HIDROLISADO DA CLARA DE OVO PREVINE DANOS REPRODUTIVOS SOBRE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO EM BAIXAS DOSES

Grazielly Caroline da Silva [1]

José Eudes Gomes Pinheiro Júnior [2]

Paola Zambelli Moraes [3]

Marta Miguel [4]

Giulia Alessandra Wiggers Pecanha [5]

Resumo:

Investigamos os efeitos do EWH no dano induzido por chumbo na motilidade espermática, espermatogênese e estresse oxidativo. Ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos, tratados por 30 dias com: a) Não tratado (injeções intramusculares - im de solução salina); (b) Acetato de chumbo (II) (Pb (CH3COO) 2), primeira dose de 10 µg / 100g pc, doses subsequentes de 0,125 µg / 100g pc (im), c) Hidrolisado (EWH, gavagem, 1g / kg / dia); d) Chumbo mais hidrolisado. Analisamos a motilidade espermática, produção diária de espermatozóides por testículo, número de espermatozóides e tempo de trânsito no epidídimo, integridade da membrana espermática e bioquímica (níveis de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e capacidade antioxidante total) nos testículos e epidídimos. A motilidade dos dados e a integridade da membrana espermática são expressas como mediana [mínimo máximo] analisadas pelo teste de Kruskal - Wallis, os dados são expressos como média ± SEM, analisados pela ANOVA, valores de p

Palavras-chave: chumbo; hidrolisado; reprodutor

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

HIDROLISADO DA CLARA DE OVO PREVINE DANOS REPRODUTIVOS SOBRE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO EM BAIXAS DOSES

[1] Aluno de graduação. graziellycaroline1@gmail.com. Autor principal

[2] Doutorando. jose.eudes86@gmail.com. Co-autor

[3] Mestranda. pzambellimoraes@gmail.com. Co-autor

[4] Pesquisadora. martamiguel@csic.es. Co-autor

[5] Docente. giuliapecanha@unipampa.edu.br. Orientador

HIDROLISADO DA CLARA DE OVO PREVINE DANOS REPRODUTIVOS SOBRE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO EM BAIXAS DOSES

1 INTRODUÇÃO

O chumbo (Pb) é um metal pesado tóxico amplamente utilizado no setor industrial na fabricação munições, baterias, soldas, e também encontrado na água potável. A exposição ocupacional e este metal é a forma mais frequente a que o ser humano está exposta, e de maneira aguda ou crônica afeta de forma diferente os sistemas do organismo. Há relatos de danos promovidos por este metal em baixas doses sobre o sistema nervoso, sistema renal, sistema cardiovascular e sistema reprodutor (PATRICK, 2016; FIORESI et al,. 2014).

No sistema reprodutor é bem conhecido que a exposição ao Pb induz a toxicidade reprodutiva masculina com astenospermia e oligospermia correlacionada a concentração de Pb no sangue. Este tipo de exposição também evidenciou em animais redução significativa nos pesos de testículos e do epidídimo acompanhado de maior estresse oxidativo em testículo (SAINATH et al, 2011).

Uma vez que o Pb é um metal que acarreta importantes alterações em vários sistemas, tanto em modelos de animais como em humanos, a busca pela redução da incidência da contaminação e tratamentos para reversão de seus efeitos são essenciais. Em modelos animais expostos ao Pb o uso de alimentos funcionais ou complementos dietéticos como a espirulina demontraram efeitos hepatoprotetores e antioxidantes (GARGOURI et al, 2016). Recentemente tem se dado uma atenção maior para substâncias naturais, sabe-se que certos peptídeos derivados do ovo e análogos sintéticos desempenham atividades biológicas e com capacidades antioxidantes, a este respeito o hidrolisado da clara de ovo (EWH) obtido a partir da hidrólise enzimática da clara do ovo com pepsina resultou em um componente com potente atividade antioxidante. Esses peptídeos bioativos foram identificados previamente e há relatos in vivo sobre sua capacidade de reduzir a hipertensão, hiperlipidemia e estresse oxidativo em ratos espontaneamente hipertensos (MIGUEL et al. 2006; MORENO et al. 2015; GARCES-RIMON et al. 2016). Nesse contexto investigamos os efeitos do EWH sobre o dano induzido por exposição crônica ao Pb nos parâmetros espermáticos e estresse oxidativo de ratos.

