

VIVIANE GORETE SILVEIRA Mouro

EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE PARÂMETROS MORFOLÓGICOS  
TESTICULARES E EPIDIDIMÁRIOS E DE FERTILIDADE EM RATOS  
WISTAR

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA**  
**MINAS GERAIS – BRASIL**  
**2013**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M931e  
2013

Mouro, Viviane Gorete Silveira, 1987-  
Efeito do alumínio sobre parâmetros morfológicos  
testiculares e epididimários e de fertilidade em ratos Wistar /  
Viviane Gorete Silveira Mouro. – Viçosa, MG, 2013.  
ix, 107 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Mariana Machado Neves.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Rato - Reprodução. 2. Rato - Histologia. 3. Rato -  
Espermatozoides. 4. Cloreto de alumínio. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral.  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural.  
II. Título.

CDD 22. ed. 599.352

VIVIANE GORETE SILVEIRA MOURO

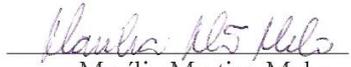
EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE PARÂMETROS MORFOLÓGICOS  
TESTICULARES E EPIDIDIMÁRIOS E DE FERTILIDADE EM RATOS WISTAR

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Estrutural, para  
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

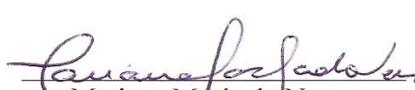
APROVADA: 26 de fevereiro de 2013.



Sérgio Luis Pinto da Matta



Marília Martins Melo



Mariana Machado Neves  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ter sido realizado sem contribuição das pessoas as quais deixo meu agradecimento.

Primeiramente a Deus pelas oportunidades, pelos momentos, conquistas, por me proporcionar a realização de mais uma etapa.

A minha mãe Graça que sempre esteve ao meu lado, incentivando a minha trajetória. Obrigado por nunca perder a esperança em mim e sempre me apoiar, sem seu apoio essa conquista jamais seria possível.

Ao Wanderson pela amizade, carinho, companheirismo, compreensão, incentivo e apoio durante todo este período.

A minha orientadora e amiga Profa. Mariana Machado Neves por confiar e acreditar em mim, pela orientação e todas as contribuições neste trabalho. Obrigada por me ensinar a ser uma pesquisadora.

Ao Prof. Sérgio Luis P. da Matta pelos materiais, reagentes e contribuições ao longo deste trabalho.

As amigas Tatiana, Simone, Graziela e ao amigo Rafael pela ajuda durante o experimento, pela amizade. A amiga Nayara pela ajuda e companheirismo. Obrigada pela amizade, vocês foram fundamentais na realização deste trabalho.

A amiga Kyvia, pessoa maravilhosa, por tudo que me ensinou, pela amizade e por ter me acolhido no início desta etapa.

As amigas Camila e Susana, obrigada pela amizade, ajuda e palavras ditas nos momentos certos.

Aos técnicos do laboratório de Biologia Estrutural Aléx e Mateus, pelo constante auxílio com reagentes, soluções, equipamentos, por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos professores do Laboratório de biologia Celular e Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV, Sérgio, Isabel, Clóvis, Adilson, Mariana e Juliana pela colaboração no uso dos equipamentos e materiais.

A Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade da realização deste crescimento profissional.

A FAPEMIG pelo financiamento deste projeto, imprescindível na realização deste trabalho.

Ao Prof. Marc Henry pela disponibilização de equipamentos e do laboratório na Escola de Veterinária da UFMG para a realização das análises espermáticas.

Aos funcionários do Biotério Central da UFV, Adão e Juliano, pelo fornecimento dos animais a apoio durante o experimento.

Aos animais utilizados neste estudo.

## RESUMO

MOURO, Viviane Gorete Silveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Efeito do alumínio sobre parâmetros morfológicos testiculares e epididimários e de fertilidade em ratos Wistar.** Orientadora: Mariana Machado Neves.

Não foram encontrados trabalhos avaliando os efeitos da ingestão crônica de 0,1mg/L de alumínio na água doce, concentração máxima tolerada por Brasil (2005), sobre o aparelho reprodutor masculino. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros morfológicos e de fertilidade de ratos expostos a diferentes concentrações de alumínio. Foram utilizados 60 ratos Wistar, distribuídos em cinco grupos (G; n=12 animais/G), recebendo diariamente água destilada (C), baixas concentrações de alumínio (Al) na forma de cloreto de alumínio (0,02 e 0,1mg/L Al) e altas concentrações (10 e 40mg/Kg Al), todas administradas por gavagem durante 112 dias. Os animais foram eutanasiados em dois momentos: no 113º dia (n=30) e no 121º dia (n=30) do período experimental. Fragmentos de testículo e epidídimo foram fixados e processados para microscopia de luz nos dois momentos experimentais, assim como foi coletado sangue, para dosagem de testosterona sérica, e espermatozoides da cauda do epidídimo, para realização de avaliações espermáticas. Realizou-se o teste de fertilidade por monta natural no grupo de animais do 121º dia. Não foram encontradas alterações histológicas dos órgãos reprodutores analisados, excetuando-se vacuolizações citoplasmáticas nas células prismáticas da região do corpo do epidídimo de todos os animais tratados. Não foram observadas diferenças entre os grupos para a maior parte das análises morfométricas, testiculares e epididimárias, sendo que os animais tratados e eutanasiados no 113º dia apresentaram diminuição no volume e no diâmetro do núcleo das células de Leydig. A motilidade total reduziu apenas nos animais tratados com 40mg/Kg Al por 112 dias. A exposição ao alumínio levou a redução na integridade estrutural das membranas espermáticas nos animais avaliados nos dois momentos experimentais. Observou-se redução da taxa de fertilidade nos animais que receberam altas concentrações de alumínio, sendo que no grupo que recebeu 40mg/Kg Al observou-se redução no número de filhotes por parto. A concentração de testosterona foi menor nos animais tratados, analisados no 113º dia, não havendo diferença entre os grupos ao 121º dia. Os resultados sugerem que a ingestão de alumínio por via oral

apresenta menor efeito desse metal nos tecidos, quando comparada a outras vias de administração. No entanto, ainda assim, a exposição a baixas concentrações de alumínio causaram alterações nos parâmetros reprodutivos avaliados, influenciando negativamente a fertilidade.

## ABSTRACT

MOURO, Viviane Gorete Silveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2013. **Aluminum effect on morphologic parameters of testis and epididymis and fertility of wistar rats.** Adviser: Mariana Machado Neves.

Aluminum is the third most abundant metal in the earth's crust and has no known biological function. Brazil (2005) determines that an acceptable daily intake of 0.02 mg/L of aluminum in fresh water, but there are no reports on the effects of chronic ingestion of this concentration on the male reproductive system. Therefore, the objective of this study was to evaluate morphological parameters and fertility in rats exposed to different concentrations of aluminum in the form of aluminum chloride. Were used 60 Wistar rats were divided into five groups (G, n = 12 animals / G) receiving daily distilled water (G1), low concentrations of aluminum as aluminum chloride (0.02 and 0.1 mg / L Al, respectively for G2 and G3) and high concentrations (10 and 40mg/Kg respectively for G4 and G5), all administered by gavage for 112 days. The animals were euthanized at two times: in 113 days (30 animals) and 121 days (30 animals) of the experimental period. Fragments of testis and epididymis were fixed and processed for light microscopy, the sperm were collected from cauda epididymis and for the kinetic analyzes of sperm motility and membrane integrity and sperm concentration and serum testosterone were measured in plasma two moments of this work, besides the test fertility in animals of 121 days. There were no changes in histology of organs analyzed, except for cytoplasmic vacuolation in prismatic cells in the region of the body of all animals treated. No differences were observed between groups for most of the morphometric analyzes, testicular and epididymal, and in treated animals (113 days) there was a decrease in the volume and diameter of the nucleus of Leydig cells. The total motility decreased only in the treatment of animals euthanized in 40mg/Kg 113th day. Exposure to aluminum led to a reduction in structural integrity of sperm membranes. In animals with high concentrations of aluminum observed reduction in fertility rate and the number of pups per litter in the group receiving 40mg/Kg aluminum. The testosterone concentration was lower in treated animals analyzed in 113 days, with no difference between groups at 121° day. The findings suggest that exposure to low concentrations of aluminum can alter reproductive parameters as reduced sperm membrane integrity and reduction in serum concentration of testosterone. That was,

chronic exposure to low concentrations of aluminum caused some changes in reproductive parameters, which can cause problems in male fertility.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Alumínio .....	3
2.2. Efeito da exposição ao alumínio em órgãos e células .....	5
2.2.1 Testículo .....	6
2.2.2 Epidídimo .....	8
2.2.3 Espermatozoides .....	12
3. REFERÊNCIAS .....	14
CAPÍTULO 1 – EFEITO DE BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE ALUMÍNIO SOBRE PARÂMETROS TESTICULARES, EPIDIDIMÁRIOS E ESPERMÁTICOS DE RATOS WISTAR ADULTOS	
1. INTRODUÇÃO .....	30
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	31
2.1. Grupos experimentais .....	31
2.2. Coleta do material biológico .....	32
2.3. Processamento histológico do testículo e epidídimo .....	32
2.4. Morfometria testicular .....	33
2.4.1 Análise dos componentes tubulares .....	33
2.4.2 Análises estereológicas dos componentes intertubulares .....	34
2.4.3 Estereologia das células de Leydig .....	34
2.5. Morfometria epididimária .....	35
2.6. Determinação da concentração sérica de testosterona .....	36
2.7. Avaliações espermáticas .....	36
2.7.1 Motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático .....	36
2.7.2 Morfologia espermática .....	36
2.7.3 Avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática e acrossomal da cabeça dos espermatozoides .....	37
2.8. Análises estatísticas .....	37
3. RESULTADOS .....	37
3.1. Variação de peso durante o período experimental .....	37
3.2. Avaliação histológica do parênquima testicular e epididimário .....	38
3.3. Morfometria testicular .....	46
3.3.1 Parâmetros biométricos .....	46
3.3.2 Parâmetros histomorfométricos .....	46
3.4. Morfometria epididimária .....	49
3.4.1 Biometria .....	49
3.4.2 Histomorfometria epididimária .....	50
3.5. Concentração sérica de testosterona .....	53
3.6. Avaliações espermáticas .....	54
4. DISCUSSÃO .....	56
5. CONCLUSÕES .....	63
6. REFERÊNCIAS .....	63
CAPÍTULO 2 – PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE RATOS WISTAR EXPOSTOS CRONICAMENTE AO CLORETO DE ALUMÍNIO	
1. INTRODUÇÃO .....	69
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	70
2.1. Animais e grupos experimentais .....	70
2.2. Procedimentos experimentais para avaliação da fertilidade in vivo .....	70

2.3. Coleta dos órgãos e de espermatozoides do fluido da cauda do epidídimo .....	71
2.4. Avaliações espermáticas .....	72
2.4.1 Motilidade e cinética espermáticas .....	72
2.4.2 Morfologia espermática .....	73
2.4.3 Avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática e acrossomal da cabeça dos espermatozoides .....	73
2.5. Processamento histológico do testículo e epidídimo .....	74
2.6. Morfometria testicular .....	75
2.6.1 Análise dos componentes tubulares .....	75
2.6.2 Análises estereológicas dos componentes intertubulares .....	76
2.6.3 Estereologia das células de Leydig .....	76
2.7. Morfometria epididimária .....	77
2.8. Determinação da concentração sérica de testosterona .....	77
2.9. Análises estatísticas .....	78
3. RESULTADOS .....	78
3.1. Avaliação da fertilidade in vivo .....	78
3.2. Avaliações espermáticas .....	80
3.3. Biometria corporal e testicular .....	83
3.4. Avaliação histológica do parênquima testicular e epididimário .....	84
3.4.1 Parâmetros histomorfométricos e estereológicos .....	87
3.5. Morfometria epididimária .....	91
3.5.1 Biometria .....	91
3.5.2 Histomorfometria epididimária .....	91
3.6. concentração sérica de testosterona .....	95
4. DISCUSSÃO .....	96
5. CONCLUSÕES .....	100
6. REFERÊNCIAS .....	101
CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	107

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O alto nível de industrialização, a intensa atividade agrícola e a necessidade do aumento de produção, advinda do aumento na densidade populacional, contribuíram significativamente para o aumento dos lançamentos de despejos e resíduos nos cursos d'água, principalmente em áreas geográficas próximas aos rios e regiões litorâneas (Zagatto, 2006). Com a crescente contribuição antropogênica na liberação de metais para os corpos d'água, verifica-se o aumento nos níveis de metais nestes sistemas, o que gera preocupação quanto a capacidade destes elementos químicos se bioacumularem em organismos, inclusive humano, que direta ou indiretamente estão em contato ou fazem uso dos recursos hídricos (Forstner e Wittmann, 1981).

O alumínio pertencente à família 3A da tabela periódica, apresentando número atômico 13 e massa 27. Apesar de sua baixa absorção pelas vias oral, respiratória e dérmica, a exposição crônica a grandes quantidades e sua ingestão associada a determinados compostos químicos, favorecem seu acúmulo no organismo, podendo desencadear problemas renais, neurológicos, respiratórios e reprodutivos (Llobet et al., 1995; Yousef et al., 2005; Krewski et al., 2007).

Com relação à reprodução, poucos estudos foram encontrados sobre os efeitos do alumínio sobre o parênquima testicular e epididimário, principalmente. Sabe-se que ele pode alterar parâmetros espermáticos quando o animal é exposto a altas concentrações (Yousef et al., 2005). A resolução 357 ditada pelo CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente) tolera que seja encontrada na água potável uma quantidade máxima de 0,1 mg/L de alumínio, sendo esta consumida diariamente sem acarretar danos ao organismo (Brasil, 2005). No entanto, não há relatos sobre o seu efeito quando esta ingestão ocorre cronicamente, principalmente ao considerar parâmetros histomorfométricos e reprodutivos.

Com base no presente exposto, formulou-se a hipótese de que baixas concentrações de alumínio, quando administradas cronicamente, não causam alterações em parâmetros reprodutivos de ratos Wistar. Para testá-la, foram elaborados os seguintes objetivos:

- Avaliar o efeito crônico da ingestão de alumínio, na forma de cloreto de alumínio, sobre parâmetros histomorfométricos testiculares, como índices

gonadossomático, leydigossomático e tubulossomático, diâmetro tubular, altura de epitélio e comprimento dos túbulos seminíferos, além do percentual de componentes tubulares e intertubulares e volumetria das células de Leydig;

- Comparar o efeito da ingestão de diferentes concentrações de alumínio sobre parâmetros histomorfométricos epididimários, como altura do epitélio, diâmetros tubular e luminal e proporção volumétrica dos componentes tubulares e intertubulares do ducto, considerando as quatro regiões epididimárias;

- Avaliar a ocorrência ou não de alterações microscópicas na arquitetura tecidual dos testículos e epidídimos em microscopia de luz;

- Avaliar a concentração sérica de testosterona e a fertilidade dos machos tratados, a partir de análises espermáticas realizadas logo após o término do tratamento e do cruzamento com fêmeas híginas, obtendo-se também o percentual de fêmeas prenhes e o número de filhotes por parto.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Alumínio

O alumínio é o terceiro elemento mais abundante na Terra e o mais abundante de sua crosta (Csuros e Csuros, 2002). Por ser um elemento muito reativo, o alumínio não é encontrado na natureza como metal livre, em seu estado metálico, mas sim em seu estado oxidativo (carga<sup>+3</sup>) geralmente combinado com oxigênio, silício ou flúor. Seu raio iônico é pequeno, de 0,51 Å, devido à forte carga do íon elétrico. A elevada carga e o tamanho pequeno dão ao alumínio um efeito de forte polarização em átomos adjacentes. Portanto, em soluções aquosas ele se ioniza, envolvendo parte da água e formando hidroxocomplexos. Como resultado, a solução torna-se ácida (Ganrot, 1986).

O alumínio oxidado é encontrado em minerais, solo e rochas. Ele pode ser beneficiado a partir da bauxita e utilizado na indústria automobilística, na construção civil e em estruturas de ligas metálicas que, além do alumínio, utilizam pequena quantidade de cobre, silício e manganês na sua composição (Morais, 2009).

O homem pode se contaminar com o alumínio a partir do consumo de aditivos alimentares para nutrição parenteral, soluções intravenosas, água potável, emulsões lipídicas e medicamentos, como vacinas, antiácidos, analgésicos e fluidos de diálise. Produtos cosméticos, como antitranspirantes, e inalação de ar ambiente contaminado servem como outras fontes de contaminação por alumínio. A exposição ocupacional ao alumínio ocorre no refinamento do metal primário, a bauxita, em indústrias secundárias, que produzem e utilizam componentes de alumínio, além do processo de soldagem (Fernandez-Lorenzo et al., 1999; Popi'nska et al., 1999; HCN, 2009). A dose letal (LD<sub>50</sub>) de alumínio, quando administrada oralmente para ratos, foi reportada como sendo de 380-400mg/ Kg de peso corporal (Krasovski et al., 1979).

Sua absorção é pequena pelas vias oral e inalatória e inexistente por via cutânea. Em circunstâncias normais, sua absorção pelo aparelho digestório varia de 0,1 a 1% do total de alumínio ingerido, sendo o alumínio precipitado no intestino delgado e excretado nas fezes (Krewski et al., 2007).

A absorção intestinal do alumínio ocorre pelas vias de passagem, através de junções por processos passivos e rotas de passagem transcelular através do

enterócito, envolvendo difusão facilitada e transporte ativo (Hawkins et al., 1994; Niesink et al., 1995). A taxa de absorção depende da forma com que o alumínio é ingerido e da presença de componentes alimentares capazes de formar complexos absorvíveis, geralmente solúveis em água, ou não-absorvíveis, insolúveis em água aumentando ou inibindo a absorção (Gomes et al., 1991; Colomina et al., 1992).

Muitos dos efeitos tóxicos do alumínio ocorrem devido a suas interações com alguns nutrientes, como fósforo, cálcio, magnésio, ferro e vitamina D. Acredita-se que os mesmos canais usados para absorção de cálcio sejam utilizados para a absorção do alumínio. Uma interrupção na taxa de absorção de cálcio favorece a entrada de alumínio no organismo, sendo este fator citado como um dos mecanismos que explicam a toxicidade do alumínio (Greger, 1993). O alumínio, em doses farmacológicas, pode reduzir o transporte transcelular de cálcio, mediado pela calbindina-D dependente de vitamina D, no intestino delgado de humanos, roedores e frangos (Orihuela, 2009).

Adultos ingerem por dia, a partir de fontes dietéticas, cerca de 1000 mg de cálcio e 5 mg de alumínio. A presença de alumínio em alimentos está associada a fontes naturais ou a aditivos alimentares. Os alimentos naturalmente ricos em alumínio são batata, espinafre e chá (CETESB, 2012). Deficiência na absorção de cálcio se deve à ingestão de altas concentrações do alumínio em formas não alimentares, tais como antiácidos ou aglutinantes de fosfato (Merian et al., 2004).

Deng et al. (2000) relataram que componentes orgânicos da dieta, como os ácidos ascórbico (56,3 mg/kg/dia), cítrico (62mg/kg/dia), glucônico (62,7mg/kg/dia), láctico (28,8 mg/kg/dia), málico (42,9 mg/kg/dia), oxálico (28,8 mg/kg/dia) e tartárico (48 mg/kg/dia) podem facilitar a absorção do alumínio por atuarem como possíveis quelantes, aumentando sua distribuição no organismo. Os quelatos de alumínio podem atravessar as membranas celulares e compartimentos do organismo, alcançando os locais onde o alumínio tem efeito nocivo (Domingo et al., 1991).

A bioacumulação tem sido observada nos casos de ingestão de grandes quantidades de cloreto de alumínio (Greger, 1993). Alguns estudos mostraram que trabalhadores expostos a poeira do alumínio apresentaram altas concentrações deste metal no soro e no plasma seminal (Elinder et al., 1991; Dawson et al., 2000). Cerca de 50% do total do alumínio que entramos em contato se acumula no esqueleto,

enquanto que outros 25% se acumulam nos pulmões (Ganrot,1986). Geralmente as concentrações em tecidos moles são menores que nos ossos (Greger, 1993).

O principal meio de excreção do alumínio é na urina, sendo que o rim consegue eliminar diariamente quantidades inferiores a 100 µg de alumínio, além de pequenas quantidades poderem ser excretadas na bile (Ganrot, 1986; Davenport et al., 1990). A presença de altas concentrações de alumínio nos tecidos e no soro reflete a incapacidade do rim de excretá-lo rapidamente (Greger, 1993). De acordo com Greger (1993) a ineficiência na excreção do alumínio se deve a falhas na reabsorção tubular devido a maior ligação deste metal a proteínas plasmáticas, o que impede a rápida filtração. Portanto, a elevação das concentrações plasmáticas do alumínio durante várias horas, teoricamente, permite maior transferência deste para os tecidos (Greger, 1993).

## 2.2.Efeitos da exposição ao alumínio em órgãos e células

Nos mamíferos, o sistema nervoso central é particularmente vulnerável à exposição ao alumínio, onde este metal tem sido implicado na etiologia de diversas doenças, tais como esclerose lateral amiotrófica, doença caracterizada pela degeneração dos neurônios motores, parkinsonismo-demência de Guam e doença de Alzheimer (Piccardo et al., 1988; McLachlan et al., 1991; Yasui et al., 1992). O alumínio afeta a função neuronal, causando alterações na neurotransmissão com consequente estresse oxidativo. Dentre essas alterações pode-se citar a redução da atividade colinérgica, aumento da atividade da enzima glutamato descarboxilase e mudanças no transporte de ácido gama-aminobutírico (GABA) (Bilkei-Gorzo, 1993; Nayak e Chatterjee, 2001; Cordeiro et al., 2003). Além disso, alguns estudos sugerem que o alumínio altera a homeostase do ferro em neurônios cerebrais, a partir da captação da transferrina ligada a este íon. No entanto, essas mudanças neuronais induzidas pela intoxicação ao alumínio podem ser consequência de efeitos indiretos sobre as células da glia (Erazi, et al., 2010).

A exposição ao alumínio, mesmo que em menor grau, também está relacionada a doenças pulmonares obstrutivas. Amostras de soro e urina de soldadores de alumínio e de trabalhadores envolvidos na produção do seu pó apresentaram altas concentrações deste metal (Sjogren et al., 1983; Llobet et al., 1995).

Em relação aos efeitos sobre o aparelho reprodutor masculino, alguns estudos mostram a diminuição na concentração espermática e da motilidade dos espermatozoides (Yousef e Salama, 2009). Além disso, foi demonstrado que a concentração de alumínio nos testículos é significativamente mais elevada em pacientes em hemodiálise (Guo et al., 2005).

### 2.2.1. Testículo

O testículo realiza função endócrina, ao produzir a testosterona, e exócrina, por liberar espermatozoides imersos no plasma seminal. Ele é envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, chamada de albugínea testicular, que penetra no testículo dividindo seu parênquima em dois compartimentos básicos: o intertubular e o tubular. No rato, a produção do espermatozoide dura 56 dias, tempo total de duração do ciclo do epitélio seminífero (Russell et al., 1990).

Os túbulos seminíferos formam alças contorcidas que possuem duas extremidades conectadas à *rete testis* pelo túbulo reto. São constituídos pelo tecido peritubular e pelo epitélio seminífero, com as células de Sertoli e células da linhagem germinativa, espermatogônias, espermatócitos e espermátides (Russell et al., 1990). As células de Sertoli são altas, de formato colunar, com a base aderida à membrana basal. Sua região apical alcança o lúmen tubular e apresenta numerosos prolongamentos laterais e apicais, os quais se estendem ao redor de todas as células germinativas. Possuem núcleo bem característico, com cromatina finamente dispersa e nucléolo bem distinto (Russell e Griswold, 1993; Predes, 2007). Possuem a capacidade de degradar células em degeneração dentro de um ou dois dias dos primeiros sinais de degeneração das células espermatogênicas (Russell et al., 1990).

Células de Sertoli adjacentes se unem por junções oclusivas formando uma barreira para macromoléculas conhecida como barreira de Célula de Sertoli (Monsees et al., 2000). Isto resulta na formação de dois ambientes no epitélio seminífero: o basal, que contém espermatogônias e espermatócitos primários iniciais, e o adluminal, que contém espermatócitos mais tardios e espermátides em várias etapas da espermiogênese. A presença desta barreira faz com que as células de Sertoli estejam envolvidas no transporte de substâncias, do ambiente basal para as células germinativas no ambiente adluminal (Russell e Griswold, 1993).

Os túbulos seminíferos são delimitados por endotélio linfático, células mioides e elementos acelulares. As células mioides são contráteis e com isso fornecem a principal força para o movimento do fluido e propulsão dos espermatozoides no interior dos túbulos seminíferos. Juntamente com a túnica própria, as células mioides fornecem um suporte estrutural no qual as células de Sertoli e as células do compartimento basal do epitélio seminífero se apoiam (Russell et al., 1990).

O compartimento intersticial do testículo apresenta as células de Leydig que são produtoras da testosterona, macrófagos, vasos sanguíneos e linfáticos (Kim e Yang, 1999). Em ratos e camundongos, os vasos linfáticos são canais irregulares ou sinusoides, limitados por células endoteliais, denominados espaços linfáticos, os quais se estendem entre as células do interstício e os túbulos seminíferos. As células de Leydig possuem forma arredondada ou poligonal, núcleo central e citoplasma repleto de inúmeras gotículas de gordura. Apresentam características de células secretoras de esteroides, com retículo endoplasmático liso bem desenvolvido e numerosas mitocôndrias (Russell et al., 1990; Payne et al., 1996).

A histomorfometria testicular é empregada nos estudos de intoxicação com o objetivo de se mensurar os efeitos de substâncias tóxicas sobre a proporção dos elementos que constituem o parênquima testicular, bem como sobre os índices quantitativos de produção espermática e desenvolvimento de células, túbulo e epitélio seminífero (Russell et al., 1990). As mensurações do diâmetro tubular e altura do epitélio fornecem dados relevantes para a avaliação da eficiência espermatogênica. O comprimento tubular depende do volume dos testículos, da proporção volumétrica dos túbulos seminíferos e do diâmetro tubular. A quantificação métrica do túbulo seminífero por unidade de massa testicular, diferente da quantificação total, é um parâmetro produtivo que permite a comparação entre animais de diferentes portes (França e Russell, 1998).

Através de análises morfométricas é possível determinar o diâmetro tubular e luminal dos túbulos seminíferos, a altura do epitélio germinativo e contagem da população celular nos túbulos seminíferos. Análises restritas ao compartimento tubular servem como parâmetro para compreensão de como se encontra a espermatogênese e se foi alterada devido às condições na qual o animal se encontra. No compartimento intertubular pode ser realizada a contagem de pontos sob seus

constituintes e diâmetro do núcleo das células de Leydig (Kim e Yang, 1999). Alterações nas células de Leydig servem como indicativo de como se encontra a produção de testosterona. Além dessas análises, pode ser feita a proporção entre os constituintes do testículo no compartimento tubular (epitélio, lúmen e túnica própria) e intertubular. Portanto trata-se de uma análise quantitativa para se obter informações tridimensionais de secções bidimensionais de tecidos (Russell et al., 1990).

Não foram encontrados trabalhos avaliando a morfometria testicular em indivíduos expostos ao alumínio. Com relação a avaliação histopatológica, estudos mostram que o alumínio pode causar uma desorganização na arquitetura dos túbulos seminíferos, devido a descamação do epitélio com a presença de células germinativas acumuladas dentro dos túbulos afetados e parada da maturação em alguns túbulos, porém não citam em que estágio ocorreu esta parada. Foram observadas algumas células germinativas com núcleo pequeno e nucléolos altamente corados. No compartimento intertubular houve, hiperplasia de células de Leydig, assim como aglomeração formando grupos densos que circulam a maior parte dos túbulos seminíferos (Yousef e Salama, 2009).

Guo et al. (2005b) observaram, após duas semanas de tratamento com cloreto de alumínio nas concentrações de 7 e 13 mg/Kg via subcutânea, efeitos deletérios e alterações histopatológicas dos tecidos testiculares. Ademais, animais tratados durante cinco semanas apresentaram necrose nas espermátides e nos espermatozoides (Guo et al., 2005b).

### 2.2.2. Epidídimo

O epidídimo é o local onde os espermatozoides ganham sua capacidade fecundante no processo de maturação espermática, que envolve a aquisição e rearranjo de moléculas que participam da interação espermatozoide-zona pelúcida e fusão espermatozoide-ovócito (França et al., 2005).

Quando os espermatozoides dos mamíferos saem do testículo, eles possuem morfologia altamente especializada, mas são imóveis e incapazes de fertilizar um ovócito (Brooks, 1983; Hermo e Robaire, 2002; Gatti et al., 2004). Durante o trânsito epididimário, que é o período em que os espermatozoides demoram para percorrer o comprimento do seu ducto, esses gametas sofrem uma série de modificações, como a aquisição de motilidade (Dacheux e Pacquignon, 1980; Yeung et al., 1993),

alterações morfológicas como alterações de cabeça e cauda (Jindal e Panda, 1980; Bonet et al., 1992; Howes et al., 2001) e bioquímicas, como mudanças nos resíduos superficiais de carboidratos (Voglmayr et al., 1980; Dacheux e Voglmayr, 1983; Skudlarek et al., 1993; Abascal et al., 1998), na composição lipídica da membrana (Poulos et al., 1973; Atreja e Anand, 1985), alterações nas proteínas de membrana (Amann et al., 1993; Kohn et al., 1998; Gatti et al., 2004; Baker et al., 2005), aquisição de novas proteínas (Dacheux e Voglmayr, 1983; Hancock et al., 1993; Miranda et al., 1995).

Estas modificações envolvem intensas interações entre espermatozoides e proteínas produzidas e secretadas por células do epitélio epididimário, sendo a presença delas região-dependente. As regiões epididimária são denominadas como segmento inicial, cabeça, corpo e cauda. Elas podem ser morfológicamente distinguidas baseando-se na altura do epitélio, no diâmetro tubular e luminal e na frequência dos diferentes tipos celulares, além da presença de tecido muscular liso na região da cauda circundando o túbulo epididimário. Sabe-se que os dois diâmetros aumentam progressivamente no sentido do segmento inicial para a cauda, enquanto que a altura do epitélio diminui no mesmo sentido (Serre e Robaire, 1998). As mensurações dos diâmetros e altura de epitélio podem ser obtidas a partir de análises morfométricas, a exposição a agentes de diferentes origens como contaminantes ambientais podem alterá-las. No estudo da intoxicação com o alumínio, não foram encontrados trabalhos que relacionem seu efeito sobre dados morfométricos epididimários.

São observadas seis células distintas são geralmente observadas no epitélio epididimário de mamíferos, sendo elas as células principais, basais, apicais, claras, estreitas e halo (Hamilton, 1975; Robaire e Hermo, 1988; Hermo et al., 1994; Serre e Robaire, 1998). Elas apresentam variabilidade regional, com células ocorrendo especificamente ou em maior frequência em um ou determinados segmentos (Hermo et al., 1992; Igdoura et al., 1995; Morales et al., 1996).

