

**BRUNA MORAES ARAÚJO**

**MORFOMETRIA TESTICULAR EM RATOS WISTAR ADULTOS  
TRATADOS COM PARACETAMOL (ACETAMINOFENO).**

**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  
2008**

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

T

A663m  
2008

Araújo, Bruna Moraes, 1978-  
Morfometria testicular em ratos wistar adultos tratados  
com paracetamol (Acetaminofeno) / Bruna Moraes Araújo.  
– Viçosa, MG, 2008.  
xi, 58f.: il. ; 29cm.

Orientador: Tarcisio Antônio Rego de Paula.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Testículos - Efeito na reprodução de ratos.  
2. Toxicologia reprodutiva. 3. Paracetamol.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.


CDD 22.ed. 573.655

**BRUNA MORAES ARAÚJO**

**MORFOMETRIA TESTICULAR EM RATOS WISTAR ADULTOS  
TRATADOS COM PARACETAMOL (ACETAMINOFENO).**

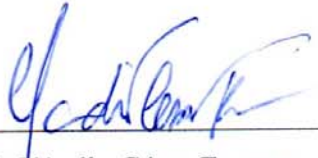
Dissertação apresentada  
à Universidade Federal de  
Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
graduação em Biologia Celular  
e Estrutural, para obtenção do  
título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de abril de 2008



---

Prof. Sérgio Luís Pinto da Matta  
(Co-orientador)



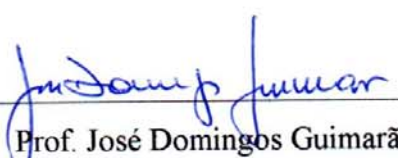
---

Prof. Cláudio César Fonseca  
(Co-orientador)




---

Prof.ª Izabel Regina Santos Costa Maldonado



---

Prof. José Domingos Guimarães



---

Prof. Tarcízio Antônio Rego de Paula  
(Orientador)

**Dedico este trabalho aos meus pais, ao Jorge e à Tati.**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Viçosa e ao curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela contribuição para a minha capacitação profissional.

Ao meu orientador, professor Tarcízio Antônio Rego de Paula, exemplo de amor e dedicação à profissão, pelo auxílio imprescindível na realização deste trabalho.

Ao co-orientador Sérgio Luís Pinto da Matta, professor admirado e querido, pela imensa colaboração em todas as etapas desta pesquisa.

Ao co-orientador Cláudio César Fonseca, pela oportunidade concedida para o aprendizado de técnicas histológicas e pelas correções da dissertação.

Aos professores Izabel Regina Santos Maldonado e José Domingos Guimarães pela participação como membros da banca examinadora e pelas valiosas correções e sugestões.

Às colaboradoras deste trabalho, Ana Paula Florentino e Pamella Campos, pela amizade e participação fundamental no processamento e na análise do material histológico. Ao Luiz Chieregatto, pelas soluções apresentadas para as análises morfométricas. Às colegas Dani Morais e Maitê Koch e às estagiárias Mônica Oliveira e Dani Soares, pelo auxílio no tratamento dos animais. Ao Marcos de Lucca, pelo incentivo para meu ingresso no programa de mestrado. Aos demais colegas do laboratório, pela cooperação e pela boa convivência.

Aos professores do laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV: Sérgio, Izabel, Lino, Clóvis e Adilson por toda colaboração e todo conhecimento compartilhado.

Aos demais professores dos departamentos de Biologia Geral e de Veterinária, pelas contribuições nas disciplinas lecionadas no programa de mestrado.

Às funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Geral: Beth, Diana, Salvadora e Rose, pela solicitude em quaisquer circunstâncias.

Aos meus dedicados pais, pelos valores transmitidos aos filhos, pelo apoio contínuo, e por nos oferecerem todas as condições para crescimento profissional.

Ao Jorge, por seus cuidados, companheirismo, incentivo, paciência e bom humor.

Aos meus irmãos, pela força, amizade e carinho, meus sobrinhos, João Pedro e Lucas, pelas alegrias que nos transmitem, e aos familiares, pelo espírito de união.

A todos os meus amigos, em especial à Mônica, Dé, Cris, Drê, Kris, Regis e Manu que me acolheram em Viçosa, e à Clarisse que sempre se fez presente mesmo estando distante.

Aos meus xodós Zeca, Bartô e Fred, porque cachorro (e gato) é tudo de bom!

A Deus, por tudo acima...

## SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO GERAL	3
1-Paracetamol	3
1.1- Classificação farmacológica	3
1.2- Histórico	3
1.3- Propriedades farmacologias e uso terapêutico	4
1.4- Farmacocinética e metabolismo	5
1.5- Mecanismo de ação	6
1.6-Toxicidade	7
2-Testículo	10
3-Espermatogênese	11
4-Células de Leydig	12
OBJETIVOS	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
EFEITO TARDIO DO USO PROLONGADO DE DOSES TERAPÊUTICA E SUPRATERAPÊUTICA DE PARACETAMOL (ACETAMINOFENO) SOBRE PARÂMETROS TESTICULARES DE RATOS WISTAR ADULTOS – Resumo	27
LATE EFFECT OF CHRONICAL USE OF THERAPEUTIC AND SUPRATHERAPEUTIC PARACETAMOL (ACETAMINOPHEN) DOSES OVER TESTICLE PARAMETHODS IN ADULT WISTAR RATS – Abstract	28
1- Introdução	29
2- Material e métodos	30
2.1- Animais, Grupos Experimentais e Tratamento	30
2.2- Coleta de amostras	31
2.3-Processamento do material para análise histológica	31
2.4-Proporções volumétricas (%) e volume dos componentes do testículo	31
2.5 - Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos	32
2.6 - Índice Gonadossomático e Tubulossomático.	32
2.7- Análises estatísticas	33

3- Resultados	33
4- Discussão	35
5- Conclusão	38
6- Referências Bibliográficas	38
MORFOMETRIA DO COMPARTIMENTO INTERTUBULAR DE RATOS WISTAR ADULTOS SUBMETIDOS A TRATAMENTO CRÔNICO COM PARACETAMOL (ACETAMINOFENO) – Resumo	43
INTERTUBULAR COMPARTIMENT MORPHOMETRY FROM ADULT WISTAR RATS SUBMITTED TO PARACETAMOL (ACETAMINOPHEN) CHRONICAL TREATMENT – Abstract	44
1- Introdução	45
2- Material e métodos	46
2.1- Animais, Grupos Experimentais e Tratamento	46
2.2- Coleta de amostras	46
2.3-Processamento do material para análise histológica	47
2.4-Proporções volumétricas (%) e volume dos elementos do intertúbulo	47
2.5- Diâmetro do núcleo da célula de Leydig., volume de 1 célula de Leydig, número total de células de Leydig, número de células de Leydig por grama de testículo	47
2.6- Índice Leydigossomático e índice somático das glândulas vesiculares	48
2.7- Análises estatísticas	48
3- Resultados	48
4- Discussão	51
5- Conclusão	53
6- Referências Bibliográficas	53
CONCLUSÕES GERAIS	57

## RESUMO

ARAÚJO, Bruna Moraes, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, abril de 2008. **Morfometria testicular em ratos wistar adultos tratados com paracetamol (acetaminofeno)**. Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula. Co-orientadores: Sérgio Luís Pinto da Matta e Cláudio César Fonseca.

O paracetamol é um analgésico e antipirético de venda livre considerado seguro e bem tolerado em doses terapêuticas, mas pode causar danos hepáticos e extrahepáticos em modelos animais e humanos expostos a altas doses. A administração de doses supraterapêuticas de paracetamol tem sido relacionada a lesões testiculares e alteração do comportamento sexual em modelos animais. Neste estudo, avaliou-se o efeito do uso crônico de paracetamol em doses terapêuticas e supraterapêuticas sobre a biometria corporal e testicular e sobre os compartimentos tubular e intertubular dos testículos de ratos Wistar em idade reprodutiva. Utilizou-se 35 ratos, divididos em cinco grupos com sete animais: o grupo um (controle), recebeu solução oral de xarope de frutose; os grupos dois e quatro receberam doses diárias de 57mg de paracetamol em solução oral (xarope de frutose); e os grupos três e cinco, receberam doses de 114mg do mesmo. Após 53 dias de tratamento, os grupos um, dois e três foram eutanasiados, enquanto os grupos quatro e cinco foram mantidos por mais 53 dias, recebendo apenas água e ração. O tratamento crônico com paracetamol causou redução do índice gonadossomático (IGS), da altura do epitélio seminífero e do índice tubulossomático (ITS), independentemente da dose utilizada, porém apenas em animais sacrificados 53 dias após o término do tratamento. Houve, ainda, redução significativa, também tardia, do volume dos túbulos seminíferos, da massa total do testículo, da massa do parênquima testicular, do volume do tecido conjuntivo, do volume do núcleo de células de Leydig, do diâmetro do núcleo de células de Leydig, do índice Leydigossomático e do índice somático das glândulas vesiculares nos animais do grupo tratado cronicamente com paracetamol em doses supraterapêuticas. Os dados acima sugerem que o uso crônico do paracetamol possa afetar tardiamente a produção espermática, independentemente da dose, e a produção de andrógenos pelas células de Leydig, em doses supraterapêuticas.

## ABSTRACT

ARAÚJO, Bruna Moraes, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, april, 2008.  
**Testis Morphometry in adult Wistar rats treated with acetaminophen.** Adviser:  
Tarcízio Antônio Rego de Paula. Coadvisers: Sérgio Luís Pinto da Matta and Cláudio  
César Fonseca.

Acetaminophen is non-prescription analgesic and antipyretic considered safe and well tolerated in therapeutics doses, but it might cause hepatic and extrahepatic damage in animal and human models exposed to high doses. The chronic use of paracetamol in supratherapeutics doses has been implied in testicular lesions and sexual behavior alterations in animal models. In this study, the effect of chronic use of therapeutics and supratherapeutics doses of acetaminophen over corporal and testis biometry and tubular and intertubular compartments in Wistar rats on reproductive age was evaluated. Thirty five rats were used, divided into five groups with seven animals each: group one (control) received fructose syrup oral solution; animals from groups two and four received daily doses of acetaminophen 57 mg/kg diluted in fructose syrup oral solution; groups three and five received 114 mg/kg doses of the same. After fifty three days of treatment, groups one, two and three were euthanized, while groups four and five were kept for another fifty three days, receiving just water and ration. The chronic treatment with acetaminophen caused reduction of testis somatic index, seminiferous epithelium thickness, seminiferous tubule volume, tubule somatic index, independently on used dose, however, only onto animals euthanized fifty three days after the end of the treatment. A significant late reduction was also observed in the seminiferous tubules volume, testicles total mass, testicle parenchyma mass, conjunctive tissue volume, Leydig cell's nucleus volume, Leydig cell's nucleus diameter, leydigosomatic index and somatic index of vesicular glands in the group of animals chronically treated with acetaminophen in supratherapeutic doses. The datas above suggest that the chronic use of acetaminophen may lately affect the spermatic production, independently on used dose, and the androgens production by Leydig cells, in supratherapeutics doses.

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1- Paracetamol

#### 1.1-Classificação farmacológica

De acordo com Brunton *et al.* (2003), o paracetamol pertence à categoria dos antiinflamatórios, analgésicos e antipiréticos, constituída por um grupo heterogêneo de compostos que freqüentemente não estão relacionados sob o ponto de vista químico (apesar da maioria constituir ácidos orgânicos), mas que compartilham algumas ações terapêuticas e efeitos colaterais. O protótipo deste grupo é o ácido acetilsalicílico. Por este motivo, esses compostos são muitas vezes designados como agentes semelhantes ao ácido acetilsalicílico, sendo também freqüentemente denominados antiinflamatórios não esteróides ou AINE. Conforme a classificação química dos AINE, o paracetamol pertence ao grupo dos derivados do p-aminofenol. A sua fórmula química, cuja estrutura molecular está representada na Figura 1, é  $C_8H_9NO_2$  e a massa molar é 151,16g/mol (National Toxicology Program, 1993).

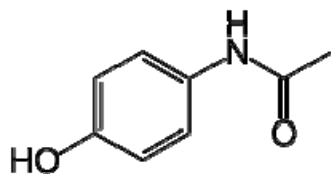


Figura 1- Estrutura molecular do paracetamol.

#### 1.2-História

A acetanilida, membro original dos derivados do p-aminofenol, foi introduzida na medicina em 1886 com o nome de antifebrina e sua ação antipirética foi descoberta acidentalmente. Todavia, a acetanilida demonstrou ser excessivamente tóxica. Na busca de compostos menos tóxicos, outros derivados do p-aminofenol foram testados e um dos mais satisfatórios foi a fenacetina, introduzida para fins terapêuticos em 1887 e extensamente empregada em misturas analgésicas até ser implicada na nefropatia causada por abuso de analgésicos (Brunton *et al.*, 2003).

O paracetamol (acetaminofeno) foi descoberto na Alemanha no final do século XIX, mas a substância não foi amplamente explorada até meados do século XX (Sheen

*et al.*, 2002), quando foi identificada como o metabólito ativo da acetanilida e fenacetina (Booting, 2000). Viu-se então que as atividades analgésicas e antipiréticas do paracetamol eram semelhantes às da fenacetina e da acetanilida, contudo, ao contrário destas duas drogas, não apresentava como efeito tóxico a formação de metahemoglobina (hemoglobina incapaz de transportar oxigênio).

A popularidade do paracetamol como analgésico e antipirético tornou-se marcante a partir 1955 quando foi lançado nos EUA com o nome comercial de Tylenol® (Booting, 2000). Em 1956, os comprimidos de 500 mg de paracetamol foram também colocados à venda no Reino Unido com o nome comercial “Panadol”. Em 1960, foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para venda sem prescrição (National Toxicology Program, 1993). Entre 1960 e 1970, o uso do paracetamol cresceu, enquanto o da aspirina (ácido acetilsalicílico) decresceu (Ivey, 1983), o que pode ser explicado pela maior tolerabilidade ao paracetamol, conforme demonstrado por Moore *et al.* (1999). Atualmente, o paracetamol está disponível no mercado sob diversas formas, tanto em apresentações isoladas quanto em formulações combinadas (Sheen et al, 2002), por exemplo, em associação com fosfato de codeína (Tylex®), com dipirona (Buscopan Plus®), com relaxantes musculares e anti-inflamatórios (Mioflex®, Sedilax®, Tandrilax®).

### *1.3- Propriedades farmacológicas e uso terapêutico*

O paracetamol (acetaminofeno ou N-acetil-aminofeno) apresenta efeitos analgésicos e antipiréticos que não diferem dos efeitos induzidos pelo ácido acetilsalicílico, mas ao contrário deste, não apresenta atividade antiinflamatória apreciável (Brunton *et al.*, 2003) e não exerce atividade gastrotóxica e antiplaquetária (Botting, 2000; Kis *et al.*, 2005). A dose oral convencional de paracetamol é de 350 a 1000mg. A dose terapêutica diária recomendada para o adulto é de 4g (Farrel, 1986).

Pini *et al.* (1997) e Breaver (1998) relataram a eficácia do paracetamol para alívio de dor leve a moderada associada à cirurgia oral, episiotomia, osteoartrite, dismenorréia, dor de cabeça e também ao pós-parto e câncer. O paracetamol tem sido considerado droga de primeira escolha para controle da dor moderada na osteoartrite e em caso de uso prolongado (Zhang *et al.*, 2005), como também, no controle da febre em crianças, uma vez que provê rápida melhora dos sintomas sem apresentar efeitos adversos excessivos (Cranswick & Coghlan, 2000; Gupta *et al.*, 2007).

#### 1.4- Farmacocinética e metabolismo

Brunton *et al.* (2003) descreveram que o paracetamol sofre absorção rápida e quase completa pelo trato gastrointestinal. A concentração plasmática atinge um pico entre 30 e 60min, e a meia-vida plasmática é de cerca de 2 horas após administração de doses terapêuticas. O paracetamol exibe distribuição relativamente uniforme na maioria dos líquidos corporais. A ligação do fármaco a proteínas plasmáticas é variável. Segundo Hinson *et al.* (1982) e Siegers *et al.* (1983), os metabólitos do paracetamol são eliminados primariamente por via urinária, embora uma quantidade substancial seja excretada na bile.

