

ANÁLISE DE PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E FERTILIDADE DE RATOS WISTAR EXPOSTOS AO INTERFERON ALFA

JOSIANE DE LIMA ROSA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular, Estrutural e Funcional*.

Prof^a Dr^a Wilma De Grava Kempinas

Botucatu - SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ANÁLISE DE PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E FERTILIDADE DE RATOS WISTAR EXPOSTOS AO INTERFERON ALFA

JOSIANE DE LIMA ROSA

Prof^a Dr^a Wilma De Grava Kempinas

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular, Estrutural e Funcional*.

Prof^a Dr^a Wilma De Grava Kempinas

Botucatu - SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO - CRB 8/7500

Rosa, Josiane de Lima.

Análise de parâmetros espermáticos e fertilidade de ratos Wistar expostos ao interferon alfa / Josiane de Lima Rosa. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Wilma de Grava Kempinas

Capes: 20602006

1. Interferon. 2. Glicoproteínas. 3. Reprodução animal. 4. Fertilidade.

Palavras-chave: Interferon alfa; Potencial fértil; Qualidade espermática.

Dedicatória

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida:

Minha mãe, pelo amor incondicional.

Meu pai, o mais generoso de todos os pais.

Minhas irmãs, pelo incentivo e apoio.

Agradecimientos

Durante esses dois anos só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria me permitiram seguir em frente e os de sofrimento serviram para um crescimento pessoal único. É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À minha família, vocês são minha fortaleza. Obrigada por acreditarem em mim, mesmo quando eu não acreditava!

Aos meus pais, por estarem sempre ao meu lado. Serei eternamente grata pelo exemplo de vida, pelos valores e princípios que norteiam minha caminhada. Espero um dia poder retribuir tudo o que vocês fizeram e fazem por mim.

Às minhas irmãs, com quem divido minhas alegrias, expectativas, anseios e medos. Obrigada por serem sempre tão presentes em minha vida.

Ao Daniel, meu cunhado preferido, sempre me fazendo rir e passar vergonha. Você é o irmão que a vida me deu.

À minha tia Marli, que me recebeu com tanto carinho durante esses dois anos em sua casa. Sempre me apoiou em tudo que precisei. Sempre muito atenciosa e paciente... obrigada por aguentar meu mau humor matinal! Minha "mãezinha botucuda", você fez toda a diferença.

À minha orientadora, prof^a Dr^a Wilma De Grava Kempinas, que mesmo sem me conhecer abriu as portas do ReproTox, acreditando que eu era capaz. Só tenho a agradecer aos seus ensinamentos, orientações, apoio, palavras de incentivo, confiança e oportunidade de trabalhar ao seu lado.

À prof^a Dr^a Flávia Karina Delella e ao Prof^o Dr^o Daniel G. Cyr, pela colaboração, disponibilidade, atenção e ajuda na realização das imunossorções que, embora não façam parte da dissertação, me proporcionaram a oportunidade de vivenciar essa importante ferramenta metodológica.

À minha grande amiga, Marília, pela amizade, cumplicidade e incentivo nos momentos difíceis. Você sempre esteve ao meu lado e não mediu esforços para me ajudar. Nós percorremos este caminho juntas, nos complementando e nos fortalecendo. Você é parte essencial desse trabalho.

À equipe do ReproTox, pelo auxílio nos experimentos e pelos momentos de descontração. Especialmente a Cibele, para quem por vezes eu liguei enlouquecida. Muito obrigada pelo apoio.

Ao técnico do Laboratório de Embriologia, José Eduardo, sempre disposto a ajudar e aconselhar.

Aos funcionários da Pós-Graduação por todo suporte e atenção.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processo 2012/13307-4) pelo suporte financeiro.

Às pessoas incríveis, Ana Flávia Vidotti, Aline Lima, Pei e Gui, que Botucatu me permitiu conhecer e conviver.

Aos meus amigos Aline e Milanez, cuja distância física não nos separou. Pessoas lindas com as quais uma simples conversa por cel, facebook ou whatsapp me deixa extremamente feliz, não importa quão idiota seja essa conversa. Só tenho a agradecer por todos os nossos momentos juntos.

Aos animais, parte fundamental desse trabalho, obrigada por suas contribuições à ciência.

A todos meu carinho e muito obrigada!!!

*"Sede como os pássaros que, ao pousarem um instante
sobre ramos muito leves, sentem-nos ceder, mas cantam!
Eles sabem que possuem asas."
(Victor Hugo)*

SUMÁRIO

Resumo	9
Abstract	11
Introdução	13
Citocinas	14
Interferons	15
Interferon Alfa	17
Vias de Sinalização	17
Farmacocinética	18
Aplicação Clínica	20
Efeitos Adversos	20
Sistema Genital Masculino e o Interferon-Alfa	22
Justificativa	25
Manuscrito	27
Abstract	30
1. Introduction	31
2. Materials and Methods	31
2.1. Animals	31
2.2. Drug	32
2.3. General treatment schedule	32
2.3.1.Experiment 1	32
2.3.1.1. Reproductive organ weight and testosterone level	32
2.3.1.2. Sperm count and daily sperm production	33
2.3.1.3. Intrauterine artificial insemination	33
2.3.1.4. Sperm motility and morphology	34

2.3.2. Experiment 2	34
2.3.2.1. Testicular and epididymal histopathology	34
2.3.2.2. Testicular morphometry	34
2.4. Statistical analysis	35
3. Results	35
4. Discussion	36
5. Acknowledgements	38
6. References	38
Conclusões	49
Referências Bibliográficas	51
Apêndices	55
Cômite de Ética	58

Resumo

Interferons (IFNs) são pequenas proteínas conhecidas por suas atividades antiproliferativa e imunorregulatória e por seu envolvimento crucial na ação antiviral celular. Os IFNs do tipo I incluem os IFN- α , β e ω e são utilizados terapeuticamente no tratamento de diversos tipos de cânceres e hepatites B e C. Sabe-se que dentre os efeitos adversos causados pelo IFN- α estão as disfunções endócrinas. Pouco se sabe sobre os efeitos dos IFNs na reprodução. Assim, o presente estudo objetivou investigar, em ratos adultos, os efeitos da exposição subcrônica a diferentes doses de IFN- α sobre parâmetros reprodutivos masculinos. No experimento 1, ratos Wistar adultos (90 dias/350-470g) foram distribuídos em três grupos experimentais (n=10), sendo um controle, cujos animais receberam o veículo, e dois tratados, subcutaneamente, com as doses de 5×10^4 unidades/Kg e 10×10^4 unidades/Kg, diluídas em salina. Após 30 dias de tratamento os animais foram pesados e eutanasiados para coleta dos órgãos do sistema genital. Testículo e epidídimo direitos, próstata ventral e glândula seminal (sem a glândula coaguladora) de cada animal foram retirados e pesados. Testículos e epidídimos direitos foram utilizados para determinação do número de células germinativas e os epidídimos esquerdos para a coleta de espermatozoides para avaliação da motilidade e morfologia espermática e para serem usados nas inseminações artificiais intrauterinas. Os níveis séricos de testosterona também foram mensurados. No experimento 2, outro lote de animais, seguindo o mesmo design experimental, foi utilizado para a coleta dos testículos e epidídimos esquerdos para avaliações histopatológica e morfométrica. Os pesos corpóreos e dos órgãos reprodutores foram semelhantes entre os grupos, bem como a produção espermática diária, tempo de trânsito espermático através do epidídimo, motilidade e morfologia espermática e potencial fértil dos animais. As avaliações histopatológica e morfométrica não revelaram danos relacionados ao tratamento. Assim, nossos resultados mostram que a exposição subcrônica ao IFN- α não interferiu com as concentrações plasmáticas de testosterona e não prejudicou a qualidade espermática e capacidade fértil de ratos adultos.

Abstract

Interferons (IFNs) are small proteins known their antiproliferative and immunoregulatory activities and their crucial involvement in the cellular antiviral. Type I IFNs include the IFN- α , β e ω and are used therapeutically in the treatment of several kinds of cancers and hepatitis B and C. Endocrine dysfunction is among the adverse side effects of IFN- α . Little is know about the effects of IFNs on reproduction. Therefore, the present study aimed to investigated, in adult rats, the effects of subchronic exposure to different doses of IFN- α on male reproductive parameters. In the experiment 1, adult male Wistar rats (90 days/350-470g) were distributed in three experimental groups (n=10), one control, which received the vehicle, and two treated, subcutaneously, with 5×10^4 units/Kg e 10×10^4 units/Kg of IFN- α , diluted in saline. After 30 days of treatment the animals were weighed and euthanized for collection of reproductive organs. Right testis and epididymis, ventral prostate and seminal gland (without coagulating gland) of each animal were removed and weighed. Right testis and epididymis were used for the determination of sperm number and left epididymis for collection of sperm to evaluate of sperm motility and morphology and for intrauterine artificial insemination. The serum testosterone levels were also measured. In the experiment 2, another lot of animals, following the same experimental design, were used for collection of left testis and epididymis for to histopathological and morphometric evaluation. The body and reproductive organ weights were unchanged, as well as the daily sperm production, sperm transit time through the epididymis, sperm motility and morphology and fertility potential of animals. The histopathological and morphometric evaluation did not reveal injuries related to treatment. Thus, our results show that subchronic exposure to IFN- α did not interfere with levels of serum testosterone and did not impair the sperm quality and fertile capacity of adult male rats.

Introdução

CITOCINAS

Citocinas são proteínas monoméricas ou multiméricas, usualmente, menores que 35 kDa, cujo papel principal é o controle de respostas imunes e inflamatórias através da regulação da proliferação, diferenciação e atividade celular. Apesar de desempenharem suas funções, principalmente, por meio de interações altamente localizadas, muitas citocinas também circulam no sangue e, portanto, se comportam de uma maneira endócrina clássica (Hedger & Meinhardt, 2003).

Inicialmente chamadas de linfocinas e monocinas para indicar as fontes celulares, tornou-se claro que o termo citocina é a melhor descrição, uma vez que quase todas as células nucleadas são capazes de sintetizar esta proteína (Dinarello, 2000).

Algumas citocinas claramente promovem a inflamação sendo denominadas pró-inflamatórias, já outras suprimem o processo inflamatório e são denominadas anti-inflamatórias, no entanto, muitas citocinas desempenham um papel ambíguo (Dinarello, 2000; Hedger & Meinhardt, 2003).