A célula mais abundante do epidídimo é a principal, que tem formato colunar, núcleo localizado na porção basal e grande quantidade de lisossomos (Hamilton, 1975; Robaire e Hermo, 1988). Diferenças morfológicas e funcionais das células principais ao longo do epidídimo têm sido relatadas em diversas espécies (Robaire e Hermo, 1988), sendo estas diferenças relacionadas a alterações

espermáticas durante sua maturação (Cooper, 1990). A função secretora e de reabsorção das células principais, juntamente com as junções oclusivas entre elas, garantem a manutenção do microambiente intraluminal onde ocorre a maturação dos espermatozoides (Cooper, 1998). As células estreitas são encontradas em baixas quantidades e localizadas exclusivamente nos segmentos iniciais (Shum et al., 2009).

As células basais são mais numerosas no segmento inicial e no corpo, apresentam um prolongamento citoplasmático que alcança o lúmen epididimário e parecem atuar como possíveis precursoras das demais células epiteliais, bem como na produção de antioxidantes (Calvo et al., 1997). Elas funcionam como possíveis elementos de estabilização da morfologia do ducto, em função de sua disposição basal, abaixo do citoplasma das células principais. Alguns autores comentam a possível participação destas células na produção e secreção de esteroides em nível do epidídimo (Schimming et al., 2002).

Em roedores, as células apicais parecem estar restritas às regiões mais proximais do epidídimo (Schimming et al., 2002), estando envolvidas no transporte e digestão de proteínas e carboidratos do lúmen (Brown e Montesano, 1980; Palacios et al., 1993; Syntin et al., 1999).

As células possuem numerosas vesículas de coloração pálida e de vários tamanhos em sua região apical (Robaire e Viger, 1995). Podem ser encontradas na cabeça do epidídimo do rato (Brown e Montesano, 1980) e no corpo, porém predominam na região da cauda com função de endocitose (Robaire e Hermo, 1988; Serre e Robaire, 1998). Estas células são responsáveis pela acidificação do lúmen (Breton et al., 1996), este processo ocorre quando as células basais entram em contato com o lúmen interagem com a angiotensina II, podendo comunicar com as células claras que respondem por aumentar a acidificação do lúmen (Shum et al., 2008). A enzima vacuolar  $H^+$ -ATPase (V-ATPase) é uma proteína intracelular que acidifica organelas e é altamente expressa nas células claras tanto na sua membrana plasmática luminal e nas vesículas intracelulares nas sua porção apical, atuando na acidificação do lúmen na região da cauda epididimária e no vasos deferentes (Pastor-Soler et al., 2008).

Células halo são encontradas em todo epidídimo e em várias posições dentro do epitélio. Estas células são parte do sistema imune e foram caracterizadas como monócitos ou linfócitos (Robaire e Hermo, 1988).

A regionalização epididimária correlaciona suas características morfológicas com propriedades funcionais, sendo que o segmento inicial está relacionado com a absorção de fluidos vindos do testículo, as regiões da cabeça e corpo estão envolvidas com os processos iniciais e tardios de maturação espermática, como a aquisição da motilidade progressiva e da capacidade de reconhecimento e fertilização do ovócito, enquanto que a região da cauda está associada com o armazenamento espermático e com a remoção de espermatozoides anormais (Serre e Robaire, 1998; Oliva et al., 2009).

As funções relacionadas ao epitélio epididimário incluem absorção de fluidos, íons e moléculas orgânicas, secreção de glicoproteínas, espermiofagia, armazenamento de espermatozoides, síntese e metabolização de hormônios esteroides e de outras substâncias, como prostaglandinas e vitamina D<sub>3</sub>. Durante o processo de maturação, ocorre a absorção de proteínas e glicoproteínas produzidas pelo epitélio epididimário, assim como a remoção algumas proteínas de membrana espermática (Oliva et al., 2009).

A comunicação entre os diversos tipos celulares do epitélio são essenciais para a coordenação da função epididimária e a formação de um microambiente apropriado para a maturação espermática. Este ambiente envolve a participação de fatores testiculares, principalmente na região do segmento inicial. A distribuição diferencial das células epiteliais ao longo do ducto epididimário faz com que cada região apresente um fluido luminal característico, constantemente modificado pela atividade secretória e de reabsorção das células e pela atividade metabólica do espermatozoide (Setchell et al., 1988; Hinton et al., 1993).

O transporte do espermatozoide através do ducto epididimário depende da contração muscular, via transmissão simpática e parassimpática, da ação dos estereocílios presentes nas células epiteliais e do gradiente de pressão hidrostática diferencial entre as porções proximal e distal do ducto epididimário (Robaire e Hermo, 1988). A regulação destes mecanismos garante um tempo do trânsito espermático adequado para a ocorrência da maturação espermática (Oliva et al., 2009).

O tempo da passagem dos gametas pelo ducto epididimário é espécie-específico, variando de 3 a 15 dias (Cosentino e Cockett, 1986). No rato, o tempo de trânsito é de 8 dias (Amann et al., 1976; Robb et al., 1978; França et al., 2005) e uma

alteração nesse tempo pode alterar o processo de maturação. Dados da literatura mostram que o atraso no tempo de trânsito pelo epidídimo não altera a capacidade fértil dos gametas, mas quando ele é acelerado a fertilidade fica comprometida (Klinefelter e Suarez, 1997; Kempinas et al., 1998a,b). Esse prejuízo na fertilidade dos gametas ocorre porque o tempo disponível dos processos requeridos para a aquisição da capacidade fértil fica diminuído. A alteração no tempo de trânsito espermático também altera a quantidade de gametas disponíveis para a ejaculação (Klinefelter, 2002).

### 2.2.3. Espermatozoides

Os espermatozoides são células altamente especializadas, com a função de fertilizar o ovócito, sendo morfológicamente dividido em cabeça e cauda. A cabeça contém o núcleo haploide, com cromatina altamente compactada, e o acrossoma, uma estrutura de dupla parede situada entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo. Ele é derivado do complexo de Golgi, sendo formado durante a espermiogênese. No rato e no hamster a cabeça do espermatozoide é alongada em formato de gancho (Hafez, 1970).

A cauda é formada por um longo flagelo composto de três peças: intermediária, principal e terminal. Na peça intermediária existe grande número de mitocôndrias que se encontram dispostas em forma de hélice, possuindo a função de produzir a energia necessária para a motilidade espermática. O axonema do flagelo se inicia na região da peça intermediária e se mantém ao longo de toda a cauda, simplificando sua organização à medida que se aproxima da parte distal. Ele apresenta nove pares de microtúbulos periféricos e um par separado central, além de duas proteínas contráteis principais, a dineína e a tubulina, que utilizam a adenosina trifosfato (ATP), produzida pelas mitocôndrias presentes na peça intermediária, no mecanismo da motilidade espermática (Eddy e O'Brien, 1994; Hafez, 1995; Alberts et al., 2010).

As análises espermáticas *in vitro* permitem avaliar parâmetros morfofuncionais de espermatozoides, que podem ser correlacionados com a fertilidade. Motilidade, morfologia e concentração espermática são os parâmetros tradicionais mais simples a serem avaliados (Barth e Oko, 1989). O potencial fecundante depende, além de um mínimo de espermatozoides móveis por amostra,

das características do seu movimento, que podem ser analisadas por sistemas de análise computadorizada como o CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*), do percentual de células morfologicamente normais em preparações úmidas usando microscopia de contraste de fase, da integridade nuclear e estrutural de membranas, utilizando-se diferentes fluorocromos, além da integridade funcional dessas membranas, a partir dos testes hiposmóticos (Sanchez-Partida et al., 1999; Rigau et al., 2001; Rodriguez-Martinez, 2003; O'Meara et al., 2008).

Apesar de a motilidade ser somente um dos principais atributos de um espermatozoide fértil, este parâmetro continua sendo o primeiro e amplamente utilizado como indicador da função espermática. A motilidade é a manifestação da competência estrutural e funcional do espermatozoide, estando positivamente correlacionada com a integridade de membrana e morfologia normal (Peña Martínez, 2004; Neves, 2008).

Anormalidades no espermatozoide têm sido tradicionalmente classificadas por localização do defeito em relação às regiões celulares como cabeça e cauda, ou classificadas quanto a defeitos maiores, que incluem a maioria das anomalias da cabeça e peça intermediária, gota citoplasmática proximal e alterações individuais presentes numa percentagem elevada, e defeitos menores como cabeças de espermatozoide destacadas e gotículas citoplasmáticas distais (Menon et al., 2011).

Yousef et al. (2005) ao tratarem coelhos com cloreto de alumínio na concentração de 34mg/Kg, observaram diminuição nas médias globais do volume de sêmen ejaculado, na concentração e produção total de espermatozoides, bem como na motilidade total e progressiva de espermatozoides por ejaculado, quando comparado com animais não tratados. Moselhy et al. (2012) mostraram que ratos albinos tratados com cloreto de alumínio, em igual concentração ao anterior, tratados durante 30, 45 e 60 dias, tiveram diminuição da concentração sérica de testosterona e da motilidade espermática, bem como aumento de anormalidades na morfologia espermática.

Llobet et al. (1995), ao tratarem camundongos com nitrato de alumínio nas concentrações de 50, 100 e 200mg/Kg durante quatro semanas, observaram diminuição na concentração espermática no tratamento com 200 mg/Kg, não havendo alteração na motilidade. O alumínio na forma de nitrato apresentou toxicidade no desempenho reprodutivo dos animais tratados com 100 e 200mg/Kg,

havendo diminuição na taxa de prenhez de fêmeas não tratadas cruzadas com os machos tratados.

Portanto, o alumínio apresenta poucos estudos sobre seus efeitos na arquitetura do tecido reprodutivo. Como o testículo desempenha função de produção dos espermatozoides e o epidídimo no processo de maturação destes, qualquer patologia que contribua para alterar essa função pode resultar no processo de alteração na produção e maturação espermática, influenciando na fertilidade. Com as análises morfométricas nos cortes histológicos, tanto do testículo como epidídimo, em animais tratados com o alumínio, é possível obter respostas sobre o possível efeito do alumínio nestes órgãos.

### 3. REFERÊNCIAS

ABASCAL, I., SKALABAN, S. R., GRIMM, K. M., AVILÉS, M., MARTIANEZ-MENARGUEZ, J. A., CASTELLS, M. T., BALLESTA, J., ALHADEFF, J. A. 1998 Alteration of the isoforma composition of plasma-membrane-associated rat Sperm  $\alpha$ -L-fucosidase during late epididymal maturation: comparative characterization of the acidic and neutral isoforms. *The Biochemical Journal*, v. 333, p. 201-207.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. 2010. *Biologia Molecular da Célula*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed.

ALFREY, A. C., HEGG, A., CRASWELL, P. 1980. Metabolism and toxicity of aluminum in renal failure. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 33, p. 1509-1516.

AMANN, R. P., JOHNSON, L., THOMPSON, D. L., PICKETT, B. W. 1976. Daily spermatozoal production, epididymal spermatozoal reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the rhesus monkey. *Biology of Reproduction*, v. 15, p. 586-592.

AMANN, R. P., HAMMERSTEDT, R. H., VEERAMACHANENI, D. N. 1993. The epididymis and sperm maturation: a perspective. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 5, p. 361-381.

ATREJA, S. K., ANAND, S. R. 1985. Phospholipase and lysophospholipase activities of goat spermatozoa in transit from the caput to the cauda epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 74, p. 686-691.

BAKER, M. A., WITHERDIN, R., HETHERINGTON, L., CUNNINGHAM-SMITH, K., AITKEN, R. J. 2005. Identification of post-translational modifications that occur during sperm maturation using difference in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, v. 5, p. 1003- 1012.

BARTH, A. D., OKO, R. J. 1989. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames, IA: Iowa University Press, 285p.

BILKEI-GORZO, A. 1993. Neurotoxic effect of enteral aluminium. *Food and Chemical Toxicology*, v. 31, p. 357–361.

BONET, S., BRIZ, M., FRADERA, A., EGOZCUE, J. 1992. Origin, development and ultrastructure of boar spermatozoa with folded tails and with two tails. *Human Reproduction*, v. 7, p. 523-528.

BRETON, S., SMITH, P. J., LUI, B., BROWN, D. 1996. Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H<sup>+</sup>)-ATPase. *Nature Medicine*, v. 2, p. 470–472.

BRASIL. 2005. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução n. 357.

BROOKS, D. E. 1983. Epididymal functions and their hormonal regulation. *Australian Journal of Biological Sciences*, v. 36, p. 205-221.

BROWN, D., MONTESANO, R. 1980. Membrane specialization in the rat epididymis. I. Rod-shaped intramembrane particles in the apical (mitochondrias-rich) cell. *Journal of Cell Science*, v. 45, p. 187-198.

CALVO, A., BUSTOS-ÓREGON, E., PASTOR, L. M. 1997. Morphological and histochemical changes in the epididymis of hamster (*Mesocricetus auratus*) subjected to short photoperiod. *Journal of Anatomy*, v. 191, p. 77-88.

CETESB. Ficha de Informação Toxicológica. Alumínio. CETEBS, São Paulo, 2012. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/aluminio.pdf>. Acesso em: 24 de janeiro de 2013.

COLOMINA, M. T., GOMEZ, M., DOMINGO, J. L., LLOBET, J. M., CORBELLA, J. 1992. Concurrent ingestion of lactate and aluminum can result in developmental toxicity in mice. *Reserach Communication in Chemical Pathology and Pharmacology*, v. 77, n. 1, p. 95-106.

COOPER, T. G. 1990. In defense of a function for the human epididymis. *Fertility and Sterility*, 54:965-75.

COOPER, T. G. 1998. Epididymis. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press, California: E. Knobil & J. D. Neill, v. 2, p. 1-17.

COSENTINO, M. J., COKETT, A. T. 1986. Structure and function of the epididymis. *Urological Research*, v. 14, n. 5, p. 229-240.

CONSTANTINI, S., GIORDANA, R., IOPPOLA, A., MANTOVANI, A., BALLANTI, P., MOCETTI, P., BONUCCI, E. 1989. Distribution of aluminum following intraperitoneal injection of aluminum lactate in the rat. *Pharmacology & Toxicology*, v. 64, p. 47-50.

CORDEIRO, J. M., SILVA, V. S., OLIVEIRA, C. R., GONÇALVES, P. P. 2003. Aluminium induced impairment of Ca<sup>2+</sup> modulatory action on GABA transport in brain cortex nerve terminals. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 97, p. 132– 142.

CSUROS, M, CSUROS, S. 2002. *Environmental sampling and analysis for metals*. Boca Raton: CRC Press, 413p.

DACHEUX, J. L., PACQUIGNON, M. 1980. Relations between the fertilizing ability, motility and metabolism of epididymal spermatozoa. *Reproduction, Nutrition and Development*, v. 20, p. 1085-1099.

DACHEUX, J. L., VOGLMAYR, J. K. 1983. Sequence of sperm cell surface differentiation and its relationship to exogenous fluid proteins in the ram epididymis. *Biology of Reproduction*, v. 29, p. 1033-1046.

DAVENPORT, A., DAVISON, A. M., NEWTON, K. E., WILL, E. J., GILES, G. R., TOOTHILL, C. 1990. Urinary aluminium excretion following renal transplantation and the effect of pulse steroid therapy. *Annals of Clinical Biochemistry*, v. 27, p. 25–32.

DAWSON, E. B., EVANS, D. R., HARRIS, W. A., POWELL, L. C. 2000. Seminal plasma trace metal levels in industrial workers. *Biological Trace Element Research*, v. 74, p. 97-105.

DENG, Z., COUDRAY, C., GOUZOUX, L., MAZUR, A., RAYSSIGUIER, Y., PÉPIN, D. 2000. Effects of Acute and Chronic Congestion of AlCl<sub>3</sub> with Citrate or Polyphenolic Acids on Tissue Retention and Distribution of Aluminum in Rats. *Biological Trace Element Research*, v.76, p.245-256.

DOMINGO, J. L., GOMEZ, M., LLOBET, J. M., CORBELLA, J. 1991. Influence of some dietary constituents on aluminum absorption and retention in rats. *Kidney International*, v. 39, n. 4, p. 598-601.

EDDY, E. M., O'BRIEN, D. A. 1994. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Eds.) *The Physiology of Reproduction*. 2ed. New York: Raven Press, Cap. 2, p. 29-77.

ELINDER, C. G., AHRENGART, L., LIDUMS, V., PETTERSSON, E., SJÖGREN, B. 1991. Evidence of aluminum accumulation in aluminum welders. *British Journal of Industrial Medicine*, v. 48, n. 11, p. 735–738.

ELLIOT, H. L., DRYBURGH, F., FELL, G. S., SABET, S., MACDOUGALL, A. I. 1978. Aluminium toxicity during regular haemodialysis. *Brazilian Medical Journal*, v. 1, p. 1101-1103.

ERAZI, H., SANSAR, W., AHBOUCHA, S., GAMRANI, H. 2010. Aluminum affects glial system and behavior of rats. *Comptes Rendus Biologies*, v. 333, p. 23–27.

FERNANDEZ, C. D. B. 2006. Alteração do tempo de trânsito epididimário: Implicações no Perfil Proteico e Outros Parâmetros Espermáticos. 87p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

FERNANDEZ-LORENZO, J. R., COCHO, J. A., REY-GOLDAR, M. L., COUCE, M., FRAGA, J. M. 1999. Aluminum contents of human milk, cow's milk, and infant formulas. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v. 28, n. 3, p. 270-275.

FORSTNER, U., WITTMANN, G. T. W. 1981. *Metal pollution in the aquatic environment*. 2° ed. Berlim. Springer-Verlag, 1981, 486p.

FRANÇA, L. R., RUSSELL, L. D. 1998. Testis morphometric seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production on domestic cats (*Felis catus*). *Biology of Reproduction*, v. 68, p. 1554-1561.

FRANÇA, L. R., AVELAR, G. F., ALMEIDA, F. F. L. 2005. Spermatogenesis and transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, v. 63, p. 300-318.

FRASER, L. R. 1987. Minimum and maximum extracellular Ca<sup>2+</sup> requirements during mouse sperm capacitation and fertilization *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 81, p. 77–89.

FROMENT, D. H., BUDDINGTON, B., MILLER, N. L., ALFREY, A. C. 1989. Effect of solubility on the gastrointestinal absorption of aluminum from various aluminum compounds in the rat. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 114, n. 3, p. 237-342.

GANROT, P. O. 1986. Metabolism and possible health effects of aluminum. *Environmental Health Perspectives*, v. 65, p. 363-441.

GATTI, J. L., CASTELLA, S., DACHEUX, F., ECRUYD, H., MÉTAYER, S., THIMON, V., DACHEUX, J. L. 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 321-339.

GREGER, J. L. 1993. Aluminum metabolism. *Annual Review of Nutrition*, v.13, p. 43-63.

GOMEZ, M., DOMINGO, J. L., LLOBET, J. M. 1991. Developmental toxicity evaluation of oral aluminum in rats: influence of citrate. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 13, n. 3, p. 323-328.

GUO, C. H., LIN, C. Y., YEH, M. S., HSU, G. S. W. 2005a. Aluminum induced suppression of testosterone through nitric oxide production in male mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 19, p. 33–40.

GUO, C. H., LUB, Y. F., HSU, G. S. W. 2005b. The influence of aluminum exposure on male reproduction and offspring in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 20, p. 135–141.

HAFEZ, E. S. E. 1970. *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*. Detroit: Lea & Febiger, Cap. 3, p. 56.

HAFEZ, E. S. E. 1995. Preservação e criopreservação de gametas e embriões. In: *Reprodução Animal*. 6. ed. São Paulo: Manole, Cap. 24, p. 513-535.

HAMILTON, D. W. 1975. Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymidis, and ductus deferens in the rat. In: GREEP, R.O., ASTWOOD, E.B. (Eds.), *Handbook of Physiology*. Sect. 7, Endocrinology, Male Reproductive System. American Physiology Society, Washington, v. 5, p. 259–301.

HANCOCK, L.W., RAAB, L.S. 1993.  $\alpha$ -L-fucosidase. *Biology of Reproduction*, v. 48, p. 1228-1238.

HAWKINS, N. M., COFFEY, S., LAWSON, M. S., DELVES, H. T. 1994. Potential aluminium toxicity in infants fed special infant formula. *Journal of Pediatric and Gastroenterology Nutrition*, v. 19, n. 4, p. 377-381.

Health Council of the Netherlands. 2009. Aluminium and aluminium compounds; Evaluation of the effects on reproduction, recommendation for classification. The Hague: Health Council of the Netherlands.

HERMO, L., OKO, R., ROBAIRE, B. 1992. Epithelial cells of the epididymis show regional variations with respect to the secretion or endocytosis of immobilin as revealed by light and electron microscope immunocytochemistry. *Anatomical Record*, v. 232, p. 202–220.

HERMO, L., OKO, R., MORALES, C. 1994. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. *International Review of Cytology*, v. 154, p. 105–189.

HERMO, L., ROBAIRE, B. 2002. Epididymal cell types and their functions. In: ROBAIRE, B., HINTON, B. T. *The Epididymis – from molecules to clinical practice*. (Eds.). Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York, p. 81-102.

HINTON, B. T., SETCHELL, B. P. 1993. Fluid secretion and movement. In: RUSSELL, L. D., GRISWOLD, M. D. *The Sertoli cell*. Vienna IL: Cache River.

HOWES, E. A., HURST, S. M., JONES, R. 2001. Actin and actin-binding proteins in bovine spermatozoa: potential role in membrane remodeling and intracellular signaling during epididymal maturation and the acrosome reaction. *Journal of Andrology*, v. 22, p. 62-72.

IGDOURA, S. A., MORALES, C. R., HERMO, L. 1995. Differential expression of cathepsins B and D in testis and epididymis of adult rats. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 43, p. 545-557.

JINDAL, S. K., PANDA, J. N. 1980. Maturation changes of goat spermatozoa during transit throughout the epididymis. *Andrologia*, v. 12, p. 328-331.

KEMPINAS, W. G., SUAREZ, J. D., ROBERTS, N. L., STRADER, L., FERRELL, J., GOLDMAN, J. M., KLINEFELTER, G. R. 1998a. Rat epididymal sperm quantity, quality, and transit after guanethidine - induced sympathectomy. *Biology of Reproduction*, v. 59, p. 890-896.

KEMPINAS, W. G., SUAREZ, J. D., ROBERTS, N. L., STRADER, L., FERRELL, J., GOLDMAN, J. M., NAROTSKY, M. G., PERREAULT, S. D., EVENSON, D. P., RICKER, D. D., KLINEFELTER, G. R. 1998b. Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy. *Biology of Reproduction*, v. 59, 897-904.

KIM, I., YANG, H. 1999. Morphometric study of the testicular interstitium of the rat during postnatal development. *The Korean Journal of Anatomy*, v. 32, p. 849-858.

KLINEFELTER, G. R., LASKEY, J. W., FERRELL, J., SUAREZ, J. D., ROBERTS, N. L. 1997. Discriminant analysis indicates a single sperm protein (SP22) is predictive of fertility following exposure to epididymal toxicants. *Journal of Andrology*, v.18, n. 2, p. 139-150.

KLINEFELTER, G. R. 2002. Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. In: ROBAIRE, B., HINTON, B. T. *The Epididymis – from molecules to clinical practice*. (Eds.), Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York, p. 353-369.

KOHN, F. M., DAMMSHÄUSER, I., NEUKAMM, C., RENNEBERG, H., SIEMS, W. E., SCHILL, W. B., AUMÜLLER, G. 1998. Ultrastructural localization of angiotensin-converting enzyme in ejaculated human spermatozoa. *Human Reproduction*, v. 13, p. 604-610.

KRASOVSKIH, G. N., VASUKOVICH, L. Y., CHARIEV, O. G. 1979. Experimental Study of Biological Effects of Lead and Aluminum Following Oral Administration. *Environmental Health Perspectives*. v. 30, p. 47-51.

KREWSKI, D., YOKEL, R. A., NIEBOER, E., BORCHELT, D., COHEN, J., HARRY, J., KACEW, S., LINDSAY, J., MAHFOUZ, A. M., RONDEAU, V. 2007. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *Journal of Toxicology Environmental Health Part B Critical Review*, v. 10, p. 1-269.

LLOBET, J. M., COLOMINA, M. T., SIRVENT, J. J., DOMINGO, J. L., CORBELLA, J. 1995. Reproductive Toxicology of Aluminum in Male Mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, v. 25, p. 45-51.

LOTE, C. J., WOOD, J. A., SAUNDERS, H. C. 1992. Renal filtration, reabsorption and excretion of aluminum in the rat. *Clinical Science*, v. 82, p. 13-18.

MCLACHLAN, D. R. C., DALTON, A. J., KRUCK, T. P. A., BELL, M. Y., SMITH, W. L., KALOW, W., AND ANDREWS, D. F. 1991. Intramuscular desferrioxamine in patients with Alzheimer's disease. *Lancet*, v. 337, p. 1304-1308.

MARSDEN, S. N. E., PARKINSON, I. S., WARD, M. K., ELLIS, H. A., KERR, D. N. S. 1979. Evidence for aluminium accumulation in renal failure. Proceedings of the European. *Dialysis and Transplant Association*, v. 16, p. 588-596.

MENON, A. G., BARKEMA, H. W., WILDE, R., KASTELIC, J. P., THUNDATHIL, J. C. 2011. Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 75, p. 241–247.

MERIAN, E., ANKE, M., IHNAT, M., STOEPPLE, M. 2004. *Elements and their Compounds in the Environment, Occurrence, Analysis and Biological Relevance*. Wiley- VCH, Weinheim, p. 635–658.

MIRANDA, P. V., BRANDELLI, A., TEZON, J. G. 1995. Characterization of beta-N-acetylglucosaminidase from human epididymis. *International Journal of Andrology*, v. 18, p. 263-270.

MONSEES, T. K., FRANZ, M., GEBHARDT, S., WINTERSTEIN, U., SCHILL, W. B., HAYATPOUR, J. 2000. Sertoli cell as a target for reproductive hazards. *Andrologia*, v. 32, p. 239-246.

MORAIS, A. C. T. 2009. Concentração de metais pesados em peixes teleósteos do rio Piracicaba. 108p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

MORALES, C. R., IGDOURA, S.A., WOSU, U.A., BOMAN, J., AGRAVES, W.S. 1996. Low density lipoprotein receptor related protein-2 expression in efferent duct and epididymal epithelia: evidence in rats its *in vivo* role in endocytosis of apolipoprotein-J/clusterin. *Biology of Reproduction*, v. 55, p. 676– 683.

MOSELHY, W. A., HELMY, N. A., ABDEL-HALIM, B. R., NABIL, T. M., ABDEL-HAMID, M. I. 2012. Role of Ginger Against the Reproductive Toxicity of

Aluminium Chloride in Albino Male Rats. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, p. 335–343.

NAYAK, P., CHATTERJEE, A. K. 2001. Effects of aluminium exposure on brain glutamate and GABA systems: an experimental study in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 39, p. 1285–1289.

NEVES, M. M. 2008. Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de *Gallus domesticus* e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino. 117p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

NIESINK, R. J. M., DE VRIES, J., HOOLINGER, M. A. 1995. *Toxicology, Principles and Applications*. Boca Raton: CRC.

OLIVA, S. U., RINALDO, P. A., STUMPP, T. 2009. Biologia epididimária: maturação espermática e expressão gênica. *O Mundo da Saúde*, v. 33, n. 4, p. 419-425.

O'MEARA, C. M., HANRAHAN, J. P., PRATHALINGAM, N. S., OWEN, J. S., DONOVAN, A., FAIR, S., WARD, F., WADE, M., EVANS, A. C., LONERGAN, P. 2008. Relationship between *in vitro* sperm functional tests and *in vivo* fertility of rams after cervical insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, v.69, p.513-522.

ORIHUELA, D. 2009. Inhibitory effect of aluminium on calcium absorption in small intestine of rats with different thyroid hormone status. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 103, p. 1542–1547.

PALACIOS, J., REGADERA, J., PANIAGUA, R., GAMALLO, C., NISTAL, M. 1993. Immunohistochemistry of the human ductus epididymis. *Anatomical Record*, v. 235, p. 560–566.

PASTOR-SOLER, N. M., HALLOWS, K. R., SMOLAK, C., GONG, F., BROWN, D., BRETON, S. 2008. Alkaline pH- and cAMP-induced V-ATPase membrane accumulation is mediated by protein kinase A in epididymal clear cells. *American of Journal Physiology Cell Physiology*, v. 294, p. C488–C494.

PAYNE, A. H., HARDY, M. P., RUSSELL, L. D. 1996. *The Leydig Cell*. Cache River Press, Vienna.

PEÑA, A., JOHANNISSON, A., LINDEFORSBERG, C. 1999. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology*, v. 52, n. 6, p. 965-980.

PEÑA MARTÍNEZ, A. I. 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 209-224.

PICCARDO, P., YANAGIHARA, R., GARRUTO, R. M., GIBBS, C. J. JR., GAJDUSEK, D. C. 1988. Histochemical and X-ray microanalytical localization of aluminum in amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia of Guam. *Acta Neuropathologica*, v. 77, p. 1-4.

POULOS, A., VOGLMAYR, J. K., WHITE, I. G. 1973. Phospholipid changes in spermatozoa during passage through the genital tract of the bull. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 306, p. 194-202.

PREDES, F. S. 2007. Associação de Cádmio e *Gingko Biloba* em Ratos: Avaliação dos Testículos Quanto a Modificações de Estrutura, Ultra-estrutura e Morfometria. 64p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

POPIŃSKA, K., KIERKUŚ, J., LYSZKOWSKA, M., SOCHA, J., PIETRASZEK, E., KMIOTEK, W., KSIAZYK, J. 1999. Aluminum contamination of parenteral nutrition additives, amino acid solutions, and lipid emulsions. *Nutrition*, v. 15, n. 5, p. 683–686.

RANA, S. V. S. 2007. *Environmental Pollutions: Health and Toxicology*. Alpha Science. International. 269p.

RIGAU, T., FARRÉ, M., BALLESTER, J., MOGAS, T., PEÑA, A., RODRÍGUEZ-GIL, J. E. 2001. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*, v. 56, n. 5, p.801-815.

ROBAIRE, B., HERMO, L. 1988. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens structure, functions, and their regulation. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.). *The Physiology of Reproduction*, v. 23, p. 999–1080.

ROBAIRE, B., VIGER, R. S. 1995. Regulation of Epididymal Epithelial Cell Functions. *Biology of Reproduction*, v. 52, p. 226-236.

ROBB, G., W., AMMAN, R. P., KILLIAN, G. J. 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of puberal and adult rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 54, p. 103-107.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reproduction in Domestic Animals*, v. 38, p. 312–318.

RUSSELL, L. D., ETLIN, R. A., HIKIM, A. P. S., CLEGG, E. D. 1990. *Histological And Histopathological Evaluation Of The Testis*. Cache River Press, Clearwater.

RUSSELL, L. D., GRISWOLD, M. D. 1993. *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater.

SANCHEZ-PARTIDA, L. G., WINDSOR, D. P., EPPLESTON, J., SETCHELL, B. P., MAXWELL, W. M. 1999. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. *Journal of Andrology*, v. 20, p. 280-288.

SARTI, P. 2006. Avaliação morfométrica do testículo e da espermatogênese de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758) adultas. 56p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

SCHIMMING, B. C., VICENTINI, C. A., TIRAPELLI, L. F., TIRAPELLI, D. P. C. 2002. Observações morfológicas no ducto epididimário do cão. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 39, n. 2, p. 61-65.

SERRE, V., ROBAIRE, B. 1998. Segment-specific morphological changes in aging brown norway rat epididymis. *Biology of Reproduction*, v. 58, p. 497–513.

SETCHELL, B. P., MADDOCKS, S., BROOKS, D. E. 1988. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In: KNOBIL, E., NEILL, J. *The Physiology of Reproduction*. (Eds.) New York: Raven Press.

SHUM, W. W. C., DA SILVA, N., MCKEE, M., SMITH, P. J. S., BROWN, D., BRETON, S. 2008. Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell*, v. 135, n. 6, p. 1108–1117.

SHUM, W. W. C., DA SILVA, N., BROWN, D., BRETON, S. 2009. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell–cell Crosstalk. *The Journal of Experimental Biology*, v. 212, p. 1753-1761.

SILVA, M. R. C. 2002. Estudo do sedimento da bacia hidrográfica do Moji-Guaçu, com ênfase na determinação de metais. 86p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo.

SJOGREN, B., LUNDBERG, I., LIDUMS, V. 1983. Aluminum in the blood and urine of industrially exposed workers. *British Journal of Industrial Medicine*, v. 40, p. 301-304.

SKUDLAREK, M. D., TULSIANI, D. R., NAGDAS, S. K., ORGEBIN-CRIST, M. C. 1993. Beta-D-galactosidase of rat spermatozoa: subcellular distribution, substrate specificity, and molecular changes during epididymal maturation. *Biology of Reproduction*, v. 49, p. 204-213.

SYNTIN, P., DACHEUX, J. L., DACHEUX, F. 1999. Postnatal development and regulation of proteins secreted in the boar epididymis. *Biology of Reproduction*, v. 61, p. 1622-1635.

VOGLMAYR, J. K., FAIRBANKS, G., JACKOWITZ, M. A., COLELLA, J. R. 1980. Post-testicular developmental changes in the ram sperm cell surface and their relationship to luminal fluid proteins of the reproductive tract. *Biology of Reproduction*, v. 22, p. 655-667.

YEUNG, C. H., COOPER, T. G., OBERPENNING, F., SCHULZE, H., NIESCHLAG, E. 1993. Changes in movement characteristics of human spermatozoa along the length of the epididymis. *Biology of Reproduction*, v. 49, p. 274-280.

YASUI, M., KIHARA, T., OTA, K. 1992. Calcium, magnesium and aluminum concentrations in Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, v. 13, p. 593- 600.

YOKEL, R. A., MCNAMARA, P. J. 1989. Elevated aluminum persists in serum and tissues of rabbits after a six-hour infusion. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 99, p. 133-138.

YOUSEF, M., EL-MORSY, A. M. A., HASSAN, M. S. 2005. Aluminium-induced deterioration in reproductive performance and seminal plasma biochemistry of male rabbits: Protective role of ascorbic acid. *Toxicology*, v. 215, p. 97–107.

YOUSEF, M. I., SALAMA, A. F. 2009. Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, p. 1168–1175.

WILLS, M. R., SAVORY, J. 1982. Aluminium poisoning: dialysis encephalopathy, osteomalacia, and anaemia, *Lancet*, v. 2, p. 29–34.

ZAGATTO, P. A., BERTOLETTI, E. 2006. *Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações*. São Carlos: Rima, 478p.

# **CAPÍTULO 1 – PARÂMETROS TESTICULARES, EPIDIDIMÁRIOS E ESPERMÁTICOS DE RATOS WISTAR EXPOSTOS CRONICAMENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ALUMÍNIO**

## **1. INTRODUÇÃO**

A preocupação com a contaminação ambiental tem crescido a cada ano, principalmente quanto ao seu potencial efeito sobre a fertilidade. Muitos destes contaminantes estão presentes na água de consumo, podendo contribuir para a ocorrência de problemas de infertilidade, tanto em animais quanto em homens (Saradha e Marthus, 2006; Veeramachaneni, 2008).

A preocupação com as consequências da ingestão de alumínio eram pequenas até a década de 90, pois se pensava que este elemento não era oralmente biodisponível. Porém, atualmente sabe-se que o alumínio pode ser absorvido pelo aparelho digestório e que esta absorção é baixa, cerca de 0,1%, devido ao fato do aparelho digestório representar uma grande barreira para a absorção desse metal (Alfrey, 1985; Deng et al., 2000). O alumínio, mesmo apresentando biodisponibilidade não possui qualquer função biológica significativa, sendo que os efeitos tóxicos são geralmente observados quando este metal é ingerido em grande quantidade. Neste caso ocorre sua acumulação nos órgãos-alvo, o que tem sido associado com danos no tecido testicular e redução na concentração sérica de testosterona (Kamboj e Kar, 1964; Rana, 2007).

Estudos mostram que altas concentrações de alumínio podem alterar parâmetros reprodutivos. Yousef et al. (2005), tratando por via oral coelhos machos de sete meses de idade com cloreto de alumínio na dose de 34mg/Kg, obtiveram diminuição nas médias globais de parâmetros seminais, como volume do ejaculado, concentração espermática, produção total de espermatozoides e porcentagem de espermatozoides móveis por ejaculado. Guo et al. (2005b), avaliando tecido testicular e taxa de fertilidade em ratos tratados por via subcutânea com 7 e 13mg/kg de cloreto de alumínio, observaram a ocorrência de necrose nos túbulos seminíferos no tratamento de maior dose durante cinco semanas, além da diminuição significativa na fertilidade. Em outro trabalho, houve uma diminuição na produção de testosterona quando os ratos foram tratados por via intraperitoneal com 35mg/Kg

do cloreto de alumínio (Guo et al., 2005a). Quanto aos epidídimos, observou-se diminuição do peso, além de redução significativa de espermatozoides no seu lúmen (Yousef et al., 2005; Guo et al., 2009). Não foram encontrados trabalhos avaliando os efeitos do alumínio sobre parâmetros histomorfométricos testiculares e epididimários.

Cheng e Mruk (2011) relatam que o declínio atual na qualidade do espermatozoide em homens de países industrializados é causado, em parte, pela exposição a baixas concentrações de tóxicos ambientais. São escassos os estudos sobre o efeito dessas baixas concentrações, principalmente do alumínio, sobre o aparelho reprodutor quando ingeridas oralmente. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos crônicos de diferentes concentrações de alumínio sobre alguns parâmetros reprodutivos, testiculares, epididimários e espermáticos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Grupos experimentais**

Para este experimento foram utilizados 30 ratos machos da linhagem Wistar em com 70 dias de idade ( $332,11 \pm 28,41$ g) provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Educação Física com controle de iluminação ambiente (12h claro/ 12h escuro) e temperatura ( $21^{\circ}\text{C}$ ), os animais foram acondicionados em gaiolas conjuntas contendo 6 animais/gaiola. Foram fornecidas diariamente 25g de ração comercial para animais de laboratório por rato e água de beber *ad libitum*.

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais ( $n = 6$  animais/grupo). Estes grupos englobaram animais que não receberam alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) (grupo controle, G1), sendo fornecido 1mL de água destilada por gavagem, animais que receberam baixas concentrações, 0,02mg/L (grupo 2) e 0,10mg/L (grupo 3) de alumínio na forma de  $\text{AlCl}_3$ , e altas concentrações, 10mg/Kg Al (grupo 4, 1/40  $\text{DL}_{50}$ ) e 40mg/Kg Al (grupo 5, 1/10  $\text{DL}_{50}$ ), todas adaptadas ao volume de 1mL. A administração foi feita diariamente por 112 dias, período que contempla dois ciclos do epitélio seminífero. A dose estabelecida de 0,02mg/L corresponde a 1/5 do valor tolerável de contaminação pelo alumínio em águas doces que é de 0,1mg/L,

determinada por Brasil (2005). Já as altas concentrações foram baseadas na DL<sub>50</sub> do alumínio (Krasoviskii et al., 1979). Os animais foram pesados semanalmente para adequação das doses, obtendo-se, ao final, a variação de peso durante o período experimental. Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV) sob número de protocolo 019/2011.

## 2.2. Coleta do material biológico

Os animais de cada grupo foram eutanasiados 24 horas após o término da administração do cloreto de alumínio (113° dia de experimento). Primeiramente eles foram pesados em balança de precisão 0,01g (AS500, Marte), sendo posteriormente sedados e anestesiados utilizando-se cloridrato de xilazina (10mg/kg/IP) e cloridrato de quetamina (150mg/kg/IP), respectivamente. Durante a etapa de anestesia, realizou-se a coleta do sangue por meio de punção cardíaca. Este foi centrifugado a 4.119 xg por 15 minutos para obtenção do soro, que foi armazenado em microtubos previamente identificados, o material foi congelado a -20 °C. Posteriormente, aprofundou-se a anestesia até a morte do animal. Em seguida, fez-se a abertura da cavidade abdominal a partir de uma incisão na linha alba, para a dissecação e a obtenção dos testículos e epidídimos. O testículo e o epidídimo esquerdo foram utilizados para processamento histológico, enquanto que o testículo direito foi congelado para realização das análises enzimáticas e o epidídimo, do mesmo lado, foi usado para obtenção dos espermatozoides da região da cauda.

## 2.3. Processamento histológico do testículo e epidídimo

O testículo e o epidídimo esquerdo foram fixados em solução de Karnovsky (Karnovisky, 1965) durante 24 horas. Posteriormente, os órgãos foram seccionados, utilizando lâminas de barbear, para a obtenção de pequenos fragmentos, sendo o epidídimo segmentado nas suas quatro regiões de estudo: segmento inicial, cabeça, corpo e cauda. Em seguida, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 95% e absoluto) com trocas a cada 30 minutos. Após a desidratação foram realizadas a pré-inclusão e inclusão em hidroxietil metacrilato (Historesin<sup>®</sup>, Leica). Cortes histológicos de 3µm de espessura foram obtidos utilizando-se navalhas de vidro em micrótomo rotativo (Reichert Jung 2045).

Esses cortes foram montados em lâminas histológicas, num total de 12 cortes por lâmina. As secções histológicas semi-seriadas foram obtidas utilizando intervalos de 13 cortes para testículos e oito cortes para o epidídimo. Os cortes foram corados com azul de toluidina-borato de sódio 1% e montadas com Entellan (Merck).

Os cortes histológicos foram analisados qualitativamente em microscópio de luz Olympus BX-50, em aumentos de 100, 200 e 400x, para a verificação da integridade da arquitetura tecidual testicular e epididimária, presença de alterações histopatológicas e identificação das regiões epididimárias, considerando os parâmetros como altura do epitélio, diâmetros luminal e tubular, bem como a distribuição das células em cada região.

## 2.4. Morfometria testicular

### 2.4.1. Análise dos componentes tubulares

O peso do parênquima testicular foi obtido subtraindo-se a massa ocupada pela albugínea do peso total dos testículos, obtendo-se assim o peso líquido da porção funcional do órgão. O índice gonadossomático (IGS), definido pela razão entre peso corporal e testicular, foi calculado usando a fórmula:  $PG/PC \times 100$  (PG = peso total das gônadas e PC = peso corporal; Amann, 1970).

As densidades volumétricas (V.v.) de túbulo seminífero e intertúbulo foram obtidas utilizando-se uma grade contendo 266 pontos projetados sobre imagens digitalizadas do parênquima testicular, totalizando 2660 pontos por animal. Foram registrados os pontos coincidentes sobre túbulo seminífero (túnica própria, epitélio seminífero e lúmen) e intertúbulo e, em seguida, calculado o percentual dos pontos sobre cada componente. O volume (mL) de cada componente testicular foi estimado a partir da fórmula:  $\% \text{ túbulo (ou seus constituintes)} / 100 \times \text{volume total do parênquima testicular}$  (Melo et al., 2010). Como a densidade do testículo de mamíferos é em torno de 1 (Paula et al., 2002; Tae et al., 2005; Leal e França, 2006; Costa et al., 2011), a massa do testículo foi considerada igual ao seu volume.

Baseado nos volumes de túbulos seminíferos e nos pesos corporais foi calculado o índice tubulossomático (ITS) a partir da fórmula:  $VT/PC \times 100$  (VT = Volume de túbulo seminífero e PC = Peso corporal).

O diâmetro tubular médio foi obtido a partir de 20 secções transversais de túbulo seminífero para cada animal. As secções escolhidas foram as mais circulares

possíveis, independentes do estágio em que se encontravam. A altura do epitélio seminífero foi mensurada na mesma secção transversal em que foi aferido o diâmetro dos túbulos seminíferos. Neste caso, considerou-se a distância desde a túnica própria até a borda luminal, tomando-se duas medidas diametralmente opostas em cada secção transversal, sendo considerada como medida representativa a média das duas. O diâmetro do lúmen foi obtido subtraindo-se o diâmetro tubular das duas alturas obtidas para o epitélio seminífero.

O comprimento total (metros) dos túbulos seminíferos foi estimado a partir do volume ocupado pelos túbulos seminíferos nos testículos e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal, empregando-se a fórmula onde  $CT = VTS / \pi R^2$  ( $VTS$  = volume total dos túbulos seminíferos;  $\pi R^2$  = área da secção transversal dos túbulos seminíferos;  $R$  = diâmetro tubular/2) (Attal e Courot, 1963). O comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo foi calculado dividindo-se o comprimento total pelo peso bruto dos testículos.

#### 2.4.2. Análises estereológicas dos componentes intertubulares

Para a obtenção das proporções volumétricas (%) dos componentes intertubulares foram contados 1.000 pontos projetados sobre imagens capturadas da região do intertúbulo, nos diferentes cortes histológicos do testículo de cada animal. Foram registrados os pontos coincidentes sobre núcleo e citoplasma de células de Leydig (NC e CL), vaso sanguíneo (VS), espaço linfático (EL), tecido conjuntivo (TC) e macrófagos (M). O percentual de cada elemento no intertúbulo foi obtido multiplicando por 100 o número de pontos contados sobre os elementos e dividindo o valor obtido por 1000.

#### 2.4.3. Estereologia das células de Leydig

O diâmetro nuclear médio das células de Leydig foi obtido a partir de imagens capturadas com objetiva 40x. Trinta núcleos de células de Leydig foram mensurados para cada animal escolhendo-se aqueles que apresentavam o contorno mais circular, cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. Foram calculados os volumes nuclear e citoplasmático e, em seguida, o volume de uma célula de Leydig. Para obtenção do volume nuclear (VN) utilizou-se a fórmula  $VN = 4/3 \pi R^3$ , onde  $R$  = raio nuclear. O volume citoplasmático (VC) foi calculado a partir da fórmula  $VC =$

% citoplasma x VN/% núcleo. O volume de uma célula de Leydig foi obtido somando-se o VN ao volume citoplasmático. Estes valores foram expressos em micrômetros cúbicos ( $\mu\text{m}^3$ ). O cálculo do volume que as células de Leydig ocupam por testículo foi feito a partir da proporção das células de Leydig no parênquima testicular x peso do parênquima de um testículo/100. O peso do parênquima testicular foi obtido subtraindo-se a massa ocupada pela albugínea do peso total dos testículos, obtendo-se assim o peso líquido da porção funcional do órgão.

O volume que as células de Leydig ocupam por grama de testículo foi obtido utilizando-se o peso bruto dos testículos. O número total de células de Leydig por testículo foi calculado a partir do volume que as células de Leydig ocupam por testículo ( $\mu\text{m}^3$ )/volume de uma célula de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ ). Para calcular o número total de células de Leydig por grama de testículo utilizou-se a fórmula: volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo ( $\mu\text{m}^3$ )/volume de uma célula de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ ).

A fim de se quantificar o investimento em células de Leydig, em relação à massa corporal, foi calculado o índice Leydigossomático (ILS), utilizando-se a fórmula:  $\text{ILS} = \text{volume total de célula de Leydig no parênquima testicular} / \text{PC} \times 100$ , onde PC= peso corporal.

## 2.5. Morfometria epididimária

Foi obtido o diâmetro tubular médio por região por animal a partir da mensuração, ao acaso, de 30 secções transversais do ducto epididimário que apresentaram contorno o mais circular possível. Nas mesmas secções foram feitas a mensuração da altura do epitélio, medindo da membrana basal até o lume tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio, em cada túbulo, representou a média de quatro medidas tomadas de forma diametralmente opostas. Estas medidas foram realizadas utilizando-se programa de análise de imagem Image Pro Plus em imagens aumentadas em 100x. Na região do corpo onde não se é possível encontrar túbulos circulares foram feitas duas medidas e a média representou a altura do epitélio, para a mensuração dos diâmetros tubular e luminal foi mensurado o menor diâmetro.

A proporção volumétrica (%) do compartimento tubular e intertubular foi estimadas a partir do uso de uma grátula de 266 pontos incidida em 10 campos histológicos aleatórios obtidos em aumento de 100x, totalizando a avaliação de 2660

pontos para cada região epididimária de cada animal. Foram contabilizados pontos sobre epitélio, lúmen sem a presença de espermatozoides e com espermatozoide, lâmina própria, tecido conjuntivo e vaso sanguíneo.

## 2.6. Determinação da concentração sérica de testosterona

No momento da eutanásia o soro foi congelado e posteriormente processado para quantificação da testosterona sérica. Esta análise foi feita pelo método da quimioluminescência utilizando kit Access Testosterone REF 33560, próprio para o equipamento Access 2 (Beckman), pertencente ao Laboratório de Reprodução do Departamento de Zootecnia da UFV. O resultado foi expresso em ng/mL.

## 2.7. Avaliações espermáticas

A cauda do epidídimo direito foi seccionada várias vezes em placa de Petri para obtenção do fluido rico em espermatozoides. Este fluido foi diluído em aproximadamente 500µl de meio diluidor TRIS aquecido a 32°C, sendo coletadas amostras para a avaliação da motilidade e morfologia espermáticas, além da avaliação da integridade estrutural das membranas.

### 2.7.1. Motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático

As motilidades total e progressiva e o vigor espermático foram avaliados utilizando-se 10µL do fluido da cauda colocado entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37°C, sendo avaliado em microscópio óptico Bioval nos aumentos de 100X e 400X. Estes parâmetros foram avaliados no tempo 0, que corresponde a primeira análise após a obtenção do fluido da cauda, e no tempo 5, que corresponde à avaliação 5 minutos após a primeira. A motilidade foi expressa em porcentagem (0-100) e o vigor espermático numa escala de 0 (imobilidade) a 5 (rápida mobilidade), segundo descrito por CBRA (1988).

### 2.7.2. Morfologia espermática

A avaliação da morfologia espermática foi feita em microscópio de contraste de fase. Para isso, 50µl do fluido da cauda do epidídimo foi fixado em 100µL de formaldeído 4% tamponado, sendo mantido refrigerado até a análise. As anormalidades espermáticas observadas foram classificadas quanto a defeitos de

cabeça, peça intermediária, peça principal e distal, gota citoplasmática proximal e gota citoplasmática distal. Foram contadas 200 células, sendo os resultados expressos em porcentagem.

#### 2.7.3. Avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática e acrossomal da cabeça dos espermatozoides

A integridade estrutural da membrana plasmática e acrossomal foi avaliada pela técnica da fluorescência utilizando-se dois fluorocromos, o diacetato de carboxifluoresceína (DACF) e o iodeto de propídio (IP), segundo o protocolo proposto por Harrison e Vickers (1990) e modificado por Zúccari (1998). Foi adicionado 10µL de fluido epididimário 40µL da solução trabalho. Esta solução foi incubada por oito minutos em banho-maria a 37°C e avaliada em microscópio de epifluorescência no aumento de 400X, ao abrigo da luz, utilizando filtro de 480 a 610nm. Foram contadas 200 células, considerando-se três categorias de espermatozoides: íntegros, lesados e semi lesados. Espermatozoides íntegros apresentaram membrana plasmática íntegra, corados pelo DACF em toda sua extensão. Espermatozoides lesados, corados pelo IP, apresentaram membrana plasmática e membrana acrossomal lesadas, enquanto que espermatozoides semi lesados apresentaram-se corados pelo DACF, devido a integridade da membrana plasmática na cauda, e pelo IP, devido a lesão da membrana plasmática.

#### 2.8. Análises estatísticas

Os resultados obtidos a partir das avaliações quantitativas foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), sendo suas médias comparadas pelo teste de Student Newman Keuls, ao nível de significância de 5%. Os resultados de análises como motilidade, total e progressiva, e o vigor espermáticos foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis. Esta análise foi feita utilizando o software STATISTICA for Windows 3.11. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

### **3. RESULTADOS**

#### 3.1. Variação de peso durante o período experimental

Os parâmetros biométricos médios do peso corporal, inicial e final, e do ganho de peso ao longo do tratamento estão dispostos na Tabela 1. Não houve alteração nos parâmetros de peso corporal.

Tabela 1. Média e desvio padrão do peso corporal (PC) inicial e final e da variação de peso (GP) de ratos Wistar machos tratados com diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) durante 112 dias (P > 0,05).

	G1	G2	G3	G4	G5
PC final (g)	436,11±42,90	471,98±42,41	425,43±56,08	447,18±68,56	390,71±43,19
PC inicial (g)	330,61±16,44	339,91±21,19	329,11±36,90	323,55±33,78	337,36±35,40
GP (g)	105,50±32,01	132,07±22,92	96,31±25,44	123,62±90,73	53,45±21,23

G1 = animais que receberam 1mL água destilada; G2 = animais que receberam 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al.

### 3.2. Avaliação histológica do parênquima testicular e epididimário

O parênquima testicular dos animais de todos os grupos apresentou arquitetura normal, como pode ser observado na Figura 1. Observou-se túbulos seminíferos íntegros com células germinativas preservadas e epitélio seminífero apresentando organização normal, sem áreas de necrose e mostrando diversos estádios do ciclo espermatogênico, sem indicativo de que o metal afetou a espermatogênese. A mesma arquitetura normal foi observada no compartimento intertubular para todos os animais analisados (Fig. 2).

Com relação ao epidídimo, o segmento inicial apresentou arquitetura normal em todos os grupos experimentais (Fig 3). As secções desta região se apresentaram como túbulos pequenos, de formato circular e com epitélio pseudo-estratificado espesso, além da presença de espermatozoides no lúmen. Foram observados vários tipos celulares como principais, basais, apicais e estreitas, sendo característico desta região. As células principais apresentaram vacuolizações citoplasmáticas características. No compartimento intertubular, foram observados poucos mastócitos.

A região da cabeça apresentou em todos os grupos experimentais arquitetura normal, os túbulos epididimários maiores que os do segmento inicial, epitélio pseudo-estratificado, poucas células claras e apicais, lúmen com espermatozoides e estereocílios evidentes (Fig. 4). A Figura 5 mostra a região do corpo. Os animais

tratados com alumínio apresentaram vacuolizações na região basal do epitélio nos túbulos que estavam localizados próximos a região periférica do epidídimo. Em todos os grupos experimentais observou-se poucos mastócitos no compartimento intertubular.

Na região da cauda, em todos os grupos experimentais, o epitélio apresentou-se mais estreito que o epitélio das demais regiões, com abundância de células claras, característica dessa região, e lúmen repleto de espermatozoides. No compartimento intertubular observou-se poucos mastócitos (Fig. 6). Não foram observadas lesões histopatológicas nos animais que receberam alumínio, independente da concentração.

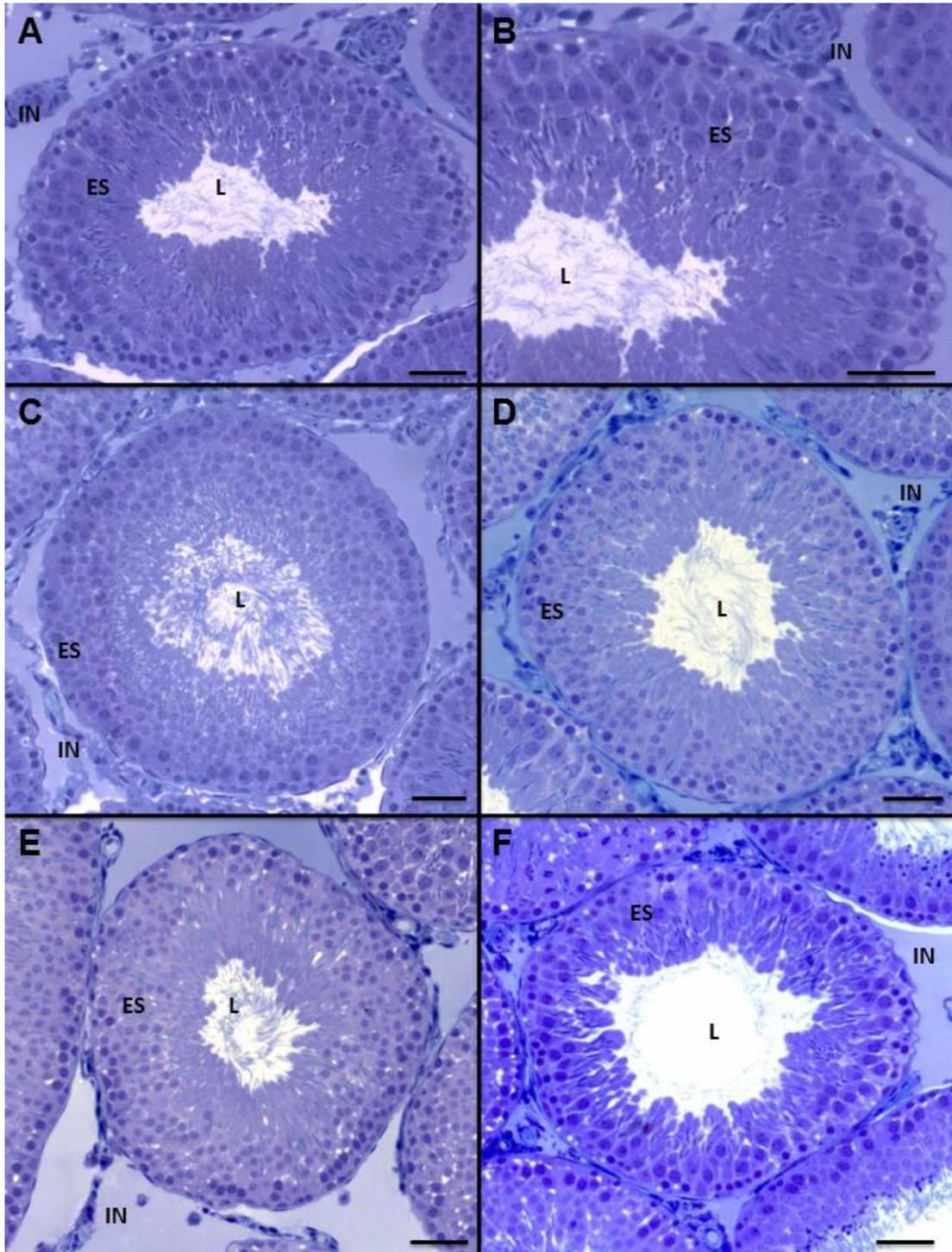


Figura 1. Fotomicrografia do compartimento tubular do testículo de ratos Wistar. A e B – grupo controle; C - 0,02mg/L Al na forma de  $AlCl_3$ ; D - 0,1mg/L Al; E - 10mg/Kg Al; F - 40mg/Kg Al. IN = Compartimento intertubular; ES = Epitélio seminífero; L = Lúmen. Coloração: Azul de Toluidina. Barras = 50 $\mu$ m.

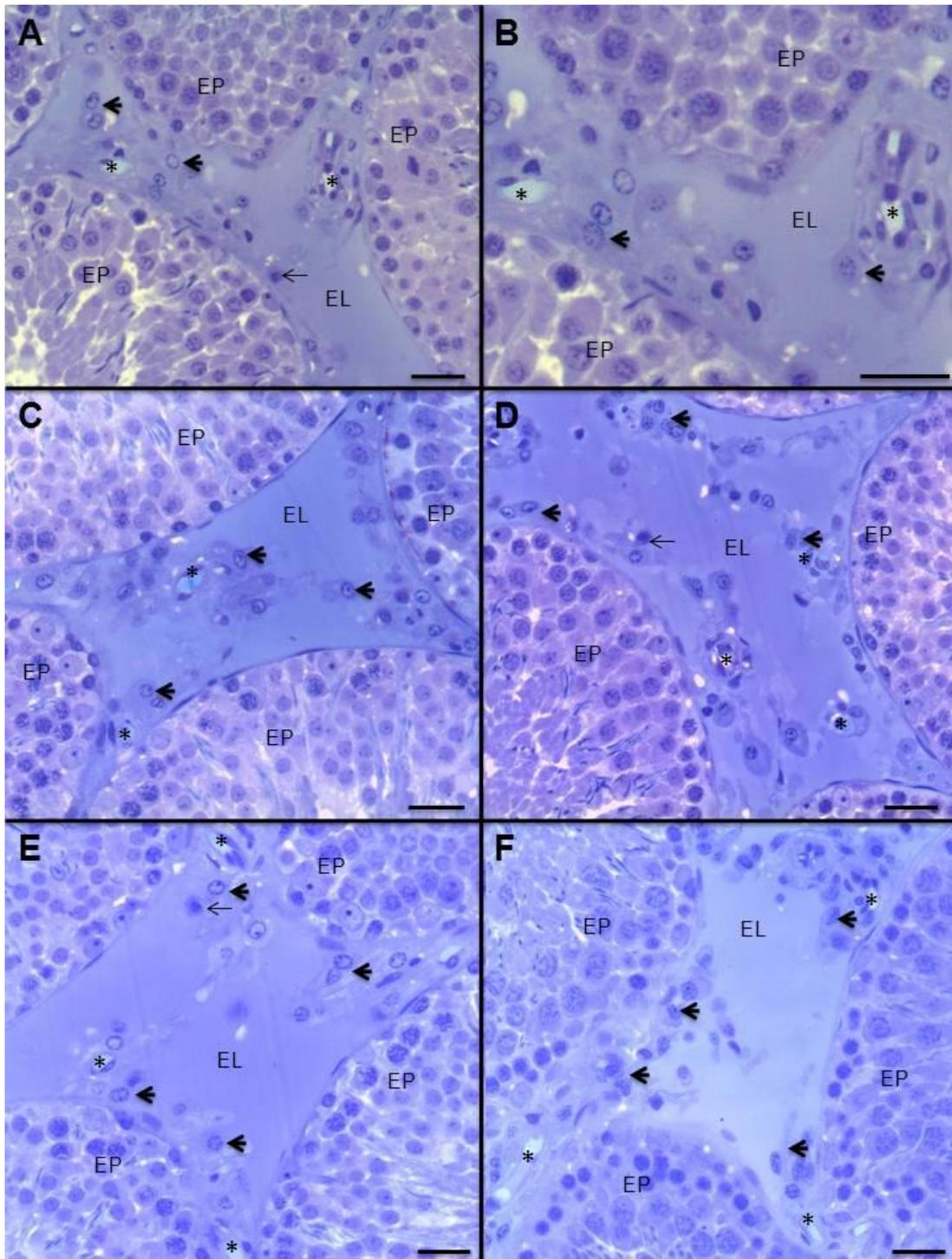


Figura 2. Fotomicrografia do compartimento intertubular testicular de ratos Wistar. A e B - Grupo controle; C - 0,02mg/L Al na forma de  $AlCl_3$ ; D - 0,1mg/L Al; E - 10mg/Kg Al; F - 40mg/Kg Al. EL = Espaço linfático; EP = Epitélio; L = Lúmen; Setas = Células de Leydig; Asterisco = Vaso sanguíneo. Coloração: Azul de Toluidina; Barras = 50µm.

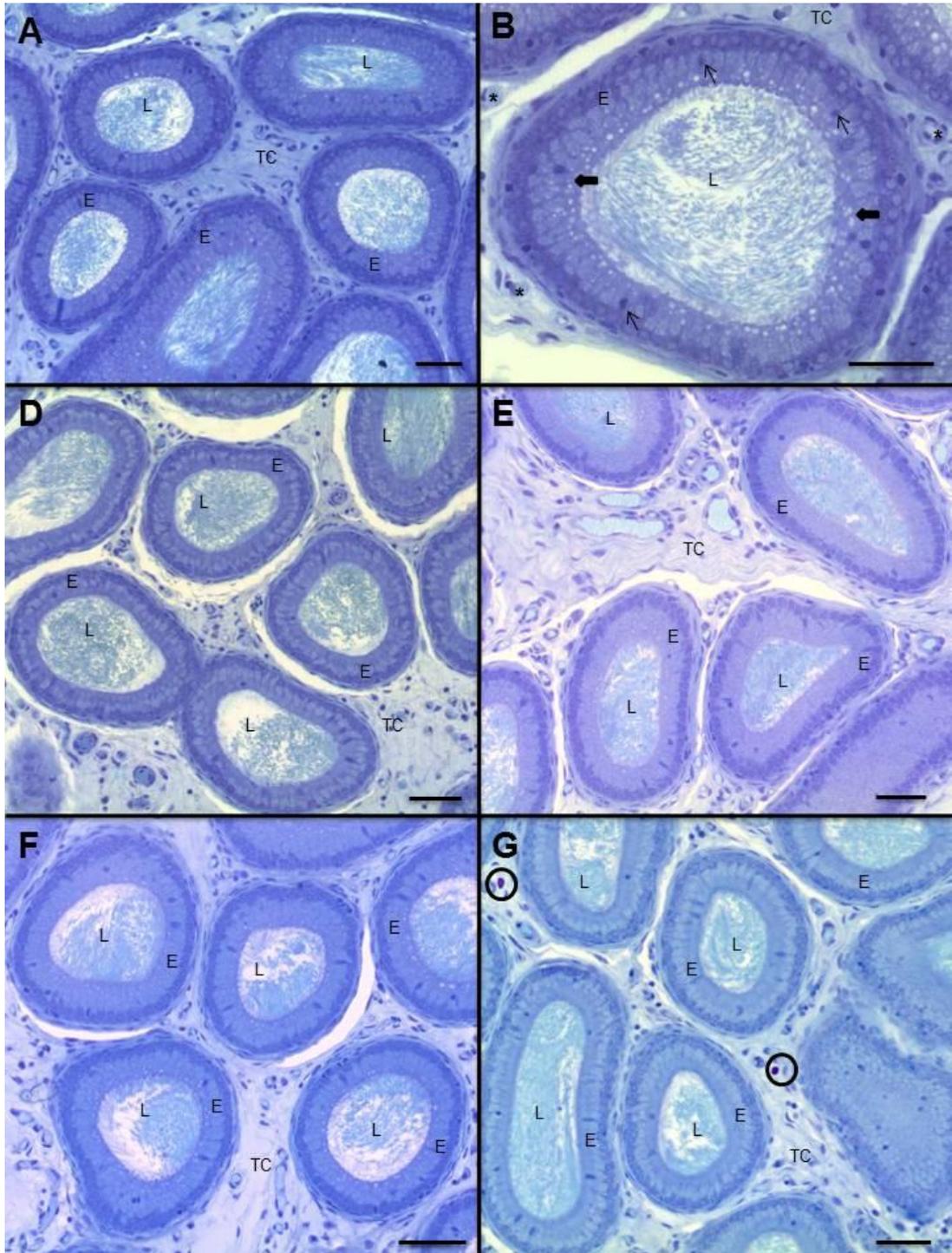


Figura 3. Fotomicrografia do segmento inicial de ratos Wistar tratados com diferentes concentrações de alumínio. A, B e C – grupo controle; D - 0,02mg/L Al; E - 0,1mg/L Al; F - 10mg/Kg Al; G - 40mg/Kg Al. E = Epitélio epididimário; L = Lúmen; TC = Tecido conjuntivo; Setas finas = células apicais; Setas largas = Vacuolização citoplasmática; Círculo = Mastócito, Asterisco = Vaso sanguíneo. Coloração: Azul de Toluidina; Barras = 50 $\mu$ m.

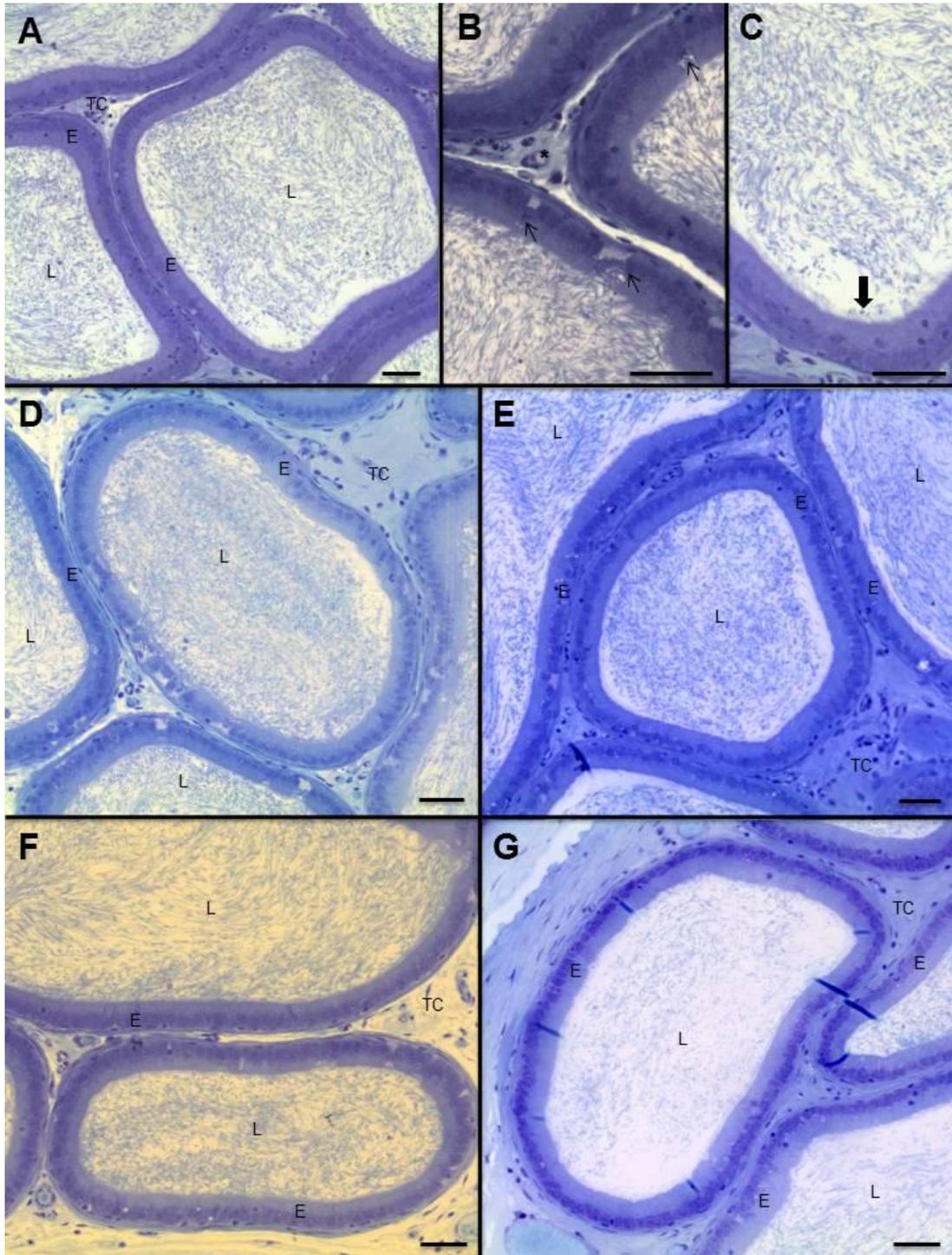


Figura 4. Fotomicrografia da região da cabeça do epidídimo de ratos Wistar tratados com diferentes concentrações de alumínio (Al). A, B e C – grupo controle; D - 0,02mg/L Al; E - 0,1mg/L Al; F - 10mg/Kg Al; G - 40mg/Kg Al. E = Epitélio epididimário; L = Lúmen; TC = Tecido conjuntivo; Setas finas = células claras; Setas largas = Estereocílios. Coloração: Azul de Toluidina; Barra = 50 $\mu$ m.

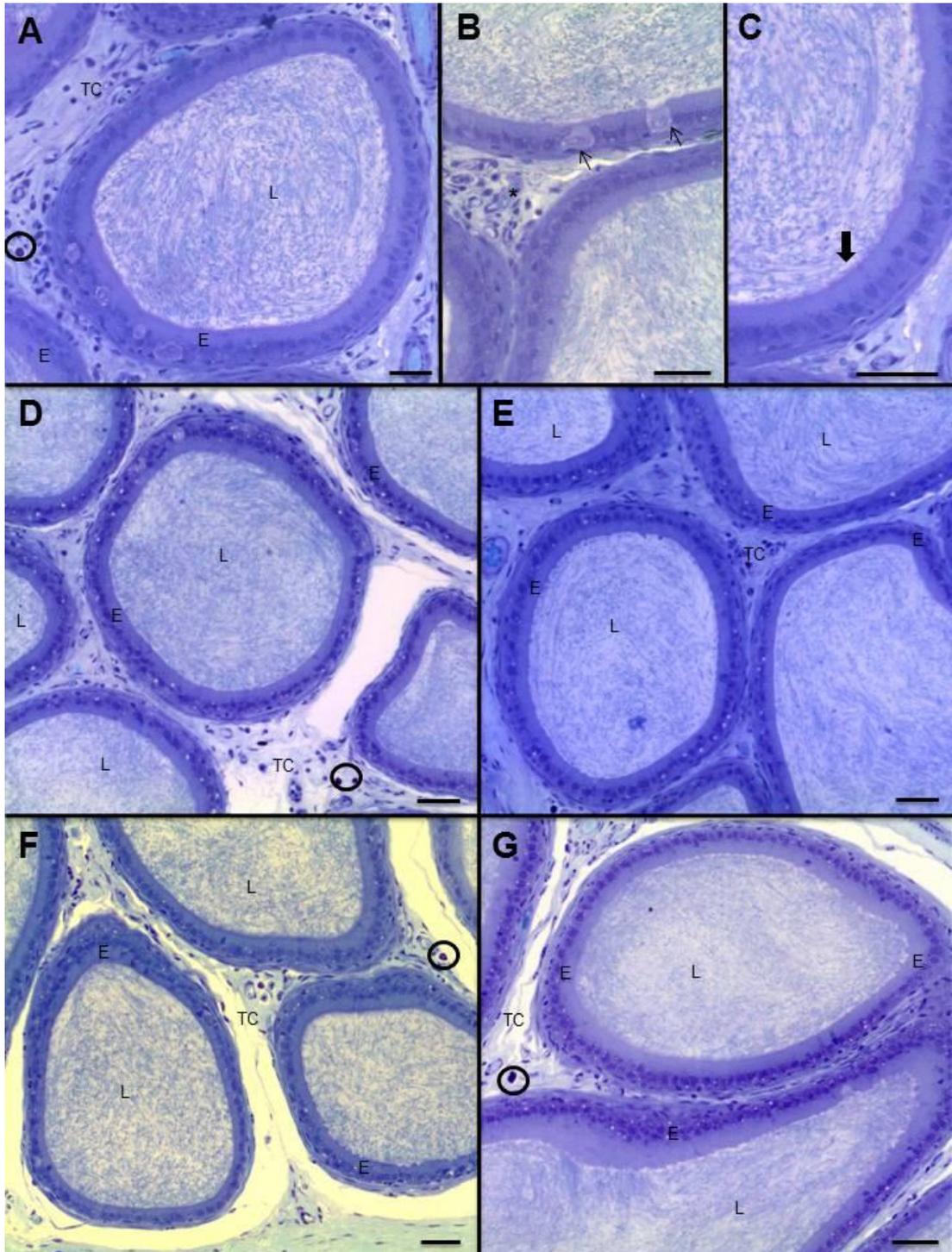


Figura 5. Fotomicrografia da região do corpo do epidídimo de ratos Wistar tratados com diferentes concentrações de alumínio (Al). A, B e C – grupo controle; D - 0,02mg/L Al; E - 0,1mg/L Al; F - 10mg/Kg Al; G - 40mg/Kg Al. E = Epitélio epididimário; L = Lúmen; TC = Tecido conjuntivo; Setas finas = células claras; Setas largas = Estereocílios. Círculo = mastócito. Coloração: Azul de Toluidina; Barra = 50 $\mu$ m.

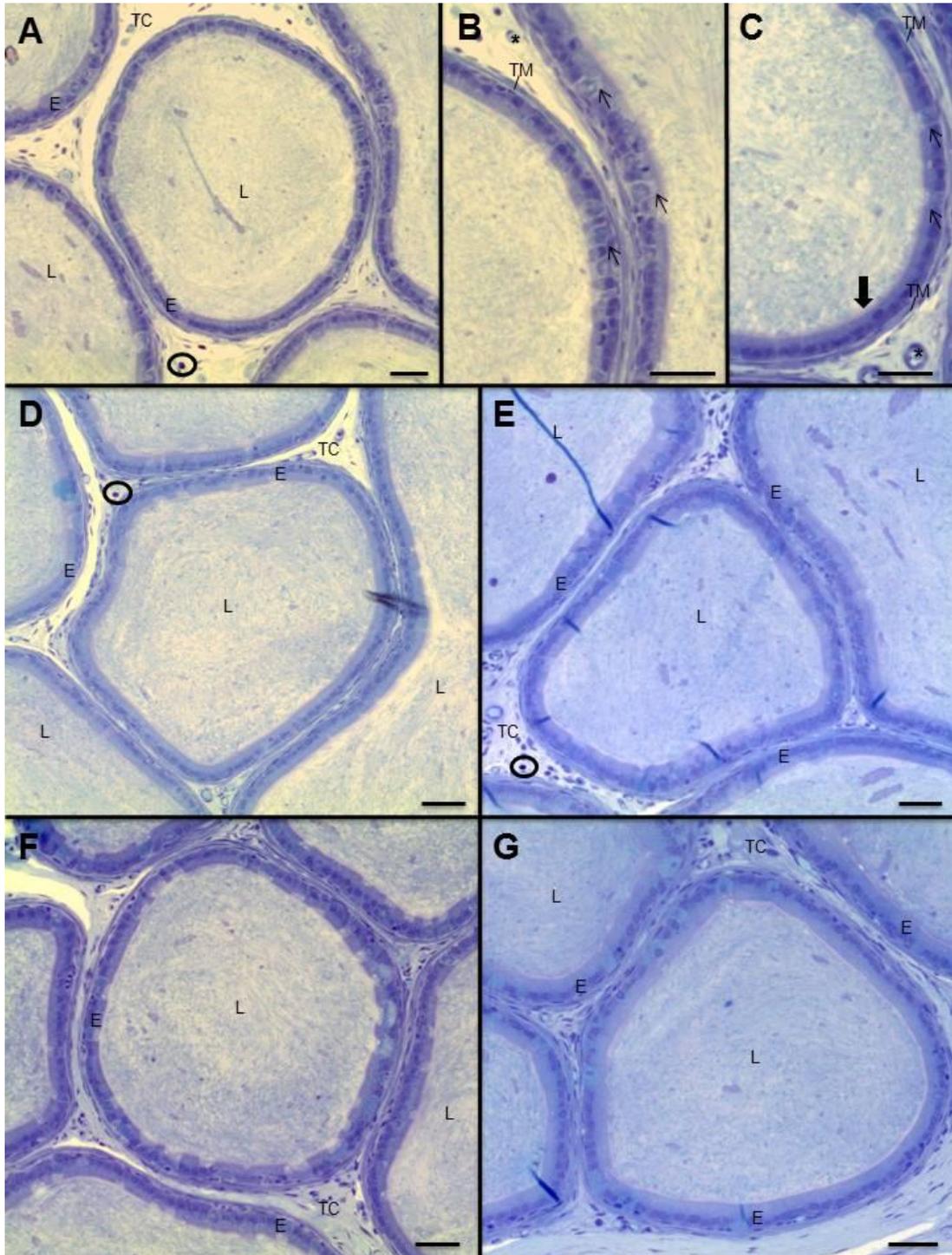


Figura 6. Fotomicrografia da região da cauda do epidídimo de ratos Wistar tratados com diferentes concentrações de alumínio (Al). A, B e C – grupo controle; D - 0,02mg/L Al; E - 0,1mg/L Al; F - 10mg/Kg Al; G - 40mg/Kg Al. E = Epitélio epididimário; L = Lúmen; TC = Tecido conjuntivo; TM = Tecido muscular; Setas finas = células claras; Setas largas = Estereocílios. Círculo = mastócito. Coloração: Azul de Toluidina; Barra = 50 $\mu$ m.

### 3.3. Morfometria testicular

#### 3.3.1. Parâmetros biométricos

Os resultados obtidos para os parâmetros biométricos estão mostrados na Tabela 2. Não foram observadas diferenças entre as médias dos grupos experimentais para peso testicular, peso do parênquima e da albugínea e índice gonadossomático ( $P > 0,05$ ).

Tabela 2. Parâmetros biométricos do testículo de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ) durante 112 dias ( $P > 0,05$ ).

	G1	G2	G3	G4	G5
PT (g)	2,01±0,15	1,97±0,21	1,84±0,14	1,82±0,12	1,76±0,10
PP (g)	1,84±0,15	1,79±0,27	1,70±0,23	1,68±0,12	1,66±0,11
PAT (g)	0,17±0,04	0,18±0,09	0,14±0,11	0,14±0,03	0,10±0,02
IGS (%)	0,93±0,15	0,84±0,09	0,88±0,13	0,83±0,11	0,92±0,10

Média ± desvio-padrão; PT = peso testicular; PP = peso do parênquima; PAT = peso da albugínea testicular; IGS = índice gonadossomático; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = animais que receberam 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al.

#### 3.3.2. Parâmetros histomorfométricos e estereológicos

Os resultados obtidos para os parâmetros histomorfométricos testiculares de diâmetro dos túbulos seminíferos, diâmetro luminal e altura do epitélio seminífero estão mostrados na Tabela 3. Não foram encontradas diferenças entre as médias dos grupos para esses parâmetros ( $P > 0,05$ ).

Com relação à proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular, o comprimento total de túbulos seminíferos por grama de testículo apresentou aumento no tratamento com 40mg/Kg de alumínio quando comparado ao tratamento com 0,01mg/L ( $P < 0,05$ ). Os demais parâmetros não apresentaram alteração ( $P > 0,05$ ; Tab. 4).

Os parâmetros morfométricos intertubulares estão mostrados na Tabela 5. Não houve alteração em nenhum dos parâmetros analisados ( $P > 0,05$ ).

Tabela 3. Média e desvio-padrão dos diâmetros, tubular (DT) e luminal (DL), e da altura do epitélio (AE) dos túbulos seminíferos de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) por 112 dias (P > 0,05).

	G1	G2	G3	G4	G5
DT (µm)	285,1±18,9	283,5±9,6	295,1±13,5	276,5±16,6	274,1±20,3
DL (µm)	135,4±19,4	130,5±8,7	134,5±11,1	117,9±15,5	125,4±17,2
AE (µm)	74,8±3,1	76,5±1,8	80,3±3,8	79,3±6,3	74,3±4,3

G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = animais que receberam 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al.

Tabela 4. Parâmetros morfométricos tubulares do parênquima testicular de ratos Wistar adultos tratados com diferentes concentrações de alumínio, na forma de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>), por 112 dias.

	G1	G2	G3	G4	G5
TS (%)	81,83±3,90	83,70±3,10	81,20±4,21	85,60±1,85	85,30±2,82
ES (%)	59,56±2,29	61,79±2,92	57,51±2,17	60,11±1,22	60,34±2,97
TP (%)	2,73±0,43	2,40±0,42	2,90±0,291	2,82±0,4	2,46±0,26
L (%)	19,54±2,74	19,51±1,4	20,79±3,05	22,67±1,82	22,50±4,16
TS (mL)	1,50±0,13	1,50±0,26	1,38±0,22	1,44±0,11	1,42±0,07
ES (mL)	1,10±0,11	1,11±0,20	0,98±0,14	1,01±0,08	1,01±0,10
TP (mL)	0,05±0,01	0,04±0,01	0,04±0,003	0,05±0,01	0,04±0,004
L (mL)	0,35±0,05	0,35±0,05	0,36±0,09	0,38±0,03	0,37±0,05
CT/T (m)	23,85±3,44	23,81±4,24	20,18±2,39	24,20±3,64	24,31±3,45
*CT/gT (m)	11,86±1,77 <sup>ab</sup>	12,08±1,41 <sup>ab</sup>	10,96±0,92 <sup>a</sup>	13,29±1,73 <sup>ab</sup>	13,81±1,87 <sup>b</sup>
ITS (%)	0,35±0,06	0,32±0,06	0,33±0,07	0,33±0,05	0,37±0,04

Média ± desvio-padrão; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = animais que receberam 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al; TS = Túbulo seminífero; ES = Epitélio seminífero; TP = Túnica própria; L = Lúmen; CT/T = Comprimento total de túbulos seminíferos por testículo; CT/gT = Comprimento total de túbulos seminíferos por grama de testículo; ITS = Índice tubulossomático, \* <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma coluna são diferentes entre si (P < 0,05), pelo teste de Student Newman Keuls.

Tabela 5. Volume (mL) e proporção volumétrica (%) dos componentes intertubulares de ratos Wistar adultos expostos cronicamente a diferentes concentrações de alumínio por 112 dias ( $P > 0,05$ ).

	G1	G2	G3	G4	G5
IN (mL)	0,34±0,08	0,29±0,04	0,32±0,07	0,24±0,04	0,24±0,06
IN (%)	18,17±3,90	16,30±3,2	18,80±4,2	14,40±1,9	14,70±2,8
VS (mL)	0,038±0,020	0,026±0,014	0,024±0,009	0,023±0,012	0,024±0,006
VS (%)	10,77±3,67	8,90±5,40	6,40±2,80	9,60±5,40	9,80±1,00
EL (mL)	0,230±0,006	0,200±0,046	0,210±0,071	0,170±0,039	0,160±0,037
EL (%)	68,29±4,40	69,20±0,20	68,00±2,80	70,90±2,30	66,60±4,30
CL (mL)	0,019±0,003	0,019±0,009	0,026±0,011	0,016±0,006	0,022±0,010
CL (%)	5,38±0,69	6,60±3,00	7,90±3,20	6,70±2,50	9,50±3,30
TC (mL)	0,043±0,011	0,035±0,008	0,046±0,018	0,026±0,011	0,028±0,006
TC (%)	12,70±3,96	12,20±2,90	13,90±5,60	10,50±4,10	11,50±2,00
M (mL)	0,010±0,002	0,010±0,003	0,014±0,006	0,005±0,002	0,006±0,002
M (%)	2,86±0,80	3,10±1,40	3,80±2,00	2,30±1,00	2,60±0,40

Média ± desvio-padrão; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = animais que receberam 0,02 mg/L de Al; G3 = 0,1 mg/L de Al; G4 = 10 mg/Kg de Al; G5 = 40 mg/Kg de Al; IN = Intertúbulo; VS = Vaso sanguíneo; EL = Espaço linfático; NL = Núcleo de Leydig; CL = Células de Leydig; TC = Tecido conjuntivo; M = Macrófago.

Os resultados da morfometria da célula de Leydig estão mostrados na Tabela 6, Houve redução no diâmetro e volume nuclear em todos os tratamentos quando comparados ao controle ( $P < 0,05$ ). O volume das células de Leydig por testículo apresentou redução nos tratamentos com 0,1mg/L, 10mg/Kg e 40mg/Kg de alumínio quando comparados ao controle ( $P < 0,05$ ). Nos demais parâmetros não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais.

Tabela 6. Morfometria das células de Leydig no testículo de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de alumínio, na forma de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>), por 112 dias.

	G1	G2	G3	G4	G5
*DNL	11,52±0,70 <sup>a</sup>	10,02±0,58 <sup>b</sup>	9,62±0,81 <sup>b</sup>	9,32±0,59 <sup>b</sup>	9,50±1,21 <sup>b</sup>
*VN	807,89±141,73 <sup>a</sup>	530,48±89,42 <sup>b</sup>	473,50±113,01 <sup>b</sup>	427,64±83,19 <sup>b</sup>	466,25±170,92 <sup>b</sup>
VC	1582,33±504,83	1171,08±271,60	1066,72±312,67	948,78±576,42	1303,99±358,06
*VL	2390,21±605,12 <sup>a</sup>	1701,56±239,03 <sup>a</sup>	1540,21±403,72 <sup>b</sup>	1376,41±654,17 <sup>b</sup>	1769,24±516,71 <sup>b</sup>
NCL/T	7,89±2,59	11,02±4,80	17,70±10,37	12,72±4,43	12,81±5,60
*NCL/gT	3,92±1,20 <sup>a</sup>	5,59±2,20 <sup>ab</sup>	9,61±5,08 <sup>b</sup>	6,98±2,41 <sup>ab</sup>	7,27±2,99 <sup>ab</sup>
RNP	55,98±22,14	48,2±16,1	45,4±8,1	54,5±21,1	35,3±5,2
ILS	0,008±0,002	0,008±0,003	0,012±0,005	0,007±0,002	0,012±0,006

Média ± desvio-padrão; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = animais que receberam 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al. DNL = Diâmetro nuclear de células de Leydig (µm); VN = Volume nuclear de células de Leydig (µm<sup>3</sup>); VC = Volume do citoplasma de Leydig (µm<sup>3</sup>); VL = volume de células de Leydig por testículo (µm<sup>3</sup>); NCL/T = Número de células de Leydig por testículo (10<sup>6</sup>); NCL/gT = Número de células de Leydig por grama de testículo (10<sup>6</sup>); RNP = Relação nucleoplasmática (%); ILS = Índice leydigossomático (%). \* <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma coluna são diferentes entre si (P < 0,05) pelo teste de Student Newman Keuls.

### 3.4. Morfometria epididimária

#### 3.4.1. Biometria

Os resultados do peso médio epididimário encontram-se na Tabela 7. Os animais tratados com alumínio, independente da concentração administrada, apresentaram redução no peso médio epididimário em relação aos animais do grupo controle (P < 0,05).

Tabela 7. Peso epididimário de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) por 112 dias.

Tratamento	Peso (g)
G1	0,93 ± 0,25 <sup>a</sup>
G2	0,78 ± 0,12 <sup>b</sup>
G3	0,68 ± 0,07 <sup>b</sup>
G4	0,72 ± 0,05 <sup>b</sup>
G5	0,72 ± 0,04 <sup>b</sup>

Média ± desvio-padrão; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = animais que receberam 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al. <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma coluna são diferentes entre si (P < 0,05) pelo teste de Student Newman Keuls.

#### 3.4.2. Histomorfometria epididimária

Os resultados da morfometria epididimária, considerando a mensuração dos diâmetros, tubular e luminal, e da altura do epitélio, estão mostrados na Tabela 8. Não foram observadas diferenças entre os grupos para as três mensurações considerando as regiões do segmento inicial, corpo e cauda (P > 0,05). Na região da cabeça, animais que receberam 40 mg/Kg de alumínio apresentaram aumento do valor médio para altura do epitélio, quando comparado aos demais grupos experimentais (P < 0,05).

Tabela 8. Diâmetro tubular (DT;  $\mu\text{m}$ ), diâmetro luminal (DL;  $\mu\text{m}$ ) e altura epitelial (AE;  $\mu\text{m}$ ) de quatro regiões epididimárias de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) por 112 dias.

		G1	G2	G3	G4	G5
SI	DT	200,4 $\pm$ 45,8	185,6 $\pm$ 15,6	171,3 $\pm$ 5,8	175,7 $\pm$ 12,0	168,3 $\pm$ 10,4
	DL	138,8 $\pm$ 46,2	124,8 $\pm$ 4,1	107,3 $\pm$ 8,6	112,7 $\pm$ 9,2	100 $\pm$ 4,9
	AE	33,9 $\pm$ 1,3	32,2 $\pm$ 2,2	34,3 $\pm$ 3	34,9 $\pm$ 2,4	34,8 $\pm$ 2
Cabeça	DT	335 $\pm$ 31,05	349,7 $\pm$ 32,6	330,2 $\pm$ 31,7	338,8 $\pm$ 26,5	321,5 $\pm$ 14,9
	DL	272,6 $\pm$ 26,8	289,3 $\pm$ 32,5	263,7 $\pm$ 25,2	281,8 $\pm$ 23,1	251,8 $\pm$ 14,6
	*AE	32,7 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	31 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	33,1 $\pm$ 2,5 <sup>a</sup>	31,2 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	36,4 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>
Corpo	DT	327,8 $\pm$ 36,9	331,1 $\pm$ 26,3	317,6 $\pm$ 26,3	307,3 $\pm$ 17,3	303,1 $\pm$ 35,7
	DL	269,1 $\pm$ 29,7	270,2 $\pm$ 18,2	253,8 $\pm$ 23,8	255,2 $\pm$ 20	243,8 $\pm$ 28,5
	AE	27,3 $\pm$ 3,4	28,6 $\pm$ 3,6	31,7 $\pm$ 4,3	26 $\pm$ 2,6	29,4 $\pm$ 3,13
Cauda	DT	330,5 $\pm$ 20	331,4 $\pm$ 28,03	324,9 $\pm$ 9,6	321,1 $\pm$ 19,1	322,2 $\pm$ 18,3
	DL	282,5 $\pm$ 18,4	282,1 $\pm$ 34,9	270,3 $\pm$ 15,9	267,5 $\pm$ 15,3	269,4 $\pm$ 23
	AE	23,5 $\pm$ 1,1	23,8 $\pm$ 2,3	25,7 $\pm$ 2,0	24,9 $\pm$ 2,2	26,2 $\pm$ 2,3

Média  $\pm$  desvio-padrão; SI = segmento inicial; DT = Diâmetro tubular ( $\mu\text{m}$ ); DL = Diâmetro luminal ( $\mu\text{m}$ ); AE = altura de epitélio ( $\mu\text{m}$ ); G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al. \* <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma linha são diferentes entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Student Newman Keuls.

Tabela 9. Proporção volumétrica (%) da região segmento inicial do epidídimo de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) por 112 dias.

Seg. inicial	G1	G2	G3	G4	G5
*EP	35,43 $\pm$ 4,21 <sup>a</sup>	36,39 $\pm$ 3,49 <sup>a</sup>	38,89 $\pm$ 1,94 <sup>ab</sup>	37,35 $\pm$ 3,05 <sup>a</sup>	43,34 $\pm$ 5,81 <sup>b</sup>
LP	6,67 $\pm$ 1,86	4,29 $\pm$ 1,77	4,96 $\pm$ 1,91	5,64 $\pm$ 1,45	4,58 $\pm$ 1,88
*LcSPZ	27,69 $\pm$ 9,64 <sup>a</sup>	24,66 $\pm$ 3,65 <sup>a</sup>	19,62 $\pm$ 4,48 <sup>b</sup>	19,44 $\pm$ 2,81 <sup>b</sup>	18,45 $\pm$ 2,83 <sup>b</sup>
LsSPZ	0,71 $\pm$ 0,48	1,81 $\pm$ 1,89	1,27 $\pm$ 0,76	1,50 $\pm$ 0,70	1,03 $\pm$ 0,64
TC	28,57 $\pm$ 6,55	31,54 $\pm$ 2,02	33,51 $\pm$ 4,05	34,81 $\pm$ 3,80	30,99 $\pm$ 5,61
VS	0,93 $\pm$ 0,30	1,31 $\pm$ 0,73	1,75 $\pm$ 0,61	1,26 $\pm$ 0,29	1,61 $\pm$ 0,62

Média  $\pm$  desvio-padrão; Seg. inicial = Segmento inicial; EP = Epitélio; LP = Lâmina própria; LcSPZ = Lúmen com espermatozoide; LsSPZ = Lúmen sem

espermatozoide; TC = Tecido conjuntivo; VS = Vaso sanguíneo. G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = animais que receberam 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al. \* <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma linha são diferentes entre si (P < 0,05) pelo teste de Student Newman Keuls.

Tabela 10. Proporção volumétrica (%) da região da cabeça do epidídimo de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) por 112 dias.

Cabeça	G1	G2	G3	G4	G5
*EP	28,49±2,14 <sup>a</sup>	28,85±2,65 <sup>a</sup>	32,36±2,94 <sup>b</sup>	28,01±2,07 <sup>a</sup>	33,71±1,84 <sup>b</sup>
*LP	4,56±1,61 <sup>ab</sup>	3,67±1,18 <sup>bc</sup>	2,54±0,95 <sup>c</sup>	4,03±0,57 <sup>abc</sup>	5,79±1,69 <sup>a</sup>
LcSPZ	49,88±50,6	48,22±8,41	42,02±4,83	49,26±3,14	43,31±1,77
LsSPZ	1,38±1,23	3,14±4,01	2,28±3,01	2,14±1,13	1,90±1,97
TC	15,04±3,40	15,40±3,59	20,00±2,99	15,71±2,78	14,18±1,99
VS	0,65±0,08	0,72±0,33	0,80±0,32	0,85±0,40	1,11±0,25

Média ± desvio-padrão; EP = Epitélio; LP = Lâmina própria; LcSPZ = Lúmen com espermatozoide; LsSPZ = Lúmen sem espermatozoide; TC = Tecido conjuntivo; VS = Vaso sanguíneo; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = animais que receberam 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al. \* <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma linha são diferentes entre si (P < 0,05) pelo teste de Student Newman Keuls.

Tabela 11. Proporção volumétrica (%) da região do corpo do epidídimo de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) por 112 dias.

Corpo	G1	G2	G3	G4	G5
*EP	22,93±1,02 <sup>a</sup>	25,91±2,55 <sup>ab</sup>	27,94±3,59 <sup>b</sup>	23,52±2,25 <sup>a</sup>	28,61±2,80 <sup>b</sup>
LP	4,06±1,22	2,74±1,16	2,79±1,05	3,33±0,76	3,41±1,09
LcSPZ	46,23±6,25	47,86±2,73	46,51±7,65	47,25±4,50	45,76±4,95
LsSPZ	0,08±0,20	0,21±0,24	0,17±0,25	0,19±0,25	2,73±5,61
TC	25,61±6,74	22,78±5,09	21,64±6,00	25,02±2,96	18,74±7,33
VS	1,09±0,51	0,50±0,16	0,95±0,53	0,69±0,16	0,75±0,39

Média ± desvio-padrão; EP = Epitélio; LP = Lâmina própria; LcSPZ = Lúmen com espermatozoide; LsSPZ = Lúmen sem espermatozoide; TC = Tecido conjuntivo; VS = Vaso sanguíneo; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = animais que receberam 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al. \* <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma linha são diferentes entre si (P < 0,05) pelo teste de Student Newman Keuls.

Tabela 12. Proporção volumétrica (%) da região da cauda do epidídimo de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) por 112 dias (P > 0,05).

Cauda	G1	G2	G3	G4	G5
EP	23,53±1,88	23,59±3,44	26,46±2,36	26,86±3,92	25,95±3,15
LP	2,91±0,78	3,31±0,59	2,73±0,67	3,89±0,79	3,44±0,65
LcSPZ	54,79±3,06	54,98±6,38	52,28±5,54	50,77±5,39	53,34±2,30
LsSPZ	0,37±0,49	0,05±0,12	0,14±0,2	0,14±0,15	0,66±0,57
TC	17,53±1,41	16,91±4,26	16,88±2,53	17,56±2,76	15,49±1,17
VS	0,67±0,2	0,91±0,60	0,65±0,41	0,55±0,23	0,71±0,28
ML	0,20±0,36	0,25±0,51	0,86±1,08	0,23±0,22	0,41±0,78

Média ± desvio-padrão; EP = Epitélio; LP = Lâmina própria; LcSPZ = Lúmen com espermatozoide; LsSPZ = Lúmen sem espermatozoide; TC = Tecido conjuntivo; VS = Vaso sanguíneo; ML = Músculo liso; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = animais que receberam 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al.

### 3.5. Concentração sérica de testosterona

Todos os animais que receberam o tratamento com cloreto de alumínio apresentaram diminuição nos valores médios de testosterona plasmática (P < 0,05; Tab. 13), quando comparados ao controle.

Tabela 13. Concentração sérica de testosterona em ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) por 112 dias.

Tratamento	Testosterona (ng/dL)
G1	1,86±0,85 <sup>a</sup>
G2	0,48±0,28 <sup>b</sup>
G3	0,48±0,12 <sup>b</sup>
G4	0,84±0,50 <sup>b</sup>
G5	0,81±0,60 <sup>b</sup>

Média ± desvio-padrão. G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = animais que receberam 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al. <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma coluna são diferentes entre si (P < 0,05) pelo teste de Student Newman Keuls.

### 3.6. Avaliações espermáticas

Os resultados obtidos para os parâmetros de motilidade e vigor espermáticos, no tempo 0 (primeira avaliação) e 5 minutos após a primeira avaliação, estão mostrados na Tabela 14. Animais que receberam a maior concentração de alumínio apresentaram a menor motilidade total no tempo 0 (P < 0,05) entre os grupos, enquanto que as médias para as demais variáveis neste tempo, motilidade progressiva e vigor, bem como os três parâmetros no tempo 5 não diferiram entre os grupos experimentais (P > 0,05). Ao avaliar a integridade estrutural das membranas espermáticas (Tab. 15), observou-se que o percentual de espermatozoides íntegros foi menor nos animais que receberam o tratamento com alumínio comparado aos animais do grupo controle (P < 0,05). Houve um aumento no percentual de espermatozoides lesados nos animais tratados, quando comparados aos animais controle (P < 0,05). Os animais do grupo controle e expostos a menor concentração de alumínio apresentaram maior quantidade de espermatozoides semi lesados que os animais dos demais grupos (P < 0,05).

Não houve diferença entre os grupos para o percentual médio de defeito de cabeça, de peça intermediária, de cauda e de espermatozoides com morfologia normal (Tab. 16; P > 0,05). Animais que receberam 0,02mg/L de alumínio apresentaram espermatozoides com peça intermediária quebrada (0,50 ± 0,54%), enquanto que animais que receberam 10mg/Kg apresentaram espermatozoides com

gota citoplasmática proximal ( $0,66 \pm 0,81$ ). Os outros grupos não apresentaram essas patologias.

Tabela 14. Motilidades e vigor de espermatozoides coletados da cauda do epidídimo de ratos Wistar expostos cronicamente a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ), analisados em dois momentos.

Tratamento	Tempo 0			Tempo 5		
	*MT (%)	MP (%)	Vigor (0-5)	MT (%)	MP (%)	Vigor (0-5)
G1	84,26±5,84 <sup>a</sup>	60,00±8,36	2,58±0,49	62,00±4,47	50,00±7,07	2,80±0,27
G2	73,33±10,80 <sup>a</sup>	54,16±15,62	2,67±0,51	53,00±9,08	42,00±7,58	2,90±0,22
G3	75,00±6,32 <sup>a</sup>	60,00±8,36	2,33±0,40	58,33±6,83	51,66±8,16	3,08±0,20
G4	77,50±6,89 <sup>a</sup>	60,83±6,64	2,41±0,80	50,83±12,81	43,33±16,63	2,91±0,49
G5	70,00±7,74 <sup>b</sup>	61,66±5,16	2,33±0,25	41,67±6,05	29,16±5,84	2,33±0,40

Média ± desvio-padrão; Tempo 0: imediatamente após coleta do fluido epididimário; Tempo 5: 5 minutos após a primeira avaliação; MT = Motilidade total; MP = Motilidade progressiva; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = animais que receberam 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al. \* <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Kruskal Wallis.

Tabela 15. Avaliação da integridade estrutural de membranas de espermatozoides presentes no fluido epididimário de ratos Wistar expostos cronicamente a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ), utilizando iodeto de propídio (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (DACF) como fluorocromos.

Tratamento	Fluorescência (%)		
	Íntegro ( $\text{DACF}^+/\text{IP}^+$ )	Lesado ( $\text{DACF}^-/\text{IP}^+$ )	Semi lesado ( $\text{DACF}^+/\text{IP}^+$ )
G1	49,83±7,98 <sup>a</sup>	42,33±6,53 <sup>a</sup>	7,84±5,11 <sup>a</sup>
G2	33,66±7,65 <sup>b</sup>	59,67±5,24 <sup>b</sup>	6,67±5,16 <sup>a</sup>
G3	20,66±13,44 <sup>b</sup>	78,84±13,94 <sup>b</sup>	0,50±1,22 <sup>b</sup>
G4	6,00±6,03 <sup>b</sup>	93,17±5,52 <sup>b</sup>	0,83±1,32 <sup>b</sup>
G5	5,66±4,59 <sup>b</sup>	93,34±5,04 <sup>b</sup>	1,00±1,54 <sup>b</sup>

Média ± desvio-padrão; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = animais que receberam 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 =

40 mg/Kg Al; <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma coluna são diferentes entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Student Newman Keuls.

Tabela 16. Morfologia de espermatozoides presentes no fluido epididimário de ratos Wistar expostos cronicamente a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ) ( $P > 0,05$ ).

	G1	G2	G3	G4	G5
Def. Cabeça	0,33±0,51	1,33±1,96	1,28±1,47	1,50±1,22	0,66±0,81
Def. PI	0,66±0,46	0,66±0,24	0,44±0,09	0,33±0,23	0
Def. Cauda	11,65±5,58	6,82±3,28	12,92±4,91	10,98±3,61	15,66±7,48
Normal	87,36±7,94	91,19±4,11	85,36±3,16	87,19±6,55	83,68±8,89

Média ± desvio-padrão; Def. Cabeça = Defeito de cabeça; Def. PI = Defeito de peça intermediária; Def. Cauda = Defeito de cauda; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = animais que receberam 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al.

#### 4. DISCUSSÃO

Neste estudo não foi observada alteração no peso médio final dos animais e no ganho de peso, independente do grupo experimental. Os animais que receberam tratamento com 40mg/Kg de alumínio apresentaram 15% de ganho de peso, enquanto que os animais dos grupos controle, 0,02mg/L, 0,1 mg/L e 10mg/Kg apresentaram, respectivamente, 31%, 38%, 29% e 38%. Guo et al. (2005b), administrando em camundongos 7 e 13 mg/Kg de cloreto de alumínio durante 14 dias por via subcutânea, não observaram diminuição no seu peso corporal, bem como quando foi administrado por via intraperitoneal, na mesma espécie, 13 e 35 mg/Kg durante 14 dias (Guo et al, 2005a). O resultado encontrado no presente trabalho se difere do observado por Llobet et al. (1995), ao administrar nitrato de alumínio em camundongos por quatro semanas na concentração de 50, 100 e 200 mg/Kg via intraperitoneal. Sabe-se que alguns fatores podem influenciar os resultados relacionados a toxicidade do alumínio, como espécie, peso dos animais, sexo, idade, via de administração e forma química (Rollin et al., 1996). No presente estudo, houve uma redução na quantidade de ração consumida pelos animais tratados com o

cloreto de alumínio, principalmente com as maiores concentrações. A solução do cloreto de alumínio, ofertada via gavagem, se caracteriza por ter pH próximo de 3 para evitar a precipitação do metal. Este fato pode ter influenciado a ingestão de alimentos, devido a uma possível ocorrência de lesões no epitélio esofágico, local de deposição da solução. Sugere-se maiores estudos para confirmar se, na metodologia em questão, este fato pode acontecer.

Os resultados mostraram que o alumínio, na forma de cloreto de alumínio, não alterou parâmetros morfométricos testiculares, como peso da albugínea, índices gonadossomático e leydigossomático, além de mensurações do compartimento tubular, como diâmetro tubular e luminal, altura do epitélio seminífero e percentual de seus componentes, independente da concentração utilizada. A ausência de alteração no IGS indica que não houve um comprometimento da massa testicular pelo efeito dos diferentes tratamentos. Segundo França e Russell (1998), a proporção volumétrica de túbulos seminíferos em mamíferos é um dos fatores responsáveis pela eficiência na produção espermática. Como neste estudo a proporção de túbulos seminíferos não foi alterada pelo alumínio, pode-se sugerir que a produção espermática não foi comprometida.

Não foram encontradas alterações no comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, porém o tratamento com 0,1mg/L de alumínio sofreu redução no comprimento de túbulos seminíferos por grama de testículo comparado ao tratamento com 40mg/Kg de alumínio. Sabe-se que este parâmetro está intimamente relacionado com volume testicular, diâmetro tubular e proporção volumétrica dos túbulos seminíferos (França e Russell, 1998). Da mesma forma, não foram observadas alterações no índice tubulossomático (ITS), que quantifica o investimento do animal em túbulos seminíferos em relação a massa corporal (Attal e Courot, 1963). Como não houve alteração nos animais que receberam alumínio, sugere-se que o investimento em massa tubular não sofreu alterações, mesmo se levando em consideração os animais que receberam 0,1mg/L de alumínio, já que estes animais não apresentaram alteração em nenhum dos outros parâmetros.

Na literatura existem poucos trabalhos relacionando o acúmulo de alumínio e análises morfométricas testiculares. França e Russell (1998) citam que geralmente existe relação positiva entre o diâmetro tubular e a atividade espermatogênica. Contudo, sabe-se que a altura do epitélio seminífero é uma mensuração mais efetiva

para avaliação da produção espermática, por ser este um elemento dinâmico no túbulo seminífero (Wing e Christensen, 1982). Como neste trabalho não houve alteração na altura de epitélio seminífero, pode-se sugerir que o alumínio não foi capaz de atuar negativamente sobre a espermatogênese.

No compartimento intertubular, observou-se redução do diâmetro e do volume nuclear das células de Leydig nos animais tratados. A redução nestes parâmetros pode estar relacionada com a diminuição de testosterona produzida (Guyton, 2006), fato observado nos animais que receberam cloreto de alumínio, independente de sua concentração. No entanto, o índice leydigossomático, que quantifica o investimento em células de Leydig em relação ao peso corporal (Russell, 1996), não apresentou alteração.

A alteração observada nas células de Leydig pode ter ocorrido pelo fato destas encontrarem-se próximas aos vasos sanguíneos e serem as primeiras a entrarem em contato com o alumínio. Portanto, baixas concentrações de cloreto de alumínio foram capazes de exercer efeitos negativos sobre estas células, afetando a produção deste hormônio, inclusive quando administrada concentração de 0,02mg/L, sendo esta inferior a concentração máxima tolerável de alumínio em água doce, estabelecida por Brasil (2005), que é de 0,1mg/L.

A interrupção da biossíntese de testosterona por fatores ambientais, como a exposição ao alumínio, pode causar disfunção sexual e infertilidade (Papadopoulos, 2007). Moselhy et al. (2012), trabalhando com administração de 34mg/Kg de cloreto de alumínio durante 60 dias por via oral em ratos Wistar, observaram redução na concentração sérica de testosterona. O mesmo foi observado por Rawi e Nassr (2012), utilizando 50mg/kg de sulfato de alumínio em ratos Wistar por 45 dias.

Castro et al. (2002) relatam que não há correlação entre altas concentrações de testosterona e aumento da atividade espermatogênica. As concentrações desse hormônio precisam atingir certo nível limiar para que a espermatogênese proceda normalmente, sendo que baixas concentrações de testosterona são extremamente nocivas para reprodução. No presente estudo, apesar dos resultados mostrarem redução na concentração de testosterona plasmática, que é a testosterona secretada por via endócrina, esta aparentemente não afetou a atividade espermatogênica, ao não observar alterações nas médias de altura de epitélio seminífero e percentuais de componentes do compartimento tubular. Acredita-se que a testosterona testicular,

testosterona secretada por via parácrina, não sofreu redução e por isso o processo de espermatogênese aparentemente não foi alterado. Sugere-se que seja feita a dosagem da testosterona testicular com fim de se verificar se esta realmente não sofreu redução. Além disso, análises de microscopia eletrônica e contagem de população celular devem ser realizadas para verificar se realmente não houve alteração na espermatogênese.

No presente estudo, o alumínio não provocou alterações histopatológicas no testículo. Llobet et al. (1995) e Guo et al. (2005b) encontraram necrose em espermátides e espermatozoides presentes no interior dos túbulos seminíferos de camundongos. Um fator que pode justificar a ausência de alterações histológicas neste trabalho, quando comparado aos achados desses autores, pode ser a via de administração utilizada. Llobet et al. (1995) utilizaram via intraperitoneal, enquanto que Guo et al. (2005b) a via subcutânea, que apresentam absorção imediata de soluções aquosas (Hardman e Limbird, 2012).

Sabe-se que a via oral apresenta absorção limitada em função de suas características de permeabilidade baixa das membranas e hidrossolubilidade reduzida. Além disso, substâncias presentes no aparelho gastrointestinal podem ser metabolizadas por enzimas do fígado, da flora ou da mucosa intestinal antes de alcançarem a circulação sistêmica. Porém, mesmo utilizando a via oral, Yousef e Salama (2009) relataram que 34mg/Kg  $AlCl_3$  por 70 dias causaram uma acumulação de células germinativas na luz dos túbulos, devido a uma paralisação do ciclo do epitélio seminífero. Moselhy et al. (2012) observaram que o tratamento com cloreto de alumínio em ratos durante 30 dias levou a alterações degenerativas nas células espermatogênicas, desorganização das células no túbulo seminífero aos 45 dias, necroses, deixando o lúmen com ausência de espermatozoides. Rawi e Nassr (2012) também observaram alterações histológicas no testículo de ratos quando expostos ao sulfato de alumínio durante 45 dias, como encolhimento dos túbulos seminíferos pela perda de células espermatogênicas.

Quanto ao compartimento intertubular, os achados descritos na literatura, testando a exposição ao cloreto e nitrato de alumínio, mostram alterações como vacuolização e hiperplasia das células de Leydig, além de formação de grupos densos dessas células circundando a maior parte do túbulo seminífero (Yousef e Salama, 2009). Esses resultados se contrapõem ao observado no presente estudo,

considerando que todos os trabalhos utilizaram via de administração oral, mesma espécie animal e forma química, excetuando-se Rawi e Nassr (2012), que utilizaram sulfato de alumínio. O alumínio na forma de sulfato de alumínio apresenta em 1g do sal menor concentração de alumínio que em 1g de cloreto de alumínio. A variável observada entre os trabalhos foi o tempo de exposição ao metal, sendo o tempo máximo utilizado nos trabalhos de até 70 dias, enquanto que no presente estudo o tempo de administração do alumínio foi de 112 dias. A administração crônica, usada neste trabalho, pode ter causado uma adaptação do organismo ao alumínio. Calabrese (2008) descreve o processo de hormese, relacionado com a homeopatia, que é uma resposta de compensação do organismo quando ocorrem perturbações na homeostase. O autor cita que a hormese é uma manifestação quantitativa de um processo reparador que é adaptativo na natureza. A estimulação reflete a capacidade do organismo para alocar recursos biológicos, que são dependentes da perturbação sofrida, de uma maneira altamente eficiente para reparação de danos induzidos pelo agente tóxico após certo período de tempo. O tempo de exposição ao alumínio (112 dias) foi quase o dobro de tempo utilizado nos outros trabalhos, o que pode justificar a ausência de alterações histológicas, principalmente testiculares. Dixon et al. (1979) trataram ratos albinos Sprague Dawley com 44,8, 447,6 e 4476 mg/L de cloreto de alumínio por via oral durante 90 dias, e não observaram alterações histopatológicas, neste estudo os autores sugerem que a ausência de alterações está relacionada com os níveis normais de gonadotrofinas.

O resultado obtido para peso epididimário foi similar a outros trabalhos que utilizaram altas concentrações de cloreto (Yousef e Salama, 2009) e nitrato de alumínio (Llobet et al., 1995). Guo et al. (2005), apesar de terem observado redução do peso testicular nas duas concentrações testadas, obtiveram redução do peso epididimário apenas em animais que receberam 13 mg/Kg. O epidídimo é dependente da testosterona que, ao entrar neste órgão, é convertida em diidrotestosterona para manutenção de sua estrutura, peso e função. A redução da concentração sérica de testosterona pode influenciar na redução do peso epididimário (Robaire et al., 2009). Portanto, a redução do peso pode ter ocorrido devido à diminuição da concentração sérica de testosterona observada em todos os animais expostos ao alumínio.

No presente estudo foi observada alteração no percentual de lúmen com espermatozoides somente na região do segmento inicial de animais expostos às maiores concentrações do cloreto de alumínio (0,1mg/L, 10mg/Kg e 40mg/Kg). Nos animais que receberam a maior concentração isso pode ter ocorrido devido ao aumento no percentual de epitélio, mas, em todos os grupos citados, não houve aumento do percentual de lúmen sem espermatozoides. O segmento inicial é a região epididimária mais influenciada pelo testículo, pois recebe os espermatozoides recém-liberados do epitélio seminífero junto com os fluidos testiculares, que possuem substâncias que estimulam suas funções (Hermo e Robaire, 2002). Portanto, essa região é muito importante no estudo da interação entre esses dois órgãos nos casos de intoxicação.

Também não foi observado alteração nos valores médios para diâmetro luminal e tubular e altura do epitélio epididimário, considerando as regiões do segmento inicial, corpo e cauda. A região da cabeça foi a única que apresentou aumento da altura do epitélio, quando os animais foram expostos a maior concentração de cloreto de alumínio fornecida neste experimento. Esse aumento foi refletido no maior percentual de epitélio. No entanto, apesar de não terem apresentado aumento na espessura do epitélio, animais tratados com 0,1mg/L, considerando cabeça e corpo, e 40mg/Kg, considerando corpo e segmento inicial, apresentaram aumento no percentual do epitélio. A região da cauda não foi afetada pela exposição ao cloreto de alumínio, considerando-se os parâmetros morfométricos analisados. Não há relatos na literatura sobre alterações morfométricas epididimárias quando animais são expostos ao cloreto de alumínio, nas concentrações testadas. Sabe-se que a altura epitelial pode refletir um aumento na atividade secretória e absorptiva das células, devido maior atividade de suas organelas (Hermo e Robaire, 2002).

As vacuolizações na porção basal da região do corpo em todos os grupos que receberam cloreto de alumínio pode ser indicativo de ação do alumínio sobre o epitélio epididimário. No entanto, não foram observadas as mesmas alterações nas demais regiões desse órgão. Moselhy et al. (2012) mostraram o efeito nocivo do alumínio ao epidídimo, em que 34mg/Kg levou a uma descamação e vacuolização do epitélio epididimário e redução da quantidade de espermatozoides intraluminais após exposição por 45 dias. Após 60 dias, o lúmen epididimário apareceu vazio ou com

baixa densidade espermática (Moselhy et al., 2012). Guo et al. (2005b) não relataram alterações histológicas no epidídimo em seu trabalho.

Com relação aos espermatozoides, a alteração mais importante obtida neste estudo foi a grande quantidade de espermatozoides com membranas espermáticas lesadas nos animais que receberam o sal, mostrando que houve um prejuízo na manutenção dessa integridade. Alterações na membrana espermática podem ser relacionadas com prejuízos na fertilidade e podem ocorrer devido a redução no tempo de trânsito epididimário. Essas alterações, no entanto, não influenciaram significativamente os parâmetros de motilidade e vigor, independente dos tempos analisados, excetuando-se os espermatozoides de animais expostos a 40mg/Kg no tempo 0 com relação a redução no percentual de células com motilidade total. Krasovisk et al. (1979) relatam que ao administrar 50mg/Kg de cloreto de alumínio a ratos houve alterações na motilidade espermática. Llobet et al. (1995) não verificaram alteração na motilidade nas concentrações de 50, 100 e 200mg/Kg de nitrato de alumínio.

A motilidade reduzida pode ocorrer devido a aberrações morfológicas ou a outros mecanismos (Wyrobeck, 1975), mas, no presente estudo, provavelmente foi por falta de integridade estrutural das membranas. Isso porque o percentual de espermatozoides morfolologicamente normal foi semelhante para todos os animais do experimento. A presença de gota citoplasmática proximal nos animais expostos a 10mg/Kg de cloreto de alumínio pode ser devido ao aumento no tempo de trânsito epididimário, demonstrando a importância da realização desta análise. Os andrógenos também atuam sobre o trânsito epididimário, controlando a viscosidade do fluido luminal e a contratilidade do ducto, a fim de garantir que a taxa de trânsito dos gametas seja ideal (Sujarit e Pholpramool, 1985). Conseqüentemente, a falta desses hormônios pode aumentar a permanência dos espermatozoides no epidídimo. A análise do trânsito epididimário torna-se cada vez mais importante para se compreender as alterações encontradas nos espermatozoides, já que a concentração sérica de testosterona foi alterada pelo cloreto de alumínio.

Neste trabalho as concentrações de 0,02mg/L, cinco vezes menor que a concentração máxima tolerável, e de 0,1mg/L estabelecida pelo Brasil (2005) não se apresentaram seguras, considerando que capazes de alterar a integridade estrutural nas membranas espermáticas. Para compreender melhor a capacidade do alumínio

em lesar a membrana espermática, sugere-se que análise do trânsito epididimário e da proteômica do fluido epididimário sejam realizados.

## 5. CONCLUSÕES

A concentração de 0,1mg/L de alumínio que é a concentração máxima de alumínio tolerável na água doce, juntamente com a concentração cinco vezes menor (0,2mg/L) e as altas concentrações (10 e 40 mg/Kg) levaram a alterações nas células de Leydig, já que estas apresentaram diâmetro e volume nuclear reduzidos, conseqüentemente a concentração sérica de testosterona também apresentou redução. A redução na concentração de testosterona pode ter influenciado na redução do peso epididimário. Os efeitos tóxicos das baixas e altas concentrações do alumínio no espermatozoide foram verificados pela alteração na membrana espermática que apresentou redução na sua integridade, à falta de integridade da membrana espermática pode ter ocorrido devido a alterações no tempo de trânsito epididimário, sugere-se então que a análise do tempo de trânsito seja realizada. Diferentes alterações na morfometria epididimária foram observadas nas concentrações de 0,1mg/L, 10mg/Kg e 40mg/Kg, porém é necessário que seja realizada análise de microscopia eletrônica para melhor compreensão destes resultados.

## 6. REFERÊNCIAS

ALFREY, A. C. 1985. Gastrointestinal absorption of aluminum. *Clinical Nephrology*, v.24, p.84–87.

AMANN, R. P. Sperm production rates. 1970. In: JOHNSON, A. D., GOMES, W. R., VANDEMARK, N. L. (eds). *The testis*. New York: Academic Press, v.1, Cap.7, p. 433-482.

ATTAL, J., COUROT, M. 1963. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*, v. 3, p. 219-241.

BRASIL. 2005. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução n. 357.

CALABRESE, E. J. 2008. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.. 27, n. 7, p. 1451–1474.

CASTRO, A. C. S., BERNDTSON, W. E., CARDOSO, F. M. 2002. Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, p. 493-498.

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

CHENG, C.Y., MRUK, D.D. 2011. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological Reviews*, v. 64, n 1, p. 16-64.

COSTA, K. L. C., MATTA, S. L. P., GOMES, M. L. M., PAULA, T. A. R., FREITAS, K. M., CARVALHO, F. A. R., SILVEIRA, J. A., DOLDER, H., MENDIS-HANDAGAMA, C. 2011. Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Animal Reproduction Science*, v. 127, p. 202-212.

DENG, Z., COUDRAY, C., GOUZOUX, L., MAZUR, A., RAYSSIGUIER, Y., PÉPIN, D. 2000. Effects of acute and chronic congestion of AlCl<sub>3</sub> with citrate or polyphenolic acids on tissue retention and distribution of aluminum in rats. *Biological Trace Element Research*, v.76, p. 245-256.

DIXON, R. L., SHERINS, R. J., LEE, I. P. 1979. Assessment of environmental factors affecting male fertility. *Environmental Health Perspectives*, v. 30, p. 53-68.

FRANÇA, L. R., RUSSELL, L. D. 1998. Testis morphometric seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production on domestic cats (*Felis catus*). *Biology of Reproduction*, v. 68, p. 1554-1561.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. 2006. Funções reprodutivas e hormonais nos homens. In: *Tratado de fisiologia médica*. 11ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1025-1039.

GUO, C. H.; LIN, C. Y.; YEH, M. S.; HSU, G. S. W. Aluminum induced suppression of testosterone through nitric oxide production in male mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 19, p. 33–40, 2005.

GUO, C. H., LIN, C. Y., YEH, M. S., HSU, G. S. W. 2005a. Aluminum induced suppression of testosterone through nitric oxide production in male mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 19, p. 33–40.

GUO, C. H., LU, Y. F., HSU, G. S. W. 2005b. The influence of aluminum exposure on male reproduction and offspring in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 20, p. 135–141.

GUO, C. H., HSU, G. S. W., CHUANG, C. J., CHEN, P. C. 2009. Aluminum accumulation induced testicular oxidative stress and altered selenium metabolism in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 27, p. 176–181.

HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E. 2012. *Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. McGraw Hill, 12ª ed.

HARRISON, R. A. P., VICKERS, S. E. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 88, p. 343- 352.

HERMO, L., ROBAIRE, B. 2002. Epididymal cell types and their functions. In: ROBAIRE, B., HINTON, B. T. *The Epididymis – from molecules to clinical practice*. (Eds.), Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York, p. 81-102.

KAMBOJ, V. P., KAR, A. B. 1964. Antitesticular effect of metallic and rare earth salts. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 7, p. 21-28.

KRASOVSKIY, G. N., VASUKOVICH, L. Y., CHARIEV, G. 1979. Experimental study of biological effects of lead and aluminum following oral administration. *Environmental Health Perspectives*, v. 30, p. 47-51.

LEAL, M. C., FRANÇA, L. R. 2006. The seminiferous epithelium cycle length in the black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) is similar to humans. *Biology of Reproduction*, v. 74, p. 616-624.

LLOBET, J. M., COLOMINA, M. T., SIRVENT, J. J., DOMINGO, J. L., CORBELLA, J. 1995. Reproductive Toxicology of Aluminum in Male Mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, v. 25, p. 45-51.

MELO, F. C. S. A., MATTA, S. L. P., PAULA, T. A. R., GOMES, M. L. M., OLIVEIRA, L. C. 2010. The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult Wistar rats. *Biological Research*, v. 43, p. 445-450.

MOSELHY, W. A., HELMY, N. A., ABDEL-HALIM, B. R., NABIL, T. M., ABDEL-HAMID, M. I. 2012. Role of ginger against the reproductive toxicity of aluminium chloride in albino male rats. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, p. 335–343.

PAPADOPOULOS, V. 2007. Environmental factors that disrupt Leydig cell steroidogenesis. In: PAYNE, A. H., HARDY, M. P. (Eds). *Contemporary Endocrinology. The Leydig cell in the health and disease*. New Jersey: Humana Press., p. 393-413.

PAULA, T. A. R., COSTA, D. S., MATTA, S. L. P. 2002. Avaliação histológica quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas. *Bioscience Journal*, v. 18, p. 121- 136.

RANA, S. V. S. 2007. *Environmental Pollutions: Health and Toxicology*. Alpha Science. International. 269p.

RAWI, S. M., NASSR, F. M. S. A. 2012. Zinc sulfate and vitamin E alleviate reproductive toxicity caused by aluminium sulfate in male albino rats. *Toxicology and Industrial Health*, p. 1-14.

ROBAIRE, B., SEENUNDUN, S., HAMZEH, M., LAMOUR, S. A. 2009. Androgenic regulation of novel genes in the epididymis. *Asian Journal of Andrology*, v. 9, n. 4, p. 545–553.

ROLLIN, H. B., THEODOROU, P., CANTRELL, A. C. 1996. Biological indicators of exposure to total and respirable aluminium dust fractions in a primary aluminium smelter. *Occupational and Environmental Medicine*, v. 53, p. 417-421.

RUSSELL, L. D. 1996. Mammalian Leydig cell structure. In: PAYNE, A. H., HARDY, M. P., RUSSELL, L. D. (Eds). *The Leydig cell*. Vienna: Cache River Press, p. 218- 222.

SARADHA, B., MARTHUS, P. P. 2006. Effect of environmental contaminants on male reproduction. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 21, p. 34-41.

TAE, H. J., JANG, B. G., AHN, D. C., CHOI, E. Y., KANG, H. S., KIM, N. S., LEE, J. H., PARK, S. Y., YANG, H. H., KIM, I. S. 2005. Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus karpowi*) during the breeding and non-breeding season. *Veterinary Research Communication*, v. 29, p. 629-643.

VEERAMACHANENI, D. N. 2008. Impact of environmental pollutants on the male: effects on germ cell differentiation. *Animal Reproduction Science*, v. 105, p. 144-157.

WING, T. Y., CHRISTENSEN, A. K. 1982. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *The American Journal of Anatomy*, v. 165, p. 13-25.

WYROBECK, A. J., BRUCE, W. R. 1975. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 72, p. 255-265.

YOUSEF, M., EL-MORSY, A. M. A., HASSAN, M. S. 2005. Aluminium-induced deterioration in reproductive performance and seminal plasma biochemistry of male rabbits: Protective role of ascorbic acid. *Toxicology*, v. 215, p. 97–107.

YOUSEF, M. I., SALAMA, A. F. 2009. Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, p. 1168–1175.

ZENICK, H., CLEGG, E. D., PERREAULT, S. D., KLINEFELTER, G. R., GRAY, L. E. 1994. Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach. In: *Principles and methods of toxicology*. 3. ed. New York: Raven, p. 937-988.

ZÚCCARI, C. E. S. N. 1998. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina. 121f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

## **CAPÍTULO 2 – PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE RATOS WISTAR EXPOSTOS CRONICAMENTE AO ALUMÍNIO**

### **1. INTRODUÇÃO**

A contaminação por alumínio pode ocorrer pelo consumo de aditivos alimentares para nutrição parenteral, soluções intravenosas, água potável, emulsões lipídicas e medicamentos, como vacinas, antiácidos, analgésicos e fluidos de diálise. Antigamente, antiácidos contendo alumínio eram utilizados no tratamento de distúrbios gastrointestinais, ocorrendo acúmulo no organismo quando ingeridos em grande quantidade (Lobet et al., 1995).

Relatos de contaminação testicular pelo alumínio estão documentados na literatura. Llobet et al. (1995) relatam que ratos machos apresentaram redução na taxa de fertilidade quando tratados com 100 e 200mg/Kg de nitrato de alumínio por via intraperitoneal durante quatro semanas. Yousef e Salama, (2009) observaram que ratos tratados por via oral com 34mg/Kg de cloreto de alumínio durante 70 dias apresentaram diminuição no peso dos testículos e epidídimo, diminuição na concentração espermática e na motilidade dos espermatozoides.

Os parâmetros espermáticos podem ser analisados por meio da morfologia, motilidade e integridade da membrana espermática. A morfologia dos espermatozoides em grande parte reflete a funcionalidade dos túbulos seminíferos e, em menor grau, do epidídimo (Menon et al., 2011). Alterações nas membranas, espermática e acrossomal, levam ao decréscimo no tempo de vida do espermatozoide e na capacidade deste em fertilizar o ovócito (Chatiza et al., 2011). Aliado a esses parâmetros está a avaliação da motilidade espermática, seja esta subjetiva ou utilizando análises computadorizadas, que podem refletir danos de membrana e patologias espermáticas (McNiven et al., 1992; Jasko et al., 1998; Aziz et al., 2005).

Entretanto, não se tem relato do efeito crônico de baixas concentrações deste metal na fertilidade de mamíferos. A Resolução número 357 ditada por Brasil (2005) estabelece a concentração máxima tolerável de 0,1mg/L de alumínio a ser encontrada na água doce. Portanto, modelos animais tratados cronicamente com baixas doses de alumínio precisam ser estudados para que sejam definidos os possíveis danos aos órgãos reprodutores e espermatozoides. Dessa forma, o objetivo

deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de alumínio sobre parâmetros reprodutivos, quando administrados cronicamente.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 30 ratos machos da linhagem Wistar com 70 dias de idade ( $332,37 \pm 22,03\text{g}$ ) provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Educação Física com controle de iluminação ambiente, contemplando 12hs de luminosidade diária e acondicionados em gaiolas conjuntas contendo 6 animais/gaiola. Foram fornecidas diariamente 25g de ração comercial para animais de laboratório por rato e água de beber *ad libitum*.

Após completarem 80 dias de idade, os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais ( $n = 6$  animais/grupo). O grupo controle (G1) foi formado por animais que receberam 1mL de água destilada por gavagem. Já os animais dos grupos 2 (G2) e 3 (G3) receberam 0,02mg/L e 0,1mg/L de alumínio (Al) na forma de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ). Animais dos grupos 4 (G4) e 5 (G5) receberam, respectivamente, 10mg/Kg Al (1/40  $\text{DL}_{50}$ ) e 40mg/Kg Al (1/10  $\text{DL}_{50}$ ). Todas as concentrações foram adaptadas para o volume de 1mL, administrado por gavagem. A concentração estabelecida de 0,02 mg/L corresponde a 1/5 do valor máximo tolerável de contaminação pelo alumínio em águas doces, determinado por Brasil (2005), que é de 0,1 mg/L. Já as altas concentrações foram baseadas na  $\text{DL}_{50}$  do alumínio (Krasoviskii et al., 1979).

Os animais foram pesados semanalmente para adequação das doses. O fornecimento diário das soluções foi realizado por 112 dias, período que contempla dois ciclos do epitélio seminífero. Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV) sob número de protocolo 019/2011.

### 2.2. Procedimentos experimentais para avaliação da fertilidade *in vivo*

No 113° dia de experimento, findado o tratamento com cloreto de alumínio, cada macho foi colocado em caixas individuais menores, com duas fêmeas híginas

em idade reprodutiva. Permitiu-se a cópula por cinco dias, quando os machos foram separados das fêmeas. Os machos foram mantidos por mais três dias, período em que foram transportados para o Laboratório de Reprodução Animal, pertencente ao setor de reprodução do Departamento de Clínica e Cirurgias Veterinárias da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG). Esse período foi estipulado para reposição da reserva espermática na cauda do epidídimo, favorecendo a coleta de espermatozoides para as avaliações espermáticas.

As fêmeas foram mantidas nas mesmas gaiolas em que estavam com os machos até completar 21 dias após o primeiro dia com o macho, tempo que contempla o período de gestação nesta espécie. Neste período, as fêmeas receberam água e ração comercial para ratos *ad libitum*. Foi avaliado a taxa de fertilidade/macho e por grupo experimental, considerando prenhez positiva e número de filhotes por parto. Os resultados da taxa de fertilidade foram expressos por percentual e o número de filhotes por grupo expresso em média  $\pm$  desvio padrão.

### 2.3. Coleta dos órgãos e de espermatozoides do fluido da cauda do epidídimo

No laboratório de Reprodução Animal (EV/UFMG), os ratos machos de cada grupo foram pesados em balança de precisão 0,01g (AS500, Marte) e eutanasiados oito dias após o término da administração do alumínio. Primeiramente eles foram sedados e anestesiados utilizando-se cloridrato de xilazina (10mg/kg/IP) e cloridrato de quetamina (150mg/kg/IP), respectivamente. Durante a etapa de anestesia, realizou-se a coleta do sangue por meio de punção cardíaca. Este foi centrifugado a 4.119 xg por 15 minutos para obtenção do soro, que foi armazenado em microtubos previamente identificados e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, aprofundou-se a anestesia até a morte do animal.

Em seguida, fez-se a abertura da cavidade abdominal, a partir de uma incisão na linha alba, para a dissecação e a obtenção dos testículos e epidídimos. Os testículos e epidídimos esquerdos foram utilizados para processamento histológico, enquanto que o testículo direito foi congelado para realização das análises enzimáticas e o epidídimo do mesmo lado foi usado para obtenção dos espermatozoides da cauda do epidídimo.

## 2.4. Avaliações espermáticas

A cauda do epidídimo direito foi seccionada várias vezes em placa de Petri, utilizando lâmina de barbear, para obtenção do fluido rico em espermatozoides. Este fluido foi diluído em aproximadamente 500µl de meio diluidor TRIS aquecido a 34°C, sendo coletadas amostras para avaliação da motilidade e morfologia espermáticas, além da avaliação da integridade funcional das membranas.

### 2.4.1. Motilidade e cinética espermáticas

A motilidade e cinética espermáticas foram avaliadas pelo sistema automático de análise seminal (CASA; Ivos-Ultimate, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, EUA) no Laboratório de Reprodução Animal da EV/UFGM. Uma gota do fluido (10µL) coletado da cauda do epidídimo foi utilizado para a análise. O equipamento foi ajustado para avaliar espermatozoides de roedores, considerando os seguintes parâmetros: motilidade total (MT), progressiva motilidade (MP), velocidade de percurso (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), retidão (STR) e linearidade (LIN). Os parâmetros foram analisados nos tempo de 0 minutos e 3 minutos. A Figura 1 representa a forma como é feita a leitura dos espermatozoides pelo CASA.

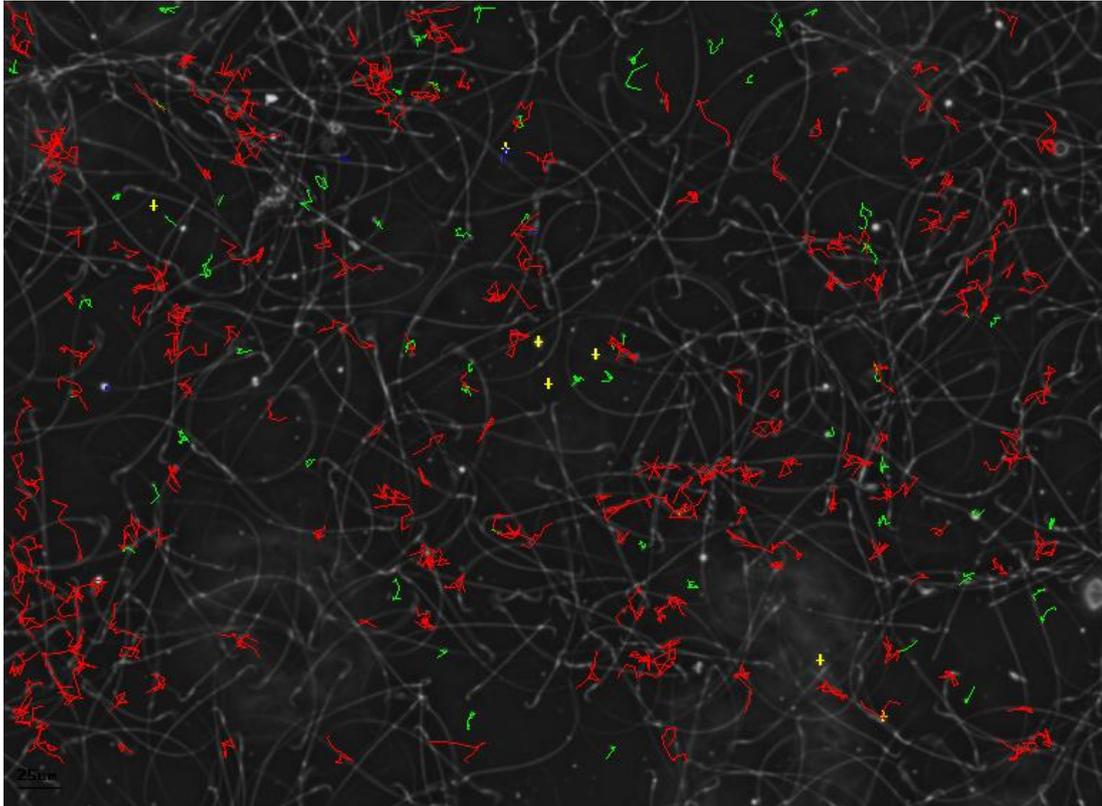


Figura 1 - Leitura de espermatozoides de rato pelo CASA. Vermelho = motilidade progressiva rápida; Verde = Motilidade progressiva lenta; Azul = Sem motilidade progressiva; Amarelo = Imóvel.

#### 2.4.2. Morfologia espermática

A avaliação da morfologia espermática foi feita em microscópio de contraste de fase. Para isso, 50µl do fluido da cauda foi fixado em 100µL de formaldeído a 4% tamponado, sendo mantido refrigerado até a análise. As anormalidades espermáticas observadas foram classificadas quanto a defeitos de cabeça, peça intermediária, peça principal e distal, gota citoplasmática proximal e gota citoplasmática distal. Foram contadas 200 células, sendo os resultados expressos em porcentagem.

#### 2.4.3. Avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática e acrossomal da cabeça dos espermatozoides

A integridade estrutural da membrana plasmática e do acrossomal, realizada no Laboratório de Reprodução Animal (EV/UFMG), foi avaliada pela técnica da fluorescência, adotando-se dois fluorocromos, o diacetato de carboxifluoresceína

(CFDA) e o iodeto de propídio (IP), segundo o protocolo proposto por Harrison e Vickers (1990) e modificado por Zúccari (1998). Foi adicionado 10 $\mu$ L de fluido epididimário à 40 $\mu$ L da solução trabalho. Esta solução foi incubada por oito minutos em banho-maria a 37°C e avaliada em microscópio de epifluorescência no aumento de 400X, ao abrigo da luz, utilizando filtro de 480 a 610nm. Foram contadas 200 células, considerando-se três categorias de espermatozoides: íntegros, lesados e semi-lesados. Espermatozoides íntegros apresentaram membrana plasmática íntegra, corados pelo CFDA em toda sua extensão. Espermatozoides lesados, corados pelo IP, apresentaram membrana plasmática e membrana acrossomal lesadas, enquanto que espermatozoides semi lesados apresentaram-se corados pelo CFDA, devido a integridade da membrana espermática da cauda, e pelo IP, devido a lesão da membrana plasmática e acrossomal.

#### 2.5.Processamento histológico do testículo e epidídimo

O testículo e epidídimo esquerdo foram fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) durante 24 horas. Posteriormente, os órgãos foram seccionados, utilizando lâminas de barbear, para a obtenção de pequenos fragmentos do testículo e do epidídimo, sendo este último segmentado considerando suas quatro regiões de estudo: segmento inicial, cabeça, corpo e cauda. Em seguida, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 95% e absoluto) com trocas a cada 30 minutos. Após a desidratação foram realizadas a pré-inclusão e inclusão em hidroxietil metacrilato (Historesin<sup>®</sup>, Leica). Cortes histológicos de 3 $\mu$ m de espessura foram obtidos utilizando-se navalhas de vidro em micrótomo rotativo (Reichert Jung 2045). Esses cortes foram colocados em lâminas histológicas, num total de 12 secções por lâmina. Para o testículo, as secções semi-seriadas foram coletadas respeitando o intervalo de 13 cortes, enquanto que no epidídimo foram desprezados oito cortes. Os cortes foram corados com azul de toluidina-borato de sódio 1% e montados com Entellan (Merck).

Os cortes histológicos foram analisados qualitativamente em microscópio de luz Olympus BX-50, em aumentos de 100 e 400x, para a verificação da integridade da arquitetura tecidual testicular e epididimária, presença de alterações histopatológicas e identificação das regiões epididimária, considerando os

parâmetros como altura do epitélio, diâmetros luminal e tubular, bem como a distribuição das células em cada região.

## 2.6. Morfometria testicular

### 2.6.1. Análise dos componentes tubulares

O peso do parênquima testicular foi obtido subtraindo-se a massa ocupada pela albugínea do peso total dos testículos, obtendo-se assim o peso líquido da porção funcional do órgão. O índice gonadossomático (IGS), definido pela razão entre peso corporal e testicular, foi calculado usando a fórmula:  $PG/PC \times 100$  (PG = peso total das gônadas e PC = peso corporal; Amann, 1970).

As densidades volumétricas (V.v.) de túbulo seminífero e intertúbulo foram obtidas utilizando-se uma grade contendo 266 pontos projetados sobre imagens digitalizadas do parênquima testicular, totalizando 2660 pontos por animal. Foram registrados os pontos coincidentes sobre túbulo seminífero (túnica própria, epitélio seminífero e lúmen) e intertúbulo e, em seguida, calculado o percentual dos pontos sobre cada componente. O volume (mL) de cada componente testicular foi estimado a partir da fórmula:  $\% \text{ túbulo (ou seus constituintes)} / 100 \times \text{volume total do parênquima testicular}$  (Melo et al., 2010). Como a densidade do testículo de mamíferos é em torno de 1 (Paula et al., 2002; Tae et al., 2005; Leal e França, 2006; Costa et al., 2011), a massa do testículo foi considerada igual ao seu volume.

Baseado nos volumes de túbulos seminíferos e nos pesos corporais foi calculado o índice tubulossomático (ITS) a partir da fórmula:  $VT/PC \times 100$  (VT = Volume de túbulo seminífero e PC = Peso corporal).

O diâmetro tubular médio foi obtido a partir de 20 secções transversais de túbulo seminífero para cada animal. As secções escolhidas foram as mais circulares possíveis, independentes do estágio em que se encontravam. A altura do epitélio seminífero foi mensurada na mesma secção transversal em que foi aferido o diâmetro dos túbulos seminíferos. Neste caso, considerou-se a distância desde a túnica própria até a borda luminal, tomando-se duas medidas diametralmente opostas em cada secção transversal, sendo considerada como medida representativa a média das duas. O diâmetro do lúmen foi obtido subtraindo-se o diâmetro tubular das duas alturas obtidas para o epitélio seminífero.

O comprimento total (metros) dos túbulos seminíferos foi estimado a partir do volume ocupado pelos túbulos seminíferos nos testículos e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal, empregando-se a fórmula onde  $CT = VTS / \pi R^2$  ( $VTS$  = volume total dos túbulos seminíferos;  $\pi R^2$  = área da secção transversal dos túbulos seminíferos;  $R$  = diâmetro tubular/2) (Attal e Courot, 1963). O comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo foi calculado dividindo-se o comprimento total pelo peso bruto dos testículos.

#### 2.6.2. Análises estereológicas dos componentes intertubulares

Para a obtenção das proporções volumétricas (%) dos componentes intertubulares foram contados 1.000 pontos projetados sobre imagens capturadas da região do intertúbulo, nos diferentes cortes histológicos do testículo de cada animal. Foram registrados os pontos coincidentes sobre núcleo e citoplasma de células de Leydig (NC e CL), vaso sanguíneo (VS), espaço linfático (EL), tecido conjuntivo (TC) e macrófagos (M). O percentual de cada elemento no intertúbulo foi obtido multiplicando por 100 o número de pontos contados sobre os elementos e dividindo o valor obtido por 1000.

#### 2.6.3. Estereologia das células de Leydig

O diâmetro nuclear médio das células de Leydig foi obtido a partir de imagens capturadas com objetiva 40x. Trinta núcleos de células de Leydig foram mensurados para cada animal escolhendo-se aqueles que apresentavam o contorno mais circular, cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. Foram calculados os volumes nuclear e citoplasmático e, em seguida, o volume de uma célula de Leydig. Para obtenção do volume nuclear (VN) utilizou-se a fórmula  $VN = 4/3 \pi R^3$ , onde  $R$  = raio nuclear. O volume citoplasmático (VC) foi calculado a partir da fórmula  $VC = \% \text{ citoplasma} \times VN / \% \text{ núcleo}$ . O volume de uma célula de Leydig foi obtido somando-se o VN ao volume citoplasmático. Estes valores foram expressos em micrômetros cúbicos ( $\mu\text{m}^3$ ). O cálculo do volume que as células de Leydig ocupam por testículo foi feito a partir da proporção das células de Leydig no parênquima testicular x peso do parênquima de um testículo/100. O peso do parênquima testicular foi obtido subtraindo-se a massa ocupada pela albugínea do peso total dos testículos, obtendo-se assim o peso líquido da porção funcional do órgão.

O volume que as células de Leydig ocupam por grama de testículo foi obtido utilizando-se o peso bruto dos testículos. O número total de células de Leydig por testículo foi calculado a partir do volume que as células de Leydig ocupam por testículo ( $\mu\text{m}^3$ )/volume de uma célula de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ ). Para calcular o número total de células de Leydig por grama de testículo utilizou-se a fórmula: volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo ( $\mu\text{m}^3$ )/volume de uma célula de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ ).

A fim de se quantificar o investimento em células de Leydig, em relação à massa corporal, foi calculado o índice Leydigossomático (ILS), utilizando-se a fórmula:  $\text{ILS} = \text{volume total de célula de Leydig no parênquima testicular} / \text{PC} \times 100$ , onde PC= peso corporal.

## 2.7. Morfometria epididimária

Foi obtido o diâmetro tubular médio por região por animal a partir da mensuração, ao acaso, de 30 secções transversais do ducto epididimário que apresentaram contorno o mais circular possível. Nas mesmas secções foram feitas a mensuração da altura do epitélio epididimário, medindo da membrana basal até o lume tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio, em cada túbulo, representou a média de quatro medidas tomadas de forma diametralmente opostas. Estas medidas foram realizadas utilizando-se programa de análise de imagem Image Pro Plus em imagens aumentadas em 100x.

A proporção volumétrica (%) do compartimento tubular e intertubular foi estimadas a partir do uso de uma grátula de 266 pontos incidida em 10 campos histológicos aleatórios obtidos em aumento de 1000x, totalizando a avaliação de 2660 pontos para cada região epididimária de cada animal. Foram contabilizados pontos sobre epitélio, lúmen sem a presença de espermatozoides e com espermatozoide, lâmina basal, tecido conjuntivo e vaso sanguíneo.

## 2.8. Determinação da concentração sérica de testosterona

O soro congelado no momento da eutanásia foi posteriormente processado para quantificação da testosterona sérica. Esta análise foi feita pelo método da quimioluminescência utilizando kit Access Testosterone REF 33560, próprio para o

equipamento Access 2, pertencente ao Laboratório de Reprodução do Departamento de Zootecnia da UFV. O resultado foi expresso em ng/mL.

## 2.9. Análises estatísticas

As avaliações histológicas qualitativas foram feitas descritivamente. Os resultados obtidos a partir das avaliações quantitativas foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), sendo suas médias comparadas pelo teste de Student Newman Keuls, ao nível de significância de 5%. Esta análise foi feita utilizando o software STATISTICA for Windows 3.11. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Avaliação da fertilidade *in vivo*

A taxa de fertilidade dos ratos machos submetidos a exposição ao alumínio são mostrados na Tabela 1. Houve uma diminuição da taxa de fertilidade nos animais que receberam 10mg/Kg e 40mg/Kg de alumínio. Durante o experimento, ocorreu a morte de um animal no tratamento com 10mg/Kg devido a administração por falsa via, diagnosticada por necrópsia. No tratamento com 40 mg/Kg de alumínio houve a morte de dois animais, a causa da morte de um dos animais é desconhecida, pois não foi realizada a necrópsia. O outro animal deste grupo estava magro comparado aos demais que receberam a mesma concentração de alumínio. Apresentava sinais de arritmia cardíaca e respiração ofegante, através da necropsia não foi constatada falsa via como causa da morte do animal. Devido a perda de animais foi utilizado menor número de fêmeas avaliadas para estes grupos. As médias do número de filhotes decresceram à medida que a concentração de alumínio aumentou (Fig. 2).

Tabela 1. Taxa de fertilidade e número de filhotes obtidos após o cruzamento de fêmeas híbridas com machos expostos a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) por 112 dias.

Grupos	Taxa de fertilidade	Nº de filhotes*
G1 (n=6 machos)	83,33% (10/12)	11,25±5,36
G2 (n=6 machos)	83,33% (10/12)	10,16±5,47
G3 (n=6 machos)	83,33% (10/12)	9,58±5,76
G4 (n=5 machos)	70,00% (7/10)	9,00±6,40
G5 (n=4 machos)	37,5% (3/8)	4,87±6,90

Número de fêmeas/ macho = 2/1; \*Média ± desvio-padrão; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = animais que receberam 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al.

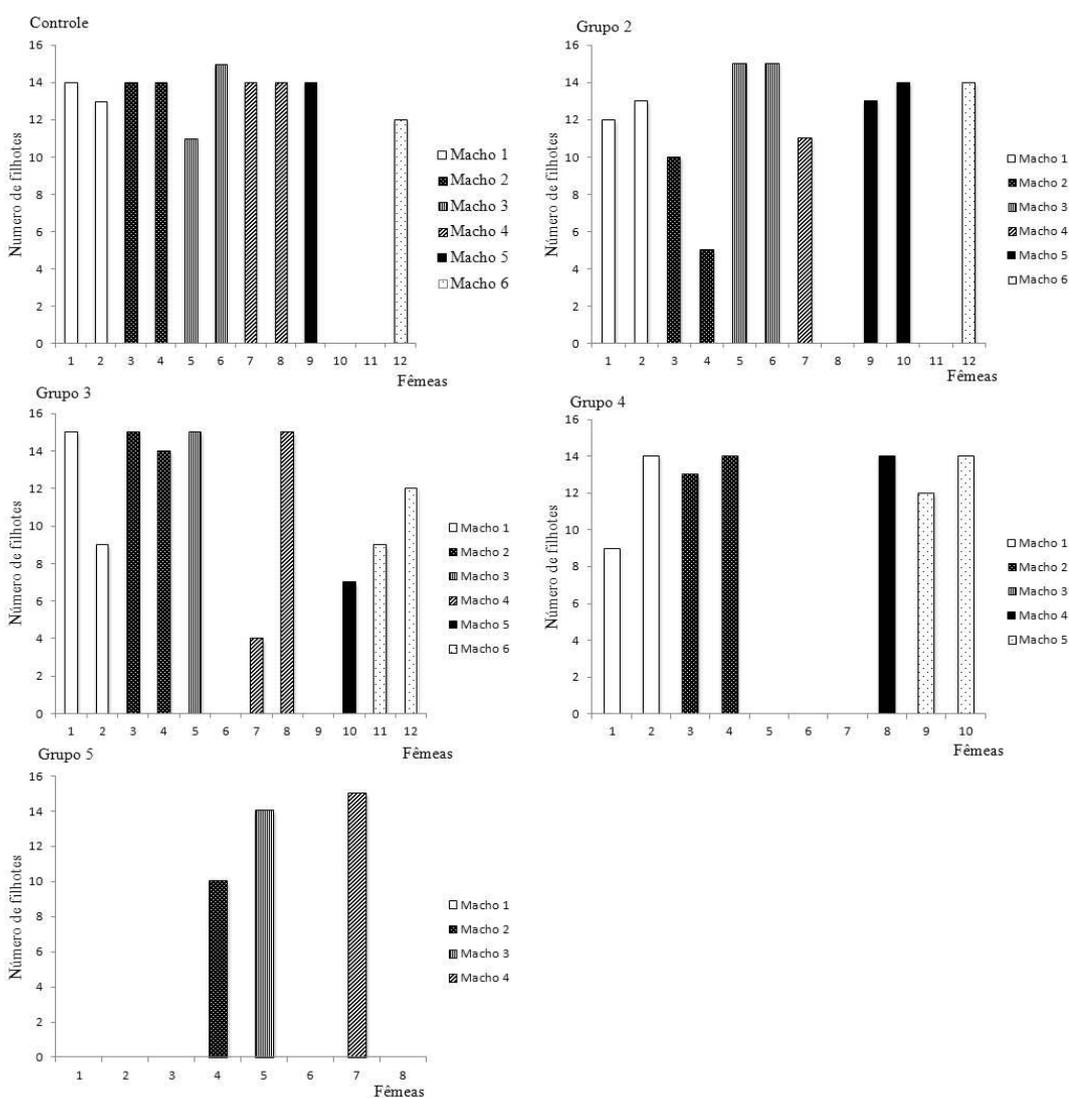


Figura 2. Número de filhotes por fêmeas acasaladas com machos submetidos ao tratamento com diferentes concentrações de cloreto de alumínio. Controle = água destilada; Grupo 2 = 0,02mg/L Al; Grupo 3 = 0,1mg/L Al; Grupo 4 = 10mg/Kg Al; Grupo 5 = 40mg/Kg Al.

### 3.2.Avaliações espermáticas

A motilidade nos tempos zero e três minutos pode ser observada na Figura 3. Não houve diferença entre os grupos para ambos os tempos analisados ( $P > 0,05$ ).

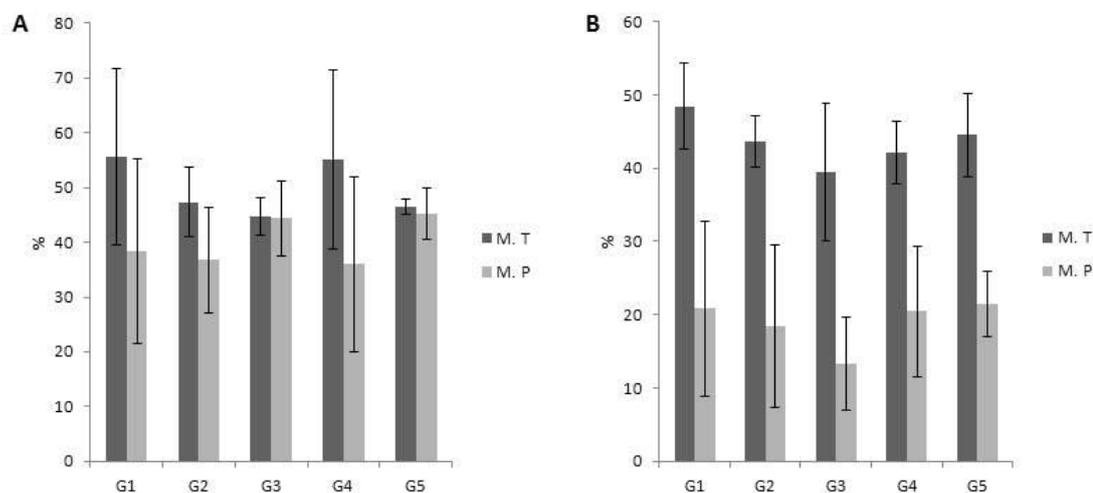


Figura 3. Motilidade espermática nos tempos de zero (A) e três minutos (B) de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de alumínio, na forma de cloreto de alumínio, durante 112 dias ( $P > 0,05$ ). MT = Motilidade total; MP = Motilidade progressiva; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al.

Os valores encontrados para VAP, VSL e VCL nos tempos zero e três minutos encontram-se na Figura 4. Não houve diferença entre os tratamentos para esses parâmetros, independente do tempo avaliado ( $P > 0,05$ ). O mesmo foi observado para os parâmetros de retidão e linearidade ( $P > 0,05$ ; Fig. 5).

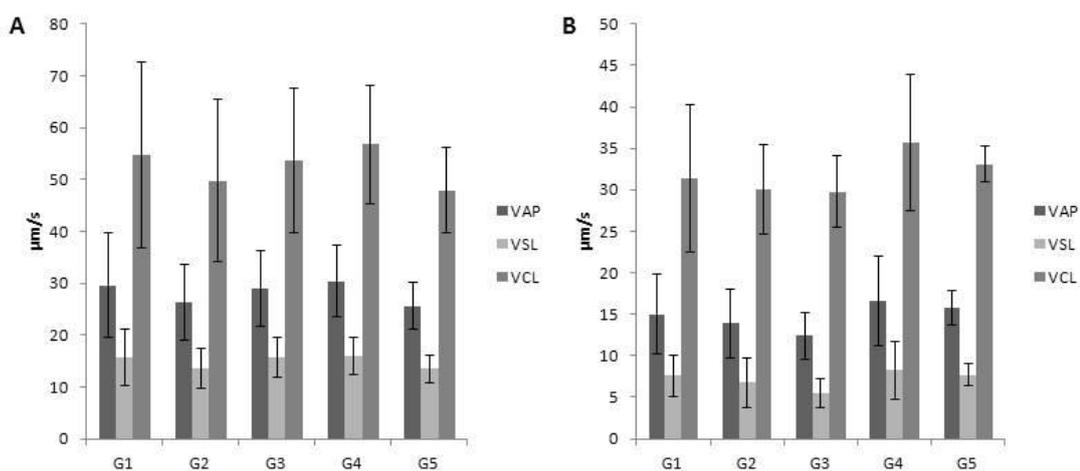


Figura 4. Velocidade espermática nos tempo de em zero minutos (A) e três minutos (B) de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio durante 112 dias ( $P > 0,05$ ). VAP = Velocidade de percurso; VSL = Velocidade progressiva; VCL = Velocidade curvilínea; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = animais que receberam 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al.

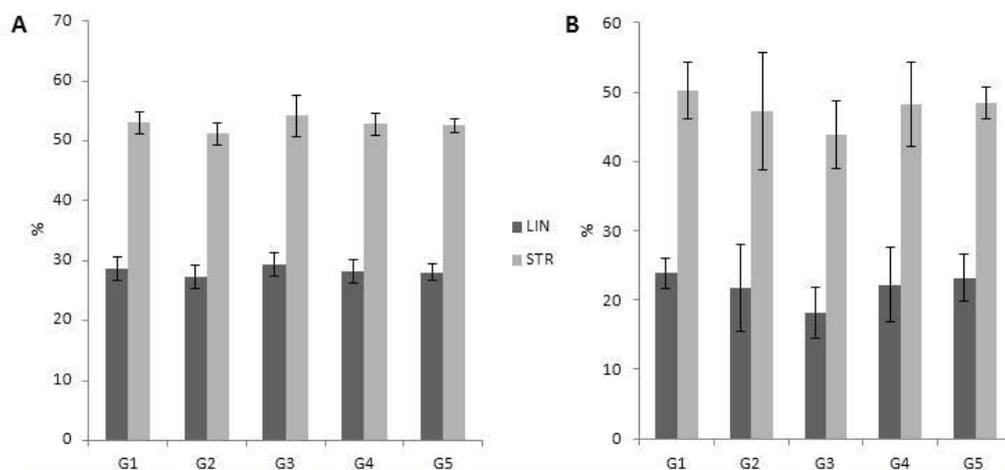


Figura 5. Retidão (STR) e linearidade (LIN) no tempo de zero (A) e três minutos (B) de ratos Wistar expostos a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio durante 112 dias ( $P > 0,05$ ). G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al.

Com relação à morfologia espermática, não foi observada diferença entre os grupos experimentais para os parâmetros de defeito de cabeça, de peça intermediária,

de cauda e do percentual de espermatozoides normais (Tab. 2;  $P > 0,05$ ). No entanto, houve redução na média percentual de gota citoplasmática distal em espermatozoides obtidos de animais dos grupos tratados com 0,1mg/L ( $3,69 \pm 3,72$ ), 10mg/Kg ( $2,40 \pm 2,30$ ) e 40mg/Kg ( $2,50 \pm 2,38$ ) quando comparados ao grupo controle ( $20,10 \pm 9,78$ ). Estes mesmos grupos apresentaram maior percentual de enrolamento de cauda sendo que o tratamento com 0,1mg/L apresentou valores de ( $9,83 \pm 4,16$ ), 10mg/Kg ( $14,00 \pm 9,53$ ) e 40mg/Kg ( $11,75 \pm 8,42$ ) em relação ao grupo controle ( $2,50 \pm 2,66$ ).

A média de espermatozoides com membranas, acrossomal e espermática, íntegras foi menor nos animais expostos ao cloreto de alumínio (Tab. 3), independente da concentração, que os espermatozoides de animais controle ( $P < 0,05$ ). Essa diferença também foi observada com relação a média de espermatozoides lesados, porém esta foi maior em animais tratados ( $P < 0,05$ ). Não houve diferença entre os grupos experimentais para o parâmetro de semi lesado ( $P > 0,05$ ).

Tabela 2. Morfologia de espermatozoides presentes no fluido epididimário de ratos Wistar expostos cronicamente a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ), 8 dias após a realização do teste de fertilidade *in vivo* ( $P > 0,05$ ).

	G1	G2	G3	G4	G5
Def. Cabeça	1,00±1,09	1,83±0,75	1,83±2,63	0,40±0,54	1,00±0,81
Def. PI	0,50±0,35	0,32±0	1,83±1,29	0	0,25±0,17
Def. Cauda	23,00±8,75	15,5±5,84	15,31±4,04	17,20±5,98	14,50±5,05
Normal	75,50±8,45	82,35±6,02	81,03±3,74	82,40±7,53	84,25±8,53

Média ± desvio-padrão; Def. Cabeça (%) = Defeito de cabeça; Def. PI (%) = Defeito de peça intermediária; Def. Cauda (%) = Defeito de Cauda; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al.

Tabela 3. Avaliação da integridade estrutural de membranas de espermatozoides presentes no fluido epididimário de ratos Wistar expostos cronicamente a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>), utilizando iodeto de propídio (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (DACF) como fluorocromos, após teste de fertilidade *in vivo*.

Grupos	Fluorescência (%)		
	*Íntegro (DACF <sup>+</sup> /IP <sup>-</sup> )	*Lesado (DACF <sup>-</sup> /IP <sup>+</sup> )	Semi lesado (DACF <sup>+</sup> /IP <sup>+</sup> )
G1	40,67±10,55 <sup>a</sup>	48,00±13,44 <sup>a</sup>	11,33±10,78
G2	24,34±7,63 <sup>b</sup>	70,50±7,84 <sup>b</sup>	5,16±7,65
G3	10,83±8,86 <sup>b</sup>	89,17±8,86 <sup>b</sup>	0
G4	6,00±6,92 <sup>b</sup>	94,00±6,92 <sup>b</sup>	0
G5	8,50±8,69 <sup>b</sup>	88,00±15,23 <sup>b</sup>	3,50±70

Média ± desvio-padrão; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al; \* <sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma coluna são diferentes entre si (P < 0,05) pelo teste de Student Newman Keuls.

### 3.3. Biometria corporal e testicular

Os animais tratados com alumínio não apresentaram diferença no peso corporal final, já no ganho de peso os animais que receberam tratamento com 0,1mg/L apresentaram um maior ganho de peso comparado aos outros grupos (Tab. 4). O peso testicular, peso da albugínea e índice gonadossomático não apresentaram alteração nos tratamentos com alumínio quando comparados ao grupo controle (P > 0,05; Tab. 5).

Tabela 4. Média e desvio padrão do peso corporal (PC) inicial e final e da variação de peso (GP) de ratos Wistar expostos cronicamente a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>), 8 dias após a realização do teste de fertilidade *in vivo*.

	G1	G2	G3	G4	G5
PC final (g)	397,53±24,44	405,48±21,74	450,93±21,87	401,64±36,87	414,07±73,49
PC inicial (g)	335,40±24,30	331,18±31,21	329,11±18,06	333,97±16,45	335,97±52,00
*GP (g)	62,13±16,74 <sup>a</sup>	74,30±25,54 <sup>a</sup>	121,82±10,09 <sup>b</sup>	67,67±27,41 <sup>a</sup>	78,10±14,42 <sup>a</sup>

Média ± desvio-padrão; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al; \* <sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma coluna são diferentes entre si (P < 0,05) pelo teste de Student Newman Keuls.

Tabela 5. Média e desvio padrão dos parâmetros biométricos no testículo de ratos Wistar expostos cronicamente a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>), 8 dias após para realização do teste de fertilidade *in vivo* (P > 0,05).

	G1	G2	G3	G4	G5
PT (g)	1,84±0,13	1,82±0,13	1,75±0,18	1,75±0,19	1,85±0,26
PP (%)	1,68±0,17	1,64±0,12	1,61±0,21	1,61±0,16	1,66±0,26
PAT (g)	0,16±0,04	0,18±0,09	0,14±0,11	0,14±0,03	0,19±0,04
IGS (%)	0,93±0,11	0,90±0,07	0,78±0,06	0,87±0,10	0,90±0,09

Média ± desvio-padrão; PT = peso testicular; PP = peso do parênquima; PAT = peso da albugínea testicular; IGS = índice gonadossomático; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al.

### 3.4. Avaliação histológica do parênquima testicular e epididimário

O parênquima testicular dos animais dos grupos apresentou sua arquitetura normal, como pode ser observado na Figura 6. Observou-se túbulo seminífero íntegro com células germinativas bem preservadas, o epitélio seminífero estava organizado normalmente, sem indicativo de que o tratamento pudesse ter afetado a espermatogênese. Não foi observadas áreas de necrose. O compartimento intertubular apresentou organização normal em todos os tratamentos (Fig. 6).

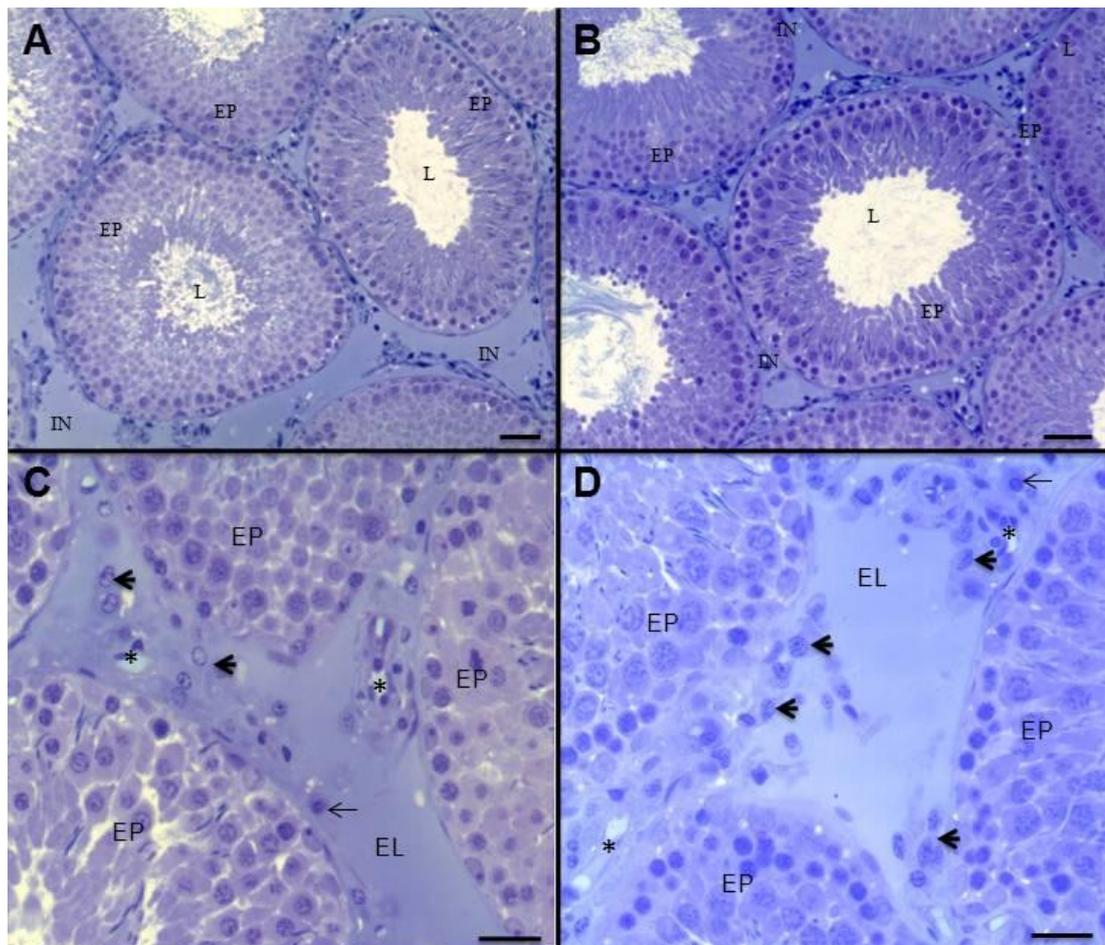


Figura 6. Fotomicrografia do parênquima e intertúbulo testiculares de ratos Wistar tratados com diferentes concentrações de alumínio. A e C – grupo controle; B e D - 40mg/Kg de Al; EP = Epitélio seminífero; L = Lúmen; IN = Intertúbulo; EL = Espaço linfático, Setas espessas = Células de Leydig; Setas finas = Macrófago; Asterisco = Vaso sanguíneo. Azul de Toluidina. Barras = 50  $\mu$ m.

No epidídimo, o segmento inicial apresentou arquitetura normal em todos os grupos experimentais (Fig. 7). As diversas secções do ducto epididimário apresentaram-se como túbulos pequenos, de formato arredondado, com epitélio pseudoestratificado espesso contendo os diversos tipos celulares comuns nesta região, inclusive as células apicais. Observou-se os estereocílios evidentes e vacuolização citoplasmática característica desta região. No compartimento intertubular observou-se poucos mastócitos. O lúmen estava repleto de espermatozoides.

A região da cabeça (Fig. 7) apresentou, em todos os grupos, arquitetura normal, com o tamanho das secções dos túbulos maior que o dos túbulos do

segmento inicial, também apresentando epitélio pseudoestratificado sem alterações histológicas. Observou-se a presença de poucas células claras e apicais, além da presença dos demais tipos celulares, exceto as células estreitas, e estereocílios bem evidentes. Assim como no segmento inicial, observou-se a presença de poucos mastócitos e lúmen com espermatozoides.

Na região do corpo, mostrada na Figura 7, os animais tratados com cloreto de alumínio apresentaram vacuolizações na região basal do epitélio que estavam localizados próximos a região periférica do epidídimo. Em todos os grupos experimentais observou-se poucos mastócitos.

A região da cauda, Figura 7, em todos os grupos experimentais, o epitélio apresentou-se mais estreito que as demais regiões, com abundância em células claras, característica dessa região, estereocílios visíveis e lúmen repleto de espermatozoide.

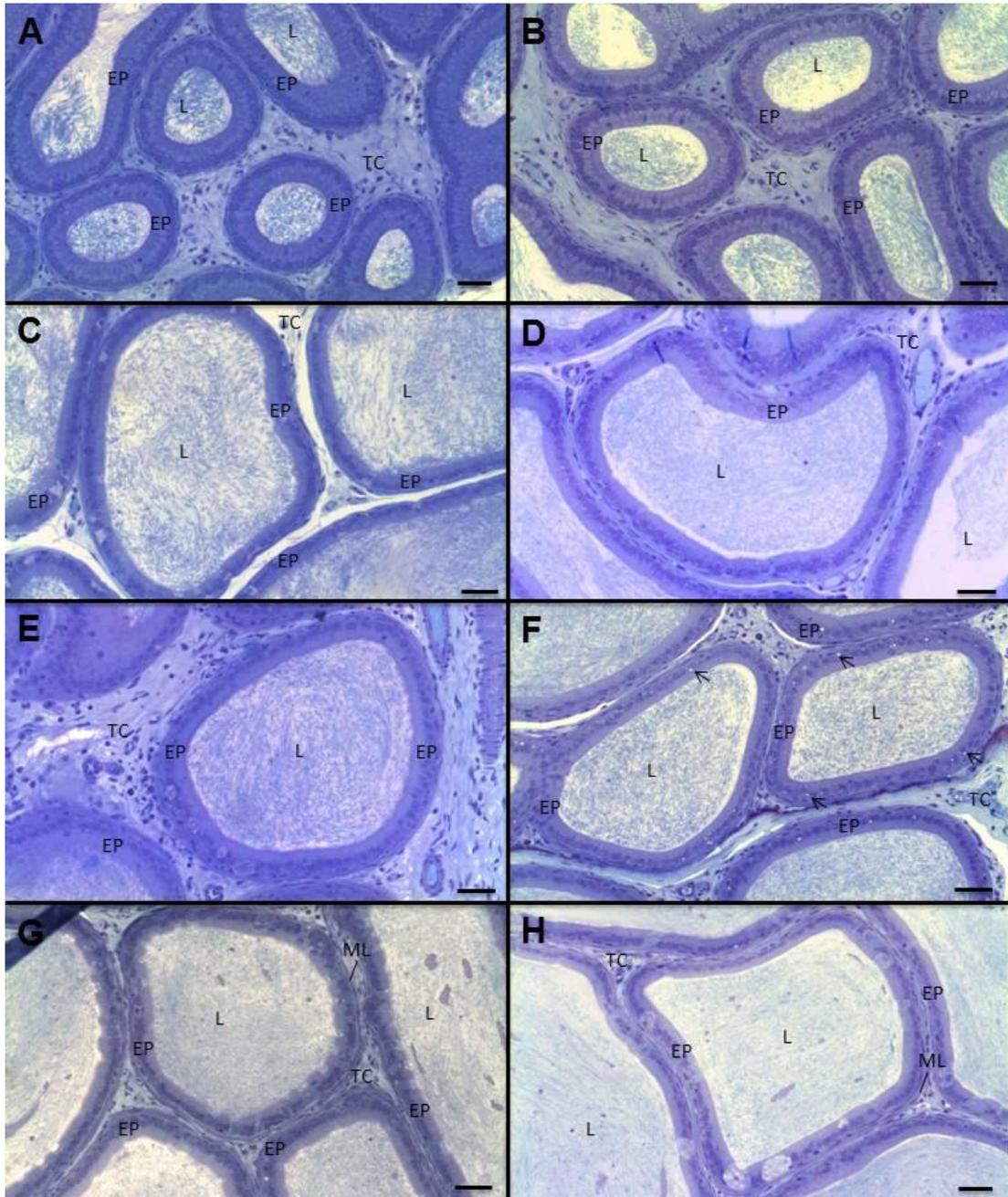


Figura 7. Fotomicrografia do epidídimo de ratos Wistar. A, C, E e G - grupo controle; B, D, F e H - 40mg/Kg de Al; EP = Epitélio; L = Lúmen; TC = Tecido conjuntivo; ML = Músculo liso; Setas finas = Vacuolização. Azul de Toluidina. Barras = 50  $\mu$ m.

### 3.4.1. Parâmetros histomorfométricos e estereológicos

Os resultados obtidos para os parâmetros histomorfométricos testiculares de diâmetro dos túbulos seminíferos, diâmetro luminal e altura do

epitélio seminífero estão mostrados na Tabela 6. Não foram encontradas diferença entre as médias dos grupos ( $P > 0,05$ ) para esses parâmetros.

Na morfometria do compartimento tubular, observou-se redução no percentual de epitélio seminífero dos animais que receberam tratamento com 0,1mg/L quando comparados ao tratamento com 40mg/Kg de alumínio (Tab. 7). Os resultados da morfometria do compartimento intertubular são mostrados na Tabela 8. O percentual de espaço linfático apresentou redução nos tratamentos com 10 e 40mg/Kg quando comparado ao tratamento com 0,1mg/L. Sendo que o tratamento com 40mg/Kg também apresentou redução comparado ao controle e ao tratamento com 0,02mg/L de alumínio. O volume do espaço linfático reduziu no tratamento com 10mg/Kg comparado ao tratamento com 0,1mg/L de alumínio. Não foram observadas alterações nos parâmetros de Leydig em ambos os grupos experimentais (Tab. 9).

Tabela 6. Diâmetro tubular (DT), luminal (DL) e da altura do epitélio (AE) dos túbulos seminíferos de ratos Wistar expostos cronicamente a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ), 8 dias após a realização do teste de fertilidade *in vivo*.

	G1	G2	G3	G4	G5
DT ( $\mu m$ )	298,4 $\pm$ 10,5	308 $\pm$ 12,8	301,2 $\pm$ 15,6	320,6 $\pm$ 22,2	303,6 $\pm$ 12,8
DL ( $\mu m$ )	147,8 $\pm$ 9,5	151 $\pm$ 10,9	144,3 $\pm$ 18,9	158 $\pm$ 15,9	146,8 $\pm$ 14,4
AE ( $\mu m$ )	75,3 $\pm$ 4,2	78,4 $\pm$ 3	78,4 $\pm$ 4,3	81,3 $\pm$ 3,4	78,4 $\pm$ 1,8

Média  $\pm$  desvio padrão. DT = Diâmetro tubular; DL = Diâmetro luminal; AE = Altura de epitélio; G1 = Controle; G2 = 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al.

Tabela 7. Parâmetros morfométricos tubulares do parênquima testicular de ratos Wistar expostos cronicamente a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>), 8 dias após a realização do teste de fertilidade *in vivo*.

	G1	G2	G3	G4	G5
TS (%)	85,92±1,95	85,56±4,19	85,88±1,42	88,63±2,16	89,07±1,43
*ES (%)	61,88±2,69 <sup>ab</sup>	61,09±4,22 <sup>ab</sup>	58,29±1,79 <sup>b</sup>	62,53±2,42 <sup>ab</sup>	63,97±2,03 <sup>a</sup>
TP (%)	2,41±0,23	2,38±0,22	2,10±0,24	2,45±0,40	2,43±0,72
L (%)	21,63±2,55	22,09±4,17	25,49±2,12	23,65±2,01	22,67±1,71
TS (mL)	1,44±0,13	1,40±0,13	1,38±0,18	1,43±0,16	1,47±0,22
ES (mL)	1,04±0,10	1,00±0,06	0,94±0,11	1,00±0,10	1,06±0,14
TP (mL)	0,04±0,01	0,03±0,01	0,03±0,004	0,04±0,01	0,04±0,01
L (mL)	0,36±0,05	0,37±0,09	0,41±0,08	0,39±0,07	0,37±0,09
CT/T (m)	20,64±1,52	18,96±2,64	19,39±1,61	17,64±0,51	20,25±1,39
CT/gT (m)	11,21±0,70	10,41±1,46	11,08±0,92	10,08±1,47	10,94±0,80
ITS (%)	0,36±0,05	0,35±0,05	0,31±0,03	0,36±0,04	0,36±0,04

Média ± desvio-padrão; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = animais que receberam 0,02 mg/L de Al; G3 = 0,1 mg/L de Al; G4 = 10 mg/Kg de Al; G5 = 40 mg/Kg de Al; TS = Túbulo seminífero; ES = Epitélio seminífero; TP = Túnica própria; L = Lúmen; CT/T = Comprimento total de túbulos seminíferos por testículo; CT/gT = Comprimento total de túbulos seminíferos por grama de testículo; ITS = Índice tubulossomático. \* <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma coluna são diferentes entre si (P < 0,05) pelo teste de Student Newman Keuls.

Tabela 8. Volume (mL) e proporção volumétrica (%) dos componentes intertubulares de ratos Wistar expostos cronicamente a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>), 8 dias após a realização do teste de fertilidade *in vivo*.

	G1	G2	G3	G4	G5
IN (mL)	0,24±0,05	0,24±0,07	0,23±0,04	0,19±0,03	0,19±0,05
IN (%)	14,08±1,95	14,44±4,19	14,12±1,42	11,37±2,16	10,93±1,43
VS (mL)	0,019±0,008	0,026±0,015	0,020±0,009	0,026±0,007	0,026±0,003
VS (%)	8,45±4,29	9,69±3,34	9,42±3,79	12,82±3,79	14,44±2,39
*EL (mL)	0,17±0,04 <sup>abc</sup>	0,16±0,04 <sup>abc</sup>	0,16±0,02 <sup>b</sup>	0,11±0,02 <sup>c</sup>	0,11±0,03 <sup>abc</sup>
*EL (%)	70,13±6,85 <sup>ab</sup>	69,48±6,29 <sup>ab</sup>	68,68±4,64 <sup>a</sup>	59,58±5,26 <sup>bc</sup>	58,25±9,55 <sup>c</sup>
CL (mL)	0,020±0,003	0,022±0,008	0,021±0,008	0,021±0,006	0,022±0,014
CL (%)	8,30±2,09	8,57±2,79	9,27±2,96	10,28±1,52	11,05±5,02
TC (mL)	0,026±0,007	0,026±0,013	0,024±0,008	0,027±0,005	0,026±0,009
TC (%)	10,87±2,77	10,38±3,46	10,35±2,52	14,38±3,82	14,18±4,48
M (mL)	0,005±0,002	0,006±0,001	0,005±0,002	0,006±0,002	0,006±0,002
M (%)	2,25±0,71	1,88±0,74	2,28±1,11	2,94±0,53	2,08±0,55

Média±desvio-padrão; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al; IN = Intertúbulo; VS = Vaso sanguíneo; EL = Espaço linfático; CL= Célula de Leydig; TC = Tecido conjuntivo; M = Macrófago. \* <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma coluna são diferentes entre si (P < 0,05) pelo teste de Student Newman Keuls.

Tabela 9. Morfometria das células de Leydig presentes no compartimento intertubular de testículos de ratos Wistar expostos cronicamente a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>), 8 dias após a realização do teste de fertilidade *in vivo* (P > 0,05).

	G1	G2	G3	G4	G5
DNL	10,66±0,62	10,66±0,73	10,48±0,80	10,95±0,50	10,26±0,17
VN	639,89±112,96	641,22±133,14	610,69±136,91	689,98±94,14	564,90±28,68
VC	1706,85±568,36	1849,05±405,36	2805,04±1680,76	2020,39±493,77	1432,73±494,07
VL	2346,74±620,86	2490,27±481,79	3415,72±1705,53	2710,37±581,53	1997,63±511,70
NCL/T	8,90±3,79	8,15±3,27	7,31±3,43	7,46±3,67	10,02±4,37
NCL/gT	4,83±1,96	4,47±2,05	4,17±2,27	4,26±2,00	5,41±1,66
RNP	40,52±12,46	35,54±7,12	27,28±15,22	34,89±4,13	42,88±13,55
ILS	0,010±0,001	0,010±0,005	0,009±0,004	0,009±0,003	0,010±0,005

Média ± desvio-padrão; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al; DNL = Diâmetro nuclear de células de Leydig ( $\mu\text{m}$ ); VN = Volume nuclear de células de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ ); VC = Volume do citoplasma de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ ); VL = volume de células de Leydig por testículo ( $\mu\text{m}^3$ ); NCL/T = Número de células de Leydig por testículo ( $10^6$ ); NCL/gT = Número de células de Leydig por grama de testículo ( $10^6$ ); RNP = Relação nucleoplasmática (%); ILS = Índice leydigossomático (%).

### 3.5. Morfometria epididimária

#### 3.5.1. Biometria

Os resultados do peso médio epididimário encontra-se na Tabela 10. Não houve diferença no peso médio dos epidídimos dos grupos tratados com alumínio comparados ao controle ( $P > 0,05$ ).

Tabela 10. Peso médio do epidídimo de ratos Wistar expostos cronicamente a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ), 8 dias após a realização do teste de fertilidade *in vivo* ( $P > 0,05$ ).

Grupos	Peso epidídimo(g)
G1 (n =6)	0,71±0,07
G2 (n =6)	0,68±0,03
G3 (n =6)	0,67±0,04
G4 (n =6)	0,73±0,09
G5 (n =6)	0,74±0,08

Média ± desvio-padrão; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al.

