



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FRANCIELY APARECIDA VAZ DANTAS LEAL

**EXPOSIÇÃO AO CLORETO DE ALUMÍNIO PREJUDICA A  
MORFOLOGIA TESTICULAR E PROSTÁTICA DE RATOS  
DURANTE O PERÍODO PERIPUBERAL**

---

Londrina  
2017

FRANCIELY APARECIDA VAZ DANTAS LEAL

**EXPOSIÇÃO AO CLORETO DE ALUMÍNIO PREJUDICA A  
MORFOLOGIA TESTICULAR E PROSTÁTICA DE RATOS  
DURANTE O PERÍODO PERIPUBERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes.

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Leal, Franciely Ap. Vaz Dantas.

EXPOSIÇÃO AO CLORETO DE ALUMÍNIO PREJUDICA A MORFOLOGIA TESTICULAR E PROSTÁTICA DE RATOS DURANTE O PERÍODO PERIPUBERAL / Franciely Ap. Vaz Dantas Leal. - Londrina, 2017.  
85 f. : il.

Orientador: Glaura Scantamburlo Alves Femandes..

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2017.  
Inclui bibliografia.

1. Alumínio - Tese. 2. Sistema Genital - Tese. I. Scantamburlo Alves Femandes., Glaura. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . III. Título.

FRANCIELY APARECIDA VAZ DANTAS LEAL

**EXPOSIÇÃO AO CLORETO DE ALUMÍNIO PREJUDICA A  
MORFOLOGIA TESTICULAR E PROSTÁTICA DE RATOS DURANTE  
O PERÍODO PERIPUBERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Profa. Dra. Glaucia Scantamburlo Alves  
Fernandes  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Eduardo José de Almeida Araújo  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Marina Trevisan Guerra  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 04 de abril de 2017

Dedico,

à minha família que sempre me apoiou em todas as minhas decisões, em especial ao meu esposo e nossa querida filha. À minha professora orientadora pela confiança e incentivo, por sempre acreditar em minha capacidade. E a Deus, por todas as oportunidades, por me dar forças para superar todos os desafios.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, foi ele que me deu forças para superar todas as dificuldades e acreditar que aos olhos do pai não existe impossível.

Aos meus pais, Nelson e Lucélia, pelo amor e apoio, sem eles mais esta conquista não seria possível. Pai, infelizmente não estás aqui presente de corpo, porém suas palavras de incentivo irão permanecer em meu coração, sei que estás muito feliz e orgulhoso por este momento. Amo muito vocês.

Aos meus irmãos, Fernanda e Fábio, obrigada por me darem sempre o abraço e o carinho fraterno que me aconchegava quando necessário.

Ao meu esposo Leandro, meu amor, meu companheiro que me entende, e me acompanhou em incontáveis finais de semana tratando os animais e nas inúmeras noites de estudo pela madrugada. Eu sei que não era fácil ter que sair de casa em pleno domingo e ainda no horário de almoço ou ter que abrir de mão de muitas coisas pelos momentos de estudo. Obrigada pelo amor e toda compreensão. Obrigada especialmente por me dar esse presente que hoje carrego em meu ventre, mas que logo estará em nossos braços: nossa amada filha Maria Clara.

À minha orientadora Glauro, obrigada por acreditar em minha capacidade, pela confiança e por me aceitar como orientanda. Você sempre será uma inspiração em minha vida.

Aos amigos de laboratório que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Obrigada em especial à Gé e ao Henrique que me ajudaram e me apoiaram, sem a colaboração de vocês eu jamais teria conseguido.

Aos professores e colegas de mestrado, apesar do pouco tempo de convivência colaboraram para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos laboratórios de Pesquisa em Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer, coordenado pelo Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior, que permitiram que eu pudesse deixar minha dissertação mais enriquecida. E aos discentes destes laboratórios que me ajudaram em todas as minhas análises.

À banca, professor Dr. Eduardo José de Almeida Araújo e a professora Dra. Marina Trevisan Guerra, que aceitaram meu convite de fazer parte de mais essa etapa em minha carreira.

À todos que de alguma forma colaboraram para que este trabalho pudesse ser concluído, meu sincero Muito Obrigado!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

LEAL, Franciely Aparecida Vaz Dantas. **Exposição ao cloreto de alumínio prejudica a morfologia testicular e prostática de ratos durante o período peripuberal.** 2017. 85 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

Os metais podem apresentar graves consequências sobre o desenvolvimento do sistema reprodutivo masculino, diretamente, quando prejudicam órgãos reprodutivos específicos, ou indiretamente, quando provocam uma reação no sistema neuroendócrino. Entre eles, o alumínio (Al) é o metal mais amplamente distribuído no ambiente sendo o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre. A puberdade compreende um período de complexo desenvolvimento sexual, envolvendo mudanças físicas, comportamentais e hormonais, através das quais ocorre a maturação sexual e a obtenção da capacidade reprodutiva. As investigações em humanos e em animais experimentais tem encontrado associação entre a exposição ao Al e a toxicidade do sistema reprodutor masculino em adultos, porém, pouco se conhece sobre os efeitos desse metal durante o período peripuberal. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a exposição ao cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ), durante o período peripuberal, pode afetar o desenvolvimento testicular e prostático em ratos. Ratos machos *Wistar* foram divididos em três grupos experimentais, sendo dois grupos tratados com  $\text{AlCl}_3$  (em solução salina estéril 0,9%) nas doses de 7 mg/Kg (grupo AL7) ou 34 mg/Kg (grupo AL34) de peso corpóreo via intraperitoneal do dia pós natal (DPN) 36 ao 66 (período peripuberal). O terceiro grupo (controle) recebeu apenas o veículo. Ao final do período experimental, os animais foram anestesiados, pesados e submetidos à eutanásia. Foram avaliados peso dos órgãos reprodutivos: testículo, epidídimo, próstata, glândula seminal e ducto deferente; morfologia espermática e produção diária de espermatozoides (PDE); histopatologia e morfometria testicular e prostática, contagem de célula de Sertoli e marcação imunohistoquímica para receptor de andrógeno (AR) nos testículos; contagem de mastócitos na próstata; avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO) e N-acetyl glicosidase (NAG) e determinação dos níveis de citocinas IL1- $\beta$ , IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  nos testículos e IL-6 na próstata; dosagem de testosterona plasmática. Não foram observadas diferenças no peso dos órgãos reprodutivos, dosagem de testosterona, e número de mastócitos. Os animais do grupo AL34 apresentaram diminuição no peso corpóreo, contagem espermática e PDE em comparação aos demais grupos. A morfologia espermática mostrou-se alterada nos animais do grupo AL7 comparado com os demais grupos experimentais. Houve diminuição no número de células de Sertoli e no número de células de Sertoli imunomarcadas para AR nos testículos no grupo AL34 em relação aos demais grupos experimentais. As análises histopatológicas dos testículos mostraram aumento significativo no número de túbulos seminíferos anormais nos animais do grupo AL34. A atividade de MPO foi elevada nos testículos e próstatas dos animais AL34. Nos testículo, houve aumento da citocina TNF- $\alpha$  no grupo AL34 e aumento de IL-10 no grupo AL7. Não houve diferença significativa na análise morfométrica dos testículos entre os grupos experimentais. As análises estereológicas na próstata demonstraram aumento no estroma e diminuição no lúmen dos animais do grupo AL7 e AL34. Dessa forma, podemos concluir que o cloreto de alumínio, durante o período peripuberal, na doses de 7 mg/Kg e 34 mg/Kg prejudica os parâmetros espermáticos e o desenvolvimento testicular e prostático em ratos.

**Palavras-chave:** Cloreto de alumínio. Peripuberdade. Testículo. Próstata.

LEAL, Franciely Aparecida Vaz Dantas. **Aluminum Chloride exposure impair testicular and prostatic morphology in rats during peripuberal period.** 2017. 85 pp. Dissertation (Master in Experimental Pathology) –Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

### ABSTRACT

Metals can promote serious consequences on the male reproductive system, directly, when targeting specific reproductive organs, or indirectly, when acting in the neuroendocrine system. Aluminum (Al) is the most widely distributed metal in the environment and is the third most abundant element in the earth's crust. Puberty comprises a complex sexual development, involving physical, behavioral and hormonal changes, through which sexual maturation and the attainment of reproductive capacity occur. Investigations in humans and experimental animals have found association between exposure to Al and toxicity of the male reproductive system in adult experimental animals however little is known about the effects of this metal during the development of this system. Thus, the objective of this study was to evaluate whether exposure to Aluminum Chloride (AlCl<sub>3</sub>) during the peripuberal period may affect testicular and prostatic development in rats. Male Wistar rats were divided into three groups: two groups were treated with aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub> – diluted in sterile 0.9% saline buffer) at doses of 7 mg/kg or 34 mg/kg of body weight, i.p., during the peripubertal period (postnatal day PND 36-66). The control group received only the vehicle. At 67 PND the rats were anesthetized and euthanized. The following were evaluated: weight of the reproductive organs, testis, epididymis, prostate, seminal vesicle and vas deferens; Sperm morphology and daily sperm production (DSP); testicular and prostatic histopathology and morphometry; Sertoli cell count and immunohistochemical labeling for androgen receptor (AR) in the testis; Mast cell count in the prostate; Myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl glycosidase (NAG) activity and determination of IL1- $\beta$ , IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  cytokines in the testes and IL-6 in the prostate; Plasma testosterone dosage. No differences were observed in reproductive organ weight, plasma testosterone levels, and number of mast cells in the prostate. The animals in the AL34 group had a decrease in body weight, sperm count and PDE in comparison to the other groups. The sperm morphology was altered in the AL7 group compared to the other experimental groups. There was a reduction in the number of Sertoli cells and Sertoli cells nucleus stained for AR, in the AL34 group, in relation to the control and AL7 groups. Histopathological analyzes of the testis showed a significant increase in the number of abnormal tubules in the AL7 animals. MPO activity was elevated in the testis and prostate of AL34 animals. In the testis, there was an increase in TNF- $\alpha$  cytokine in the AL34 group and an increase in IL-10 in the AL7 group. There was no significant difference in the morphometric analysis of the testis between the experimental groups. Stereological analyzes in the prostate demonstrated an increase in the stroma and a decrease in lumen of the AL7 and AL34 group. Thus, we conclude that aluminum chloride, during the peripuberal period, at doses of 7 mg/kg and 34 mg/kg affects sperm parameters and testicular and prostatic development in rats.

**Key words:** Aluminum chloride. Peripuberty. Testis. Prostate.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Organização testicular .....	13
<b>Figura 2</b> - Epitélio seminífero .....	14
<b>Figura 3</b> - Fases do processo espermatogênico .....	16

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABP	Proteína de ligação a andrógenos
AL	Alumínio
AR	Receptor De Andrógeno
BHT	Barreira hemato-testicular
DPN	Dia pós-natal
EGF	Receptor de Estradiol
ER $\alpha$	Receptor de Estrógeno alfa
ER $\beta$	Receptor de Estrógeno beta
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
LH	Hormônio Luteinizante
IL	Interleucina
IL-1 $\alpha$	Interleucina 1 alfa
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
PSA	Antígeno prostático específico
TGF- $\beta$	Fator De Crescimento Transformador Beta
Th1	Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> com fenótipo 1
Th2	Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> com fenótipo 2
TNFR1	Receptor do Fator de Necrose Tumoral 1
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1	Sistema Genital Masculino em Adultos .....	12
1.2	Puberdade e desenvolvimento pós-natal do sistema genital masculino .....	21
1.3	Cloreto de Alumínio .....	22
1.4	Relação entre Cloreto de Alumínio e o Sistema Genital Masculino.. .....	23
1.5	Sistema Genital Masculino e inflamação. ....	25
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	29
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	30
3.1	Geral .....	30
3.2	Específico .....	30
<b>4</b>	<b>ARTIGO I - Aluminum Chloride compromises spermatogenesis and alter cytokine levels in rats during the peripuberal period</b> .....	31
<b>5</b>	<b>ARTIGO II- Aluminum chloride-induced prostatic changes in male rats during the peripuberal period</b> .....	58
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	79
<b>8</b>	<b>REFERENCIAL BIBLIOGRAFICO</b> .....	80
<b>9</b>	<b>ANEXO: Comissão de ética no uso de animais</b> .....	85

# 1 INTRODUÇÃO

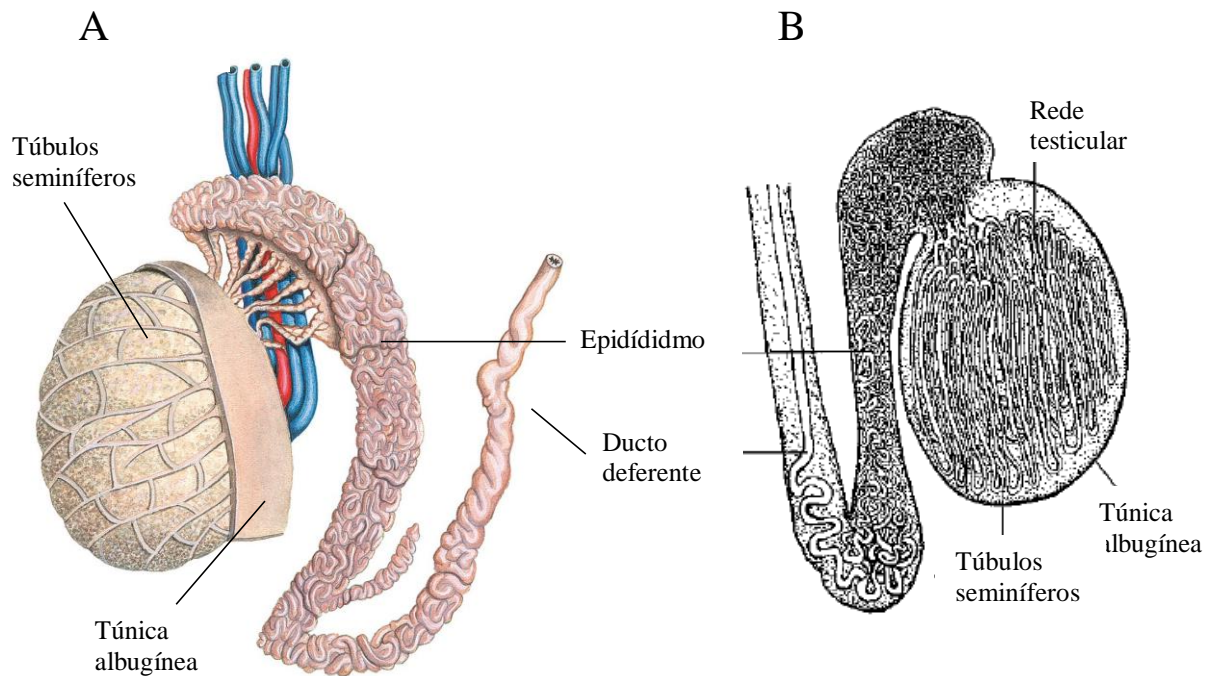
## 1.1 Sistema Genital Masculino em adultos

O sistema genital masculino humano, bem como em roedores, é formado por testículos (gônadas), túbulos retos, epidídimos, ductos deferentes, glândulas sexuais acessórias e órgão copulador (pênis) (MOORE; PERSAUD, 2012).

Os testículos são órgãos pares localizados em uma bolsa músculo cutânea denominada escroto que está situada fora da cavidade abdominal. Morfologicamente, os testículos são envoltos pela túnica albugínea e compostos por túbulos seminíferos e tecido intersticial que, respectivamente, são responsáveis pela espermatogênese e esteroidogênese (RODRIGUEZ; FAVARETTO, 1999). Fisiologicamente esse órgão essencialmente executa duas funções: produção de espermatozoides e biossíntese de hormônio esteroides sexuais (RATO, 2012).

Em humanos, a túnica albugínea é compactada na superfície posterior do testículo e constitui o mediastino, do qual partem septos fibrosos que formam compartimentos denominados lóbulos do testículo. Nos lóbulos dos testículos são encontrados grande quantidade de finos e longos ductos, os túbulos seminíferos. Estes túbulos estão alojados dentro de um tecido conjuntivo frouxo, o tecido intersticial, rico em vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células de Leydig, macrófagos e mastócitos (RUSSEL et al., 1990, JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012) (Figura 1A).

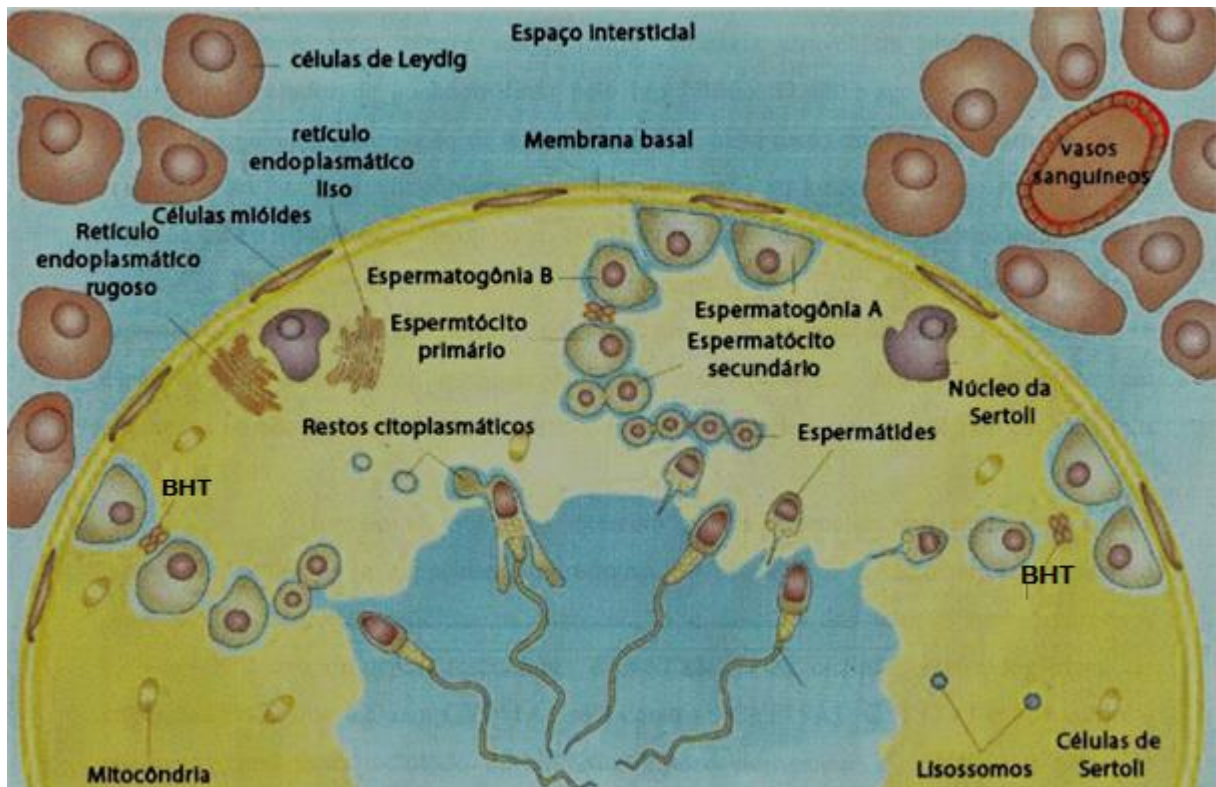
Diferentemente dos humanos, o rato adulto não apresenta lóbulos nos testículos, sendo este constituído por 20 túbulos seminíferos e quantidade escassa de tecido conjuntivo. Ao final dos túbulos seminíferos existem áreas de epitélio de transição denominado túbulos retos que conectam os túbulos seminíferos à rede testicular (FOLEY, 2001) (Figura 1B).



**Figura 1.** Anatomia testicular e epididimária em humanos (A) e em ratos (B), mostrando a localização dos túbulos seminíferos, epidídimo e ducto deferente. Note a presença da rede testicular no testículo de rato (modificado de COOKE; SAUNDERS, 2002, BERNE; KOEPPEN; STANTON, 2009).

Nas diferentes espécies de mamíferos há grande variação no número e nas dimensões (diâmetro e comprimento) dos túbulos seminíferos (FRANÇA; RUSSEL, 1998), porém, de maneira geral, a maior parte dos mamíferos estudados apresenta cerca de 10 a 15 metros de comprimento de túbulo e um valor entre 180 a 300  $\mu\text{m}$  para o diâmetro tubular (ROOSEN ERUNGE, 1977).