As diferentes citocinas podem ser enquadradas em diversas categorias: interferon (IFN), interleucina (IL), fator estimulante de colônia (CSF), fator de necrose tumoral (TNF) e fator de transformação de crescimento (TGF) (Dinarello, 2000; Hedger & Meinhardt, 2003). Todas as citocinas são substâncias hidrofílicas de sinalização, com ação mediada via receptores específicos expressos na superfície de células alvo (Bazhanova, 2005).

INTERFERONS

O IFN foi descoberto na Inglaterra em 1957 por Isaacs & Lindenmann, que verificaram que culturas de membranas corioalantoicas infectadas pelo vírus da gripe produziam uma proteína que reagia com as células para torná-las resistentes à infecção por diversos vírus. Os autores chamaram a proteína de IFN. Pouco depois da descoberta da potência antiviral do IFN, sua potência antitumoral foi reconhecida. Embora descoberto na década de 50, levou muitos anos para que fosse registrado e utilizado terapeuticamente como agente antiviral e antitumoral (Isaacs & Lindenmann, 1957; Corssmit *et al.*, 2000; Pestka, 2007).

IFNs são conhecidos por suas atividades antiproliferativa e imunorregulatória e por seu envolvimento crucial na ação antiviral celular (Dejucq *et al.*, 1998). Eles são agrupados em três tipos principais: IFN I, II e III (Tabela 1), de acordo com suas propriedades biológicas, físico-químicas e antigênicas (Pfeffer *et al.*, 1998; Corssmit *et al.*, 2000; Randall & Goodbourn, 2008; González-Navajas *et al.*, 2012). Desde a descoberta do IFN-alfa (α) e beta (β), classificados como IFNs do tipo I, cinco outros IFNs foram descobertos e também classificados como tipo I, IFN-epsilon (ϵ), kappa (κ), ômega (ω), delta (δ) e tau (τ). Destes, apenas o IFN- ϵ , κ e ω são encontrados em seres humanos, mas, até o momento, suas funções ainda não são totalmente compreendidas (Pestka *et al.*, 2004; George *et al.*, 2012).

Dois outros IFNs possuem relevância biológica em seres humanos. O IFN-gama (γ), classificado como IFN do tipo II, foi relatado pela primeira vez por Wheelock em 1965, e foi mais estudado e nomeado em 1970. O IFN-lambda (λ), classificado como IFN do tipo III, é o mais recente dos IFNs e foi inicialmente descrito por dois grupos no início de 2003 (George *et al.*, 2012).

Tabela1. Membros da família do interferon.

<i>Tipos</i>	<i>Subtipos de IFNs</i>	<i>Fonte Primária</i>	<i>Função</i>	<i>Receptor</i>	<i>Vias de Transdução de Sinal</i>
I	IFN- α	PDCs			
	IFN- β	Fibroblastos, células dendríticas	Antiviral Citotóxica	IFNAR 1/2	Jak1, Tyk1, Stat1, Stat2,
	IFN- ϵ	Células do SNC, útero, ovário	Antitumoral Pro-apoptótica		Stat3, Stat4, Stat5, NF- κ B,
	IFN- κ	Keratinócitos	Antiproliferativa		MAPK, p53
	IFN- ω	PDCs			
II	IFN- γ	Células NK, células T, Macrófagos	Antiviral Antibacterial Antitumoral	IFNGR 1/2	Jak1, Jak2, Stat1, Stat3, Stat5
III	IFN- λ 1 (IL-29)	PDCs	Antiviral	IFNLR/IL-10R2 (células epiteliais e hepatócitos)	
	IFN- λ 2 (IL-28A)	PDCs	Antibacterial Antitumoral		Jak1, Tyk2, Stat1, Stat2,
	IFN- λ 3 (IL-28B)	PDCs	Pro-apoptótica Antiproliferativa		Stat3, Stat5

PDCs: células dendríticas plasmocitóides (plasmacytoid dendritic cell); células do SNC: células do sistema nervoso central; células NK: células exterminadoras naturais (natural killer cells).

INTERFERON ALFA

Via de Sinalização

Os IFNs do tipo I podem ser produzidos por praticamente todos os tipos celulares incluindo leucócitos, fibroblastos e células endoteliais (Chen *et al.*, 2004; George *et al.*, 2012; González-Navajas *et al.*, 2012), em resposta a patógenos ou células tumorais (Brojeni *et al.*, 2012).

A via de sinalização que leva à indução deste tipo de IFN se dá através de um receptor heterodimérico comum, conhecido como IFNAR, que é expresso em quase todos os tipos de células. Este receptor é constituído por duas subunidades, IFNAR1 e IFNAR2 (Chen *et al.*, 2004; George *et al.*, 2012; González-Navajas *et al.*, 2012). Os domínios intracelulares do IFNAR1 e IFNAR2 estão associados com proteínas tirosina quinases da família Janus, TYK2 e JAK1, respectivamente (Figura 1) (Takaoka & Yanai, 2006; González-Navajas *et al.*, 2012).

A ligação do IFN- α ao receptor IFNAR resulta na mudança conformacional do receptor (Randall & Goodbourn, 2008) e na ativação das proteínas quinases TYK2 e JAK1 através da fosforilação de resíduos de tirosina destas proteínas. Os resíduos fosforilados servem como locais de recrutamento para efetores de sinalização e ativadores da transcrição (STAT) (Brierley & Fish, 2002). Na maioria das células os membros da família STAT incluem o STAT1, STAT2, STAT3 e STAT5 (González-Navajas *et al.*, 2012).

As proteínas TYK2 e JAK1 ativadas fosforilam um único resíduo de tirosina na extremidade carboxi-terminal da proteína STAT (Brierley & Fish, 2002). O STAT1 e o STAT2 ativados interagem com o fator regulador de interferon 9 - IRF9 (*interferon regulatory factor 9*) formando o complexo STAT1-STAT2-IRF9 que é conhecido como fator de gene estimulado por IFN - ISGF3 (*interferon stimulated gene factor 3*) (González-Navajas *et al.*, 2012). Este complexo migra para o núcleo e se liga a elementos de resposta estimulados por IFN - ISRE (*interferon stimulated response element*) na região promotora de genes estimulados por IFN - ISG

(*interferon stimulated gene*) para iniciar a transcrição do gene (Figura 1) (Brierley & Fish, 2002; Gonzáles-Navajas et al., 2012).

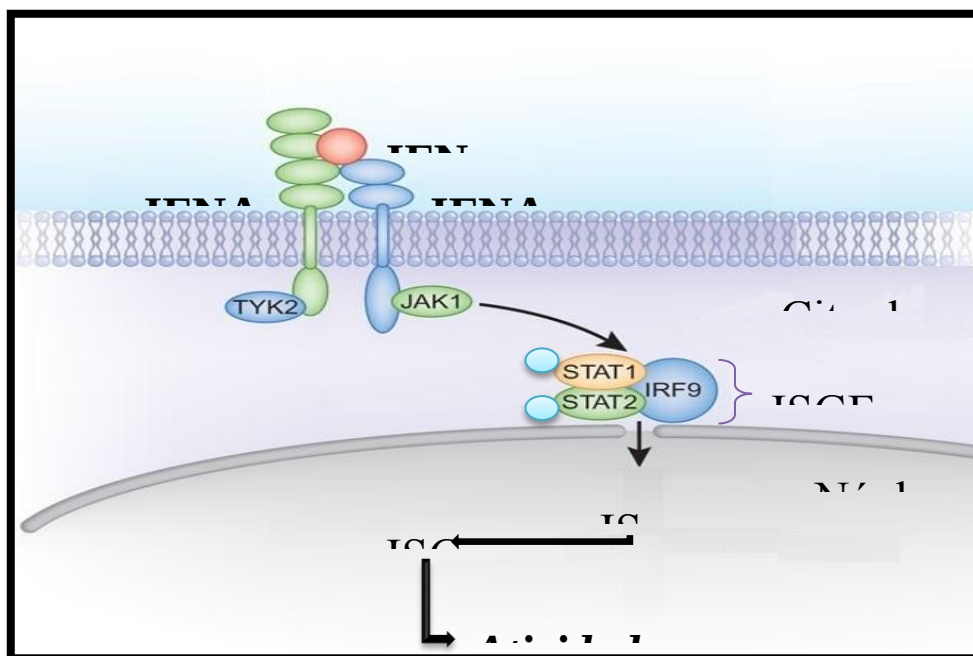


Figura 1. Representação esquemática do receptor de IFN do tipo I e sua via de sinalização. A ativação do receptor resulta na fosforilação das proteínas TYK2 e JAK1 e no recrutamento dos STAT1 e 2 que juntamente com o IRF9 conduzem a ativação da expressão do ISG.
Fonte: Adaptado de O'Brien, 2009.

Farmacocinética

O IFN- α é fracamente absorvido pelo sistema gastrointestinal, portanto, é administrado via parentérica, sendo a injeção subcutânea a via habitual de administração (George *et al.*, 2012). Tanto com administração subcutânea quanto intravenosa, a meia vida deste IFN é relativamente curta, 4-8 horas, sendo que após 24 horas, seus níveis no sangue diminuem abaixo do limite de detecção (Corssmit *et al.*, 2000; Foser *et al.*, 2003).

O IFN- α é consideravelmente diluído no plasma e fluidos intercelulares e pode ser inativado por estes fluidos. Além disso, é largamente sequestrado pelos receptores celulares de todo o corpo e catabolizado pelos rins e fígado, o que pode explicar seu curto tempo de meia vida (Corssmit *et al.*, 2000).

Desde 1986 o IFN- α -2A recombinante humano (Roferon[®]-A) tornou-se importante agente terapêutico no tratamento de pacientes com doenças virais e oncológicas. A frequência da administração dos IFNs depende da doença. Por exemplo, para a hepatite C a administração recomendada é de três vezes por semana, durante 24-48 meses, dependendo do genótipo do vírus (Foser *et al.*, 2003).

Desde o início da década de 90, grande esforço tem sido orientado visando melhorar a meia vida do IFN- α no sangue, de modo a diminuir a frequência de administração do fármaco. Um caminho considerado promissor foi a peguilação do IFN (Figura 2). A técnica de peguilação consiste em unir uma molécula de polietilenoglicol (PEG) ao IFN por meio de uma ligação covalente (Foser *et al.*, 2003). A conjugação do IFN- α com o PEG altera as propriedades físico-químicas e biológicas do IFN, diminuindo a degradação proteolítica e depuração renal e aumentando a meia vida do IFN no sangue. Assim, a melhora da farmacocinética permitiu a administração uma vez por semana com concentrações mais estáveis da droga (Foser *et al.*, 2003; George *et al.*, 2012).

