.; SETTE, R.; PREDES, F.S.; MONTEIRO, J.C.; PIGOSO, A.A.; BARBIERI, R.; DOLDER, M.A.H.; SEVERI-AGUIAR, G.D.C., 2012. Green Brazilian propolis effects on sperm count and epididymal morphology and oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology* 50, p. 3956–3962.

DANTAS, T.A. et al. Leydig cell number and sperm production decrease induced by chronic ametryn exposure: a negative impact on animal reproductive health. *Environmental Science and Pollution Research* 2015; DOI 10.1007/s11356-014-4010-5.

ILANI et al, 2012 *Human Reproduction*, Vol.27, No.12 pp. 3403–3411, 2012

IYYATHURAI et al. *BMC Cell Biology* 2016, 17(Suppl 1):20

MBONGUE, G. Y. F., KAMTCHOUING, P., DIMO, T. 2011. Effects of the aqueous extract of dry seeds of *Aframomum melegueta* on some parameters of the reproductive function of mature male rats. *Andrologia* 44, 53–58.

SEVERI-AGUIAR GD, PINTO SJ, CAPUCHO C, OLIVEIRA CA, DIAMANTE MA, BARBIERI R, et al. Chronic intake of green propolis negatively affecting the rat testis. *Phcog Res* 2017; 9:27-33.

SOLIMAN G. A., DONIAAEL R., AWAAD A. S., ALQASOUMI S. I., YUSUFOGLU H. 2012. Effect of *Emex spinosa*, *Leptadenia pyrotechnica*, *Haloxylon salicornicum* and

Ochradenus baccatus extracts on the reproductive organs of adult male rats. Pharm. Biol. 50(1), 105-12.

YOUSEF M.I., SALAMA A.F., 2009. Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. Food Chem. Toxicol. 47, 1168–1175.

k. Conclusão geral

Os resultados obtidos no presente estudo mostram os efeitos da ingestão da própolis verde brasileira em três situações distintas. Em todas elas foram observadas alterações significativas nos parâmetros analisados demonstrando, portanto, que a própolis verde brasileira, quando ingerida na concentração de 6mg/kg/dia, pode afetar negativamente o desenvolvimento, a maturação e a homeostasia dos órgãos reprodutivos masculinos, interferindo na capacidade reprodutiva dos ratos na fase adulta.

Quando ingerida pelas fêmeas prenhas, a geração de ratos machos quando na fase adulta apresentaram aumento significativa no IGS, no diâmetro tubular e na altura do epitélio germinativo, além da presença de espaços entre as células germinativas, o que evidencia hipertrofia do parênquima testicular e desorganização da barreira hematotesticular. Além disso, houve aumento significativo na proporção de espaço intersticial, com aumento no número de macrófagos, na proporção das células de Leydig e de tecido conjuntivo. As células de Leydig apresentaram aumento no número de mitocôndrias e redução das cisternas do Complexo de Golgi. Foi observada perda de células de Leydig provavelmente induzidas por apoptose, devido aumento na expressão de caspase-3. Não houve alteração significativa no número de espermatozoides e na PDE, embora tenha havido redução significativas nas proteínas que participam da esteroidogênese (StAR e CYP11A1).

Quando ingerida por ratos depois do desmame até a fase adulta (90 dias) ocorreu aumento nos níveis de peroxidação lipídica e na atividade das enzimas antioxidantes, como a GST e CAT. Redução na expressão de proteínas localizadas na membrana mitocondrial das células de Leydig, que participam da esteroidogênese como StAR e CYP11A1, além de redução na expressão da proteína Beclin, de mitocôndrias, adensamento do espaço citoplasmático com aumento de REL, alterações essas associadas a alterações na síntese de esteroides. Ocorreu aumento do epitélio germinativo, promoveu a retenção e alterou a estrutura das células germinativas levando à redução da produção diária de espermatozoides e à formação de espermatozoides mal formados na região luminal.

E, finalmente, quando ingerida conjuntamente com um agroquímico sabidamente tóxico ao sistema reprodutor masculino, a ametrina, a própolis verde

brasileira agravou os danos causados pelo primeiro, induzindo peroxidação lipídica, redução dos níveis de testosterona e da PDE.