Os túbulos seminíferos são constituídos de um lúmen central revestido por um epitélio seminífero especializado, contendo duas populações celulares distintas: as células de Sertoli somáticas e as células espermatogênicas ou germinativas (espermatogônias, espermatócitos primários e secundários e espermátides). O epitélio seminífero é envolto por uma lâmina basal e uma parede formada por fibras colágenas, fibroblastos e células mióides contráteis (KIERSZENBAUM, 2004). Esta parede externa do túbulo seminífero é chamada de túnica própria (STEVENS; LOWE, 1999) (Figura 2).



**Figura 2** – Epitélio seminífero. Representação esquemática de parte de um tubo seminífero e dos tecidos intersticiais. No tubo seminífero estão representadas as células de Sertoli com as células germinativas associadas em diferentes estados de maturação (modificado de LEITE et al., 2012).

A espermatogênese é um processo biológico complexo que envolve a diferenciação celular para produção de células germinativas haploides à partir de células tronco espermatogoniais diploides (FRANÇA; RUSSEL, 1998). As células espermatogênicas são uma população em constante processo de proliferação composta por células em várias fases de um complexo processo de diferenciação (ROSS et al., 1993).

Nos mamíferos, a espermatogênese é dividida em três fases: proliferativa ou mitótica, meiótica e espermiogênica. A fase proliferativa tem a finalidade de aumentar o número da população das células tronco espermatogoniais, sendo assim, as espermatogônias do tipo A (diploides), que estão localizadas no compartimento basal do túbulo seminífero, sofrem mitose e diferenciam-se para formar espermatogônias tipo B (diploides), estas diferenciam-se em espermátócitos primários (diploides) (WONG E CHENG, 2005). Os espermátócitos primários sofrem meiose I dando origem a espermátócitos secundários (haploides), que sofrem meiose II formando espermátide

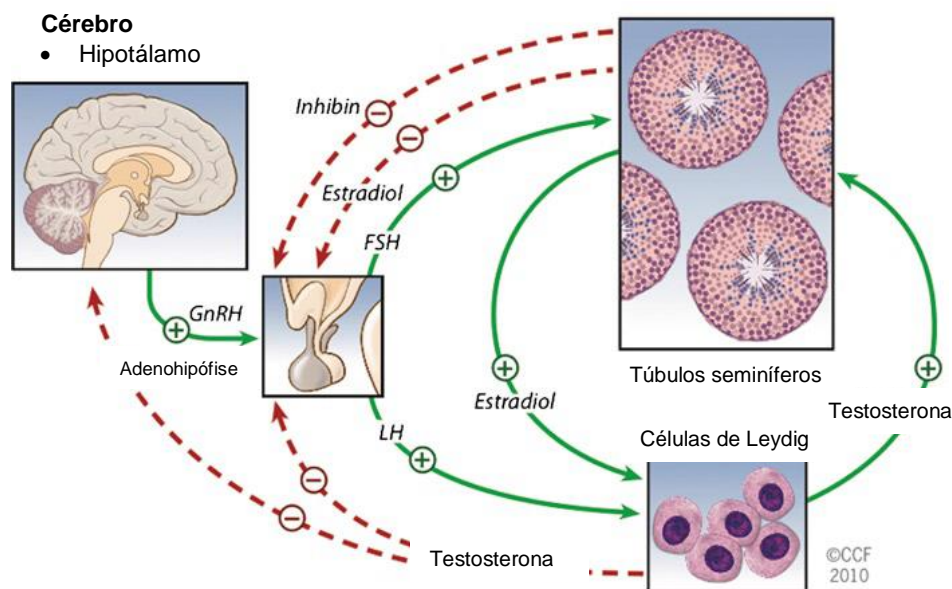
(haploides) que não se separam completamente após a meiose, mas permanecem unidas por pontes intercelulares, que persistem durante todas as fases da espermatogênese, e são importantes para facilitar interações bioquímicas e a sincronia na maturação das células germinativas (AGARWAL; SHARMA, 2013). Por fim, durante a espermiogênese, as espermátides haploides esféricas diferenciam-se em espermatozoides alongados com sua cromatina plenamente condensada. Durante este processo as espermátides sofrem alterações morfológicas que incluem formação da vesícula acrossomal, perda do citoplasma e desenvolvimento do flagelo, e passam a ser denominadas espermátide tardias. Estas, por sua vez, rompem suas pontes citoplasmáticas desligando-se do epitélio germinativo tornando-se células livres na luz do túbulo seminífero – os espermatozoides (HESS; FRANCA, 2003, MRUK; CHENG, 2015, AGARWAL; SHARMA, 2013).

O controle endócrino da espermatogênese se dá pela atividade neuroendócrina ao longo do eixo hipotálamo-hipófise-testículo. No homem, bem como em primatas superiores, esse processo compreende 3 fases distintas, com a duração de meses a anos (RAMASWAMY; WEINBAUER, 2014). A primeira fase é denominada neonatal-infantil que apresenta atividade no eixo hipotálamo-hipófise-testículo porém sem atividade espermatogênica. A segunda é a fase juvenil-infantil caracterizada pelo repouso do eixo hipotálamo-hipófise-testicular. Na fase final, a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-testicular é reiniciada e acompanhada pela iniciação do processo espermatogênico e da puberdade (PLANT, 2005, RAMASWAMY; WEINBAUER, 2014). Em roedores, a atividade do eixo hipotalâmico-hipófise-testicular inicia-se imediatamente após o parto, resultando, na rápida diferenciação das espermatogônias, conclusão da primeira onda de espermatogênese na puberdade e finalmente estabelecimento da idade adulta em torno do terceiro mês de vida (RAMASWAMY; WEINBAUER, 2014).

Em mamíferos, a duração total da espermatogênese, baseada em 4,5 ciclos espermatogênicos – sequência repetitiva de várias gerações celulares, e dependentes de uma ação hormonal -, varia aproximadamente entre 30 a 78 dias (CHENG, 2012). A espermatogênese é iniciada através do controle hormonal no hipotálamo, este secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que por sua vez estimula o lobo anterior da hipófise (adenohipófise) a liberar os hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) (AGARWAL; SHARMA, 2013) (Figura 3). O LH age nas células de Leydig estimulando a produção e liberação de andrógenos, principalmente a testosterona que é indispensável ao desenvolvimento normal das células da linhagem germinativa. A

testosterona é essencial para a manutenção da espermatogênese em diferentes níveis: na ausência de testosterona ou do receptor de androgênio (AR), a formação da barreira hemato-testicular (BHT) é comprometida, as células germinativas tornam-se incapazes de progredir além da meiose e os espermatozoides maduros não são liberados das células de Sertoli. O comprometimento de qualquer um destes processos dependentes da testosterona resulta na falha de espermatogênese e infertilidade (WALKER, 2010, RAMASWAMY, 2014).

O FSH age nas células de Sertoli, estimulando a produção da proteína de ligação a andrógenos (ABP). O complexo andrógeno-ABP é transportado ao lúmen dos túbulos seminíferos e são responsáveis por manter altos os níveis de andrógenos próximos às células germinativas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012, AGARWAL; SHARMA, 2013). Em roedores, o FSH é essencial para o desenvolvimento na fase peripuberal e o completo desenvolvimento das células de Sertoli, sendo que, a ausência desta gonadotrofina, nessa fase de desenvolvimento, afeta a espermatogênese quantitativamente, resultando na diminuição da produção de espermatozoides no adulto (RAMASWAMY, 2014).



**Figura 3** – Controle endócrino na reprodução masculina. Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-testículo e o sistema de feedback hormonal (modificado de AGARWAL E SHARMA, 2013).

Aproximadamente 40% de massa do epitélio dos túbulos seminíferos são constituídos de células de Sertoli. Cada célula de Sertoli faz contato com cinco outras

células de Sertoli e com cerca de 40-50 células germinativas (AGARWAL; SHARMA, 2013). As células de Sertoli constituem uma população que não se prolifera após a fase adulta, compostas por um único tipo celular, sendo que em ratos sua multiplicação começa por volta dos 19-20 dias de gestação e cessa por volta do 15º dia pós-natal (DPN) (SHARPE, 1994). No microscópio de luz são facilmente reconhecidas devido ao seu nucléolo evidente. O citoplasma se estende da região basal ao lúmen do túbulo seminífero, e as células de Sertoli adjacentes estão interconectadas por junções de oclusão. As junções de oclusão basolaterais são os componentes que determinam a BHT, que protege os espermatozoides em desenvolvimento e as espermatídes das reações auto-imunes (KIERSZENBAUM, 2004). Além disso, existem vários pontos de comunicação entre as células de Sertoli e as células germinativas em desenvolvimento, que são necessários para a manutenção da espermatogênese dentro um ambiente hormonal apropriado (AGARWAL; SHARMA, 2013).

Basicamente as funções das células de Sertoli são: dar suporte físico às células espermáticas, secretar as proteínas inibina e activina, secretar a proteína de ligação a andrógenos (ABP), proteger e nutrir as células espermáticas em desenvolvimento, fagocitar células espermáticas degeneradas e o excesso de citoplasma oriundo das espermatídes em fase de diferenciação, secretar um fluido rico em íons e proteínas no lúmen do túbulo seminífero, participar na regulação do ciclo espermático e da compartimentalização do epitélio seminífero. (RUSSEL; GRISWOLD, 1993, SHARPE, 1993, KIERSZENBAUM, 2004, AGARWAL; SHARMA, 2013).

No rato, a BHT começa a agregar-se entre 15 e 16 DPN e está completamente formada entre os dias 18 a 21 DPN, coincidindo com o período em que as células de Sertoli cessam sua divisão (CHENG, 2012). Os espermatozoides são produzidos a partir da puberdade, dessa forma, não são reconhecidos pelo sistema imunológico que desenvolve-se durante o primeiro ano de vida. A BHT fornece um microambiente para a espermatogênese ocorrer em um local imunoprivilegiado.

A BHT funcional é formada por três componentes: uma barreira anatômica responsável por restringir a entrada de moléculas e células germinativas do compartimento basal, que está em estreito contato com os endotélios dos vasos sanguíneos linfáticos; uma barreira imunológica que regula o trânsito das células do sistema imunológico e o nível de citocinas no epitélio seminífero; e uma barreira fisiológica (composta por transportadores e os canais das membranas) que é altamente dinâmica para satisfazer as necessidades das células germinativas e de Sertoli. Em

conjunto, estes componentes são essenciais para a função da BHT: criar um microambiente responsável para o desenvolvimento adequado de células germinativas e dos espermatozoides (WONG; CHENG, 2005, RATO, 2012)

As células de Leydig estão presentes em agregados no espaço intertubular nas proximidades de vasos sanguíneos e linfáticos e são as principais responsáveis pela síntese de testosterona no organismo. Outros tipos de células, tais como fibroblastos, macrófagos e um pequeno número de mastócitos também estão presentes no espaço intertubular (KIERSZENBAUM, 2004). As células de Leudig apresentam uma cito-arquitetura típica de uma célula secretora de esteroides: retículo endoplasmático liso bem desenvolvido, gotículas lipídicas além de inúmeras mitocôndrias com cristas tubulares características. São facilmente observadas ao microscópio de luz, pois além de serem as células predominantes no espaço intertubular, apresentam morfologia arredondada ou poligonal com nucléolo central proeminente (STEVENS; LOWE, 1999, JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012)

Os túbulos seminíferos se convertem formando a rede testicular, estes dão origem aos ductulos eferentes que formam um túbulo único, altamente enovelado, o epidídimo, que se liga em sua porção final ao ducto deferente. O comprimento do ducto epididimário pode variar de acordo com a espécie, sendo de 1 metro em camundongos, 3 metros em ratos e 3 a 6 metros em humanos (ROBAIRE et al., 2006). O epidídimo nos mamíferos adultos é revestido por epitélio pseudo-estratificado colunar com estereocílios e rodeado por fibras musculares lisas, cujas contrações peristálticas permitem o movimento dos espermatozoides ao longo do ducto. As células que constituem o epitélio são classificadas como: células principais, estreitas, apicais, basais, claras e do halo, sendo a primeira a mais abundante. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004, CORNWALL, 2009).

As células principais são as mais abundantes, constituindo cerca de 80% do epitélio, e são responsáveis pela produção da maior parte das proteínas secretadas no lúmen. As junções de oclusão entre essas células são responsáveis pela formação da barreira hemato-epididimária, proporcionando um ambiente imuno protegido. As células estreitas e apicais participam da acidificação do lúmen através da secreção de prótons. As células claras, por sua vez, são células fagocitárias e parecem participar da limpeza de proteínas advindas do lúmen epididimário. As células basais são o segundo tipo celular mais abundante no epitélio do epidídimo e não estão em contato com o lúmen. Embora a função exata destas células ainda não esteja bem esclarecida, alguns resultados mostram que elas podem ter um papel importante nos processos imunes do epitélio e na regulação

da secreção de eletrólitos pelas células principais. Por fim, as células halo parecem ser as células imunes primárias no epidídimo (ROBAIRE et al., 2006, CORNWALL, 2009, ARROTEIA et al., 2012, DACHEUX; DACHEUX, 2015).

Em humanos, o epidídimo pode ser dividido em três regiões: cabeça, corpo e cauda. Em algumas espécies, como no rato, há também o seguimento inicial próximo à região da cabeça do epidídimo. Cada região do epidídimo realiza funções específicas e distintas. (CORNWALL, 2009).

Os espermatozoides produzidos nos testículos são morfologicamente completos, porém imóveis e incapazes de fecundar o ovócito II (DACHEUX; DACHEUX, 2015). Dessa forma, além da função primária de transporte dos espermatozoides, o epidídimo exerce um importante papel sobre a maturação espermática, sendo um local onde ocorrem modificações na membrana do espermatozoide, além de atuar sobre a regulação da motilidade, capacidade de sofrer a reação acrossômica, reconhecimento e fusão com o ovócito. Outra importante função do epidídimo é a estocagem dos gametas masculinos e a proteção destes contra espécies reativas de oxigênio (ROS) (CORNWALL, 2009, ARROTEIA et al., 2012, SULLIVAN; MIEUSSET, 2016)

A maturação envolve mudanças morfológicas e bioquímicas na superfície dos espermatozoides em resposta às secreções epididimárias de enzimas, proteínas e glicoproteínas, essenciais ao processo de fertilização (ARROTEIA et al., 2012). Esse processo abrange uma interação altamente estruturada entre a lâmina própria e o epitélio epididimário, fluido luminal e os espermatozoides. As principais alterações são na dimensão e aparência do acrossoma e núcleo, migração da gota citoplasmática e alterações estruturais de organelas citoplasmáticas, além de modificações na membrana plasmática dos espermatozoides (KEMPINAS, CORNWALL, 2009, KEMPINAS, KLINEFELTER, 2010;).

O epidídimo é um órgão andrógeno dependente. A testosterona e a dihidrotestosterona estão envolvidas tanto na maturação quanto no trânsito dos espermatozoides através do ducto epididimário. A testosterona produzida pelas células de Leydig liga-se à ABP segregada pelas células de Sertoli no lúmen dos túbulos seminíferos. Esse complexo é transportado ao fluido epididimário, sendo rapidamente endocitado pelas células principais (SULLIVAN; MIEUSSET, 2016). A privação de andrógenos pode resultar em apoptose das células epiteliais e redução no diâmetro dos ductos epididimário, sendo que, essas alterações permanecem até o reestabelecimento dos níveis normais desse hormônio (KEMPINAS; KLINEFELTER, 2010).

Os espermatozoides são armazenados na cauda do epidídimo, sendo rapidamente transportados para a uretra por contrações peristálticas da musculatura do ducto deferente (BERNE; KOEPPEN; STANTON, 2009, MOORE; PERSAUD, 2012).

O ducto (ou vaso) deferente é uma estrutura tubular com um lúmen estreito, envolto por uma espessa camada muscular circular e longitudinal, partindo da cauda do epidídimo até a uretra prostática onde libera seu conteúdo. Próximo à região da próstata, esse ducto se dilata dando origem à ampola no qual as vesículas seminais liberam seu conteúdo. O Segmento que entra na próstata é chamado ducto ejaculatório. (BERNE; KOEPPEN; STANTON, 2009, JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

As glândulas seminais são constituídas por dois túbulos tortuosos que produzem uma secreção amarelada rica em substâncias importantes para os espermatozoides como frutose, citrato, prostaglandinas e várias proteínas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). Sua mucosa é forrada por epitélio cuboide ou pseudoestratificado colunar rico em grânulos de secreção. A lâmina própria é rica em fibras elásticas envolvida por uma fina camada de músculos lisos. (GONZALES, 2001, BERNE; KOEPPEN; STANTON, 2009, JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

A secreção da glândula seminal pode promover a motilidade e aumentar a estabilidade da cromatina do espermatozoide e suprimir a atividade imune no sistema genital feminino para evitar a rejeição de espermatozoides e embriões (em caso de fertilização) que possuem antígenos estranhos às mulheres (GONZALES, 2001).

Juntamente com a glândula bulbouretral, a próstata é responsável por cerca de 40-30% do restante do fluido seminal, sendo esta, responsável pela produção de citrato, zinco, espermina e fosfatase, bem como o antígeno prostático específico (PSA), que liquefaz o sêmen coagulado após minutos. Por sua vez, a glândula bulbouretral é responsável pela liberação de muco que lubrifica, limpa e tampona a uretra (BERNE; KOEPPEN; STANTON, 2009, JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

Embora desenvolva função semelhante, a anatomia prostática varia entre mamíferos. Em humanos, embora esteja presente, os lóbulos prostáticos não são demarcados, dessa forma, esse órgão apresenta-se como uma glândula única com diferentes regiões. Diferentemente dos humanos, em roedores, a próstata é segmentada em lobos (ventral, dorsolateral, e anterior – também denominado glândula coaguladora). Em animais jovens, os lobos laterais e dorsais são facilmente identificáveis (MARKER, et al., 2003). Os ductos da próstata desembocam na porção da uretra que cruza a próstata, chamada uretra prostática.

A próstata humana é formada por um conjunto de 30 a 50 glândulas túbulo-alveolares ramificadas, sendo distribuídas em três zonas distintas: zona central, composta por 25% do volume da glândula, zona de transição e zona periférica que possui o restante da glândula (SHAPPELL, et al., 2004, LEE et al., 2011, JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

A próstata é uma glândula altamente dependente de andrógenos, sendo estes, cruciais na manutenção do tecido prostático, podendo regular o crescimento e diferenciação dos diferentes tipos de células epiteliais, direta ou indiretamente, via estroma (AUMÜLLER; SEITZ, 1990). Os efeitos dos andrógenos são mediados pela ativação do receptor de andrógeno (AR). No tecido prostático normal o AR é expresso em altos níveis nas células do epitélio secretor e em um subconjunto de células musculares lisas do estroma (ROY-BURMAN, 2004). A próstata também responde a estrógenos através de receptores de estrogênio ( $ER\alpha$  e  $ER\beta$ ) expressos no epitélio e no estroma prostático, porém  $ER\beta$  parece ser um regulador fisiológico do crescimento e diferenciação epitelial da próstata, estando presente no epitélio, onde é coexpressado com o AR (WEIHUA et al., 2001, CUNHA et al, 2002).

Em humanos, o pênis é composto pela uretra e três corpos cilíndricos de tecido erétil, envolvidos por pele. Em roedores, este órgão é formado por dois corpos cavernosos penianos e um corpo cavernoso uretral (CHIASSON, 1969). O corpo cavernoso é constituído por tecido erétil com auréolas calibrosas, revestidas por uma espessa camada de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea (MURAKAMI; MIZUNO, 1986). No rato, o pênis apresenta um osso peniano localizado centralmente na glande (HEBEL; STROMBERG, 1976). Ao chegar na uretra os espermatozoides estão envolvidos em um líquido seminal, o sêmen, o qual é ejaculado no lúmen vaginal.

## **1.2 Puberdade e desenvolvimento pós-natal do sistema genital masculino**

A puberdade compreende um período de complexo desenvolvimento sexual, envolvendo mudanças físicas, comportamentais e hormonais, através das quais ocorre a maturação sexual e a obtenção da capacidade reprodutiva (GOLUB et al., 2008). Tais mudanças ocorrem em decorrência de uma série de eventos que resultam na maturação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e conseqüentemente no início do ciclo reprodutivo da espécie (OJEDA; URBANSKI, 1994). Nesse período acontecem mudanças no perfil hormonal, especificamente na síntese e secreção de esteroides em resposta ao aumento da pulsatilidade do GnRH e ao aumento da síntese e secreção de LH

e FSH (OJEDA; URBANSKI, 1994). No rato macho, o desenvolvimento pós-natal tem sido classificado em quatro fases: neonatal (dia pós-natal, DPN, 1 – 7), Infantil (DPN 8-21), juvenil (DPN 22-35), peripuberal (DPN 36 – 55 ou 65) e adulto (a partir do DPN 66), onde atinge sua maturidade sexual (CLEGG, 1960, OJEDA et al., 1980). Durante a peripuberdade, a espermatogênese e a esteroidogênese ainda não estão totalmente estabelecidas (JOHNSON et al, 2000).