As vias metabólicas do paracetamol em humanos e modelos animais estão representadas na Figura 2, cujos dados foram extraídos dos estudos de National Toxicology Program (1993). Em doses terapêuticas, o paracetamol é eliminado primariamente como conjugados não tóxicos de glucuronida e sulfatos, mas uma pequena proporção do paracetamol é oxidada pelo sistema enzimático citocromo P450 (Hinson, 1980; Brunton *et al.*, 2003). O citocromo P450 converte o paracetamol em um metabólito intermediário altamente reativo, o N-acetil-p-benzo-quinonimina (NAPQI) (Hinson, 1980; Raucy *et al.*, 1989; Patten *et al.*, 1993; Jaeschke *et al.*, 2003; Knight *et al.*, 2003) que normalmente é neutralizado ao se conjugar com a glutatona (Jollow *et al.*, 1973, Hinson, 1980; Brunton *et al.*, 2003). Outras reações metabólicas acontecem nos rins (Fischer *et al.*, 1985) e no intestino (National Toxicology Program, 1993), sendo que a conversão do acetaminofeno em p-aminofenol nos rins é a provável responsável por nefrotoxicidade em altas doses de paracetamol (Rush *et al.*, 1984). Existem ainda vias metabólicas do paracetamol de menor importância que incluem a formação de conjugados *3-hydroxi e 3-methoxy acetaminophen*, identificados em urina de ratos submetidos a doses hepatotóxicas de paracetamol (Forte *et al.*, 1984) e overdose em humanos (Knox & Juran, 1977).

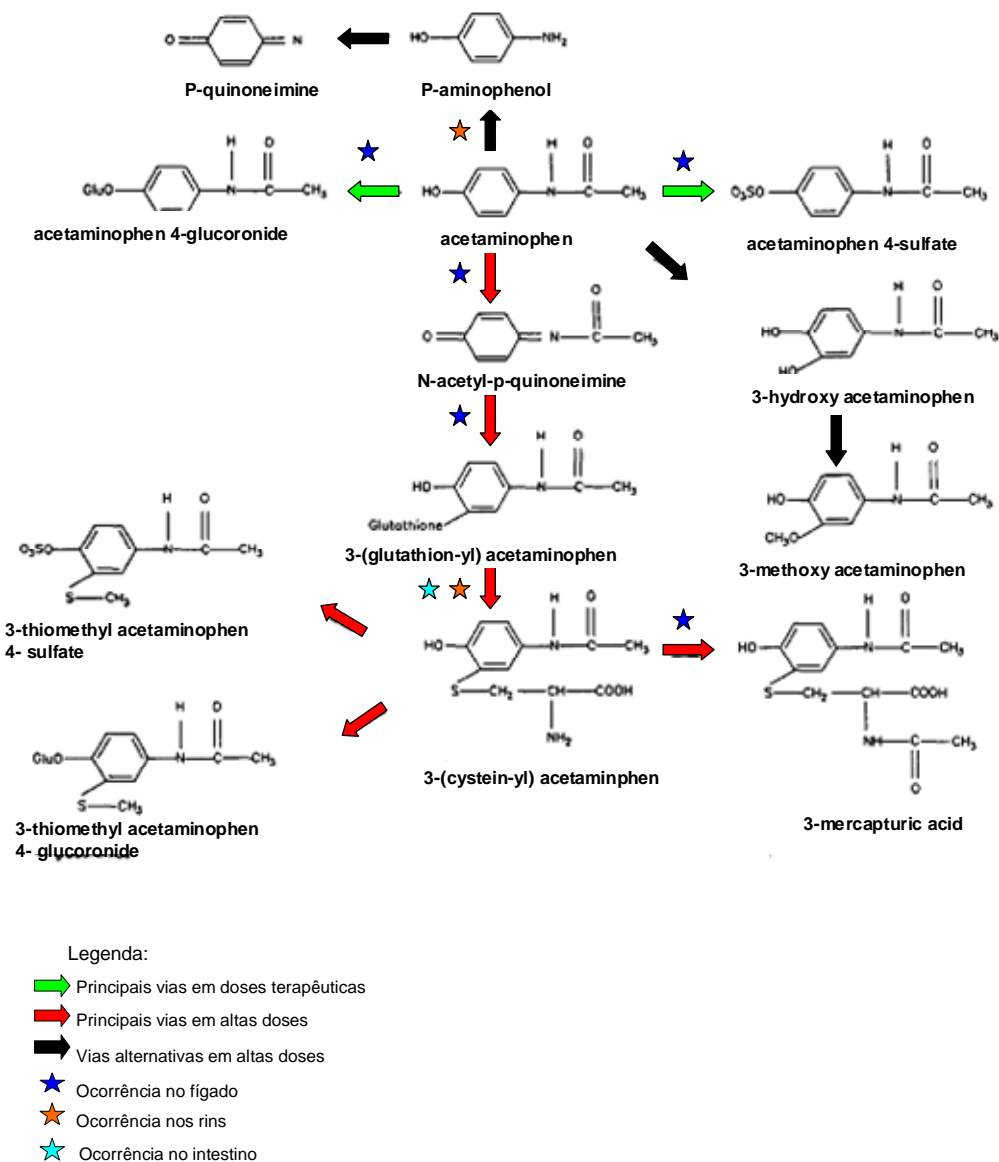


Figura 2- Principais vias metabólicas do paracetamol (segundo National Toxicology Program, 1993).

### 1.5- Mecanismos de ação

Existem evidências de que o paracetamol atue no mecanismo antinociceptivo das vias descendentes serotoninérgicas (Bonfont *et al.*, 2003; Graham & Scott, 2005; Bonfont *et al.*, 2007), o que explicaria os seus efeitos analgésicos. Por outro lado, assim como os demais AINE, o paracetamol também age sobre as ciclooxigenases. São conhecidas duas formas de ciclooxigenases: COX-1 e COX-2. Ambas as enzimas convertem o ácido araquidônico, inicialmente, em intermediários instáveis prostaglandina G2 (PGG2) e prostaglandina H2 (PGH2), os quais são precursores de

todos os isômeros de prostaglandina (PG), como também, da prostaciclina e do tromboxano (Brunton *et al.*, 2003).

A COX-1 é a isoforma constitutiva, encontrada na maioria das células e tecidos normais (Seibert *et al.*, 1997). A COX-2, por sua vez, é uma proteína rara nos tecidos dos mamíferos (Simmons *et al.*, 2000). Dentre seus vários efeitos fisiológicos, a COX-1 induz a síntese de PG, que confere proteção à mucosa gástrica, e a síntese de tromboxanos envolvidos na agregação plaquetária (Brunton *et al.*, 2003). A COX-2 é altamente induzida nos fibroblastos, nos macrófagos, no endotélio vascular e em outros tipos celulares, por uma variedade de estímulos, especialmente em condições de inflamação (Xie *et al.*, 1991; O'Banion *et al.*, 1991), sendo responsável pela síntese de PG relacionadas aos processos febris, no sistema nervoso central, (Simmons *et al.* 2000) e pela síntese de PG relacionada aos processos inflamatórios (Brunton *et al.*, 2003).

Têm sido reportadas evidências de que o paracetamol atue como inibidor da síntese de PG por meio de suas ações sobre a *ciclooxigenase 2* (COX-2), como também, de que os efeitos deste fármaco sejam similares aos dos inibidores seletivos da COX-2. (Graham & Scott, 2005; Kis *et al.*, 2005; Hinz *et al.* 2007). Tal observação permite a compreensão da eficácia do paracetamol como antipirético sem atividade gastrotóxica e antiplaquetária associadas. Por outro lado, a fraca atividade antiinflamatória deste fármaco poderia ser explicada pela redução da sua ação sobre a COX-2 na presença de altas concentrações de peróxidos no tecido, como verificado nas lesões inflamatórias (Botting, 2000; Boutlaud *et al.*, 2002; Brunton *et al.*, 2003; Kis *et al.*, 2005; Schildknecht *et al.*, 2008).

### *1.6-Toxicidade*

O paracetamol tem sido considerado uma droga bem tolerada, sem efeitos colaterais severos ou excessivos (Sheen *et al.*, 2002), no entanto, altas doses agudas do medicamento causam hepatotoxicidade (Savides & Oehme, 1983; Thomas, 1993). O envenenamento por paracetamol tem sido referido como a causa mais comum de falência aguda do fígado nos Estados Unidos e no Reino Unido (O'Grady, 2005; Larson *et al.*, 2005). A hepatotoxicidade por paracetamol parece não envolver somente a administração aguda de altas doses, uma vez que a ingestão diária de 50 a 70mg/kg de paracetamol, de maneira prolongada (semanas a anos), tem sido associada à hepatite

crônica (National Toxicology Program, 1993). Os efeitos deletérios do paracetamol em humanos não se restringem a danos no fígado, visto que insuficiência renal também tem sido documentada nos casos de ingestão de altas doses agudas (Von Mach *et al.*, 2005; Mazer & Perrone, 2008).

Estudos em modelos animais evidenciam diversos efeitos deletérios extrahepáticos da administração de altas doses de paracetamol. Placke *et al.* (1987) reportaram, além de lesões no fígado, alterações degenerativas e necróticas em rins, pulmões, testículos e tecido linfóide de camundongos tratados com doses únicas de 600mg/kg. Nos estudos de National Toxicology Program (1993), ratos tratados durante 13 semanas com cerca de 2g/kg diários de paracetamol apresentaram lesões hepáticas e atrofia testicular, enquanto ratos tratados com cerca de 4g/kg diários apresentaram adicionalmente lesões nos ovário, útero, rim, timo e nódulos linfáticos. Neste mesmo estudo, a exposição a 1g/kg de paracetamol durante 65 semanas, acarretou aumento da incidência de hiperplasia de células foliculares da tireóide em camundongos e aumento da severidade de nefropatia e da incidência de hiperplasia tubular renal e da glândula paratireóide em ratos. Em adição às lesões causadas por altas doses de paracetamol, foi verificado em ratas prenhes que a administração crônica (do 10º dia de gestação ao 13º dia pós parto) de doses terapêuticas (7,3mg/kg 3 vezes ao dia) de paracetamol causa alterações renais histopatológicas (Ucheya & Igweh, 2008).

Poucos estudos foram realizados para investigar primariamente os possíveis efeitos do paracetamol sobre os órgãos reprodutores masculinos. Eldon & Boyd (1970) relataram que a administração de dose única de paracetamol, correspondente a dose letal para 50% da população (LD50), acarretou discretas alterações histopatológicas testiculares (algum grau de congestão dos capilares venosos) em ratos e porcos, enquanto a administração da mesma durante 100 dias resultou em graus variados de atrofia testicular, acompanhada de evidências de prejuízo na espermatogênese em análise histológica, cuja metodologia não foi descrita pelos autores.

Jaqueson *et al.* (1984) demonstraram redução da massa testicular de ratos submetidos à administração de doses diárias de 500mg/kg de paracetamol durante 70 dias. Placke *et al.* (1987) verificaram alterações histopatológicas nos túbulos seminíferos de camundongos, utilizando dose única de 600mg/kg, tais como: degeneração de espermátides, presença de células do epitélio seminífero no lúmen, formação de células gigantes, agregados de material protéico ocluindo a maior parte do lúmen e presença de espermátides arredondadas no epidídimo.

Reel *et al.* (1992) avaliaram a toxicidade do paracetamol sobre a capacidade reprodutiva de camundongos empregando um protocolo de tratamento expondo gerações sucessivas. Camundongos da primeira geração que receberam 1,43g/kg/dia de paracetamol na fase adulta durante 103 dias geraram menor número de descendentes do que o controle. Camundongos da segunda geração, também expostos a 1,43g/kg/dia doses de paracetamol via amamentação, e posteriormente, via alimentação até os 74 dias de idade, apresentaram um percentual de espermatozóides anormais significativamente maior do que o controle.

Wiger (1995) investigou os efeitos do paracetamol sobre os seguintes parâmetros testiculares de camundongos: replicação de DNA nas células germinativas (por análise de incorporação de timidina), biometria testicular; análise histopatológica dos túbulos seminíferos, mensuração de diâmetro de túbulos seminíferos, mensuração do percentual das diferentes populações das células germinativas e análise da estrutura da cromatina do espermatozóide nos ductos deferentes (por meio da mensuração do conteúdo relativo de DNA e RNA pela citometria de fluxo). A administração de 400mg/kg de paracetamol durante cinco dias causou inibição da replicação de DNA, redução da população de espermátocitos primários em paquíteno, redução do diâmetro dos túbulos seminíferos e da massa testicular. Além disso, foi observado aumento da frequência de espermatozóides caracterizados por alterações na estrutura da cromatina, estimadas pelo aumento da suscetibilidade à desnaturação do DNA.

Ratnasooriya & Jayakody (2000) analisaram os efeitos do paracetamol sobre o comportamento sexual e a fertilidade de ratos tratados com doses diárias de 500 a 1000mg/kg durante 30 dias. Ao trigésimo dia de tratamento foi observada redução da libido, do vigor sexual e da performance sexual. A fertilidade também reduziu, porém foi restabelecida ao trigésimo dia após término do tratamento. Houve, ainda, aumento das perdas na pré-implantação, oligospermia, alterações na motilidade e redução do potencial fertilizante do espermatozóide.

Yano & Dolder (2002) investigaram alterações morfológicas no testículo de ratos wistar tratados com doses únicas de 665mg/kg de paracetamol. Análises qualitativas em microscopia de luz e eletrônica foram feitas ao 5º, 10º e 15º dias após tratamento. Foram identificados alguns túbulos seminíferos alterados, como também pequena quantidade de túbulos degenerados. As células de Sertoli encontravam-se fragmentadas. Espermátides morfológicamente alteradas foram observadas retendo

grande volume de citoplasma residual em proporção maior do que no grupo controle. Não foi verificada qualquer recuperação ao 15º dia após o tratamento.

## 2-Testículo

O testículo dos mamíferos é um órgão de forma oval ou arredondada, geralmente localizado no escroto, que apresenta funções exócrina e endócrina. É envolvido pela albugínea, uma espessa cápsula de tecido conjuntivo, que emite septos para o interior do órgão até a região do mediastino testicular, dividindo o testículo em lóbulos. O testículo dos mamíferos pode ainda ser dividido, funcionalmente, em dois compartimentos principais: o compartimento intertubular ou intersticial, também chamado de espaço intertubular, e o compartimento tubular, constituído de túbulos seminíferos (Russell *et al.*, 1990).

O compartimento intertubular contém uma série de elementos, cuja proporção volumétrica é bastante variável entre diversas espécies (Fawcett *et al.*, 1973; França & Russell, 1998; Godinho, 1999). Tais elementos são os vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células de Leydig e uma população celular variável, constituída principalmente de fibroblastos, macrófagos e mastócitos (Russell *et al.*, 1990; Setchell, 1991). A célula de Leydig é, em geral, o tipo celular mais freqüente neste compartimento, sendo que, no período reprodutivo de animais sexualmente maduros, o percentual ocupado por estas células nos testículos pode variar de aproximadamente 1% em carneiros até 35% em capivaras (França & Russell, 1998; Paula *et al.*, 2002).

O compartimento tubular representa a maior parte do testículo, preenchendo de 70 a 90% do parênquima testicular na maioria dos mamíferos estudados (França & Russell, 1998; Godinho, 1999). Constitui-se de túbulos que formam alças bastantes contorcidas que se conectam, através de suas extremidades, à rede testicular, localizada no mediastino testicular, uma região bastante rica em vasos e tecido conjuntivo. A rede testicular continua-se com ductos eferentes que desembocam no epidídimo (Amann, 1970).

Existe grande variação no número e nas dimensões (diâmetro e comprimento) dos túbulos seminíferos nas diferentes espécies de mamíferos (França & Russell, 1998), mas, de maneira geral, grande parte dos mamíferos estudados apresentam cerca de 10 a 15 metros de comprimento de túbulo por grama de testículo e um valor entre 180 a 300µm para o diâmetro tubular (Roosen-Runge, 1977).