#### 3.5.2. Histomorfometria epididimária

Os dados da morfometria epididimária podem ser observados na Tabela 11. Não houve alteração nos parâmetros de diâmetro tubular, luminal e altura de epitélio para as regiões do segmento inicial, cabeça, corpo e cauda ( $P > 0,05$ ).

Tabela 11. Diâmetro tubular (DT;  $\mu\text{m}$ ), diâmetro luminal (DL;  $\mu\text{m}$ ) e altura epitelial (AE;  $\mu\text{m}$ ) de quatro regiões epididimárias de ratos Wistar expostos cronicamente a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ), 8 dias após a realização do teste de fertilidade *in vivo* ( $P > 0,05$ ).

		G1	G2	G3	G4	G5
SI	DT	195,8 $\pm$ 15,3	194,4 $\pm$ 15,1	192,3 $\pm$ 4,9	189,1 $\pm$ 8,6	190,1 $\pm$ 5,08
	DL	127,9 $\pm$ 18,2	127,5 $\pm$ 21,9	121,3 $\pm$ 7,4	121 $\pm$ 14,6	118,8 $\pm$ 6,1
	AE	34,8 $\pm$ 5,09	34,02 $\pm$ 2,7	36,3 $\pm$ 4,6	34,3 $\pm$ 2,6	35,5 $\pm$ 1,2
Cabeça	DT	355 $\pm$ 21,1	349,8 $\pm$ 12,3	357,5 $\pm$ 17,2	352,5 $\pm$ 21,6	352,8 $\pm$ 29,07
	DL	291,4 $\pm$ 21,04	284,5 $\pm$ 11,2	289,07 $\pm$ 16,9	285,8 $\pm$ 18,08	291,4 $\pm$ 16,6
	AE	31,6 $\pm$ 2,1	32,6 $\pm$ 2,2	34,3 $\pm$ 0,9	32,8 $\pm$ 1,8	34,9 $\pm$ 2,3
Corpo	DT	362,1 $\pm$ 15,8	340,5 $\pm$ 14,6	327,3 $\pm$ 13,3	348,2 $\pm$ 28,3	337,6 $\pm$ 26,4
	DL	291,7 $\pm$ 17,9	277,7 $\pm$ 16,5	269,07 $\pm$ 14,5	284,9 $\pm$ 23,6	269,7 $\pm$ 19,9
	AE	31,07 $\pm$ 1,7	30,09 $\pm$ 2,8	29,5 $\pm$ 1,9	30,7 $\pm$ 2,5	32,4 $\pm$ 4
Cauda	DT	328,8 $\pm$ 34,8	329,2 $\pm$ 32,6	316,6 $\pm$ 26,9	327,5 $\pm$ 27,1	318,4 $\pm$ 15,1
	DL	274,02 $\pm$ 35,3	273,8 $\pm$ 34,2	253,6 $\pm$ 16,9	266,1 $\pm$ 33,2	263,9 $\pm$ 15,1
	AE	26,5 $\pm$ 0,6	28,05 $\pm$ 1,3	28,2 $\pm$ 2,6	25,9 $\pm$ 1,6	25,9 $\pm$ 0,5

Média  $\pm$  desvio-padrão; SI = segmento inicial; DT = Diâmetro tubular ( $\mu\text{m}$ ); DL = Diâmetro luminal ( $\mu\text{m}$ ); AE = Altura de epitélio ( $\mu\text{m}$ ); G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al.

Na proporção volumétrica do segmento inicial (Tab. 12) foi observado aumento no percentual de epitélio no epidídimo dos animais expostos a 10mg/Kg de alumínio, em relação aos demais grupos, e aumento no percentual médio de vasos sanguíneos em comparação aos grupos controle e animais que receberam 0,02mg/L ( $P < 0,05$ ). Não houve alteração nos outros percentuais avaliados ( $P > 0,05$ ).

Com relação a região da cabeça, animais expostos a 10mg/Kg apresentaram menor percentual de lúmen com espermatozoide e maior percentual de lúmen sem espermatozoide ( $P < 0,05$ ) que os animais dos demais grupos (Tab. 13). Na região do corpo (Tab. 14) foi observado diferenças nos percentuais obtidos para lâmina basal, lúmen com e sem espermatozoides e tecido conjuntivo entre os grupos ( $P < 0,05$ ). Houve maior percentual de lâmina basal nos animais expostos a 40mg/Kg em relação

aos animais dos grupos controle e que receberam 0,02mg/L e 10mg/Kg. Este último grupo apresentou maior percentual de lúmen sem espermatozoide, enquanto que animais dos grupos 0,02mg/L e 10 mg/Kg apresentaram menor percentual médio para o parâmetro tecido conjuntivo ( $P < 0,05$ ). Somente houve diferença entre os animais que receberam baixas concentrações para o parâmetro lúmen com espermatozoide ( $P < 0,05$ ). Na região da cauda não houve diferença entre os grupos para os parâmetros analisados ( $P > 0,05$ ; Tab.15).

Tabela 12. Proporção volumétrica do segmento inicial epididimário de ratos Wistar expostos cronicamente a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ), 8 dias após a realização do teste de fertilidade *in vivo*.

Seg. inicial	G1	G2	G3	G4	G5
*EP	36,33±7,60 <sup>a</sup>	39,42±2,40 <sup>a</sup>	43,86±2,10 <sup>a</sup>	43,95±4,30 <sup>b</sup>	40,15±3,50 <sup>a</sup>
LB	5,31±1,90	3,73±0,95	3,18±0,60	4,05±0,29	5,71±2,0
LcSPZ	30,54±15,50	26,52±5,0	22,12±3,0	20,87±5,0	20,58±5,40
LsSPZ	2,78±1,20	3,15±1,40	3,78±0,91	5,67±2,10	3,56±2,60
TC	24,14±7,39	26,29±3,90	26,06±3,70	24,14±4,0	28,85±3,50
*VS	0,90±0,16 <sup>b</sup>	0,89±0,23 <sup>b</sup>	1,00±0,32 <sup>ab</sup>	1,32±0,24 <sup>a</sup>	1,15±0,14 <sup>ab</sup>

Média ± desvio-padrão; Seg. inicial = Segmento inicial; EP = Epitélio (%); LB = Lâmina basal (%); LcSPZ = Lúmen com espermatozoide (%); LsSPZ = Lúmen sem espermatozoide (%); TC = Tecido conjuntivo (%); VS = Vaso sanguíneo (%); G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al; \* <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma coluna são diferentes entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Student Newman Keuls.

Tabela 13. Proporção volumétrica da região da cabeça epididimária de ratos Wistar expostos cronicamente a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>), 8 dias após a realização do teste de fertilidade *in vivo*.

Cabeça	G1	G2	G3	G4	G5
EP	29,09±3,22	31,68±3,39	32,86±4,53	31,17±1,71	32,29±1,36
LB	4,47±1,47	3,36±0,33	3,44±0,43	4,22±1,20	3,33±0,87
*LcSPZ	49,58±5,18 <sup>a</sup>	44,14±4,69 <sup>a</sup>	41,63±9,99 <sup>a</sup>	34,45±13,05 <sup>b</sup>	45,11±2,53 <sup>a</sup>
*LsSPZ	3,37±3,44 <sup>a</sup>	6,75±5,13 <sup>a</sup>	5,52±4,54 <sup>a</sup>	15,72±10,12 <sup>b</sup>	3,32±2,43 <sup>a</sup>
TC	12,77±2,26	13,20±1,60	15,66±4,92	13,47±3,96	15,23±1,82
VS	0,72±0,26	0,87±0,61	0,89±0,27	0,97±0,53	0,72±0,23

Média ± desvio-padrão; EP = Epitélio (%); LB = Lâmina basal (%); LcSPZ = Lúmen com espermatozoide (%); LsSPZ = Lúmen sem espermatozoide (%); TC = Tecido conjuntivo (%); VS = Vaso sanguíneo (%); G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al; \* <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma linha são diferentes entre si (P < 0,05) pelo teste de Student Newman Keuls.

Tabela 14. Proporção volumétrica da região do corpo do epidídimo de ratos Wistar expostos cronicamente a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>), 8 dias após a realização do teste de fertilidade *in vivo*.

Corpo	G1	G2	G3	G4	G5
*EP	24,69±1,66 <sup>a</sup>	27,41±0,45 <sup>a</sup>	27,31±1,86 <sup>a</sup>	30,18±4,68 <sup>b</sup>	25,88±2,37 <sup>a</sup>
*LB	3,21±1,14 <sup>b</sup>	3,00±0,60 <sup>b</sup>	4,20±1,04 <sup>ab</sup>	3,04±0,63 <sup>b</sup>	5,34±1,14 <sup>a</sup>
*LcSPZ	48,62±3,33 <sup>ab</sup>	45,02±4,11 <sup>b</sup>	51,77±3,36 <sup>a</sup>	48,35±3,51 <sup>ab</sup>	45,95±2,41 <sup>ab</sup>
*LsSPZ	0,23±0,4 <sup>b</sup>	0,19±0,19 <sup>b</sup>	0,12±0,17 <sup>b</sup>	0,87±0,14 <sup>a</sup>	0,16±0,13 <sup>b</sup>
*TC	21,96±1,78 <sup>a</sup>	22,76±4,12 <sup>a</sup>	15,87±2,02 <sup>b</sup>	16,56±2,46 <sup>b</sup>	21,00±2,92 <sup>a</sup>
VS	1,29±1,24	1,62±1,23	1,00±0,51	1,10±0,49	1,67±0,96

Média ± desvio-padrão; EP = Epitélio (%); LB = Lâmina basal (%); LcSPZ = Lúmen com espermatozoide (%); LsSPZ = Lúmen sem espermatozoide (%); TC = Tecido conjuntivo (%); VS = Vaso sanguíneo (%); G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al; \* <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma coluna são diferentes entre si (P < 0,05) pelo teste de Student Newman Keuls.

Tabela 15. Proporção volumétrica (%) da região da cauda do epidídimo de ratos Wistar expostos cronicamente a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>), 8 dias após a realização do teste de fertilidade *in vivo* (P > 0,05).

Cauda	G1	G2	G3	G4	G5
EP	27,11±5,97	28,61±0,94	31,61±4,74	30,81±4,28	27,45±1,51
LB	3,47±0,77	2,79±0,36	3,50±0,61	3,36±0,53	2,68±0,14
LcSPZ	48,33±10,47	50,09±4,21	50,19±6,78	49,23±5,56	54,21±3,36
LsSPZ	2,40±1,73	0,63±0,96	0,45±0,52	1,37±0,86	0,94±0,73
TC	17,28±5,60	16,50±2,61	13,44±3,14	14,23±2,36	13,98±2,11
VS	0,64±0,54	0,88±0,42	0,81±0,46	0,61±0,27	0,64±0,44
ML	0,77±0,91	0,50±0,74	0	0,39±0,35	0,10±0,17

Média ± desvio-padrão; G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al; EP = Epitélio; LB = Lâmina basal; LcSPZ = Lúmen com espermatozoide; LsSPZ = Lúmen sem espermatozoide; TC = Tecido conjuntivo; VS = Vaso sanguíneo; ML = Músculo liso.

### 3.6. Concentração sérica de testosterona

Não houve diferença significativa nos valores encontrados para a testosterona nos tratamentos em relação ao controle (P > 0,05; Tab. 16).

Tabela 16. Concentração de testosterona de ratos Wistar expostos cronicamente a diferentes concentrações de alumínio na forma de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>), 8 dias após a realização do teste de fertilidade *in vivo* (P > 0,05).

Grupos	Testosterona ng/dL
G1 (n = 6)	3,24±3,66
G2 (n = 6)	1,61±1,82
G3 (n = 6)	0,94±0,27
G4 (n = 5)	0,50±0,14
G5 (n = 4)	0,68±0,44

Média ± desvio-padrão. G1 = animais que receberam 1 mL água destilada; G2 = 0,02 mg/L Al; G3 = 0,1 mg/L Al; G4 = 10 mg/Kg Al; G5 = 40 mg/Kg Al.

#### 4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostram que a fertilidade diminuiu nos animais tratados com 10 e 40mg/Kg de alumínio, sendo o número de filhotes/parto menor nos animais que receberam 40mg/Kg. Llobet et al. (1995) observaram uma diminuição na taxa de prenhez de ratas que cruzaram com machos que receberam 100 e 200mg/Kg de nitrato de alumínio, durante quatro semanas via intraperitoneal. Guo et al. (2005), administrando para camundongos 7 e 13 mg/Kg/SC de cloreto de alumínio durante 14 dias, observaram uma diminuição na taxa de fertilidade destes animais que foram colocados para acasalamento natural. Esses autores sugeriram que a exposição ao alumínio pode diminuir a libido dos animais, já que a frequência de acasalamentos também reduziu nestes grupos. Essa redução da libido pode estar relacionada com o acúmulo de alumínio nos testículos e redução na testosterona, apesar dos autores não terem observado redução deste andrógeno (Guo et al., 2005). Mesmo a fertilidade sendo avaliada por acasalamento natural, a metodologia utilizada neste estudo apresentou-se válida, já que apenas um animal do grupo controle teve suas duas fêmeas vazias e nos outros animais deste mesmo grupo todas as fêmeas estavam prenhes.

Apesar da taxa de fertilidade não ter reduzido nos animais que receberam baixas concentrações de alumínio (0,02 e 0,1mg/L), eles apresentaram menor percentual de integridade estrutural das membranas espermáticas. Nesta análise, observou-se maior percentual de membranas lesadas e menor percentual íntegras em todos os animais expostos ao alumínio, independente da concentração fornecida. A integridade da membrana não é apenas importante para o metabolismo do espermatozoide, mudanças corretas nas propriedades da membrana são necessárias para a capacitação espermática, a reação do acrossoma e a ligação do espermatozoide com a superfície do ovócito (Jeyendran et al., 1984).

Apesar do alto percentual de espermatozoides com danos estruturais em suas membranas, não foi observada diferença entre os grupos para os parâmetros de motilidade e cinética dos espermatozoides (VAP, VCL, VSL, LIN, STR). Hovatta et al. (1998) e Dawson et al. (2000) relatam que elevadas concentrações de alumínio nos espermatozoides e no plasma seminal apresenta correlação com diminuição da motilidade espermática. Sugere-se a mensuração do teor de alumínio nos tecidos e

fluidos corporais aqui analisados para verificar se houve bioacumulação. Em todos os grupos experimentais, a motilidade observada foi baixa. No entanto, animais de laboratório não sofrem seleção para parâmetros reprodutivos, o que acarreta uma qualidade espermática menor que a de animais selecionados reprodutivamente.

A morfologia espermática, outro parâmetro para avaliar-se a qualidade seminal, não apresentou diferença entre os grupos quanto o percentual de espermatozoides com morfologia normal. Todos os animais experimentais apresentaram até 25% de patologia espermática, o que é considerado normal em uma análise seminal (CBRA, 1998).

A morfologia espermática é um importante indicador de fertilidade, tanto em homens como em animais, além de ser um bom indicador para danos espermáticos consequentes de agentes físicos ou químicos (Verstegen et al., 2002; Garcia-Herreros et al., 2006). Moselhy et al. (2012) relataram que ratos tratados com 34 mg/Kg de cloreto de alumínio via oral durante 60 dias apresentaram diminuição na motilidade espermática e aumento no percentual de anormalidades no espermatozoide. Já Yousef et al. (2005) relata que coelhos tratados com 34mg/Kg de cloreto de alumínio durante 70 dias apresentaram redução na motilidade espermática. Llobet et al. (1995) observaram que, apesar da redução na taxa de fertilidade dos animais que receberam nitrato de alumínio, a motilidade e a morfologia espermática se mostraram inalteradas. Assim como no capítulo anterior, neste trabalho pode ter ocorrido o processo de hormenese (Calabrese, 2008). Portanto, os animais podem ter apresentado uma reposta ao tratamento com alumínio, resultando na reparação dos danos causados pelo metal, o que justifica a diferença nos resultados encontrados por Yousef et al. (2005) e Moselhy et al. (2012).

A presença de gota citoplasmática distal encontrada nos animais que receberam alumínio nas três concentrações mais altas, 0,1mg/L, 10 e 40mg/Kg, pode ter ocorrido devido a aceleração no tempo do trânsito epididimário. A gota citoplasmática é uma pequena massa de citoplasma que permanece no espermatozoide quando ele deixa o epitélio seminífero. Durante o trânsito pelo epidídimo ocorre a migração dessa gota ao longo da cauda, que é finalmente liberada quando essa célula fica estocada na cauda do epidídimo (Cosentino e Cockett, 1986; Gatti et al., 2004). Portanto, sugere-se a avaliação do trânsito epididimário em

animais expostos ao cloreto de alumínio, a fim de verificar seu efeito sobre o tempo gasto pelo espermatozoide para percorrer o ducto epididimário.

Os resultados obtidos para biometria corporal, testicular e epididimária, bem como para a maior parte dos dados morfométricos testiculares e epididimários, diâmetros tubular e luminal e altura do epitélio, não mostraram alterações quando os animais foram expostos às diferentes concentrações de alumínio. No caso do testículo, este resultado foi diferente do observado no capítulo anterior, onde houve alteração de algumas mensurações das células de Leydig e da concentração plasmática da testosterona. Contudo, sabe-se que a testosterona apresenta pulso de produção (Gupta et al., 2000) e o fato de não haver alteração na produção de testosterona parece estar relacionada com o pulso apresentado por algum animal do grupo controle, já que o desvio apresentou-se maior que média neste grupo. Deng et al. (2000) relatam que o alumínio não é bem retido nos tecidos o que significa que é rapidamente eliminado através da urina. Quando o elemento é mal absorvido, as pequenas quantidades que foram absorvidas são rapidamente excretadas pelos rins, por isso não ocorre acumulação no organismo (Deng et al., 2000). Este fato pode explicar os resultados aqui obtidos, pois a histomorfometria testicular foi mensurada em material coletado oito dias após o término da administração do alumínio.

Com base nos achados de Guo et al. (2005), ratos machos tratados com cloreto de alumínio via subcutânea apresentaram recuperação positiva da libido após 11 semanas do fim do tratamento, sendo esta mais rápida nos animais que receberam 7 mg/Kg comparado com os animais que receberam 13 mg/Kg. Após sete semanas a taxa de fertilidade foi recuperada, sendo que a elevação na concentração de alumínio no soro permaneceu durante duas semanas após o tratamento (Guo et al., 2005). Portanto, pode-se sugerir que as alterações causadas pelas concentrações administradas de cloreto podem ser reversíveis, no caso dos tecidos aqui analisados. Neste trabalho foi utilizada a via oral para administração do alumínio, diferentemente de Guo et al. (2005) que usaram a via subcutânea, a via oral apresenta absorção limitada em função de suas características de permeabilidade baixa das membranas e hidrossolubilidade reduzida enquanto que via subcutânea, que apresentam absorção imediata de soluções aquosas (Hardman e Limbird, 2012). Portanto, a recuperação dos efeitos do alumínio neste trabalho, pode ter ocorrido de

forma mais rápida quando comparado ao trabalho citado acima já que a absorção de alumínio pela via utilizada neste trabalho é menor.

Não foram encontrados trabalhos relacionando morfometria testicular a exposição ao alumínio. Neste trabalho, as únicas alterações testiculares observadas foram no percentual de epitélio seminífero, em que o tratamento com 40mg/Kg apresentou aumento em relação ao tratamento com 0,1mg/L, este aumento pode ter ocorrido devido a redução no percentual de componentes do túbulo seminífero como túnica própria e lúmen.

A redução no percentual de espaço linfático observada nos tratamentos com 10 e 40mg/Kg de alumínio pode estar relacionada com aumento no percentual dos demais constituintes do compartimento intertubular nestes grupos.

A ausência de alteração no IGS indica que não houve um comprometimento da massa testicular devido aos diferentes tratamentos. O comprimento total de túbulos seminíferos também não apresentou alteração, este parâmetro está intimamente relacionado com volume testicular, diâmetro tubular e proporção volumétrica dos túbulos seminíferos (França e Russell, 1998). Como não houve alterações nestes parâmetros, o comprimento total de túbulos também não apresentou alterações. Assim como não foram observadas alterações no índice tubulossomático (ITS), este parâmetro visa quantificar o investimento em túbulos seminíferos em relação à massa corporal (Cupertino, 2012), sugere-se então que o investimento em massa tubular não sofreu alterações. A ausência de alteração na altura do epitélio seminífero pode ser indicativo de que não houve comprometimento da produção espermática, já que este parâmetro é uma mensuração mais efetiva para avaliação da produção espermática por ser este um elemento dinâmico do túbulo seminífero, assim como para a altura de epitélio que não sofreu alteração (Wing e Christensen, 1982). Porém, para se confirmar se realmente não houve alteração na espermatogênese sugere-se que análises de população celular e microscopia eletrônica do testículo sejam realizadas.

Com relação à volumetria epididimária, observou-se alterações nos percentuais de alguns parâmetros no segmento inicial, cabeça e corpo. Nas duas primeiras regiões, observou-se que animais expostos a 10mg/Kg de alumínio apresentaram maior percentual de epitélio e vasos sanguíneos (segmento inicial) e diminuição do percentual de lúmen com espermatozoide e consequente aumento de

lúmen sem espermatozoide (cabeça) em relação aos demais grupos. Assim como para o testículo, não foram encontrados trabalhos analisando a morfometria epididimária em animais tratados com alumínio.

Já na região do corpo houve alterações em vários parâmetros, como aumento do percentual de lâmina basal nos animais que receberam 40mg/Kg em relação aos animais controle e que receberam 0,02mg/L e 10mg/Kg, redução do percentual de tecido conjuntivo nos animais que receberam estas concentrações em relação aos demais tratamentos e, por fim, maior percentual de lúmen com espermatozoide nos animais expostos a 0,1mg/L que 0,02mg/L e maior percentual de lúmen sem espermatozoide nos animais que receberam 10mg/Kg que os demais tratamentos.

O epidídimo pode estar implicado na infertilidade masculina (Dubé et al., 2007), portanto sugere-se que análise de tempo do trânsito epididimário, proteômica do fluido epididimário e do tecido sejam realizados para tentar esclarecer a redução na taxa de fertilidade observada neste trabalho. Análises de microscopia eletrônica devem ser realizadas para melhor compreensão das alterações encontradas na morfometria epididimária.

De acordo com os resultados encontrados, sugere-se que as alterações podem significar que, em longo prazo, a exposição contínua ao alumínio pode acarretar subfertilidade. Portanto, maiores estudos devem ser conduzidos no intuito de investigar se essas alterações podem levar a infertilidade masculina.

## **5. CONCLUSÕES**

O tratamento com alumínio levou a redução da fertilidade nos animais que receberam maiores concentrações do metal (10 e 40mg/Kg). Houve redução do percentual de membranas espermáticas íntegras e aumento do percentual de lesadas nos espermatozoides dos animais tratados com alumínio, independente da concentração fornecida. Altas concentrações de alumínio 10 e 40mg/Kg apresentaram diferentes efeitos sob a morfometria epididimária.

## 6. REFERÊNCIAS

AMANN, R. P. Sperm production rates. 1970. In: JOHNSON, A. D., GOMES, W. R., VANDEMARK, N. L. (eds). *The testis*. New York: Academic Press, v.1, Cap.7, p. 433-482.

AZIZ, D. M., AHLWEDE, L., ENBERGS, H. 2005. Application of MTT reduction assay to evaluate equine sperm viability. *Theriogenology*, v. 64, p. 1350–1356.

ATTAL, J., COUROT, M. 1963. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*, v. 3, p. 219-241.

BRASIL. 2005. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução n. 357.

CALABRESE, E. J. 2008. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.. 27, n. 7, p. 1451–1474.

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

CHATIZA, F. P., PIETERSE, G. M., BARTELS, P., NEDAMBALE, T. L. 2011. Characterization of epididymal spermatozoa motility rate, morphology and longevity of springbok (*Antidorcas marsupialis*), impala (*Aepyceros melampus*) and blesbok (*Damaliscus dorcus phillipsi*): Pre- and post-cryopreservation in South Africa. *Animal Reproduction Science*, v. 126, p. 234-244.

COSENTINO, M. J., COKETT, A. T. 1986. Structure and function of the epididymis. *Urological Research*, v. 14, n. 5, p. 229-240.

COSTA, K. L. C., MATTA, S. L. P., GOMES, M. L. M., PAULA, T. A. R., FREITAS, K. M., CARVALHO, F. A. R., SILVEIRA, J. A., DOLDER, H.,

MENDIS-HANDAGAMA, C. 2011. Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Animal Reproduction Science*, v. 127, p. 202-212.

CUPERTINO, M. C. 2012. Danos oxidativos e histológicos crônicos causados pelo cádmio no fígado e na espermatogênese de ratos. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 70 p.

DAWSON, E. B., EVANS, D. R., HARRIS, W. A., POWELL, L. C. 2000. Seminal plasma trace metal levels in industrial workers. *Biological Trace Element Research*, v. 74, p. 97-105.

DENG, Z., COUDRAY, C., GOUZOUX, L., MAZUR, A., RAYSSIGUIER, Y., PÉPIN, D. 2000. Effects of acute and chronic congestion of AlCl<sub>3</sub> with citrate or polyphenolic acids on tissue retention and distribution of aluminum in rats. *Biological Trace Element Research*, v.76, p. 245-256.

DUBÉ, E., CHAN, P. T. K., HERMO, L., CYR, D. G. 2007. Gene Expression Profiling and Its Relevance to the Blood-Epididymal Barrier in the Human Epididymis. *Biology of Reproduction*, v. 76, p. 1034–1044.

FRANÇA, L. R., RUSSELL, L. D. 1998. Testis morphometric seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production on domestic cats (*Felis catus*). *Biology of Reproduction*, v. 68, p. 1554-1561.

GATTI, J. L., CASTELLA, S., DACHEUX, F., ECRUYD, H., MÉTAYER, S., THIMON, V., DACHEUX, J. L. 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 321-339.

GARCIA-HERREROS, M., APARICIO, I. M., BARON, F. J., GARCIA MARTIN, L. J., GIL, M. C. 2006. Standardization of samples preparation, staining and

sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. *International Journal of Andrology*, v. 29, p. 553-563.

GUPTA, S. K., LINDEMULDER, E. A., SATHYAN, G. 2000. Modeling of circadian testosterone in healthy men and hypogonadal men. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 40, n. 7, p. 731-738.

GUO, C. H., LU, Y. F., HSU, G. S. W. 2005. The influence of aluminum exposure on male reproduction and offspring in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 20, p. 135–141.

HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E. 2012. *Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. McGraw Hill, 12<sup>a</sup> ed.

HARRISON, R. A. P., VICKERS, S. E. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 88, p. 343- 352.

HOVATTA, O., VENALAINEN, E. R., KUUSIMAKI, L., HEIKKILA, J., HIRVI, T., REIMA, I. 1998. Aluminium, lead and cadmium concentrations in seminal plasma and spermatozoa, and semen quality in Finnish men. *Human Reproduction*, v.13, n.1, p. 115–119.

JASKO, D. J., LITTLE, T. V., SMITH, K., LEIN, D. H., FOOTE, R. H. 1998. Objective analysis of stallion sperm motility. *Theriogenology*, v. 30, p. 1159–1167.

JEYENDRAN, R. S., VAN DER VEN, H. H., PEREZ-PELAEZ, M., CRABO, B. G., ZANEVELD, L. J. D. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journals of Reproduction and Fertility*, v. 70, p. 219-228.

KRASOVSKIY, G. N., VASUKOVICH, L. Y., CHARIEV, G. 1979. Experimental study of biological effects of lead and aluminum following oral administration. *Environmental Health Perspectives*, v. 30, p. 47-51.

LEAL, M. C., FRANÇA, L. R. 2006. The seminiferous epithelium cycle length in the black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) is similar to humans. *Biology of Reproduction*, v. 74, p. 616-624.

LLOBET, J. M., COLOMINA, M. T., SIRVENT, J. J., DOMINGO, J. L., CORBELLA, J. 1995. Reproductive Toxicology of Aluminum in Male Mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, v. 25, p. 45-51.

MCNIVEN, M. A., GALLANT, R. K., RICHARDSON, G. F. 1992. In vitro methods of assessing the viability of trout spermatozoa. *Theriogenology*, v. 38, p. 679-86.

MELO, F. C. S. A., MATTA, S. L. P., PAULA, T. A. R., GOMES, M. L. M., OLIVEIRA, L. C. 2010. The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult Wistar rats. *Biology Research*, v. 43, p. 445-450.

MENON, A. G., BARKEMA, H. W., WILDE, R., KASTELIC, J. P., THUNDATHIL, J. C. 2011. Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 75, p. 241-247.

MOSELHY, W. A., HELMY, N. A., ABDEL-HALIM, B. R., NABIL, T. M., ABDEL-HAMID, M. I. 2012. Role of Ginger Against the Reproductive Toxicity of Aluminium Chloride in Albino Male Rats. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, p. 335-343.

PAULA, T. A. R., COSTA, D. S., MATTA, S. L. P. 2002. Avaliação histológica quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas. *Bioscience Journal*, v. 18, p. 121- 136.

PASTOR-SOLER, N., PIETREMENT, C., BRETON, S. 2005. Role of acid/base transporters in the male reproductive tract and potential consequences of their malfunction. *Physiology Bethesda*, v. 20, p. 417–428.

PASTOR-SOLER, N. M., HALLOWS, K. R., SMOLAK, C., GONG, F., BROWN, D., BRETON, S. 2008. Alkaline pH- and cAMP-induced V-ATPase membrane accumulation is mediated by protein kinase A in epididymal clear cells. *American of Journal Physiology Cell Physiology*, v. 294, p. C488–C494.

TAE, H. J., JANG, B. G., AHN, D. C., CHOI, E. Y., KANG, H. S., KIM, N. S., LEE, J. H., PARK, S. Y., YANG, H. H., KIM, I. S. 2005. Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus karpowi*) during the breeding and non-breeding season. *Veterinary Research Communications*, v. 29, p. 629-643.

VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179.

WING, T. Y., CHRISTENSEN, A. K. 1982. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *The American Journal of Anatomy*, v. 165, p. 13-25.

YOUSEF, M. I., EL-MORSY, A. M. A., HASSAN, M. S. 2005. Aluminium-induced deterioration in reproductive performance and seminal plasma biochemistry of male rabbits: protective role of ascorbic acid. *Toxicology*, v.215, p. 97-107.

YOUSEF, M. I., SALAMA, A. F. 2009. Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, p. 1168–1175.

ZÚCCARI, C. E. S. N. 1998. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina. 121f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

### **CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A exposição a baixas concentrações de alumínio podem levar a alterações no aparelho reprodutor masculino, como, redução na concentração de testosterona plasmática e na integridade da membrana espermática. Porém a toxicidade deste metal parece ocorrer durante o tempo de exposição, já que quando esta é interrompida ocorre a normalização de alguns parâmetros, como a testosterona plasmática. Além disso, deve-se levar em consideração que o alumínio apresenta baixa absorção. A partir dos resultados este estudo sugere que outras análises como, microscopia eletrônica, contagem da população celular, tempo de trânsito epididimário e proteômica do fluido epididimário sejam realizadas, para a melhor compreensão dos resultados observados.