Na fase peripuberal importantes eventos são observados, tais como leve redução na proliferação e desenvolvimento das células germinativas, aumento nos níveis de testosterona e proliferação de células de Sertoli em humanos (SHARPE, 2010, O'SHAUGHNESSY, 2015).

Em ratos, as primeiras espermátides maduras no testículo são encontradas no DPN 40, enquanto nos epidídimos os espermatozoides são observados apenas no DPN 50. Com base nestes relatos, o rato macho pode atingir a puberdade por volta de 50 dias de idade, sendo que, aos 70 dias apresenta máxima produção de espermatozoides (ROBB et al., 1978). Como a espermatogênese e a esteroidogênese ainda não estão totalmente, a peripuberdade caracteriza-se como uma fase crítica do desenvolvimento reprodutivo e alterações nesses eventos pode acarretar sérios prejuízos e comprometer a reprodução do indivíduo na vida adulta (JOHNSON et al., 1997).

### **1.3 Cloreto de Alumínio**

Reconhecidamente, não existem referências com relação à existência do alumínio (Al) antes do início do século XIX. Em 1825 este metal foi isolado em sua forma elementar pelo físico dinamarquês Hans Oersted (SIGEL; SIGEL, 1988). Atualmente, o alumínio é considerado o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre, ocorrendo naturalmente no meio ambiente na forma de silicatos, óxidos e hidróxidos, combinados com outros elementos, tais como sódio e flúor, e na forma de complexos com a matéria orgânica (AZEVEDO, 2003, IPCS, 2007). Dotado de extrema versatilidade, o alumínio metálico apresenta praticamente ilimitadas possibilidades de aplicação. O primeiro setor industrial em importância na utilização desse metal é o de transporte. O pó de alumínio é utilizado em tintas e como revestimento em fogos de artifício. O uso medicinal de alumínio é muito antigo e está relacionado à sua ação no combate à disenteria e no alívio das manifestações de úlcera gástrica, sendo amplamente utilizado em antiácidos, aspirinas tamponadas, vacinas e antitranspirante (SUTHERLAND; GREGER, 1998, EXLEY, 2012). Além disso, a contaminação de alumínio também tem sido relatada em aditivos de

nutrição parenteral, soluções intravenosas, dialises, emulsões lipídicas e fármacos infantis (FERNÁNDEZ-LORENZO et al., 1999, POPIŃSKA et al., 1999, EXLEY, 2013).

As formas mais relevantes de exposição ao Al são por meio da ingestão desse composto em alimentos e na água, sendo a taxa de absorção intestinal cerca de 0,2%, além da inalação de partículas finas presentes no ar (PRIEST et al., 1988, GÓMEZ, 2008). Estima-se que a ingestão média semanal do Al em humanos adultos, a partir de alimentos e bebidas seja de 14 a 280mg. No entanto, este valor varia de acordo com a composição dos alimentos, do país e local de residência, sexo e idade (IPCS, 2007). As fontes antropogênicas diretas de compostos à base de alumínio são primariamente a atmosfera associada com processos industriais, como a metalurgia. Contudo, o uso de alumínio em compostos à base de alumínio em embalagens, estocagem de produtos alimentares e ainda como flocculantes no tratamento de água potável pode contribuir para sua presença na água e nos alimentos (AZEVEDO, 2003). Além disso, o crescimento da prevalência de chuva ácida resultante da queima de combustíveis fósseis pode efetuar a descarga de grandes quantidades de sais de Al a partir de minerais insolúveis, levando a uma maior disponibilidade desse elemento no ambiente (SMITH, 1996)

Os impactos da intoxicação do alumínio (Al) na saúde humana têm sido cada vez mais alarmantes nos últimos anos, no entanto seu papel no metabolismo celular ainda não foi esclarecido. Compostos de Al são conhecidos por serem tóxicos para plantas (KOCHIAN; JONES, 1995) e animais (SPARLING; CAMPBELL, 1997) e têm havido grande preocupação em relação aos efeitos potencialmente negativos do metal sobre a saúde humana (KLEIN et al., 2014).

#### **1.4 Relação entre Cloreto de Alumínio e o Sistema Genital Masculino**

As investigações em humanos e em animais experimentais têm evidenciado associação entre a exposição ao Al e a toxicidade do sistema reprodutor masculino. Altos teores de Al observados em testículos, células de Leydig, espermatozoides, sangue e urina, foram associados com a diminuição da qualidade e viabilidade seminal em humanos (EXLEY; ESIRI, 2006, KLEIN, 2014). O estudo de GUO et al. (2005a) mostrou que a exposição ao cloreto de alumínio na dose de 13 mg/Kg de peso corporal durante duas semanas diminuiu os níveis de testosterona no plasma e nos testículos em camundongos adultos. Os autores sugerem que a redução severa na libido masculina e na fertilidade após a administração de alumínio pode ser resultado da acumulação excessiva de alumínio nos testículos e nas baixas concentrações de testosterona.

Estudos recentes evidenciam que a ingestão de uma quantidade excessiva de compostos de alumínio desencadeia lesão de tecido testicular (YOUSEF; SALAMA, 2009). Estes autores observaram diminuição no peso de testículos, vesícula seminal e epidídimo, diminuição da concentração e motilidade espermática, aumento no número de anormalidades espermáticas e diminuição nos níveis de testosterona em ratos adultos tratados com 34 mg/Kg de  $AlCl_3$  por um período de 60 dias. Além disso, aumento do nível de alumínio no semen de camundongos e ratos foi correlacionado com a diminuição da motilidade e viabilidade espermática, bem como a produção de testosterona, comportamento sexual e fertilidade (GUO; LU 2005<sup>a</sup>, YOUSEF et al., 2007). ERO gerados a partir da administração de Cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ) podem ser responsáveis pela diminuição da qualidade do sêmen em camundongos adultos após a administração de 7, 13 e 35 mg/Kg durante duas semanas (GUO et al. 2005b, GUO et al., 2009);

A administração de  $AlCl_3$  (34 mg/Kg) durante 30 dias em ratos adultos levou a pequenas alterações degenerativas nos túbulos seminíferos com focos de células em necrose. Este resultado mostrou-se agravado em animais cujo tempo de exposição ao  $AlCl_3$  foi aumentado para 45 e 60 dias, no qual foi observado intenso edema intersticial (MOSELHY et al., 2012).

HALA et al. (2010) relataram que a administração de  $AlCl_3$  (20 mg/Kg) durante 70 dias, em ratos adultos, causou grave congestão e edema intersticial. Os autores atribuíram tais resultados a alterações na permeabilidade dos vasos sanguíneos testiculares devido ao estresse oxidativo induzido pela exposição ao  $AlCl_3$ . Além disso, os autores relataram que os efeitos do  $AlCl_3$  sobre as células germinativas podem estar relacionados à sua capacidade de atravessar a barreira hematotesticular causando danos nas membranas biológicas dos testículos (LATCHOUMYCANDANE; MATHUR, 2002).

A qualidade ideal do sêmen humano está diretamente associada à concentração satisfatória de antioxidantes e níveis baixos de ERO no organismo (LEWIS et al., 1997, ESKENAZI, 2005). Em altas concentrações, as ERO são extremamente tóxicas para as células, pois levam à peroxidação lipídica, danos à molécula de DNA e degradação protéica afetam diversas moléculas biológicas (SUN, 1990). Estudos têm mostrado que o Al pode induzir alterações na atividade de um número de antioxidantes biológicos, tais como a superóxido desmutase, catalase, e glutathione peroxidase, que têm um papel importante na proteção do testículo e do espermatozoide contra danos peroxidativos (MOUMEN et al., 2001). Outro mecanismo que pode estar envolvido no estresse

oxidativo induzido pelo AI é a peroxidação lipídica. O Malondialdeído (MDA) é um indicador da peroxidação lipídica em testes laboratoriais bem conhecido e encontra-se aumentado em testículos e epidídimo após exposição ao AI (YOUSEF; SALAMA, 2009, HALA et al., 2010).

### **1.5 Sistema Genital Masculino e Inflamação**

A inflamação é uma resposta complexa a diversos agentes nocivos, como microorganismos e células danificadas, que consiste em respostas vasculares, migração e ativação de leucócitos e reações sistêmicas. A inflamação destrói, dilui ou isola o agente nocivo e desencadeia uma série de eventos que tentam curar e reconstituir o tecido danificado (KUMAR et al., 2005). Essa resposta protetora causa dor, calor, rubor, tumor (inchaço) e/ou perda de função, sendo que a não resolução da inflamação crônica culmina em patologias, incluindo câncer e fibrose (KARIN; CLEVERS, 2016).

Nas sociedades desenvolvidas, estima-se que entre 5% e 10% da infertilidade masculina de etiologia conhecida tem suspeita do envolvimento inflamatório ou auto-imune, que engloba a formação de anticorpos contra espermatozoides, orquite (inflamação no testículo), epididimite e epididimo-orquite, e pelo menos alguma infertilidade "idiopática" (HEDGER, 2011).

É bem estabelecido que infecções sistêmicas podem ter consequências sobre a função reprodutora masculina, por consequência da atividade de células antimicrobianas e suas secreções e pelo dano celular. Indiretamente, mediadores inflamatórios como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), óxido nítrico (ON), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e espécies reativas de oxigênio (ERO) podem atuar sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular (HEDGER, 2011).

Evidências sugerem que reguladores inflamatórios possuem um papel chave na espermatogênese e no desenvolvimento das células germinativas, sendo produzidos no testículo em condições normais pelas células germinativas e somáticas, dessa forma, infecção e inflamação são capazes de afetar o epitélio seminífero (O'BRYAN et al., 2000, LIEW et al, 2007). Células do sistema imune como monócitos, macrófagos, células dendríticas, células T e T reguladoras (Treg), células natural killer e mastócitos, juntamente às células de Leydig, Sertoli e da linhagem germinativa ajudam na manutenção da espermatogênese (MRUK; CHENG, 2015)

Os testículos são classificados como órgãos "imunoprivilegiados", nesses órgãos, os tecidos vitais são protegidos de respostas imunes prejudiciais. As células

germinativas são protegidas dos ataques do sistema imunológico em condições fisiológicas, o que é essencial para a espermatogênese normal e a fertilidade (HEDGER, 2012, CHEN; DENG; HAN, 2016). Diversos mecanismos estão envolvidos na prevenção de doenças auto-imunes nos testículos: a) A BHT, que limita o acesso das células imunes intersticiais aos antígenos das células germinativas e a passagem de anticorpos do espaço intersticial para o lúmen tubular; b) secreção de fatores imunossupressores principalmente por macrófagos, células peritubulares, células de Sertoli e de Leydig; c) um número escasso de células T, principalmente CD8+; d) presença de células T reguladoras (Tregs) (JACOBO et al., 2011).

Nos testículos, os macrófagos residentes constituem a linha de frente da defesa inata contra infecções microbianas do sangue circulante e representam cerca de 20% de todas as células intersticiais. Essas células possuem baixa capacidade para produção de citocinas pró-inflamatórias e apresentam fenótipos imunossupressores. Diversos estudos clínicos demonstram que o aumento no número de macrófagos nos testículos está associado com infertilidade masculina (WINNALL et al., 2011, CHEN et al., 2016). Durante o desenvolvimento de orquite auto-imune experimental (OAE), foi observado aumento na produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e interferon (IFN)- $\gamma$  por macrófagos testiculares (JACOBO et al., 2011).

Os linfócitos, por sua vez, representam a segunda maior população de leucócitos com cerca de 15% dos leucócitos testiculares em ratos. Sob condições fisiológicas apenas os linfócitos T residem nos testículos, sendo que, as Tregs favorecem o privilégio imunológico inibindo a ativação de células T efetoras (FRUNGIERI et al., 2002, CHEN et al., 2016). Estudos revelaram que durante a OAE células CD4+ Th1 e Th17 produzem localmente citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17) que orquestram a inflamação tecidual contribuindo para o recrutamento e ativação de outras células efetoras nos testículos, induzindo apoptose de células germinativas e modulação da função de Tregs (JACOBO et al., 2011).

Basicamente, as citocinas podem ser divididas em “pró-inflamatórias e anti-inflamatórias”, baseado em sua variedade de ações, porém, muitas citocinas podem apresentar um papel mais ambíguo. A IL-1 é uma citocina pró-inflamatória que ocorre em duas isoformas capazes de se ligarem ao mesmo receptor e exercer efeitos semelhantes (DINARELLO, 1996; HEDGER; MAINHARDT, 2003). A isoforma IL-1 $\beta$  é sintetizada como uma molécula precursora inativa de 35kDa, que é proteoliticamente processada em uma molécula ativa de 17kDa no momento da secreção. A interleucina-6 (IL-6) faz parte

de uma família de citocinas que atuam através do receptor Gp130, sendo extremamente importante na regulação da inflamação e da imunidade (BRAVO; HEATH, 2000, HEDGER; MAINHARDT, 2003). Essa citocina está envolvida no processo inflamatório inato e adaptativo, incluindo a ativação de células B, resposta inflamatória de fase adulta e tombopoiese e pode ser produzida por diversas células incluindo macrófagos, células endoteliais e linfócitos T (SFANOS, DE MARZO, 2012). No testículo, a IL-6 é produzida por células de Sertoli em resposta à estimulação por FSH, testosterona, neuropeptídeos e corpos residuais e apresenta uma série de efeitos sobre a função epitelial dos túbulos seminíferos, incluindo estimulação da produção de transferrina por células de Sertoli, e inibição da síntese de DNA meiótico em espermátócitos pré-leptoteno (Hakovirta et al., 1995, HEDGER; AMINHARDT, 2003). O TNF- $\alpha$  é uma citocina citotóxica com estrutura trimérica, que atua através de receptores (TNFR-1) que medeiam um sinal de morte celular. Semelhante à IL-1, o TNF- $\alpha$  inibe a esteroidogênese das células de Leydig, e sua localização na região de células germinativas pós-meiótica também indica possível envolvimento no processo de espermatogênese (MEALY, et al., 1990, XIONG; HALES, 1993b, HEDGER; AMINHARDT, 2003). Na OAE, essa citocina tem sido descrita como principal agente causador dessa patologia. (YULE; TUNG, 1993 HEDGER; AMINHARDT, 2003).

A apoptose de espermátócitos e espermátides é uma das principais características durante a OAE. Estudos recentes demonstraram que células germinativas apoptóticas apresentavam aumento na expressão de receptores TNFR1, Fas e IL-6R (RIVAL, et al., 2006; JACOCO et al., 2011). Acredita-se que durante o desenvolvimento da doença, citocinas pró-inflamatórias produzidas por células mononucleares intersticiais podem induzir a apoptose de células germinativas através da interação com receptores de morte nessas células (THEAS, et al., 2008).

No testículo normal, células somáticas secretam fatores e citocinas (fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), alfa endorfina, met-enkefalina, fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1)) que inibem reações imunes gerando um microambiente imunossupressor. Em contraste, o recrutamento de células imunes ao interstício testicular (principalmente células dendríticas (CDs), macrófagos e células T) e a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-23) ocorrem durante a inflamação induzida por agentes infecciosos ou no desenvolvimento de diversas patologias como a OAE (THEAS et al., 2008, JACOCO et al., 2011). Algumas dessas

citocinas atuam sobre moléculas de adesão alterando a permeabilidade da BHT, induzindo apoptose de células germinativas (LYSIAK, 2004, LI, et al., 2006, JACOCO et al., 2011).

O epidídimo, por sua vez, também apresenta uma barreira hemato-epididimária, capaz de restringir o movimento de moléculas através do epitélio epididimário, porém essa barreira não parece ser análoga nem tão eficaz como a hemato-testicular (NEILL, 2006, MICHEL et al., 2015). A principal diferença com o epitélio seminífero é a presença de macrófagos e linfócitos no epitélio do ducto epididimal, sendo denominadas células halo, o que sugere diferenças na imunidade desses dois órgãos. Macrófagos e linfócitos também são frequentemente encontrados no tecido intersticial do epidídimo (SERRE; ROBAIRE, 1999, NEILL, 2006, HEDGER, 2011). Estudos recentes evidenciam que o epidídimo parece ser mais susceptível à inflamação e subsequente infiltração leucocitária que o testículo, o que foi demonstrado pela observação de linfócitos e neutrófilos no epidídimo e ducto deferente em camundongos senescentes (ITOH et al., 1999<sup>a</sup>; HEDGER, 2011). Foi evidenciado que a presença de IL-10 colabora na imunoregulação do tecido epididimário, evitando assim, a iniciação do processo inflamatório e danos espermáticos (VERÄJÄNKORVA et al., 2002, HEDGER, 2011, JRAD-LAMINE et al., 2013, MICHEL, 2015).

Inflamações na próstata são consideradas comuns e podem ocorrer por diversos fatores como infecções, tumores e exposição ambiental. Este órgão possui em seu epitélio e estroma células imunes como macrófagos, mastócitos e células T e B (DE MARZO et al., 2007). A citocina IL-6 é conhecida por desempenhar importante papel em diversas doenças auto-imunes. No câncer de próstata, evidências apontam que essa citocina apresenta um papel contributivo na iniciação e/ou progressão do câncer podendo atuar na ativação do receptor de andrógeno (AR). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a IL-6 estimula a proliferação e inibe a apoptose de células prostáticas tumorais (DE MARZO et al., 2007, CULIG; PUHR, 2012).

## 2 JUSTIFICATIVA

O alumínio (Al) é o metal mais amplamente distribuído no ambiente sendo o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre. Os compostos de alumínio são usados em produtos farmacêuticos, no processo de tratamento de água, em utensílios domésticos, em aditivos alimentares e em produtos de consumo. Assim, avaliação das consequências da exposição humana aos metais tem sido o objetivo de estudo de várias pesquisas no campo toxicológico nas últimas décadas. Os seres humanos são inevitavelmente expostos a metais devido à sua disponibilidade na natureza, através da contaminação no ar, água, solo e alimentos. Outro importante meio de contaminação por metais se dá por sua ampla utilização pelas indústrias e por seu longo prazo de persistência no ambiente. As pessoas estão expostas ao alumínio a níveis acima do normal através da poluição ambiental pelos diferentes compostos de alumínio. Os metais podem apresentar graves consequências sobre o sistema reprodutivo masculino, diretamente, quando visam órgãos reprodutivos específicos, ou indiretamente, quando agem no sistema neuroendócrino. As investigações em humanos e em animais experimentais tem encontrado associação entre a exposição ao alumínio e alterações do sistema reprodutor masculino em indivíduos adultos. Nestes, os principais danos causados pela exposição ao Al no sistema reprodutor masculino são alterações nos níveis de testosterona, perda da integridade da barreira hematotesticular e aumento nos níveis de estresse oxidativo.

Tendo em vista que a maioria dos estudos até o momento foram realizados em animais em idade adulta, os estudos epidemiológicos também são restritos à humanos adultose que não foram encontrados na literatura dados que demonstrem os efeitos do Cloreto de Alumínio durante o período peripuberal o presente estudo tem grande aplicabilidade ao avaliar se a exposição ao alumínio durante o desenvolvimento peripuberal do sistema reprodutor masculino trará danos celulares, teciduais ou hormonais para este sistema, especificamente para os testículos e a próstata.

### **3 OBJETIVOS**

#### **Geral:**

Avaliar se a exposição ao Cloreto de Alumínio durante o período peripuberal poderia trazer prejuízo para o desenvolvimento testicular e prostático de ratos machos

#### **Específicos:**

Analisar alterações no peso dos órgãos reprodutivos, bem como a produção diária de espermatozoide, morfologia e histopatologia testicular;

Avaliar a morfologia e histopatologia prostática e quantificar a testosterona plasmática total;

Evidenciar o número de receptor de andrógenos nos testículos e próstata;

Avaliar a migração de neutrófilos e macrófagos no testículo e na próstata, bem como, alterações nos níveis de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  no testículo e IL-6 na próstata.