Os túbulos seminíferos são constituídos por túnica própria, epitélio seminífero e lume tubular. A túnica própria reveste o túbulo externamente, sendo composta de membrana basal, fibras colágenas e células mióides ou peritubulares, as quais são responsáveis pela movimentação de fluido e propulsão de espermatozóides através do lume tubular (Russell *et al.*, 1990). O epitélio seminífero é formado basicamente por dois tipos celulares: as células germinativas e as células de Sertoli. As células de Sertoli, através de junções de oclusão, dividem o epitélio seminífero em dois compartimentos: o basal, onde se localizam as espermatogônias e os espermatócitos primários na fase inicial da prófase meiótica (pré-leptótenos e leptótenos), e o adluminal, no qual se encontram os espermatócitos primários a partir da fase de zigóteno, os espermatócitos secundários e as espermatídes (Russell *et al.*, 1990). O compartimento adluminal está totalmente sob controle das células de Sertoli, propiciando um micro-ambiente isolado e imunoprivilegiado, essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (Russell *et al.*, 1990; Setchell, 1991; Poccia, 1994; Sharpe, 1994). O lume tubular contém fluido secretado pelas células de Sertoli e espermatozóides recém-espermiados (Setchell, 1991).

### 3-Espermatogênese

A espermatogênese é um processo altamente complexo e bem organizado que ocorre nos túbulos seminíferos e dura de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos (França & Russell, 1998; França *et al.*, 1998; Godinho, 1999). O processo espermatogênico pode ser dividido em três fases, conforme características morfológicas e funcionais: fase proliferativa, caracterizada por várias e sucessivas divisões mitóticas dos diferentes tipos de espermatogônias e a formação dos espermatócitos I; fase meiótica, na qual ocorre a duplicação do DNA, a recombinação gênica e duas divisões reducionais que dão origem, sucessivamente, aos espermatócitos II e às espermatídes; fase de diferenciação, quando as espermatídes arredondadas passam por drásticas alterações morfológicas e funcionais, como a formação do acrossoma e do flagelo, e a condensação nuclear, resultando em uma célula altamente especializada, o espermatozóide (Russell *et al.*, 1990; Sharpe, 1994).

As células germinativas não estão organizadas ao acaso e sim em associações celulares distintas, denominadas estádios. Os estádios celulares podem ser classificados pelo método da morfologia tubular (Berndtson, 1977; França & Russell, 1998), no qual

oito estádios do ciclo são relatados para todas as espécies, ou pelo método do sistema acrossômico (Leblond & Clermont, 1952; Russell *et al.*, 1990), no qual o número de estádios classificados é variável para cada espécie. Os estádios se sucedem com o tempo, de maneira bastante ordenada. O período de tempo em que um dado estágio volta a se repetir em um mesmo segmento de túbulo é referido como um ciclo do epitélio seminífero. A cada ciclo, a célula germinativa apresenta-se em uma fase mais avançada do processo espermatogênico. A duração do ciclo do epitélio seminífero é uma constante biológica espécie-específica e está sob o controle do genótipo da célula germinativa (França *et al.*, 1998). De maneira geral, são necessários em torno de 4,5 ciclos para que o processo espermatogênico se complete, ou seja, para que a partir de uma espermatogônia sejam produzidos espermatozoides (Amann & Schanbacher, 1983; França & Russell, 1998).

Para que o processo espermatogênico transcorra de maneira normal e eficiente, há evidente necessidade da integridade funcional da membrana basal (Dym, 1994), como também da interação das células germinativas com os componentes somáticos do testículo, principalmente células de Sertoli e células de Leydig (Skinner, 1991; Pescovitz *et al.*, 1994; Schalatt *et al.*, 1997; França & Russell, 1998).

#### 4-Células de Leydig

As células de Leydig produzem andrógenos, sintetizados a partir de uma molécula-base, o colesterol (Bardin, 1996), sob o estímulo do LH (hormônio luteinizante) em receptores localizados na membrana plasmática das células de Leydig. Nos mamíferos são responsáveis pela masculinização fetal, pelas características sexuais secundárias e pelo processo espermatogênico (Kerr & Knell, 1988; Kuopio *et al.*, 1989; Huhtaniemi & Pelliniemi, 1992).

O desenvolvimento pós-natal das células de Leydig, processo regulado por hormônios (Ge *et al.*, 1996; Rouiller-Fabre *et al.*, 1998), envolve a proliferação celular, a diferenciação morfológica e a aquisição da capacidade de produção de testosterona. Segundo Ge *et al.* (1996), a proliferação celular é estimulada por células de Sertoli, macrófagos e pelo IGF-1 (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina), o qual também aumenta a sensibilidade das células progenitoras ao LH. Este, por sua vez, está envolvido na diferenciação das células de Leydig. O crescimento da população de

células de Leydig é limitado pelo efeito inibitório do estradiol sobre a proliferação celular.

As células mesenquimais são consideradas as principais precursoras das células de Leydig do tipo adulto (Russell *et al.*, 1995; Ge *et al.*, 1996; Lejeune *et al.*, 1998). Outros tipos celulares do testículo como as células mióides, as células endoteliais dos vasos linfáticos e as células perivasculares (pericitos) também podem dar origem às células de Leydig (De Kretser *et al.*, 1994; Gaytan *et al.*, 1994; Russell *et al.*, 1995; Dombrowicz *et al.*, 1996). Apesar de pouco documentado, ocorrem mitoses de células de Leydig em animais adultos (Russell *et al.*, 1995).

Dentre os andrógenos sintetizados pelas células de Leydig, incluem-se a testosterona e a diidrotestosterona, os quais são responsáveis pela diferenciação do órgãos genitais masculinos e da genitália externa na fase fetal (Pelleniemi *et al.*, 1996), pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários e pela manutenção quantitativa da espermatogênese a partir da puberdade (Sharpe, 1994; Zirkin *et al.*, 1994). A diidrotestosterona é também responsável pela manutenção funcional das glândulas sexuais acessórias e do epidídimo (Luke & Coffey, 1994; Fan & Robaire, 1998; Goyal *et al.*, 1999). Tais andrógenos atuam no testículo em receptores encontrados nas células de Sertoli, células mióides, nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos e na própria célula de Leydig (Schalatt *et al.*, 1997; Suárez-Quian *et al.*, 1998).

De acordo com Bardin *et al.* (1996), além da produção de andrógenos, várias outras substâncias são produzidas pelas células de Leydig. Estas substâncias participam do controle autócrino e parácrino exercido por estas células. As células de Leydig podem influenciar a função das células de Sertoli, tanto em animais imaturos quanto em animais adultos, especificamente por meio de peptídeos derivados da proopiomelanocorticotrofina (POMC). Da mesma forma, as células de Sertoli parecem regular de forma parácrina a população das células de Leydig e a capacidade esteroidogênica das mesmas, por meio da secreção de fatores de crescimento estimulados pelo FSH (Tabone *et al.*, 1984; Waites *et al.*, 1985).

## **OBJETIVOS**

O presente trabalho teve por objetivos verificar os efeitos do uso crônico do paracetamol sobre o testículo de ratos Wistar adultos. Para tal foram avaliados:

- a) Morfometria macro e microscópica dos testículos, incluindo proporções volumétricas entre seus componentes;
- b) Caracterização quantitativa do tecido intertubular;
- c) Cálculo dos índices Gonadossomático, Tubulossomático, Leydigossomático e índice somático das glândulas vesiculares;
- d) Cálculo do diâmetro dos túbulos e da altura do epitélio seminífero;
- e) Cálculo do comprimento do túbulo seminífero, total e por grama de testículo;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN R.P., 1970. Sperm production rates. IN: JOHNSON, A.D., GOMES, W.R. AND VANDEMARK, N.L. (eds). The testis. New York: Academic Press, p. 433-482.
- AMANN R.P. AND SCHANBACHER B.D., 1983. Physiology of male reproduction. *Journal Animal Science*, 57 (2), p.380-403.
- BARDIN C.W., 1996. Androgens: early attempts evaluate to Leydig cell function in man. IN: PAYNE A.H., HARDY M. P. AND RUSSELL L.D. The Leydig Cell. Vienna: Cache River Press, 2, p. 31-42.
- BERNDTSON W.E., 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *Journal of Animal Science* 44 (5), p.818-83.
- BONNEFONT J.D., COURADE J.P., ALLOUI A. AND ESCHALIER A., 2003. Antinociceptive mechanism of action of paracetamol. *Drugs*, 63 (2), p.1-4.
- BONNEFONT J.D., DAULHAC M., ETIENNE E., CHAPUY C., MALLET L., OUCHCHANE C., DEVAL J., COURADE M., FERRARA A. AND ESCHALIER A., 2007. Acetaminophen recruits spinal p42/p44 MAPKs and GH/IGF-1 receptors to produce analgesia via the serotonergic system. *Molecular Pharmacology*, 71(2), p.407-415.
- BOOTING R.M., 2000. Mechanism of action of acetaminophen: is there acycloxygenase 3? *Clinical Infections Diseases*, 31, p.202-210.
- BOUTLAUD O., ARONOFF D.M., RICHARDSON J.H., MARNETT L.J. AND OATES J.A., 2002. Determinants of the cellular specificity of acetaminophen as an inhibitor of prostaglandin H2 syntases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (10), p.7130-7135.

BREAVER W.T., 1998. Impact of non-narcotic oral analgesic on pain management. *The American Journal of Medicine*, 84 (5A), p. 3-15.

BRUNTON L.L., LAZO J.S. AND PARKER K.L., 2003. Goodman & Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica. 10ª ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, seção IV, p.483-551.

CRANSWICK N. AND COGHLAN D., 2000. Paracetamol efficacy and safety in children: the first 40 years. *American Journal of Therapeutics*, 7(2), p.135-41.

DADUONE J.P. AND DEMOULIN A., 1993. Structure and functions of the testis. IN: THIBAUT C., LEVASSEUR M. AND HUNTER R.H.F. (eds). *Reproduction in mammals and man*. Paris : Ellipses, 13, p.227-250.

DE KRETZER M. AND KERR J.B., 1994. The cytology of the testis. IN: KNOBIL E. AND NEIL J.D. (eds.). *The Physiology of Reproduction*. New York: Haven Press, 2(19), 1177-1290.

DIXON R.L. AND LEE I.P., 1980. Pharmacokinetic and adaptation factors involved in testicular toxicity. *Federation Proceedings*, 39, p. 66-73.

DOMBROWICZ D., SENTE B., REITER E., CLOSSET J. AND HENNEN G., 1996. Pituitary control of proliferation and differentiation of Leydig cell and their putative precursors in immature hypophysectomized rat testis. *Journal of Andrology*, 17, p.639-650.

DYM M., 1994. Basement membrane regulation of Sertoli cells. *Endocrine Reviews*, 15, p.102-115.

ELDON M. AND BOYD E. M., 1970. Testicular atrophy from analgesics drugs. *Journal of Clinical Pharmacology*, 10, p. 222-227.

FAN X. AND ROBAIRE B., 1998. Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinology*, 139, p.2128-2136.

FARREL G.C., 1986. The hepatic side effects of drugs. *Medical Journal of Australia*, 145, p.600-604.

FAWCETT D.W., NEAVES W.B. AND FLORES M.N., 1973. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of Reproduction*, 9, p.500-532.

FISCHER L.J., GREEN M.D. AND HARMAN A.W., 1985. Studies on the fate of the glutathione and cysteine conjugates of acetaminophen in mice. *Drug Metabolism and Disposition*, 13, p.121-126.

FORTE A.J., WILSON J.M., STATERRY J.T. AND NELSON S.D., 1984. The formation and toxicity of catechol metabolites of acetaminophen in mice. *Drug Metabolism and Disposition*, 12, p. 484-491.

FRANÇA L.R., PARREIRA G.G., GATES R.J. AND RUSSELL L.D., 1998. Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: quantitation of germ-cell population and effect of elimination of residual testosterone after long-term hypophysectomized. *Journal of Andrology*, 19, p. 335-342.

FRANÇA L.R. AND RUSSELL L.D., 1998. The testis of domestic mammals. IN: MARTINEZ-GARCIA F. AND REGADERA J. (eds) *Male reproduction; a multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Communications Europe España, 16, p.198-219.

GAYTAN F., BELLIDO C., AGUILAR E. AND ROOIJEN N.V., 1994. Requirement for testicular macrophages in Leydig cell proliferation and differentiation during prepubertal development in rat. *Journal of Reproduction and Fertility*, 102, p.393-399.

GE R.S., SHAN R.X. AND HARDY M.P., 1996. Pubertal development of Leydig cell. IN: PAYNE A.H., HARDY M.P., RUSSELL L.D. (eds.). The Leydig cell. Vienna: Cache River Press, 6, p. 159-174.

GODINHO H.P. AND CARDOSO F.M., 1990. Desenvolvimento sexual de porcos Yorkshire. II. Estabelecimento e evolução da espermatogênese. Arquivos da Escola de Medicina Veterinária, UFMG, 31, p.351-361.

GODINHO C.L., 1999. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular)-UFMG, 74p.

GOYAL H.O., WILLIAMS C.S., KHALIL M.K., VIG M.M. AND MALONEY M.A., 1999. Postnatal differentiation of ductus deferens, tail of the epididymis and distal body of epididymis in goats occurs independently of rete testis fluids. Anatomical Records, 254, p.508-520.

GRAHAM G.G. AND SCOTT K.F., 2005. Mechanism of action of paracetamol. American Journal of Therapeutics, 12(1) p.46-55.

GRISWOLD M.D., 1995. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. Biology of Reproduction, 52, p.211-216.

GUPTA H., SHAH D., GUPTA P. AND SHARMA K.K., 2007. Role of paracetamol in treatment of childhood fever: a double-blind randomized placebo controlled trial. Indian Pediatrics., 44(12), p.903-911.

HINSON J.A., 1980. Biochemical toxicology of acetaminophen. IN: HODGSON E., BEND J. AND PHILPOT R. (eds). Reviews in Biochemical. New York, Elsevier 2, p.103-130.

HINSON J.A., MONKS T.J., HONG M., HIGHET R.J. AND POHL L.R., 1982. 3-(Glutathion-S-y1)acetaminophen: A biliary metabolite of acetaminophen. Drug Metabolism and Disposition, 10, p.47-50.

HINZ B., CHEREMINA O. AND BRUNE K., 2007. Acetaminophen (paracetamol) is a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in man. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 22(2), p.383-390.

HUHTANIEMI I. AND PELLINIEMI L.J., 1992. Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span and special functional features. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 201, p.125-140.

IVEY K.J., 1983. Gastrointestinal effects of antipyretic analgesics. *American Journal of Medicine*, 75 (5A), p.53-64.

JAESCHKE H., KNIGHT T. R. AND BAJT M. L., 2003. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicology*, 65, p.166-176.

JAQUESON A. SEMONT H., THEVENIN M., WARNET J.M., PROST R. AND CLAUDE JR., 1984. Effects of daily high doses of paracetamol given orally during spermatogenesis in the rat testes. *Archives of Toxicology Supplement*, 7, p.164-166.

JEGOU B., 1993. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *International Review of Cytology*, 147, p.25-95.

JOLLOU D.J., MITCHELL J.R., POTTER W.Z., DAVIS D.C., GILLETTE J.R. AND BRODIE B.B., 1973. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding in vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 187, p.195-202.

KERR J.B. AND KNELL C.M., 1988. The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal. *Development*, 103, p.535-544.

KIS B. SPINES J.A. AND BUSIJA D.W., 2005. Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315(1), p.1-7.

KNOX J. AND JURAN J., 1977. Determination of paracetamol and its metabolites in urine with high performance liquid chromatography using reverse phase bonded supports. *Journal of Chromatography.*, 142, p.651-670.

KUOPIO T., TAPANAINEN J., PELLINIEMI L.J. AND HUHTANIEMI I., 1989. Developmental stages of fetal-type Leydig cells in prepubertal rats. *Development*, 107, p.213-220.

LARSON A.M., POLSON J. AND FONTANA R.J., 2005. Paracetamol-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology*, 42, p.1364-1372.

LAZEROW S.K., ABDI M.S. AND LEWIS J.H., 2005. Drug-induced liver disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, 21, p. 283-292.

LEBLOND C.P. AND CLERMONT Y., 1952. Definition of stages of the cycle of seminiferous epithelium in the rat. *Annals of New York Academy Science*, 55, p.548-573.

LEJEUNE H., HABERT R. AND SAEZ J.M., 1998. Origin, proliferation and differentiation of Leydig cells. *Journal of Molecular Endocrinology*, 20, p.1-25.

LUKE M.C. AND COFFEY D.S., 1994. The male sex accessory tissue: structure, androgen action and physiology. IN: KNOBIL E., NEIL J.D. (eds.). *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, 1 (23), p.1435-1488.

MAZER M. AND PERRONE J., 2008. Acetaminophen-induced nephrotoxicity: pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Journal Medical Toxicology.*, 4(1), p.2-6.