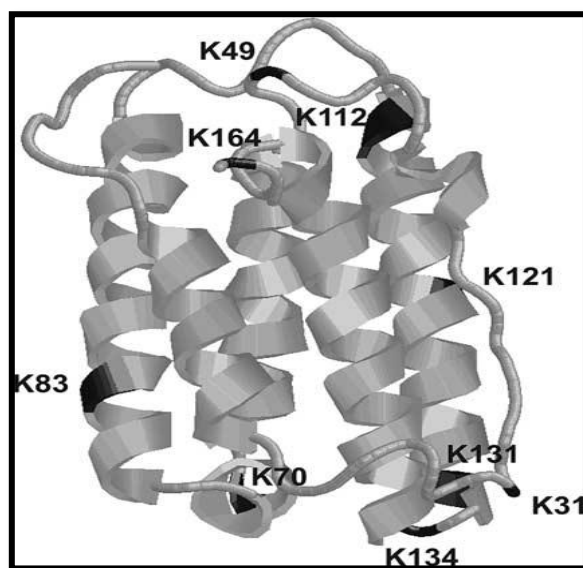


Figura 2. Estrutura de fita do IFN- α -2A, determinada por espectroscopia. Os locais de peguilação estão representados pela cor preta e rotulados com o tipo e número do resíduo.
Fonte: Foser *et al.*, 2003.

Aplicação Clínica

A partir da observação do papel crítico que os IFNs desempenham no sistema imune inato, muitos pesquisadores têm explorado o potencial imunomodulador terapêutico dessas proteínas. Em particular, os IFNs do tipo I têm sido amplamente utilizados no tratamento de diversas doenças como melanoma metastático, linfoma, leucemia, condiloma acuminado, sarcoma de Kaposi, esclerose múltipla e hepatites B e C (Pfeffer *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2008; Randall & Goodbourn, 2008).

O IFN- α consiste de uma família multigênica, de pelo menos 13 genes funcionais, com 80-95% de homologia, que codificam para 12 isoformas de IFN- α . Destas isoformas, somente o IFN- α -2 é utilizado terapeuticamente (Corssmit *et al.*, 2000; Pestka, 2007; Randall & Goodbourn, 2008; George *et al.*, 2012).

O uso mais comum de terapia com IFN- α é no tratamento de infecção pelo vírus da hepatite C. Cerca de 150 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas, sendo que, a cada ano, mais de 350 mil pessoas morrem de doenças hepáticas relacionadas com a hepatite C (WHO, 2013).

Efeitos Adversos

A terapia com IFN- α , especialmente quando são utilizadas altas doses, está associada à ocorrência de efeitos adversos. Além de efeitos mais brandos como sintomas gripais, náusea, mialgia e calafrios (Lechner *et al.*, 1999), depressão, impotência sexual (Kraus *et al.*, 2005; Kartal *et al.*, 2007), lesões dermatológicas (erupções cutâneas, bem como reações no local da injeção), desenvolvimento ou exacerbação de doenças autoimunes (George *et al.*, 2012) e diversas disfunções endócrinas, em particular tireoidite têm sido documentadas após a administração do fármaco (Corssmit *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2003), de forma que o IFN- α pode ser considerado um interferente endócrino (IE) (Andrade, 2012).

A desregulação endócrina é definida como uma modificação do sistema endócrino, causando efeitos prejudiciais em indivíduos saudáveis ou em seus descendentes (Schmidt & Peterlin-Masic, 2012; Nohynek, 2013). Hormônios atuam em concentrações plasmáticas muito baixas, e certos produtos químicos conhecidos como IE podem modificar a função endócrina em concentrações similarmente baixas (Schmidt & Peterlin-Masic, 2012).

Doenças autoimunes e endócrinas são complicações bem reconhecidas decorrentes da terapia com IFN, além da tireoidite, mencionada anteriormente, lúpus eritematoso sistêmico, vasculite, fenômeno de Raynaud (George *et al.*, 2012), diabetes mellitus e doença de Addison também têm sido relatadas (Chan *et al.*, 2003).

Os sintomas gripais (mialgia, astenia, febre, fadiga e dor de cabeça) são comuns nas primeiras semanas de tratamento e muitas vezes respondem a medicação com paracetamol. Efeitos adversos neuropsiquiátricos podem ter consequências graves tanto para o paciente bem como para sua família, uma vez que casos de suicídios foram relatados (George *et al.*, 2012).

Irritabilidade, déficit de memória e fadiga são comuns, mas não resultam na rescisão do tratamento. Já a neutropenia e trombocitopenia são causas importantes de redução da dose e até mesmo cessação da terapia, especialmente em pacientes cirróticos que estão em risco de sépsis e já apresentavam baixos níveis de plaquetas antes do início do tratamento devido à esplenomegalia (George *et al.*, 2012).

Os efeitos tóxicos pulmonares estão se tornando cada vez mais evidentes. A pneumonia foi há muito reconhecida como um efeito adverso potencial do tratamento com IFN e há evidências emergentes que indicam que o IFN também pode atuar sobre a vasculatura pulmonar, com relatos de casos que revelam uma associação com a hipertensão arterial pulmonar (George *et al.*, 2012).

SISTEMA GENITAL MASCULINO E O INTERFERON-ALFA

O sistema genital masculino é formado pelo pênis, testículos, túbulos retos, ductos eferentes, epidídimos, ducto deferente e glândulas sexuais acessórias, incluindo a próstata e glândula seminal (Stanbenfeld & Edqvist, 1996). Sabe-se que este sistema é andrógeno-dependente, e que qualquer composto que atue sobre o controle do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal pode interferir no desenvolvimento normal do sistema genital masculino, assim como no seu crescimento e função (Luccio-Camelo & Prins, 2011).

A secreção do hormônio luteinizante - LH (*luteinizing hormone*) e do hormônio folículo estimulante - FSH (*follicle stimulating hormone*) pela adenohipófise mantém o funcionamento normal do sistema genital masculino (Spritzer & Reis, 2008). O LH é responsável por estimular a secreção de testosterona pelas células de Leydig enquanto o FSH estimula as células de Sertoli a produzirem a proteína ligante de andrógenos - ABP (*androgen-binding protein*), fazendo com que sejam mantidas altas concentrações locais de testosterona, um fator imprescindível para o processo espermato gênico (Spritzer & Reis, 2008).

No organismo masculino, a testosterona é o hormônio sexual mais abundante, a ponto de ser considerado o hormônio testicular fundamental. Cerca de 95% da testosterona circulante é secretada pelas células de Leydig, localizadas no interstício testicular, e os 5% restantes pelas glândulas supra-renais (Guyton & Hall, 2006).

Em homens normais, 30% da testosterona está ligada a uma betaglobulina chamada globulina ligante de hormônio sexual - SHBG (*sex hormone binding globulin*), sendo esta a principal transportadora de testosterona. Alterações qualitativas e/ou quantitativas na SHBG podem reduzir ou ampliar a base hormonal. Somente 1 a 2% da testosterona total permanece livre, sendo considerada biologicamente ativa, o restante está vinculada à albumina e outras proteínas (Morales *et al.*, 2004).

Os dados disponíveis em relação os efeitos do IFN- α sobre a produção de testosterona em humanos saudáveis ou pacientes com doenças infecciosas são inconclusivos, uma vez que tanto concentrações diminuídas como inalteradas deste hormônio foram encontradas, o que possivelmente está relacionado à diferenças nos protocolos experimentais (Corssmit *et al.*, 2000).

Orava *et al.* (1986) e Corssmit *et al.* (2000) demonstraram que a administração subcutânea de IFN- α recombinante humano, em homens saudáveis, induziu diminuição nos níveis séricos de testosterona. Corssmit e colaboradores ainda relataram que o tratamento com a citocina em questão provocou diminuição no índice de andrógenos livres, sem promover quaisquer alterações nos níveis séricos de LH, FSH e SHBG.

Em 2005, durante um estudo onde pacientes portadores da hepatite crônica C receberam doses de IFN- α 2b e IFN- α 2b combinados com ribavirina, três vezes por semana durante doze meses, Kraus *et al.* também não encontraram alterações nos níveis de SHBG e LH. Os autores ainda relataram diminuição acentuada nos níveis séricos de testosterona durante o tratamento com o IFN- α -2b e ribavirina, sendo que a redução foi persistente mesmo após o término do tratamento.

Piazza *et al.* (1997) demonstraram que em pacientes afetados pela hepatite crônica C que receberam IFN- α , três vezes por semana durante doze meses, os níveis de testosterona, medidos a cada três meses, mantiveram-se inalterados. O mesmo foi observado por Barreca *et al.* (1993) que não relataram mudanças nos níveis séricos de testosterona livre e nas concentrações de LH, medidos a cada dois meses, durante a terapia com IFN- α , administrado três vezes por semana, durante seis meses.

Por outro lado, Hibi *et al.* (1997) observaram aumento nos níveis séricos de testosterona e LH em ratos adultos tratados, subcutaneamente, durante 3 meses, com IFN- α . Os autores ainda relataram que os níveis de FSH não foram alterados. Do mesmo modo, Mageed *et al.* (2005)

também relataram maiores níveis séricos de testosterona em camundongos, sexualmente maduros, tratados com IFN- α uma vez por semana durante doze semanas, via intraperitoneal. No entanto, os autores relataram decréscimo tanto nos níveis de FSH quanto de LH.

A saúde reprodutiva masculina é definida tanto pelo desenvolvimento adequado do sistema reprodutor como pela manutenção de suas funções ao longo da vida adulta. Como o sistema genital masculino é totalmente dependente de andrógenos, espera-se que compostos que interferem na ação destes hormônios tenham impacto sobre a funcionalidades dos órgãos que compõem o sistema genital masculino (Luccio-Camelo & Prins, 2011).

Pouco se sabe sobre como IE androgênicos/antiandrogênicos afetam o sistema reprodutor masculino, uma vez que os hormônios andrógenos são cruciais para o desenvolvimento e função dos testículos bem como das glândulas sexuais acessórias e manutenção da espermatogênese (Heinlein & Chang, 2002; Luccio-Camelo & Prins, 2011).

Dessa maneira, considerando que os efeitos dos IFNs têm sido investigados em grande número de sistemas biológicos, poucos estudos relacionados aos efeitos deste fármaco sobre o sistema genital masculino estão disponíveis (Mageed *et al.*, 2005), o que reforça a necessidade de estudos inovadores abordando este tema.

Justificativa

O homem está exposto a agentes virais e atualmente a terapia com IFN- α é a mais utilizada no tratamento da hepatite crônica B e C, embora provoque disfunções endócrinas. IE são substâncias químicas que interferem com a homeostase hormonal e existem evidências de que o IFN- α atue como um IE. Uma vez que os relatos na literatura sobre a ação deste fármaco na reprodução masculina são escassos e contraditórios, justificou-se a realização deste trabalho para investigar os efeitos da administração subcrônica de IFN- α (Roferon[®]-A) sobre parâmetros reprodutivos de ratos Wistar adultos.

Manuscrito

Este trabalho deu origem ao artigo "Assessment of Reproductive Parameters in Adult Male Rats Exposed to Interferon-alpha" submetido ao periódico "Journal of Reproductive Immunology".

Assessment of Reproductive Parameters in Adult male Rats Exposed to Interferon-alpha

J. L. Rosa, M. M. Cavariani, C. S. Borges, G. A. A. Leite, W. G. Kempinas*

Laboratory of Biology and Toxicology of Reproduction and Development, Department of Morphology, Institute of Biosciences, UNESP - Univ Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil.

* Corresponding author: Department of Morphology, Institute of Biosciences, UNESP - Univ Estadual Paulista. Distrito de Rubião Jr, s/n, 18618-970, Botucatu, SP, Brazil. Tel.: +55 14 3880-0476.
E-mail address: kempinas@ibb.unesp.br

ABSTRACT

IFN- α (IFN- α), a type I IFN, is a protein with antiviral, antiproliferative and immunoregulatory activities, beyond being a potential endocrine disruptor, widely used in the treatment of several kinds of cancers and hepatitis B and C. Decrease of libido and erectile dysfunction are commonly reported by male patients during the treatment of chronic hepatitis C with IFN- α , but therapy-associated underlying factors for sexual dysfunction and antiviral therapy are still not well defined. Once that to the best of our knowledge there are few studies investigating the effects of IFNs in the male reproductive system, we evaluated the effects of subchronic exposure to IFN- α (5×10^4 units/Kg and 10×10^4 units/Kg, 30 days) on testosterone levels, sperm parameters, fertility and testicular and epididymal histopathology and morphometry in adult male Wistar rats. None of the evaluated parameters were altered by IFN- α . Thus, our results suggest that exposure to IFN- α , in this experimental design, did not adversely affect sperm quality and fertile capacity of male rats.

Keywords: Interferon-alpha, male rat, sperm quality, testosterone, fertility potential.

1. Introduction

Interferons (IFNs) are proteins with antiviral, antiproliferative and immunoregulatory activities (Dejucq *et al.*, 1998; Brojeni *et al.*, 2012) which according to their biological, physicochemical and antigenic properties (Corssmit *et al.*, 2000a) are classified in three main types: IFN I, II and III (Randall and Goodbourn, 2008; Gonz  les-Navajas *et al.*, 2012).

Type I IFNs include the subtypes alpha (INF- α) and beta (INF- β) are widely used therapeutically in the treatment of several kinds of cancers and hepatitis B and C (Lechner *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2008, George *et al.*, 2012). The therapy with high doses of IFN- α is related to side effects that include ranging from the flu symptoms, nausea and fever (Lechner *et al.*, 1999) to endocrine dysfunctions such as thyroiditis (Corssmit *et al.*, 2000b) and sexual dysfunction (Kraus *et al.*, 2005). The level of IFN- α in the seminal plasma can be related to sperm production, since oligozoospermic men show higher concentration of IFN- α in the seminal plasma compared to normozoospermic men (Fujisawa *et al.*, 1998).

Currently there are few studies investigating the effects of therapeutic use of IFNs on reproductive parameters. However a study conducted by Hibi *et al.* (1997) reported an increase in daily sperm production, epididymal sperm count and serum testosterone levels in rats submitted to chronic administration of IFN- α .

Since IFN- α could act as a potential endocrine disruptor (Andrade, 2012) and due to the existence of few and contradictory studies correlating the use of IFN- α and sexual side effects as well as sperm quality, the aim of the present study was to investigate the effects of subchronic IFN- α exposure on sperm parameters and fertility of adult male Wistar rats.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Male (90 days old/350-460g) and female (60 days old/230-270g) (*Rattus norvegicus*), supplied by the Central Biotherium of Universidade Estadual Paulista were maintained under controlled conditions ($23 \pm 1^\circ\text{C}$, 12h light/12h dark cycle and $60 \pm 5\%$ relative humidity) with commercial rat chow and filtered water *ad libitum* in the Biotherium of the Morphology Department, Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP.

All experimental procedures were in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian Society of Science in Laboratory Animals (SBCAL) and were approved by the Institute of Biosciences of Botucatu/UNESP Ethics Committee for Animal Research (protocol number 425).

2.2. Drug

The IFN- α was acquired from Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A. (Roferon[®]-A, São Paulo, Brazil).

2.3. General treatment schedule

The animals were randomly distributed into three experimental groups that received saline solution, the vehicle (control group, n=10), IFN 5x10⁴ units/Kg (IFN5, n=10) or IFN 10x10⁴ units/Kg (IFN10, n=10) daily during 30 days subcutaneously. These doses correspond to those used in the human clinic for the treatment of hepatitis C (Hibi *et al.*, 1997). The study was divided in two steps, Experiment 1 and Experiment 2, as described below.

2.3.1. Experiment 1

2.3.1.1. Reproductive organ weights and testosterone levels

After 30 days of treatment the animals were weighed and submitted to narcosis in a CO₂ chamber, followed by decapitation. The blood was collected from ruptured cervical vessels (between 9:00 and 12:00 am) and serum was obtained by centrifugation (1236×g, for 20 min at 4°C). The concentration of testosterone was determined by double antibody radioimmunoassay. Testosterone assay was performed using a TESTOSTERONE MAIA[®] kit (Biochem Immuno System). All samples were assayed in duplicate and in the same assay to avoid inter-assay errors. The intra-assay error was 4%.

Right testis and epididymis as well as ventral prostate and seminal vesicle (without the coagulating gland) were removed and their weights (absolute and relative to body weight) were recorded. Testis and epididymis were frozen until sperm counts, as described below.

2.3.1.2. Sperm counts and daily sperm production

The testis, decapsulated and weighed immediately after collection, was frozen at -20°C until homogenization second method described by Robb *et al.* (1978) adapted as described hereafter. The testicular parenchyma was thawed and homogenized, for 1 minute, in 5 ml of NaCl 0.9% containing Triton X 100 0.5%, followed by sonication for 30 seconds. After a 10-fold dilution, one sample was transferred to Neubauer chambers (4 fields per animal), carrying the count of spermatids resistant homogenization process. To calculate the daily sperm production (DSP), the number of mature spermatids was divided by 6.1, which is the number of days of the seminiferous cycle during which these spermatids are present in the seminiferous epithelium. In the same manner, caput/corpus and cauda epididymidis were cut into small fragments with scissors and homogenized, and sperm counted as described for the testis. The sperm transit time through the epididymis was determined by dividing the number of sperm in each portion by DSP.

2.3.1.3. Intrauterine Artificial Insemination

Intrauterine artificial insemination has shown to be a more sensitive method to evaluate fertility in rodents, due to their high spermatogenic efficiency (Kempinas & Klinefelter, 2010). For this, LHRH-synchronized females in proestrus were paired with sexually experienced, vasectomized males for 1 hour. Receptive females (i.e. those that exhibited lordosis) were selected for insemination. Proximal cauda sperm from the left epididymides were isolated and prepared as previously described (Klinefelter *et al.*, 1994) with the following adaptations. Briefly, the sperm were released from the proximal cauda by nicking the duct with a number 10 scalpel and collecting the sperm in 2 mL of modified human tubular fluid (HTF) medium (Irvine Scientific®). After a 10-fold dilution, sperm were counted and each uterine horn was injected with a volume containing 5×10^6 sperm (Seed *et al.*, 1996). One female was inseminated per male and when insemination was completed, the abdominal musculature was sutured. All surgery was performed using a mix of ketamine and xylazine for the anesthesia. Nine days later, the females were euthanized by decapitation to enable fertility evaluation. After collection of the uterus and ovaries the numbers of corpora lutea and implants were recorded and the following endpoints determined: gestational rate: number of pregnant females/number of inseminated females $\times 100$; fertility potential (efficiency of implantation): implantation sites/corpora lutea $\times 100$.

2.3.1.4. Sperm motility and morphology

Sperm motility was evaluated in the same sperm sample used for artificial insemination. For this purpose, an aliquot of 10 μL of sperm suspensions was immediately transferred to a Makler chamber (Irvine, Israel) maintained at 34°C. Using a phase-contrast microscope (Leica DMLS) (400 $\times$ magnification). One hundred sperm were evaluated and classified as type A: motile, with progressive movement; type B: motile, without progressive movement; type C: immotile.

An aliquot of 100 μL from the same sample used by artificial insemination was added to 900 μL of formol saline. To analyze sperm morphologically, smears were prepared on histological slides that were left to dry for 40 min and two hundred spermatozoa per animal were analyzed in a phase-contrast microscope (400 $\times$ magnification). Morphological abnormalities were classified into two general categories: head morphology (without curvature, without characteristic curvature, pin head or isolated form, i.e., no tail attached) and tail morphology (broken or rolled into a spiral) (Filler, 1993). Sperm were also classified as to the presence or absence of the cytoplasmic droplet.

2.3.2. Experiment 2

2.3.2.1. Testicular and epididymal histopathology

Male rats (90 day old) were randomly allocated into three experimental groups (n=10) and treated as described previously.

The left testes and epididymides were removed and immersed in Bouin solution for 24 hours. The pieces were dehydrated in a graded ethanol series, routinely processed for embedding in paraffin, sectioned at 5 μm and subsequently stained with hematoxylin and eosin (H&E). The sections were captured by a 3DHISTECH scanner and examined using Pannoramic Viewer program.

Histopathological analyses were performed following specific guidelines for toxicological studies (Foley, 2001).

2.3.2.2. Testicular morphometry

One hundred sections of seminiferous tubules were evaluated per animal as to the stage of spermatogenic cycle. The stages were grouped in stages I-VI, VII-VIII, IX-XIII and XIV, according to the number of generations of spermatids, presence of mature spermatids localized in the tubule luminal border or presence of secondary

spermatocytes (Ferreira *et al.*, 1967). In order to determine the seminiferous epithelium height and tubular diameter 10 sections of tubules in stage IX were measured per animal.

2.4. Statistical analysis

For comparison of results between the experimental groups, parametric ANOVA with Tukey post-test or nonparametric Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test, were used, according to the characteristic of each variable. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. The results were expressed as the median values $\pm$ interquartile range and mean $\pm$ standard error of the mean for non-parametric and parametric data, respectively. The statistical analyses were performed by GraphPad InStat (version 5).

3. Results

Final body, absolute and relative weights of reproductive organ (testis, epididymis, full and empty seminal vesicle and prostate) were similar among control and treated groups (Table 1).

Exposure to IFN- α did not alter the level of serum testosterone (Figure 1) as well as the testis and epididymal sperm number, the daily sperm production and sperm transit time through the epididymis (Table 2).

Sperm motility was not altered by IFN- α since the percentages of sperm type A, B and C was similar among treated and control groups (Figure 2). The assessment of sperm morphology revealed that the percentages of normal and abnormal sperm were not different among the groups. This analysis also revealed the absence of cytoplasmic droplets in most spermatozoa of control, IFN5 and IFN10 groups (Table 3).

The gestational rate of control and IFN10 groups were 80%, while in IFN5 group was 90%. The fertility potential was not significantly different among all the groups. Control group: 88.15 (78.52 - 98.33); IFN5: 78.57 (73.22 - 90.60); IFN10: 80.91 (60.42 - 96.88). Values expressed as median $\pm$ interquartile range, $p > 0.05$.

Testicular and epididymal histopathological evaluation (data not shown) and morphometry performed in the testicular sections (Table 4) did not reveal alterations due to IFN- α exposure.

4. Discussion

The relation between cytokines and human reproduction represent an area of increasing interest due to the involvement of these proteins in several aspects of infertility (Cohen *et al.*, 2004). The effects of IFNs on a large number of biological systems have been investigated, however, there are few studies related to the use of IFNs and the male genital system (Mageed *et al.*, 2005), reinforcing the need for innovative studies addressing this issue and making it difficult to compare our results with other works. Here we present an investigation about sperm parameters, testosterone levels, testicular and epididymal morphology as well as on fertility, in adult male rats exposed to INF- α for 30 days.

Body weight monitoring provides subsidies for evaluation of the general health status of the animal, and the determination of absolute and relative weights of reproductive organs provide important parameters for evaluation of toxicity risk on the male genital system (Clegg *et al.* 2001). The absence of changes in body weight, absolute and relative reproductive organs weight of animals exposed to IFN- α indicates that the drug did not induced systemic and reproductive toxicity.

Androgen hormones are crucial for the development and function of the testes and accessory sex glands and maintenance of spermatogenesis and male fertility (Heinlein and Chang, 2002; Smith and Walker, 2014). As the male genital system is totally dependent on androgens, it is expected that compounds that interfere with the action of hormones impact the functionality of the organs that comprise the male genital system (Luccio-Camelo and Prins, 2011). Although INF- α has been suggested as a possible endocrine disruptor (Andrade, 2012), in the present study the testosterone levels were similar in all groups. In contradiction, other authors showed different results when INF- α was administered to rodents for longer periods. Hibi *et al.* (1997) reported that injections of IFN- α daily for 3 months increased the testosterone levels in male rats. Similarly, Mageed *et al.* (2005) also reported higher testosterone levels in adult mice treated with IFN- α -2b, intraperitoneally, once a week for twelve weeks.

Parameters such as sperm count, motility and morphology are used to evaluate the concentration and quality of the sperm (Jensen *et al.*, 2006; Amann, 2009). Fujisawa *et al.*, (1998) suggest that level of IFN- α in seminal plasma can be related to sperm production, since oligozoospermic men show higher concentration of IFN- α in the seminal plasma compared to normozoospermic men.

Although IFN- α is a protein with antiproliferative activity (Dejucq *et al.*, 1998; Brojeni *et al.*, 2012), in the present study the treatment with IFN- α did not alter the sperm production and reserves in both doses used. Since IFN- α plays an important role on neoplastic cells (Corssmit *et al.*, 2000a), unaltered production and sperm reserves in the IFN- α treated groups was probably due to the normal pattern of proliferation of individual spermatogonias (As) that through the spermatogenic process originate the spermatozoa (Oatley and Brinster, 2012).

The epididymis is a highly specialized organ that is involved in the maturation, transport, protection, and storage of mammalian spermatozoa. During the transit through the epididymis, spermatozoa acquire progressive motility and the ability to bind and fertilize the oocyte (Robaire *et al.*, 2006). Spermatozoa maturation involves the remodeling of the sperm plasma membrane by the addition, removal or modification of cell surface molecules, which is in part due to the interaction of spermatozoa with molecules found in the epididymal luminal microenvironment (Dubé *et al.*, 2007). Our results showed no alteration in sperm transit time through the epididymis that could be attributed to the treatment.

Sperm motility is one of the most commonly used parameters to assess the fertile ability of sperm (Aitken *et al.*, 1985, Mortimer *et al.*, 1986, Gruschwitz *et al.*, 1996). In accordance to Hibi *et al.* (1997), we found no changes in the sperm motility of animals treated with IFN- α in both doses. It is known that sperm morphology evaluation also provides valuable information on the dose-response of a chemical substance (Perreault and Cancel, 2001). After releasing from the seminiferous epithelium, spermatozoa show a small droplet of cytoplasm attached near to the neck region. During the transit of sperm through the caput epididymis, this cytoplasmic droplet migrates along the middle piece of the flagellum. In the corpus of epididymis, the droplet shows a lateral displacement, while in the cauda of epididymis it detaches from the spermatozoa (Hermo *et al.*, 1988). In this work the incidences of abnormally shaped sperm and sperm retaining the cytoplasmic droplet in the IFN- α treated groups were low and comparable with the control group.

Histopathological evaluation is generally accepted as the most sensitive parameter for detecting effects of chemical substances on male reproductive function (Creasy, 2003). The analysis of testis and epididymis did not reveal any apparent injuries related to treatment with IFN- α . The testis morphometric analysis also did not show any

changes in the spermatogenesis dynamics, seminiferous epithelial height and tubular diameter in animals treated with this cytokine.

Since rats produce and ejaculate an excess of qualitatively normal sperm, the intrauterine artificial insemination of a fixed number of sperm can increase the probability for detecting a decrease in sperm quality in this specie (Klinefelter, 2002). Fertility potential was unaltered after the subchronic treatment with both doses of IFN- α . This is in agreement with the other presented results, showing absence of effects on sperm quantity and quality.

In conclusion, we demonstrated that the subchronic exposure to 5 and 10×10^4 units/Kg of IFN- α had no impact on the sperm quality and fertility capacity of adult male rats. Although a broader investigations is necessary to evaluate the hypothesis of endocrine disruption provoked by IFN- α , the observed normal testosterone levels and the associated endpoints suggest that IFN- α did not act as an hormonally active compound in the present experimental conditions.

5. Acknowledgements

Authors are grateful to the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP 2012/13307-4) for their financial support. It must be stated that FAPESP did not have any involvement in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. We are also thankful to José Eduardo Bozano for technical support, and to Dr^a Janete Aparecida Anselmo-Franci and Ruither de Oliveira Gomes Carolino of the Department of Morphology, Stomatology and Physiology, Dental School of Ribeirão Preto, USP for the hormonal assays.

6. References

- Aitken, R. J., Sutton, M., Warner, P., Richarson, D. W., 1985. Relationship between the Movement Characteristics of Human-Spermatozoa and Their Ability to Penetrate Cervical-Mucus and Zona-Free Hamster Oocytes. *J Reprod Fertil.* 73, 441-449.
- Amann, R. P., 2009. Considerations in Evaluating Human Spermatogenesis on the Basis of Total Sperm per Ejaculate. *J Androl.* 30, 626-641.
- Andrade, L. J. O., 2012. Interferon-alpha: an endocrine disruptor?. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 56, 72-73.
- Bessler, H., Singer, R., Raanani, P., Levinsky, H., Lahav, M., Cohen, A. M., 1995. Interferon α -2b modulates β -galactoside α -2,6-sialyltransferase gene expression in rat testes. *Biol Reprod.* 53, 1474-1477.

- Brojeni, P. Y., Matok, I., Garcia Bournissen, F., Koren, G., 2012. A systematic review of the fetal safety of interferon alpha. *Reprod Toxicol.* 33, 265-268.
- Clegg, E. D., Perreault, S. D., Klinefelter, G. R., 2001. Assessment of male reproductive toxicology. In: Hayes, A. W. (Eds.), *Principles and Methods of Toxicology*. Taylor & Francis, Philadelphia, pp. 1263-1299.
- Cohen, D. R., Basu, S., Randall, J. M., Aballa, T. C., Lynne, C. M., Brackett, N. L., 2004. Sperm motility in men with spinal cord injuries is enhanced by inactivating cytokines in the seminal plasma. *J Androl.* 25, 922-925.
- Corssmit, E. P., De Metz, J., Sauerwein, H. P., Romijn, J. A., 2000a. Biologic responses to IFN-alpha administration in humans. *J Interferon Cytokine Res.* 20, 1039-1047.
- Corssmit, E. P. M., Endert, E., Sauerwein, H. P., Romijn, J. A., 2000b. Acute effects of interferon-alpha administration on testosterone concentrations in healthy men. *Eur J Endocrinol.* 143, 371-374.
- Creasy, D. M., 2003. Evaluation of testicular toxicology: a synopsis and discussion of the recommendations proposed by the Society of Toxicologic Pathology. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 68, 408-415.
- Dejucq, N., Lienard, M. O., Guillaume, E., Dorval, I., Jegou, B., 1998. Expression of interferons-alpha and -gamma in testicular interstitial tissue and spermatogonia of the rat. *Endocrinology.* 139, 3081-3087.
- 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. *Biol Reprod.* 76, 1034-1044.
- Ferreira, A. L., Lison, L., Valeri, V., 1967. Caryometric study of spermatogenesis in the rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 76, 31-55.
- Filler, R., 1993. Methods for evaluation of rats epididymal sperm morphology. In: Chapin, R. E., Heindel, J. J. (Eds.), *Male reproductive toxicology*. Academic Press, California, pp. 334-343.
- Foley, G. L., 2001. Overview of male reproductive pathology. *Toxicol Pathol.* 29, 49-63.
- Fujisawa, M., Fujioka, H., Tatsumi, N., Inaba, Y., Okada, H., Arakawa, S., Kamidono, S., 1998. Levels of interferon alpha and gamma in seminal plasma of normozoospermic, oligozoospermic, and azoospermic men. *Arch of Androl.* 40, 211-214.
- George, P. M., Badiger, R., Alazawi, W., Foster, G. R., Mitchell, J. A., 2012. Pharmacology and therapeutic potential of interferons. *Pharmacol Ther.* 135, 44-53.
- González-Navajas, J. M., Lee, J., David, M., Raz, E., 2012. Immunomodulatory Functions of Type I Interferons. *Nat Rev Immunol.* 12, 125-135.
- Gruschwitz, M. S., Brezinschek, R., Brezinschek, H. P., 1996. Cytokine levels in the seminal plasma of infertile males. *J Androl.* 17, 158-163.
- Herms, L., Dworkin, J., Oko, R., 1988. Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. *Am J Anat.* 183, 107-124.
- Heilein, C. A.; Chang, C., 2002. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev.* 23, 175-200.
- Hibi, H., Yokoi, K., Yamamoto, M., 1997. Effects of alpha-interferon on sperm production, concentration, and motility in the rat. *Int J Urol.* 4, 603-607.
- Jensen, T. K., Bonde, J. P., Joffe, M., 2006. The influence of occupational exposure on male reproductive function. *Occup Med.* 56, 544-553.

- Khan, N. U., Pulford, K. A., Farquharson, M. A., Howatson, A., Stewart, C., Jackson, R., McNicol, A. M., Foulis, A. K., 1989. The distribution of immunoreactive interferon-alpha in normal human tissues. *Immunology*. 66, 201-206.
- Kempinas, W. G., Klinefelter, G. R., 2010. The epididymis as a target for toxicants. In: McQueen, C. A. (Eds.), *Comprehensive toxicology*, Academic Press, Oxford, pp. 149-166.
- Klinefelter, G. R., 2002. Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. In: Robaire, B., Hinton, B. T. (Eds.), *The epididymis - from molecules to clinical practice*, Kluwer Academic, New York, pp. 353-369.
- Klinefelter, G. R., Laskey, J. W., Kelce, W. R., Ferrell, J., Roberts, N. L., Suarez, J. D., Slott, V., 1994. Chloroethylmethanesulfonate-Induced Effects on the Epididymis Seem Unrelated to Altered Leydig-Cell Function. *Biol Reprod*. 51, 82-91.
- Kraus, M. R., Schafer, A., Bentink, T., Scheurlen, M., Weissbrich, B., Al-Taie, O., Seufert, J., 2005. Sexual dysfunction in males with chronic hepatitis C and antiviral therapy: interferon-induced functional androgen deficiency or depression?. *J Endocrinol*. 185, 345-352.
- Lechner, J., Krall, M., Netzer, A., Radmayr, C., Ryan, M. P., Pfaller, W., 1999. Effects of interferon alpha-2b on barrier function and junctional complexes of renal proximal tubular LLC-PK1 cells. *Kidney Int*. 55, 2178-2191.
- Lechner, J., Malloth, N., Seppi, T., Beer, B., Jennings, P., Pfaller, W., 2008. IFN-alpha induces barrier destabilization and apoptosis in renal proximal tubular epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol*. 294, C153-160.
- Li, Z. L., Strunk, J. J., Lamken, P., Piehler, J., Walz, T., 2008. The EM structure of a type I interferon-receptor complex reveals a novel mechanism for cytokine signaling. *J Mol Biol*. 377, 715-724.
- Luccio-Camelo, D. C., Prins, G. S., 2011. Disruptor of androgen receptor signaling in males by environmental chemicals. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 127, 74-82.
- Mageed, N. A., Hassan, E., Hegazy, A., Wahab, N. M. A., Ismail, S. A., 2005. Reproductive effects of human interferon-alpha-2b administration on male albino mice testes. An experimental study. *Egypt J Hosp Med*. 19, 67-78.
- Mortimer, D., Pandya, I. J., Sawers, R. S., 1986. Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro. *J Reprod Fertil*. 78, 93-102.
- Oatley, J. M., Brinster, R. L., 2012. The germline stem cell niche unit in mammalian testes. *Physiol Rev*. 92, 577-595.
- Perreault, S. D., Cancel, A. M., 2001. Significance of incorporating measures of sperm production and function into rat toxicology studies. *Reproduction*. 121, 207-216.
- Randall, R. E., Goodbourn, S., 2008. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol*. 89, 1-47.
- Robaire, B., Hinton, B. T., Orgebin-Crist, Marie-Claire, 2006. The epididymis. In: Neill, J. D. (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Elsevier, 1071-1148.
- Robb, G. W., Amann, R. P., Killian, G. J., 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adults rats. *J Reprod Fert*. 54, 103-107.
- Seed, J., Chapin, R. E., Clegg, E. D., Dostal, L. A., Foote, R. H., Hurtt, M. E., Klinefelter, G. R., Makris, S. L., Perreault, S. D., Schrader, S., Seyler, D., Sprando, R., Treinen, K. A., Veeramachaneni, D. N. R., Wise, L. D., 1996. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: A consensus report. *Reprod Toxicol*. 10, 237-244.

Smith, L. B., Walker, W. H., 2014. The regulation of spermatogenesis by androgens.
Semin Cell Dev Biol. 2,.

Table 1. Body, absolute and relative of reproductive organ weights.

Variable Analyzed	Experimental Groups		
	Control	IFN5	IFN10
<i>Absolute Weights</i>			
Body (g)	460.05 ± 10.00	471.45 ± 12.22	467.73 ± 21.76
Testis (g)	1.78 ± 0.07	1.76 ± 0.05	1.72 ± 0.05
Epididymis (mg)	684.43 ± 17.55	687.21 ± 9.96	648.05 ± 12.11
Full seminal vesicle (mg)	1408.9 ± 96.82	1424.4 ± 56.76	1330.0 ± 35.03
Empty seminal vesicle (mg)	517.84 ± 32.06	543.74 ± 25.30	484.79 ± 19.93
Prostate (mg)	545.47 ± 19.99	621.14 ± 23.84	584.26 ± 29.63
<i>Relative Weights</i>			
Testis (g/100g)	0.39 ± 0.02	0.38 ± 0.02	0.37 ± 0.01
Epididymis (mg/100g)	149.54 ± 5.32	146.54 ± 3.92	140.92 ± 6.04
Full seminal vesicle (mg/100g)	306.91 ± 20.29	266.99 ± 31.40	263.69 ± 33.04
Empty seminal vesicle (mg/100g)	112.45 ± 6.34	116.71 ± 8.03	105.67 ± 6.15
Prostate (mg/100g)	118.99 ± 4.66	131.83 ± 4.25	127.87 ± 9.15

Values expressed as mean ± S.E.M, $p > 0.05$. ANOVA followed by Tukey, N=10.

Table 2. Testis and epididymis sperm count and sperm transit time through the epididymis.

Variable Analyzed	Experimental Groups		
	Control	IFN5	IFN10
<i>Sperm Counts In The Testis</i>			
Mature Spermatids (x10 ⁶ /testis)	257.87 ± 8.10	257.55 ± 9.05	257.37 ± 7.51
Mature Spermatids (x10 ⁶ /g/testis)	157.28 ± 6.62	160.36 ± 4.11	161.90 ± 4.60
Daily Sperm Production (x10 ⁶ /testis)	42.27 ± 1.33	42.22 ± 1.48	42.19 ± 1.23
Daily Sperm Production (x10 ⁶ /g/testis)	25.79 ± 1.09	26.29 ± 0.68	26.54 ± 0.75
<i>Sperm Counts In The Epididymis</i>			
<i>Caput/Corpus</i>			
Sperm count (x10 ⁶ /testis)	148.38 ± 7.73	139.35 ± 8.34	136.61 ± 6.75
Sperm count (x10 ⁶ /g/testis)	382.02 ± 12.61	383.79 ± 19.50	378.55 ± 14.00
Sperm transit time (days)	3.54 ± 0.21	3.30 ± 0.15	3.25 ± 0.16
<i>Cauda</i>			
Sperm count (x10 ⁶ /testis)	264.38 ± 14.94	238.13 ± 11.84	236.77 ± 6.35
Sperm count (x10 ⁶ /g/testis)	976.76 ± 30.10	960.99 ± 39.61	966.04 ± 26.76
Sperm transit time (days)	6.33 ± 0.46	5.69 ± 0.33	5.66 ± 0.24

Values expressed as mean ± S.E.M., $p > 0.05$. ANOVA followed by Tukey, N=10.

Table 3. Sperm morphology.

Variable Analyzed (%)	Experimental Groups		
	Control	IFN5	IFN10
Normal Sperm	96.75 (95.50 - 98.25)	96.00 (95.00 - 97.63)	96.00 (94.00 - 96.63)
Sperm with abnormal head	3.00 (1.75 - 4.00)	3.50 (1.00 - 5.25)	3.00 (2.00 - 5.00)
Sperm with Abnormal cauda	3.50 (2.00 - 5.25)	4.00 (3.00 - 5.25)	5.00 (3.75 - 7.00)
Absence of cytoplasmatic droplet	71.00 (65.88 - 73.88)	66.75 (59.25 - 74.63)	65.00 (61.00 - 74.38)

Values expressed as median (1° quartile - 3° quartile), $p > 0.05$. Kruskal-Wallis followed by Dunn's, N=10.

Table 4. Morphometric analysis.

Variable Analyzed	Experimental Groups		
	Control (n=10)	IFN5 (n=9)	IFN10 (n=10)
<i>Stages of the germinal epithelium</i> ¹			
I- VI	32.50 (29.00 - 35.00)	29.00 (26.50 - 36.50)	30.00 (28.00 - 33.75)
VII-VIII	36.50 (31.50 - 39.25)	41.00 (36.00 - 47.50)	40.00 (38.25 - 45.00)
IX-XIII	28.50 (25.00 - 30.25)	25.00 (21.00 - 27.00)	25.00 (19.75 - 27.25)
XIV	3.50 (3.00 - 4.25)	3.00 (3.00 - 4.00)	3.50 (2.00 - 5.25)
<i>Morphometry (μm)</i> ²			
Tubular diameter	275.6 ± 3.65	271.8 ± 5.22	275.3 ± 4.86
Epithelium height	92.34 ± 1.59	88.29 ± 1.79	89.98 ± 1.65

¹Values expressed as median (1° quartile - 3° quartile), $p > 0.05$. Kruskal-Wallis followed by Dunn's.

²Values expressed as mean $\pm$ S.E.M., $p > 0.05$. ANOVA followed by Tukey.

Legends of Figures

Figure 1. Serum testosterone level of males control and IFN α groups.

Values expressed as mean $\pm$ S.E.M., $p > 0.05$. ANOVA followed by Tukey, N=10.

Figure 2. Sperm motility. Type A: sperm motile (A), with progressive movement; Type B: sperm motile, without progressive movement (B); Type C: sperm immotile (C).

Values expressed as median (1° quartile - 3° quartile), $p > 0.05$. Kruskal-Wallis followed by Dunn's, N=10.

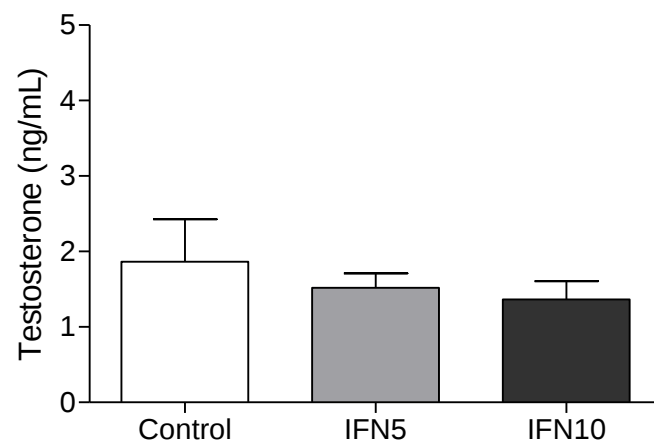


Figure 1.

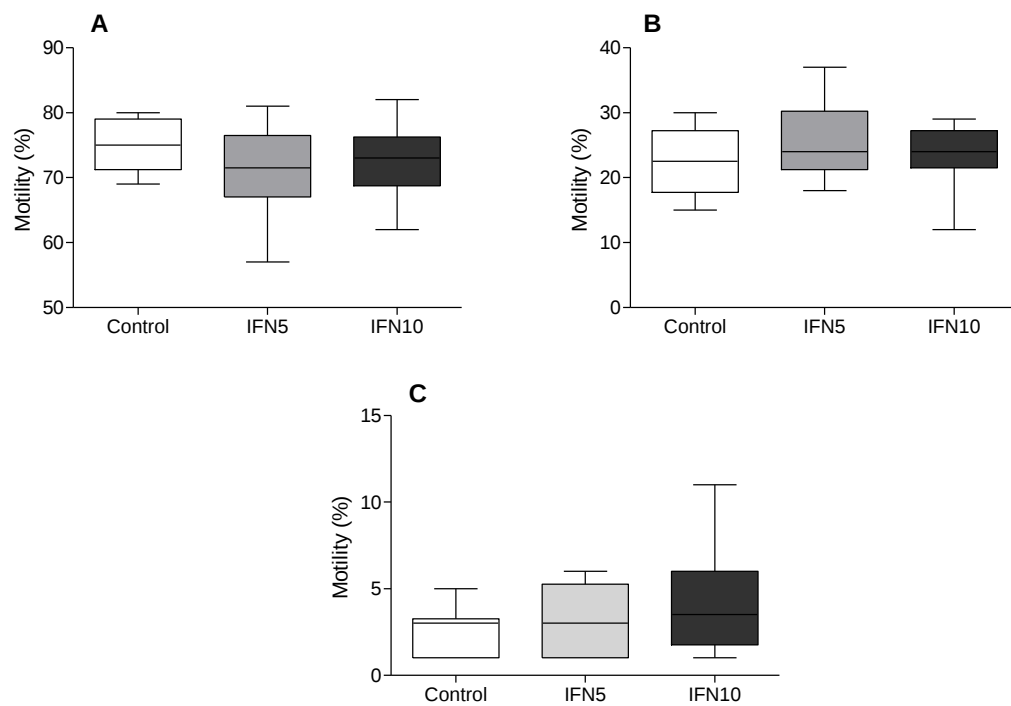


Figure 2.

Conclusões

A exposição subcrônica ao IFN- α não foi deletéria para a qualidade espermática e capacidade fértil de ratos adultos, corroborando com a ausência de danos sobre as concentrações séricas de testosterona, sugerindo ausência de desregulação endócrina devido ao tratamento.

*Referências
Bibliográficas*

- ANDRADE, L. J. O. Interferon-alpha: an endocrine disruptor?. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v.56, p.72-73, 2012.
- BARRECA, T.; PICCIOTTO, A.; FRANCESCHINI, R.; VARAGONA, G.; GARIBALDI, A.; VALLE, F.; CATALDI, A.; D'AGOSTINO, S.; ROLANDI, E. Sex hormones and sex hormone-binding globulin in males with chronic viral hepatitis during recombinant interferon-alpha 2b therapy. *Journal of Interferon Research*, v.13, p.209-211, 1993.
- BAZHANOVA, E. D. Participation of interferon-alpha in regulation of apoptosis. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, v.41, p.127-133, 2005.
- BRIERLEY, M. M.; FISH, E. N. IFN- α/β receptor interactions to biologic outcomes: understanding the circuitry. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, v.22, p.835-845, 2002.
- BROJENI, P. Y.; MATOK, I.; BOURNISSEN, F. G.; KOREN, G. A Systematic review of the fetal safety of interferon alpha. *Reproductive Toxicology*, v.33, p.265-268, 2012.
- CHAN, W. B.; CHOW, C. C.; COCKRAM, C. S. Interferon alpha treatment and endocrine disease. *Journal of the Royal Society of Medicine*, v.96, p.481-485, 2003.
- CHEN, JIABING; BAIG, EHTESHAM; FISH, E. N. Diversity and relatedness among the type I interferons. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, v.24, p.687-698, 2004.
- CORSSMIT, E. P. M.; METZ, J.; SAUERWEIN, H. P.; ROMIJN, J. A. Biologic responses to IFN- α administration in humans. *Journal of Inteferon and Cytokine Research*, v.20, p.1039-1047, 2000.
- DEJUCQ, N.; LIENARD, MARIE-ODILE; GUILLAUME, E.; DORVAL, I.; JÉGOU, B. Expression of interferons- α and - γ in testicular interstitial tissue and spermatogonia of the rat. *Endocrinology*, v.139, p.3081-3087, 1998.
- DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. *Chest Journal*, v.118, p.503-508, 2000.
- FOSE, S.; SCHACHER, A.; WEYER, K. A.; BRUGGER, D.; DIETEL, E.; MARTI, S.; SCHREITMÜLLER, T. Isolation, structural characterization, and antiviral activity of positional isomers of monopegylated interferon α -2a (PEGASYS). *Protein Expression and Purification*, v.30, p.78-87, 2003.
- GEORGE, P. M.; BADIGER, R.; ALAZAWI, W.; FOSTER, G. R.; MITCHELL, J. A. Pharmacology and therapeutic potential of interferons. *Pharmacology & Therapeutics*, v.135, p.44-53, 2012.
- GONZÁLES-NAVAJAS, J. M.; LEE, J.; DAVID, M.; RAZ, E. Immunomodulatory functions of type I inteferons. *Nature Reviews Immunology*, v.12, p.125-135, 2012.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Tratado de fisiologia médica*. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. pp.1115.

- HEDGER, M. P.; MEINHARDT, A. Cytokines and the immune-testicular axis. *Journal of Reproductive Immunology*, v.58, p.1-26, 2003.
- HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocrine Reviews*, v.23, p.175-200, 2002.
- HIBI, H.; YOKOI, K.; YAMAMOTO, M. Effects of α -interferon on sperm production, concentration, and motility in the rat. *International Journal of Urology*, v.4, p.603-607, 1997.
- ISAACS, B. A.; LINDENMANN, J. Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, v.147, p.258-267, 1957.
- KARTAL, E. D.; ALPAT, S. N.; OZQUNES, I.; USLUER, G. Adverse effects of high-dose interferon-alpha-2a treatment for chronic hepatitis B. *Advances in Therapy*, v.24, p.963-971, 2007.
- KRAUS, M. R.; SCHAFER, A.; BENTONK, T.; SCHEURLLEN, M.; WEISSBRICH, B.; AL-TAI, O.; SEUFERT, J. Sexual dysfunction in males with chronic hepatitis C and antiviral therapy: interferon-induced functional androgen deficiency or depression?. *Journal of Endocrinology*, v.185, p.345-352, 2005.
- LECHNER, J.; KRALL, M.; NETZER, A.; RADMAYR, C.; RYAN, M. P.; PFALLER, W. Effects of interferon α -2b on barrier function and junctional complexes of renal proximal tubular LLC-PK1 Cells. *Kidney International*, v.55, p.2178-2191, 1999.
- LI, Z.; STRUNK, J. J.; LAMKEN, P.; PIEHLER, J.; WALZ, T. The EM structure of a type I interferon-receptor complex reveals a novel mechanism for cytokine signaling. *Journal of Molecular Biology*, v.28, p.715-724, 2008.
- LUCCIO-CAMELO, D. C.; PRINS, G. S. Disruptor of androgen receptor signaling in males by environmental chemicals. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v.127, p.74-82, 2011.
- MAGEED, N. A.; HASSAN, E.; HEGAZY, A.; WAHAB, N. M. A.; ISMAIL, S. A. Reproductive effects of human interferon-alpha-2b administration on male albino mice testes. An experimental study. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, v.19, p.67-78, 2005.
- MORALES, A.; BUVAT, J.; GOOREN, L. J.; GUAY, A. T.; KAUFMAN, J. M.; TAN, H. M.; TORRES, L. O. Endocrine aspects of sexual dysfunction in men. *Journal of Sexual Medicine*, v.1, p.69-81, 2004.
- NOHYNEK, G. J.; BORGERT, C. J.; DIETRICH, D.; ROZMAN, K. K. Endocrine disruptor: fact or urban legend?. *Toxicology Letters*, v.223, p.295-305, 2013.
- O'BRIEN, T. R. Interferon-alfa, interferon-lambda and hepatitis C. *Nature Genetics*, v.10, p.1048-1050, 2009.

- ORAVA, M.; CANTELL, K.; VIHKO, R. Treatment with preparations of human leukocyte interferon decreases serum testosterone concentrations in men. *International Journal of Cancer*, v.38, p.295-296, 1986.
- PESTKA, S. The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *The Journal of Biological Chemistry*, v.282, p.20047-20051, 2007.
- PESTKA, S.; KRAUSE, C. D.; WALTER, M. R. Interferons, interferon-like cytokines and their receptors. *Immunological Reviews*, v.202, p.8-32, 2004.
- PFEFFER, L. M.; DINARELLO, C. A.; HERBERMAN, R. B.; WILLIAMS, B. R. G.; BORDEN, E. C.; BORDENS, R.; WALTER, M. R.; NAGABHUSHAN, T. L.; TROTTA, P. P.; PESTKA, S. Biological properties of recombinant α -interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. *Cancer Research*, v.58, p.2489-2499, 1998.
- PIAZZA, M.; TOSONE, G.; BORGIA, G.; ORLANDO, R.; FENZI, G.; VITALE, M.; BLOISE, A.; MARIANO, A.; MACCHIA, V. Long-term interferon-alpha therapy does not affect sex hormones in males with chronic hepatitis C. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, v.17, p.525-529, 1997.
- RANDALL, R. E.; GOODBOURN, S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology*, v.89, p.1-47, 2008.
- SCHMIDT, J.; PETERLIN-MASIC, L. Organic synthetic environmental endocrine disruptors: structural classes and metabolic fate. *Acta Chimica Slovenica*, v.59, p.722-738, 2012.
- SPRITZER, P. M.; REIS, F. M. Sistema reprodutor masculino. In: AIRES, M.M. *Fisiologia*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. pp.
- STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. *Dukes Fisiologia dos animais domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 603-617.
- TAKAOKA, A.; YANAI, H. Interferon signalling network in innate defence. *Cellular Microbiology*, v.8, p.907-922, 2006.
- WHELOCK, E. F. Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science*, v.149, p.310-311.
- WHO - World Health Organization. Hepatitis C, 2013. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>>. Acesso em 15.11.2013

Spêndices

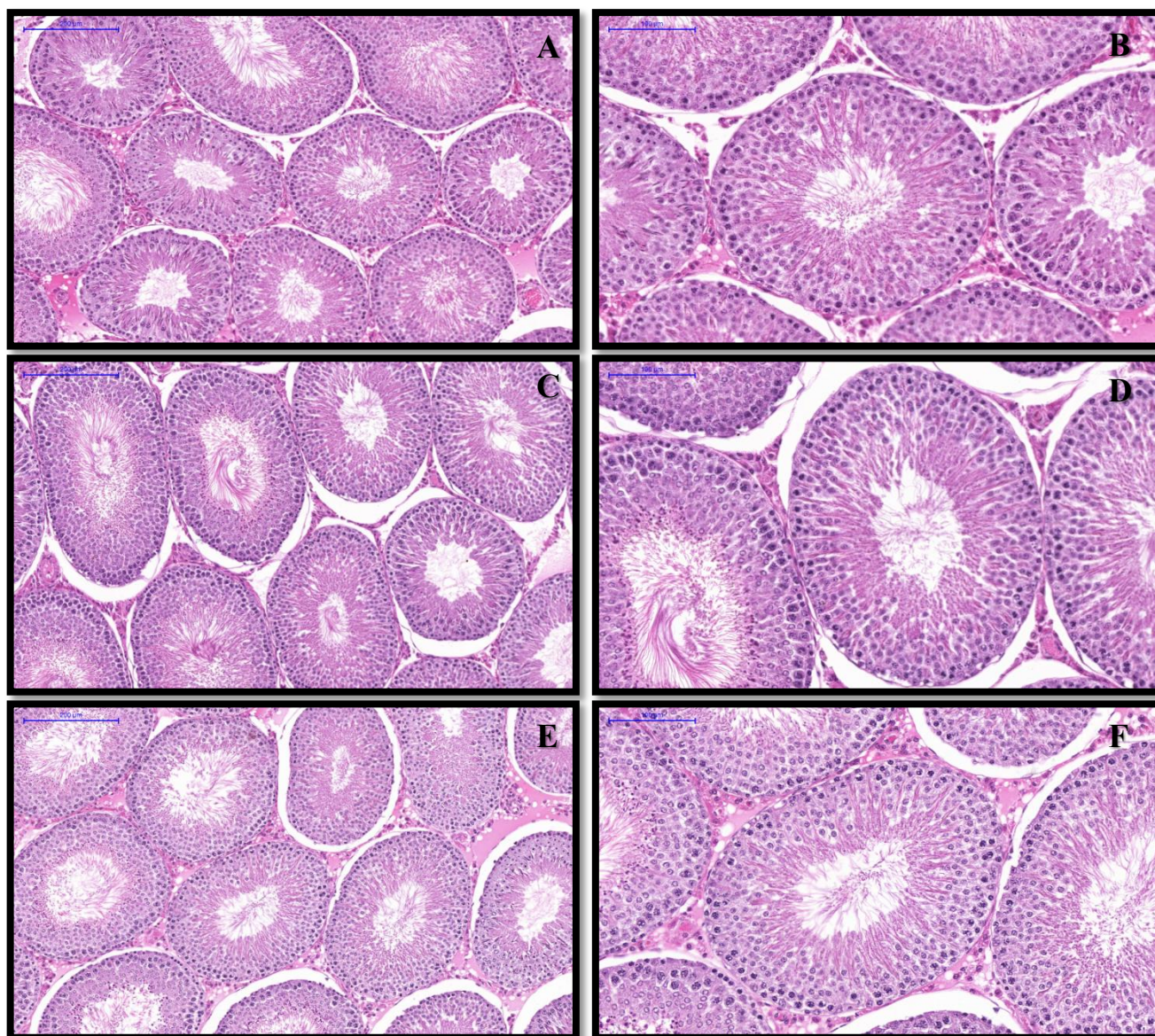


Figura 1. Fotomicroscopia de luz de secção transversal de testículo de rato Wistar, corado pela técnica de eosina-hematoxilina (H&E). **A-B:** Controle; **C-D:** IFN5; **E-F:** IFN10. Magnitude: 100X (A, C e E); 200X (B, D e F).

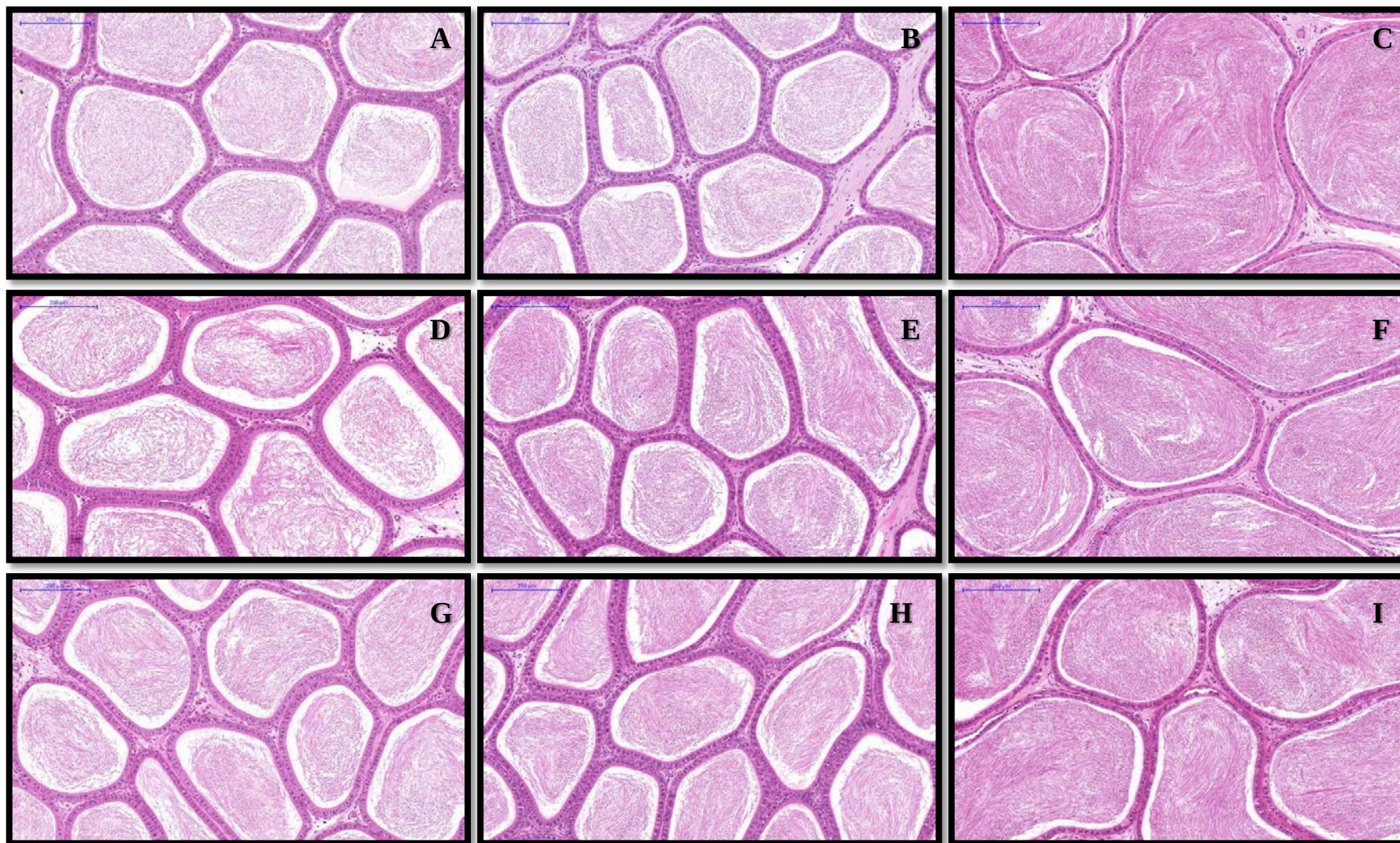


Figura 2. Fotomicroscopia de luz de secção longitudinal de epidídimo de rato Wistar, corado pela técnica de eosina-hematoxilina (H&E). **A-C:** Controle; **D-F:** IFN5; **G-I:** IFN10. Cabeça (A, D e G); Corpo (B, E e H) Cauda distal (C, F e I). Magnitude: 100X.

Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Certificado

Certificamos que o Protocolo nº 425-CEUA, sobre "Efeitos do Interferon Alfa sobre Parâmetros Reprodutivos de Ratos Machos, com Ênfase sobre Aspectos Moleculares das Barreiras Hemato-Testicular e Hemato-Epididimária", sob a responsabilidade de **Wilma De Grava Kempinas**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado "Ad referendum" da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Botucatu, 29 de agosto de 2012.


Prof.ª Dr.ª Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro
Presidente da CEUA

Instituto de Biosciências - Diretoria Técnico Acadêmica
Distrito de Roberto Júnior s/n CEP 18618-970 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3811 6013/6014 Fax 14 3815 3744 e-mail: dta@ibbunesp.br