Contribuir com dados sobre os efeitos e mecanismos de ação da exposição ao Al no desenvolvimento pós-natal do testículo e próstata de ratos.

Artigo I

Cloreto de Alumínio compromete a espermatogênese e altera os níveis de citocinas de ratos durante o período peripuberal

Aluminum Chloride compromises spermatogenesis and alter cytokine levels in rats during the peripubertal period

Artigo será submetido à revista — Reproductive toxicology. ISSN: 0890-6238,

Fator de impacto: 2.850, Qualis CAPES (Med II) = A1

**Aluminum Chloride compromises spermatogenesis and alter cytokine levels in rats  
during the peripubertal period**

Franciely A.V. D. Leal<sup>A,B</sup>, Gessica D. Gonçalves <sup>A,B</sup>, Larissa Staurengo-Ferrari <sup>B</sup>,  
Victor Fatorri <sup>B</sup>, Waldiceu A. Verri <sup>B</sup> and Glaura S.A. Fernandes<sup>A\*</sup>

<sup>A</sup>Department of General Biology, Biological Sciences Center, State University of Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brazil.

<sup>B</sup>Department of Pathology, Biological Sciences Center, State University of Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brazil.

**\*Corresponding author**

Dr. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes

Department of General Biology

State University of Londrina (UEL)

Rodovia Celso Garcia Cid Pr 445 Km 380, 86057-970

Londrina, PR, Brazil

Phone: +55 43 33714417

E-mail address: glaura@uel.br (G.S.A. Fernandes)

## Abstract

Metals may cause serious consequences to the development and function in male genital system. Aluminum (Al) is the most widely distributed metal in the environment and this element has been reported to cause significant impair to the reproductive system in adult experimental animals. Puberty comprises a complex sexual development to acquisition of reproductive capacity. This study aimed to assess whether exposure to aluminum chloride during the peripubertal period could lead to damage of testicular development in rats. Male Wistar rats were allocated into three groups: two groups were treated with aluminum chloride ( $\text{AlCl}_3$  – diluted in sterile 0.9% saline buffer) at doses of 7 mg/kg (AL7) or 34 mg/kg (AL34) of body weight, intraperitoneally during the peripubertal period (postnatal day PND 36-66). The control group received only the vehicle. At PND 67 rats were anesthetized and testis and seminal gland were weighted. The sperm from the vas deferens were used for sperm morphology, and the testis were used for histopathological and morphometric analysis, sperm parameters, immunohistochemistry for androgen receptor (AR), myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl glycosidase (NAG) activity and cytokine levels (IL1- $\beta$ , IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$ ). Aluminium did not induced changes in testis, seminal vesicle and vas deferens weights, but decreased the body weight evolution in AL34 group. Analysis of sperm morphology demonstrated a significant reduction in the number of normal sperm in the AL7 group. The AL34 group presented a reduction in testicular sperm count and daily sperm production compared to the other groups. In the AL34 group, the histopathological analysis showed a significant increase in the number of abnormal seminiferous tubules and a reduction in the number of Sertoli cells and Sertoli cells nucleous stained for androgen receptor in relation to the control and AL7 groups. In relation to testicular morphometric and spermatogenesis kinetics there were no significant difference among groups. There was an increase in MPO activity and TNF- $\alpha$  dosage in the Al 34 group, while the Al 7 group presented an increase in the level of IL-10. The other cytokines were similar among groups. We conclude that aluminum chloride, at both doses, impair sperm parameters and testicular development in peripubertal rats, and cytokines could be the mechanism action for this toxic substance.

**Key words:** Testis, aluminium chloride, cytokines, sperm parameters.

## 1. Introduction

The aluminium (Al) accumulation is associated with damage to the target organs (Akinola et al., 2015). In adult male reproductive system through oral, dermal or intraperitoneal exposure (Guo et al., 2009, Zhu et al., 2014, Berihu, 2015) this metal has been reported to cause significant decrease in testosterone levels (Guo et al., 2009, Moselhy et al., 2012), sperm motility and viability (Guo et al., 2009) in addition to severe damage in the seminiferous tubules and vacuolar degeneration on the spermatogenic and Sertoli cells cytoplasm in mammals (Guo et al., 2005, Khattab 2007, Moselhy et al., 2012).

Mechanisms associated with infertility induced by Al have been described. Several studies have reported Al increases oxidative stress, causes alterations in membrane function, disruption in cell signaling and impairment of blood testis barrier (BTB) (Gou et al, 2009, Yousef e Salama, 2009, Ige e Akhigbe, 2012).

Puberty comprises a complex sexual development period, involving physical, behavioral and hormonal changes, which sexual maturation and the attainment of reproductive capacity. Changes occur as a result of a series of events that result in maturation of the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) system and consequently at the beginning of the reproductive cycle of the species (Golub et al., 2008). In this period, changes occur in the hormonal profile, specifically in the steroids synthesis and secretion. Thus, changes in this characteristic events can induce serious harm and compromise the reproduction of the individual in adult life (Ojeda, Urbanski, 1994, Harden et al., 2014).

There are no studies which analyzed the alterations on male reproductive system after aluminium exposure in peripubertal animals. Thus, the aim of the present work was to assess whether exposure to aluminum chloride during the peripubertal period

could lead to damage to testicular development in rats.

## **2. Material and methods**

### **2.1 Ethical approval**

Experimental procedures were in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazillian College of Animal Experimentation and were approved by the Ethics Committee on Animal Use of State University of Londrina (CEUA/UEL protocol number 2430.2015.47).

### **2.2 Experimental protocol**

Male Wistar rats with 30 days old (PND 30) and body weight of approximately 125 g were used for the study. Animals were obtained from House of Biological Sciences Center, State University of Londrina (CCB-UEL), Paraná, Brazil and acclimated to the new environment (Laboratory of Toxicology and Metabolic Dysfunctions of Reproduction) during five days before the beginning of the period experimental. Rats were allocated in polypropylene cages (43 cm × 30 cm × 15 cm) and maintained under controlled temperature ( $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) and lighting conditions (12:12-h photoperiod). There were provided with standart comercial laboratory chow and tap water *ad libitum*. Rats were randomly assigned into three groups ( $n = 10$ ): Control (C), AL7 (7mg/Kg bw, 1/100LD50) and AL34 (34mg/Kg bw, 1/20LD50). These doses were selected according to Guo et al. (2006), and administrated from post natal day (PND) 36 to PND 66. The peripubertal period was selected according to Ojeda et al. (1980). Thus, the animals recieved 7 mg/Kg or 34mg/Kg b.w.  $\text{AlCl}_3$  (CAS no. 7446-70-0, Sigma-Aldrich Co®, USA) injections intraperitonally, diluted in saline buffer 0,9% (vehicle), or solutions vehicle to control group.

## **2.2 Body weight evolution, testis and seminal gland weights**

Rats were weighed, twice a week, during the experimental period. In the PND 66 the animals were anesthetized with a combination of ketamine (Dopalen®, Ceva, Paulínia, Brazil - 10mg/kg, intramuscular) and xylazine (Sedomin®, König, Avellaneda, Argentina - 2mg/kg, intramuscular) and euthanized by diaphragmatic rupture at the 31st experimental day (PND 67). Testis and seminal gland (without the coagulating gland) were removed and their weights (absolute and relative to body weights) were determined. Right testis was used for sperm counts (n=10/group) and left testis for inflammatory profile (n=5/group) and histological analysis (n=5/group). Spermatozoa from left vas deferens were used for sperm morphology analysis (n=10/group).

## **2.3 Mature spermatid number, daily sperm production and sperm morphology**

For mature spermatid number, right decapsulated testes were weighed and homogenized as described previously by Robb et al (1978), with the adaptations described by Siervo et al (2015). After dilution of the homogenate, a small sample was transferred to Neubauer chamber (4 fields per animal) for counting homogenization-resistant spermatids (stage 19 of the spermatogenesis). To calculate the daily sperm production (DSP), the number of spermatids per testis was divided by 6.1, which is the number of days in which mature spermatids are present in the seminiferous epithelium (Robb et al., 1978). For sperm morphology, contents of the vas deferens were removed by internal rinsing with 0.5 mL of saline formol 10%. Spread into histological slides were prepared from this solution and observed in a photomicroscope (Opton®) at 400X magnification. Two hundred spermatozoa were analyzed per animal. Morphological

analysis was classified into three general categories: normal morphology, head abnormalities (without characteristic curvature or isolated form, i.e., no tail attached) and tail abnormalities (broken, rolled into a spiral and isolated, i.e., no head attached). This analysis was performed as described by Fernandes et al (2007).

## **2.4 Histological processing**

The left testis (5 per group) was removed, fixed in Metacarn (60% methanol, 30% chloroform, 10% acetic acid), embedded in Paraplast® (Sigma-Aldrich) and sectioned (three nonconsecutive sections per animal, 5 µm thick, 100 µm distance among sections). The sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and examined for the following analysis:

### **2.4.1 Histopathological and morphometric analysis**

One hundred random tubular images per animal in the testis cross-sections were observed for histopathological analysis, using an Opton® microscope (100X and 400X magnifications). The seminiferous tubules were classified in normal or abnormal, according to cells present in the seminiferous tubules (immature germ cells in the lumen, acidophilic cells and vacuolization). Seminiferous tubule diameters were measured using Opton® photomicroscope (400X magnification) and BELview software (version 6.2.3.0 for Windows). For this, ten tubular cross-sections, per animal, in stage IX of the seminiferous epithelium cycle, were examined. Likewise, the seminiferous epithelium height was measured using the same tubules and methodology mention above. In each seminiferous tubule the mean of four measures for diameters and height was calculated and used in the statistical analysis according to Punhagui et al. (2016).

#### **2.4.2 Spermatogenesis kinetics and Sertoli cells number**

For evaluation of spermatogenesis kinetics, one hundred random tubular images per animal were classified into four categories: Stages I–VI, VII–VIII, IX–XIII and XIV of the seminiferous epithelium cycle, according to Leblond and Clermont (1952) under a light microscope (Opton®) at 100X and 400X magnifications. Nuclei of Sertoli cells were counted in 20 cross-sections of seminiferous tubules per rat, under a light microscope, at 400X magnification (Guerra, et al., 2016).

#### **2.5. Myeloperoxidase (MPO) activity**

The neutrophil migration to testis was indirectly evaluated by the MPO activity kinetic-colorimetric assay as previously described by Bradley et al (1982). MPO is an enzyme abundantly present in the azurophilic granules of neutrophils. Briefly, left testis were collected in 400 µL of 50 mM K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 6.0) containing 0.5% HTAB and kept at -80°C until use. Samples were homogenized using Ultra-Turrax® (IKA T10 Basic, CQA Química, Paulínea, SP). Then the homogenates were centrifuged at 16,100 g for 12 minutes at 4°C. Fifteen µL of the resulting supernatant was mixed with 200 µL of 50 mM phosphate buffer, pH 6.0, containing 0.167 mg/mL o-dianisidine dihydrochloride and 0.05% hydrogen peroxide and was assayed spectrophotometrically for MPO activity determination at 450 nm (BEL SP2000UV, Photonics, São Paulo, SP, Brazil). The results of MPO activity were expressed as the number of neutrophils per mg of tissue by using a standard curve of neutrophils (196 – 200,000 cells).

#### **2.6 N-acetyl-β-D-glucosaminide (NAG) activity**

NAG (N-acetyl-β-D-glucosaminidase) activity was determined by an adapted colorimetric method previously described by Pinho-Ribeiro et al (2015) in testicular

tissue. Briefly, the supernatants (20  $\mu$ L), obtained in the MPO activity assay, were placed in a 96-well plate and mixed with  $K_2HPO_4$  buffer (80  $\mu$ L, 50 mM, pH 6.0). The reaction was initiated by the addition of  $K_2HPO_4$  buffer (100  $\mu$ L, 50 mM, pH 6.0) containing 4-nitrophenyl N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide substrate (2.24 mM). The plate was incubated at 37 °C for 10 min, and glycine buffer (100  $\mu$ L, 0.2 M pH 10.6) was added. The enzymatic activity was determined spectrophotometrically at 400 nm (Multiskan GO ThermoScientific). The results of NAG activity are expressed as the number of macrophages per mg of tissue by using a standard curve of macrophages (97 – 100,000 cells).

## **2.7 Determination of Cytokine (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-10)**

### **Production**

Left testis were frozen in liquid nitrogen, stored at  $-80$  °C and samples were homogenized in sterile saline, centrifuged (3000 rpm, 4 °C, 10 min) and the supernatant used to assess the production of the cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-10 by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) using eBioscience kits (Affymetrix Bioscience, San Diego, USA). The test was performed according to the manufacturer's guidelines. The results were obtained by comparing the densities of optical density curves and standards expressed in pg of cytokines per mg of protein.

## **2.8 Immunohistochemistry (IHC) for androgen receptor (AR)**

Androgen receptor (AR) (1:100/SC-816, rabbit polyclonal IgG, epitope mapping at the N-terminus of AR; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) primary antibodies were used for IHC assay. The right testis were fixed in Metacarn (60% methanol, 30% chloroform, 10% acetic acid), dehydrated in alcohol and embedded in

Paraplast®. The sections (three nonconsecutive sections per animal, 5 µm thick, 100 µm distance among sections) were dewaxed using xylene and rehydrated in graded alcohol and distilled water. Antigen retrieval was conducted in sodium citrate buffer (pH = 6.0) at high temperature (~100 °C) by steam cooker during 15 min. After washing to distilled water, endogenous peroxidase activity was blocked with 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 30 min, followed by a quick rinse in distilled water and PBS and then incubated in for 1 h to block non-specific binding. Sections were incubated with the primary antibody at 4 °C overnight. The slides were then washed three times with PBST (0,5% of triton plus PBS) and incubated for 2 hours with peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (1:200/SC-2004; Santa Cruz Biotechnology, Inc.). After washing, the sections were incubated for 5 minutes with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substrate solution and finally counterstained with Harris's haematoxylin. As a negative control, the primary antibody was replaced with the corresponding normal isotype serum. The nuclei of Sertoli cells stained were counted in histological cuts from the testis of rats in 20 seminiferous tubules per rat at stage VII of spermatogenesis.

## **2.10 Statistical analysis**

One-way ANOVA, with the post hoc Tukey test or the non-parametric Kruskal-wallis test with the Dunn post hoc, according to the data distribution were utilized to compare the results among the experimental groups. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ . The statistical analyses were performed by GraphPad Prism (version 5.0).

## **3. RESULTS**

### **3.1 Body weight evolution, testis and seminal vesicle weights**

The evolution of body weight is shown in Fig. 1. At the end of the experimental period, the body weight was significantly reduced ( $p < 0.05$ ) in AL34 group in relation to C and AL7 groups. There were no significant differences between the AL and control groups in absolute or relative weights of the testis and seminal vesicle (full and empty) as shown in Table 1.

### **3.2 Sperm parameters**

The sperm count analysis (Table 1) showed that exposure to 34mg/Kg  $AlCl_3$  caused a significant reduction ( $p < 0.05$ ) in the DSP, absolute and relative (concentration) number of mature spermatids in the testis in relation to control and AL7 groups.

### **3.3 Testicular morphometric and histopathological analysis**

The testicular morphometric values are shown in Table 2. Seminiferous tubular diameter and seminiferous epithelium height were not affected by the aluminium treated since these parameters were similar among experimental groups. However the histopathological analysis of the testicular tissue evidenced that AL34 group presented a significant decrease in the number of normal seminiferous tubules, as well as an increase in the number of abnormal tubules in relation to C and AL7 groups. The abnormalities found were immature cells in the lumen of the seminiferous tubule and Sertoli cell vacuolation (Fig. 2). The sperm morphology showed a significant decrease in the number of normal spermatozoa in AL7 group in relation to C and AL34 groups ( $C = 82,17 \pm 7.63$ ;  $AL7 = 68.05 \pm 10.96$ ;  $AL34 = 78.00 \pm 9.22$  - Mean  $\pm$  SEM,  $p < 0.05$ ) and consequently an increase in the number of abnormal spermatozoa ( $C = 17.83 \pm 7.63$ ;  $AL7 = 31.94 \pm 10.96$ ;  $AL34 = 22.00 \pm 9.22$  - Mean  $\pm$  SEM,  $p < 0.05$ ).

### **3.4 Spermatogenesis kinetics and Sertoli cells number**

The results are present in table 3. Aluminium exposure induced a significant reduction in the percentage of seminiferous tubules in stages VII and VIII and significant increase of stage XIV of spermatogenesis in relation to control group. The percentage of the stages I to VI and IX to XIII were statistically similar among all experimental groups. The Sertoli cells number were decreased in AL34 group ( $p<0.05$ ) in relations to other groups (Table 3).

### **3.5 MPO and NAG activity**

No effects were observed at the dose of 7 mg/kg of  $AlCl_3$  in the neutrophil migration in the testis, however at the dose of 34 mg/kg induced increase of neutrophil recruitment (MPO activity) in relation to control group (Fig. 3A). The macrophage recruitment to testicular tissue was not affected by aluminium treatment since the NAG activity was similar among experimental groups (Fig. 3B).

### **3.6. Determination of Cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$ )**

#### **Production**

There were no significant differences among the experimental groups in IL-1 $\beta$  and IL-6 levels (Fig. 4A,B). The level of IL-10 cytokine was increase ( $p<0.05$ ) in the AL7 group compared with the C and AL34 group (Fig. 4C). On the other hand, it was observed a increase in TNF- $\alpha$  levels ( $p<0.05$ ) in AL34 group (Fig. 4D).

### **3.8 Immunohistochemistry**

AR staining was found in Sertoli cells and Leydig cells (Fig. 2). In relation to control group, the number of Sertoli cells stained was decreased ( $p < 0.05$ ) in AL7 and AL34 group (Fig. 5).

### **4. Discussion**

Metals exposure during the peripubertal period may result in adverse consequences that may be visible as of puberty, and may continue into later adult life (Golub, Keen, 1999). Several studies demonstrated the toxic effects of aluminium in human and laboratory animals and the accumulation capacity in target organs like brain, bone, liver, kidney and testis (Khattab, 2007, Kutlubay, et al., 2007, Hala et al., 2010). On the other hand, there are no reports of the effects of aluminium exposure on the reproductive system in peripubertal animals.

In this experiment, the decrease in the final body weight in AL34 group is in accordance with those obtained by Hala et al. (2010) who found that  $AlCl_3$  administration (20 mg/Kg) via gavage for 70 days decrease final body weight and body weight gain in adult animals. It was reported that adult animals exposed to chronic doses of aluminium consumed less food and water, besides presenting diarrhea (Kowalczyk et al., 2004). Testis and seminal vesicle weights showed no differences among the experimental groups, that was consistent with the observations of others (Guo et al., 2002, Guo et al., 2009, Moselhy et al., 2012). On the other hand, in adult rats previous study demonstrated that a long period of Al exposure (20 mg/Kg orally), in adult animals, for 70 days resulted in testes weight decrease (Hala et al., 2010).

The significant decrease in sperm count and daily sperm production in the AL34 group and the increase in abnormal sperm observed only in the AL7 group is in

agreement with previous studies that documented in Al-treated adult rats decrease in sperm concentration (20mg/Kg AlCl<sub>3</sub> bw, during 70 days) (Hala et al., 2010) and increase in dead and abnormal sperm (34mg/Kg AlCl<sub>3</sub> bw, during 70 days) (Yousef et al., 2009). Several authors (Yousef et al., 2009, Hala et al., 2010, Moselhy et al., 2012) suggest the the severe reduction in male fertility following aluminium administrations may be result from decrease on testosterone concentrations and aluminium accumulation in the testis. However our results showed that the administration of AlCl<sub>3</sub>, in both doses, did not affect the serum testosterone levels (unpublished data). On the other hand, Sertoli cells number and the number of AR-positive Sertoli cells were decreased in AL34 group (p<0.05). Thus, these events can be explain the reduction in parameters of the sperm counts. AR plays an importante role in androgen action and male fertilyr, as promotion of development and maintenance of male phenotype and reproductive function (Li, Farook, 2009, Sun et al., 2011). It has been proved that AR gene mutations or deletions have been linked to genital malformations (Sun et al., 2011) and male infertility (Chang et al., 2003).