MOORE N., VANGANSE E., LEPARC J.M., WALL R., SCHNEID H., FARHAN M., VERRIÈRE F. AND PELEN F., 1999. PARACETAMOL, aspirin and ibuprofen study new tolerability. *Clinical Drug Investigation*, 18 (2), p. 89-98.

MUÑOZ E.M., FOGAL T., DOMINGUEZ S., SCARDAPANE L., GUZMAN J., CAVICCHIA J.C. AND PIEZZI R.S., 1998. Stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the viscacha (*Lagostomus maximul maximus*). *Anatomical Records*, 252, p.8-16.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 1993. NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Acetaminophen in F344/N rats and B6C3F1 Mice. National Toxicology Program Technical Reports Series, 394, p.1-274.

O'GRADY J.G., 2005. Acute liver failure. *Postgraduate Medical Journal.*, 81, p.148-54.

O'BANION M.K., SADOWSKI H.B., WINN V. AND YOUNG D.A., 1991. A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. *Journal of Biological Chemistry*, 266, p.23261-23267.

PAULA T.A.R., COSTA D.S. AND MATTA S.L.P., 2002. Avaliação histológica e quantitativa de testículos de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) adultas. *Bioscience Journal*, 18(1), 121-136.

PATTEN C.J., THOMAS P.E., GUY R.L., LEE M., GONZALEZ F.J., GUENGERICH F.P. AND YANG C.S., 1993. Cytochrome P450 enzymes involved in acetaminophen activation by rat and human liver microsomes and their kinetics. *Chemical Research in Toxicology.*, 6, p. 511-518.

PELLINIEMI L.J., KUPIO T. AND FROJDAM K., 1996. The cell biology and functional of fetal Leydig cell. IN : PAYNE A.H., HARDY M.P. AND RUSSELL L.D. (eds). *The Leydig cell*. Viena : Cache river Press, cap 5, p.143-157.

PESCOVITZ O.H., SRIVASTAVA C.H., BREYER P.R. AND MONTS B.A., 1994. Paracrine control of spermatogenesis. *Trends Endocrinology and Metabolism*, 5, p.126-131.

PINI L.A., VITALE G., OTTANI A. AND SANDRINI M., 1997. Naloxone-reversible antinociception by paracetamol in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280, p.934-940.

PLACKE M.E., WYAND D.S. AND COHEN S.D., 1987. Extrahepatic lesions induced by acetaminophen in the mouse. *Toxicologic Pathology*, 15(4), p. 381-387.

POCCIA D., 1994. Molecules of the somatic cell. IN: POCCIA D. (ed). *Molecular biology intelligence unit. Molecular aspects of spermatogenesis*. Austin: R.G. Landes Company, 4, p.75-90.

PRESCOTT L.F., 1983. Paracetamol overdose. Pharmacological considerations and clinical management. *Drugs*, 25, p.290-314.

RATNASOORIYA W.D. AND JAYAKODY J.R.A.C., 2000. Long-term administration of large doses of paracetamol impairs the reproductive competence of male rats. *Asian Journal of Andrology*, 2, p.247-255.

RAUCY J.L., LASKER J.M., LIEBER C.S. AND BLACK M., 1989. Acetaminophen activation by human liver cytochromes P450IIE1 and P450IA2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 271, p.270-283.

REEL J.R., LAWTON A.D. AND LAMB J.C, 1992. Reproductive toxicity of acetaminophen in Swiss CD-1 mice using a continuous breeding protocol. *Fundamental and Applied Toxicology*, 18, p.233-239.

ROOSEN-RUNGE E.C., 1977. *The process of spermatogenesis in animals*. Cambridge: Academic Press, 123p.

ROUILLER-FABRE V., LECERF L., GAUTIER C., SAEZ J.M. AND HABERT R., 1998. Expression and effects of insulin-like growth factor I on rat fetal Leydig cell function and differentiation. *Endocrinology*, 139, p.2926-2934.

RUSH G.F., SMITH J.H., NEWTON J.F. AND HOOK J.B., 1984. Chemically induced nephrotoxicity: Role of metabolic activation. *Critical Review in Toxicology*, 13, p.99-160.

RUSSELL L.D., ETTLIN R.A., SINHA HIKIM A.P. AND CLEGG E.D. Mammalian spermatogenesis, 1990. IN: RUSSELL, L.D, ETTLIN, R.A., HIKIM, A.P. AND CLEGG, E.D. (eds). *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Bolesta: Cache River Press, 1, p.1-40.

RUSSELL L.D., CHANDRASKEKAR V., BARTKE A. AND SINHA-HIKIM A.P., 1994. The hamsters Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. *International Journal of Andrology*, 17(2), p.93-106.

RUSSELL L.D., FRANÇA L.R., HESS R. AND COOKE P., 1995. Characteristics of mitotic cells in developing and adult testis with observations on cells lineages. *Tissue & Cell*, 27, p.105-128.

SAVIDES M.C. AND OEHME F.W., 1983. Acetaminophen and its toxicity. *Journal of Applied Toxicology*, 3, p.96-111.

SCHALAT S., MEINHARDT A. AND NIESCHLAG E., 1997. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *European Journal of Endocrinology*, 137, p.101-117.

SCHILDKNECHT S., DAIBER A., GHISLA S., COHEN R.A. AND BACHSCHMID M.M., 2008. Acetaminophen inhibits prostanoid synthesis by scavenging the PGHS-activator peroxynitrite. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 22(1), p.215-24.

SEIBERT K., ZHANG Y., LEAHY K., HAUSER S., MASFERRER J., ISAKSON P., 1997. Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 400A, p.167-70.

SETCHELL B.P., 1991. Male reproductive organs and semen. IN: CUPPS, P.T. *Reproduction in Domestic Animals*. 4<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic Press, 6, p. 221-250.

SHARPE R.M., 1994. Regulation of spermatogenesis. IN: KNOBIL, E, NEILL, J.D. (eds.). *The physiology of reproduction*, 2<sup>th</sup> ed. New York: Raven Press, 1 (22), p.1363-1434.

SHEEN C.L., DILLON J.F., BATEMAN D.N., SIMPSON K.J. AND MACDONALD T.M., 2002. Paracetamol toxicity: epidemiology, prevention and costs to the health-care system. *The Quarterly Journal of Medicine*, 95, p.609-619.

SIEGERS C.P., ROMAN, I.C. AND KLAASSEN, C.D., 1983. Biliary excretion and enterohepatic circulation of paracetamol in the rat. *Xenobiotica*, 13, p. 591-596.

SIMMONS D.L., WAGNER D. AND WESTOVER K., 2000. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, acetaminophen, cyclooxygenase 2 and fever. *Clinical Infectious Diseases*, 31 (5), p.211-218.

SKINNER M., 1991. Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Reviews*, 12, p.45-77.

SPITERI-GRECH J. AND NIESCHLAG, E., 1993. Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis – a review. *Journal of Reproduction and Fertility*, 98, p.1-14.

SUÁREZ-QUIAN C.A., OKE B.O. AND MUSTO N., 1998. Localization of androgen receptor in the rodents testis. IN: MARTINEZ-GARCIA F. AND REGADERA J. *Male reproduction; a multidisciplinary overview*. Spain: Churchill Communication, 10, p.114-124.

TABONE E., BENAHMED M., REVENTOS J., SAEZ J.M., 1984. Interactions between immature porcines Leydig and Sertoli *in vitro*. Cell and Tissue Research, 237, p.357-362.

UCHEYA R.E. AND IGWEH J.C. , 2008. Histological changes in kidney structure following a long-term administration o paracetamol (acetaminophen) in pregnant Sprague Dawley rats. Nigerian Journal of Physiological Science, 21(1-2), p.77-81.

VON MACH M.A., HERMANNNS-CLAUSEN M., KOCH I., HENGSTLER J.G., LAUTERBACH M., KAES J. AND WEILEMANN L.S., 2005. Experiences of a poison center network with renal insufficiency in acetaminophen overdose: an analysis of 17 cases. Clinical Toxicology, 43(1), p.31-77.

WAITES G.M.H., SPEIGHT A.C. AND JENKINS N., 1985. The function maturation of Sertoli cell and Leydig cell in mammalian testis. Journal of Reproduction and Fertility, 75, p.316-326.

WIGER R., HONSGOLO J. K., EVENSON D.P., ANGELIS P., SCHWARZE P.E. AND HOLME J.A., 1995. Effects of acetaminophen and hydroxyurea on spermatogenesis and sperm chromatin structure in laboratory mice. Reproductive Toxicology, 9 (1), p. 21-33.

YANO, C. L., DOLDER, H., 2002. Rat testicular structure and ultrastructure after paracetamol treatment. Contraception, 66, p. 463-467.

XIE W., FLETCHER B.S., ANDERSEN R.D. AND HERSCHMAN H.R., 1991. Expression of a mitogen-inducible gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. The Proceedings of National Academy of Science of the United States of America, 88, p.2692-2696.

ZANG W., DOHERTY M., ARDEN N., BANNWARTH B., BIJLSMA J., GUNTHER K.P., HAUSELMANN H.J., HERRERO-BEAUMONT G., JORDAN K., KAKLAMANIS P., LEEB B., LEQUESNE M., LOHMANDER S., MAZIERES

B., MARTIN-MOLA E., PAVELKA K., PENDLETON A., PUNZI L., SWOBODA B., VARATOJO R., VERBRUGGEN G., ZIMMERMANN-GORSKA I. AND DOUGADOS M, 2005. EULAR evidence based recommendations for the management of hip osteoarthritis: report of a task force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Annals of Rheumatic Disease*, 64, p.669-681.

ZIRKIN B.R., AWONIYI C., GRISWOLD M.D., RUSSELL L.D. AND SHARPE, R., 1994. Is FSH required for adult spermatogenesis? *Journal of Andrology*, 15, p.273-276.

# **EFEITO TARDIO DO USO PROLONGADO DE DOSES TERAPÊUTICA E SUPRATERAPÊUTICA DE PARACETAMOL (ACETAMINOFENO) SOBRE PARÂMETROS TESTICULARES DE RATOS WISTAR ADULTOS**

ARAÚJO, Bruna M. <sup>1</sup>; PAULA, Tarcízio A. R. <sup>2</sup>; MATTA Sérgio L. P. <sup>1</sup>; FONSECA Cláudio C. <sup>2</sup>; MATTA Ana Paula L.F. <sup>1</sup>; CAMPOS, Pamella K. A. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Geral- UFV

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária- UFV

## **Resumo**

O paracetamol é um analgésico e antipirético amplamente utilizado que causa lesões testiculares em modelos animais submetidos à administração de altas doses. Neste estudo, avaliou-se o efeito do uso crônico de paracetamol em doses terapêuticas e supraterapêuticas sobre os parâmetros testiculares de ratos Wistar em idade reprodutiva. Utilizou-se 35 ratos, divididos em cinco grupos com sete animais: o grupo um (controle), recebeu solução oral de xarope de frutose; os grupos dois e quatro receberam doses diárias de 57mg/kg de paracetamol em solução oral (xarope de frutose); e os grupos três e cinco, receberam doses de 114mg/kg do mesmo. Após 53 dias de tratamento, os grupos um, dois e três foram eutanasiados, enquanto os grupos quatro e cinco foram mantidos por mais 53 dias, recebendo apenas água e ração durante este período. O tratamento crônico com paracetamol causou redução do índice gonadossomático, da altura do epitélio seminífero e do índice tubulossomático, independentemente da dose utilizada, porém apenas em animais sacrificados 53 dias após o término do tratamento. Houve, ainda, redução também tardia, no volume dos túbulos seminíferos, da massa total do testículo e da massa do parênquima testicular, nos animais do grupo tratado cronicamente com paracetamol em doses supraterapêuticas. Estes resultados sugerem que doses terapêuticas e supraterapêuticas de paracetamol possam afetar o processo espermatogênico seguinte à exposição ao medicamento.

Palavras chaves: acetaminofeno; toxicidade; biometria corporal; testículo; túbulo seminífero.

# LATE EFFECT OF CHRONICAL USE OF THERAPEUTIC AND SUPRATHERAPEUT DOSES OF ACETAMINOPHEN OVER TESTICLE PARAMETHERS IN ADULT WISTAR RATS

ARAÚJO, Bruna M. <sup>1</sup>; PAULA, Tarcízio A. R. <sup>2</sup>; MATTA Sérgio L. P. <sup>1</sup>; FONSECA Cláudio C. <sup>2</sup>; MATTA Ana Paula L.F. <sup>1</sup>; CAMPOS, Pamella K. A. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> General Biology Departament- UFV

<sup>2</sup> Veterinary Departament - UFV

## Abstract

Acetaminophen is a widely used analgesic and antipyretic that causes testicular lesions in animal models which underwent high-dose administration. In this study, the effect of chronic use of acetaminophen over testicular parameters in Wistar rats on reproductive age was evaluated. Thirty five rats were used, divided into five groups with seven animals each: group one (control) received fructose syrup oral solution; animals from groups two and four received daily doses of acetaminophen 57 mg/kg diluted in fructose syrup oral solution; groups three and five received 114 mg/kg doses of the same. After fifty three days of treatment, groups one, two and three were euthanized, while groups four and five were kept for another fifty three days, receiving just water and ration *ad libitum* during this period. The chronic treatment with acetaminophen caused reduction of testis somatic index, seminiferous epithelium thickness, seminiferous tubule volume and tubule somatic index, independently on used dose, however, only onto animals euthanized fifty three days after the end of the treatment. A late reduction was also observed in the seminiferous tubules volume, testicles total mass and testicle parenchyma mass in the group of animals chronically treated with acetaminophen in suprathereapeutic doses. The results above suggest that therapeutic and suprathereapeutic doses of acetaminophen might affect spermatogenic process following exposure to the medication.

Keywords: acetaminophen; toxicity; corporal biometry; testis; seminiferous tubule.

## 1-Introdução

O paracetamol é um analgésico e antipirético amplamente utilizado, cuja popularidade tornou-se marcante a partir de 1955 quando foi lançado nos EUA com o nome comercial de Tylenol® (Booting, 2000). Em 1960, foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para venda sem prescrição (National Toxicology Program, 1993).

Em doses terapêuticas, o paracetamol é considerado seguro, mas altas doses do fármaco têm sido relacionadas à genotoxicidade (National Toxicology Program, 1993; Bergan *et al.*, 1996; Lister & McLean, 1997) e à citotoxicidade (Bergan *et al.*, 1996; Hazai *et al.*, 2002; Kon *et al.*, 2007). A administração de doses supraterapêuticas extremas de paracetamol pode acarretar falência hepática em modelos animais e em humanos (Lazerow *et al.*, 2004), lesões renais (McMurtry *et al.*, 1978;; Hu *et al.*, 1993; Hoivik *et al.*, 1995) e outras alterações extrahepáticas (National Toxicology Program, 1993).

Alguns estudos avaliaram os efeitos da administração aguda de doses supraterapêuticas de paracetamol sobre os testículos em modelos animais. Placke *et al.* (1987) observaram que camundongos tratados com dose única de 600mg/kg de paracetamol apresentaram alterações histopatológicas nos túbulos seminíferos tais como degeneração de espermatídes, presença de células do epitélio seminífero no lúmen, formação de células gigantes, agregados de material protéico ocluindo a maior parte do lúmen e presença de espermatídes arredondadas no epidídimo. Wiger *et al.* (1995) verificaram que a administração de 400mg/kg/dia de paracetamol durante 5 dias, em camundongos, leva à inibição da replicação de DNA, redução da população de espermátócitos primários em paquíteno, redução do diâmetro dos túbulos seminíferos e da massa testicular. Yano & Dolder (2002) identificaram túbulos seminíferos alterados, alguns túbulos degenerados e espermatídes retendo grande volume de citoplasma residual nos testículos de ratos Wistar tratados com dose única de 665mg/kg de paracetamol.

Os efeitos do uso crônico do paracetamol em doses supraterapêuticas também foram investigados. Eldon & Boyd (1970) relataram que o tratamento durante 100 dias com doses supraterapêuticas de paracetamol, correspondente a dose letal para 50% da população (LD<sub>50</sub>), resultou em graus variados de atrofia testicular, acompanhada de evidente prejuízo na espermatogênese. Jaqueson *et al.* (1984) demonstraram redução da

massa testicular de ratos submetidos à administração de 500mg/kg/dia de paracetamol durante 70 dias. Ratnasooriya & Jayakody (2000) verificaram que ratos tratados com doses supraterapêuticas (500 a 1000mg/kg/dia) de paracetamol durante 30 dias apresentaram redução da fertilidade, a qual foi restabelecida ao trigésimo dia após término do tratamento.

A toxicidade por paracetamol parece estar relacionada não somente a administração de doses supraterapêuticas, uma vez que a ingestão diária de 50 a 70mg/kg/dia de paracetamol, no decorrer de várias semanas a anos, foi associada à hepatite crônica em humanos (National Toxicology Program, 1993). Adicionalmente, em ratas prenhes, a administração crônica (10º dia de gestação ao 13º dia pós parto) de doses terapêuticas (7,3mg/kg 3 vezes ao dia) de paracetamol também foi relacionada a alterações renais histopatológicas (Ucheya & Igweh, 2008).

Nenhum trabalho na literatura havia investigado efeitos deletérios testiculares tardios, ou seja, visíveis no processo espermatogênico seguinte ao término do tratamento, decorrentes do uso crônico de doses terapêuticas de paracetamol, entendendo-se como “crônico” o período correspondente à duração do processo espermatogênico do animal em estudo. Neste sentido, o presente trabalho objetivou a verificação dos efeitos do paracetamol sobre o testículo e o túbulo seminífero de ratos Wistar adultos, nestas condições acima e, também, com o uso de doses supraterapêuticas.

## **2 - Material e Métodos**

### *2.1 - Animais, Grupos Experimentais e Tratamento*

Foram utilizados 35 ratos Wistar em idade reprodutiva (100 dias), provenientes do biotério central da Universidade Federal de Viçosa, os quais pesavam em média 350 g, no início do tratamento, e 435g ao término do experimento. Os ratos foram divididos em 5 grupos com 7 animais colocados em gaiolas individuais: o grupo 1 foi definido como controle, os grupos 2 e 4 receberam 57mg/kg /dia de paracetamol e os grupos 3 e 5 receberam 114mg/kg/dia do medicamento. Estas doses corresponderam, respectivamente, à dose terapêutica diária máxima (57,14mg/kg) e ao dobro do máximo recomendado (114,2mg/kg) para humanos, considerando-se indivíduos de 70 quilos. O paracetamol foi fornecido em solução oral à base de xarope de frutose, a qual foi

administrada através de seringa, em intervalos de 24 horas. O grupo controle recebeu apenas xarope à base de frutose, respeitando-se o mesmo intervalo.

A alimentação sólida (ração) e água foram fornecidos *ad libitum*. A fase de tratamento foi de 53 dias consecutivos, tempo este considerado crônico para o epitélio seminífero, uma vez que todo o processo espermatogênico do rato Wistar tem aproximadamente esta duração. Os animais dos grupos 1, 2 e 3 foram eutanasiados ao final do período de tratamento. Para se avaliar a possibilidade de recuperação do testículo (caso houvesse alteração), como verificado nos estudos de Ratnasooriya & Jayakody (2000), os animais dos grupos 4 e 5 foram mantidos por mais 53 dias, recebendo apenas água e ração, e ao término desse período foram eutanasiados.

### *2.2 - Coleta de Amostras*

Os animais foram eutanaziados pela inalação de éter etílico e em seguida dissecados para canulação da aorta descendente e então perfundidos, inicialmente com solução salina contendo heparina e posteriormente, com solução fixadora de Karnowsky (4% de paraformaldeído e 4% de glutaraldeído em tampão fosfato de sódio 0,1M). Após este período foram retirados os testículos, os quais foram pesados em balança digital de precisão da marca Bel Engineering (modelo mark 160), refixados em solução de Karnowsky, por 24 horas, e armazenados em tampão fosfato pH 7.4, 0,1M. De um dos testículos, retiraram-se fragmentos destinados ao processamento histológico, enquanto do testículo contralateral, dissecou-se e pesou-se a albugínea.

### *2.3 - Processamento do material para análise histológica*

Os fragmentos de testículos destinados ao estudo sob microscopia de luz foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70°, 80°, 95° e 100° GL) com trocas a cada trinta minutos. Após a desidratação, os fragmentos foram incluídos em resina a base de 2-hidroxietil metacrilato, sendo posteriormente seccionados na espessura de 3 µm em micrótomo automático (Reichert-Jung, Alemanha) com navalhas de vidro. As secções obtidas foram coradas com azul de toluidina-borato de sódio 1%, montadas com Entellan® (Merck), e analisadas em microscópio Olympus BX-50.

### *2.4 - Proporções volumétricas (%) e volumes dos compartimentos do testículo*

As proporções volumétricas entre os dois compartimentos do testículo, tubular e intertubular, foram estimadas a partir de 4000 pontos por animal projetados sobre

imagens capturadas em aumento de 400x. O volume (vol.) de cada compartimento testicular, expresso em mL, foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume líquido testicular (volume do parênquima testicular):

Vol. do compartimento = percentual volumétrico do compartimento x vol. líquido do testículo / 100

O valor do volume líquido do testículo foi obtido subtraindo-se da massa bruta do testículo a massa da albugínea. Como a densidade do testículo é em torno de 1 (Johnson *et al.*, 1981), a massa do testículo foi considerado igual ao seu volume.

### 2.5 - Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 20 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível. Estas medidas não levaram em consideração o estágio do ciclo do epitélio seminífero e foram realizadas utilizando-se régua micrométrica acoplada à ocular de 10x, em microscópio de luz, com a objetiva de 20x. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi mensurada a altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada da túnica própria até o lume tubular. O valor registrado para a altura do epitélio, em cada túbulo, resultou da média de duas medidas tomadas de forma diametralmente opostas. O comprimento total dos túbulos seminíferos (CTTS) por testículo, expresso em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal, empregando-se a fórmula (Attal & Courot, 1963):

$$CTTS = \frac{VTS}{\pi R^2} \text{ onde,}$$

VTS = Volume total de túbulos seminíferos

$\pi R^2$  = Área da secção transversal dos túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2)

### 2.6 - Índice Gonadossomático e Tubulossomático

Com base nas massas corporais (MC), testiculares (MT) e conhecendo o volume dos túbulos seminíferos (VTS), foram calculados os índices gonadossomático (IGS), tubulossomático (ITS), os quais se referem ao percentual de massa corporal alocados respectivamente em gônadas e túbulos seminíferos, utilizando-se as fórmulas:

$$IGS = MC/MT \times 100 \text{ e } ITS = VTS/MC \times 100$$

## 2.7- Análises estatísticas

Análise de variância seguida de teste Duncan (5% de significância) foi utilizada para avaliar variações de parâmetros estudados nos grupos controle e tratados. Os valores dos parâmetros estão representados pelas médias, desvios-padrão e coeficiente de variação.

## 2- Resultados

Os resultados dos parâmetros biométricos analisados encontram-se na Tabela 1. Não houve diferença entre as médias da massa corporal e da massa da albugínea dos animais nos 5 grupos analisados ( $p>0,05$ ). Entretanto, houve redução da massa testicular e da massa do parênquima testicular dos animais do grupo 5 ( $p<0,05$ ) em relação ao controle e aos grupos 2 e 3, como também a redução destes mesmos parâmetros no grupo 4 ( $p<0,05$ ) em relação ao grupo 2. O IGS reduziu de forma significativa nos grupos 4 e 5 ( $p<0,05$ ) em relação aos grupos 1,2 e 3.

Tabela 1- Parâmetros biométricos em ratos Wistar em idade reprodutiva após tratamento com paracetamol durante 53 dias.

Tratamento	Massa corporal (g)	Massa testicular (g)	Massa da albugínea (g)	Massa do parênquima (g)	IGS (%)
Grupo 1	433,24 ± 30,42 <b>a</b>	3,14 ± 0,19 <b>ab</b>	0,05 ± 0,01 <b>a</b>	3,08 ± 0,18 <b>ab</b>	0,73 ± 0,04 <b>a</b>
	CV=7,02	CV=5,95	CV=10,93	CV=5,98	CV=5,18
Grupo 2	434,10 ± 23,00 <b>a</b>	3,29 ± 0,17 <b>a</b>	0,05 ± 0,01 <b>a</b>	3,21 ± 0,15 <b>a</b>	0,76 ± 0,05 <b>a</b>
	CV= 5,30	CV=5,26	CV=10,99	CV=4,63	CV=6,79
Grupo 3	393,99 ± 52,37 <b>a</b>	3,17 ± 0,30 <b>ab</b>	0,05 ± 0,004 <b>a</b>	3,12 ± 0,30 <b>ab</b>	0,82 ± 0,15 <b>a</b>
	CV=13,29	CV=9,5	CV=7,62	CV=9,59	CV=18,2
Grupo 4	454,79 ± 46,99 <b>a</b>	2,86 ± 0,20 <b>bc</b>	0,05 ± 0,01 <b>a</b>	2,81 ± 0,22 <b>bc</b>	0,63 ± 0,07 <b>b</b>
	CV=10,33	CV=7,7	CV=11,94	CV=7,88	CV=11,8
Grupo 5	458,71 ± 44,03 <b>a</b>	2,73 ± 0,14 <b>c</b>	0,05 ± 0,004 <b>a</b>	2,69 ± 0,14 <b>c</b>	0,60 ± 0,06 <b>b</b>
	CV=9,60	CV=5,10	CV=7,84	CV=5,13	CV=9,3

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si ( $p>0,05$ ).

Dados expressos em média± s.d. CV= coeficiente de variação.

Grupo 1- controle: tratado com 3 mL/dia de xarope de frutose e eutanaziado ao 53º dia; Grupo 2- tratado com 57mg/kg/dia de paracetamol e eutanaziado s ao 53º dia; Grupo 3- tratado com 114 mg/kg/dia de paracetamol e eutanaziado ao 53ºdia; Grupo 4- tratado com 57mg/kg/dia e eutanaziado ao 106ºdia; Grupo 5- tratado com 114mg/kg/dia paracetamol e eutanaziado ao 106ºdia.

Conforme representado na Tabela 2, não houve variação nas proporções volumétricas (%) dos compartimentos tubular e intertubular do parênquima testicular, nas condições experimentais propostas ( $p>0,05$ ).

Tabela 2- Proporção volumétrica dos compartimentos do parênquima testicular em ratos Wistar tratados com paracetamol durante 53 dias.

Tratamento	Túbulo seminífero (%)	Tecido Intertubular (%)
Grupo 1	87,80 ± 2,06 <b>a</b> CV=2,34	12,20 ± 2,06 <b>a</b> CV=16,86
Grupo 2	87,66 ± 2,83 <b>a</b> CV=3,23	12,34 ± 2,83 <b>a</b> CV=22,93
Grupo 3	87,48 ± 2,69 <b>a</b> CV=3,07	12,52 ± 2,69 <b>a</b> CV=21,46
Grupo 4	87,72 ± 3,12 <b>a</b> CV=3,55	12,28 ± 3,12 <b>a</b> CV=25,37
Grupo 5	87,94 ± 3,23 <b>a</b> CV=3,67	12,06 ± 3,23 <b>a</b> CV=26,78

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si ( $p>0,05$ ).

Dados expressos em média± s.d. CV= coeficiente de variação.

Grupo 1- controle: tratado com 3 mL/dia de xarope de frutose e eutanaziado ao 53º dia; Grupo 2- tratado com 57mg/kg/dia de paracetamol e eutanaziado s ao 53º dia; Grupo 3- tratado com 114 mg/kg/dia de paracetamol e eutanaziado ao 53ºdia; Grupo 4- tratado com 57mg/kg/dia e eutanaziado ao 106ºdia; Grupo 5- tratado com 114mg/kg/dia paracetamol e eutanaziado ao 106ºdia.

Na Tabela 3, estão representadas as medidas do diâmetro tubular, da altura do epitélio seminífero, o comprimento total dos túbulos seminíferos (por testículo e por grama de testículo), o volume total do túbulo seminífero e o índice tubulossomático dos animais tratados e controles. Com relação ao diâmetro tubular, não foram observadas diferenças entre valores médios dos animais nos 5 grupos. Por outro lado, verificou-se redução na altura do epitélio seminífero nos grupos 4 e 5 ( $p<0,05$ ) em relação ao grupo controle. As variações registradas no comprimento total dos túbulos seminíferos e por grama de testículo não diferiram entre si ( $p>0,05$ ). O volume total dos túbulos seminíferos reduziu nos grupos 4 e 5 ( $p<0,05$ ), sendo que, no grupo 4, a redução foi significativa somente em relação aos grupos 2 e 3, não diferindo dos valores médios obtidos para os animais do grupo controle, enquanto que a do grupo 5 foi significativa em relação aos grupos 1, 2 e 3. O ITS foi menor nos grupos 4 e 5 ( $p<0,05$ ) em relação aos grupos 1,2 e 3.

Tabela 3- Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero, comprimento do túbulo seminífero (por testículo e por grama de testículo), volume total dos túbulos seminíferos e ITS em ratos Wistar tratados com Paracetamol durante 53 dias.

Tratamento	Diâmetro do túbulo seminífero ( $\mu\text{m}$ )	Altura do Epitélio seminífero ( $\mu\text{m}$ )	Comprimento total do túbulo seminífero (cm)	Comprimento do túbulo seminífero por grama de testículo (cm)	Volume total do túbulo seminífero (mL)	ITS (%)
Grupo 1	328,09 $\pm$ 13,9 <b>a</b> CV=4,2	113,28 $\pm$ 8,1 <b>a</b> CV=7,1	3212,88 $\pm$ 344,77 <b>a</b> CV=10,73	1023,91 $\pm$ 88,35 <b>a</b> CV=8,63	2,7 $\pm$ 0,14 <b>ab</b> CV=5,34	0,61 $\pm$ 0,02 <b>a</b> CV=2,86
Grupo 2	318,41 $\pm$ 13,57 <b>a</b> CV=4,26	112,02 $\pm$ 7,94 <b>ab</b> CV=7,15	3544,54 $\pm$ 255,30 <b>a</b> CV=7,2	1921,07 $\pm$ 78,69 <b>a</b> CV=7,3	2,82 $\pm$ 0,19 <b>a</b> CV=6,59	0,64 $\pm$ 0,05 <b>a</b> CV=7,79
Grupo 3	314,34 $\pm$ 13,18 <b>a</b> CV=4,19	108,31 $\pm$ 4,28 <b>ab</b> CV=3,95	3533,37 $\pm$ 418,69 <b>a</b> CV=11,85	1114,41 $\pm$ 91,96 <b>a</b> CV=8,25	2,73 $\pm$ 0,28 <b>a</b> CV=10,16	0,70 $\pm$ 0,12 <b>a</b> CV=17,69
Grupo 4	317,32 $\pm$ 10,40 <b>a</b> CV=3,28	101,16 $\pm$ 7,39 <b>b</b> CV=7,39	3118,70 $\pm$ 170,51 <b>a</b> CV=5,47	1093,74 $\pm$ 67,06 <b>a</b> CV=6,13	2,47 $\pm$ 0,18 <b>bc</b> CV=7,18	0,55 $\pm$ 0,06 <b>b</b> CV=10,16
Grupo 5	316,39 $\pm$ 13,19 <b>a</b> CV=4,17	106,05 $\pm$ 4,74 <b>b</b> CV=4,47	3017,71 $\pm$ 278,75 <b>a</b> CV=9,24	1104,94 $\pm$ 103,43 <b>a</b> CV=9,36	2,36 $\pm$ 0,17 <b>c</b> CV=7,06	0,52 $\pm$ 0,05 <b>b</b> CV=10,11

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

Dados expressos em média  $\pm$  s.d. CV= coeficiente de variação.

Grupo 1- controle: tratado com 3 mL/dia de xarope de frutose e eutanaziado ao 53º dia; Grupo 2- tratado com 57mg/kg/dia de paracetamol e eutanaziado s ao 53º dia; Grupo 3- tratado com 114 mg/kg/dia de paracetamol e eutanaziado ao 53º dia; Grupo 4- tratado com 57mg/kg/dia e eutanaziado ao 106º dia; Grupo 5- tratado com 114mg/kg/dia paracetamol e eutanaziado ao 106º dia.