Uma outra observação bastante interessante desse estudo é que pudemos comparar a constituição fitoquímica de amostras de própolis verde brasileira derivadas de duas localidades diferentes, dos Estados de São Paulo e do Paraná, e verificar que os compostos encontrados são basicamente os mesmos, variando em concentrações como demonstrado por Sforcin (2007) e, que aquela proveniente do Paraná, apresentou diidrocanferida em sua composição, ausente na de São Paulo.

I. Bibliografia Geral

ANAHARA R., TOYAMA Y., MORI C. Review of the histological effects of the anti-androgen, flutamide, on mouse testis. *Reproductive Toxicology*, v. 25, p.139-143. 2008.

AEBI, H. in: BERGMEYER, H. V., 1974, *Methods in Enzymatic analysis*, New York: Academic press; vol.2, p. 674-684.

ALLAMEH, A., VANSOUN, E. Y., ZARGHI, A. Role of glutathione conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Mechanisms of Ageing and Development*, Vol. 95. Issues 1-2, April 1997, Pages 71-79, [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(97\)01862-9](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(97)01862-9).

AL-YAHYA AA, AL-MAJED AA, AL-BEKAIRI AM, AL-SHABANAH OA, QURESHI S. Studies on the reproductive, cytological and biochemical toxicity of Ginkgo biloba in Swiss albino mice. *J Ethnopharmacol* 2006; 107 (2): 222-8.

ARMSTRONG D, BROWNE R. The analysis of the free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv Exp Med Biol*. 1994; 366(43):58.

ARN, S. BURAWAT, J., YANNASITHINON, S. SUKHORUM, W., LIMPONGSA, A., IAMSAAARD, S. 2018. Phyllanthus emblica leaf extract ameliorates testicular damage in rats with chronic stress. *Biomed & Biotechnol*, 19(12):948-959.

AYAZ, A., AGARWAL, A., SHARMA, R., KOTHANDARAMAN, N., CAKAR, Z. SIKKA, S. Proteomic analysis of sperm proteins in infertile men with high levels of reactive oxygen species. 2018. *Andrologia*: e13015-25.

BENZIE, I.F, STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996 Jul 15;239(1):70-6.

BUCK LOUIS, G.M.; GRAY JR., L.E.; MARCUS, M.; OJEDA, S.R.; PESCOVITZ, O.H.; WITCHEL, S.F.; et al. Environmental factors and puberty timing: expert panel research needs. *Pediatrics*, 121 (Suppl. 3) (2008), pp. S192-S207

BUEGE J.A., AUST, S.D., 1978, Microsomal lipid peroxidation. *Methods and Enzymology*, v. 52, pp. 302-310.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem. Toxicol.*, Florida, v.36, n.4, p.347-363, 1998.

CAPUCHO, C.; SETTE, R.; PREDES, F.S.; MONTEIRO, J.C.; PIGOSO, A.A.; BARBIERI, R.; DOLDER, M.A.H.; SEVERI-AGUIAR, G.D.C., 2012. Green Brazilian propolis effects on sperm count and epididymal morphology and oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology* 50, p. 3956–3962.

CHANDRA AK, CHOUDHURY SR, De N, SARKAR M. Effect of green tea (*Camellia sinensis* L.) extract on morphological and functional changes in adult male gonads of albino rats. *Indian J Exp Biol* 2011; 49 (9): 689-97.

CHANDRA AK, GHOSH R, CHATTERJEE A, SARKAR A. Vanadium-induced testicular toxicity and its prevention by oral supplementation of zinc sulphate. *Toxicol Mech Methods* 2007; 17(4): 175-87.

CHEN J, AHN KC, GEE NA, AHMED MI, DULEBA AJ, ZHAOL., GEE SJ, HAMMOCK BD, LASLEY BL. Triclorocarban enhances testosterone action: a new type of endocrine disruptor? *Endocrinol* 2008; 149 (3): 1173-1179.

DADA, R, et al., 2012. Epigenetics and its role in male infertility. *J. Assist. Reprod Genet.* 29(3), 213-23.

DANTAS, T.A. et al. Leydig cell number and sperm production decrease induced by chronic ametryn exposure: a negative impact on animal reproductive health. *Environmental Science and Pollution Research* 2015; DOI 10.1007/s11356-014-4010-5.

DE FALCO M, SCIARRILLO R, CAPALDO A, RUSSO T, GAY F, VALIANTE S, VARANO L, LAFORGIA V. The effects of the fungicide methyl thiophanate on adrenal gland morphophysiology of the lizard, *Podarcis sicula*. *Arch Environ Contam Toxicol* 2007; 53 (2): 241-8.

DEVEQUI-NUNES, D.; MACHADO, B.A.S.; BARRETO, G.A.; SILVA, J.R.; SILVA, D.F.; ROCHA, J. L.C.; BRANDÃO, H. N.; BORGES, V.M.; UMSZA-GUEZ, M.A. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PLOS ONE* | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207676> December 4, 2018. p 1-20.

DEVASAGAYAM, T.P.; TILAK, J.C.; BOLOOR, K.K.; SANE, K.S.; GHASKADBI, S.S.; LELE, R.D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicians of India*, v.52, p.794-804, 2004.

ELLMAN, G. L., 1959, Tissue sulphydril groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 82, p. 70-77.

ELMAZOU DY, R.H., ATTIA, A.A., EL-SHENAWY, N.S., 2011. Protective role of propolis against reproductive toxicity of chlorpyrifos in male rats. *Pest.Biochem. Physiol.*, 175–181.

FRANÇA, L.R., 1991. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. 185f. Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D., 1998. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J.; MARTINEZ-GARCIA, R. (Eds.) *Male reproduction: A multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Livingstone, p.197-219.

FERRO, C. DE O.; CHAGAS, V. L. A.; OLIVEIRA, M. F. et al. Catalase activity in lung, kidney and small bowel non-ischemic in rats after intestinal reperfusion, *Rev. Col. Bras. Cir.* 2010; 37(1): 031-038.

GARRIDO, C., GURBUXANI, S., RAVAGNAN, L., KROEMER, G., 2001. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 286, 433-442.

GOLUB, M.S.; COLLMAN; G.W.; FOSTER, P.M.; KIMMEL, C.A.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; REITER, E.O.; SHARPE, R.M.; SKAKKEBAEK, N.E.; TOPPARI; J. 2008 Public health implications of altered puberty timing. *Pediatrics* 121(Suppl 3) S218–S230. (doi:10.1542/peds.2007-1813G)

GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J., DAVID, M.M., 1949, Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal Biological Chemistry*, v.177, n 2, p. 751-766.

GOYAL A, CHOPRA M, LWALEED BA, BIRCH B, COOPER AJ. The effects of dietary lycopene supplementation on human seminal plasma. *BJU Int.* 2007; 99 (6): 1456–1460.

HABIG, W.H, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974 Nov 25;249(22):7130-9.

HEJMEJ, A., KOPERA, I., KOTULA-BALAK, M., LYDKA, M., LENARTOWICZ, M., BILINSKA, B. 2012. Are expression and localization of tight and adherens junction proteins in testes of adult boar affected by foetal and neonatal exposure to flutamide? *Int. J. Androl* 35, 340-362.

HIMES JH. Examining the evidence for recent secular changes in the timing of puberty in US children in light of increases in the prevalence of obesity. *Mol Cell Endocrinol* 2006;25:254–5, 13–21.

ILANI et al, 2012 *Human Reproduction*, Vol.27, No.12 pp. 3403–3411, 2012

IVELL, R., HENG, K., NICHOLSON, H., ANAND-IVELL, R., 2013, Brief maternal exposure of rats to the xenobiotics dibutyl phthalate or diethylstilbestrol alters adult-type Leydig cell development in male offspring. *Asian Journal of Andrology* 15, 261–268.

IYYATHURAI et al. *BMC Cell Biology* 2016, 17(Suppl 1):20

JANERO D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 1990;9(6):515-40.

KILARKAJE N., Effects of combined treatment of α -tocopherol, l-ascorbic acid, selenium and zinc on bleomycin, etoposide and cisplatin-induced alterations in testosterone synthesis pathway in rats. 2014. *Cancer Chemother Pharmacol.* 4(6): 1175-89.

KUMAZAWA, S. HAMASAKA, T. NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry, Japão*, v. 84, n. 3, p. 329–339, 2004.

LEE, J.E.; JUNG, H.W.; LEE, Y.J.; LEE, Y.A. Early-life exposure to endocrine-disrupting chemicals and pubertal development in girls. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism.* 2019. <https://doi.org/10.6065/apem.2019.24.2.78>.

LI, W. R., CHEN, L, CHANG, Z. J., XIN, H., LIU, T., ZHANG, Y. Q., LI, G. Y., ZHOU, F., GONG, Y. Q., GAO Z. Z., XIN, Z. C. 2011. Autophagic deficiency is related to steroidogenic decline in aged rat Leydig cells. *Asian Journal of Andrology* 13, 881–888.

- LIU, X. X., SHEN, X. F., LIU, F. J. 2016. Screening targeted testis-specific genes for molecular assessment of aberrant sperm quality. *MOL. MED. REP.*, 14: 1594-1600.
- JEONG EUN LEE; HAE WOON JUNG; YUN JEONG LEE; YOUNG AH LEE. Early-life exposure to endocrine-disrupting chemicals and pubertal development in girls. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 2019;24:78-91.
- MACHADO, B.A.; SILVA, R.P.; BARRETO, G.D.E.A.; COSTA, S.S.; SILVA, D.F.; BRANDÃO, H.N.; et al. (2016) Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. *PLoS One*. 2016 Jan 8;11(1):e0145954. doi: 10.1371/journal.pone.0145954. eCollection 2016.
- MAGNUSSON, U., LJUNGVALL, K. 2013. Environmental pollutants and dysregulation of male puberty – A comparison among species. *Reproductive Toxicology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.002>.
- MARANGHI, F.; MANTOVANI, A.; Targeted toxicological testing to investigate the role of endocrine disrupters in puberty disorders. *Reprod Toxicol*, 33 (3) (2012), pp. 290-296
- MARQUELE, F.D.; DI MAMBRO, V.M.; GEORGETTI, S.R.; CASAGRANDE, R.; VALIM, Y.M.; Fonseca, M.J. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.39, n.3/4, p.455-462, 2005.
- MARSHALL, W.A.; TANNER, J.M. 1970. Variações no padrão de alterações puberais em meninos. *Arquivos de Doenças na Infância* 45:13-23. (doi: 10.1136 / adc.45.239.13).
- MARKLUND S, MARKLUND G., Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*. 1974 Sep 16;47(3):469-74.
- MBONGUE, G. Y. F., KAMTCHOUING, P., DIMO, T. 2011. Effects of the aqueous extract of dry seeds of *Aframomum melegueta* on some parameters of the reproductive function of mature male rats. *Andrologia* 44, 53–58.
- MCGARVEY, C., CATES, P.N. BROOKS, A. SWANSON, I.R. MILLIGAN, W. COEN, et al. 2001. Phytoestrogens and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity and pituitary luteinizing hormone release in the rat. *Endocrinology* 142:1202-1208.
- MEDIĆ-SARIĆ M, RASTIJA V, BOJIĆ M, MALES Z., From functional food to medicinal product: Systematic approach in analysis of polyphenolics from propolis and wine, *Nutrition Journal*, Croacia, v. 8, 2009, doi:10.1186/1475-2891-8-33.
- MEEKER, J. D., 2012. Exposure to Environmental Endocrine Disruptors and Child Development. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 166(6): E1–E7. doi:10.1001/archpediatrics.2012.241.
- MONTEIRO, J. C., PREDES, F., MATTA, S. L. P., DOLDER, H., 2008. Heteropterys aphrodisiaca infusion reduces the collateral effects of cyclosporine A on the testis. *The anatomical Record* 291, 809-817.

- MORENO, M.I.N.; ISLA, M.I.; SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M.A. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, v.71, p.109-114, 2000.
- MOSTAFALOU, S., ABDOLLAHI, M. 2013. Pesticides and Human Chronic Diseases; Evidences, Mechanisms, and Perspectives. *Toxicol Appl Pharmacol* 268(2), 157-177.
- MOURITSEN, A.; AKSGLAEDE, L.; SØRENSEN, K.; MOGENSEN, S.S.; LEFFERS, H.; MAIN, K.M.; et al. Hypothesis: exposure to endocrine-disrupting chemicals may interfere with timing of puberty. *Int J Androl*, 33 (2) (2010), pp. 346-359
- PARENT, A.S.; TEILMANN, G.; JUUL, A.; SKAKKEBAEK, N.E.; TOPPARI, J.; BOURGUIGNON, J.P. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr Ver* 2003;24(5):668–93
- PARK YK, ALENCAR SM, AGUIAR CL. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. *J Agric Food Chem*. 2002 Apr 24;50(9):2502-6.
- PEREIRA, A.D., DE ANDRADE, S.F., DE OLIVEIRA SWERTS, M.S., D MAISTRO, E.L. First in vivo evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. *Food Chem. Toxicol.*, Alfenas, v. 46, n. 7, p. 2580-2584, 2008.
- POGRMIC-MAJKIC, K., FA, S., DAKIC, V., KAISAREVIC, S., KOVACEVIC, R., 2010. Upregulation of Peripubertal Rat Leydig Cell Steroidogenesis Following 24 h In Vitro and In Vivo Exposure to Atrazine. *Toxicol. Sci.* 118(1), 52–60.
- PRATT, W., TOFT, D. O., 1997. Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones. *Endocrine Reviews* 18(3), 306-360.
- PREMALATHA, R., JUBENDRADASS, R., RANI, S. J. A., SRIKUMAR, K., MATHUR, P. P. 2013. A Phytooxysterol, 28-Homobrassinolide Modulates Rat Testicular Steroidogenesis in Normal and Diabetic Rats. *Reprod. Sci.* 20(5): 589-596.
- ROBB, G.W., AMANN, R.P., KILLIAN, G.J., 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J. Reprod.Fert.* 54, 103-107.
- RODRIGUES, C.R.F.; DIAS, J.H.; SEMEDO, J.G.; SILVA, J.; FERRAZ, A.B.F.; PICADA, J.N. Mutagenic and genotoxic effects of *Baccharis dracunculifolia* (D.C.). *J Ethnopharmacol* 2009; 124(2): 321-4.
- RIZK, S.M., ZAKI, H.Z., MINA, M.A.M., 2014. Propolis Attenuates Doxorubicin-Induced Testicular Toxicity in Rats, *Food and Chemical Toxicology* 67, 176–186.
- RUSSELL, L. D., ETTLIN, R. A., SINHA HILIN, A. P., CLEGG, E. D., 1990. Mammalian spermatogenesis. In: Russel L L. D, Griswold M. D, editors. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Clearwater: Cache River Press, p. 1-38.
- RUSSO, A.; TRONCOSO, N.; SANCHEZ, F.; GARBARINO, J.A.; VANELLA, A. Propolis protects human spermatozoa from DNA damage caused by benzo[a]pyrene and exogenous reactive oxygen species. *Life Sci* 2006; 78 (13): 1401–1406.

SABIR, S.; AKHTAR, M.F.; SALEEM, A. Endocrine disruption as an adverse effect of non-endocrine targeting pharmaceuticals. *Environ Sci Pollut Res Int* 2019; 26(2): 1277-86.

SAID, R.A., GRASSI, T.F., SCOLASTICI, C., ALVES DE LIMA, R.O., DARROS, B.R., BARBISAN, L.F., DE CAMARGO, J.L. Absence of chemo preventive influence of propolis on the rat liver altered foci development. *Exp Toxicol Pathol.*, Ilhéus, v. 62, n. 4, p. 405-12, 2010.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. 2005. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2: 33–38.

SANTOS, A.M.; SCHECHTMAN, D.; CARDOSO, A.C.; CLEMENTE, C.F.M.Z.; SILVA, J.C. et al. FERM domain interaction with myosin negatively regulates FAK in cardiomyocyte hypertrophy. *Nature Chemical Biology*, 2012, vol 8, p. 102–110.

SENA-LOPES, Â.; BEZERRA, F.S.B.; DAS NEVES, R.N.; DE PINHO, R.B.; SILVA, M.T.O.; SAVEGNAGO, L. et al. Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. *PLoS One*. 2018 Feb 1;13(2):e0191797. doi: 10.1371/journal.pone.0191797. eCollection 2018.

SEVERI-AGUIAR GD, PINTO SJ, CAPUCHO C, OLIVEIRA CA, DIAMANTE MA, BARBIERI R, et al. Chronic intake of green propolis negatively affecting the rat testis. *Phcog Res* 2017; 9:27-33.

SCHOETERS, G.; DEN HOND, E.; DHOOGHE, W.; VAN LAREBEKE, N.; LEIJS, M. Endocrine disruptors and abnormalities of pubertal development. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 102 (2) (2008), pp. 168-175

SFORCIN, J.M., FERNANDES JR, A., LOPES, C. A. M., BANKOVA, V., FUNARI, S. R. C., 2000. Seasonal effects of Brazilian propolis antibacterial activity. *J. of Ethnopharmacol.*, Botucatu, v. 73, p. 243-249.

SIU ER, MRUK DD, PORTO CS, CHENG CY. Cadmium-induced testicular injury. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 238 (3): 240-9.

SOLIMAN G. A., DONIAAEL R., AWAAD A. S., ALQASOUMI S. I., YUSUFOGLU H. 2012. Effect of *Emex spinosa*, *Leptadenia pyrotechnica*, *Haloxylon salicornicum* and *Ochradenus baccatus* extracts on the reproductive organs of adult male rats. *Pharm. Biol.* 50(1), 105-12.

SÖNMEZ, M. F., ÇILENK, K. T., KARABULUT, D., ÜNALMIŞ, S., DELİGÖNÜL, E., ÖZTÜRK, I., KAYMAK, E. 2016. Protective effects of propolis on methotrexate-induced testis injury in rat. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 79: 44–51.

SOUZA DGS, VIEIRA AT, PINHO V, SOUSA LP, ANDRADE AA, BONJARDIM CA, MCMILAN M, KAHN M, TEIXEIRA MM. NF- κ B plays a major role during the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. *Br J Pharmacol.* 2005;145(2):246-54.

SOUZA, J.P.B., LEITE, M. F., JORGE, R.F., RESENDE, D.O., SILVA FILHO, A.A., FURTADO, N.A.J. C., SOARES, A.E. E., SPADARO, A. C. C., MAGALHÃES, P.M., BASTOS, J.K. Seasonality Role on the Phenolics from Cultivated *Baccharis*

dracunculifolia, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Campinas v. 2011, doi:10.1093/ecam/nep077

TAKAYASU, T., ISHIDA, Y., KIMURA, A., NOSAKA, M., KAWAGUCHI, M., KONDO, T. 2010. Postmortem Distribution of Ametryn in the Blood and Organ Tissues of an Herbicide-Poisoning Victim. *J. Analyt. Toxic.* 34, 2010. 287-291p.

TEW, K. D.; RONAI, ZE'EV. GST function in drug and stress response. *Drug Resistance Updates*, v.2, p. 143-147, 1999.

TOPPARI, J.; JUUL, A. Trends in puberty timing in humans and environmental modifiers. *Mol Cell Endocrinol*, 324 (1/2) (2010), pp. 39-44

TORETI, VC, SATO, HH, PASTORE, GM, PARK, YK. 2013. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 1– 13.

URQUIAGA, I. & LEIGHTON, F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*, v.33, n.2, p.55- 64, 2000.

VINKEN, M., VANHAECKE, T. PEPELEU, P., SNYKERS, S., HENKENS, T, ROGIERS, V. 2006. Connexins and their channels in cell growth and cell death. *Cellular Signalling* 18, 592-600.

YAGI, K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol.* 1998; 108:101-6.

YLMAZ, B. O., KORKUT, A., ERKAN, M. 2018. Sodium fluoride disrupts testosterone biosynthesis by affecting the steroidogenic pathway in TM3 Leydig cells. *Chemosphere*, vol. 212, 2018, Pages 447-455, p. 447-455 doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.08.112.

YEFIMOVA, M. G., MESSADDEQ, N., HARNOIS, T., MEUNIER, AC., CLARHAUT, J., NOBLANC, A., WEICKERT, JL., CANTEREAU, A., PHILIPPE, M., BOURMEYSTER, N., BENZAKOUR, O. 2013. A chimerical phagocytosis model reveals the recruitment by Sertoli cells of autophagy for the degradation of ingested illegitimate substrates. *Autophagy* 9(5), 653–666.

YOUSEF, M. I., KAMEL, K. I., HASSAN, M. S., EL-MORSY, A.M.A., 2010. Protective role of propolis against reproductive toxicity of triphenyltin in male rabbits. *Food and Chemical Toxicology, Egito*, v. 48, n. 7, p. 1846–185.

YOUSEF M.I., SALAMA A.F., 2009. Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food Chem. Toxicol.* 47, 1168–1175.

WALTER, M.F.; JACOB, R.F.; JEFFERS, B.; GHADANFAR, M.M.; PRESTON, G.M.; BUCH, J.; MASON, P. Serum levels of thiobarbituric acid reactive substances predict cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease: A longitudinal analysis of the prevent study. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 44:1996-2002.

WILLIAM ZAWATSKI1 AND MARY M Lee. Male pubertal development: are endocrine-disrupting compounds shifting the norms. *Journal of Endocrinology.* (2013) 218, R1–R12. DOI: 10.1530/JOE-12-0449.

ZHANG, S., NIU, Q., GAO, H. et al. 2016. Excessive apoptosis and defective autophagy contribute to developmental testicular toxicity induced by fluoride. *Environ. Poll.*, 212: 97-104.

Anexo 1: Certificado de Bioética e/ou Biossegurança

 UNICAMP	 CEUA/Unicamp
--	---

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

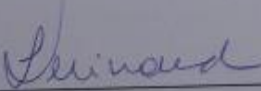
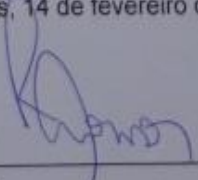
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DA PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA DE INDUZIR E DE REVERTER DANOS ESTRUTURAIS E METABÓLICOS EM TESTÍCULO DE RATOS WISTAR** (protocolo CEUA/UNICAMP nº **4009-1**), de responsabilidade da **Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder e Cristina Capucho**, teve o título alterado para **AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DA PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA DE INDUZIR E DE REVERTER DANOS ESTRUTURAIS E METABÓLICOS EM DIVERSOS ÓRGÃOS DE RATOS WISTAR**, tendo em vista os resultados obtidos até o momento.

Teve ainda autorizada a inclusão dos co-executores Franckson Jhonne Torres Neves Paiva e Silva, Bruna Fontana Thomazini e Fabrícia de Souza Predes, que utilizarão apenas órgãos coletados dos animais, conforme previsto no protocolo, sem manipulação do animal *in vivo*.

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP em 17/09/2015.

Campinas, 14 de fevereiro de 2017.

 _____ Profa. Dra. Liana M. C. Verinaud Presidente	 _____ Fátima Alonso Secretária Executiva
--	--

CEUA/UNICAMP Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil	Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/ceea/
--	---



CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DA PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA DE INDUZIR E DE REVERTER DANOS ESTRUTURAIS E METABÓLICOS EM TESTÍCULO DE RATOS WISTAR", protocolo nº 4009-1, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder / Cristina Capucho, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 17 de setembro de 2015.

Vigência do projeto: 09/2015-12/2016

Espécie/Linhagem: Rato heterogênico Wistar

No. de animais: 77

Idade/Peso: 90 dias / 275g

Sexo: machos

Origem: CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 17 de setembro de 2015.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

Anexo 2: Declaração de Direitos Autorais**DECLARAÇÃO**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **AValiação da Capacidade da Própolis Verde Brasileira de Induzir e de Reverter Danos Estruturais e Metabólicos em Testículo de Ratos Wistar**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem autoral de qualquer editora.

Campinas, 10 de outubro de 2019

Assinatura: _____



Nome do(a) autor(a): **Cristina Capucho**

RG n.º 34 027 539-x

Assinatura: _____



Nome do(a) orientador(a): **Mary Anne Heidi Dolder**

RG n.º 3 188 240