The immature germ cells in the seminiferous tubules lumen and Sertoli cell vacuolation corroboration to previous studies showed that Aluminium induced degeneration and necrosis of germ cells (Hala et al., 2010), accumulation of exfoliated germ cells (Khattab, 2007), interstitial edema (Yousef, Salama, 2009) and complete absence of germ cells (Moselhy et al., 2012) in adult rats. Histological perturbation in adult rats testis were observed by Khattab (2007) including severe damage in seminiferous tubules and vacuolar degeneration in spermatogenic and Sertoli cells after AlCl<sub>3</sub> intraperitoneal injection (15 and 30mg/Kg) for five weeks. Moselhy et al. (2012) detected degenerative changes with focal areas of necrosed spermatogenic cells, after 30 days of AlCl<sub>3</sub> orally exposure (34mg/Kg) and this state aggravated after 45 and 60 days in adult rats.

Several studies suggest that male reproductive disorders induced by aluminium might be associated to increased oxidative stress and changes in the blood-testis barrier (BTB) (Hala et al., 2010, Pandey, Jaim, 2013). The BTB is essential to preserve a microenvironment to the development of germ cells and protect these from the systemic circulation and anti-sperm antibodies (Pandey, Jaim, 2013).

The increase in MPO activity in AL34 group indicated that neutrophils were recruited to testes. The recruited neutrophils is associated to proinflammatory cytokines production as IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  (Fattori et al., 2016). There are no reports in the literature about the effects of aluminum on cytokine levels in the testis and few studies have investigated the effects of aluminum on the inflammatory response. Cao et al., (2015) observed neuroinflammation and cognition impairment in adult rats orally exposed to AlCl<sub>3</sub> (50, 150 and 450 mg/Kg for 90 days), as a result of an increase on TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 levels in the hippocampus. Similarly, balb/C mice, intraperitoneally exposed (16 h) to AlCl<sub>3</sub> (25mg/Kg) presented an increase of inflammatory cytokine IL-6 concentration in serum (Viezeliene et al., 2013; Ozturk et al., 2014). In our study, IL-10 cytokine levels were increase in AL7 group testes. IL-10 levels elevation has been shown to reduce inflammation and spermatogenic damage in mouse model of autoimmune orchitis, in addition to limiting local increase in superoxide anion (Watanabe et al., 2005). Thus, we suggest that the increase in IL-10 levels in AL7 group may be contributed to protect testis from aluminium toxicity in these animals that not has been observed in AL34 group which there was impaired in sperm counts and histological alterations.

On the other hand, TNF- $\alpha$  levels were increased in AL34 group. In testes, this cytokine is known for regulate diferent cellular processes associated to spermatogenesis and cell adhesion in seminiferous epithelium (Jacobo et al., 2011). However recent *in*

*vitro* studies have demonstrated that increase in TNF- $\alpha$  levels perturb the Sertoli cell tight junction (TJ)-permeability barrier (Siu et al., 2003). The authors also reported claudin-11 and occludin (TJ integral membrane proteins), productions by Sertoly cells, can be inhibited by TNF- $\alpha$ , inducing a temporal and spatial disrution of the BTB. This in turn causes damage in germ and Sertoli cells, damaging the seminiferous epithelium thus altering normal spermatogenesis and sperm production (Hala, et al., 2010).

## **5. Conclusion**

In the current study, it was concluded that aluminum chloride, at both doses, impair sperm parameters and testicular development in peripubertal rats, and cytokines could be the mechanism action for this toxic substance.

## REFERENCES

- Akinola, O.B., Biliaminu, S.A., Adedeji, O.G., Oluwaseun, B.S., Olawouin, O.M., Adelabu, T.A., 2016. Combined effects of chronic hyperglycaemia and oral aluminium intoxication on testicular tissue and some male reproductive parameters in Wistar rat. *Andrologia*, 48(7), 779-786.
- Berihu, B.A., 2015. Histological and functional effects of aluminium on male reproductive system. *IJPSR*, 6(8), 1122-1132.
- Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G., 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 78, 206–9.
- Cao, Z., Yuang, X., Zhang, H., Wang, H., Huang, W., Xu, F., Zhuang, C., Wang, X., Li, Y., 2016. Aluminium chloride induces neuroinflammation, loss of neural dendritic spine and cognition impairment in developing rat. *Chemosphere.* 15, 289-295.
- Chang, C.S., Chen, Y.T., Yeh, S.D., Xu, Q.Q., Wang, R.S., Guillou, F., 2004. Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci.* 101, 6876–6881.
- Fattori, V., Amaral, F.A., Verri Jr, W.A., 2016. Neutrophil and arthritis: Role in disease and pharmacological perspectives. *Pharmacol. Res.* 112, 84-98.
- Fernandes, G. S., Arena, A. C., Fernandez, C. D., Mercadante, A., Barbisan, L. F., & Kempinas, W. G., 2007. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reproductive Toxicology*, 23(1), 106-112.
- Golub, M.S., Collman, G.W., Foster, P.M.D., Immel, C.A., Meyts, E.R., Reiter, E.O., Sharpe, R.M., Skakkebaek, N.E., Toppari, J., 2008. Public Health Implications of Altered Puberty Timing. *Pediatrics.* 121(3), 218-230.
- Guerra, M.T., Sanabria, M., Leite, G.A., Borges, C.S., Cuciolo, M.S., Anselmo-Franci, J.A., Foster, W.G., Kempinas, W.G., 2017. Maternal exposure to butyl paraben impairs testicular structure and sperm quality on male rats. *Environ Toxicol.* 32(4):1273-1289.
- Guo, C.H., Hsu, G-S.W., Chuang, C.J., Chen, P.C., 2009. Aluminium accumulation induced testicular oxidative stress and altered selenium metabolism in mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 27, 176-181.
- Guo, C.H., Huang, C.J., Chiou, Y.L., Hsu, G-S.W., 2002. Alteration of trace element distribution and testis ACE activity in mice with high peritoneal aluminum. *Biol. Trace Elem. Res.* 86, 145–157.
- Guo, C.H., Lu, Y.F., Hsu, G-S.W., 2005. The influence of aluminum exposure on male reproduction and offspring in mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20, 135–141.
- Hala, A.H.K., Inas, Z.A.A., Gehan, M.K., 2010. Grape seed extract alleviate reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *J Am Sci.* 6(12), 1200-1209.
- Harden, K.P., Kretsch, N., Moore, S.R., Mendle, J., 2014. Descriptive review: Hormonal influences on risk for eating disorder symptoms during puberty and adolescence. *International Journal of Eating Disorders.* Advance online publication.

- Ige, S.F., Akhigbe, R.E., 2012. The role of *Allium cepa* on aluminum-induced reproductive dysfunction in experimental male rat models, *J. Hum. Reprod. Sci.* 5, 200-205.
- Khatab, F.K.I., 2007. Histological and ultrastructural studies on the testis of rat after treatment with aluminium chloride, *Aust. J. Basic & Appl. Sci.* 1, 63-72.
- Kowalczyk, E., Kopffl, A., Kędziora<sup>1</sup>, J., Błaszczyk, J., Kopffl, M., Niedworok, J. and Fijałkowski, P., 2004. Effect of long-term aluminium chloride intoxication on selected biochemical parameters and oxidative-antioxidative balance in experimental animals. *Pol. J. Environ. Stud.* 13(1), 41-43.
- Kutlubay, R., Oguz, E.O., Can, B., Guven, M.C., Sunk, Z., Tunkay, L., 2007. Vitamin E protection from testicular damage caused by intraperitoneal aluminium. *Int. J. Toxicol.* 26, 297-306.
- Leblond, C.P., Clermont, Y., 1952. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid? *Am. J. Anat.* 90, 167-215.
- Li, J., Farook, A.A., 2009. Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas.* 63, 142–148.
- Llobet, J.M., Domingo, J.M., Gómez, M., Tomás, J.M., Corbella, J. 1987. Acute toxicity studies of aluminium compounds: antidotal efficacy of several chelating agents. *Pharmacology & Toxicology.* 60, 280-283.
- Moselhy, W.A., Helmy, N.A., Abdel-Hali, B.R., Nabil, T.M., Abdel-Hamid, M.I., 2012. Role of ginger against the reproductive toxicity of aluminum chloride in albino male rats. *Reprod Domest Anim.* 47, 335–43.
- Ojeda, R.S.; Urbanski, H.F. Puberty in the rat. In: Knobil, E.; Neill, J.D. 1994. *The physiology of reproduction.* New York: Raven, 363-397.
- Ojeda, S.R., Andrews, W.W, Advis, J.P., Smith-White, S., 1980. Recent advances in the endocrinology of puberty. *Endocr Rev.* 1(3), 228–257.
- Ozturk, H., Ozturk, H., Terzi, E.H., Bugdayci, G., Duran, A., 2014. Interleukin 10 reduces testicular damage in experimental testicular ischemia/reperfusion injury. *Urology.* 83, 508e1-508e6.
- Pandey, G., Jain, G.C., 2013. A review on toxic effects of aluminium exposure on male reproductive system and probable mechanisms of toxicity. *International Journal of Toxicology and Applied Pharmacology.* 3(3), 48-57.
- Pinho-Ribeiro, F.A., Hohmann, M.S., Borghi, S.M., Zarpelon, A.C., Guazelli, C.F., Manchope, M.F., 2015. Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF-kappaB. *Chem Biol Interact.* 228, 88–99.
- Punhagui, A.P.F., Vieira, H.R., Siervo, G.E.M.L., Rosa, R., Fernandes, G.S.A.F., 2016. Ethanol exposure during peripubertal period increases the mast cell number and impairs meiotic and spermatogenic parameters in adult male rats. *Microsc Res Tech.* 79(6): 541-9.
- Robb, G.W., Amman, R.P., Killian, G.J., 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J. Reprod. Fertil.* 54 (1), 103–107.

- Siervo, G.E., Vieira, H.R., Ogo, F.M., Fernandes, C.D., Gonçalves, G.D., Mesquita, S.F., Anselmo-Frani, J.A., Cecchini, R., Guarnier, F.A., Fernandes, G.S., 2015. Spermatic and testicular damages in rats exposed to ethanol: influence of lipid peroxidation but not testosterone. *Toxicology* 330:1-8.
- Siu, M.K.Y., Lee, W.M., Cheng, C.Y. 2003. The interplay of collagen IV, tumor necrosis factor- $\alpha$ , gelatinase B (matrix metalloprotease-9), and tissue inhibitor of metalloprotease-1 in the basal lamina regulates Sertoli cell-tight junction dynamics in the rat testis. *Endocrinology*, 144, 371–387.
- Sun, H., Hu, C., Jia, L., Zhu, Y., Zhao, H., Shao, B., Wang, N., Zhang, Z., Li, Y., 2011. Effects of Aluminum Exposure on Serum Sex Hormones and Androgen Receptor Expression in Male Rats. *Biol. Trace Elem. Res* 144, 1050-1058.
- Viezeliene, D., Beekhof, P., Gremmer, E., Rodovivius, H., Sadauskiene, I., Jansen, E., Ivanov, L., 2013. Selective induction of IL-6 by aluminium-induced oxidative stress can be prevented by selenium. *J Trace Elem Med Biol.* 27, 226-229.
- Watanabe, M., Kashiwakura, Y., Kusumi, N., Tamayose, K., Nasu, Y., Nagai, A., Shimada, T., Daida, H., Kumon, H., 2005. Adeno-associated virus-mediated human IL-10 gene transfer suppresses the development of experimental autoimmune orchitis. *Gene Ther.* 12, 1126–1132.
- Yousef, M.I., Salama, A.F., 2009. Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food and Chem. Toxicology.* 47, 1168-1175.
- Yuan, C.Y., Lee, Y.J., Hsu, G.S.W., 2012. Aluminium overload increases oxidative stress in four functional brain areas of neonatal rats. *J Biomed Sci.* 19(1), 51.
- Zhu, Y., Li, Y., Miao, L., Wang, Y., Liu, Y., Yan, X., Cui, X., Li, H., 2014. Immunotoxicity of aluminium. *Chemosphere*, 104, 1-6.

**Table 1**

Testis and seminal gland weights, sperm count and daily sperm production. Peripubertal rats were treated with AlCl<sub>3</sub> 7mg/kg/day or 34mg/kg/day (AL7 and AL34 respectively) or saline buffer (Control) (n=10/group)

	Control	AL7 mg/Kg	AL34 mg/Kg
Testis (g)	1.33±0.15	1.34±0.01	1.22±0.21
Seminal gland (full) (g)	0.87±0.18	0.87±0.17	0.71±0.24
Seminal gland (empty) (g)	0.45±0.08	0.48±0.11	0.56±0.22
Sperm counts			
Spermatid number in the testis (x10 <sup>6</sup> )	117.09 ± 19.32 <sup>a</sup>	113.28 ± 16.29 <sup>a</sup>	86.14 ± 21.52 <sup>b</sup>
Spermatid concentration in the testis (x10 <sup>6</sup> /g)	102.49 ± 14.38 <sup>a</sup>	97.70 ± 10.28 <sup>a</sup>	81.06 ± 22.62 <sup>b</sup>
Daily sperm production (x10 <sup>6</sup> /testis/ per day)	19.19 ± 3.17 <sup>a</sup>	18.57 ± 2.67 <sup>a</sup>	14.12 ± 3.53 <sup>b</sup>

Values expressed as mean ± SEM. ANOVA *post* Tukey. <sup>a,b</sup> Different letters indicate statistically significant differences among the groups (p<0.05).

**Table 2**

Morphometric and histopathological analysis. Peripubertal rats were treated with AlCl<sub>3</sub> 7mg/kg/day or 34mg/kg/day (AL7 and AL34 respectively) or saline buffer (Control). (n=5/group)

	<b>Control</b>	<b>AL7 mg/Kg</b>	<b>AL34 mg/Kg</b>
Seminiferous tubular diameter (µm)	271.87±21.04	263.67±4.37	269.30±14.32
Seminiferous epithelium height (µm)	89.37±5.53	88.21±7.53	84.92±2.51
Normal tubules	94.80±2.16 <sup>a</sup>	90.00±4.12 <sup>a</sup>	84.08±6.85 <sup>b</sup>
Abnormal tubules	5.20±2.17 <sup>a</sup>	10.00±4.12 <sup>a</sup>	16.00±6.86 <sup>b</sup>

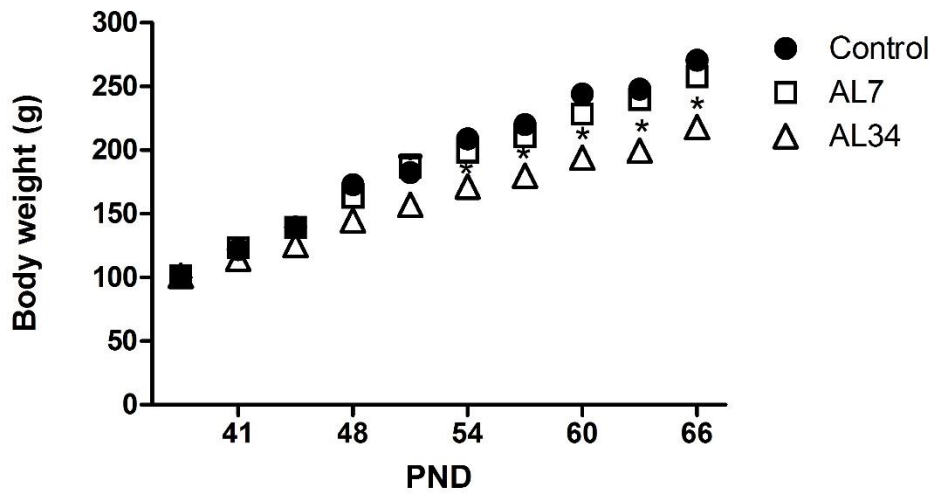
Values expressed as mean ± SEM. ANOVA *post* Tukey. <sup>a,b</sup> Different letters indicate statistically significant differences among the groups (p<0.05).

**Table 3.**

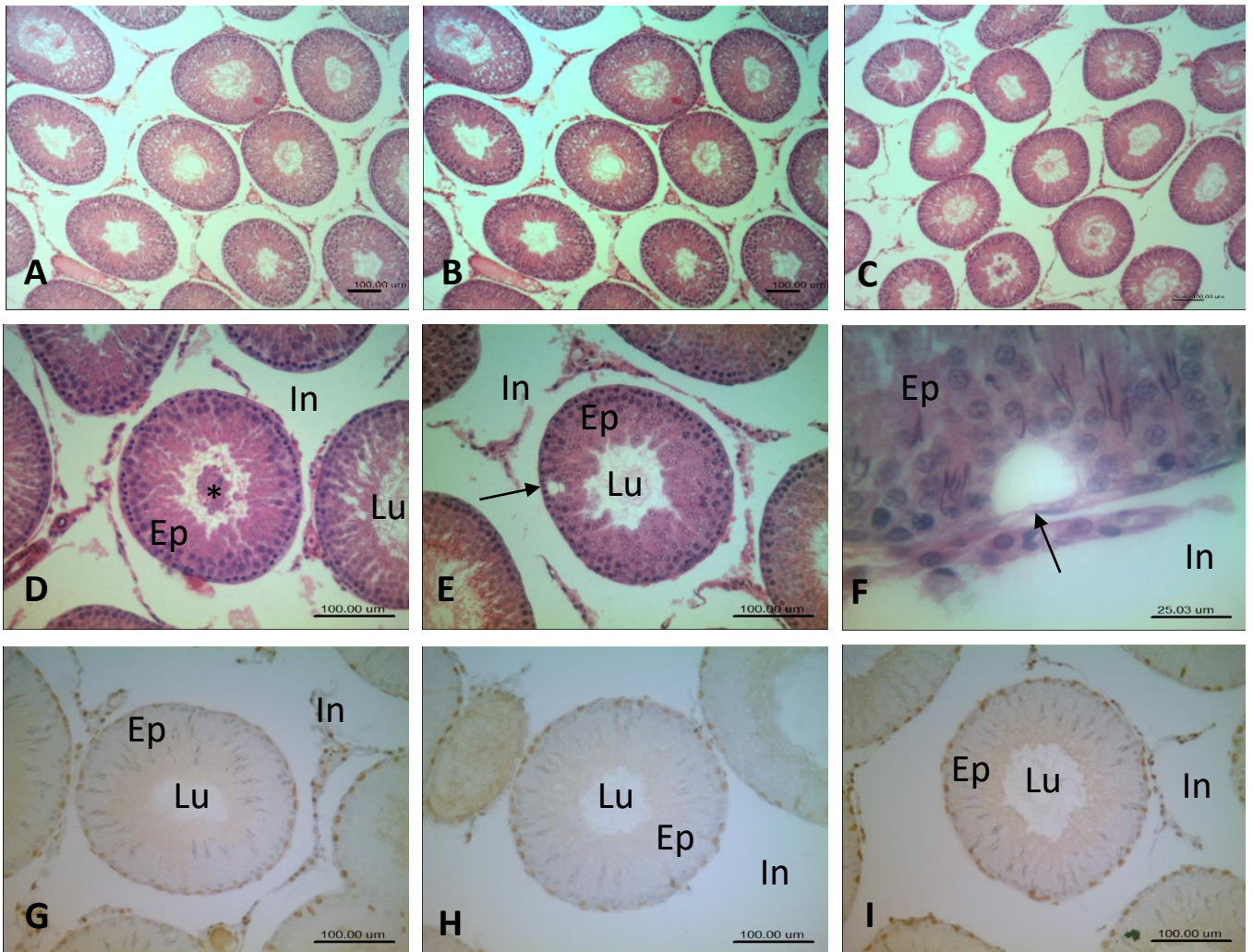
Spermatogenesis kinetics and Sertoli cells number. Peripubertal rats were treated with AlCl<sub>3</sub> 7mg/kg/day or 34mg/kg/day (AL7 and AL34 respectively) or saline buffer (Control) (n=5/group).