#### 4-Discussão

Nos últimos anos, tem sido relatada não somente uma forte indicação do declínio da contagem de espermatozóides, mas também uma grande evidência da diminuição da competência funcional da produção espermática humana (Aitken, 1999). Este declínio produtivo tem sido associado a uma série de fatores ambientais tais como mudanças no comportamento e no vestuário, exposição a tóxicos poluentes, ingestão de substâncias variadas e o uso de medicamentos (Aitken, 1999; Pereira, 2000). Estudos em animais demonstram que doses supraterapêuticas de paracetamol administradas de forma aguda (Placke *et al.*, 1987; Wiger, 1995; Yano e Dolder, 2002) ou crônica (Eldon & Boyd, 1970; Jaqueson *et al.*, 1984; Reel *et al.*, 1992; Ratnasooriya & Jayakody, 2000) causam lesões testiculares e afetam a fertilidade (Reel *et al.*, 1992; Ratnasooriya & Jayakody, 2000).

A produção espermática é altamente correlacionada com a massa testicular (Amann, 1970; Russell *et al.*, 1990; França & Russell, 1998), sendo que esta pode ser usada como indicador quantitativo da produção espermática, uma vez que o principal componente testicular é o túbulo seminífero. No presente estudo, animais tratados

cronicamente com doses terapêuticas e supraterapêuticas de paracetamol apresentaram redução da massa dos testículos apenas naqueles sacrificados 53 dias após o término do tratamento (Tabela 1). No entanto, a diminuição da massa testicular foi observada de forma significativa somente nos animais dos grupos 5, os quais receberam doses supraterapêuticas. Redução da massa testicular foi também relacionada ao uso de doses supraterapêuticas de paracetamol, tanto de forma aguda (Wiger *et al.*, 1995), como de forma crônica (Eldon & Boyd, 1970; Jaqueson *et al.*, 1984; National Toxicology Program, 1993). Por outro lado, de acordo com o presente trabalho, o paracetamol, em doses terapêuticas, não parece afetar a massa testicular mesmo quando administrado de maneira crônica e o efeito deletério do uso crônico de doses supraterapêuticas sobre a massa testicular pode ser identificado somente nos ciclos do epitélio seminífero seguintes ao término do tratamento.

No presente experimento, a massa da albugínea testicular não apresentou alteração entre os animais dos grupos estudados. Assim, a diminuição observada na massa gonadal relacionou-se a perdas no conteúdo parenquimal testicular, em especial no compartimento tubular. Wiger *et al.* (1995), utilizando doses supraterapêuticas (400mg/kg) de paracetamol em camundongos, notadamente uma dosagem 10 a 20 vezes superior às usadas no presente experimento, observaram redução no diâmetro dos túbulos seminíferos. Embora no presente trabalho não tenha sido observada diminuição significativa no diâmetro tubular (Tabela 3), verificou-se redução na altura do epitélio seminífero nos grupos 4 e 5 em relação ao controle, o que refletiu também em diminuição do volume total de túbulos seminíferos nestes grupos em relação ao controle, porém de forma significativa somente nos animais do grupo 5. Segundo Wing & Christensen (1982), a mensuração da altura do epitélio seminífero é mais efetiva que o diâmetro tubular para a avaliação da produção espermática. Uma vez que o principal componente do parênquima testicular é o túbulo seminífero, a redução volumétrica do epitélio seminífero verificada poderia justificar a diminuição das massas testiculares bruta e líquida observada nestes animais.

O comprimento dos túbulos seminíferos está relacionado ao diâmetro tubular e ao volume dos túbulos seminíferos. No presente experimento, embora o volume total dos túbulos seminíferos tenha variado significativamente no grupo 5, o comprimento tubular total não apresentou diferenças significativas, seja total ou por grama de testículo, entre os animais dos diferentes grupos estudados (Tabela 3).

Os IGS e ITS que representam, respectivamente, o percentual de massa corporal alocado nos testículo e nos túbulos seminíferos, avaliados conjuntamente quantificam o investimento do corpo na produção espermática. Assim, a redução significativa dos IGS e ITS nos grupos 4 e 5, em relação aos 1, 2 e 3 (Tabela 1 e 3), reforçam o efeito deletério tardio do uso crônico do paracetamol sobre a produção espermática, mesmo em doses terapêuticas. Este efeito deletério possivelmente não é suficiente para afetar a fertilidade de ratos uma vez que os parâmetros de fertilidade, alterados pelo oferecimento de doses de paracetamol 8 vezes maior que aquela oferecida no presente trabalho, retornaram à normalidade ou próximo do normal 30 dias após o término do tratamento (Ratnasooriya & Jayakody, 2000).

Placke *et al.* (1987) verificaram alterações histopatológicas imediatas nos túbulos seminíferos de camundongos submetidos à administração de dose única supraterapêutica (600mg/kg) de paracetamol. Tais alterações foram: degeneração de espermátides, presença de células do epitélio seminífero no lúmen, formação de células gigantes, agregados de material protéico ocluindo a maior parte do lúmen e presença de espermátides arredondadas no epidídimo. Ainda que estas alterações não tenham sido estudadas na presente condição experimental, o efeito deletério do paracetamol pôde ser claramente observado sobre o epitélio seminífero, uma vez que houve redução significativa da espessura deste epitélio e do ITS nos grupos 4 e 5.

O mecanismo de toxicidade pelo paracetamol, especialmente no fígado, tem sido atribuído ao aumento da formação do metabólito reativo NAPQI por ativação do citocromo P450 quando os níveis de paracetamol ultrapassam o limite de detoxificação pelo ácido glicurônico (Hazai, Vereczkey & Monostory, 2002). A elevada formação de NAPQI leva à depleção de glutathione, (Mitchel *et al.*, 1973; Nelson, 1990; Hazai, Vereczkey & Monostory, 2002), permitindo que NAPQI livres liguem-se covalentemente a macromoléculas, causando disfunção mitocondrial e morte celular (Jaeschke & Bajt, 2005; Kon *et al.*, 2007). Entretanto, prévios estudos *in vitro*, demonstraram que, independentemente da ativação do citocromo P450, o paracetamol induz aberrações cromossômicas e trocas entre cromátides irmãs, inibe a enzima ribonucleotídeo redutase e causa distúrbio na replicação e reparação do DNA (Bergam *et al.*, 1996).

Wiger *et al.* (1995) demonstraram que os danos testiculares resultantes de altas doses de paracetamol administradas em camundongos foram associados à inibição da replicação de DNA, mas não à depleção de glutathione, nem ao aumento considerável de

ligações covalentes, sugerindo que, ao contrário do fígado, o mecanismo de toxicidade testicular do paracetamol não envolva a formação de NAPQI. Lister & McLean (1997) observaram forte efeito inibitório do paracetamol sobre a replicação de DNA no testículo e em outros tecidos com alta capacidade mitótica, enquanto que, no fígado, somente um efeito sutil pôde ser observado, o que pode ser explicado por diferenças entre os tecidos quanto à proporção de células na fase S do ciclo celular.

Considerando os estudos acima, os efeitos tóxicos do paracetamol sobre o epitélio seminífero verificados no presente experimento poderiam estar ligados à redução da replicação de DNA e, conseqüentemente, da capacidade proliferativa das células germinativas. Adicionalmente, Richburg (2000) afirmou que a eliminação de células germinativas por meio do mecanismo de apoptose ocorre espontaneamente sobre condições naturais e é freqüentemente aumentada depois de injúrias testiculares quimicamente induzidas, sendo que a relação parácrina célula de Sertoli/célula germinativa, está diretamente implicada neste mecanismo. Dessa forma, a toxicidade do paracetamol sobre os túbulos seminíferos poderia também estar ligada ao aumento das apoptoses mediadas pelas células de Sertoli. Efeitos quantitativos resultantes de ambos os mecanismos somente poderiam ser percebidos, no processo espermatogênico seguinte a exposição ao paracetamol, o que parece ter sido o caso do presente experimento.

## **5-Conclusão**

A administração crônica do paracetamol em doses terapêuticas (cerca de 57mg/kg) e supraterapêuticas (cerca de 114mg/kg) em ratos Wistar afetou o componente tubular dos testículos, independentemente da dose utilizada, porém, somente nos animais sacrificados 53 dias após o término do tratamento. Isto sugere que o paracetamol possa afetar o processo espermatogênico seguinte ao da exposição ao medicamento.

## **6-Referências Bibliográficas**

AITKEN R.J., 1999. The human spermatozoon – a cell in crisis? *Journal of Reproduction and Fertility*, 115, p. 1-7.

AMANN R.P, 1970. Sperm production rates. IN: JOHNSON A.D., GOMES W.R. AND WANDERMARK N.L. (eds). The Testis. New York: Academic Press.1, cap 7, p.433-482.

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

BERGAN K., MÜLLER L. AND TEIGEN S.W., 1996. The genotoxicity and carcinogenicity of paracetamol: a regulatory re(view). Mutation Research 349, p.263-288.

BOOTING R.M., 2000. Mechanism of action of acetaminophen: is there acyclooxygenase 3? Clinical Infections Diseases, 31, p.202-210.

ELDON M. AND BOYD E. M., 1970. Testicular atrophy from analgesics drugs. Journal of Clinical Pharmacology, 10, p.222-227.

FRANÇA L.R. AND RUSSELL L.D., 1998. The testis of domestic mammals. IN: MARTINEZ-GARCIA F. AND REGADERA J. (eds) Male reproduction; a multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Communications Europe España, 16, p.198-219.

HAZAI E, VERECZKEY L. AND MONOSTORY K., 2002. Reduction of toxic metabolite formation of acetaminophen. Biochemical and Biophysical Research. Communications, 291, p.1089-1894.

HOIVIK D.J., MANAUTOU J.E., TVEIT A., HART S.G.E., KHARALLAH E.A., AND COHEN S.D., 1995. Gender-related differences in susceptibility to acetaminophen-induced toxicity protein arylation and nephrotoxicity inthe CD-1 mouse. Toxicology and Applied Pharmacology, 130, p.257-271.

HU J.J., LEE M.J., VAPIWALA M., REUHL K., THOMAS P.E. AND YANG CS., 1993. Sex-related differences in mouse renal metabolism and toxicity of acetaminophen. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 122(1), p.16-26.

JAESCHKE H. AND BAJT M. L., 2006. Review - Intracellular Signaling Mechanisms of Acetaminophen-Induced Liver Cell Death. *Toxicological Sciences*, 89(1), p.31-41.

JAQUESON A. SEMONT H., THEVENIN M., WARNET J.M., PROST R. AND CLAUDE JR., 1984. Effects of daily high doses of paracetamol given orally during spermatogenesis in the rat testes. *Archives of Toxicology Supplement*, 7, p.164-166.

JOHNSON L., PETTY C.S. AND NEAVES W.B., 1981. A new approach to qualification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. *Biology of Reproduction* 25, p.217-226.

KON K. IKEJIMA K., OKUMURA K., AOYAMA T., ARAI K., TAKEI Y., LEMASTERS J.J. AND SATO N., 2007. Energy metabolism and mechanism of cell death role of apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22 (1), p.49-52.

LAZEROW S.K., ABDI M.S.AND LEWIS J.H., 2005. Drug-induced liver disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, 21, p. 283-292.

LISTER, C.F. AND MCLEAN A.E.M., 1997. Inhibition of DNA synthesis by paracetamol in different tissues of the rat in vivo. *Toxicology* 116, p. 49-57

MCMURTRY R.J, SNOGDRASS W.R. AND MITCHELL J.R., 1978. Renal necrosis, glutathione depletion and covalent binding after acetaminophen. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 46, p. 87-100.

MITCHELL J.R., JOLLOW D.J., POTTER W.Z., GILLETTE J.R. AND BRODIE B.B., 1973. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of

glutathione. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 187, p.211-217.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 1993. NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Acetaminophen in F344/N rats and B6C3F1 Mice. National Toxicology Program Technical Reports Series, 394, p.1-274.

NELSON S.D., 1990. Molecular mechanisms of the hepatotoxicity caused by acetaminophen. *Seminars of Liver Disease*, 10, p.267-278

PEREIRA F.E.L., 2000. Patologia ambiental. IN: BRASILEIRO GF (ed). *Bogliolo Patologia*, 6ª ed., Guanabara Koogan, p. 254-273.

PLACKE M.E., WYAND D.S. AND COHEN S.D., 1987. Extrahepatic lesions induced by acetaminophen in the mouse. *Toxicologic Pathology*, 15(4), p. 381-387.

RATNASOORIYA W.D. AND JAYAKODY J.R.A.C., 2000. Long-term administration of large doses of paracetamol impairs the reproductive competence of male rats. *Asian Journal of Andrology*, 2, p.247-255.

REEL J.R., LAWTON A.D. AND LAMB J.C., 1992. Reproductive toxicity of acetaminophen in Swiss CD-1 mice using a continuous breeding protocol. *Fundamental and Applied Toxicology*, 18, p.233-239.

RICHBURG J.H., 2000. The relevance of spontaneous- and chemically-induced alterations in testicular germ cell apoptosis to toxicology. *Toxicology Letters*, 15 (112-113), p.79-86.

RUSSELL L.D., ETTLIN R.A., SINHA HIKIM A.P. AND CLEGG E.D. Mammalian spermatogenesis, 1990. IN: RUSSELL, L.D, ETTLIN, R.A., HIKIM, A.P. AND CLEGG, E.D. (eds). *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Bolesta: Cache River Press, 1, p.1-40.

UCHEYA R.E. AND IGWEH J.C., 2008. Histological changes in kidney structure following a long-term administration o paracetamol (acetaminophen) in pregnant Sprague Dawley rats. Niger Journal of Physiological Science, 21(1-2), p.77-81.

WIGER R., HONSGOLO J. K., EVENSON D.P., ANGELIS P., SCHWARZE P.E. AND HOLME J.A., 1995. Effects of acetaminophen and hydroxyurea on spermatogenesis and sperm chromatin structure in laboratory mice. Reproductive Toxicology, 9 (1), p. 21-33.

WING T.Y. AND CHRISTENSEN A.K., 1982. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. American Journal of Anatomy, 165(1), p.13-25.

YANO, C. L. AND DOLDER, H., 2002. Rat testicular structure and ultrastructure after paracetamol treatment. Contraception, 66, p. 463-467.

# MORFOMETRIA DO COMPARTIMENTO INTERTUBULAR DE RATOS WISTAR ADULTOS SUBMETIDOS A TRATAMENTO CRÔNICO COM PARACETAMOL (ACETAMINOFENO)

ARAÚJO, Bruna M. <sup>1</sup>; PAULA, Tarcízio A. R. <sup>2</sup>; MATTA Sérgio L. P. <sup>1</sup>; FONSECA Cláudio C. <sup>2</sup>; MATTA Ana Paula L.F. <sup>1</sup>; CAMPOS, Pamella K. A. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> General Biology Department- UFV

<sup>2</sup> Veterinary Department - UFV

## Resumo

O paracetamol é um analgésico e antipirético de venda livre, que tem sido implicado em lesões testiculares e alteração do comportamento sexual em modelos animais expostos a altas doses. Neste estudo, avaliou-se o efeito do uso crônico de paracetamol no compartimento intertubular dos testículos de ratos Wistar em idade reprodutiva. Utilizou-se 35 ratos, divididos em cinco grupos com sete animais: o grupo um (controle), recebeu solução oral de xarope de frutose; os grupos dois e quatro receberam doses diárias de 57mg de paracetamol em solução oral (xarope de frutose); e os grupos três e cinco, receberam doses de 114mg do mesmo. Após 53 dias de tratamento, os grupos um, dois e três foram eutanasiados, enquanto os grupos quatro e cinco foram mantidos por mais 53 dias, recebendo apenas água e ração *ad libitum*. Nos animais sacrificados 53 dias após o término do tratamento, observou-se que, a administração crônica de paracetamol, em doses terapêuticas, causou redução do diâmetro médio dos núcleos das células de Leydig e do volume individual médio das células de Leydig e, em doses supraterapêuticas, acarretou redução do volume do tecido conjuntivo, do volume individual médio dos núcleos de células de Leydig, do diâmetro médio dos núcleos de células de Leydig, do índice Leydigossomático e do índice somático das glândulas vesiculares. Estes quatro últimos parâmetros sugerem que doses supraterapêuticas crônicas de paracetamol possam afetar tardiamente a produção de andrógenos pelas células de Leydig.

Palavras chave: acetaminofeno; toxicidade; testículo; célula de Leydig; intertúbulo.

# INTERTUBULAR COMPARTIMENT MORPHOMETRY FROM ADULT WISTAR RATS SUBMITTED TO ACETAMINOPHEN CHRONICAL TREATMENT

ARAÚJO, Bruna M. <sup>1</sup>; PAULA, Tarcízio A. R. <sup>2</sup>; MATTA Sérgio L. P. <sup>1</sup>; FONSECA Cláudio C. <sup>2</sup>; MATTA Ana Paula L.F. <sup>1</sup>; CAMPOS, Pamella K. A. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Geral- UFV

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária- UFV

## Abstract

Paracetamol is non-prescription analgesic and antipyretic that has been implied in testicular lesions and sexual behavior alterations in animal models exposed to high doses. In the present study, the effect of chronic use of acetaminophen over testicular intertubular compartment in Wistar rats on reproductive age was evaluated. Thirty five rats, divided into five groups with seven animals, were utilized: group one (control) received fructose syrup oral solution; groups two and four were given daily doses of 57 mg of acetaminophen in oral solution (fructose syrup); and groups three and five received 114 mg of the same. Fifty three days after the beginning of the treatment, groups one, two and three were euthanized, while groups four and five were kept for another fifty three days, and were given only water and ration *ad libitum* during this period. On those animals were euthanized fifty three days after the end of the treatment, observed that the chronic administration of paracetamol, at therapeutic dosage, caused reduction on the mean diameter of the Leydig cells nuclei and on the mean individual volume of Leydig cells and, at suprathereapeutic dosage, caused reductions on the conjunctive tissue volume, Leydig cell's nucleus volume, Leydig cell's nucleus diameter, leydigosomatic index and somatic index of vesicular glands. These last four parameters suggest that acetaminophen chronic suprathereapeutic dosage may affect androgen production by Leydig cells, fifty three days after treatment.

Keywords: acetaminophen; toxicity; testis; Leydig cell; intertubule.

## 1- Introdução

O paracetamol é uma droga de venda livre pertencente ao grupo dos derivados do p-aminofenol, o qual apresenta ações antipiréticas e analgésicas, sem atividade antiinflamatória apreciável (Brunton *et al.*, 2003). Atualmente, está disponível no mercado sob diversas formas tanto em apresentações isoladas quanto em formulações combinadas (Sheen *et al.*, 2002).

Embora seja considerado seguro e bem tolerado em doses terapêuticas, o paracetamol é bem conhecido pelo seu potencial hepatotóxico em caso de altas doses agudas (Savides & Oehme, 1983; Thomas, 1993). Lesões em outros órgãos também foram identificadas em modelos animais e humanos expostos a altas doses do fármaco (McMurtry *et al.*, 1978; Prescott, 1983; Hu *et al.*, 1993; National Toxicology Program, 1993; Hoivik *et al.*, 1995).

Foi demonstrado que doses supraterapêuticas de paracetamol causam redução da massa testicular em modelos animais submetidos a tratamento agudo (Wiger *et al.*, 1995) ou crônico (Eldon & Boyd, 1970; Jaqueson *et al.*, 1984; National Toxicology Program, 1993). Efeitos deletérios sobre os túbulos seminíferos de camundongos também foram relatados na administração aguda de doses supraterapêuticas de paracetamol. Dentre estes efeitos foram descritos: degeneração de espermátides, presença de células do epitélio seminífero no lúmen, formação de células gigantes e presença agregados de material protéico ocluindo a maior parte do lúmen (Placke *et al.*, 1987), redução da população de espermátócitos primários em paquíteno e redução do diâmetro dos túbulos seminíferos (Wiger, 1995) e presença de túbulos seminíferos alterados ou degenerados e de espermátides retendo grande volume de citoplasma residual (Yano & Dolder, 2002).

De acordo com outro estudo ainda não publicado, os efeitos deletérios do paracetamol sobre o componente tubular dos testículos parecem envolver também a administração crônica de doses terapêuticas, uma vez que o tratamento em tais condições foi associado à redução na altura do epitélio germinativo, no ITS, e no IGS, sugerindo um efeito negativo sobre a espermatogênese, porém, somente verificado no processo espermatogênico seguinte ao período de exposição à droga.

Ratnasooriya & Jayakody (2000) verificaram alterações no comportamento sexual de ratos submetidos à administração crônica de doses supraterapêuticas de paracetamol. Entretanto, investigações diretas dos efeitos do paracetamol sobre o

intertúbulo testicular não se encontram na literatura. Assim, no presente experimento, buscou-se verificar os efeitos da administração crônica (ao longo do processo espermatogênico) de doses terapêuticas e supraterapêuticas de paracetamol sobre o compartimento intertubular dos testículos de ratos Wistar adultos.

## **2 - Material e Métodos**

### *2.1 - Animais, Grupos Experimentais e Tratamento*

Foram utilizados 35 ratos Wistar em idade reprodutiva (100 dias), provenientes do biotério central da Universidade Federal de Viçosa, os quais pesavam em média 350 g no início do tratamento e 435g ao término do experimento. Os ratos foram divididos em 5 grupos com 7 animais colocados em gaiolas individuais: o grupo 1 foi definido como o controle, os grupos 2 e 4 receberam em média 57mg/kg/dia de paracetamol e os grupos 3 e 5 receberam cerca de 114mg/kg/dia do medicamento. Estas doses corresponderam, respectivamente, à dose terapêutica diária máxima (57,14mg/kg) e ao dobro do máximo recomendado (114,2mg/kg) para humanos. O paracetamol foi fornecido em solução oral à base de xarope de frutose, a qual foi administrada através de seringa, em intervalos de 24 horas. O grupo controle recebeu apenas xarope à base de frutose respeitando o mesmo intervalo.

A alimentação sólida (ração) e água foram fornecidos *ad libitum*. A fase de tratamento foi de 53 dias consecutivos, tempo este considerado crônico para o epitélio seminífero, uma vez que todo o processo espermatogênico do rato Wistar tem aproximadamente esta duração. Os animais dos grupos 1, 2 e 3 foram eutanasiados ao final do período de tratamento. Para se avaliar a possibilidade de recuperação do testículo (caso houvesse alteração), como verificado nos estudos de Ratnasooriya & Jayakody (2000), os animais dos grupos 4 e 5 foram mantidos por mais 53 dias, recebendo apenas água e ração, e ao término desse período foram eutanasiados

### *2.2 - Coleta de Amostras*

Os animais foram eutanasiados pela inalação de éter etílico, em seguida, foram dissecados para canulação da artéria aorta descendente e, então, perfundidos inicialmente com solução salina contendo heparina e, posteriormente, com solução fixadora de Karnovsky (4% de paraformaldeído e 4% de glutaraldeído em tampão fosfato de sódio 0,1M). Após este período foram retirados os testículos e as glândulas

vesiculares os quais foram pesados em balança digital de precisão Engineering (modelo mark 160), refixados em solução de Karnowsky, por 24 horas, e armazenados em tampão fosfato pH 7.4, 0,1 M, sob refrigeração. De um dos testículos, retiraram-se fragmentos destinados ao processamento histológico, enquanto do testículo contralateral, dissecou-se e pesou-se a albugínea.

### *2.3 - Processamento do material para análise histológica*

Os fragmentos de testículos armazenados e destinados ao estudo sob microscopia óptica foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (70°, 80°, 95° e 100° GL) com trocas a cada trinta minutos. Após a desidratação, os fragmentos foram incluídos em resina a base de 2-hidroxietil metacrilato, sendo posteriormente seccionados em intervalos de 10 cortes, na espessura de 3 µm, em micrótomo automático (Reichert-Jung, Alemanha) com navalhas de vidro. As secções obtidas foram coradas com azul de toluidina-borato de sódio 1%, montadas com Entellan® (Merck), e analisadas em microscópio Olympus BX-50.

### *2.4-Proporções volumétricas (%) e volume dos elementos do intertúbulo*

As proporções volumétricas do núcleo e do citoplasma das células de Leydig, do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e do espaço linfático no parênquima testicular foram estimadas a partir de 4000 pontos por animal projetados sobre imagens do parênquima capturadas em aumento de 400x. A relação entre a proporção volumétrica do citoplasma e a proporção volumétrica do núcleo das células de Leydig foi considerada relação nucleocitoplasmática, a ser utilizada na confecção de dados volumétricos celulares. O volume de cada elemento do intertúbulo, expresso em mL, foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume líquido testicular. O valor deste último foi obtido subtraindo-se da massa bruta do testículo a massa da albugínea. Como a densidade do testículo é em torno de 1 (Jonhson *et al.*, 1981), a massa do testículo foi considerado igual ao seu volume.

### *2.5- Diâmetro do núcleo da célula de Leydig., volume de 1 célula de Leydig, número total de células de Leydig, número de células de Leydig por grama de testículo*

O diâmetro médio do núcleo de uma célula de Leydig foi obtido a partir da mensuração do diâmetro de 10 secções transversais, o mais circular possível, de núcleos

de células de Leydig em cada animal. As mensurações foram feitas utilizando-se o programa de imagens Image Pro Plus. O volume individual médio do núcleo das células de Leydig foi obtido a partir da fórmula  $\frac{4}{3}\pi r^3$ , onde r é igual ao raio do núcleo. Através da relação nucleocitoplasmática foi então calculado o volume citoplasmático e total de uma célula de Leydig. Para o cálculo do número total de células de Leydig, o volume total de células de Leydig foi dividido por seu volume individual. Dividindo-se ainda o número total de células Leydig pelo peso testicular, foi obtido o número de células Leydig por grama de testículo.

#### *2.6- Índice Leydigossomático e índice somático das glândulas vesiculares*

Através do volume das células de Leydig e do peso das glândulas vesiculares, foram calculados, respectivamente, os índices Leydigossomático (ILS) e Índice somático das glândulas vesiculares (ISGV), os quais se referem ao percentual de massa corporal alocados respectivamente em células de Leydig e glândulas vesiculares:

$$\text{ILS} = \text{Volume de Leydig} / \text{Peso corporal} \times 100$$

$$\text{ISGV} = \text{Peso das glândulas vesiculares} / \text{Peso Corporal} \times 100$$

#### *2.7 - Análises estatísticas*

Análise de variância seguida de teste Duncan (5% de significância) foi utilizada para avaliar variações de parâmetros estudados nos grupos controle e tratados. Os valores dos parâmetros estão representados pelas médias e desvios-padrão.

### **3-Resultados**

A proporção volumétrica dos componentes do intertúbulo encontra-se na Tabela 1. Os valores médios observados para tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e espaço linfático não variaram entre os animais dos grupos estudados ( $p > 0,05$ ). A proporção volumétrica das células de Leydig reduziu nos animais do grupo 5 em relação aos do grupo 2 ( $p < 0,05$ ) e as proporções volumétricas de núcleos e citoplasmas de células de Leydig reduziram nos animais do grupo 5 em relação aos dos grupos 2 e 3 ( $p < 0,05$ ).

Tabela 1- Proporção volumétrica (%) dos elementos do intertúbulo no parênquima testicular em ratos Wistar em idade reprodutiva após tratamento com paracetamol durante 53 dias.

<i>Tratamentos</i>	<i>Vasos Sanguíneos</i>	<i>Espaço linfático</i>	<i>Tecido Conjuntivo</i>	<i>Células de Leydig</i>	<i>Núcleos de células de Leydig</i>	<i>Citoplasmas de células de Leydig</i>
Grupo 1	0,98± 0,86 <b>a</b>	5,80± 1,43 <b>a</b>	2,48± 0,69 <b>a</b>	2,45± 0,48 <b>ab</b>	0,72± 0,15 <b>ac</b>	1,73± 0,36 <b>ac</b>
Grupo 2	1,38± 0,80 <b>a</b>	5,56± 2,43 <b>a</b>	2,18± 0,32 <b>a</b>	2,86± 0,70 <b>a</b>	0,83± 0,13 <b>ab</b>	2,03± 0,58 <b>ab</b>
Grupo 3	1,55± 1,29 <b>a</b>	4,15± 1,27 <b>a</b>	2,46± 0,26 <b>a</b>	2,64± 0,72 <b>ab</b>	0,81± 0,26 <b>ab</b>	2,01± 0,43 <b>ab</b>
Grupo 4	1,76± 1,23 <b>a</b>	5,43± 2,20 <b>a</b>	2,56± 0,85 <b>a</b>	2,25± 1,15 <b>ab</b>	0,68± 0,35 <b>ac</b>	1,56± 0,81 <b>ac</b>
Grupo 5	1,60± 0,94 <b>a</b>	6,24± 2,81 <b>a</b>	2,07± 0,27 <b>a</b>	1,86± 0,77 <b>b</b>	0,50± 0,27 <b>c</b>	1,31± 0,50 <b>c</b>

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si ( $p>0,05$ ).

Dados expressos em média± s.d.

Grupo 1- controle: tratado com 3 mL/dia de xarope de frutose e eutanaziado ao 53º dia; Grupo 2- tratado com 57mg/kg/dia de paracetamol e eutanaziado s ao 53º dia; Grupo 3- tratado com 114 mg/kg/dia de paracetamol e eutanaziado ao 53ºdia; Grupo 4- tratado com 57mg/kg/dia e eutanaziado ao 106ºdia; Grupo 5- tratado com 114mg/kg/dia paracetamol e eutanaziado ao 106ºdia.

Os valores referentes ao volume ocupado no parênquima pelos elementos do intertúbulo encontram-se na Tabela 2. Os volumes dos vasos sanguíneos e dos vasos linfáticos não variaram entre os animais dos grupos analisados ( $p>0,05$ ). Por outro lado, verificou-se redução do volume do tecido conjuntivo nos animais do grupo 5 em relação aos dos grupos 1 e 3 ( $p<0,05$ ). O volume total das células de Leydig reduziu nos animais do grupo 4 ( $p<0,05$ ) em relação aos do grupo 2, e nos do grupo 5 ( $p<0,05$ ) em relação aos dos grupos 1, 2 e 3. O volume total dos núcleos de células de Leydig reduziu nos animais do grupo 5 em relação aos dos grupos 1, 2 e 3 ( $p<0,05$ ), enquanto a redução do volume total dos citoplasmas das células de Leydig nos animais daquele grupo foi verificada somente em relação aos dos grupos 2 e 3 ( $p<0,05$ ).

Tabela 2 – Volume total (mL) dos elementos do intertúbulo no parênquima testicular em ratos Wistar em idade reprodutiva após tratamento com paracetamol durante 53 dias.

<i>Tratamento</i>	<i>Vasos sanguíneos</i>	<i>Espaço linfático</i>	<i>Tecido Conjuntivo</i>	<i>Células de Leydig</i>	<i>Núcleos de células Leydig</i>	<i>Citoplasmas de células de Leydig</i>
Grupo 1	0,03± 0,026 <b>a</b>	0,18± 0,052 <b>a</b>	0,08± 0,024 <b>a</b>	0,08± 0,016 <b>ab</b>	0,02± 0,005 <b>a</b>	0,05± 0,012 <b>ac</b>
Grupo 2	0,03± 0,026 <b>a</b>	0,18± 0,071 <b>a</b>	0,07± 0,011 <b>ab</b>	0,10± 0,025 <b>a</b>	0,03± 0,005 <b>a</b>	0,07± 0,020 <b>a</b>
Grupo 3	0,05± 0,046 <b>a</b>	0,13± 0,049 <b>a</b>	0,08± 0,009 <b>a</b>	0,09± 0,013 <b>ab</b>	0,03± 0,006 <b>a</b>	0,06± 0,012 <b>a</b>
Grupo 4	0,05± 0,035 <b>a</b>	0,16± 0,071 <b>a</b>	0,07± 0,022 <b>ab</b>	0,07± 0,036 <b>bc</b>	0,02± 0,011 <b>ab</b>	0,05± 0,025 <b>ac</b>
Grupo 5	0,04± 0,025 <b>a</b>	0,17± 0,073 <b>a</b>	0,06± 0,008 <b>b</b>	0,05± 0,019 <b>c</b>	0,01± 0,007 <b>b</b>	0,04± 0,010 <b>c</b>

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si ( $p>0,05$ ).

Dados expressos em média± s.d.

Grupo 1- controle: tratado com 3 mL/dia de xarope de frutose e eutanaziado ao 53º dia; Grupo 2- tratado com 57mg/kg/dia de paracetamol e eutanaziado s ao 53º dia; Grupo 3- tratado com 114 mg/kg/dia de paracetamol e eutanaziado ao 53ºdia; Grupo 4- tratado com 57mg/kg/dia e eutanaziado ao 106ºdia; Grupo 5- tratado com 114mg/kg/dia paracetamol e eutanaziado ao 106ºdia.

Na Tabela 3 encontram-se os valores médios para os diâmetros dos núcleos de células de Leydig, relação nucleocitoplasmática, volume individual da célula de Leydig, número total de células de Leydig e para o número de células de Leydig por grama de testículo. O diâmetro médio do núcleo da célula de Leydig reduziu nos animais do grupo 4 em relação aos do grupos 1, 2 e 3 ( $p<0,05$ ) e nos do grupo 5 em relação aos dos grupos 1 e 2 ( $p<0,05$ ). A relação nucleocitoplasmática não apresentou variações entre os animais dos grupos estudados ( $p>0,05$ ). O volume individual médio da célula de Leydig diferiu somente entre os animais do grupo controle e do grupo 4, apresentando menor valor neste último ( $p<0,05$ ). O número total de células de Leydig reduziu nos animais do grupo 5 em relação aos animais dos grupos 2 e 3 ( $p<0,05$ ). O número de células de Leydig por grama de testículo diferiu somente entre os animais dos grupos 3 e 5, sendo menor neste último ( $p<0,05$ ).

Tabela 3 – Diâmetro do núcleo da célula de Leydig ( $\mu\text{m}$ ), relação nucleocitoplasmática (%), volume de 1 célula de Leydig (mL), número total de células de Leydig, número de células de Leydig por grama de testículo em ratos Wistar adultos tratados com paracetamol durante 53 dias.

<i>Tratamentos</i>	<i>Diâmetro do núcleo de célula de Leydig</i>	<i>Relação nucleocitoplasmática</i>	<i>Volume de 1 célula de Leydig (<math>10^{-10}</math>)</i>	<i>Nº total de célula de Leydig (<math>10^6</math>)</i>	<i>Nº de célula de Leydig /g de testículo (<math>10^6</math>)</i>
Grupo 1	7,48± 0,39 <b>a</b>	41,95 ± 6,73 <b>a</b>	7,5± 1,27 <b>a</b>	101± 18 <b>ac</b>	32± 5 <b>ab</b>
Grupo 2	7,14± 0,32 <b>a</b>	42,30 ± 5,88 <b>a</b>	6,6± 1,37 <b>ab</b>	142± 32 <b>ab</b>	43± 4 <b>ab</b>
Grupo 3	7,09± 0,42 <b>ab</b>	40,93 ± 12,97 <b>a</b>	6,5± 2,79 <b>ab</b>	151± 61 <b>ab</b>	48± 5 <b>a</b>
Grupo 4	6,47± 0,31 <b>c</b>	44,94 ± 10,69 <b>a</b>	4,7± 9,93 <b>b</b>	134± 74 <b>ac</b>	46± 5 <b>ab</b>
Grupo 5	6,70± 0,42 <b>bc</b>	38,50 ± 13,50 <b>a</b>	6,1± 1,46 <b>ab</b>	80± 31 <b>c</b>	30± 3 <b>b</b>

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si ( $p>0,05$ ).

Dados expressos em média± s.d.

Grupo 1- controle: tratado com 3 mL/dia de xarope de frutose e eutanaziado ao 53º dia; Grupo 2- tratado com 57mg/kg/dia de paracetamol e eutanaziado s ao 53º dia; Grupo 3- tratado com 114 mg/kg/dia de paracetamol e eutanaziado ao 53º dia; Grupo 4- tratado com 57mg/kg/dia e eutanaziado ao 106º dia; Grupo 5- tratado com 114mg/kg/dia paracetamol e eutanaziado ao 106º dia.

Os valores médios referentes ao ILS, ao peso das glândulas vesiculares e ao índice somático das glândulas vesiculares estão representados na Tabela 4 ( $p<0,05$ ). O maior valor para o ILS foi registrado no grupo 3 e os menores valores nos grupos 4 e 5. A redução do ILS no grupo 5 foi significativa em relação aos grupos 1, 2 e 3, já a redução do ILS no grupo 4 diferiu apenas dos grupos 2 e 3 ( $p<0,05$ ). Com relação ao peso das glândulas vesiculares não foram verificadas variações significativas ( $p>0,05$ ). Por outro lado, o ISGV reduziu de forma significativa o grupo 5 em relação aos demais ( $p<0,05$ ).

Tabela 4 – Massa Corporal, Índice Leydigossomático (ILS), Massa das glândulas vesiculares e Índice somático das glândulas vesiculares (ISGV) em ratos Wistar adultos tratados com paracetamol durante 53 dias.

<i>Tratamentos</i>	<i>Massa corporal(g)</i>	<i>ILS</i> (%)	<i>Massa das glândulas vesiculares (g)</i>	<i>ISGV (%)</i>
Grupo 1	433,24 ± 30,42 <b>a</b>	0,017± 0,003 <b>ab</b>	1,279 ± 0,20 <b>a</b>	0,297 ± 0,05 <b>a</b>
Grupo 2	434,10 ± 23,00 <b>a</b>	0,021± 0,005 <b>a</b>	1,181 ± 0,16 <b>a</b>	0,275 ± 0,03 <b>a</b>
Grupo 3	393,99 ± 52,37 <b>a</b>	0,022± 0,004 <b>a</b>	1,124 ± 0,02 <b>a</b>	0,285 ± 0,03 <b>a</b>
Grupo 4	454,79 ± 46,99 <b>a</b>	0,015± 0,009 <b>bc</b>	1,268 ± 0,15 <b>a</b>	0,280 ± 0,003 <b>a</b>
Grupo 5	458,71 ± 44,03 <b>a</b>	0,010± 0,004 <b>c</b>	1,214 ± 0,19 <b>a</b>	0,239 ± 0,003 <b>b</b>

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si ( $p>0,05$ ).

Dados expressos em média± s.d.

Grupo 1- controle: tratado com 3 mL/dia de xarope de frutose e eutanaziado ao 53º dia; Grupo 2- tratado com 57mg/kg/dia de paracetamol e eutanaziado s ao 53º dia; Grupo 3- tratado com 114 mg/kg/dia de paracetamol e eutanaziado ao 53ºdia; Grupo 4- tratado com 57mg/kg/dia e eutanaziado ao 106ºdia; Grupo 5- tratado com 114mg/kg/dia paracetamol e eutanaziado ao 106ºdia.

#### 4-Discussão

O compartimento intertubular representa a porção endócrina do testículo dos mamíferos. O arranjo e a proporção dos seus diferentes componentes, embora variem sobremaneira entre as diferentes espécies estudadas, são responsáveis pela manutenção dos níveis fisiológicos espécie específicos de andrógenos, tanto no fluido intersticial testicular, como nos níveis séricos (Fawcett *et al.*, 1973). A testosterona e a diidrotestosterona são andrógenos sintetizadas pelas células de Leydig responsáveis pela diferenciação do trato genital masculino e da genitália externa na fase fetal (Pelliniemi *et al.*, 1996), pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários e pela manutenção quantitativa da espermatogênese a partir da puberdade (Sharpe, 1994; Zirkin *et al.*, 1994).

No presente estudo, dentre os elementos do compartimento intertubular, o tecido conjuntivo e as células de Leydig apresentaram reduções de seus volumes totais nos animais do grupo 5, submetidos à administração crônica de doses supratrapêuticas de paracetamol e eutanaziados 53 dias após o término do tratamento (Tabela 2). Ainda que o volume individual das células de Leydig e o número total da célula de Leydig não tenham variado nos animais do grupo 5 em relação ao controle ( $p>0,05$ ), a sobreposição de ambos os parâmetros poderia explicar as reduções no volume total das células de Leydig no parênquima testicular ( $p<0,05$ ). Esta redução e a não variação da massa corporal dos animais, acarretaram a redução do ILS, ou seja, do percentual de massa

corporal alocado em células de Leydig nos animais submetidos à administração crônica de doses supraterapêuticas de paracetamol e eutanaziados 53 dias após o término do tratamento (Tabela 4).

Estudos correlacionando estrutura e função das células de Leydig em várias espécies de mamíferos mostraram que variações na secreção de testosterona resultam mais da capacidade individual desta célula em secretar andrógenos do que de diferenças no volume total das mesmas (Ewing *et al.*, 1979). Neste sentido, Costa e Paula (2006) correlacionaram positiva e significativamente o volume individual da célula de Leydig com o nível sérico de testosterona na capivara. Para Zirkin *et al.* (1980), a capacidade produtiva da célula de Leydig está altamente relacionada à quantidade de retículo endoplasmático liso presente nesta célula. Castro *et al.* (2002) descreveram que, em coelhos, existe uma correlação altamente significativa do percentual volumétrico do núcleo e do número de células de Leydig por grama de testículo, com os níveis plasmáticos e testiculares de testosterona.

Os andrógenos testiculares, em especial a diidrotestosterona são amplamente responsabilizados pela manutenção funcional das glândulas sexuais acessórias e do epidídimo, neste sentido, alterações volumétricas nas glândulas vesiculares podem ser utilizadas na estimativa de variações séricas dos níveis de andrógenos testiculares. (Luke & Coffey, 1994; Fan & Robaire, 1998; Goyal *et al.*, 1999; Costa & Paula, 2006).

Na presente experimentação, é pouco provável que a redução do volume individual das células de Leydig e do diâmetro do núcleo de células de Leydig ( $p < 0,05$ ) nos animais do grupo 4, submetidos à administração crônica de doses terapêuticas de paracetamol, tenha influenciado os níveis séricos de testosterona, visto que, nestes animais, não foram verificadas variações no ILS, na massa das glândulas vesiculares e no ISGV ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, nos animais do grupo 5, a diminuição do volume total das células de Leydig, dos núcleos das células do Leydig, do diâmetro do núcleo de células de Leydig e do ILS ( $p > 0,05$ ), embora não tenham sido acompanhadas de redução na massa das glândulas vesiculares em relação aos demais grupos estudados ( $p > 0,05$ ), correlacionaram-se com redução do índice somático das glândulas vesiculares (ISGV) ( $p < 0,05$ ). Neste sentido, animais sob a administração crônica de doses supraterapêuticas de paracetamol e sacrificados 53 dias após o tratamento, apresentaram provável comprometimento em seus níveis séricos de andrógenos testiculares. Alterações semelhantes são sugeridas por Ratnasooriya & Jayakody (2000), que observaram que doses supraterapêuticas diárias (500 ou 1000mg/Kg) de paracetamol

administradas durante 30 dias não acarretaram reduções na massa das glândulas acessórias, porém resultaram em redução da libido, do vigor sexual e da performance sexual em ratos adultos.

## **5-Conclusão**

A administração crônica de doses supraterapêuticas de paracetamol afetou a porção endócrina do testículo nos animais sacrificados 53 dias após o tratamento. Dentre as alterações verificadas nestes animais, a redução do volume das células de Leydig, do núcleo das células de Leydig, do diâmetro do núcleo de células de Leydig, do índice Leydigossomático e do índice somático das glândulas vesiculares sugerem que doses crônicas supraterapêuticas de paracetamol possam afetar tardiamente a produção de andrógenos pelas células de Leydig.

## **6-Referências Bibliográficas**

BRUNTON L.L., LAZO J. S. AND PARKER K.L., 2003. Goodman & Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica. 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, seção IV, p.483-551.

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

COSTA D.S. AND PAULA T.A.R., 2006 Testosterone level, nasal gland volume and Leydig cell morphometry in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 58 (6), p.1086-1094.

ELDON M. AND BOYD E. M., 1970. Testicular atrophy from analgesics drugs. Journal of Clinical Pharmacology, 10, p. 222-227.

EWING L.L. et al., 1979. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea, pig, dog and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. Endocrinology, 105(5), p.1135-1142.

FAN X. AND ROBAIRE B., 1998. Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinology*, 139, p.2128-2136.

FAWCETT D.W., NEAVES W.B. AND FLORES M.N., 1973. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of Reproduction*, 9, p.500-532

GOYAL H.O. et al., 1999. Postnatal differentiation of ductus deferents, tail of the epididymis and distal body of epididymis in goats occurs independently of rete testis fluids. *Anatomical Records*, 254, p.508-520.

HOIVIK D.J. et al, 1995. Gender-related differences in susceptibility to acetaminophen-induced toxicity protein arylation and nephrotoxicity in the CD-1 mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 130, p.257-271.

HU J.J. et al., 1993. Sex-related differences in mouse renal metabolism and toxicity of acetaminophen. *Toxicology and Applied Pharmacol*, 122(1), p.16-26.

JAQUESON A. et al., 1984. Effects of daily high doses of paracetamol given orally during spermatogenesis in the rat testes. *Archives of Toxicology Supplement*, 7, p.164-166.

JONHSON L., PETTY C.S AND NEAVES W.B, 1981. A new approach to qualification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. *Biology of Reproduction* 25, p.217-226.

LUKE M.C. AND COFFEY D.S., 1994. The male sex accessory tissue: structure, androgen action and physiology. IN: KNOBIL E., NEIL J.D. (eds). *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, 1 (23), p.1435-1488.

MCMURTRY R.J., SNOGDRASS W.R. AND MITCHELL J.R., 1978. Renal necrosis, glutathione depletion and covalent binding after acetaminophen. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 46, p. 87-100.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 1993. NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Acetaminophen in F344/N rats and B6C3F1 Mice. National Toxicology Program Technical Reports Series, 394, p.1-274.

PLACKE M.E., WYAND DS. AND COHEN SD., 1987. Extrahepatic lesions induced by acetaminophen in the mouse. *Toxicologic Pathology*, 15(4), p. 381-387.

PRESCOTT L.F., 1983. Paracetamol overdose. Pharmacological considerations and clinical management. *Drugs*, 25, p.290-314.

RATNASOORIYA W.D. AND JAYAKODY J.R.A.C., 2000. Long-term administration of large doses of paracetamol impairs the reproductive competence of male rats. *Asian Journal of Andrology*, 2, p.247-255.

SAVIDES M.C. AND OEHME F.W., 1983. Acetaminophen and its toxicity. *Journal of Applied Toxicology*, 3, p.96-111.

SHARPE, R.M., 1994. Regulation of spermatogenesis. IN: KNOBIL. E, NEILL, J.D. (eds.). *The physiology of reproduction*, 2<sup>th</sup> ed. New York: Raven Press, 1 (22), p.1363-1434.

SHEEN C.L. et al., 2002. Paracetamol toxicity: epidemiology, prevention and costs to the health-care system. *The Quarterly Journal of Medicine*, 95, p.609-619.

THOMAS, S.H.L., 1993. Paracetamol (acetaminophen) poisoning. *Pharmacology & Therapeutics*, 60, p.91-120.

WIGER R., et al., 1995. Effects of acetaminophen and hydroxyurea on spermatogenesis and sperm chromatin structure in laboratory mice. *Reproductive Toxicology*, 9 (1), p. 21-33.

YANO, C. L. AND DOLDER, H., 2002. Rat testicular structure and ultrastructure after paracetamol treatment. *Contraception*, 66, p. 463-467.

ZIRKIN B.R. et al., 1980. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig and hamster testes perfused in vitro: Correlation with Leydig cell ultrastructure. *Endocrinology* 107, p.1867-1874.

ZIRKIN B.R. et al., 1994. Is FSH required for adult spermatogenesis? *Journal of Andrology*, 15, p.273-276.

## CONCLUSÕES GERAIS

A administração crônica do paracetamol em doses terapêuticas (cerca de 657mg/Kg/dia) e supraterapêuticas (cerca de 114mg/Kg/dia) em ratos Wistar sacrificados 53 dias após o tratamento influenciou aspectos biométricos testiculares e quantitativos do parênquima testicular quando comparados com o grupo controle.

Independentemente da dose utilizada, o paracetamol causou redução do IGS, do ITS e da altura do epitélio germinativo, a qual foi observada no processo espermatogênico seguinte ao período de exposição à droga.

Apenas nos animais tratados com doses supraterapêuticas de paracetamol, houve redução também tardia, do volume dos túbulos seminíferos, do peso total do testículo e no peso do parênquima testicular, do volume do tecido conjuntivo, do volume do núcleo de células de Leydig, do diâmetro do núcleo de células de Leydig, do índice Leydigossomático e do índice somático das glândulas vesiculares.

As alterações observadas acima sugerem que o uso crônico do paracetamol possa afetar tardiamente a produção espermática, independentemente da dose, e a produção de andrógenos pelas células de Leydig, em doses supraterapêuticas.