2 METODOLOGIA

Foram utilizados ratos *Wistar* machos mantidos em ambiente com temperatura e umidade constantes e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à ração e à água em gabinete próprio. O uso e cuidado desses animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1991). O protocolo experimental foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Unipampa (CEUA/UNIPAMPA: 035/2016). Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos e tratados por 30 dias com: a) Controle (Untreated): injeções intramusculares – im de solução salina; b)Pb: Acetato de chumbo -primeira dose de 10 µg / 100g pc e doses subsequentes de 0,125 µg / 100g pcim; c) EWH: solução salina im e EWH nas doses de 1 g /

kg / dia por gavagem); d) Pb-EWH: ambos tratamentos. Ao final dos 30 dias, os ratos foram anestesiados e eutanasiados.

Para a análise da motilidade espermática, os espermatozóides foram retirados por lavagem interna do ducto deferente direito e colocados sobre uma placa aquecida a 34º C, uma alíquota de 10 µL transferida para uma lâmina e analisada em microscopia de luz (400X). Foram analisados 100 espermatozóides e classificados quanto a sua motilidade em: móveis com movimento progressivo, móveis sem movimento progressivo e imóveis segundo protocolo de Perobelli *et al*. (2010). A integridade de membrana foi realizada pela remoção dos espermatozóides do canal deferente direito com injeção de 1 mL de fluido tubular humano pré-aquecido a 37° C, e determinada pelo teste hipo-osmótico (HOS). Este ensaio foi realizado por mistura de espermatozóides com solução hipo-osmótica (1:5) e incubado a mistura a 37 ºC durante 45 min e 100 células por animal foram analisadas em microscópio óptico, onde foi considerado dano na membrana aqueles espermatozóides com cauda reta, segundo protocolo de Lomeo & Giambersio, (1991).

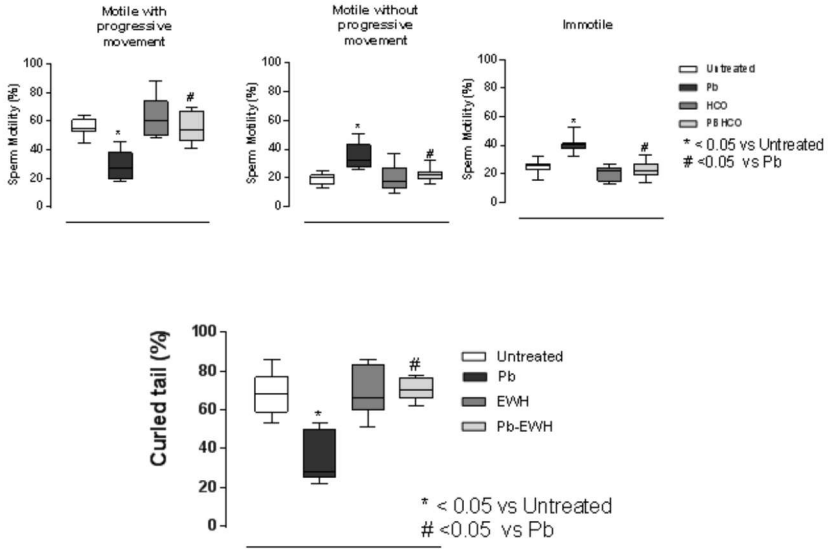
Os estresse oxidativo foi avaliado em plasma, cérebro, próstata ventral, ducto deferente, testículo e epidídimo com a análise dos níveis de peroxidação lipídica por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) segundo Ohkawa *et al.* (1979), os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi determinado conforme descrito por Loetchutinat *et al.* (2005) e a capacidade antioxidante total foi medida pelo ensaio FerricReducing/Antioxidant Power (FRAP) Assay segundo Benzie et al. (1996).

A motilidade e integridade da membrana espermática estão expressas como mediana [mínimo – máximo] e analisadas pelo teste de Kruskal – Wallis, a contagem espermática, ROS, TBARS e FRAP estão expressos como média ± erro padrão da média (SEM) e analisados por ANOVA, valores de $p<0,05$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

O hidrolisado da clara de ovo preveniu a redução dos espermatozóides móveis com movimento progressivo promovida pela exposição ao Pb (Untreated: 53 (48-61), Pb: 24 (18-67)*, EWH: 59 (48-74), Pb+EWH: 48 (26-70)$^{\#}$ - ***vs*Untreated e $^{\#}$*vs*Pb), assim como preveniu o aumento dos espermatozóides móveis sem movimento progressivo (Untreated: 20 (13-25), Pb: 38.5 (26-51)*, EWH: 17.5 (13-37), Pb+EWH: 22 (16-49)$^{\#}$) e imóveis (Untreated: 26 (22-32), Pb: 34.5 (6-53)*, EWH: 21 (13-27), Pb+EWH: 25 (14-50)$^{\#}$) induzidos pela exposição a metal (Figura 1).

Figura 1 – Efeito da exposição ao Pb e co-tratamento com EWH na motilidade espermática.



A exposição ao Pb por 30 dias também foi capaz de diminuir o número de espermatozóides testicular e epididimal (corpo e cauda) e o EWH preveniu este dano (Tabela 1). Estes achados corroboram com Rizzetti *et al.* (2016) que observou efeito similar em exposição por 60 dias ao cloreto de mercúrio ($HgCl_2$) em ratos e da mesma maneira o EWH também preveniu os efeitos danosos do metal, mostrando assim seus benefícios preventivos sob ação de diferentes metais tóxicos.

Tabela 1 –Efeito da exposição ao Pb e co-tratamento com EWH na contagem espermática no testículo e epidídimo de ratos.

Parameters Sperm count	Control	Pb	EWH	Pb-EWH
Testis				
Sperm number (x10^6)	139.2±4.92	113.5±2.21*	141.9±8.20	127.5±4.83
Sperm number (x10^6/g)	89.18±4.39	69.35±2.40*	87.77±6.03	84.8±3.68#
DSP (x10^6/testis/day)	22.82±0.80	18.61±0.36*	23.27±1.34	20.91±0.79
DSP (x10^6/testis/day/g)	14.62±0.72	11.37±0.39*	14.39±0.98	13.9±0.60#
Epididymis Caput/ Corpus				
Sperm number (x10^6)	140.5±9.00	82.18±3.63*	173.4±22.07	157.7±18.20#
Sperm number (x10^6 /g)	353.00±7.82	260.8±6.54	400.4±19.43	379.9±9.40
Sperm transit time (days)	5.77±0.34	6.44±0.23	6.30±0.66	5.98±0.37
Epididymis/cauda				
Sperm number (x10^6)	250.0±5.69	143.4±8.17*	245.6±15.48	231.3±12.35#
Sperm number (x10^6 /g)	829.9±32.41	499.1±21.20*	802.5±19.65	729.7±55.56#
Sperm transit time (days)	7.00±0.43	7.02±0.22	6.66±0.29	6.84±0.35

DSP: produção diária de espermatozóides; DSPr: produção diária de espermatozoides em relação ao peso do testículo. Os dados são expressos como média ± SEM. Unidades: g: grama * p <0,05 vs controle; # p <0,05 vsPb (teste de Kruskal-Wallis).

A exposição ao Pb também resultou em uma redução significativa na produção diária de espermatozoides no testículo que foi evitada pela administração do EWH que restabeleceu esta produção (Untreated: 22.82 ± 0.80, Pb: 18.61 ± 0.36*, EWH: 23,27 ± 1.34, Pb-EWH: 20.91 ± 0.79#). Quanto aos parâmetros de estresse oxidativo analisados o co-tratamento com EWH preveniu o aumento do estresse oxidativo após a exposição ao Pb (Figuras 2, 3 e 4).

Figura 2 - Medida de espécies reativas (ROS) por absorbância em testículo e epidídimo entre os grupos de ratos. Dados expressos em média±EPM e comparação feita pela ANOVA, * p< 0,05 Vs Ct; # p< 0,05 Vs Pb. UF: unidade de fluorescência.

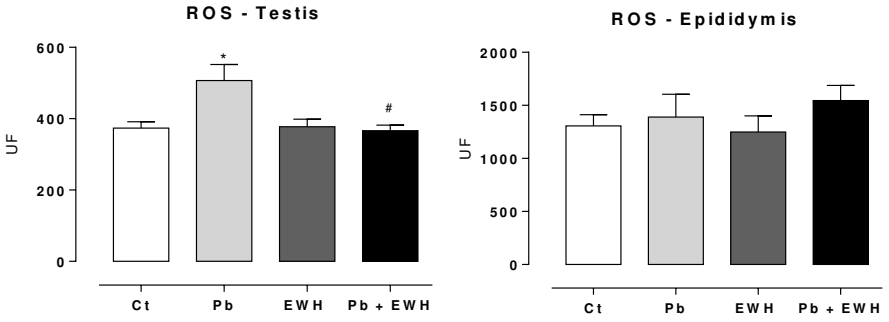


Figura 3 - Medida da peroxidação lipídica em valores de malondialdeido (MDA) em testículo e epidídimo entre os grupos de ratos. Dados expressos em média±EPM e comparação feita pela ANOVA, * p< 0,05 Vs Ct; # p< 0,05 Vs Pb.

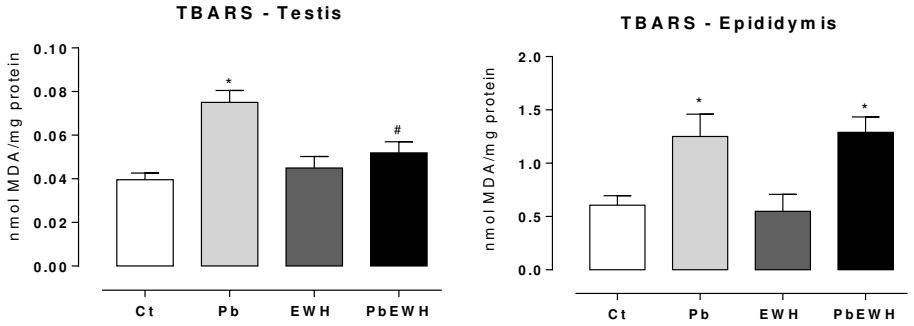
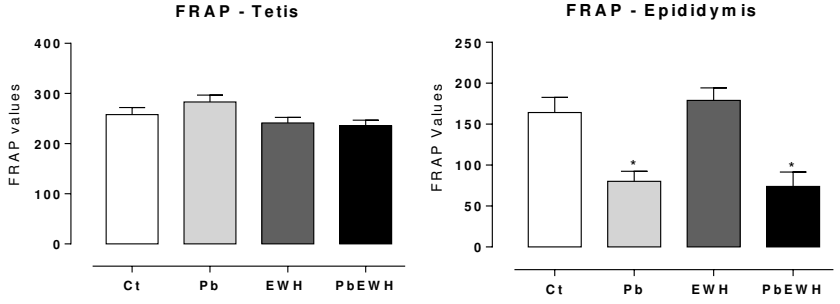


Figura 4 - Medida capacidade antioxidante total entre os grupos em valores de FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power) em testículo dos ratos. Dados expressos em média±EPM e comparação feita pela ANOVA, * p< 0,05 vs CT; # p < 0,05 vs Pb.



Nosso estudo demonstrou que a exposição ao chumbo causou toxicidade reprodutiva masculina em ratos, o que já é relatado também por Batra *et al.* (2001), que examinaram o acúmulo sequencial de Pb em testículos de ratos após administração oral de 10, 50 e 200 mg / kg de Pb por 3 meses e encontraram aumento dependente da dose nos testículos, estes resultados corroboram os encontrados neste estudo indicando que o Pb é capaz de atravessar a barreira hematointestinal e causar danos as células germinativas.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O EWH pode representar uma poderosa alternativa natural para proteger o sistema reprodutor masculino contra a toxicidade induzida por Pb.

REFERÊNCIAS

BATRA N.; HEHRU, B.; BANSAL, M, P. Influence of lead and zinco n rat male reproduction at 'biochemical and histopathological levels'.**Journal of Applied Toxicology**, v 21, p. 507-2, 2001.

BENZIE, J, F.; STRAIN, J, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

FIORESI, M., et al. Chronic Lead Exposure Increases Blood Pressure and Myocardial Contractility in Rats. **Plos One**, v. 9, p.01-09, maio 2014.

GARCES-RIMON, M., et al. Pepsin Egg White Hydrolysate Ameliorates Obesity-Related Oxidative Stress, Inflammation and Steatosis in Zucker Fatty Rats. **PLoS. One**, v. 11, 2016.

GARGOURI, M., et al. Spirulina exhibits hepatoprotective effects against lead induced oxidative injury in newborn rats. **Cell Mol Biol**,v.31, p. 85-3, 2016.

LOMEO, A, M.; GIAMBERSIO, A, M. Water-test: a simples method to assess sperm-membrane integrity. Int. J. Androl, v.14, p. 278-282, 1991.

MIGUEL, M., et al. Long-term intake of egg white hydrolysate attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Life Sci**, v. 78, p. 2960- 2966, 2006.

MORENO, S., et al. Experimental study to evaluate the effect of a pepsin Egg White Hydrolysate on cardiometabolic complications in diet induced obese rats, **Journal of Hypertension**, v. 33, p. 91, 2015.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.**Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979**.**

PATRICK, L. Lead toxicity, a review of the literature.: Part 1: Exposure, evaluation, and treatment.. **Alternative Medicine Review: Of Clinical Therapeutic**, v. 11, p.1-22, mar. 2006.

PEROBELLI, J, E., et al. Decreased sperm motility in rats orally exposed to single or mixed pesticides. Journal Toxicology Environ Health, v. 73, p. 991- 1002, 2010.

RIZZETTI, D, A., et al. Egg white-derived peptides prevent male reproductive dysfunction induced by mercury in rats. **Food and Chemical Toxicology,** v 100, p. 253-264, 2016.

SAINATH, S, B., et al. Protective role of Centellaasiática on lead-induced oxidative stress and suppressed reproductive health in male rats. **EnvironmentalToxicology and Pharmacology,** v. 32, P. 146-154, set. 2011.