	Control	Al 7 mg/Kg	Al 34 mg/Kg
<sup>1</sup> I – VI (%)	34 [30-39]	36 [29-38]	34 [30-35]
<sup>1</sup> VII – VIII (%)	36 [29-38] <sup>a</sup>	24 [22-26] <sup>b</sup>	24 [22-28] <sup>b</sup>
<sup>1</sup> IX – XIII (%)	41 [33-42]	35 [33-38]	35 [33-42]
<sup>1</sup> XIV (%)	01 [0.5-02] <sup>a</sup>	05 [05-06] <sup>b</sup>	07 [02-07] <sup>b</sup>
<sup>2</sup> Sertoli cells number	23.8±3.70 <sup>a</sup>	21.6±1.51 <sup>a</sup>	18.8±2.17 <sup>b</sup>

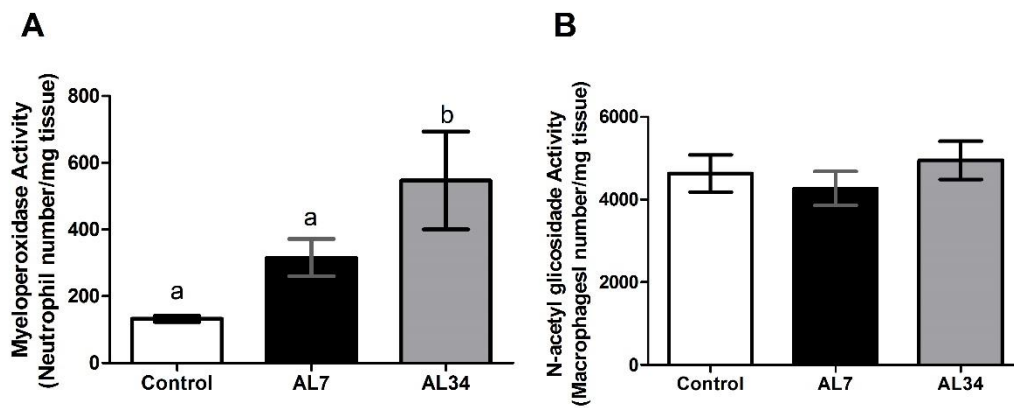
<sup>1</sup>Values expressed as median [Q1-Q3]. Kruskal Wallis *post* Dunn. <sup>2</sup>Values expressed as mean ± SEM. ANOVA *post* Tukey. <sup>a,b</sup> Different letters indicate statistically significant differences among the groups (p<0.05).



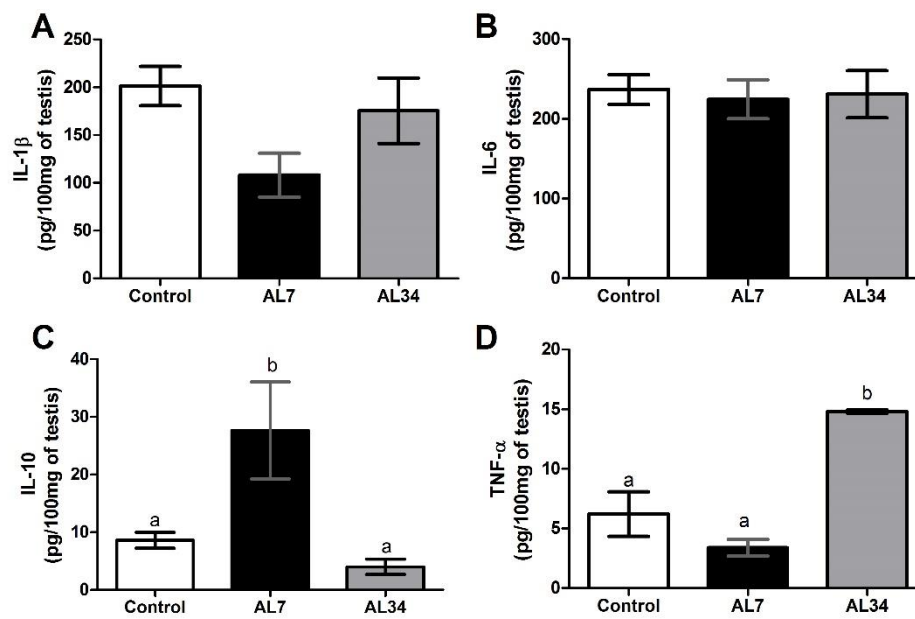
**Figure 1.** Body weight evolutions during experimental days (n=10/group). Peripubertal rats were treated with  $\text{AlCl}_3$  7mg/kg/day or 34mg/kg/day (AL 7 and AL 34 respectively) or saline buffer (Control). ANOVA *post* Tukey test \*( $p < 0.05$ ) AL34 in compared to control group.



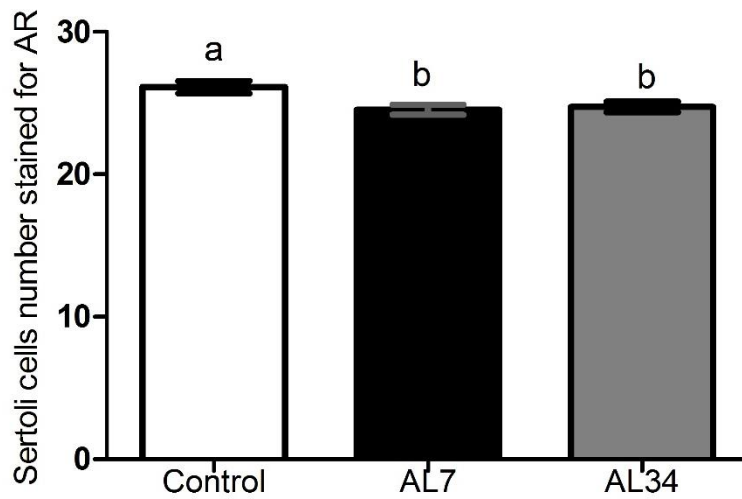
**Figure 2.** Light microscopy of testicular tissue (A-F) and immunostaining of AR in adult rat testis (G-I). Peripubertal rats were treated with  $\text{AlCl}_3$  7mg/kg/day or 34mg/kg/day (AL 7 and AL 34 respectively) or saline buffer (Control). A and G - Control group; Band H - Al 7 group; C,D-F,I - Al 34 group. (D) Presence of immature germ cells in the lumen (asterisk). (E and F) Sertoli Cell vacuolization (arrow). *Ep*: Seminiferous epithelium, *In*: interstitial tissue, *Lu*: Lumen, arrows: Sertoli cell vacuolization. (A-F) Hematoxiline and Eosin (HE).



**Figure 3.** (A) Myeloperoxidase (MPO) and (B) N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) activity (n=5/group). Rats were treated with AlCl<sub>3</sub> 7mg/kg/day or 34mg/kg/day (AL 7 and AL 34 respectively) or saline buffer (Control). Results are expressed as mean ± SEM. <sup>a,b</sup> Different letters indicate statistically significant differences among the groups (p<0.05).



**Figure 4.** (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-6, (C) IL-10 and (D) TNF- $\alpha$  levels were determined by ELISA. (n=5/group). Rats were treated with AlCl<sub>3</sub> 7mg/kg/day or 34mg/kg/day (AL 7 and AL 34 respectively) or saline buffer (Control). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. <sup>a,b</sup> Different letters indicate statistically significant differences among the groups (p<0.05).



**Figure 5.** Sertoli cell number stained for AR (n=5/group). Rats were treated with  $\text{AlCl}_3$  7mg/kg/day or 34mg/kg/day (AL 7 and AL 34 respectively) or saline buffer (Control). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. <sup>a,b</sup> Different letters indicate statistically significant differences among the groups ( $p < 0.05$ ).

## Artigo II

Alterações prostáticas induzidas pelo cloreto de alumínio em ratos machos durante o período peripuberal

Aluminum chloride-induced prostatic changes in male rats during the peripuberal period

Artigo será submetido à revista — Reproductive fertility and development -  
ISSN: 1031-3613, Fator de Impacto: 2.135. Qualis CAPES (Med II) = A1

## **Aluminum chloride-induced prostatic changes in male rats during the peripuberal period**

Franciely A.V. D. Leal<sup>A,B</sup>, Gessica D. Gonçalves<sup>A,B</sup>, João Gabriel M. Soncini<sup>A</sup>, Larissa Staurengo-Ferrari<sup>B</sup>, Victor Fatorri<sup>B</sup>, Waldiceu A. Verri<sup>B</sup>, Wellerson R. Scarano<sup>C</sup> and Glaura S.A. Fernandes<sup>A\*</sup>

<sup>A</sup>Department of General Biology, Biological Sciences Center, State University of Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brazil.

<sup>B</sup>Department of Pathology, Biological Sciences Center, State University of Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brazil.

<sup>C</sup>Department of Morphology, Institute of Biosciences, UNESP — Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil.

### **\*Corresponding author**

Dr. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes

Department of General Biology

State University of Londrina (UEL)

Rodovia Celso Garcia Cid Pr 445 Km 380, 86057-970

Londrina, PR, Brazil

Phone: +55 43 33714417

E-mail address: glaura@uel.br (G.S.A. Fernandes)

## **Abstract**

High levels of metals may cause serious consequences to the development and function in male genital system, directly acting on the reproductive organs, or indirectly, when acting in the neuroendocrine system. Aluminum (Al) is the third most prevalent element and the most abundant metal in the earth's crust. Puberty comprises a period of complex sexual development, involving physical, behavioral and hormonal changes, where sexual maturation occurs. The prostate is an accessory sexual gland which contributes to the production of nutrients, maintenance of the ionic gradient and pH of the seminal fluid. Recent studies have shown an association between exposure to Al and toxicity of the male reproductive system. Thus, the aim of this study was to evaluate whether exposure to Aluminum Chloride ( $\text{AlCl}_3$ ) during the peripubertal period may affect ventral prostate development in rats. Male Wistar rats (30 days old) were divided into three experimental groups where two groups received  $\text{AlCl}_3$  (diluted in sterile 0.9% saline solution (vehicle)) at a dose of 7 mg / kg (group AL7) or 34 mg / kg (group AL34) intraperitoneally of postnatal day (PND) 36 to 66 (peripubertal period); and the third group (Control) received only the vehicle. At PND 67 the animals were anesthetized, weighed and euthanized. Blood was collected for testosterone levels. Ventral prostate was removed and weighed. The ventral prostate were fixed and processed for histochemistry and immunohistochemistry to detect androgen (AR) and Ki67 antigens. Stereological, histopathological, mast cell count, myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl glucosidase (NAG) activity and cytokine IL-6 level were also performed. The AL34 group presented a reduction in body weight, compared to the other groups. There was no significant difference in prostate weight, number of granulated or degranulated mast cells and testosterone levels. In both AL7 and AL34, the relative proportions (%) of stromal compartment increased, while the luminal compartment decreased. For the histopathological analysis, no adaptive alterations, inflammatory or dysplastic prostatic lesions were observed in the experimental groups. There was an increase in MPO activity in the AL34 group, while NAG activity and IL-6 level were similar between groups. As far as we are aware, this is the first report in the literature showing that Aluminum Chloride could affect some aspects in peripubertal prostatic development in rats.

**Key words:** Aluminium chloride, ventral prostate, sperm parameters, androgen receptor.

## **1. Introduction**

People are constantly exposed to environmental contaminants from industrial processes, through air, food, water or contact with a variety of consumer products. Aluminum (Al) is the most widely distributed metal in the environment and the third most abundant element in the earth's crust. Although aluminum is not known to be essential for life processes, it is known to cause toxicity to a variety of organ systems including the brain, the bones, the kidneys, and blood (Ganrot, 1986; Akinola et al., 2015; Kutlubay, et al., 2007). Toxicity caused by environmental exposure to metals during the peripubertal period has raised questions about adult life (Golub et al., 2008). However, the effect of aluminum on the prostatic tissue during the peripubertal period is not yet known.

The prostate is an accessory gland of the male urogenital system that contributes to the production of nutrients for the seminal fluid and promotes the maintenance of the ionic gradient and appropriate pH in this secretion (Untergasser et al., 1999). This organ is an androgen-dependent gland and testosterone presents a central role in the maintenance of prostatic tissue and can regulate the growth and differentiation of different types of epithelial cells, either directly or indirectly, via stroma (Aumüller and Seitz, 1990). In rats, the prostate is divided into three lobes, the ventral lobe being the most responsive to androgens, and therefore the most used in studies focusing on prostatic lesions (Scarano, et al., 2009).

Puberty is a period in which changes occur in the hormonal profile, specifically in the steroids synthesis and secretion and comprises a complex sexual development, involving physical, behavioral and sexual maturation (Golub et al., 2008; Ojeda, Urbanski, 1994); therefore, changes in these events can compromise the reproduction of the individual in adult life (Harden et al., 2014).

Investigations in human and experimental animals have showed that aluminium able to induce toxic effects in the male reproductive system, especially in the testes and epididymis, (Zhu et al., 2014; Guo et al., 2009; Berihu, 2015) but little is known about aluminium the effects on the prostate in peripubertal animals. Thus, the present study aims to evaluate the morphology and inflammation profile of the ventral prostate, as well as the testosterone level of rats exposed to aluminium chloride during peripubertal period.

## **2. Material and methods**

### **2.1 Experimental protocol**

Male Wistar rats (30 days old) were used for the study. Animals were obtained from Animal House of Biological Sciences Center, State University of Londrina (CCB-UEL), Paraná, Brazil and acclimated to the new environment for five days before the beginning of the period experimental. Rats were allocated in polypropylene cages (43 cm × 30 cm × 15 cm) and maintained under controlled temperature ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and lighting conditions (12:12-h photoperiod). Rat chow and water were provided *ad libitum*. There were provided with standart comercial laboratory chow and tap water *ad libitum*. The experimental protocol followed the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazillian Brazillian Council for Control of Animal Experimentation and it were approved by the Ethics Committee on Animal Use of State University of Londrina (CEUA/UEL protocol number 2430.2015.47).

### **2.2 Experimental design**

Rats were randomly assigned into three groups ( $n = 10$ ): AL7 (7mg/Kg bw, 1/100LD50), AL34 (34mg/Kg bw, 1/20LD50) and Control (C). These doses were selected according to Guo et al. (2006) and administrated from post natal day (PND) 36

to PND 66. The peripubertal period was selected according to Ojeda et al. (1980). Thus, the animals received 7 mg/Kg or 34mg/Kg b.w. ( $AlCl_3$ , CAS no. 7446-70-0, Sigma-Aldrich Co®, USA) by intraperitoneal injections, diluted in saline buffer 0,9% (vehicle), or just the vehicle to control group.

### **2.3 Body and ventral prostate weights**

On the 31st experimental day (PND 67) all rats were weighed and anesthetized with a combination of ketamine (Dopalen®, Ceva, Paulínia, Brazil - 10mg/kg, intramuscular) and xylazine (Sedomin®, König, Avellaneda, Argentina - 2mg/kg, intramuscular) and euthanized by diaphragmatic rupture. Ventral prostate (VP) was removed and its weight was determined. Prostate were used for histopathological and stereological analysis (n=5/group), and inflammatory profile (n=5/group).

### **2.4 Plasma testosterone levels**

Blood plasma was collected (between 9:00 and 11:30 am) and stored in freezer at -20°C for determinations of testosterone levels, according to chemiluminescence assay (2nd Generation Testosterone, Architect System, Abbott, Wiesbaden, Germany), according to the manufacturer's recommendations.

### **2.5 Histopathological and stereological analysis**

The ventral prostate was removed, fixed in Methacarn (60% methanol, 30% chloroform, 10% acetic acid) for two hours and kept in 70% ethanol. Next, the tissues were dehydrated in graded ethanol and were embedded in Paraplast® and sectioned (three nonconsecutive sections per animal, at 5 µm thick, 100 µm distance among sections). The sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and examined for general

histopathological and stereological analysis as described to De Melo Neto et al (2015). For histopathological analyses were carried out on Opton® microscope (100x and 400x magnification). In stereological analysis, 10 random ventral prostate histologic fields per animal were captured using a photomicroscope (Opton®) and BELView® Software (version 6.2.3.0 for Windows) in 400x magnifications and analyzed. This analyses were obtained by Weibel's multipurpose graticulate, with 168 points (Weibel, 1963) to compare the relative proportions among the prostatic components (epithelium, stroma and lumen) in the experimental groups.

## **2.6 Mast Cell Count**

Mast cell count analysis was performed as described by Mendes et al. (2011). Tissue sections of the ventral prostate were stained with 1% toluidine blue to mast cells identification. Since the granules within mast cells contain heparin and sulfated glycosaminoglycan, they were stained metachromatically using toluidine blue to evaluate and quantify the intact and degranulated mast cells. Were captured and analyzed 10 random ventral prostate cross-sections per animal using a photomicroscope (Opton®) and BELView® Software (version 6.2.3.0 for Windows) in 400x magnification. All fields analyzed contained mast cells (MC) classified into: intact MC and degranulated MC. The MC number found in all the photomicrographs was counted accordingly per animal.

## **2.7 Myeloperoxidase (MPO) activity**

The neutrophil migration to ventral prostate was indirectly evaluated by the MPO activity kinetic-colorimetric assay as previously described by Bradley et al (1982). MPO is an enzyme abundantly present in the azurophilic granules of neutrophils. Briefly, ventral prostate was collected in 400 µL of 50 mM K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 6.0) containing

0.5% HTAB and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Samples were homogenized using Ultra-Turrax<sup>®</sup> (IKA T10 Basic, CQA Química, Paulínea, SP). Then the homogenates were centrifuged at 16,100 g for 12 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$ . Fifteen  $\mu\text{L}$  of the resulting supernatant was mixed with 200  $\mu\text{L}$  of 50 mM phosphate buffer, pH 6.0, containing 0.167 mg/mL o-dianisidine dihydrochloride and 0.05% hydrogen peroxide and was assayed spectrophotometrically for MPO activity determination at 450 nm (BEL SP2000UV, Photonics, São Paulo, SP, Brazil). The results of MPO activity were expressed as the number of neutrophils per mg of tissue by using a standard curve of neutrophils (196 – 200,000 cells).

### **2.8 NAG activity**

NAG (N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase) activity was determined by an adapted colorimetric method previously described by Pinho-Ribeiro et al (2015). Briefly, the supernatants (20  $\mu\text{L}$ ), obtained in the MPO activity assay, were placed in a 96-well plate and mixed with  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  buffer (80  $\mu\text{L}$ , 50 mM, pH 6.0). The reaction was initiated by the addition of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  buffer (100  $\mu\text{L}$ , 50 mM, pH 6.0) containing 4-nitrophenyl N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide substrate (2.24 mM). The plate was incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 10 min, and glycine buffer (100  $\mu\text{L}$ , 0.2 M pH 10.6) was added. The enzymatic activity was determined spectrophotometrically at 400 nm (Multiskan GO ThermoScientific). The results of NAG activity are expressed as the number of macrophages per mg of tissue by using a standard curve of macrophages (97 – 100,000 cells).

### **2.9 Determination of IL-6 Production**

Ventral prostate from the control and treated groups were removed and frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Part of the samples were homogenized and

centrifuged (3000 rpm, 4 °C, 10 min) and the supernatant used to assess the production of the cytokine IL-6 by ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) using eBioscience kits (Affymetrix Bioscience, San Diego, USA). The test was performed according to the manufacturer's guidelines. The results were obtained by comparing the densities of optical density curves and standards expressed in pg of cytokines per mg of protein.

## **2.10 Immunohistochemistry**

Androgen receptor (AR) (1:100/SC-816, rabbit polyclonal IgG, epitope mapping at the N-terminus of AR; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and Ki67 (1:100/ab16667; Ki67 – Proliferation Marker, abcam®, Cambridge, MA, USA) primary antibodies were used for IHC assay. Histologic sections from distal part of ventral prostate (5µm) were dewaxed and then rehydrated in graded alcohol and distilled water. Antigen retrieval was conducted in sodium citrate buffer (pH = 6.0) at high temperature (~100 °C) by steam cooker during 5 min. After washing to distilled water, endogenous peroxidase activity was blocked with 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 30 min, followed by a quick rinse in distilled water and PBS and then incubated in for 1 h to block non-specific binding. Sections were incubated with the primary antibody at 4 °C overnight. The slides were then washed with PBST (0,5% of triton plus PBS) and incubated for 2 hours with the secundar anti-rabbit antibody at 37 °C followed by peroxidase-conjugated avidin–biotin complexes and chromogen diaminobenzidine (DAB). The sections were finally counterstained with Harris's haematoxylin. As a negative control, the primary antibody was replaced with the corresponding normal isotype serum.

## **2.11 Proliferation index determination**

The number of epithelial cells marked by Ki67 was determined by counting all nuclei of 50 microscopic fields per group at 400× magnification (5 animals/group; 10 microscopic fields/animal). The proportion of epithelial proliferating cells was determined by dividing the number of stained cells by the number of cells analyzed and the value multiplied by 100 as previously described by Bernardo et al (2015).

## **2.12 Statistical analysis**

One-way ANOVA, with the post hoc Tukey test or the non-parametric Kruskal-wallis test with the Dunn post hoc, according to the data distribution were utilized to compare the results among the experimental groups. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ . The statistical analyses were performed by GraphPad Prism (version 5.0).

## **3 Results**

### **3.1 Body and prostate weight**

The final body weight was lesser ( $p < 0.05$ ) in AL34 group in relation to C and AL7 group. There were no significant differences between the treated and control groups in weights of the prostate as show in Table 1.

### **3.2 Plasma testosterone concentration**

Although plasma testosterone level were higher in the AL7 - treated groups (25%), the difference was not statistically significant ( $p > 0.05$ ) compared to the C group (Fig. 1).

### **3.3 Histopathological and stereological analysis**

The histological sections of the ventral prostate of the experimental groups showed regular architecture where the prostatic acini were rounded with the predominantly simple cubic epithelium, surrounded by a delicate fibromuscular stroma (Figure 2, D). The stereological values are shown in Table 1. The AL7 and AL34 groups presented a significant increase in stromal compartment followed by a decrease in luminal compartment from ventral prostate only in the AL34 group compared to control group. The epithelium was not modified by the treatments. For histopathological analysis, no adaptive alterations, inflammatory or dysplastic prostatic lesions were observed in the experimental groups.

### **3.4 Mast cell count**

There were no changes in the number of mast cells intact ( $C=6.0\pm 1.78$ ;  $AL7=6.0\pm 0.93$ ;  $AL34=5.0\pm 0.49$  - Mean $\pm$ SEM) and degranulated ( $C=8.0\pm 1.82$ ;  $AL7=10.0\pm 0.51$ ;  $AL34=12.0\pm 1.25$  - Mean $\pm$ SEM) in the prostate among the experimental groups.

### **3.6 MPO and NAG activity and IL-6 level**

The MPO activity in the prostate revealed a significant increase in the AL34 group in relation to others experimental groups (Figure 3,A). There were no significant differences among the treated and control groups in the NAG activity and IL-6 production in the prostate, as show in Figure 3, B,C.

### **3.7 Immunohistochemistry for AR and Ki67**

AR staining was found in prostatic epithelial cells (Figure 2, C-F). The index of cells stained were decreased ( $p < 0.05$ ) in AL34 group (Table 1) compare to control and AL7 groups. The Ki67 assay revealed that there was no significant differences in the proliferation index among the experimental groups.

#### **4 Discussion**

The AL34 group presented a reduction in body weight, compared to the other groups. There was no significant difference in prostate weight, number of granulated or degranulated mast cells and testosterone levels. In both AL7 and AL34, the relative proportions (%) of stromal compartment increased, while the luminal compartment decreased. There was an increase in MPO activity in the AL34 group, while NAG activity and IL-6 level were similar between groups. The significant reduction in the body weight gain in AL34 group corroborated with previous studies showed that  $AlCl_3$  exposure (orally 64.18, 128.36 and 256.72 mg/Kg BW, during 120 days) suppressed rats body weight gain in adult animals (Zhu et al., 2014). Kowalczyk et al. (2004) reported that animals (adult) orally exposed to chronic doses of aluminium (6.4mg/Kg for 3 months) consumed less water and food, in addition to presented transient diarrhea.

Administration of aluminium had no influence on weights of ventral prostate. These results come in accordance with those obtained by Moselhy et al., 2012 in adult animals, after 30, 45 and 60 days of  $AlCl_3$  orally exposure (34mg/Kg). Therefore, our results clearly show that aluminum chloride is capable of altering the body weight independently of the prostatic tissue.

In general, the VP of adult rats is composed of a group of glandular acini with simple columnar epithelium, surrounded by a stroma composed of a tenuous layer of vascular connective tissue, surrounded by smooth muscle cells (Santana et al., 2016).

There are no studies about the effects of aluminium on the VP in peripubertal animals. Treatment with aluminum in the peripubertal phase seems to retard the luminal development of prostatic acini appearing with the reduced lumen in the treated groups. These findings are in agreement with the obtained data by Moselhy et al. (2012), who reported histological changes as decrease in prostatic acini besides intra luminal secretions absence, after 45 and 60 days of  $AlCl_3$  in adult animals. For this reason, there is a relative increase of the stroma since the acini occupy less volume in the gland, which is also evident by the stereological analyzes. As the treatment occurred in the peripubertal stage, where the number of acini by budding had already been defined, it appears that the exposure interfered with the luminal growth of the acini, but not with the number of acini, since the relative epithelial component (stereology) was altered among the groups, which could indicate a higher number of acini by prostatic gland.

$AlCl_3$  induced significant increase in MPO activity in the AL34 group as compared to both control and AL7 group. However, the pro-inflammatory cytokine IL-6 level showed no alterations as well as NAG activity. Despite IL-6 levels were not altered, others proinflammatory cytokines, such as  $TNF-\alpha$ , could be involved in the development of an inflammatory microenvironment. IL-6 is associated with pathogenesis in prostate cancer, stimulating the initiation and promotion, while  $TNF-\alpha$  secretion by mast cells is related to death of tumor cells (Sfanos et al. 2014). However, in this study there were no changes in the number of intact and degranulated mast cell in the prostate.

Furthermore, the rat ventral prostate has also been demonstrated to be adequate for the testing of endocrine disruptors, given its extreme dependency on androgen stimulation and high susceptibility to estrogenic stimulation. During puberty, the VP shows a two-phase response to the increasingly testosterone levels: I) there is a clear activation of the secretory activity, manifested by the increase in the absolute volume of

the lumen; II) an increase in the volume of the epithelium, which takes place 2 weeks later (Vilamaior et al., 2006). Androgens act on androgen receptors to induce epithelial proliferation, ductal branching and epithelial cell differentiation (Cunha et al., 1993).

Several studies showed a decrease in testosterone levels after aluminium administration in adult animals (Hala et al., 2010; Moselhy et al., 2012; Reza, Palan, 2006) In the present work, we observed that the administration of AlCl<sub>3</sub> in both doses, did not affect the serum testosterone levels but the index of epithelial cells immunostaining for AR was lesser in the AL34 group compare the others experimental groups. Reduction in AR positive cells in AL34 was one of the factors that interfered in the acini growth and late differentiation. Testosterone binds to androgen receptors in the prostate gland having a role in prostate morphogenesis and proper prostate function (Alukal, Lepor, 2016; Datta, Tindall, 2013). The complex androgen-AR is translocated to the nucleus to regulate gene transcription, so changes in testosterone concentration or androgen receptor may induce prostatic damage.

## **5. Conclusion**

We conclude that aluminium chloride can interfere in the body weight gain and induce minor structural changes in the ventral prostate in peripubertal rats which can be associated with male infertility.

## **REFERENCES**

- Akinola, O.B., Biliaminu, S.A., Adedeji, O.G., Oluwaseun, B.S., Olawouin, O.M., Adelabu, T.A, 2016. Combined effects of chronic hyperglycaemia and oral aluminium intoxication on testicular tissue and some male reproductive parameters in Wistar rats. *Andrologia*, 48(7), 779-786.
- Alukal, J. P., & Lepor, H., 2016. Testosterone Deficiency and the Prostate. *Urologic Clinics of North America*, 43: 203-208.

- Ames, B. N., Gold, L. S. & Willett, W. C., 1995. The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 92, 5258–5265.
- Aumüller, G., & Seitz, J., 1990. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. *International review of cytology*, 121, 127-231.
- Berihu, B.A., 2015. Histological and functional effects of aluminium on male reproductive system. *IJPSR*, 6(8), 1122-1132.
- Bernardo, B.D., Brandt, J.Z., Grassi, T. F., Silveira, L. T., Scarano, W. R., Barbisan. 2015. Genistein reduces the noxious effects of in utero bisphenol A exposure on the rat prostate gland at weaning and in adulthood. *Food and Chemical Toxicology*, 84, 64-73.
- Bradley P.P., Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G., 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982;78:206–9.
- Coussens L.M., Werb Z., 2002. Inflammation and cancer. *Nature.* 420:860–867.
- Datta, K., & Tindall, D. J., 2013. Endocrine mechanisms, androgen receptor and carcinogenesis, and hormone escape. In *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective* (pp. 35-41). Springer London.
- De Melo Neto JS, de Campos Gomes F, Pinheiro PFF, Pereira S, Scarano WR, Favaro WJ & Domeniconi RF., 2015. The effects of high doses of nandrolone decanoate and exercise on prostate microvasculature of adult and older rats. *Life Sci* 121, 16–21.
- Fernandes, G. S., Arena, A. C., Fernandez, C. D., Mercadante, A., Barbisan, L. F., & Kempinas, W. G., 2007. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reproductive Toxicology*, 23(1), 106-112.
- Ganrot PO., 1986. Metabolism and possible health effects of aluminum. *Environ Health Perspect.* 65:363-441
- Golub, M.S., Collman, G.W., Foster, P.M.D., Immel, C.A., Meyts, E.R., Reiter, E.O., Sharpe, R.M., Skakkebaek, N.E., Toppari, J., 2008. Public Health Implications of Altered Puberty Timing. *Pediatrics.* 121(3), 218-230.
- Gu, X., Gao, X., Li, X., Qi, X., Ma, M., Qin, S., & Wang, W. 2016. Prognostic significance of neutrophil-to-lymphocyte ratio in prostate cancer: evidence from 16,266 patients. *Scientific reports*, 6.
- Guo, C.H., Liao, S. Y., Yuan, C. Y., Hsu, G. S. W. 2006. Effects of peritoneal aluminum overload on polyamines and nitric oxide contents of testes and epididymis in the mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21, 1-7.
- Guo, C.H., Hsu, G-S.W., Chuang, C.J., Chen, P.C., 2009. Aluminium accumulation induced testicular oxidative stress and altered selenium metabolism in mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 27, 176-181.
- Hala, A.H.K., Inas, Z.A.A., Gehan, M.K., 2010. Grape seed extract alleviate reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *J Am Sci.* 6(12), 1200-1209.
- Harden, K.P., Kretsch, N., Moore, S.R., Mendle, J., 2014. Descriptive review: Hormonal influences on risk for eating disorder symptoms during puberty and adolescence. *International Journal of Eating Disorders.* Advance online publication.

- Kowalczyk, E., Kopffl, A., Kędziora, J., Błaszczak, J., Kopffl, M., Niedworok, J. and Fijałkowski, P., 2004. Effect of long-term aluminium chloride intoxication on selected biochemical parameters and oxidative-antioxidative balance in experimental animals. *Pol. J. Environ. Stud.* 13(1), 41-43.
- Kutlubay, R., Oguz, E.O., Can, B., Guven, M.C., Sunk, Z., Tunkay, L., 2007. Vitamin E protection from testicular damage caused by intraperitoneal aluminium. *Int. J. Toxicol.* 26, 297-306.
- Llobet, J.M., Domingo, J.M., Gómez, M., Tomás, J.M., Corbella, J., 1987. Acute toxicity studies of aluminium compounds: antidotal efficacy of several chelating agents. *Pharmacology & Toxicology.* 60, 280-283.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.I., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Mendes, L.O., Amorim, J.P.A., Teixeira, G.R., Chuffa, L.G.A., Fioruci, B.A., Pimentel, T.A., Martinez, F.E., 2011. Mast cells and ethanol consumption: Interactions in the prostate, epididymis and testis of UChB rats. *Am J Reprod Immunol.* 66(3):170-8.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31, pp. 426-428.
- Moselhy, W.A., Helmy, N.A., Abdel-Hali, B.R., Nabil, T.M., Abdel-Hamid, M.I., 2012. Role of ginger against the reproductive toxicity of aluminum chloride in albino male rats. *Reprod Domest Anim.* 47, 335-43.
- Ojeda, R.S.; Urbanski, H.F. Puberty in the rat. In: Knobil, E.; Neill, J.D. 1994. *The physiology of reproduction.* New York: Raven, 363-397.
- Ojeda, S.R., Andrews, W.W., Advis, J.P., Smith-White, S., 1980. Recent advances in the endocrinology of puberty. *Endocr Rev.* 1(3), 228-257.
- Pinho-Ribeiro, F.A., Hohmann, M.S., Borghi, S.M., Zarpelon, A.C., Guazelli, C.F., Manchope, M.F., 2015. Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF- $\kappa$ B. *Chem Biol Interact.* 228, pp. 88-99.
- Reza, S. M., Palan, M. J. 2006. Effect of aluminium on testosterone hormones in male rat. *J. Med. Sci.* 6 (2), 296-299.
- Santana, V.P., Salles, E.S., Correa, D.E., Gonçalves, B.F., Campos, S.G., Justulin, L.A., Godinho, A.F., Scarano, W.R., 2016. Long-term effects of perinatal exposure to low doses of cadmium on the prostate of adult male rats. *Int J Exp Pathol.* 97(4):310-316.
- Scarano, W. R., de Toledo, F. C., Guerra, M. T., de Campos, S. G. P., Júnior, L. A. J., Felisbino, S. L., & Kempinas, W. D. G., 2009. Long-term effects of developmental exposure to di-n-butyl-phthalate (DBP) on rat prostate: proliferative and inflammatory disorders and a possible role of androgens. *Toxicology.* 262(3), 215-223.
- Sfanos, K. S., Hempel, H. A., & De Marzo, A. M., 2014. The role of inflammation in prostate cancer. In *Inflammation and Cancer* (pp. 153-181). Springer Basel.

- Untergasser, G., Rumpold, H., Hermann, M., Dirnhofer, D., Jilg, G., Berger, P., 1999. Proliferative disorders of the aging human prostate: involvement of protein hormones and their receptors. *Exp. Gerontol.* 34, 275–287.
- Vilamaior, P.S., Taboga, S.R., Carvalho, H.F., 2006. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: a stereological and morphometrical study. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 288, 885–892.
- Weibel E.R., 1963. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab. Invest.* 12,131–155.
- Yuan, C.Y., Lee, Y.J., Hsu, G.S.W., 2012. Aluminium overload increases oxidative stress in four functional brain areas of neonatal rats. *J Biomed Sci.* 19(1), 51.
- Zhu, Y., Li, Y., Miao, L., Wang, Y., Liu, Y., Yan, X., Cui, X., Li, H., 2014. Immunotoxicity of aluminium. *Chemosphere*, 104, 1-6.

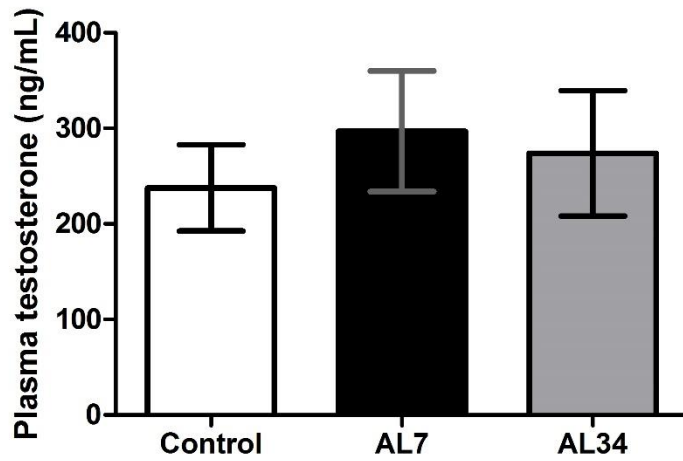
**Table 1.** Body and ventral prostate weights, stereological analysis and immunostaining for AR and Ki67. Peripubertal rats were treated with AlCl<sub>3</sub> 7mg/kg/day or 34mg/kg/day (AL7 and AL34 respectively) or saline buffer (Control).

	Control	Al. 7 mg/Kg	Al. 34 mg/Kg
Biometric data (n=10)			
Final body weight (g)	267.59±40.83 <sup>a</sup>	260.92±18.46 <sup>a</sup>	218.08±20.82 <sup>b</sup>
Ventral prostate (mg)	253.5±19.81	247.2±28,86	257.5±44.68
Stereologic analysis (n=5; 50fields/group)			
Epithelial compartment (%)	30.95[23.81-40-48]	28.28[23.66-32.29]	30.36[25.45-34.52]
Stromal compartment (%)	13.10[7.59-18.60] <sup>a</sup>	20.24[15.33-27.68] <sup>b</sup>	21.73[14.73-26.64] <sup>b</sup>
Luminal compartment (%)	53.87[48.81-64.88] <sup>a</sup>	50.30[43.30-57.15] <sup>ab</sup>	47.62[42.26-54-76] <sup>b</sup>
Immunostaing Index (n=5, 50 fields/group)			
Epitelial cells immunostaining for AR (%)	96.47[95.20-98.39] <sup>a</sup>	96.15[95.58-98.00] <sup>a</sup>	95.66[95.20-97.44] <sup>b</sup>
Epithelial cells proliferations index–Ki67 (%)	6.56[4.78-8.36]	7.61[4.62-12.96]	5.52[4.13-9.87]

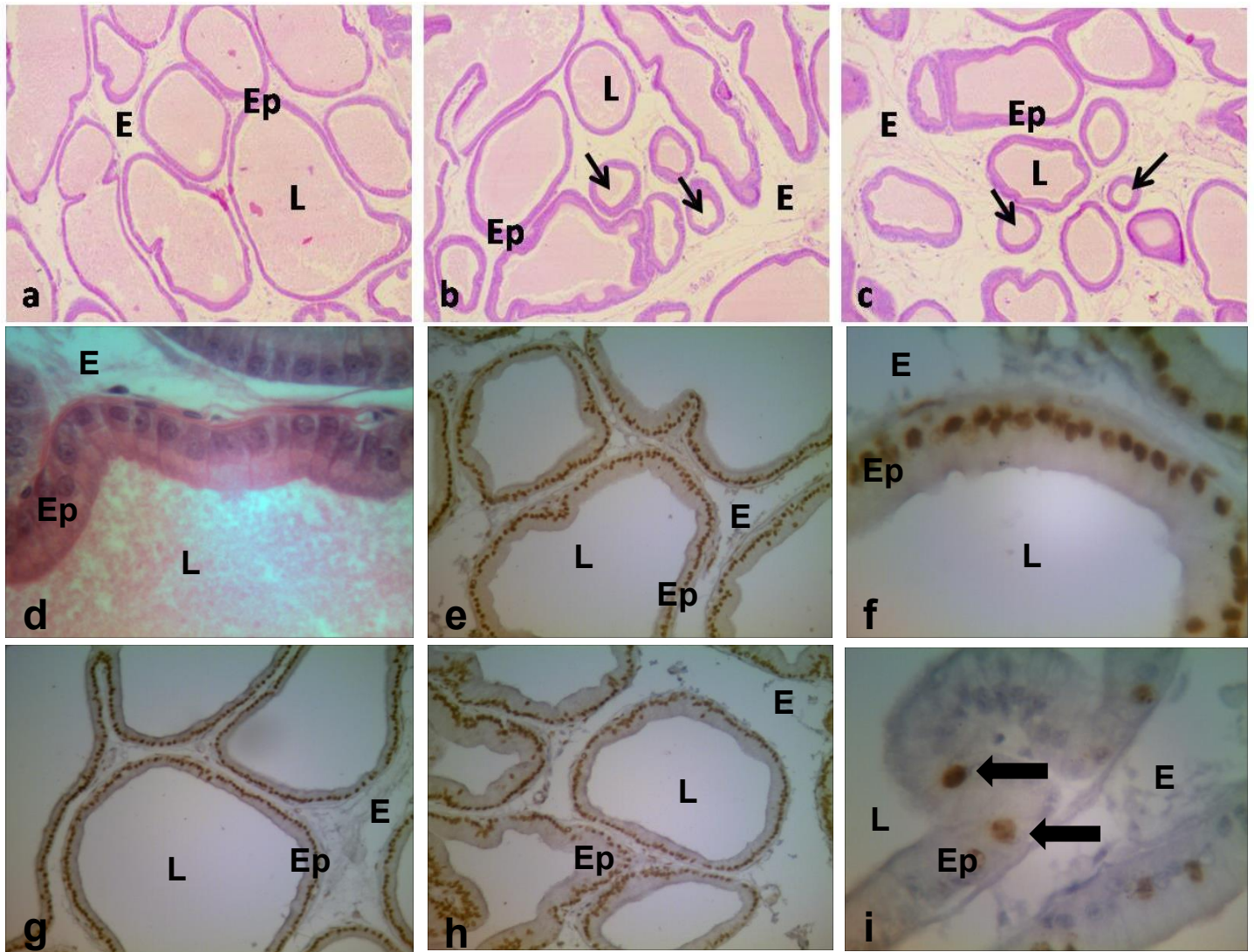
Body and prostate weight: Values expressed as Mean ± SEM. ANOVA *post* Tukey.

Stereological analysis and immunostaing index: Values expressed as median [Q1-Q3].

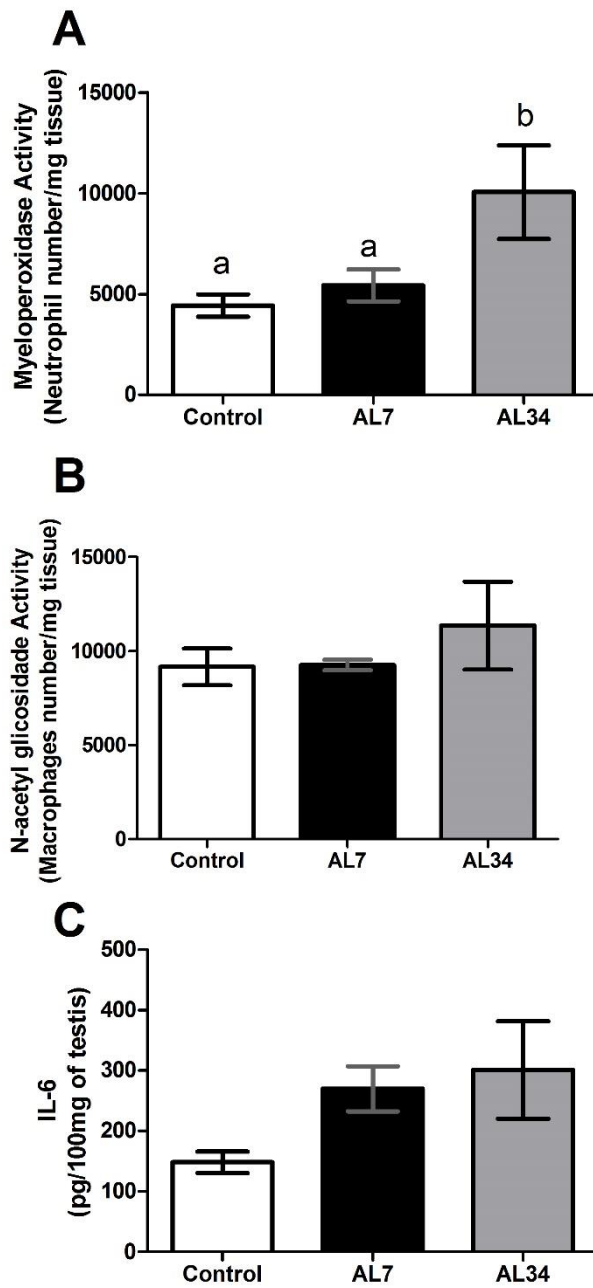
Kruskall Wallis *post* Dunn. <sup>a,b</sup> Different letters indicate statistically significant differences among the groups (p<0.05).



**Figure 1.** Plasma testosterone levels (n=10/group). Peripubertal rats were treated with  $\text{AlCl}_3$  7mg/kg/day or 34mg/kg/day (AL7 and AL34 respectively) or saline buffer (Control). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. <sup>a,b</sup>Different letters indicate statistically significant differences among the groups ( $p < 0.05$ ).



**Figure 2** – (a-d) Histological sections of the ventral prostate. The arrows indicate prostatic acini with reduced lumen. Hematoxiline and Eosin (HE) staining. (e-h) Histological sections submitted to AR and (i) Ki67 IHC. Brown stain signifies AR and Ki67-positive reactivity. The arrow indicates Ki67-positive cells. Rats were treated with  $\text{AlCl}_3$  7mg/kg/day or 34mg/kg/day (AL7 and AL34 respectively) or saline buffer (Control). a,d,e, f, i - Control group; b and g - AL7 group, c and h - AL34 group. Abbreviations: *E*: Stroma; *Ep*: Epithelium; *L*: Lumen. a-c 40X, e, g, h 100X, f and i 400X.



**Figure 3.** (A) Myeloperoxidase (MPO), (B) N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) activity and (C) IL-6 level (n=5/group). Rats were treated with AlCl<sub>3</sub> 7mg/kg/day or 34mg/kg/day (AL

7 and AL 34 respectively) or saline buffer (Control). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM.

<sup>a,b</sup> Different letters indicate statistically significant differences among the groups ( $p < 0.05$ ).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que a exposição ao Cloreto de Alumínio em diferentes doses, foi capaz de levar a diversas alterações nos tecidos prostático e testicular, além de interferir no peso dos animais.

No testículo  $AlCl_3$  foi capaz de promover alterações na função espermática, nas análises morfométricas e histopatológicas, no número das células de Sertoli e receptores de andrógenos nessas. Além de induzir a atividade da mieloperoxidase e alterar o níveis das citocinas IL-10 e TNF- $\alpha$ . Na próstata, o  $AlCl_3$  levou a alterações na estereologia e histopatologia, diminuição no número de receptores de andrógenos nas células epiteliais bem como atividade da mieloperoxidase.

Portanto o presente estudo contribui um pouco mais para a elucidação dos efeitos do Cloreto de Alumínio sobre o desenvolvimento do sistema genital masculino em animais peripuberais, especificamente no tecido prostático e testicular, bem como uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nesse processo.

## 8 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

AUMÜLLER, G.; SEITZ, J. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. **International review of cytology**, v. 121, p. 127-231, 1990.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. Metais: Gerenciamento da Toxicidade. Ed. Atheneu, Rio de Janeiro, 2003. 554 p.,

BERNE, R. M.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. Berne & Levy fisiologia. 6º Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009

BURRELL, S.A., EXLEY, C. There is (still) too much aluminium in infant formulas. **BMC Pediatr.** v.10, p.63, 2010. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2431-10-63>.

CHIASSON, R.B. **Laboratory anatomy of the white rat**. In: Brown C. Arizona: Wm, v. 2, p. 81, 1969.

CLEGG, E.J. The age at which male rats become fertile. **Reprod. Fert.** v. 1, p. 119-120. 1960.

COOKE, H. J.; SAUNDERS, P. TK. Mouse models of male infertility. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 10, p. 790-801, 2002.

CORNWALL, G.A. New insights into epididymal biology and function. **Human reproduction update**, v. 15, n. 2, p. 213-227, 2009.

CUNHA, G.R.; HAYWARD, S.W.; WANG, Y.Z. Role of stroma carcinogenesis of the prostate. **Differentiation**, v. 70, n. 9-10, p. 473-485, 2002

DABEKA, R., FOUQUET, A., BELISLE, S., TURCOTTE, S., Lead, cadmium and aluminum in Canadian infant formulae, oral electrolytes and glucose solutions. **Food Addit. Contam. A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.** v. 28, p. 744-753, 2011.

DACHEUX, J.L.; DACHEUX, F.. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. **Reproduction**, v. 147, n. 2, p. R27-R42, 2015.

DE MARZO, A.M. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 256-269, 2007.

ESKENAZI, B.; KIDD, S. A.; MARKS, A. R.; SOLDER, E.; BLOCK, G.; WYROBEK, A. J. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. **Hum Reprod.**, v. 20, p. 1006-1012, 2005.

ESKENAZI, B.; KIDD, S. A.; MARKS, A. R.; SOLDER, E.; BLOCK, G.; WYROBEK, A. J. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. **Hum Reprod.**, v. 20, p. 1006-1012, 2005.

EXLEY, C., ESIRI, M.M. Severe cerebral congophilic angiopathy coincident with increased brain aluminum in a resident of Camelford, Cornwall, UK. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.** v. 77, p. 877-879, 2006.

EXLEY, C., HOUSE, E., POLWART, A., ESIRI, M.M. Brain burdens of aluminum, iron, and copper and their relationships with amyloid- $\beta$  pathology in 60 human brains. **J. Alzheimer's Dis.** v. 31, p. 725-730, 2012.

FOLEY, G.L. Overview of Male Reproductive Pathology. **Toxicologic Pathology**, v. 29 n.1, p. 49-63, 2001.

- FRANÇA, L. R., RUSSEL, L. DL. The testis of domestic mammals. IN: MARTINEZ-GARCÍA F., REGADERA, J. Male reproduction; a multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Communications Europe España, 16: 198-219, 1998.
- GOLUB, M. S. et al. Public health implications of altered puberty timing. **Pediatrics**, v. 121, p. 218-230, 2008.
- GÓMEZ, M., ESPARZA, J. L., CABRÉ, M., GARCÍA, T., GOMINGO, J. L. Aluminum exposure through the diet: Metal levels in A<sub>PP</sub> transgenic mice, a model for Alzheimer's disease. **Toxicology**. v. 249, p. 214-219, 2008.
- GONZALES, Gustavo F. Function of seminal vesicles and their role on male fertility. **Asian journal of andrology**, v. 3, n. 4, p. 251-258, 2001.
- GUO, C., LU, Y., H, G.W. The influence of aluminum exposure on male reproduction and offspring in mice. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** v. 20, p. 135–141, 2005a.
- GUO, C.H., HSU, G.S., CHUANG, C.J., CHEN, P.C. Aluminum accumulation induced testicular oxidative stress and altered selenium metabolism in mice. **Environ Toxicol Pharmacol.** v. 27, p. 176–81, 2009.
- GUO, C.H., HUANG, C.J., YEH, M.S., HSU, G.S.W. Aluminium induced suppression of testosterone through nitric oxide production in male mice. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** v. 19, p. 33–40, 2005b.
- HALA, K.H., INAS, Z.A., GEHAN, K.M., Grape seed extract alleviate reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. **Journal American Science**. V. 12, p. 1200–1209, 2010.
- HEBEL, R.; STROMBERG, M. W. **Anatomy of the laboratory rat**, Hardcover, v. 1, 1976.
- HEDGER, Mark P. Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. **Journal of andrology**, v. 32, n. 6, p. 625-640, 2011.
- HESS, Rex A. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 1, p. 1, 2003.
- HOYER, R.E., HARRIS, P.B.(Eds). **Comprehensive Toxicology**. v. 10, New York: Pergamon, p. 5-61, 1997.
- IPCS (INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY). Aluminium from all sources, including food additives (addendum), in: Safety evaluation of certain food additives and contaminants, prepared by the Sixty-seventh meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), WHO Food additives series 58, WHO, Geneva, p. 119–208, 2007.
- JOHNSON, L., VARNER, D.D., ROBERTS, M.E., SMITH, T.L., KEILLOR, G.E., SCRUTCHFIELD, W.L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, 2, p. 471-480, 2000.
- JOHNSON, L.; WELSH, T. H. J.; WILKER, C. E. Anatomy and physiology of the male reproductive system and potential targets of toxicants. In: Boekleheide K., Chapin **Journal of Endocrinology**, v. 136, p. 357-360, 1993.
- JUNQUEIRA, LC; CARNEIRO, J. Histologia básica. 11ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA, 2012

- KEMPINAS, W. G.; KLINEFELTER, G. R. The epididymis as a target for toxicants. In Charlene A. & McQueen (Ed.). **Comprehensive Toxicology**, Oxford: Academic press, p. 149-66, 2010.
- KIERSZENBAUM, A.L. Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia. Editora Elsevier. Rio de Janeiro. 653 p. 2004.
- KLEIN J.P., MOLDC M., MERYA L., COTTIERA M., EXLEYC C. Aluminum content of human semen: Implications for semen quality. **Reproductive Toxicology**. v. 50, p. 43–48, 2014.
- KOCHIAN, L.V., JONES, D.L. Cellular mechanisms of Aluminum toxicity and resistance in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, v. 46, p. 237–260, 1995.
- LATCHOUMYCANDANE, C., MATHUR, P.P. Effects of vitamin E on reactive oxygen species-mediated 2,3,7,8-tetrachlorodi-benzo-p-dioxin toxicity in rat testis. **J Appl Toxicol**; v. 22, p. 345-51, 2002.
- LEWIS, S. E. M.; STERLING, E. S. L.; YOUNG, I. S.; THOMPSON, W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. **Fertil Steril.**, v. 67, p. 142-147, 1997.
- MARKER, Paul C. et al. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Developmental biology**, v. 253, n. 2, p. 165-174, 2003.
- MICHEL, Vera et al. Epididymitis: revelations at the convergence of clinical and basic sciences. **Asian journal of andrology**, v. 17, n. 5, p. 756, 2015.
- MOORE, Keith L.; PERSAUD, T. V. N. Embriologia Básica, 8ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- MOSELHY, W.A., HELMY, N.A., ABDEL-HALI, B.R., NABIL, T.M., ABDEL-HAMID, M.I. Role of ginger against the reproductive toxicity of aluminum chloride in albino male rats. **Reprod Domest Anim**. v.47, p. 335–43, 2012.
- MOUMEN, R., N. A. OUKHATAR, F. BUREAU, C. FLEURY F. VIADER. Aluminium increases xanthine oxidase activity and disturbs antioxidant status in the rat. **J. Trance Element Med. Biol.**, v. 15, p. 89-93, 2001.
- MRUK, Dolores D.; CHENG, C. Yan. The mammalian blood-testis barrier: its biology and regulation. **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 5, p. 564-591, 2015.
- MURAKAMI, R.; MIZUNO, T. Proximal-distal sequence of development of the skeletal tissue in the penis of rat and the inductive effect of epithelium. **Journal of Embryology & Experimental Morphology**, v. 92, p. 133-43, 1986.
- O'BRYAN, M.K., HEDGER, M.P. Inflammatory networks in the control of spermatogenesis. Chronic inflammation in an immunologically privileged tissue? **Adv Exp Med Biol**. 636:92–114, 2008.
- O'DONNELL, L., NICHOLLS, P.K., O'BRYAN, M.K., MCLACHLAN, R.I., STANTON, P.G. Spermiation: The Process of Sperm Release. **Spermatogenesis**. v.1, p. 14-35, 2011.
- O'SHAUGHNESSY, P. Testicular development. In: Knobil E., Neil JD. (Eds.). **The physiology of Reproduction**. New York: Elsevier, 4ed, 601–771, 2015.
- OJEDA, S. R. et al. Recent advances in the endocrinology of puberty. **Endocrine Reviews**, v. 1, p. 228-257, 1980.

- OJEDA, S. R.; URBANSKI, H. F. Puberty in the rat. In: Knobil E., Neil, J.D. (Eds). **The physiology of reproduction**, v. 1, p. 365-409, 1994.
- PRIEST, N.D., TALBOT, R.J., NEWTON, D., DAY, J.P., KING, S.J., FIFIELD, L.K., Uptake by man of aluminum in a public water supply. **Hum. Exp. Toxicol.** v. 17, 296–301, 1988
- RATO, Luís et al. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. **Nature Reviews Urology**, v. 9, n. 6, p. 330-338, 2012.
- ROBAIRE, B.; HINTON, B.; ORGEBIN-CRIST, M. C. The Epididymis. In: Knobil E., Neil JD. (Eds.). **The physiology of reproduction**. New York: Elsevier, p. 1071-1148, 2006.
- ROBB, G. W.; AMMAN, R. P.; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of puberal and adult rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 103-107, 1978.
- RODRIGUEZ, J. A; FAVARETTO, A. L. V. Sistema reprodutor. In Aires M. M. (Ed.) *Fisiologia*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p 877-917, 1999.
- ROOSEN-RUNGE, E. C. The process of spermatogenesis in animals. Cambridge: Academic Press, 123p, 1977.
- ROSS, M.H; REITH, E.J.; ROMRELL, L.J. *Histologia: texto e atlas*. 2a ed. Editora Médica Panamericana. Cap. 21. p. 603 – 647, 1993.
- ROY-BURMAN, P. et al. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. **Endocrine-related cancer**, v. 11, n. 2, p. 225-254, 2004.
- RUSSEL, L.D.; GRISWOLD, M.D. The Sertoli Cell. **Cache River Press**. Clearwater, FL. 801p. 1993.
- RUSSEL, L.D.; ETTLIN, R.A.; HIKIM, A.P.S.; CLEGG, E.D. Histological and histopathological evaluation of the testis. 1a Ed. **Cache River Press**. Clearwater, FL. 1990.
- SFANOS, Karen S.; HEMPEL, Heidi A.; DE MARZO, Angelo M. **The role of inflammation in prostate cancer**. In: *Inflammation and Cancer*. Springer Basel, 2014. p. 153-181.
- SHAPPELL, Scott B. et al. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. **Cancer research**, v. 64, n. 6, p. 2270-2305, 2004.
- SHARPE, R. M. Development and maturation of the normal male reproductive system. In: Woodruff TJ, Janssen SJ, Guillette LJ and Giudice LC, Eds. **Environmental impacts on reproductive health and fertility**, 2010.
- SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil and Neil, J.D. (EDS). **The Physiology of Reproduction**. 2aed. New York: Raven Press. P. 1363 – 1434. 1994.
- SIGEL, H., SIGEL, A. Metal ions in biological systems. Aluminum and Its Role in Biology, vol. 24. Marcel Dekker, New York, 1988.
- SMITH, R.W. Kinetic aspects of aqueous aluminum chemistry: environmental implications. *Coord. Chem. Rev.* v. 149, p. 81–93, 1996.

SPARLING, D.W., CAMPBELL, P.G.C. Ecotoxicology of aluminum to fish and wildlife. In: Yokel, R.A., Golub, M.S. (Eds.), *Research Issues in Aluminum Toxicity*. Taylor and Francis, Washington, DC, pp. 48–68. 1997.

STEVENS, A., LOWE, J.S. *Human Histology*. 2a ed. Mosby incorporation. London. 408 p. 1999.

SUN, Y. Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 8, p. 583–599, 1990.

SUTHERLAND, J.E., GREGER, J.L. Size of an oral aluminum dose affects the relative importance of biliary vs. urinary aluminum excretion in conscious rats. **Food Chem. Toxicol.** **1998**.

VERÄJÄNKORVA, E. et al. IL-10 is highly expressed in the cryptorchid cryptepididymal epithelium: a probable mechanism preventing immune responses against autoantigenic spermatozoa in the epididymal tubule. **International journal of andrology**, v. 25, n. 3, p. 129-133, 2002.

WALKER, W. H. Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365(1546), p. 1557–1569, 2010.

WEIHUA, Zhang et al. A role for estrogen receptor  $\beta$  in the regulation of growth of the ventral prostate. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 11, p. 6330-6335, 2001.

WONG, C.H., CHENG, C.Y. The blood-testis barrier: its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis. **Curr. Top. Dev. Biol.** 71: 263–296, 2005.

YOUSEF, M.I., KAMEL, K.I., EI-DEMERDASH, F.M. An in vitro study on reproductive toxicity of aluminum chloride on rabbit sperm: the protective role of some antioxidants. **Toxicology**. v. 239, p.213–23, 2007.

YOUSEF, M.I., SALAMA, A.F. Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminum chloride in male rats. **Food Chem Toxicol.** v. 47, p.1168–75, 2009.

## ANEXO

Comissão de ética no uso de animais



Universidade  
Estadual de Londrina

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 059/2015

Londrina, 30 de Abril de 2015.

Prezado Pesquisador,

A CEUA/UEL reunida em 31 de Março de 2015 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Efeitos da exposição ao cloreto de alumínio sobre os parâmetros reprodutivos de ratos machos durante o período peribuberal**", registrado sob o processo CEUA nº **2430.2015.47**, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 45 ratos Wistar machos, com 30 dias de idade e provenientes do Biotério Central da UEL. O projeto tem como objetivo avaliar se a exposição ao cloreto de alumínio durante o período peripuberal poderá trazer prejuízo para o desenvolvimento testicular e epididimário de ratos. Para tanto, os animais serão divididos em três grupos experimentais e, de acordo com o grupo pertencente, serão expostos ao cloreto de alumínio via intraperitoneal (i.p) nas doses de 7 ou 35 mg/kg, diluído em solução salina 0,9% ou receberão apenas o veículo, em um período de 30 dias. Dez animais de cada grupo experimental terão os testículos e epidídimos direitos retirados, pesados em balança analítica de precisão e congelados à -20°C para posterior determinação do número de espermátides maduras, os testículos e epidídimos esquerdos serão congelados à -80°C para avaliação do nível de estresse oxidativo. Ao final do período experimental, os ratos serão anestesiados com cloridrato de cetamina (10 mg/kg) e cloridrato de xilazina (2 mg/kg) via intramuscular e eutanasiados por punção cardíaca para a coleta de sangue para análise hormonal (FSH, LH, testosterona). Os protocolos experimentais estão aprovados com previsão para execução em 36 meses.

Cumpre orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior  
Coordenador da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

**Prof. Dra. Glaura Scantamburio Alves Fernandes**

Coordenadora do Projeto

Departamento de Biologia Geral

Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Sra. Edilamar dos Anjos (Chefe da DCA/PROPPG), Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central da UEL), Chefe do Departamento de Biologia Geral e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas.