

**ANDRÉA COSTA GOULART**

**EFEITO DO ROACUTAN® (ISOTRETINOÍNA) SOBRE O APARELHO  
REPRODUTOR DE RATOS WISTAR ADULTOS**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

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

T

G694e  
2013

Goulart, Andréa Costa, 1970-  
Efeito do Roacutan<sup>®</sup> (isotretinoína) sobre o aparelho  
reprodutor de ratos Wistar adultos / Andréa Costa Goulart.  
– Viçosa, MG, 2013.  
xvi, 63f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Rato - Reprodução. 2. Rato - Testículos. 3. Testículos.  
4. Isotretinoína. 5. Retinóides. 6. Medicamentos - Toxicologia.  
7. Espermatogênese em animais. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Animal. II. Título.

CDD 22. ed. 599.35

**ANDRÉA COSTA GOULART**

**EFEITO DO ROACUTAN® (ISOTRETINOÍNA) SOBRE O APARELHO  
REPRODUTOR DE RATOS WISTAR ADULTOS**

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

APROVADA: 28 de fevereiro de 2013.

---

Clóvis Andrade Neves

---

Ita de Oliveira Silva

---

Sérgio Luis Pinto da Matta  
(Orientador)

Dedico este trabalho  
aos meus amados pais, Ilma e Manoel (in memoriam).

Ao meu marido, Luiz Carlos.

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;  
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.

As facilidades nos impedem de caminhar.

Mesmo as críticas nos auxiliam muito.

Chico Xavier

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pelo amor incondicional, e por ter me dado discernimento para superar todos os momentos difíceis, e esperança quando quase já não havia.

A Maria, Mãe de Jesus e nossa Mãe, sempre protetora e amável, ensinando-me a amar verdadeiramente.

À minha mãe, tesouro mais precioso que tenho, pelo amor incondicional, carinho, apoio e compreensão em tantos momentos de ausência. Obrigada por tudo!

Ao meu pai, pelos valores de vida que me ensinou com tanta sabedoria e que certamente me auxiliaram muito nesta caminhada. Sinto-o vivo em cada passo que dou me amparando e iluminando; essa vitória também é sua! Saudades eternas!

Ao meu marido Luiz Carlos, por todo apoio, pela paciência, pelo amor verdadeiro e carinho incessante. Sem a sua ajuda e compreensão não conseguiria mais esta vitória. Obrigada por existir em minha vida. Te amo!

À minha família, pelo carinho e incentivo, principalmente à tia Dú pelos ensinamentos e pela grande contribuição na correção ortográfica deste trabalho.

Às minhas amigas, Katiely, Adymila, Micaela, Évelin e Jéssika, com as quais compartilhei momentos de tristezas, angústias e ansiedade, e que sempre estiveram prontas a me escutar e ajudar, me dando forças para enfrentar as dificuldades e os obstáculos.

À professora Elisângela Helena Souza pela disponibilidade na elaboração e correção do abstract deste estudo.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Patológica e demais setores do Hospital do Câncer de Muriaé pelo apoio.

À Universidade Federal de Viçosa e ao curso de Pós Graduação em Biologia Animal pela brilhante contribuição na capacitação de novos profissionais.

Ao Dr. Maurício Drummond Alves, médico hematologista da Fundação Cristiano Varella, Hospital do Câncer de Muriaé, pela disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos para complementar este estudo.

Ao meu querido orientador, Sérgio da Matta, um grande mestre e um amigo sempre pronto a me ouvir, incentivando-me e oportunizando-me experiências positivas. Foi uma honra ter a oportunidade de desenvolver este trabalho sob sua orientação. Sempre o terei como um exemplo de pesquisador íntegro, envolvido, criterioso e ético. Sou e serei eternamente grata pela sua paciência, confiança, compreensão, pelos seus ensinamentos e pela carinhosa acolhida neste Laboratório de Biologia Celular e Estrutural desde minha graduação.

Às professoras e coorientadoras, Mariana Machado Neves e Mariella Bontempo Duca de Freitas, pela grande contribuição para com este trabalho.

Aos professores dos cursos de Pós Graduação em Biologia Animal e Medicina Veterinária pelos ensinamentos adquiridos durante o curso.

Aos professores da banca, Clóvis Andrade Neves e Ita de Oliveira Silva, pela disponibilidade e pelas considerações que certamente contribuirão para melhoria deste trabalho.

Aos professores do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV pela colaboração na análise do material histológico, no uso de equipamentos e materiais e pelo exemplo de profissionalismo.

À minha ex-professora de graduação e amiga, Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo, com quem aprendi que trabalhar com ética e profissionalismo vale a pena, sempre. Obrigada por ter me apresentado a um mundo novo, pelo incentivo em aprimorar a cada dia meus conhecimentos!

Aos funcionários do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), por disponibilizarem tempo e cuidados imprescindíveis para execução do experimento.

Ao laboratório de Citogenética de Insetos, por ceder espaço e equipamento para captura das imagens.

Às amigas Susana e Camila, que auxiliaram no tratamento dos animais e pela imensa contribuição durante o decorrer do experimento, dividindo tantas responsabilidades comigo. A colaboração de vocês foi determinante neste trabalho. Obrigada, de coração!

À amiga Sanely “FB”, exemplo de determinação e otimismo, pelos ensinamentos, incentivo, e amparo nas horas mais difíceis! Obrigada!

À aluna Isabela Rossi, que disponibilizou seu tempo auxiliando nas análises de intertúbulo.

A todos os amigos do laboratório de Biologia Celular e Estrutural, pela convivência agradável e pelos momentos de descontração.

A todos aqueles que fizeram parte da minha história, mas que por motivos diversos não compartilham mais do meu convívio, meus sinceros agradecimentos.

Finalmente, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho... muito obrigada!!!

## **BIOGRAFIA**

Andréa Costa Goulart, filha de Manoel da Silveira Goulart e Ilma Rodrigues Costa Goulart, nasceu em Juiz de Fora, Minas Gerais, em 22 de março de 1970.

Em dezembro de 2002 graduou-se como Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), campus de Carangola, Minas Gerais. Durante sua graduação, desenvolveu trabalho laboratorial na área de hematologia.

Em março de 2004, concluiu o curso de Pós-Graduação Lato Sensu em nível de especialização em Citologia Clínica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro - RJ, defendendo monografia intitulada “Associação do Papilomavírus com neoplasias malignas do colo uterino”.

Em agosto de 2010 ingressou no programa de Mestrado em Biologia Animal, área de conhecimento morfologia, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, defendendo a dissertação em 28 de fevereiro de 2013.

## SUMÁRIO

	<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>x</b>
	<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>xii</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>xv</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvi</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Vitaminas.....</b>	<b>2</b>
<b>2.2</b>	<b>Retinol e Ácido Retinoico.....</b>	<b>3</b>
<b>2.3</b>	<b>Isotretinoína como Tratamento Sistêmico da Acne.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3.1</b>	<b>História, Uso Terapêutico e Propriedades Farmacológicas.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Mecanismos de Ação, Metabolismo, Distribuição e Excreção.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Toxicidade e Efeitos Adversos da isotretinoína.....</b>	<b>8</b>
<b>2.4</b>	<b>Biomarcadores.....</b>	<b>9</b>
<b>2.5</b>	<b>Testículo.....</b>	<b>10</b>
<b>2.6</b>	<b>Espermatogênese.....</b>	<b>12</b>
<b>2.7</b>	<b>Células de Sertoli.....</b>	<b>14</b>
<b>2.8</b>	<b>Células de Leydig.....</b>	<b>15</b>
<b>2.9</b>	<b>Análises dos Efeitos da Isotretinoína sobre Testículos.....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>18</b>
	<b>ARTIGO 1 – EFEITO DA ISOTRETINOÍNA (ÁCIDO 13-CIS-RETINOICO) SOBRE A HISTOMORFOMETRIA DE TÚBULOS SEMINÍFEROS, DE GLÂNDULAS ACESSÓRIAS E QUALIDADE ESPERMÁTICA DE RATOS WISTAR ADULTOS.....</b>	<b>23</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>23</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1</b>	<b>Animais, Grupos Experimentais e Tratamento.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2</b>	<b>Diluição do Roacutan® 20mg.....</b>	<b>25</b>
<b>2.3</b>	<b>Coleta das Amostras.....</b>	<b>26</b>

<b>2.4</b>	<b>Análises Biométricas e Morfométricas.....</b>	<b>26</b>
2.4.1	Peso do Parênquima Testicular e Índice Gonadossomático.....	27
2.4.2	Proporções Volumétricas (%); Volume do Compartimento do Parênquima Testicular e Índice Tubulossomático (%)......	27
2.4.3	Diâmetro Tubular e Altura do Epitélio Seminífero.....	28
2.4.4	Comprimento total dos Túbulos Seminíferos e Comprimento de Túbulo por Grama de Testículo.....	28
<b>2.5</b>	<b>Avaliação Espermática.....</b>	<b>28</b>
2.5.1	Morfologia Espermática (%)......	28
2.5.2	Avaliação da Integridade Estrutural da Membrana Plasmática e Acrossomal dos Espermatozoides (%)......	29
2.5.3	Motilidade total (%) e Concentração Espermática.....	29
<b>2.6</b>	<b>Análises Estatísticas.....</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>

	<b>ARTIGO 2 – HISTOMORFOMETRIA DO COMPARTIMENTO INTERTUBULAR DE RATOS WISTAR ADULTOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM ROACUTAN®.....</b>	<b>44</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>44</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
<b>2.1</b>	<b>Animais, Grupos Experimentais e Tratamento.....</b>	<b>46</b>
<b>2.2</b>	<b>Diluição do Roacutan® 20mg.....</b>	<b>47</b>
<b>2.3</b>	<b>Coleta das Amostras.....</b>	<b>47</b>
<b>2.4</b>	<b>Análises Morfométricas.....</b>	<b>47</b>
2.4.1	Proporção Volumétrica (%) e Volume dos Elementos do Intertúbulo.....	48
2.4.2	Morfometria da Célula de Leydig e biometria da próstata.....	48
<b>2.5</b>	<b>Determinação dos Níveis Plasmáticos de Testosterona.....</b>	<b>49</b>
<b>2.6</b>	<b>Análises Estatísticas.....</b>	<b>50</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>

<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>57</b>
	<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>62</b>
	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>63</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Algumas funções dos retinoides.....	3
Figura 2. Conversão do retinol a ácido retinoico.....	4
Figura 3. Estrutura molecular da isotretinoína (ácido 13-cis-retinoico), o princípio ativo do Roacutan®.....	6
Figura 4. Mecanismos de ação do 13-cis-AR .....	7
<b>Artigo 1 Efeito da isotretinoína (ácido 13-cis-retinoico) sobre a histomorfometria de túbulos seminíferos, de glândulas acessórias e qualidade espermática de ratos Wistar adultos</b>	
Figura 1. Fluorescência dos espermatozoides.....	35
<b>Artigo 2 Histomorfometria do compartimento intertubular de ratos Wistar adultos submetidos ao tratamento com Roacutan®</b>	
Figura 1. Determinação dos níveis plasmáticos de testosterona.....	54

## LISTA DE TABELAS

### **Artigo 1. Efeito da isotretinoína (ácido 13-cis-retinoico) sobre a histomorfometria de túbulos seminíferos, de glândulas acessórias e qualidade espermática de ratos Wistar adultos**

- Tabela 1. Características biométricas e morfométricas de ratos Wistar em idade reprodutiva, após tratamento com Roacutan® (isotretinoína)..... 31
- Tabela 2. Proporção volumétrica e volume dos compartimentos do parênquima testicular de ratos Wistar em idade reprodutiva, após tratamento com Roacutan® (isotretinoína)..... 31
- Tabela 3. Índice Gonadossomático (IGS) e Tubulossomático (ITS) de ratos Wistar em idade reprodutiva, após tratamento com Roacutan® (isotretinoína)..... 32
- Tabela 4. Diâmetro tubular (DT), altura do epitélio seminífero (AE); comprimento total dos túbulos seminíferos (CTT) e comprimento total dos túbulos por grama de testículo (CTT/g) de ratos Wistar em idade reprodutiva, após tratamento com Roacutan® (isotretinoína)..... 33
- Tabela 5. Avaliação morfológica dos espermatozoides da cauda do epidídimo de ratos Wistar tratados com Roacutan® (isotretinoína) em diferentes concentrações por 60 dias..... 33
- Tabela 6. Avaliação da integridade estrutural de membranas de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de ratos Wistar tratados com Roacutan® (isotretinoína) por 60 dias, utilizando fluorocromos Iodeto de Propídio (PI) e Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA)..... 34
- Tabela 7. Motilidade total (MT) e concentração espermática (CE) de ratos Wistar tratados com Roacutan® (isotretinoína) por 60 dias..... 35

### **Artigo 2 Histomorfometria do compartimento intertubular de ratos Wistar adultos submetidos ao tratamento com Roacutan®**

- Tabela 1. Proporção volumétrica (PV%) dos elementos constituintes do intertúbulo..... 50
- Tabela 2. Proporção volumétrica (PV%) de intertúbulo e de seus elementos no testículo..... 51
- Tabela 3. Volume do intertúbulo e de seus elementos constituintes por testículo (mL)... 52
- Tabela 4. Volume dos elementos do intertúbulo (mL) por grama de testículo..... 53
- Tabela 5. Morfometria das células de Leydig e biometria da próstata ..... 54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH	Enzima Microsossomal Álcool Dehidrogenase
AE	Altura do Epitélio Seminífero
ALDH	Enzima Aldeído Dehidrogenase
AR	Ácido Retinoico
ATRA	All-trans-AR
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CE	Concentração Espermática
CEUA/UFV	Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa
CFDA	Carboxyfluorescein Diacetate (Diacetato de Carboxifluoresceína)
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CRABP	Cellular Retinoic Acid-binding Protein
CTT	Comprimento Total dos Túbulos Seminíferos
CYP	Citocromo P450
DC	Defeito na Cabeça
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DT	Diâmetro Tubular
DVE	Densidade Volumétrica Epitelial
DVT	Densidade Volumétrica de Túbulo Seminífero
EC	Enrolamento da Cauda
FSH	Follicle-Stimulating Hormone (Hormônio Folículo Estimulante)
GCD	Gota Citoplasmática Distal
GCP	Gota Citoplasmática Proximal
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormone (Hormônio Liberador de Gonadotrofina)
HDL	High-Density Lipoprotein (Lipoproteína de Alta Densidade)
IGS	Índice Gonadossomático
ILS	Índice Leydigossomático
IP	Iodeto de Propídio
ITS	Índice Tubulossomático
LDL	Low-Density Lipoprotein (Lipoproteína de Baixa Densidade)

LH	Luteinizing Hormone (Hormônio Luteinizante)
MS	Ministério da Saúde
MT	Motilidade Total
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo)
NLY/GT	Número de Células de Leydig por Grama de Testículo
NLY/T	Número de Células de Leydig por Testículo
nPI	Número Total de Pontos sobre Intertúbulo
PA	Peso da Albugínea
PC	Peso Corporal
PG	Peso das Gônadas
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Propidium Iodide (Iodeto de Propídio)
PIFD	Peça Intermediária Fortemente Dobrada
PIFRD	Peça Intermediária Fracamente Dobrada
PIQ	Peça Intermediária Quebrada
PPar	Peso do Parênquima
PT	Peso do Testículo
RAR	Receptor de Ácido Retinoico
RIA	Radioimunoensaio
RNA	Ácido Ribonucleico
RNP	Relação Nucleoplasmática
RXR	Receptor de Retinoide X
SAS	Secretaria de Atenção à Saúde
SNK	Student Newman-Keuls
TIT	Testosterona Intratesticular
TT	Testosterona
TRIS	Solução Tampão Tris (Hidroximetil) Aminometano
UPS	Unidade Pilosebácea
VLY	Volume de Célula de Leydig
VCT	Volume Citoplasmático

VEG	Volume do Epitélio Germinativo
VEIT	Volume dos Elementos do Intertúbulo por Testículo
VEIT/G	Volume dos Elementos do Intertúbulo por Grama de Testículo
VLDL	Very-Low-Density Lipoprotein (Lipoproteína de Muito Baixa Densidade)
VLY/T	Volume de Células de Leydig por Testículo
VNU	Volume Nuclear
VTL	Volume de Célula de Leydig no Testículo
VTS	Volume Total de Túbulos Seminíferos

## RESUMO

GOULART, Andréa Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Efeito do Roacutan® (isotretinoína) sobre o aparelho reprodutor de ratos Wistar adultos.** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta. Coorientadores: Mariana Machado Neves e Mariella Bontempo Duca de Freitas.

O uso de drogas para tratamento da acne é cada vez mais frequente, destacando-se a eficácia do fármaco Roacutan® 10 e 20mg, um retinoide que contém em sua fórmula uma substância derivada da vitamina A, a isotretinoína (ácido 13-cis-retinóico), que melhora os aspectos clínicos da acne grave e está associada à supressão da atividade e diminuição do tamanho das glândulas sebáceas. Diversos estudos demonstram que o Roacutan® é teratogênico durante seu uso ou mesmo até um mês após sua interrupção, porém são escassos e inconclusivos os relatos em literatura que comprovem sua toxicidade ao aparelho reprodutor masculino. Este estudo investigou a ação tóxica do fármaco sobre a morfofisiologia do aparelho reprodutor de ratos Wistar adultos. Vinte e quatro ratos adultos foram distribuídos em três grupos: dois grupos tratados e um grupo controle. Os animais dos grupos tratados foram submetidos ao tratamento com a administração por gavagem de 0,2mg e 0,4mg de Roacutan® em 1,0mL de óleo de soja/animal respectivamente, uma vez por dia, durante 60 dias. Os animais do grupo controle receberam também por gavagem 1,0mL de água/animal/dia. Os animais foram eutanasiados 60 dias após a primeira exposição, sendo feitas análises de biometria corporal, órgãos reprodutores, além de estereologia testicular, avaliação espermática e dosagem de testosterona sérica. As doses terapêuticas de Roacutan® mostraram pouca interferência sobre os túbulos seminíferos, sendo necessárias análises da população celular para se obter detalhes da ação deste fármaco neste compartimento. Entretanto, o tratamento com Roacutan® em ambas as doses causou aumento do compartimento tubular, redução do compartimento intertubular, do percentual de macrófagos, do número de células de Leydig e, conseqüentemente, reduziu os níveis de testosterona plasmática e o peso da próstata. Conforme avaliação do medicamento sobre a viabilidade espermática houve prejuízo na integridade das membranas espermáticas acompanhado da baixa motilidade total dos espermatozoides. A administração deste fármaco deve ser criteriosa uma vez que pareceu exercer efeito tóxico afetando a porção endócrina testicular.

## ABSTRACT

GOULART, Andréa Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2013. **Effect of Roaccutane® (isotretinoin) on the reproductive system of adult rats Wistar.** Advisor: Sérgio Luis Pinto da Matta. Co-advisers: Mariana Machado Neves and Mariella Bontempo Duca de Freitas.

The use of drugs for acne's treatment is ever more common, emphasizing the efficacy of the drug Roaccutane®, a retinoid which contains a substance in its formula derivative of vitamin A, the isotretinoin (13-cis-retinoic acid), which improves the clinical aspects of severe acne and it is associated with the activity suppression and decreasing of the sebaceous gland size. Several studies demonstrate that Roaccutane® is teratogenic during its use or even up to a month after its discontinuation, but reports in that literature which proving its toxicity to the male reproductive system are rare and inconclusive. This study investigated the toxic action of the drug on adult Wistar rat testicular morphophysiology. Twenty-four adult rats were divided into three groups: two treated groups and one control group. The animals of the treated group were submitted with gavage administration of 0,2mg and 0,4mg of Roaccutane® in 1,0 mL of soybean oil respectively, once a day, for 60 days. The animals in the control group also were treated with gavage administration of 1,0 mL of water/animal/day. The animals were euthanized 60 days after the first exposure, it was being made biometrics analyzes of the body and reproductive organs, and testicular stereology and morphometry, sperm evaluation and serum testosterone measurement. Therapeutic doses of Roaccutane® showed little interference on the seminiferous tubules, requiring analysis of the cell population to obtain details of the action of this drug in this compartment. However, treatment with Roaccutane® at both doses caused an increase in tubular compartment and reducing the intertubular compartment, the percentage of macrophages, the number of Leydig cells and hence reduced plasma testosterone levels and prostate weight. According to the evaluation of the drug on sperm viability there was damage in the integrity of the sperm membrane accompanied by low sperm motility total. The administration of this drug should be careful since it seemed to exert toxic effects affecting a testicular endocrine portion.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O testículo de mamíferos é uma glândula mista, suscetível a agentes tóxicos ambientais ou terapêuticos que podem comprometer a espermatogênese por diferentes mecanismos, como alterações na espermiogênese, indução de apoptose nas células germinativas, azoospermia e até infertilidade (Pannocchia et al., 2008).

O uso de drogas para tratamento da acne é cada vez mais frequente, destacando-se a eficácia do fármaco Roacutan® 10 e 20 mg, um retinoide que contém em sua fórmula uma substância derivada da vitamina A, a isotretinoína (ácido 13-cis-retinoico), que melhora os aspectos clínicos da acne grave e está associada à supressão da atividade e diminuição do tamanho das glândulas sebáceas (Centralx Bulas, 2013).

O ácido retinoico (AR) é um metabólito ativo da vitamina A que regula a taxa de crescimento e diferenciação de vários tipos celulares. Devido à possibilidade das configurações cis-trans da cadeia lateral, existem vários isômeros do ácido retinoico tais como o all-trans-AR (tretinoína), 13-cis-AR (isotretinoína) e 9-cis-AR (alitretinoína) (Coelho et al., 2003).

A isotretinoína somente deve ser prescrita por médicos que tenham experiência no uso de retinoides sistêmicos por apresentar uma série de contraindicações e efeitos colaterais, necessitando o paciente de rigoroso acompanhamento. Os efeitos colaterais mais comuns são alteração de pele e mucosas, como ressecamento, prurido e hipertrigliceridemia. Outros possíveis efeitos são anorexia, cefaleia, pseudotumor cerebral, queda de cabelo, hemorragia, anemia, distúrbios psiquiátricos e do sistema nervoso central. O Roacutan® é teratogênico durante seu uso ou mesmo até um mês após sua interrupção e, por este motivo, não deve ser administrado a mulheres grávidas ou mulheres em idade fértil, a menos que apresentem acne cística severa e desfigurante que não responda às terapias-padrão. Para maioria dos pacientes, o tratamento recomendado é de 16 a 24 semanas e as doses variam de 0,5 a 1,0 mg/kg/dia, sendo que em pacientes com doença muito grave as doses diárias podem chegar até 2,0 mg/kg (Centralx Bulas, 2013).

Este medicamento é amplamente utilizado por homens, porém são escassos e inconclusivos os relatos em literatura que comprovem sua toxicidade ao aparelho reprodutor masculino. Dentro desse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação tóxica do fármaco sobre a morfofisiologia do aparelho reprodutor de ratos Wistar adultos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Vitaminas**

As vitaminas são compostos orgânicos requeridos pelo corpo em quantidades mínimas para realizar funções celulares específicas e podem ser classificadas de acordo com sua solubilidade e suas funções no metabolismo (Champe et al., 2000). As vitaminas são classificadas principalmente em lipossolúveis e hidrossolúveis (Paixão & Stamford, 2004).

As vitaminas hidrossolúveis são compostas pelo grupo B, vitamina C e a Colina. A maioria das vitaminas hidrossolúveis é componente do sistema de enzimas essenciais. São envolvidas em reações de manutenção do metabolismo energético e armazenadas no organismo em grandes quantidades. São excretadas em pequenas quantidades na urina (Giacomini, 2006).

Quatro vitaminas: A, D, E e K, são denominadas lipossolúveis. Estas vitaminas são liberadas, absorvidas e transportadas com a gordura da dieta. Elas não são facilmente excretadas na urina, sendo que quantidades significativas são armazenadas no fígado e tecido adiposo (Champe et al., 2000).

A vitamina A e seus derivados exercem uma infinidade de efeitos em diversos processos biológicos, destacando-se a reprodução, visão, regulação de processos inflamatórios, crescimento, proliferação e diferenciação de células normais e neoplásicas (Napoli, 1999). A ligação dos retinoides a receptores específicos, leva à mudança (ativação ou inibição) na expressão de genes que medeiam diferentes efeitos biológicos como proliferação, apoptose e diferenciação celular. Estes efeitos são dependentes da expressão dos receptores específicos, do tipo e concentração dos compostos retinoides presentes na célula, da expressão das proteínas de ligação e das enzimas responsáveis pelo metabolismo dos retinoides (Fig. 1; Napoli, 1999; Bonet et al, 2003).

Palace et al. (1999) descreveram a ação protetora da vitamina A em diversas doenças, relacionando a sua capacidade de neutralizar formas tóxicas de oxigênio e outros radicais livres em sistemas biológicos. A vitamina A também é essencial para diferenciação normal dos tecidos epiteliais e para a secreção mucosa (Champe et al., 2000). Livera et al. (2002) descreveram que esta vitamina atua ainda protegendo o epitélio germinativo de machos e estabilizando a integridade das membranas celulares. Por outro lado, o excesso de vitamina A induz citotoxicidade testicular e infertilidade (Livera et al., 2002).

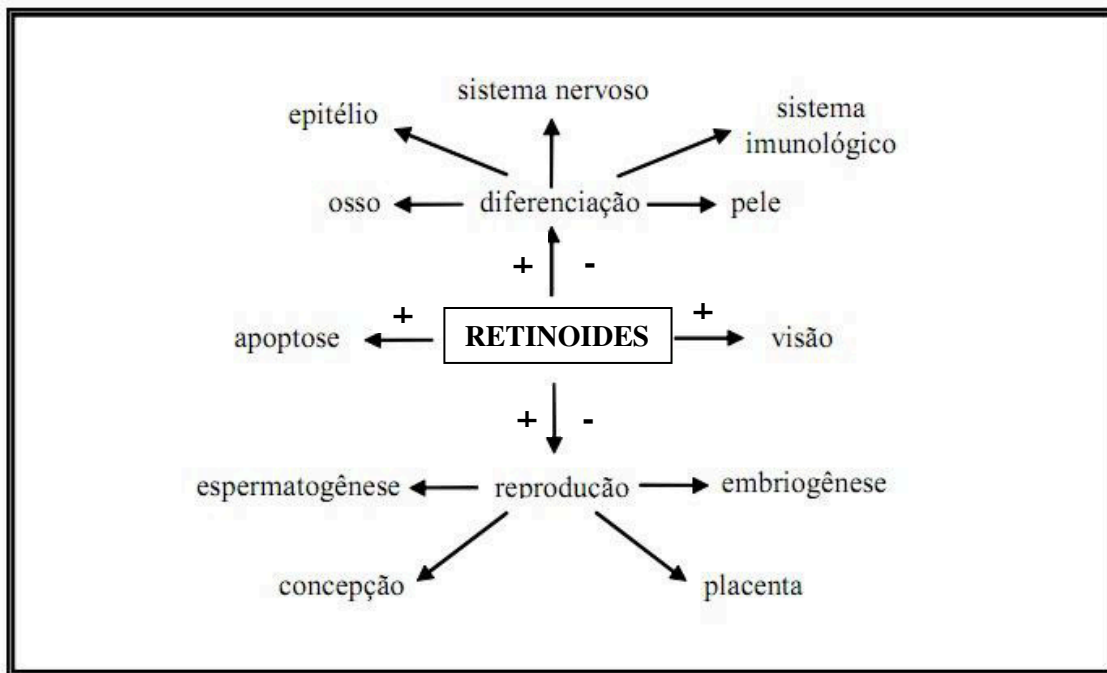


Figura 1. Algumas funções dos retinoides (adaptado de Napoli, 1999). (+) estimulação; (-) inibição

O termo “retinoides” inclui as formas naturais e sintéticas da vitamina A que podem ou não exibir sua atividade biológica (Champe et al., 2000). Três compostos – vitamina A álcool (retinol), vitamina A aldeído (retinal), vitamina A ácido (ácido retinoico) – e alguns outros ésteres isômeros possuem atividade de vitamina A para frangos e diversos animais experimentais como ratos (Giacomini, 2006).

## 2.2 Retinol e Ácido Retinoico

O retinol, a forma álcool da vitamina A, é convertido no fígado e em outros tecidos em ácido retinoico (AR). A rota mais bem estabelecida de metabolização envolve a conversão reversível de retinol a retinal que, por sua vez, é irreversivelmente convertido a ácido retinoico. A conversão oxidativa de retinol a retinal é mediada pela família de enzimas microssomais álcool desidrogenases (ADH), enzimas que utilizam  $\text{NAD}^+$  como cofator, gerando NADH. O passo subsequente, a conversão de retinal a AR, é mediada pela ação das enzimas aldeído desidrogenase (ALDH) e por isoenzimas da família P450 (CYP) (Wang, 2005; Figura 2).

Segundo Napoli et al. (1999), há evidências que o retinol pode dar origem diretamente a ácido retinoico sem a presença de retinal como intermediário.

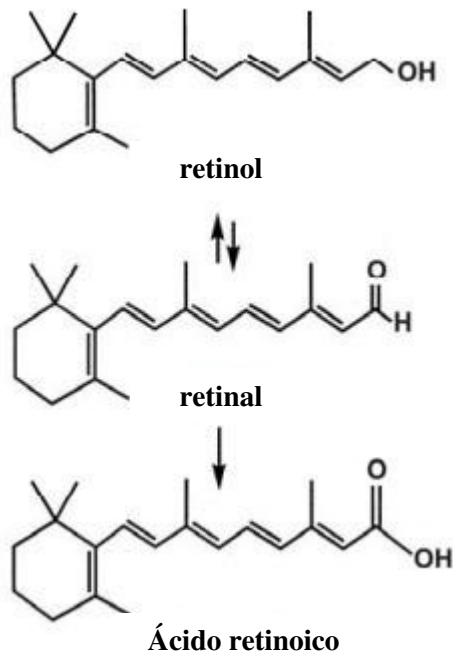


Figura 2. Conversão do retinol a ácido retinoico (Adaptado de Napoli, 1999).

Retinoides são importantes reguladores da diferenciação e proliferação epidérmica. Como moléculas lipofílicas, eles difundem através das membranas celulares, ligando-se a receptores nucleares e modulando a expressão de genes responsáveis pela diferenciação celular (Sorg et al., 2006), normalizando a queratinização folicular e sinais pró-inflamatórios na unidade pilossebácea (UPS; Jain, 2004).

Derivados sintéticos da vitamina A (retinol), apresentam papel fundamental no tratamento da acne, porque agem na lesão primária, o microcomedão, além de seu importante papel na supressão sebácea (Chivot, 2005).

Além da formação de ácido retinoico a partir de retinal, o retinol, potente fator de transcrição e uma das formas mais ativas de retinoide, pode ser extraído pela maioria das células a partir do plasma, onde ele é transportado ligado à albumina (Frota Junior, 2005).

O ácido retinoico é um metabólito ativo da vitamina A que regula a taxa de crescimento e diferenciação de vários tipos celulares. Devido à possibilidade das configurações cis-trans da cadeia lateral, existem vários isômeros do AR: all-trans-AR (tretinoína), 13-cis-AR (isotretinoína) e 9-cis-AR (alitretinoína; Marcus et al., 2000).

A ação do AR é obtida através da ligação com receptores específicos, que fazem parte da superfamília de receptores nucleares (Coelho et al., 2003).

## 2.3 Isotretinoína como Tratamento Sistêmico da Acne

### 2.3.1 História, Uso Terapêutico e Propriedades Farmacológicas

Em 1955 foi sintetizada a isotretinoína ou ácido 13-cis-retinóico, um estereoisômero do ácido all-trans-retinoico – tretinoína (Figura 3). O 13-cis-RA ( isotretinoína) é o composto ativo do fármaco comercializado com o nome de Roacutan® (Laboratório Roche, São Paulo, SP, Brasil) ou Accutane® nos Estados Unidos (Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ, EUA) e trata-se de um retinoide sintético utilizado em altas doses para o tratamento de acnes severas, pois afeta todos os fatores etiológicos da doença: produção sebácea, comedogênese, colonização do ducto pela bactéria *Propionibacterium acnes*. O seu uso terapêutico para acnes iniciou-se em 1982 com a aprovação deste tratamento pela agência regulamentadora nos Estados Unidos. No Brasil, a comercialização do Roacutan® teve início em 1993, e a regulamentação do produto genérico ocorreu em 2002 (Ministério da Saúde, 2012).

A isotretinoína é um tipo de retinoide e, desde sua introdução no Brasil, tem sido amplamente utilizada para o tratamento tópico e sistêmico de várias dermatoses, atuando no crescimento e diferenciação das células epidérmicas, interferindo na atividade da glândula sebácea com propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias (Brito et al., 2010). O tratamento com isotretinoína é preconizado principalmente nos casos de acne inflamatória grau III e IV (Brasil, 2001).

O fármaco Roacutan® 10 ou 20 mg melhora os aspectos clínicos da acne grave e está associado à supressão da atividade e diminuição do tamanho das glândulas sebáceas (Centralx Bulas, 2013).

Há poucos trabalhos comparativos avaliando o tratamento de acne com isotretinoína porque os estudos iniciais já mostraram resultados nunca antes obtidos com terapias convencionais. Nenhum outro tratamento leva à cura das lesões com porcentagem tão alta de resposta como isotretinoína, e assim seu uso acabou consagrado (Brasil, 2010).

Conforme a preconização da Portaria SAS/MS nº143, de 31 de março de 2010, a dose varia de 0,5-2 mg/kg/dia, em 1 ou 2 tomadas diárias, ingerido(s) com os alimentos junto às refeições. A dose preconizada é de 0,5-1,0 mg/kg/dia, mas pacientes com lesões muito avançadas ou preponderantemente no tronco podem receber até 2 mg/kg/dia. A dose pode ser ajustada conforme a resposta clínica e a ocorrência de efeitos adversos. O tempo de tratamento irá depender da dose total diária e da dose total cumulativa. Na maioria dos casos,

este tempo será de 4 a 6 meses. Um segundo período de tratamento pode ser iniciado 2 meses após a interrupção do tratamento anterior se as lesões persistirem ou houver recorrência de lesões graves (Brasil, 2010).

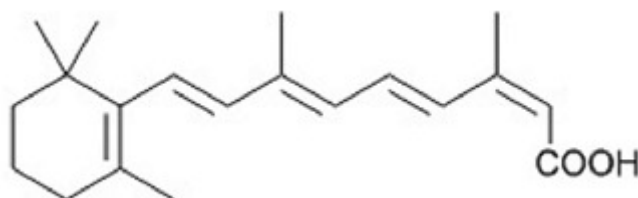


Figura 3. Estrutura molecular da isotretinoína (Ácido 13-cis-retinoico), o princípio ativo do Roacutan® (Adaptado de Diniz et al., 2002).

### 2.3.2 Mecanismos de Ação, Metabolismo, Distribuição e Excreção

A ação do AR tem início com a ativação do complexo receptor RXR-RAR (receptor de retinoide X e receptor de ácido retinoico), denominado como fator de transcrição, que se encontra ligado ao elemento responsivo ao AR (retinoic acid response element, RARE) localizado em regiões promotoras do DNA dando início à transcrição gênica. Cada família apresenta os subtipos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . O AR atravessa a membrana plasmática passivamente e é translocado para o núcleo por proteínas celulares de ligação ao ácido retinoico (CRABP I-II), onde se liga aos receptores nucleares: all-trans-AR liga-se ao RAR; 9-cis-AR liga-se ao RAR e RXR (Umesono et al., 1991; Tsukada et al., 2000).

A absorção do fármaco Roacutan® ocorre no intestino e, devido ao seu caráter lipofílico, é aumentada com a ingestão concomitante de alimento. No sangue, o 13-cis-retinoico é transportado ligado à proteína albumina e entra na célula por um processo de difusão passiva (Tsukada et al., 2002). No interior da célula o 13-cis-AR, diferentemente do all-trans-AR (ATRA), não é transportado pela CRABP, devido à sua baixa afinidade por esta proteína (Zouboulis, 2006). O 13-cis-AR pode ativar o processo de transcrição gênica de forma semelhante ao retinol, através da interação com RAR de duas maneiras: a) ligando-se diretamente ao RAR, porém com uma baixa afinidade; b) sofrer isomerização à all-trans e 9-cis que são ligantes de alta afinidade (O'Reilly et al., 2008; Fig.4).

Isotretinoína e tretinoína são interconvertidas in vivo, e cerca de 20% a 30% da dose de isotretinoína são aparentemente metabolizados nessa rota. Após administração oral de isotretinoína, três metabólitos principais são identificados no plasma: 4-oxo- isotretinoína, tretinoína e 4-oxo-tretinoína. A transformação metabólica da isotretinoína é muito complexa,

tanto no animal como no homem e seguem as seguintes etapas: oxidação para 4-oxo-isotretinoína, isomerização em pequenas quantidades para tretinoína e conjugação glicurônica antes de sua eliminação biliar e urinária. Portanto, o principal metabólito da isotretinoína é a 4-oxo-isotretinoína que é excretada pela bile após ser conjugada com o ácido glicurônico, possuindo meia-vida média de eliminação de 25 horas. Com a administração repetida, a concentração de equilíbrio é estabelecida em 5 a 7 dias (Diniz et al., 2002; Centralx Bulas, 2013). Estudos farmacocinéticos realizados em animais recebendo doses orais de isotretinoína indicam que esta substância lipofílica possui distribuição tissular em 15 minutos com máximo de 1 hora e declínio até níveis não detectáveis em um período de 25 horas em muitos tecidos, tais como o hepático, renal, ovariano, testicular, adrenal e glândulas lacrimais (Meyskens et al., 1985; Allen & Bloxham, 1989). A isotretinoína é excretada pela via urinária, sendo possível detectar na urina a presença de baixa quantidade de isotretinoína não conjugada. Entretanto, a excreção de 53 a 74% da isotretinoína administrada ocorre nas fezes, como resultado de uma absorção incompleta, eliminação biliar ou recirculação entero-hepática. (Meyskens et al., 1985; Diniz et al., 2002).

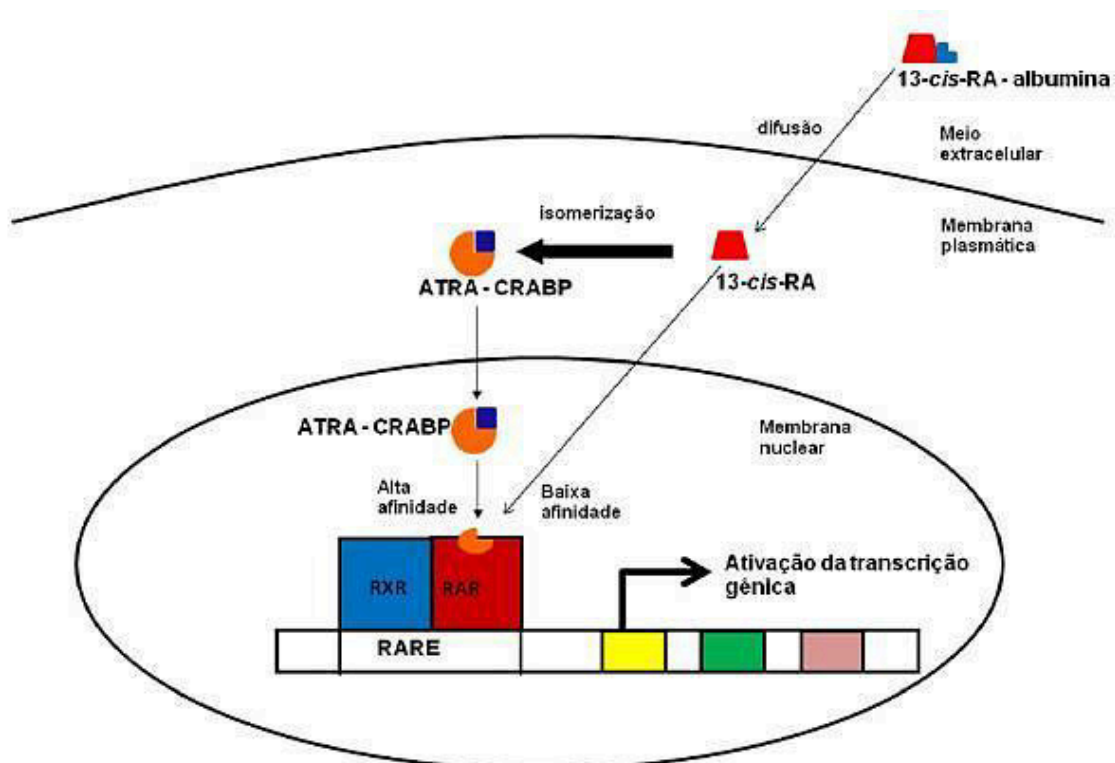


Figura 4. Mecanismo de ação do 13-cis-AR (Adaptado de Ofuchi, 2010).

### 2.3.3 Toxicidade e efeitos adversos da isotretinoína

Os efeitos adversos clínicos da isotretinoína, assim como de outros retinoides, são divididos em dois grupos: efeitos mucocutâneos e efeitos tóxicos sistêmicos. As alterações nas membranas mucosas e pele são decorrentes da diminuição da produção de sebo, redução da espessura do estrato córneo e alteração da função de barreira da pele. A maioria dos pacientes desenvolve ressecamento e fissuras de lábios, pele e mucosas. A secura labial ocorre em 100% dos casos, já podendo ser observada nos primeiros dez dias do tratamento. Geralmente, estes sintomas são controlados com hidratantes labiais e antibióticos ou antifúngicos, se necessário. O ressecamento da mucosa nasal (50%) e oral (40%) também é comum. Prurido e descamação da pele são frequentes (25%), podendo surgir fissuras digitais. A fotossensibilidade ocorre em 40% dos casos, por conta da diminuição das camadas do estrato córneo (Brito et al., 2010).

A toxicidade sistêmica dos retinoides pode atingir músculos, ossos, trato gastrointestinal, sistema nervoso central, olhos, ouvidos, tireoide e rins. Sinais individuais de hipertensão intracraniana como náuseas, cefaleia e vômitos são observados ocasionalmente. A síndrome de pseudotumor cerebral é rara e tem como fatores de risco o uso associado de tetraciclina e seus derivados (Brito et al., 2010).

Associação entre depressão/suicídio e tratamento com isotretinoína foi descrita em vários relatos de casos. No entanto, pequenos ensaios clínicos não confirmaram a associação e, uma revisão sistemática sobre o tema concluiu que as informações disponíveis atualmente são insuficientes para estabelecer uma relação causal entre o medicamento e o risco de depressão e suicídio. Sugere-se atenção para a possibilidade do surgimento desses sintomas nos pacientes em tratamento (Brasil, 2010).

Cerca de 25% dos pacientes em tratamento com isotretinoína apresentam elevação plasmática de triacilgliceróis o que, em alguns casos, pode estar associada ao aparecimento de pancreatite aguda. A isotretinoína pode provocar ainda uma leve queda da concentração plasmática de HDL colesterol (high-density lipoprotein) e aumento de LDL (low-density lipoprotein) e VLDL colesterol (very-low-density lipoprotein; Brasil, 2010).

A isotretinoína é altamente teratogênica. Existe um risco extremamente alto de deformidades em crianças no caso de gravidez durante a administração de isotretinoína oral, em qualquer quantidade, mesmo durante curtos períodos. Todos os fetos expostos podem ser afetados. Mesmo pacientes do sexo feminino que normalmente não utilizam métodos

anticoncepcionais devido à história de infertilidade (exceto no caso de histerectomia) ou que dizem não apresentar atividade sexual, devem ser aconselhadas a usar medidas contraceptivas eficazes enquanto tomarem isotretinoína. Caso ocorra gravidez, apesar dessas precauções, na vigência do tratamento com Roacutan® ou durante o mês seguinte, há um grande risco de malformação grave do feto incluindo anormalidade do sistema nervoso central, dimorfismo facial, fenda palatina, anormalidades no ouvido externo, oculares, cardiovasculares, anormalidades no timo e glândulas paratireoides. Há também aumento da incidência de abortos espontâneos. O Roacutan® é altamente lipofílico, sendo a passagem da droga para o leite materno muito provável. Devido aos efeitos adversos potenciais, o uso da medicação também deve ser evitado durante a lactação (Centralx Bulas, 2013).

Para pacientes do sexo masculino, os dados atuais mostram que os níveis de exposição materna ao sêmen e fluido seminal em usuários de Roacutan® não é suficiente para representar risco de teratogenicidade (Centralx Bulas, 2013). Os resultados dos estudos sobre os efeitos dos retinoides sobre a espermatogênese são controversos. Segundo Gencoglan & Tosun (2011), alguns experimentos de investigação em animais mostraram reversível comprometimento da espermatogênese, enquanto outros não revelaram qualquer alteração.

## **2.4. Biomarcadores**

A avaliação da exposição aos agentes químicos constitui um importante aspecto para a saúde pública, tendo em vista a possibilidade de se prevenir ou minimizar a incidência de mortes ou doenças decorrentes da interação das substâncias químicas com o organismo humano. Os parâmetros estudados com este objetivo são definidos como biomarcadores, indicadores biológicos ou bioindicadores (Amorim, 2003).

O estudo dos biomarcadores é uma ferramenta de avaliação do efeito tóxico, que, através do desenvolvimento e aplicação de técnicas de exposição ou efeito em três níveis de complexidade, individual, celular e molecular, torna possível a elucidação da relação causa-efeito e dose-efeito na avaliação de risco à saúde (Jesus & Carvalho, 2008).

Os biomarcadores podem ter como finalidade, avaliar a exposição (quantidade absorvida ou dose interna), avaliar os efeitos das substâncias químicas e avaliar a suscetibilidade individual (WHO, 1993). Estes constituem instrumentos para explorar a evolução de eventos e comportamento do organismo em relação à exposição (Oga et al., 2008).

Os biomarcadores de exposição refletem a distribuição da substância química ou seu metabólito através do organismo e, por isso, são identificados como dose interna. Teoricamente, a distribuição da substância no organismo pode ser traçada por meio de vários níveis biológicos, como tecidos e células, até seu alvo definitivo (WHO, 1993).

O biomarcador de efeito é um parâmetro biológico, medido no organismo, que reflete a interação da substância química com os receptores biológicos (Amorim, 2003). Geralmente, as alterações bioquímicas são consideradas como uma fonte potencial de indicadores biológicos de efeito. Se considerarmos que essas alterações precedem um dano estrutural, a detecção dessas alterações biológicas permite a identificação precoce de uma exposição excessiva e intervenção para prevenir um efeito irreversível, ou seja, a doença. Essa estratégia é baseada na identificação das alterações bioquímicas precoces e reversíveis que são indicadores sensíveis e específicos de uma resposta do organismo à exposição (Rüdiger, 1999).

Os biomarcadores de suscetibilidade podem refletir fatores genéticos ou adquiridos que influenciam na resposta do organismo a uma determinada exposição química, aumentando ou diminuindo a suscetibilidade. Esses fatores são pré-existentes e independem da exposição. São predominantemente genéticos, embora a patologia, alterações fisiológicas, medicamentos e exposição a outros agentes ambientais também possam alterar a suscetibilidade individual (WHO, 1993; Rüdiger, 1999; Amorim, 2003).

## **2.5. Testículo**

O testículo de mamíferos é uma glândula mista com funções endócrina e exócrina, geralmente localizado no escroto e envolvido por uma espessa cápsula de tecido conjuntivo, a albugínea testicular. Esta túnica emite septos para o interior do órgão até a região do mediastino testicular, dividindo o testículo em lóbulos (Russell et al., 1990).

Funcionalmente o testículo dos mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos principais: o tubular e o intersticial ou intertubular (Russell et al., 1990).

O compartimento tubular constitui a maior parte do testículo, ocupando, na maioria dos mamíferos, de 70% a 90% do parênquima testicular (França & Russell, 1998; Godinho, 1999). Neste compartimento, responsável pela produção dos espermatozoides, encontram-se os túbulos seminíferos. Estes túbulos formam alças bastante contorcidas, as quais possuem suas duas extremidades conectadas à rede testicular, que se encontra localizada numa região

bastante rica em vasos e tecido conjuntivo denominada mediastino testicular. A partir desta região, a rede testicular encontra-se conectada ao epidídimo através dos ductos eferentes (Russell et al., 1990).

Os túbulos seminíferos são constituídos, de sua porção externa para a interna, de túnica própria, epitélio seminífero e lume tubular. A túnica própria envolve o túbulo externamente, sendo composta de células mioides ou peritubulares e matriz extracelular. Juntamente com as células mioides, as células de Sertoli elaboram a membrana basal que serve de suporte estrutural para a própria célula de Sertoli e para as células germinativas que se encontram na porção basal do epitélio seminífero. As células de Sertoli, através de junções de oclusão, dividem o epitélio em dois ambientes: o basal e o adluminal (Costa, 2011). A divisão e proliferação das espermatogônias até espermatócito primário em preleptóteno ocorrem no ambiente basal, ou seja, abaixo das junções entre as células de Sertoli adjacentes. No início da fase de leptóteno da primeira divisão meiótica, os espermatócitos primários migram através da barreira de célula de Sertoli para o ambiente adluminal, onde a meiose continua e a espermatocitogênese ocorre (Russell, 1977; Russell & Peterson, 1985). Desta forma o ambiente adluminal está totalmente sob controle das células de Sertoli, propiciando um microambiente isolado e protegido do sistema imune, essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico. No lume tubular se encontram o fluido secretado pelas células de Sertoli e os espermatozoides recém espermiados (Russell et al., 1990; Sharpe, 1994).

Existe grande variação no número e nas dimensões (diâmetro e comprimento dos túbulos seminíferos) nas diferentes espécies de mamíferos. O comprimento total dos túbulos seminíferos está relacionado a três parâmetros estruturais: tamanho do testículo, diâmetro tubular e densidade volumétrica dos túbulos seminíferos. De maneira geral, há de 10 a 15 metros de túbulo por grama de testículo em grande parte dos mamíferos já estudados (França & Russell, 1998). A medida do diâmetro tubular é uma abordagem classicamente utilizada como indicador da atividade espermatogênica em investigações envolvendo a função testicular (Russell et al., 1994; Muñoz et al., 1998).

O compartimento intertubular é constituído de células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável constituída principalmente por fibroblastos, macrófagos e mastócitos. Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies quanto à proporção volumétrica dos diferentes componentes do compartimento intertubular (França & Russell, 1998), a célula de Leydig é usualmente o tipo celular mais frequente neste compartimento, sendo responsável pela produção de andrógenos, que, por sua

vez, estimulam o aparecimento de caracteres sexuais secundários e a manutenção da espermatogênese em animais sexualmente maduros (França & Russell, 1998).

Há uma relação direta entre o peso testicular e a produção espermática: quanto maior o testículo, maior a produção de espermatozoides. Porém, a quantidade de espermatozoides produzidos é sempre maior que o número necessário para a fecundação e, não necessariamente, o tamanho do testículo acompanha proporcionalmente o tamanho corporal, uma vez que os animais de grande porte produziram um enorme excedente (França & Russell, 1998).

## **2.6. 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 (Russell et al, 1990; França & Russell, 1998). Baseado em características morfológicas e funcionais, o processo espermatogênico pode ser dividido em três fases: (a) fase proliferativa ou espermatogonial, caracterizada por várias e sucessivas divisões mitóticas dos diferentes tipos de espermatogônias; (b) fase meiótica ou espermatocitogênica, após a duplicação do DNA no espermatócito em preleptóteno, síntese de RNA no espermatócito em paquíteno e finalização da meiose, durante a qual ocorre uma divisão reducional acompanhada de recombinação gênica e uma divisão equacional na qual, teoricamente, cada espermatócito em paquíteno dará origem a quatro espermátides haploides; (c) fase de diferenciação ou espermiogênica, onde cada espermátide arredondada passa por profundas mudanças estruturais e bioquímicas e diferencia-se em espermatozoide, um tipo celular morfológicamente especializado para alcançar e fertilizar o ovócito (Sharpe, 1994).

A espermatogênese inicia-se com a célula germinativa primitiva, a espermatogônia A, que é a célula fonte localizada junto à membrana basal. As espermatogônias se dividem por mitose e as células neoformadas podem continuar a se dividir e originar novas espermatogônias ou parar a divisão e crescer, originando os espermatócitos primários ou espermatócitos I, células que entram em meiose. Como a prófase da primeira divisão meiótica é muito demorada, a maioria dos espermatócitos I vistos nas preparações histológicas está nesta fase. Os espermatócitos I são as maiores células da linhagem espermatogênica e são caracterizados pela presença de cromossomos em diferentes fases de condensação. Dessa primeira divisão meiótica resultam células menores, os espermatócitos secundários ou

espermatócitos II. Os espermatócitos II ficam mais próximos da luz dos túbulos seminíferos e é difícil observá-los em cortes histológicos, pois entram logo na segunda divisão meiótica. Desta divisão resultam as espermatídes, células que são caracterizadas pelo pequeno tamanho, núcleos com zona de cromatina condensada e por sua localização contígua à luz dos túbulos seminíferos. Nesta fase terminam as divisões celulares da espermatogênese e cada espermatíde passará por um processo de modificações complexas, denominado espermiogênese, que levará à formação dos espermatozoides. Podem ser observadas nas preparações histológicas espermatídes com a mais variada morfologia, de acordo com a fase da espermiogênese em que se encontram (Kierszenbaum, 2011).

Nos túbulos seminíferos de indivíduos sexualmente maduros, as células germinativas não estão organizadas ao acaso, e sim em associações celulares distintas denominadas estádios, os quais se sucedem com o tempo de maneira bastante ordenada, formando o ciclo do epitélio seminífero. Os estádios do ciclo podem ser classificados pelo método da morfologia tubular (Berndtson, 1977; França & Russell, 1998) e pelo método acrossômico (Leblond & Clermont, 1952; Russell et al., 1990). No primeiro caso, 8 estádios do ciclo são obtidos para todas as espécies, enquanto que pelo sistema acrossômico o número de estádios classificados é variado para cada espécie. A duração do ciclo do epitélio seminífero é uma constante biológica espécie específica, que está sob o controle do genótipo da célula germinativa (França et al., 1998). De maneira geral, em torno de 4,5 ciclos são necessários para que o processo espermatogênico se complete em mamíferos, ou seja, desde uma espermatogônia do tipo A<sub>1</sub> até a liberação dos espermatozoides no lume do túbulo seminífero (França & Russell, 1998).

Os espermatozoides são compostos de cabeça e cauda. A cabeça é constituída pelo núcleo condensado, sendo que, na face externa dos dois terços anteriores da cabeça existe um capuz denominado acrossoma, que é formado principalmente por enzimas que desempenham papel importante durante a fertilização. A cauda denomina-se flagelo e contém grande número de mitocôndrias responsáveis pelo fornecimento de energia que gera o batimento do flagelo e a motilidade dos espermatozoides. Estes se deslocam em meio líquido, com velocidade de aproximadamente 1 a 4 mm/min (Guyton, 2011).

Todo o processo espermatogênico é controlado por vários hormônios dentre eles o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), o hormônio folículo estimulante (FSH), o hormônio luteinizante (LH) e a testosterona (TT) (Guyton, 2011), ou seja, necessita da integridade do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Antunes-Rodrigues & Favaretto, 1999).

Durante o processo espermatogênico, as células de Sertoli e as células germinativas interagem de maneira bastante complexa, tanto física quanto bioquimicamente. Existem diversas formas de junções intercelulares entre esses dois tipos celulares, incluindo-se desmossomos, junções do tipo “gap” e as junções a base de actina. Apesar de serem postuladas várias funções para estes componentes juncionais, existem ainda poucas evidências experimentais para apoiar o papel preciso dos mesmos (Russell e Griswold, 1993). No entanto, fica bastante evidente a necessidade da interação das células germinativas com os componentes somáticos do testículo, principalmente células de Sertoli, células de Leydig e células mioides, para que o processo espermatogênico transcorra de maneira normal e eficiente (Daduone & Demuolin, 1993; Russell et al., 1994; França & Russell, 1998). A integridade funcional da membrana basal elaborada pelas células de Sertoli e células mioides é também essencial para o processo espermatogênico (Dym, 1994).

## **2.7 Células de Sertoli**

A célula de Sertoli, descrita originalmente por Enrico Sertoli em 1865 na Itália, é uma célula somática residente entre as células germinativas no túbulo seminífero (Russell et al., 1990). Essas células são de origem epitelial e são responsivas a retinoides. Esse tipo celular é bem caracterizado morfolologicamente e bioquimicamente, o que facilita a identificação dos efeitos celulares mediados por retinoides e espécies reativas de oxigênio (Moreira et al., 1997). Possuem extensões citoplasmáticas que contornam os espermátocitos e espermátides mantendo estreita interação com as células germinativas durante todo o seu desenvolvimento (Russell & Griswold, 1993). O citoesqueleto é responsável por manter a forma celular e os movimentos ativos no citoplasma, essencial à acomodação dos constantes movimentos das células germinativas (Daduone & Demuolin, 1993; Russell & Griswold, 1993). Durante o desenvolvimento testicular, as células de Sertoli multiplicam-se por mitose, porém após a puberdade não sofrem mais divisões, mantendo sua população estável. O seu número total por testículo, estabelecido durante o desenvolvimento testicular, está relacionado com o tamanho do testículo e com a produção espermática do animal (Russell & Griswold, 1993; Sharpe, 1994).

As células de Sertoli desempenham um papel fundamental na regulação da espermatogênese, já que intermedeiam a ação da testosterona (TT) e hormônio folículo estimulante (FSH) nos testículos, sendo responsáveis pelo início, manutenção e regulação

deste processo (Sharpe, 1994). Apresentam capacidade relativamente fixa de suporte das células germinativas de maneira espécie específica. Adicionalmente, possuem outras funções que incluem a compartimentalização do túbulo seminífero pelas junções oclusivas entre as células de Sertoli propiciando um ambiente protegido e especializado para as células germinativas em desenvolvimento, a sustentação e suporte nutricional especial das células germinativas em diferenciação, a translocação destas células em direção ao lume tubular, a secreção de fluidos e proteínas e a eliminação fagocítica de células germinativas em degeneração e do citoplasma excedente resultante da espermiogênese (Russell et al., 1990).

## **2.8 Células de Leydig**

Preenchendo o espaço entre os túbulos seminíferos, encontram-se tecido conjuntivo, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos. Porém, o principal componente celular deste compartimento é a célula de Leydig, cuja disposição varia de espécie para espécie. São células relativamente grandes, poliédricas e com núcleo localizado excêntricamente no citoplasma contendo grânulos de heterocromatina, que por sua vez, formam uma camada intimamente associada ao envoltório nuclear. Surgem nos testículos durante o período embrionário (Setchell, 1991). De acordo com Ross et al. (2003), as células de Leydig possuem caráter eosinofílico, devido principalmente à grande quantidade de retículo endoplasmático liso e gotículas de gordura em seu citoplasma.

Fawcett et al. (1973) descreveram que o arranjo e a proporção dos elementos constituintes do espaço intertubular, nas diferentes espécies de mamíferos, seguem em geral, três padrões distintos: I – espécies nas quais as células de Leydig e o tecido conjuntivo ocupam uma área muito pequena no compartimento intertubular, contrastando com extensos sinusoides linfáticos (ex: rato, camundongo, hamster); II – espécies que apresentam grupos de células de Leydig espalhados em abundante tecido conjuntivo frouxo, drenado por vasos linfáticos localizados central ou excêntricamente no espaço intertubular (ex: bovino, macaco, homem); III – espécies nas quais abundantes grupamentos de células de Leydig ocupam praticamente todo o compartimento intertubular, restando muito pouco tecido conjuntivo e linfático (ex: suíno e zebra). Os mesmos autores inferem que a quantidade de células de Leydig e a disposição de vasos linfáticos nos mamíferos está provavelmente relacionada à habilidade dos linfáticos de mover para fora dos testículos materiais vascularmente secretados e manter concentrações adequadas de andrógenos no testículo e nos vasos sanguíneos.

As células de Leydig são bastante conhecidas por sua marcante produção de andrógenos, os quais são sintetizados a partir de uma molécula base, o colesterol. Esta produção de andrógenos ocorre por meio de estímulos do hormônio luteinizante (LH) sintetizado e secretado na adenohipófise sob influência do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) proveniente do hipotálamo (Bardin, 1996).

Nos testículos, existem receptores para andrógenos nas células de Sertoli, células mioídes, células musculares lisas dos vasos e na própria célula de Leydig (Schlatt et al., 1997; Suárez-Quian et al., 1998). Dentre os andrógenos sintetizados pelas células de Leydig incluem-se a testosterona e a diidrotestosterona, que são responsáveis pela diferenciação do trato genital masculino e da genitália externa na fase fetal (Pelliniemi et al., 1996), além de serem responsáveis pelo aparecimento e manutenção dos caracteres sexuais secundários e pela sustentação qualiquantitativa da espermatogênese a partir da puberdade (Sharpe, 1994). Particularmente, a diidrotestosterona é responsável pela manutenção funcional das glândulas sexuais acessórias e do epidídimo (Luke & Coffey, 1994; Goyal et al., 1999).

Muitos fatores podem modular a atividade das células de Leydig e, dentre estes, se destacam os compostos citotóxicos, os quais de uma forma direta ou indireta afetam a função destas células. A vitamina A, e seus derivados como o ácido retinoico estão envolvidos na regulação das funções testiculares em roedores. A deficiência de vitamina A provoca interrupção precoce da espermatogênese, caracterizada por degeneração de todas as células germinativas meióticas e defeituosa secreção de testosterona. No entanto, hipervitaminose A em ratos reduz a massa testicular, perturba o ritmo da espermatogênese, afeta negativamente as células de Leydig, reduzindo o volume intersticial (Gencoglan & Tosun, 2011).

As células de Leydig são vulneráveis a uma ampla variedade de toxinas que comprometem a secreção de andrógenos, interferindo negativamente no processo espermatogênico. Compostos que interferem indiretamente na atividade das células de Leydig podem agir no eixo hipotalâmico-hipofisário inibindo a secreção de GnRH pelo hipotálamo ou de LH pela adenohipófise. De outro modo, compostos que afetam diretamente as células de Leydig podem agir induzindo a apoptose e a formação de tumores de células de Leydig. Embora haja numerosos estudos, tais mecanismos de ação ainda não foram completamente compreendidos, necessitando de pesquisas complementares, na tentativa de elucidar o grau de toxicidade e o mecanismo de ação desses compostos na atividade das células de Leydig (Morris, 1996; Creasy, 2001).

## **2.9. Análises dos Efeitos da Isotretinoína sobre Testículos**

Ultimamente, as razões para se testar substâncias químicas, incluindo fármacos, são para determinar se eles são capazes de causar efeitos que influenciem a saúde e, se o fizerem, permitir estimar os níveis de exposição que podem ser considerados seguros ou suficientemente benéficos. Proteções contra efeitos adversos, determinação de dose ou níveis que produzem benefícios que excedem os riscos são usualmente usados para exposições humanas potenciais a um agente (Russell et al., 1990).

Para avaliação compreensiva do sistema reprodutor masculino, é importante determinar os efeitos na produção e qualidade espermática, associados à adequada avaliação histomorfométrica do testículo e glândulas acessórias, fornecendo um padrão razoável da habilidade do animal de produzir sêmen normal (Russell et al., 1990).

### **3. OBJETIVOS**

Os principais objetivos propostos foram avaliar quantitativamente, através de análises biométricas, histomorfométricas e bioquímicas, a ação do fármaco Roacutan® 20mg (ácido 13-cis-retinoico, isotretinoína) sobre o aparelho reprodutor masculino, enfatizando possíveis alterações testiculares relativas ao processo espermatogênico e androgênico de ratos Wistar adultos.

Para tal foram avaliados:

- Biometria corporal;
- Peso dos órgãos: testículo, epidídimo, glândula vesicular, próstata, fígado, e rins;
- Proporções volumétricas, volume de túbulos seminíferos;
- Índices gonadossomático, tubulossomático e Leydigossomático;
- Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero;
- Comprimento total dos túbulos seminíferos e comprimento de túbulo por grama de testículo;
- Proporção volumétrica e volume dos elementos do intertúbulo;
- Diâmetro nuclear e relação nucleoplasmática das células de Leydig;
- Volume nuclear, citoplasmático e celular de Leydig;
- Número total de células de Leydig por testículo e por grama de testículo;
- Qualidade espermática e
- Níveis séricos de testosterona.

#### 4. REFERÊNCIAS

- Allen, J.G., Bloxham, D.P. 1989. The pharmacology and pharmacokinetics of the retinoids. *Pharmacology Therapeutics*, 40(1):1-27.
- Amorim, L.C.A. 2003. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 6:1-13.
- Antunes-Rodrigues, J., Favaretto, A.L.V. 1999. Sistema reprodutor. *Fisiologia*. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 913p.
- Bardin, C.W. 1996. Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man. In: Payne, A.H., Hardy, M.P., Russell, L.D. (Eds.). *The Leydig cell*. Ed. Vienna, Cache River Press, Cap.2, p. 31-42.
- Berndtson, W.E. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *Journal of Animal Science*, 44:818-833.
- Bonet, M.L., Ribot, J., Felipe, F. Palou, A. 2003. Vitamin A and the regulation of fat reserves. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60:1311-1321.
- Brasil. 2010. Portaria SAS/MS nº 143. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. Diário Oficial da União. Brasília, Distrito Federal, mar.31; Sec 1:53.
- Brasil. 2001. Portaria SAS/MS nº 389. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. Diário Oficial da União. Brasília, Distrito Federal, jul.21; Sec 1:84.
- Brito, M.F.M., Sant'Anna, I.P., Galindo, J.C.S., Rosendo, L.H.P.M., Santos, J.B.S. 2010. Avaliação dos efeitos adversos clínicos e alterações laboratoriais em pacientes com acne vulgar tratados com isotretinoína oral. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 85(3):331-7.
- Centralx Bulas: <http://www.bulas.med.br/bula/3487/Roacutan@.htm> - acessado em 9 de janeiro de 2013.
- Champe, P.C., Harvey, R.A. 2000. *Bioquímica Ilustrada*; 2 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, pp. 336-339.
- Chivot, M. 2005. Retinoid therapy for acne. A comparative review. *American Journal of Clinical Dermatology*, 6:9-13.
- Coelho, S.M., Corbo R., Buescu, A., Carvalho, D.P., Vaisman, M. 2003. Retinoic acid: a promising therapy for the de-differentiated thyroid carcinoma? *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabologia*, 47(2):190-197.
- Costa, K. L. C.; Matta, S. L. P.; Gomes, M. L. M.; Paula, T. A. R.; Freitas, K. M.; Carvalho, F. A. R.; Silveira, J. A.; Dolder, H.; Mendis-Handagama, C. 2011. Histomorphometric

- evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Animal Reproduction Science*. 127:202-212.
- Creasy, D.M. 2001. Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicologic Pathology*, 29:64-76.
- Dadoue, J.P., Demuolin, A. 1993. Structure and functions of the testis. In Thibault, C., Levasseur, M., Hunter, R.H.F. (Org.). *Reproduction in mammals and man*. Paris, Ellipses, Cap. 13, p. 227-250.
- Diniz, D.G.A., Lima, M.E., Filho, N.R.A. 2002. Isotretinoína: perfis farmacológico, farmacocinético e analítico. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38(4):415-430.
- Dym, M. 1994. Basement membrane regulation of Sertoli cells. *Endocrine Reviews*, 15:102-115.
- Fawcett, D.W., Neaves, W.B., Flores, M.N. 1973. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of Reproduction*, 9:500-532.
- França, L.R., Russell, L.D. 1998. The testis of domestic mammals. In: Regadera, J., Martinez-Garcia, R. (Eds.). *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. Madrid, Churchill Communications, pp.198-219.
- França, L.R., Parreira, G.G., Gates, R.J., 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*, 19:335-342.
- Frota Junior, M.L.C. 2005. Ação extracelular do ácido retinoico via espécies reativas do oxigênio em células de Sertoli. *Dissertação Mestrado, Bioquímica*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 86p.
- Gencoglan, G., Tosun, M. 2011. Effects of isotretinoin on spermatogenesis of rats. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 30(1):55-60
- Giacomini, L.Z. 2006. Quantificação de vitamina A em concentrados polivitamínicos por cromatografia líquida de alta eficiência. *Dissertação Mestrado, Medicina Veterinária Preventiva*. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 64p.
- Godinho, C.L. 1999. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros. *Dissertação Mestrado, Morfologia*. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 79p.

- Goyal, H.O., Williams, C.S., Khalil, M.K., Vig, M.M., 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 fluid. *Anatomical Records*, 254:508-520.
- Guyton, A.C., Hall, J.E. 2011. *Funções reprodutivas e hormonais masculinas. Tratado de Fisiologia Médica*. 12ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1176 p.
- Jain, S. 2004. Tropical tretinoin or adapalene in acne vulgaris: an overview. *Journal of Dermatological Treatment*, 15:200-207.
- Jesus, T.B., Carvalho, C.E.V. 2008. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecologia Brasiliensis*, 12: 680-693.
- Kierszenbaum, A.L. 2011. *Histologia e Biologia Celular – Uma Introdução à Patologia*. Editora Elsevier, Rio de Janeiro, 720p.
- Leblond, C.P., Clermont, Y. 1952. Definition of stages of the cycle of seminiferous epithelium in the rat. *Annals of New York Academy Science*, 55: 548-573.
- Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Pairault, C. et al., 2002. Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. *Reproduction*, v.124. p.173-180.
- Luke, M.C., Coffey, D.S. 1994. The male sex accessory tissue: structure, androgen action and physiology. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.). *The physiology of reproduction*. New York, Raven Press, v.1 Cap. 23, p. 1435-1488.
- Marcus, R., Culston, A.M. 2000. Fat-soluble vitamins A, K and E. *Goodman and Gilman's the pharmacologic basis of therapeutics 10 ed.*, New York: Mc Graw Hill, p. 1773-1792.
- Meyskens, F.L.Jr., Goodman, G.E., Alberts, D.S. 1985. 13-cis-retinoic acid: pharmacology, toxicology, and clinical applications of the prevention and treatment of human cancer. *Critical Reviews in Oncology/ Hematology*, 3(1):75-101.
- Ministério da Saúde. Em Busca de uma pele sem marcas. Portal da Saúde. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/> Acesso em 01 janeiro de 2012.
- Moreira, J.C.F., Dal-Pizzol, F., Von Endt, D., Bernard, E.A. 1997. Effect of retinol on chromatin structure in Sertoli cells: 1,10-phenanthroline inhibit the increased DNase I sensitivity induced by retinol. *Medical Science Research*, 25:635-638.
- Morris, I.D. 1996. Leydig Cell Toxicology. In: Payne, A.H., Hardy, M.P., Russell, L.D. (Org). *The Leydig Cell*, Vienna: Cache River Press, Cap. 29, p. 573-596.
- Muñoz, E.M., Fogal, T., Dominguez, S., Scardapane, L., Gusman, J., Cavicchia, J.C., Piezzi, R.S. 1998. Stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the viscacha

- (*Lagostomus maximul maximus*). *Anatomical Records*, 252: 8-16.
- Napoli, J.L. 1999. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1440:139-162.
- Ofuchi, A.S. 2010. Administração prolongada do ácido 13-cis-retinoico (isotretinoína) em camundongos machos adolescentes: comportamentos emocionais e quantificação de transcritos de componentes do sistema serotoninérgico central. Dissertação Mestrado Farmacologia. Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 51p.
- O'Reilly, K., Bailey, S.J., Lane, M.A. 2008. Minireview: Retinoid-mediated regulation of mood: possible cellular mechanisms. *Experimental Biology and Medicine*, 233:251-258.
- Oga, S., Camargo, M.M.A., Batistuzzo, J.A.O. 2008. Fundamentos de toxicologia. São Paulo: Atheneu, 677p.
- Paixão, J.A., Stamford, T.L.M. 2004. Vitaminas lipossolúveis em alimentos – Uma abordagem analítica. *Química Nova* 27:96-105.
- Palace, V.P., Khaper, N., Qin, Q.I., Singal, P.K. 1999. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radical Biology and Medicine* 26:746-761.
- Pannocchia, M.A., Borella, M.I., Camargo, A.C.M., Gilio, J.M., Silva, C.A.S. 2008. Estratégia efetiva de fixação do testículo de ratos Wistar para avaliar os parâmetros morfológicos e morfométricos do epitélio seminífero. *Conscientiae Saúde*, 7(2):227-233.
- Pelliniemi, L.J., Kuopio, T., Fröjdman, K. 1996. The cell biology and function of the fetal Leydig cell. In: Payne, A.H., Hardy, M.P., Russell, L.D. (Eds.). *The Leydig cell*. Ed Vienna, Cache River Press, Cap. 5, p. 143-157.
- Ross, M.H., Kaye, G.I., Pawlina, W. 2003. *Histology: a text and atlas*. 4 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, Cap. 21, p.682-724.
- Rüdiger, H.W. 1999. Biomonitoring in occupational medicine. In: Marquart, H., Schäfer, S.G., McClellan, R., Welsch, F. (eds). *Toxicology*. San Diego: Academic Press, pp. 1027-1039.
- Russell, L.D. 1977. Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rats testis. *American Journal of Anatomy*, 148(3): 313-328.
- Russell, L.D., Chandrashekar, V., Bartke, A., 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):93-106.

- Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha, H.A.P., Clegg, E.D. 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis. Bolesta: Cache River Press, 286p.
- Russell, L.D., Griswold, M.D. 1993. The Sertoli Cell. Clearwater: Cache River Press, 801p.
- Russell, L.D., Peterson, R.N. 1985. Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. *International Review of Cytology*, 94:177-211.
- Schalatt, S., Meinhardt, A., Neischlag, E. 1997. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *European Journal of Endocrinology*, 137:107-117.
- Setchell, B.P. 1991. Male reproductive organs and semen. In: Cupps, P.T. (Ed.). *Reproduction in domestic animals*. 4 ed. San Diego: Academic Press, pp. 221-250.
- Sharpe, R.M. 1994. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.). *The physiology of reproduction*, ed.2, New York, Raven Press, v. 1, Cap. 22, p. 1363-1434.
- Sorg, O., Antille, C., Kaya, G., Saurat, J.H. 2006. Retinoids in cosmeceuticals. *Dermatologic Therapy*, 19:289-296.
- Suárez-Quian, C.A., Oke, B.O., Musto, N. 1998. Localization of the androgen receptor in the rodent testis. In: Martinez-Garcia, F. and Regadera, J. (Org.). *Male reproduction; a multidisciplinary overview*. Madrid, Churchill Communications, Cap. 10, p. 114-124.
- Tsukada, M., Schoröder, M., Seltmann, H., Orfanos, C.E., Zouboulis, C.C. 2002. High albumin levels restrict the kinetics of 13-cis-retinoic acid uptake and intracellular isomerization to all-trans-retinoic acid and inhibit its anti-proliferative effect on SZ95 sebocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 119(1):182-185.
- Umesono, K., Murakami, K.K., Thompson, C.C., Evans, R.M. 1991. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D<sub>3</sub> receptors. *Cell*, 65(7):1255-1266.
- Wang, X.D. 2005. Alcohol, vitamin A, and cancer. *Alcohol*, 35:251-258.
- WHO, World Health Organization 1993. *International Program on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles*. Geneva, 57p.
- Zouboulis, C.C. 2006. Isotretinoin revisited: pluripotent effects on human sebaceous gland cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(10):2154-2156.

## ARTIGO 1

### **Efeito da isotretinoína (ácido 13-cis-retinoico) sobre a histomorfometria de túbulos seminíferos, de glândulas acessórias e qualidade espermática de ratos Wistar adultos**

#### RESUMO

O ácido 13-cis-retinoico ou isotretinoína é o composto ativo do fármaco comercializado com o nome de Roacutan®. Trata-se de um retinoide sintético utilizado em altas doses para o tratamento de acne severas, atuando no crescimento e diferenciação das células epidérmicas. Neste trabalho foram avaliados os efeitos do tratamento com Roacutan® 20mg na morfometria testicular, dos túbulos seminíferos, de glândulas acessórias e qualidade espermática de ratos Wistar adultos. Utilizaram-se 24 ratos machos em idade reprodutiva (70 dias), divididos em três grupos: dois grupos tratados e um grupo controle. Os animais dos grupos tratados foram submetidos à administração por gavagem de 0,2mg e 0,4mg de Roacutan® em 1,0mL de óleo de soja/animal, respectivamente, uma vez por dia, durante 60 dias. Os animais do grupo controle receberam também por gavagem 1,0mL de água/animal/dia em igual período. A administração de Roacutan® não alterou o peso testicular, o peso do parênquima testicular, o volume dos túbulos seminíferos e o comprimento total dos túbulos seminíferos. Houve, porém, aumento da proporção de túbulos seminíferos, redução da massa prostática e prejuízo na manutenção da integridade estrutural das membranas espermáticas com redução na motilidade total dos espermatozoides. Estes resultados sugerem que doses terapêuticas de isotretinoína possam afetar a fertilidade masculina seguinte à exposição ao medicamento.

**Palavras-chave:** Isotretinoína, toxicidade, espermatogênese, testículo, túbulo seminífero.

## 1. INTRODUÇÃO

A isotretinoína é considerada o único retinoide que apresenta aplicação clínica através de terapia sistêmica para tratamento da acne (Diniz et al., 2002), sendo empregada, com particular interesse, no tratamento da acne cística e nodular (Saurat, 1997).

Uma vez que o desenvolvimento das glândulas sebáceas e a exacerbação de sua atividade secretora são fatores essenciais para a ocorrência de lesão inflamatória associada à acne, o bloqueio provocado pela isotretinoína na produção de sebo constitui fator determinante de sua atividade farmacológica no tratamento desta afecção (Saurat, 1997).

Atualmente, o papel dos retinoides na proliferação e diferenciação celular tem sido bastante investigado, porém são raros os estudos que comprovem sua toxicidade em nível testicular. Sabendo-se dos efeitos adversos clínicos causados pela isotretinoína, tornam-se importantes e necessários estudos criteriosos sobre este fármaco, para que haja comprovação ou não de seus efeitos colaterais e/ou tóxicos sobre a espermatogênese.

Os testículos dos mamíferos estão divididos morfológica e funcionalmente em dois compartimentos: o tubular ou espermatogênico e o intertubular ou androgênico. A proporção desses compartimentos varia consideravelmente entre as espécies, sendo um dos principais fatores responsáveis pela diferença observada para a eficiência da produção espermática entre elas (França & Russell, 1998; Paula, 1999).

O estudo dos testículos por meio da quantificação histológica tem sido útil para avaliar as características reprodutivas básicas em animais (Barros et al., 2007; Sarti et al., 2009; Caldeira et al., 2010). Parâmetros quantitativos diretamente relacionados com o túbulo seminífero, como diâmetro tubular, espessura do epitélio seminífero e o comprimento total de túbulos seminíferos apresentam relação positiva com a atividade espermatogênica, fornecendo informações para o estabelecimento da mesma em uma dada espécie (França & Russel, 1998; Paula, 1999). As mensurações tubulares são abordagens utilizadas como indicadores da atividade espermatogênica em investigações envolvendo a função testicular (França & Russel, 1998).

Segundo Gencoglan & Tosun (2011), os resultados dos estudos sobre os efeitos dos retinoides em relação à espermatogênese são controversos. Portanto, a avaliação dos efeitos do Roacutan® sobre as características testiculares e processo espermatogênico torna-se relevante.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros histomorfométricos do compartimento tubular do testículo e das glândulas acessórias, assim como avaliar a qualidade espermática em animais submetidos a diferentes dosagens de Roacutan®, correlacionando-os à massa corporal em ratos Wistar adultos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

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

Foram utilizados 24 ratos Wistar machos em idade reprodutiva (70 dias), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram manuseados e submetidos à eutanásia de acordo com Princípios Éticos de Pesquisa Animal, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo os critérios metodológicos aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV – Protocolo número 11/2012).

Os animais foram pesados (média 316g), colocados em gaiolas individuais e distribuídos em 3 grupos experimentais: grupo 1 (controle; n=6) recebeu 1,0mL de água deionizada; grupo 2 (tratado; n=9) recebeu 0,2mg de Roacutan® em 1,0mL de óleo de soja/animal; grupo 3 (tratado; n=9) recebeu 0,4mg de Roacutan® em 1,0mL de óleo de soja/animal. Estas doses corresponderam às doses terapêuticas mínimas (0,5 – 1,0mg/kg/dia) para humanos.

Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (média de 22°C) e fotoperíodo (12-12h claro/escuro) durante o período experimental de 60 dias consecutivos, tempo este considerado crônico para o epitélio seminífero, uma vez que todo o processo espermatogênico do rato Wistar tem aproximadamente esta duração. Todo o regime líquido foi fornecido ad libitum assim como a alimentação sólida (ração).

### **2.2 Diluição do Roacutan® 20mg**

As cápsulas de Roacutan® (Roche) 20mg foram armazenadas em temperatura ambiente (entre 15° e 30°C), em embalagem original, protegidas da umidade e da luz. Cada cápsula foi cuidadosamente cortada e todo seu conteúdo (líquido) retirado utilizando-se uma micropipeta e colocado em um recipiente de vidro âmbar onde foi diluído seguindo o seguinte protocolo: 01 cápsula de Roacutan® 20mg em 100 mL de óleo de soja para dose

convencional e 02 cápsulas de Roacutan® 20mg em 100 mL de óleo de soja para dose dupla. Todos os cuidados relativos à manipulação, condições de temperatura e armazenamento do fármaco foram tomados para preservar a estabilidade do produto e evitar contaminações.

### **2.3 Coleta das amostras**

Ao término do período experimental, os animais foram contidos, pesados e eutanasiados em atmosfera de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram removidos os testículos, epidídimos, glândulas vesiculares e próstata que foram pesados em balança de precisão (BEL Mark 160; 0,001g). Todos os órgãos coletados foram imersos em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas para análises histomorfométricas.

Os espermatozoides foram coletados diretamente do epidídimo, através de maceração da cauda em placa de Petri e obtenção do seu fluido. Este fluido foi diluído em solução TRIS e processado para avaliação de características morfofuncionais dos espermatozoides.

### **2.4 Análises Biométricas e Morfométricas**

Fragmentos de um dos testículos, destinados ao estudo em microscopia de luz, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin®; Leica), sendo posteriormente seccionados na espessura de 3µm em micrótomo rotativo automático (Reichert-Jung, Alemanha) com navalha de vidro. Os cortes histológicos semisseriados foram obtidos em intervalos de 13 cortes, correspondendo à distância de 40µm entre eles. As secções obtidas foram colocadas em lâminas de vidro – 02 lâminas por animal – totalizando 10 secções por lâmina, que foram coradas com azul de toluidina-borato de sódio 1% e montadas com Entellan® (Merck). Imagens do parênquima testicular foram obtidas em fotomicroscópio Olympus BX-60 acoplado ao software de captura de imagens Q Capture. Para análise das imagens foi utilizado o programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics). O testículo contralateral foi dissecado e foi retirada a albugínea para calcular o percentual ocupado pela mesma no testículo.

#### 2.4.1 Peso do parênquima testicular e índice gonadossomático

O peso do parênquima testicular (PPar), que corresponde ao volume líquido do testículo, foi obtido subtraindo-se do peso bruto do testículo o peso da albugínea testicular ( $PPar=PT-PA$ ) onde PT= peso bruto do testículo e PA é o peso da albugínea.

Baseado nos pesos corporais e testiculares foi calculado o índice gonadossomático (IGS) a partir da fórmula  $IGS= (PG/PC)*100$  onde PG=peso total das gônadas e PC=peso corporal. O IGS representa a proporção (%) do peso corporal alocado em testículo.

#### 2.4.2 Proporções volumétricas (%); volume do compartimento do parênquima testicular e índice tubulossomático (%)

As proporções volumétricas dos compartimentos do parênquima testicular foram estimadas a partir da contagem de 2.520 pontos sobre túbulo e intertúbulo, utilizando o software Image-Pro Plus®, projetados sobre imagens capturadas em fotomicroscópio, totalizando 10 campos histológicos aleatórios para cada animal. Para obtenção da densidade volumétrica (%) dividiu-se o número de pontos sobre túbulos e intertúbulo pelo número total de pontos constantes da grade quadriculada e multiplicou-se por 100.

O volume de cada compartimento do parênquima testicular, expresso em mL, foi obtido pela multiplicação do percentual ocupado por túbulos ou intertúbulo (densidade volumétrica) pelo volume líquido do testículo ( $PPar=$  peso do parênquima) e dividindo por 100. Como a densidade do testículo de mamíferos está em torno de 1 (Johnson & Neaves, 1981; França, 1991, Paula, 1999; Tae et al., 2005; Costa et al., 2011), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

Baseado nos volumes de túbulos seminíferos e nos pesos corporais, foi calculado o índice tubulossomático (ITS) a partir da fórmula  $ITS= (DVT/PC)*100$ , onde DVT=densidade volumétrica de túbulo seminífero e PC=peso corporal.

Como o epitélio corresponde à parte de maior importância funcional do túbulo seminífero calculou-se o volume do epitélio germinativo (VEG) utilizando-se a fórmula  $VEG=DVE*PPar/100$ , onde DVE=densidade volumétrica epitelial e PPar=peso do parênquima testicular.

### 2.4.3 Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero

O diâmetro tubular médio foi obtido, para cada animal, a partir da medida de 10 secções transversais de túbulos seminíferos de contorno o mais circular possível, não levando em consideração o estágio do ciclo do epitélio seminífero.

Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi medida a altura do epitélio seminífero, obtida da túnica própria até o lume tubular. O valor encontrado para altura do epitélio, em cada túbulo, representa a média de duas medidas diametralmente opostas. As mensurações foram feitas com o auxílio do software Image-Pro Plus®.

### 2.4.4 Comprimento total dos túbulos seminíferos e comprimento de túbulo por grama de testículo

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CTT), expresso em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos nos testículos (VTS) e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal, empregando-se a fórmula:  $CTT = VTS / \pi R^2$ , onde VTS=volume total de túbulos seminíferos;  $\pi R^2$ =área da secção transversal dos túbulos seminíferos; R=diâmetro tubular/2 (Attal & Courot, 1963; Dorst & Sajonski, 1974).

Para o cálculo do comprimento tubular por grama de testículo, dividiu-se o valor de CTT pelo peso bruto dos testículos.

## 2.5 Avaliação Espermática

Para avaliar o efeito do medicamento sobre a viabilidade espermática, foram realizadas análises de morfologia, motilidade e concentração espermática.

### 2.5.1 Morfologia espermática (%)

Para análise da morfologia espermática, uma alíquota 100µL de fluido da cauda do epidídimo foi diluída em 200µL de solução de formol salina tamponada e avaliada em preparação úmida, utilizando-se lâmina e lamínula e microscópio de contraste de fase no aumento de 1000X, sendo analisadas 200 células. As anormalidades espermáticas observadas foram classificadas quanto a defeitos de cabeça (DC), enrolamento de cauda (EC), peça

intermediária quebrada (PIQ), peça intermediária fracamente dobrada (PIFRD), peça intermediária fortemente dobrada (PIFD), gota citoplasmática proximal (GCP) e gota citoplasmática distal (GCD). Todo espermatozoide com mais de uma alteração morfológica foi classificado na categoria que representava a alteração mais próxima do ápice da célula.

### 2.5.2 Avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides (%)

A integridade estrutural da membrana plasmática e do acrossoma foi avaliada pela técnica de fluorescência, adotando-se dois fluorocromos, o Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e o Iodeto de Propídio (PI), segundo o protocolo proposto por Harrison e Vickers (1990) e modificado por Zúccari (1998). Foram adicionados 10 $\mu$ L de fluido epididimário a 40 $\mu$ L da solução trabalho: 960 $\mu$ L de citrato de sódio + 10 $\mu$ L de iodeto de propídio + 10 $\mu$ L de formol + 20 $\mu$ L de CFDA. Esta solução foi incubada por oito minutos em banho-maria a 37°C e avaliada em microscópio de epifluorescência no aumento de 400X, ao abrigo da luz, utilizando filtro de 480 a 610nm. Foram contadas 100 células, considerando-se três categorias de espermatozoides: íntegros, lesados e semilesados. Segundo Graham et al. (1990) e Arruda & Celeghini (2003), a combinação do Iodeto de Propídio (PI) com Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) permite avaliar a integridade da membrana plasmática devido às suas características moleculares, sendo proposto por esses autores o mecanismo de ação desses corantes fluorescentes, de modo que o CFDA, por conter radicais acetil, consegue transpor a membrana plasmática intacta, sendo imediatamente desacetilada por esterases intracelulares, tornando a sonda impermeável e fazendo com que os espermatozoides íntegros corem-se em verde. Em contrapartida, o PI somente penetra através de espermatozoides que contenham membrana acrossomal lesada, tendo afinidade pelo DNA e corando o núcleo da célula em vermelho.

### 2.5.3 Motilidade total (%) e concentração espermática

Para a avaliação da motilidade foi colocada uma gota de fluido da cauda do epidídimo entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37°C, para análise em microscópio óptico Bioval nos aumentos de 100X e 400X. A motilidade foi expressa em porcentagem (CBRA, 1988).

A concentração espermática foi determinada a partir da contagem de espermatozoides em câmara de Neubauer, após diluição do fluido da cauda do epidídimo em solução de formol salina tamponada na proporção de 1:100, utilizando microscópio de luz em aumento de 400X. Os resultados foram expressos em  $\times 10^6$ .

## **2.6 Análises Estatísticas**

Análise da variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls (SNK) foi usada para comparar médias e desvio padrão entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

## **3. RESULTADOS**

Os resultados das características biométricas e morfométricas analisadas estão descritos na tabela 1. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais com relação à massa corporal, testicular, da albugínea, do parênquima testicular, epidídimo e glândula vesicular ( $p > 0,05$ ). O peso da próstata reduziu 45,71% e 48,57% nos grupos G2 e G3, respectivamente, em relação ao controle G1 ( $p < 0,05$ ). Não houve variação significativa entre os tratamentos com o fármaco.

As proporções volumétricas (%) e o volume (mL) dos compartimentos do parênquima testicular estão demonstrados na tabela 2. A proporção volumétrica de túbulos nos grupos G2 e G3 apresentou aumento significativo quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa na proporção volumétrica do epitélio germinativo entre os tratamentos e o grupo controle ( $p > 0,05$ ).

A proporção volumétrica de lume no grupo G2 aumentou significativamente em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre o grupo G3 e o grupo controle ( $p > 0,05$ ).

Não houve diferença significativa na proporção volumétrica de túnica própria entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 1.** Características biométricas e morfométricas de ratos Wistar em idade reprodutiva, após tratamento com Roacutan® (isotretinoína).

Parâmetros	G1 (n=6)	G2 (n=9)	G3 (n=9)
PC (g)	384,67 ± 77,83 <sup>a</sup>	396,89 ± 46,98 <sup>a</sup>	410,33 ± 27,97 <sup>a</sup>
PT (g)	3,37 ± 0,34 <sup>a</sup>	3,50 ± 0,23 <sup>a</sup>	3,48 ± 0,10 <sup>a</sup>
PA (g)	0,035 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,036 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,032 ± 0,005 <sup>a</sup>
PPar(g)	3,22 ± 0,34 <sup>a</sup>	3,35 ± 0,23 <sup>a</sup>	3,33 ± 0,10 <sup>a</sup>
PEpi(g)	0,72 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,74 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,05 <sup>a</sup>
PGV (g)	1,02 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,93 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,26 <sup>a</sup>
PPr (g)	0,35 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,06 <sup>b</sup>

Média ± desvio-padrão; G1: grupo controle, 1,0mL água via oral; G2: grupo tratado com 0,2mg/animal/dia de Roacutan®; G3: grupo tratado com 0,4mg/animal/dia de Roacutan®; Peso corporal (PC); Peso dos testículos (PT); Peso da albugínea (PA); Peso do parênquima testicular (PPar); Peso do epidídimo (PEpi); Peso da glândula vesicular (PGV); Peso da próstata (PPr). <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (p < 0,05).

**Tabela 2.** Proporção volumétrica e volume dos compartimentos do parênquima testicular de ratos Wistar em idade reprodutiva, após tratamento com Roacutan® (isotretinoína).

Parâmetros	G1 (n=6)	G2 (n=9)	G3 (n=9)
Túbulo	94,39 ± 0,31 <sup>a</sup>	95,87 ± 1,25 <sup>b</sup>	96,66 ± 0,36 <sup>b</sup>
Epitélio Germinativo	82,15 ± 0,86 <sup>a</sup>	79,76 ± 2,83 <sup>a</sup>	81,66 ± 2,35 <sup>a</sup>
Proporção Volumétrica (%)			
Lume	7,53 ± 0,50 <sup>a</sup>	10,92 ± 2,68 <sup>b</sup>	9,77 ± 2,43 <sup>ab</sup>
Túnica Própria	4,71 ± 0,53 <sup>a</sup>	5,19 ± 0,41 <sup>a</sup>	5,23 ± 0,33 <sup>a</sup>
Intertúbulo	5,61 ± 0,28 <sup>a</sup>	4,13 ± 1,18 <sup>b</sup>	3,34 ± 0,34 <sup>b</sup>
Túbulo	3,04 ± 0,35 <sup>a</sup>	3,22 ± 0,24 <sup>a</sup>	3,22 ± 0,10 <sup>a</sup>
Volume (mL)			
Intertúbulo	0,18 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>b</sup>

Média ± desvio-padrão; G1: grupo controle, 1,0mL água via oral; G2: grupo tratado com 0,2mg/animal/dia de Roacutan®; G3: grupo tratado com 0,4mg/animal/dia de Roacutan®; <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (p < 0,05).

A proporção volumétrica de intertúbulo dos grupos G2 e G3 reduziu 26,38% e 40,46%, respectivamente em relação ao controle G1 ( $p < 0,05$ ), porém não se diferenciaram entre si. Não foi observada diferença significativa do volume ocupado pelos túbulos seminíferos entre os grupos, porém houve redução do volume ocupado pelo intertúbulo de 22,22% e 38,88%, respectivamente, nos grupos G2 e G3 em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos tratados ( $p > 0,05$ ).

Os índices Gonadossomático (IGS) e Tubulossomático (ITS) encontram-se na tabela 3. O IGS assim como o ITS, não apresentou diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 3.** Índice Gonadossomático (IGS) e Tubulossomático (ITS) de ratos Wistar em idade reprodutiva, após tratamento com Roacutan® (isotretinoína) ( $p > 0,05$ ).

Parâmetros	G1 (n=6)	G2 (n=9)	G3 (n=9)
IGS (%)	0,91 ± 0,24 <sup>a</sup>	0,89 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,07 <sup>a</sup>
ITS (%)	0,75 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,70 ± 0,07 <sup>a</sup>

Média ± desvio-padrão; G1: grupo controle, 1,0mL água via oral; G2: grupo tratado com 0,2mg/animal/dia de Roacutan®; G3: grupo tratado com 0,4mg/animal/dia de Roacutan®; <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Na tabela 4 são apresentadas as medidas de diâmetro tubular, altura do epitélio, comprimento total dos túbulos seminíferos e comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais com o fornecimento de Roacutan® ( $p > 0,05$ ).

A avaliação morfológica dos espermatozoides da cauda do epidídimo encontra-se na tabela 5. Os animais dos grupos tratados apresentaram menor percentual de gota citoplasmática distal que o grupo controle ( $p < 0,05$ ). O percentual de espermatozoides morfológicamente normais foi maior nos grupos tratados ( $p < 0,05$ ). As demais características avaliadas não apresentaram diferença significativa.

**Tabela 4.** Diâmetro tubular (DT), altura do epitélio seminífero (AE); comprimento total dos túbulos seminíferos (CTT) e comprimento total dos túbulos por grama de testículo (CTT/g) de ratos Wistar em idade reprodutiva, após tratamento com Roacutan® (isotretinoína) ( $p > 0,05$ ).

Parâmetros	G1 (n=6)	G2 (n=9)	G3 (n=9)
DT ( $\mu\text{m}$ )	287,87 $\pm$ 26,12 <sup>a</sup>	302,76 $\pm$ 31,97 <sup>a</sup>	288,53 $\pm$ 15,67 <sup>a</sup>
AE ( $\mu\text{m}$ )	102,02 $\pm$ 8,80 <sup>a</sup>	105,21 $\pm$ 7,45 <sup>a</sup>	98,58 $\pm$ 6,06 <sup>a</sup>
CTT (m)	48,06 $\pm$ 12,39 <sup>a</sup>	45,78 $\pm$ 9,06 <sup>a</sup>	49,69 $\pm$ 6,50 <sup>a</sup>
CTT/g (m/g)	14,19 $\pm$ 2,77 <sup>a</sup>	13,15 $\pm$ 2,80 <sup>a</sup>	14,24 $\pm$ 1,53 <sup>a</sup>

Média  $\pm$  desvio-padrão; G1: grupo controle, 1,0mL água via oral; G2: grupo tratado com 0,2mg/animal/dia de Roacutan®; G3: grupo tratado com 0,4mg/animal/dia de Roacutan®; <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5.** Avaliação morfológica dos espermatozoides da cauda do epidídimo de ratos Wistar tratados com Roacutan® (isotretinoína) em diferentes concentrações por 60 dias.

Parâmetros	G1 (n=6)	G2 (n=9)	G3 (n=9)
DC (%)	0,33 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>	1,22 $\pm$ 1,30 <sup>a</sup>	0,67 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>
EC (%)	0,50 $\pm$ 0,84 <sup>a</sup>	1,66 $\pm$ 2,24 <sup>a</sup>	0,83 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup>
PIQ (%)	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,11 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
PIFRD (%)	0,33 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>	0,11 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
PIFD (%)	0,16 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	0,11 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	0,50 $\pm$ 0,84 <sup>a</sup>
GCP (%)	0,16 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
GCD (%)	18,33 $\pm$ 5,43 <sup>a</sup>	5,33 $\pm$ 5,52 <sup>b</sup>	3,17 $\pm$ 1,72 <sup>b</sup>
Normal (%)	80,16 $\pm$ 5,38 <sup>a</sup>	91,44 $\pm$ 5,34 <sup>b</sup>	94,83 $\pm$ 0,75 <sup>b</sup>

Média  $\pm$  desvio-padrão; G1: grupo controle, 1,0mL água via oral; G2: grupo tratado com 0,2mg/animal/dia de Roacutan®; G3: grupo tratado com 0,4mg/animal/dia de Roacutan®; DC = Defeito de Cabeça; EC = Enrolamento de cauda; PIQ = Peça intermediária quebrada; PIFRD = Peça intermediária fracamente dobrada PIFD = Peça intermediária fortemente dobrada; GCP = Gota citoplasmática proximal; GCD = Gota citoplasmática distal. <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Na tabela 6 e figura 01 está demonstrada a avaliação da integridade estrutural de membranas de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo. Os grupos tratados G2 e G3 apresentaram redução de 32,58% e 40,82% respectivamente, na porcentagem de espermatozoides íntegros, acompanhada pelo aumento de 51,38% e 61,27%, respectivamente, do percentual de espermatozoides lesados quando comparados ao controle ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto à categoria semilesados ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 6.** Avaliação da integridade estrutural de membranas de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de ratos Wistar tratados com Roacutan® (Isotretinoína) por 60 dias, utilizando fluorocromos Iodeto de Propídio (PI) e Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA).

Parâmetros	G1 (n=6)	G2 (n=9)	G3 (n=9)
Íntegros (%)	59,33 ± 5,68 <sup>a</sup>	40,00 ± 8,56 <sup>b</sup>	35,11 ± 9,29 <sup>b</sup>
Semilesados (%)	2,50 ± 2,74 <sup>a</sup>	2,22 ± 3,93 <sup>a</sup>	3,33 ± 3,77 <sup>a</sup>
Lesados (%)	38,17 ± 6,43 <sup>a</sup>	57,78 ± 6,49 <sup>b</sup>	61,56 ± 10,14 <sup>b</sup>

Média ± desvio-padrão; G1: grupo controle, 1,0mL água via oral; G2: grupo tratado com 0,2mg/animal/dia de Roacutan®; G3: grupo tratado com 0,4mg/animal/dia de Roacutan®; Íntegros: CFDA<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup>; Semi-lesados: CFDA<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>; Lesados: CFDA<sup>-</sup>/IP<sup>+</sup>; <sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

A motilidade total (MT) e concentração espermática (CE) estão apresentadas na tabela 7. O grupo G3 apresentou redução significativa na motilidade espermática total de 37,59% quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Não foi observada diferença significativa na motilidade espermática do grupo G2 quando comparado ao grupo controle ( $p > 0,05$ ). Não houve diferença significativa na concentração espermática entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

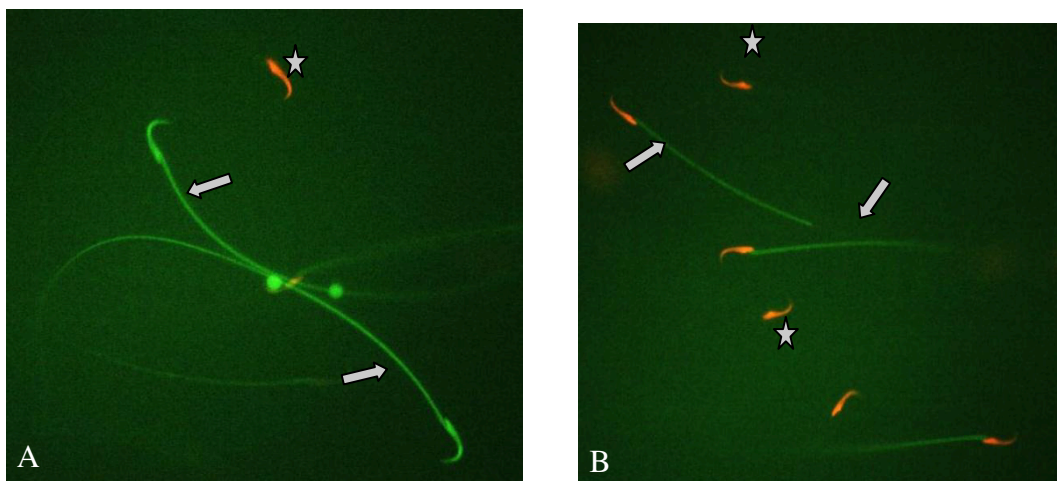


Figura 1 - Fluorescência dos espermatozoides. A. Espermatozoides íntegros (seta) corados pelo CFDA por apresentarem membrana plasmática íntegra em toda sua extensão, observados principalmente no grupo G1. B. Espermatozoides semi-lesados (setas) corados pelo CFDA devido à integridade da membrana plasmática e núcleo corado pelo PI, devido à lesão da membrana acrossomal. Espermatozoides lesados (asterisco) em A e B, com o núcleo corado pelo PI, apresentando membrana plasmática e membrana acrossomal lesadas, observados predominantemente em G2 e G3.

**Tabela 7.** Motilidade total (MT) e concentração espermática (CE) de ratos Wistar tratados com Roacutan® (Isotretinoína) por 60 dias.

Parâmetros	G1 (n=6)	G2 (n=9)	G3 (n=9)
MT (%)	83,33 ± 5,16 <sup>a</sup>	69,44 ± 10,14 <sup>a</sup>	52,00 ± 29,43 <sup>b</sup>
CE (x 10 <sup>6</sup> )	8000,00 ± 7491,66 <sup>a</sup>	3277,77 ± 2412,35 <sup>a</sup>	6083,33 ± 4057,91 <sup>a</sup>

Média ± desvio-padrão; G1: grupo controle, 1,0mL água via oral; G2: grupo tratado com 0,2mg/dia de Roacutan®; G3: grupo tratado com 0,4mg/dia de Roacutan®; <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (p < 0,05).

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo animais tratados com 0,2 e 0,4mg/animal/dia de isotretinoína não apresentaram diferenças significativas no peso corporal, do epidídimo e da glândula vesicular. Chauhan et al. (2007) relataram que, variações no peso testicular, prostático, da glândula vesicular e do epidídimo podem indicar alterações nos níveis de testosterona. Em nosso estudo, animais tratados com ambas as doses de Roacutan® apresentaram redução significativa do peso da próstata, sendo esta, indicativo de possível alteração nos níveis de testosterona circulante. Níveis ideais de testosterona circulante são requeridos para manter a

função testicular e de órgãos sexuais acessórios. Assim, mudanças nos pesos absolutos e relativos dos órgãos reprodutivos são evidências suficientes para classificar inicialmente um agente como potencial tóxico reprodutivo masculino (Zenick et al., 1994).

Uma forte indicação do declínio da contagem de espermatozoides com evidente diminuição da competência funcional da produção espermática humana tem sido evidenciada em estudos nos últimos anos. Esse declínio tem sido associado a diversos fatores como, exposição a poluentes tóxicos, ingestão de substâncias variadas e o uso de medicamentos (Aitken, 2008). A deficiência de vitamina A ou ausência de receptores para ácido retinoico causam disfunção na produção espermática e esterilidade em machos. Por outro lado, o excesso de vitamina A também induz citotoxicidade testicular e infertilidade (Livera et al., 2002). O tratamento com Roacutan® em ambas as doses não interferiu no peso dos testículos, no peso do parênquima testicular, peso da albugínea, assim como no volume de túbulos seminíferos, podendo não ter influenciado na produção espermática. O peso testicular ou o tamanho do testículo podem ser utilizados como indicadores quantitativos da produção espermática, uma vez que o principal componente do testículo é o túbulo seminífero (França e Russell, 1998). O mecanismo de ação da vitamina A nas gônadas é objeto de controvérsias. Resultados de estudos realizados por Carvalho et al. 1978; Sadek et al. 1999; Gencoglan & Tosun 2011, sugerem que uma condição de hipervitaminose A tem um efeito negativo direto sobre as gônadas. Segundo Comitato, et al. (2006), ratos submetidos à hipervitaminose A por duas semanas consecutivas apresentaram redução da massa testicular, desenvolveram lesões no epitélio seminífero, alteraram o ritmo da espermatogênese além de apresentarem células de Leydig afetadas negativamente e conseqüentemente redução do volume do tecido intersticial. Em nosso estudo, os grupos tratados com Roacutan® mostraram aumento na proporção volumétrica de túbulo e lume acompanhado pela redução volumétrica de intertúbulo. Entendemos que tenha sido um aumento compensatório, ocupando o espaço referente à redução do intertúbulo.

Segundo França & Russell (1998), geralmente existe relação positiva entre diâmetro tubular e atividade espermatogênica do testículo. A cimetidina, utilizada no tratamento de úlceras gástricas e duodenais, é citada como uma substância tóxica ao testículo, causando atrofia testicular (França et al., 2000). Ratos Wistar tratados com injeções de cimetidina em diferentes concentrações não apresentam alterações no diâmetro dos túbulos seminíferos, mas apresentaram redução da altura do epitélio germinativo com o aumento da dose, sem comprometimento severo do processo espermatogênico (França, et al., 2000). Em nossos

resultados, não houve alteração significativa na avaliação destes mesmos parâmetros, nos animais tratados com isotretinoína nas doses 0,2 e 0,4mg/animal/dia. Gencoglan & Tosun (2011) também não encontraram diferença significativa no que diz respeito ao diâmetro dos túbulos seminíferos entre os animais tratados com isotretinoína nas doses de 1 e 2mg/mL/dia durante 21 dias de tratamento.

Animais do grupo controle e tratados com Roacutan® apresentaram comprimento de túbulos seminíferos por grama de testículo dentro da faixa conhecida para maioria dos mamíferos investigados que é de 10 a 15 metros (França & Russell, 1998). Esses resultados também foram observados em ratos adultos tratados com infusão do caule de *Thinnantus fasciculatus* (Melo et al., 2010). O comprimento total dos túbulos seminíferos está relacionado a três parâmetros estruturais: tamanho do testículo, diâmetro tubular e volume dos túbulos seminíferos. Portanto, como não houve diferenças significativas nesses parâmetros, não refletiu diferenças significativas no comprimento total dos túbulos seminíferos. Como o comprimento total dos túbulos seminíferos está relacionado ao peso testicular, torna-se sem sentido discutir esse parâmetro entre as diversas espécies, uma vez que o peso do testículo é extremamente variado entre os animais. Esses dados são gerados para calcular o comprimento de túbulos seminíferos por grama de testículo o que permite comparações mais significativas.

O IGS e o ITS, que representam, respectivamente, o percentual de massa corporal alocado nos testículos e nos túbulos seminíferos quando avaliados conjuntamente quantificam o investimento do corpo na produção espermática. De acordo com nossos resultados, após 60 dias de tratamento tanto o IGS quanto o ITS não apresentaram alterações nos animais dos grupos estudados. Estes resultados corroboram os dados obtidos relativos aos parâmetros quantitativos associados aos túbulos seminíferos como diâmetro tubular, altura do epitélio germinativo, comprimento tubular total, comprimento tubular por grama de testículo e volume tubular, pois esses parâmetros influenciam diretamente na massa testicular, e esta não apresentou diferença entre os grupos. Por outro lado, Ferguson et al. (2005) observaram aumento significativo do IGS em ratos machos tratados com 7,5mg/kg/dia de Accutane® (40mg) num período de 28 dias. Entende-se que esta alteração possa ter ocorrido pela dosagem maior utilizada por esses autores, o que foge das doses clínicas usuais.

O estudo da morfologia dos espermatozoides é um importante parâmetro na análise da fertilidade, pois pode refletir os efeitos da toxicidade no sistema reprodutor (Plassmann & Urwyler, 2001). No presente estudo a morfologia dos espermatozoides colhidos na cauda epididimária mostrou-se sem alteração significativa, quando comparados ao grupo controle. O

percentual de espermatozoides normais esteve dentro da faixa de valores estabelecida pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), estando entre 80 e 100%. Assim, pode-se afirmar que o percentual de espermatozoides anormais não aumentou com as doses 0,2 e 0,4mg/animal/dia de isotretinoína. Esses resultados também foram observados em ratos adultos tratados com injeções subcutâneas de dietilestilbestrol na dose de 10µg/animal/dia durante 12 dias (Fernandez, 2006). Além dos aspectos gerais da cabeça e da cauda dos espermatozoides, outro parâmetro avaliado, é a presença e a posição da gota citoplasmática, cuja migração ao longo do espermatozoide durante a sua passagem pelo epidídimo é característico do processo de maturação, permanecendo em muitos espermatozoides estocados na cauda epididimária dos mamíferos (Cooper & Yeung, 2003). Gatti et al. (2004) verificaram que a migração da gota citoplasmática ocorre ao mesmo tempo em que a motilidade dos espermatozoides aumenta, mas a relação direta entre estes dois eventos ainda não foi demonstrada. Klinefelter (2002) e Fernandez (2006) relatam que com a aceleração do trânsito espermático, o tempo disponível para os processos necessários à maturação dos espermatozoides fica reduzido, o que pode comprometer a fertilidade. De acordo com nossos resultados, a gota citoplasmática distal nos espermatozoides dos grupos tratados diminuiu significativamente em relação ao grupo controle, sugerindo não ter havido prejuízo no trânsito epididimário ao considerar que essa gota é liberada durante a passagem do espermatozoide pelo epidídimo. Neste contexto, pesquisas que avaliem a influência da isotretinoína no tempo de trânsito dos espermatozoides no epidídimo elucidariam se o trânsito epididimário é dose-dependente.

A membrana plasmática representa importante papel na capacidade fertilizante dos espermatozoides, modificando-se ao longo do processo de espermatogênese, trânsito e armazenagem no epidídimo, ejaculação, depósito no trato genital feminino e, finalmente, capacitação e penetração do oócito (Holt, 1995; Watson, 1995; Lenzi et al., 1996). Quanto à avaliação da integridade estrutural de membranas dos espermatozoides, resultados obtidos neste trabalho demonstram que os grupos tratados tiveram menos espermatozoides com membranas íntegras e mais espermatozoides lesados quando comparados com o controle. Não houve diferença significativa de espermatozoides com membranas semi-lesadas. Estes resultados sugerem que os tratamentos com Roacutan® influenciaram negativamente a manutenção da integridade estrutural das membranas espermáticas, o que pode influenciar na fertilidade, reduzindo-a, uma vez que a membrana plasmática deve apresentar-se íntegra física

e funcionalmente para que o espermatozoide tenha viabilidade e capacidade fertilizante (Parks & Grahan, 1992).

A concentração espermática dos animais não se alterou com o tratamento com isotretinoína, entretanto estas concentrações se mostram altas provavelmente por estes espermatozoides terem sido obtidos da cauda epididimária. A cauda do epidídimo é o local de maior capacidade de armazenamento dos espermatozoides (Jindal & Panda, 1980).

A motilidade espermática é um dos parâmetros mais importantes utilizados na avaliação da habilidade fértil dos espermatozoides obtidos de amostras de sêmen *in vitro* (Mahadevan & Trounson, 1984) e *in vivo* (Bostofte et al.,1990; Barratt et al.,1993). Alterações nestes parâmetros podem levar a uma ineficiência dos espermatozoides quanto à penetração do muco cervical, impedindo seu acesso ao ovócito, reduzindo sua capacidade fertilizante (Clegg et al., 2001). Neste experimento, a motilidade total dos espermatozoides do grupo que recebeu 0,4mg/animal/dia de Roacutan® foi significativamente menor quando comparada ao controle. O prejuízo na manutenção da integridade estrutural das membranas espermáticas pode justificar estes resultados.

## **5. CONCLUSÕES**

Doses terapêuticas de Roacutan® mostraram pouca interferência sobre os túbulos seminíferos, porém causaram redução do peso da próstata. Houve aumento do compartimento tubular e redução do compartimento intertubular. O prejuízo na integridade das membranas espermáticas acompanhado da baixa motilidade total dos espermatozoides é indicativo para realização de estudos complementares sobre o uso da isotretinoína e fertilidade. Análises da população celular dos túbulos seminíferos deverão ser feitas para se obter detalhes da ação do Roacutan® no compartimento tubular.

## **6. REFERÊNCIAS**

- Aitken, R.J., Romann, S.D. 2008. Antioxidant systems an oxidative stress in the testes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 636:154-171.
- Arruda, R.P., Celeghini, E.C.C. 2003. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, suplemento, 31:230-231.
- Attal, J., Courot, M. 1963. Développement testiculaire et établissement de là spermatogènese chez le taureau. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, 3:219-241.

- Barratt, C.L.R., Tomlinson, M.J., Cooke, I.D. 1993. Prognostic significance of computerized motility analysis for in vivo fertility. *Fertility Sterility*, 60(3):520-525.
- Barros, J.B.G., Paula, T.A.R. & Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Guião-Leite, F.L., Rossi, J.L., Oliveira, P.C. & Costa, E.P. 2007. Sertoli cell index and spermatic reserves in adult captive African lions (*Panthera leo* Linnaeus, 1758). *Animal Reproduction Science*, 102:(3-4)350-356.
- Bostofte, E., Bagger, P., Michael, A., Stakemann, G. 1990. Fertility prognosis for infertile men from two different population evaluated by the Cox regression model. *Fertility Sterility*, 54(6):1100-1106.
- Caldeira, B.C., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Balarini, M.K., Campos, P.K.A. 2010. Morphometry of testis and seminiferous tubules of the adult crab-eating fox (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766). *Revista Ceres, Viçosa*, 57:(5)569-575.
- Carvalho, T.L.L., Lopes, R.A., Azoubel, R., Ferreira, A.L. 1978. Morphometric study of testicle alterations in rats submitted to hypervitaminosis A. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*, 48(4):307-315.
- Chauhan, A., Agarwal, M., Kushwaha, S., Mutreja, A. 2007. Suppression of fertility in male albino rats following the administration of 50% ethanolic extract of *Aegle marmelos*. *Contraception*, 76:474-481.
- Clegg, E.D., Perreault, S.D., Klinefelter, G.R. 2001. Assessment of male reproductive toxicology. *Principles and Methods of Toxicology*, 4 Ed. p. 1263-1299.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 1998. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 49p.
- Cooper, T. G. & Yeung, C. H. 2003. Developmental changes in signaling transduction factors in maturing sperm during epididymal transit. *Cellular and molecular biology*, 49(3):341-349.
- Comitato, R., Esposito, T., Cerbo, G., Angelini, F., Varriale, B., Cardone, A. 2006. Impairment of spermatogenesis and enhancement of testicular germ cell apoptosis induced by exogenous all-trans-retinoic acid in adult lizard *Podarcis sicula*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 305:288-298.
- Costa, K. L. C.; Matta, S. L. P.; Gomes, M. L. M.; Paula, T. A. R.; Freitas, K. M.; Carvalho, F. A. R.; Silveira, J. A.; Dolder, H.; Mendis-Handagama, C. 2011. Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Animal Reproduction*

- Science, 127:202-212.
- Diniz, D.G.A., Lima, M.E., Filho, N.R.A. 2002. Isotretinoína: perfis farmacológico, farmacocinético e analítico. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38(4):415-430.
- Dorst, V.J., Sajonski, H. 1974. Morphometric studies into tubular system of swine testes during postnatal development. *Monatsh Verinarmed*, 29(17):650-652.
- Ferguson, S.A., Cisneros, F.J., Gough, B.J., Ali, S.F. 2005. Four weeks of oral isotretinoin treatment causes few signs of general toxicity in male and female Sprague–Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*, 43:1289–1296.
- Fernandez, C.D.B. 2006. Alteração do tempo de trânsito epididimário: implicações no perfil proteico e outros parâmetros espermáticos. Dissertação de Mestrado, Biologia Celular e Estrutural. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- França, L.R., Russell, L.D. 1998. The testis of domestic mammals. In: Regadera, J., Martinez-Garcia, R. (Eds.). *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. Madrid, Churchill Communications, pp.198-219.
- França, L.R. 1991. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Tese Doutorado, Morfologia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 180p.
- França, L.R., Leal, M.C., Sasso-Cerri, E., Vasconcelos, A., Debeljuk, L., Russell, L.D. 2000. Cimetidine (Tagamet) is a reproductive toxicant in male rats affecting peritubular cells. *Biology of Reproduction*, 63:1403-1412.
- Gatti, J. L., Castella, S., Dacheux, F., Ecruyd, H., Métayer, S., Thimon, V., Dacheux, J. L. 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal Reproduction Science*, 82-83: 321-339.
- Gencoglan, G., Tosun, M. 2011. Effects of isotretinoin on spermatogenesis of rats. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 30(1):55-60.
- Graham, J.K., Kunze, E., Hammerstedt, R.H. 1990. Analysis of sperm cell viability, acrossomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction*, 43:55-64.
- Harrison, R.A.P., Vickers, S.E. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88:343-352.
- Holt, W.V. 1995. The sperm plasma membrane. In: *International Symposium on Human Sperm Acrossome Reaction, Physiological and Pharmacological Induction and Transduction Pathways*, Collioure, France. *Proceedings...* Collioure, France:

- International Society of Andrology, 1995.
- Jindal, S.K., Panda, J.N. 1980. Epididymal sperm reserves of the goat (*Capra hircus*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 59(2):469-471.
- Johnson, L., Neaves, W.B. 1981. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. *Biology of Reproduction*, 24:703-712.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cellular Biology*, 27:137-138.
- Klinefelter, G.R. 2002. Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. In: *The Epididymis – from molecules to clinical practice*. (eds. B. Robaire & B. T. Hinton), pp. 353-369. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York.
- Lenzi A., Picardo M., Gandini, L., Dondero F. 1996. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Human Reproduction Update*, 2:246-256.
- Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Pairault, C. et al., 2002. Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. *Reproduction*, 124:173-180.
- Mahadevan, M.M., Trounson, A.O. 1984. The influence of seminal characteristics on the success rate of human in vitro fertilization. *Fertility Sterility*, 42(3):400-405.
- Melo, F.C.S.A., Matta, S.L.P., Paula, T.A.R., Gomes, M.L.M., Oliveira, L.C. 2010. The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult Wistar rats. *Biological Research*, 43(4):445-450.
- Parks, J.E., Grahan, J.K. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38:209-222.
- Paula T.A.R. 1999. Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Tese Doutorado, Morfologia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 84p.
- Plassmann, S., Urwyler, H. 2001. Improved risk assessment by screening sperm parameters. *Toxicology Letters*, 119(2):157-171.
- Sadek, I.A. Abdul Mohsen, M.H. 1999. Long-term administration of vitamin A and the process of spermatogenesis. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 5(1):123-129.
- Sarti, P., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Polli, G.O., Balarini, M.K., Mascarenhas, R.M. 2009. Parâmetros biométricos corporais e testiculares de Jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) adultas. *Revista Ceres, Viçosa*, 56(2):161-165.

- Saurat, J.H. 1997. Oral isotretinoin. Where now, where next? *Dermatology Basel*, 195(1):1-3.
- Tae, H.J., Jang, B.G., AHN, D.C., Chooi, E.Y., Kang, H.S., Kim, N.S., Lee, J.H., Park, S.Y., Yang, H.H., Kim, I.S. 2005. Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus Karpowi*) during the breeding and non-breeding seasons. *Veterinary Research Communications*, 29:629-643.
- Watson, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their postthawing function. *Reproduction Fertility and Development*, 7:871-891.
- Zenick, H., Clegg, E.D., Perreault, S.D., Klinefelter, G.R., Gray, L.E. 1994. Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach. In: *Principles and methods of toxicology*. New York: Raven, 3ed. pp. 937-988.
- Zúccari, C.E.S.N. 1998. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina. Tese Doutorado, Reprodução Animal. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 121p.

## ARTIGO 2

### **Histomorfometria do compartimento intertubular de ratos Wistar adultos submetidos ao tratamento com Roacutan®**

#### RESUMO

Apesar do mecanismo de ação do Roacutan® (13-cis-AR, isotretinoína) ainda não ser completamente compreendido, este tem sido administrado para o tratamento de acnes severas, atuando no crescimento e diferenciação das células epidérmicas. A administração mais prolongada deste fármaco provoca vários problemas devido aos seus efeitos tóxicos relevantes uma vez que sua atuação é diretamente ligada ao crescimento e diferenciação das células. Neste trabalho foram avaliados os efeitos do tratamento com Roacutan® 20mg no compartimento intertubular do testículo de ratos Wistar adultos. O trabalho foi conduzido dentro dos preceitos éticos para animais de laboratório. Utilizaram-se 24 ratos machos em idade reprodutiva, divididos em três grupos: dois tratados e um controle. Os animais dos grupos tratados foram submetidos ao tratamento pela administração, por gavagem, de 0,2mg e 0,4mg de Roacutan® em 1,0mL de óleo de soja/animal, respectivamente, uma vez por dia, durante 60 dias. Os animais do grupo controle receberam, também por gavagem, 1,0mL de água/animal/dia por igual período. Após a eutanásia, o sangue foi coletado e os testículos foram retirados, fixados e processados para inclusão em metacrilato. Cortes de 3µm, corados com azul de toluidina, foram utilizados para análises morfométricas. A análise de testosterona foi feita por quimioluminescência. Observou-se redução da densidade volumétrica e do volume do compartimento intertubular, acompanhado de redução do percentual, do volume e da população das células de Leydig por testículo e por grama de testículo. Houve também redução de macrófagos e dos níveis de testosterona plasmática. Entende-se que a isotretinoína afeta drasticamente o compartimento intertubular e seus principais componentes.

**Palavras-chave:** Isotretinoína, toxicidade, intertúbulo, célula de Leydig, testosterona.

## 1. INTRODUÇÃO

Os retinoides estão envolvidos na proliferação e diferenciação de vários tipos celulares durante o desenvolvimento fetal e também ao longo da vida, como resultado da ativação do complexo retinoide-receptor. Entre os retinoides avaliados para uso em humanos, somente a isotretinoína (Roacutan®) é capaz de promover significativa remissão da acne por apresentar alta capacidade de inibir a secreção sebácea (Frota Junior, 2005).

As glândulas sebáceas, que controlam a oleosidade da pele, têm o funcionamento diretamente associado à testosterona. Com o aumento dos níveis de testosterona, há a exacerbação da atividade secretora das glândulas sebáceas, fator que contribui para ocorrência de lesão inflamatória associada à acne (Saurat, 1997).

Segundo Creasy (2001), a toxicologia reprodutiva tem como objetivo investigar os possíveis efeitos adversos sobre o sistema reprodutor, induzidos por substâncias de origem sintética ou natural. O estudo dos testículos por meio da quantificação histológica tem sido útil para avaliar as características reprodutivas básicas em animais (Caldeira et al., 2010; Sarti et al., 2011; Barros et al., 2007) assim como para avaliar a ação de substâncias tóxicas na reprodução de machos (Melo et al., 2010; Cupertino, 2012; Matta, 2012).

O testículo de mamíferos está dividido em dois compartimentos: o tubular ou espermatogênico e o intertubular ou androgênico (França & Russel, 1998). As células de Leydig estão localizadas no compartimento intertubular, juntamente com vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular diversificada, constituída principalmente por fibroblastos e macrófagos (Setchel, 1991). São células de formato poligonal, com diâmetro de aproximadamente 20µm e abundante citoplasma rico em mitocôndrias e retículo endoplasmático liso (Colleta & Carvalho, 2005). Em geral, roedores apresentam um padrão de intertúbulo no qual as células de Leydig estão intimamente associadas aos vasos sanguíneos e cercadas pelo espaço linfático (Fawcett et al., 1973).

Muitos fatores podem modular a atividade das células de Leydig e dentre estes se destacam os compostos citotóxicos os quais, de forma direta ou indireta, afetam a função dessas células. A testosterona produzida pelas células de Leydig é responsável pela estimulação da espermatogênese, pelo desenvolvimento e manutenção de características sexuais secundárias (Sharpe, 1994; O'Donnell et al., 2001).

A isotretinoína exerce uma infinidade de efeitos em diversos processos biológicos, elevando os níveis séricos de colesterol e triacilglicerol, alterando o crescimento, proliferação

e diferenciação de células normais, embora sejam raros os estudos que comprovem sua toxicidade em nível testicular. Sabendo-se dos efeitos clínicos adversos causados pelo Roacutan®, tornam-se importantes e necessários estudos criteriosos sobre este fármaco, para que haja comprovação ou não de seus efeitos colaterais e/ou tóxicos sobre a gônada masculina. Assim, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar os efeitos do tratamento com Roacutan® 20mg sobre o compartimento intertubular de testículos de ratos Wistar adultos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

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

Foram utilizados 24 ratos Wistar machos em idade reprodutiva (70 dias), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram manuseados e submetidos à eutanásia de acordo com Princípios Éticos de Pesquisa Animal, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo os critérios metodológicos aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV – Protocolo número 11/2012).

Os animais foram pesados (média 316g), colocados em gaiolas individuais e distribuídos em 3 grupos experimentais: grupo 1 (controle; n=6) recebeu 1,0mL de água deionizada/ animal/dia; grupo 2 (tratado; n=9) recebeu 0,2mg de Roacutan® em 1,0mL de óleo de soja/animal/dia; grupo 3 (tratado; n=9) recebeu 0,4mg de Roacutan® em 1,0mL de óleo de soja/animal/dia. Estas doses corresponderam às doses terapêuticas mínimas (0,5 – 1,0 mg/kg/dia) para humanos.

Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (média de 22°C) e fotoperíodo (12-12h claro/escuro) durante o período experimental de 60 dias consecutivos, tempo este considerado crônico para o epitélio seminífero, uma vez que todo o processo espermatogênico do rato Wistar tem aproximadamente esta duração. Todo o regime líquido foi fornecido ad libitum assim como a alimentação sólida (ração).

## **2.2 Diluição do Roacutan® 20mg**

As cápsulas de Roacutan® (Roche) 20mg foram armazenadas em temperatura ambiente (entre 15° e 30°C), em embalagem original, protegidas da umidade e da luz. Cada cápsula foi cuidadosamente cortada e todo seu conteúdo (líquido) retirado, utilizando-se uma micropipeta e, colocado em um recipiente de vidro âmbar onde foi diluído seguindo o seguinte protocolo: 01 cápsula de Roacutan® 20mg em 100mL de óleo de soja para dose convencional e 02 cápsulas de Roacutan® 20mg em 100mL de óleo de soja para dose dupla. Todos os cuidados relativos à manipulação, condições de temperatura e armazenamento do fármaco foram tomados para preservar a estabilidade do produto e evitar contaminações.

## **2.3 Coleta das Amostras**

Ao término do período experimental, os animais foram contidos, pesados e eutanasiados em atmosfera de CO<sub>2</sub>. O sangue, coletado através de punção cardíaca, foi centrifugado por quinze minutos a 3000 rpm. O soro foi separado e armazenado em ultrafreezer (-80°C) para análises bioquímicas e enzimáticas. Em seguida, foram removidos os testículos e a próstata, que foram pesados em balança de precisão (BEL Mark 160 classe 2) (0,001g). Todos os órgãos coletados foram imersos em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas para análises biométricas e histomorfométricas.

## **2.4 Análises Morfométricas**

Fragmentos de um dos testículos, destinados ao estudo em microscopia de luz, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica), sendo posteriormente seccionados na espessura de 3µm em micrótomo rotativo automático (Reichert-Jung, Alemanha) com navalha de vidro. Os cortes histológicos semisseriados foram obtidos em intervalos de 13 cortes, correspondendo à distância de 40µm entre eles. As secções obtidas foram colocadas em lâminas de vidro – 02 lâminas por animal – totalizando 10 secções por lâmina, que foram coradas com azul de toluidina-borato de sódio 1% e montadas com Entellan® (Merck). Imagens do parênquima testicular foram obtidas em fotomicroscópio Olympus BX-60 acoplado ao software de captura de imagens Q Capture. Para análise das imagens foi utilizado o programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics). O

testículo contralateral foi dissecado e foi retirada a albugínea para calcular o percentual ocupado pela mesma no testículo.

#### 2.4.1 Proporção volumétrica (%) e volume dos elementos do intertúbulo

Para a obtenção das proporções volumétricas (%) dos componentes intertubulares, foram contados 1.000 pontos projetados sobre imagens capturadas da região do intertúbulo, das 02 lâminas contendo cada uma 10 cortes histológicos do testículo de cada animal, utilizando-se objetiva de 40x. Foram computados os pontos coincidentes sobre núcleo e citoplasma de células de Leydig, tecido conjuntivo, macrófago, vaso sanguíneo e espaço linfático. O percentual de células de Leydig foi obtido pela soma dos pontos coincidentes sobre núcleo e citoplasma. A diferença entre esses pontos possibilitou o cálculo da relação nucleoplasmática (RNP), visando análises de volumetria das células de Leydig.

A proporção volumétrica dos componentes do intertúbulo foi calculada utilizando o número de pontos sobre o componente do intertúbulo (%CI) e o número total de pontos sobre o intertúbulo (nPI). A partir da fórmula  $DV_c = (\%CI/nPI) * 100$  calculou-se a proporção volumétrica do componente no intertúbulo.

O cálculo do percentual ocupado pelos elementos do intertúbulo nos testículos foi obtido empregando-se a fórmula:  $DV_{ct} = (DVI * \%CI) / 100$ , onde  $DVI = \% \text{ intertúbulo}$ .

O volume dos elementos do intertúbulo por testículo (VEIT) foi calculado por meio da fórmula:  $VEIT(mL) = (\% \text{ do elemento nos testículos} * PPar) / 100$ , onde  $PPar = \text{peso do parênquima testicular}$ .

O volume dos elementos do intertúbulo por grama de testículo (VEIT/G) foi calculado utilizando-se a fórmula:  $VEIT/G(mL) = VEIT / \text{peso bruto testicular}$ .

Para o cálculo do peso do parênquima testicular (PPar), subtraiu-se do peso bruto do testículo o peso da albugínea. Como a densidade do testículo de mamíferos está em torno de 1 (Johnson & Neaves, 1981; França, 1991, Paula, 1999; Tae et al., 2005; Costa et al., 2011), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

#### 2.4.2 Morfometria da célula de Leydig

O diâmetro nuclear médio das células de Leydig foi medido utilizando-se imagens capturadas com objetiva de 40x. Trinta núcleos de células de Leydig foram medidos em cada

animal utilizando-se o programa de análise de imagens Image-Pro Plus (Media Cybernetics). Foram utilizados núcleos que apresentavam contorno esférico com a cromatina perinuclear e nucléolos evidentes.

Foram calculados os volumes ( $\mu\text{m}^3$ ) nuclear (VNU), citoplasmático (VCT) e de cada célula de Leydig (VLY) por animal, utilizando-se as seguintes fórmulas:

**Volume nuclear** =  $4/3\pi R^3$ , onde R=raio nuclear; **Volume citoplasmático** =  $(\% \text{citoplasma} * \text{VNU}) / \% \text{núcleo}$ ; **Volume celular** =  $\text{VNU} + \text{VCT}$

Cálculos do número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo foram feitos utilizando-se as seguintes fórmulas:

**Número de células de Leydig por testículo** =  $\text{volume que a célula de Leydig ocupa por testículo} (\mu\text{m}^3) / \text{volume de uma célula de Leydig} (\mu\text{m}^3)$

**Número de células de Leydig por grama de testículo** =  $\text{volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo} (\mu\text{m}^3) / \text{volume de uma célula de Leydig} (\mu\text{m}^3)$

Onde:

**volume que a célula de Leydig ocupa por testículo** =  $\text{proporção da célula de Leydig no testículo} * \text{peso do parênquima de um testículo} / 100$

**volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo** =  $\text{volume que a célula de Leydig ocupa por testículo} / \text{peso bruto de um testículo}$

O índice Leydigossomático (ILS), que visa quantificar o investimento em células de Leydig com relação ao peso corporal, foi calculado através da fórmula:

**ILS** =  $(\text{VLT} / \text{PC}) * 100$ , onde VLT=volume que a célula de Leydig ocupa nos testículos e PC= peso corporal.

## 2.5 Determinação dos Níveis Plasmáticos de Testosterona

A testosterona plasmática é o principal andrógeno circulante e, juntamente com a testosterona intratesticular, é responsável pela manutenção da espermatogênese normal, dos órgãos sexuais masculinos e do aparecimento dos caracteres sexuais secundários masculinos (Da Ros et al., 1998). A dosagem de testosterona foi feita através de quimioluminescência, utilizando o “kit” comercial Access Testosterona® (Beckman Couter, U.S.A.). A dosagem foi realizada no aparelho Access II (Beckman) do Laboratório de Reprodução do Departamento de Zootecnia da UFV.

## 2.6 Análises Estatísticas

Análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls (SNK) foi usada para comparar médias e desvio padrão entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

## 3. RESULTADOS

As proporções volumétricas (%) dos elementos constituintes do intertúbulo estão descritas na tabela 1. Analisando os valores médios da proporção volumétrica de macrófagos no intertúbulo, observou-se redução significativa nos grupos tratados quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Os demais componentes constituintes do intertúbulo não apresentaram diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 1.** Proporção volumétrica (PV %) dos elementos constituintes do intertúbulo.

Parâmetros	G1 (n=6)	G2 (n=9)	G3 (n=9)
Citoplasma de Leydig	59,14 ± 3,62 <sup>a</sup>	57,24 ± 7,56 <sup>a</sup>	50,27 ± 8,15 <sup>a</sup>
Núcleo de Leydig	15,58 ± 2,44 <sup>a</sup>	14,17 ± 2,44 <sup>a</sup>	14,12 ± 3,07 <sup>a</sup>
Células de Leydig	74,72 ± 5,18 <sup>a</sup>	71,41 ± 9,08 <sup>a</sup>	64,39 ± 10,47 <sup>a</sup>
Macrófagos	2,03 ± 0,43 <sup>a</sup>	1,29 ± 0,32 <sup>b</sup>	1,08 ± 0,41 <sup>b</sup>
Tecido conjuntivo	0,30 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,59 ± 0,28 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,28 <sup>a</sup>
Vasos sanguíneos	16,22 ± 3,28 <sup>a</sup>	18,82 ± 3,43 <sup>a</sup>	21,45 ± 4,17 <sup>a</sup>
Espaço linfático	6,73 ± 3,93 <sup>a</sup>	7,89 ± 8,48 <sup>a</sup>	12,48 ± 10,29 <sup>a</sup>

Média ± desvio-padrão; G1: grupo controle, 1,0mL água via oral; G2: grupo tratado com 0,2mg/animal/dia de Roacutan®; G3: grupo tratado com 0,4mg/animal/dia de Roacutan®; <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

A proporção volumétrica (%) do intertúbulo e de seus elementos constituintes em relação ao testículo estão descritos na tabela 2. A proporção volumétrica de intertúbulo dos grupos G2 e G3 reduziu significativamente em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). As médias referentes a tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e espaço linfático não sofreram variações

significativas entre os animais do grupo controle e tratados ( $p > 0,05$ ). No entanto, as proporções volumétricas de citoplasma, núcleo e das células de Leydig nos testículos, apresentaram redução nos grupos G2 e G3 em relação ao grupo controle. A proporção volumétrica de macrófagos no testículo reduziu 53,50% e 68,42% nos grupos G2 e G3, respectivamente, em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Proporção volumétrica (PV %) de intertúbulo e de seus elementos no testículo.

Parâmetros	G1 (n=6)	G2 (n=9)	G3 (n=9)
Intertúbulo	5,608 ± 0,280 <sup>a</sup>	4,127 ± 1,180 <sup>b</sup>	3,342 ± 0,341 <sup>b</sup>
Citoplasma de Leydig	3,321 ± 0,318 <sup>a</sup>	2,374 ± 0,856 <sup>b</sup>	1,679 ± 0,318 <sup>c</sup>
Núcleo de Leydig	0,875 ± 0,154 <sup>a</sup>	0,576 ± 0,169 <sup>b</sup>	0,473 ± 0,118 <sup>b</sup>
Células de Leydig	4,196 ± 0,430 <sup>a</sup>	2,950 ± 1,011 <sup>b</sup>	2,152 ± 0,414 <sup>c</sup>
Macrófagos	0,114 ± 0,023 <sup>a</sup>	0,053 ± 0,023 <sup>b</sup>	0,036 ± 0,015 <sup>b</sup>
Tecido conjuntivo	0,017 ± 0,009 <sup>a</sup>	0,024 ± 0,011 <sup>a</sup>	0,020 ± 0,010 <sup>a</sup>
Vasos sanguíneos	0,904 ± 0,157 <sup>a</sup>	0,752 ± 0,147 <sup>a</sup>	0,709 ± 0,109 <sup>a</sup>
Espaço linfático	0,377 ± 0,220 <sup>a</sup>	0,348 ± 0,420 <sup>a</sup>	0,425 ± 0,345 <sup>a</sup>

Média ± desvio-padrão; G1: grupo controle, 1,0mL água via oral; G2: grupo tratado com 0,2mg/animal/dia de Roacutan®; G3: grupo tratado com 0,4mg/animal/dia de Roacutan®; <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

O volume do intertúbulo e de seus elementos constituintes por testículo (mL) encontram-se na tabela 3. O volume do intertúbulo reduziu significativamente nos grupos G2 e G3 quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), não havendo diferença significativa entre os grupos tratados. Os volumes de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e espaço linfático não apresentaram variações significativas entre os tratamentos. O volume do citoplasma, núcleo e das células de Leydig do grupo G3 reduziu significativamente em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), sendo que o G2 só apresentou redução significativa no volume nuclear e de células de Leydig em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). O volume de

macrófagos reduziu 51,35% e 67,56% nos grupos G2 e G3, respectivamente, em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3.** Volume do intertúbulo e de seus elementos constituintes por testículo (mL).

Parâmetros	G1 (n=6)	G2 (n=9)	G3 (n=9)
Intertúbulo	0,1815 ± 0,0263 <sup>a</sup>	0,1385 ± 0,0425 <sup>b</sup>	0,1113 ± 0,0134 <sup>b</sup>
Citoplasma de Leydig	0,1077 ± 0,0195 <sup>a</sup>	0,0797 ± 0,0304 <sup>ab</sup>	0,0558 ± 0,0103 <sup>b</sup>
Núcleo de Leydig	0,0284 ± 0,0069 <sup>a</sup>	0,0193 ± 0,0059 <sup>b</sup>	0,0157 ± 0,0039 <sup>b</sup>
Células de Leydig	0,1361 ± 0,0254 <sup>a</sup>	0,0990 ± 0,0360 <sup>b</sup>	0,0715 ± 0,0135 <sup>b</sup>
Macrófagos	0,0037 ± 0,0010 <sup>a</sup>	0,0018 ± 0,0008 <sup>b</sup>	0,0012 ± 0,0005 <sup>b</sup>
Tecido conjuntivo	0,0006 ± 0,0003 <sup>a</sup>	0,0008 ± 0,0004 <sup>a</sup>	0,0007 ± 0,0003 <sup>a</sup>
Vasos sanguíneos	0,0288 ± 0,0036 <sup>a</sup>	0,0252 ± 0,0048 <sup>a</sup>	0,0236 ± 0,0041 <sup>a</sup>
Espaço linfático	0,0123 ± 0,076 <sup>a</sup>	0,0117 ± 0,0143 <sup>a</sup>	0,0143 ± 0,117 <sup>a</sup>

Média ± desvio-padrão; G1: grupo controle, 1,0mL água via oral; G2: grupo tratado com 0,2mg/animal/dia de Roacutan®; G3: grupo tratado com 0,4mg/animal/dia de Roacutan®; <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Na tabela 4 estão demonstrados os volumes dos elementos do intertúbulo (mL) por grama de testículo. O volume citoplasmático, nuclear e das células de Leydig dos grupos G2 e G3 reduziu significativamente quando comparados ao grupo controle, ( $p < 0,05$ ). O volume de macrófagos dos grupos tratados reduziu significativamente quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa no volume dos demais componentes do intertúbulo entre os grupos tratados e controle ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 4.** Volume dos elementos do intertúbulo (mL) por grama de testículo.

Parâmetros	G1 (n=6)	G2 (n=9)	G3 (n=9)
Citoplasma de Leydig	0,0654 ± 0,0076 <sup>a</sup>	0,0483 ± 0,0178 <sup>b</sup>	0,0340 ± 0,0068 <sup>c</sup>
Núcleo de Leydig	0,0173 ± 0,0033 <sup>a</sup>	0,0117 ± 0,0035 <sup>b</sup>	0,0096 ± 0,0024 <sup>b</sup>
Células de Leydig	0,0827 ± 0,0102 <sup>a</sup>	0,0600 ± 0,0210 <sup>b</sup>	0,0436 ± 0,0088 <sup>b</sup>
Macrófagos	0,0023 ± 0,0005 <sup>a</sup>	0,0011 ± 0,0005 <sup>b</sup>	0,0007 ± 0,0003 <sup>b</sup>
Tecido conjuntivo	0,0003 ± 0,0002 <sup>a</sup>	0,0005 ± 0,0002 <sup>a</sup>	0,0004 ± 0,0002 <sup>a</sup>
Vasos sanguíneos	0,0178 ± 0,0031 <sup>a</sup>	0,0153 ± 0,0029 <sup>a</sup>	0,0143 ± 0,0021 <sup>a</sup>
Espaço linfático	0,0075 ± 0,0045 <sup>a</sup>	0,0070 ± 0,0085 <sup>a</sup>	0,0085 ± 0,0068 <sup>a</sup>

Média ± desvio-padrão; G1: grupo controle, 1,0mL água via oral; G2: grupo tratado com 0,2mg/animal/dia de Roacutan®; G3: grupo tratado com 0,4mg/animal/dia de Roacutan®; <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Os parâmetros morfométricos das células de Leydig, assim como a biometria da próstata estão descritos na tabela 5. O volume nuclear, citoplasmático, de uma célula de Leydig e de células de Leydig por testículo não apresentaram diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ). O número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo foi significativamente menor nos grupos G2 e G3 quando comparados ao controle ( $p < 0,05$ ). O índice Leydigossomático apresentou valores significativamente menores nos grupos tratados em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

O peso da próstata reduziu 45,71% e 48,57% nos grupos G2 e G3, respectivamente, em relação ao controle G1 ( $p < 0,05$ ).

A determinação dos níveis plasmáticos de testosterona está demonstrada na figura 1. Uma redução significativa nos níveis de testosterona pode ser observada nos grupos G2 e G3 quando comparados com o grupo controle ( $p < 0,05$ ). Os grupos tratados não se diferenciaram entre si ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 5.** Morfometria das células de Leydig e biometria da próstata

Parâmetros	G1 (n=6)	G2 (n=9)	G3 (n=9)
VNU ( $\mu\text{m}^3$ )	186,683 $\pm$ 18,962 <sup>a</sup>	208,961 $\pm$ 26,355 <sup>a</sup>	192,787 $\pm$ 26,980 <sup>a</sup>
VCT ( $\mu\text{m}^3$ )	723,073 $\pm$ 125,389 <sup>a</sup>	859,328 $\pm$ 158,456 <sup>a</sup>	704,968 $\pm$ 171,942 <sup>a</sup>
VLY ( $\mu\text{m}^3$ )	909,756 $\pm$ 137,601 <sup>a</sup>	1068,289 $\pm$ 178,095 <sup>a</sup>	897,755 $\pm$ 193,034 <sup>a</sup>
VLY/T (mL)	9,10 <sup>(-11)</sup> $\pm$ 1,38 <sup>(-11)</sup> <sup>a</sup>	10,7 <sup>(-11)</sup> $\pm$ 1,78 <sup>(-11)</sup> <sup>a</sup>	8,98 <sup>(-11)</sup> $\pm$ 1,93 <sup>(-11)</sup> <sup>a</sup>
NLY/T ( $\times 10^6$ )	15,30 $\pm$ 3,62 <sup>a</sup>	9,55 $\pm$ 3,90 <sup>b</sup>	8,31 $\pm$ 2,46 <sup>b</sup>
NLY/GT ( $\times 10^6$ )	4,71 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>	2,84 $\pm$ 1,11 <sup>b</sup>	2,49 $\pm$ 0,71 <sup>b</sup>
ILS (%)	0,037 $\pm$ 0,010 <sup>a</sup>	0,025 $\pm$ 0,008 <sup>b</sup>	0,018 $\pm$ 0,004 <sup>b</sup>
PPr (g)	0,35 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	0,19 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	0,18 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>

Média  $\pm$  desvio-padrão; G1: grupo controle, 1,0mL água via oral; G2: grupo tratado com 0,2mg/animal/dia de Roacutan®; G3: grupo tratado com 0,4mg/animal/dia de Roacutan®. Volume Nuclear (VNU); Volume Citoplasmático (VCT); Volume Celular de Leydig (VLY); Volume de Células de Leydig por Testículo (VLY/T); Volume de Células de Leydig por Grama de Testículo (VLY/GT); Número de Células de Leydig por Testículo (NLY/T); Número de Células de Leydig por Grama de Testículo (NLY/GT); Índice Leydigossomático (ILS); Peso da Próstata (PPr). <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

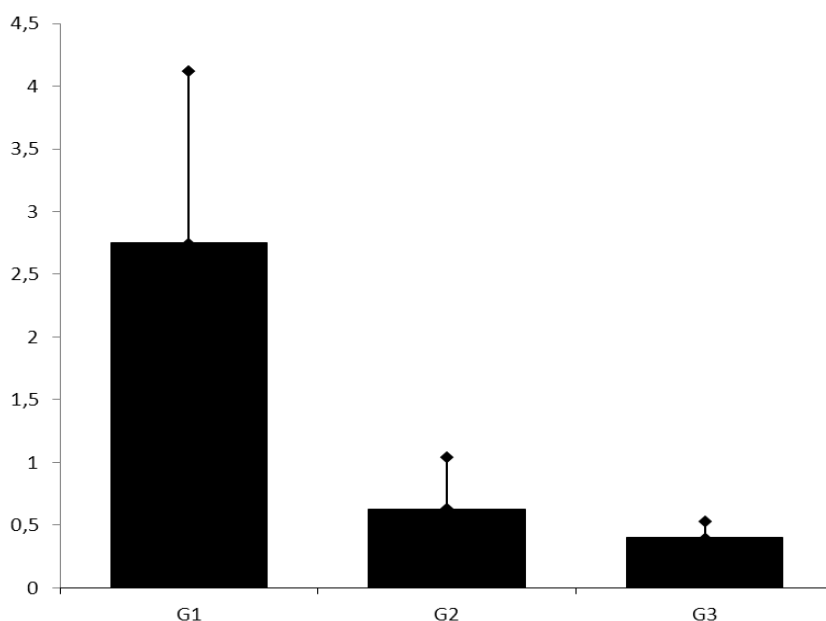


Figura 1. Níveis plasmáticos de testosterona em ratos Wistar adultos tratados com Roacutan® por 60 dias. G1: grupo controle, 1,0mL água via oral; G2: grupo tratado com 0,2mg/animal/dia de Roacutan®; G3: grupo tratado com 0,4mg/animal/dia de Roacutan®.

#### 4. DISCUSSÃO

A ação da isotretinoína sobre o sistema reprodutor masculino ainda tem sido pouco estudada, ao contrário do que encontramos na literatura quando se trata do sexo feminino. Estudos epidemiológicos do Ministério da Saúde (2010) apontam que mais de 80% de jovens entre 15 e 25 anos no país sofrem com a acne. Portanto, Gencoglan & Tosun (2011) sugerem a realização de estudos experimentais complementares para avaliar e identificar os possíveis efeitos secundários na espermatogênese, decorrentes do uso deste medicamento, tendo em vista que a maioria dos pacientes do sexo masculino que fazem uso de isotretinoína está em idade reprodutiva.

A redução na proporção volumétrica e no volume de intertúbulo nos grupos tratados com Roacutan® certamente comprometeu a fisiologia desse compartimento. Em ratos submetidos à hipervitaminose A também houve redução do volume do tecido intersticial, acompanhado da redução da massa testicular (Carvalho, 1978; Comitato, et al., 2006), sendo esta redução motivada pelas alterações intertubulares.

No presente estudo observou-se que o uso de Roacutan® causou redução nas proporções volumétricas de macrófagos relativas ao intertúbulo e ao testículo, assim como seu volume celular por mL e por grama de testículo, devido ao efeito deletério da isotretinoína sobre esta célula. Durante o desenvolvimento testicular, mudanças na morfologia das células de Leydig ocorrem de maneira coordenada com os macrófagos, demonstrando íntima associação entre estas células. Neste sentido, entende-se que fatores secretados pelos macrófagos controlam de modo parácrino a atividade esteroideogênica e o desenvolvimento das células de Leydig (Hales, 2002; Hutson, 2006). Gomes (2007) verificou redução dos macrófagos e de células de Leydig em ratos tratados com catuaba (*Trichilia catigua*). Sadek et al. (1999) investigaram o efeito da isotretinoína sobre a espermatogênese em ratos adultos machos e relataram a cessação completa da espermatogênese e alterações no citoplasma de células de Leydig após seis semanas de administração, mas não relacionaram o acontecido com macrófagos ou célula de Leydig.

Em nosso experimento, após oito semanas de administração do Roacutan®, foram observadas reduções significativas nas proporções volumétricas e volumes citoplasmáticos, nucleares e de células de Leydig nos testículos e por grama de testículo nos grupos de animais tratados, indicando um prejuízo fisiológico sobre a androgênese. A porção endócrina testicular é representada pelas células de Leydig que formam o espaço intertubular juntamente com outros componentes conjuntivos, como fibroblastos e macrófagos, além de vasos

sanguíneos e linfáticos. Segundo Skinner (1991), a célula de Leydig é o principal componente intertubular e responsável pela produção de testosterona, estabelecendo relações com outras células presentes no intertúbulo, especialmente macrófagos. Portanto, um elaborado sistema de comunicação intercelular é desenvolvido no testículo para assegurar o perfeito funcionamento do processo espermatogênico (Roser, 2000). Entende-se que citocinas e fatores de crescimento secretados pelos macrófagos estimulem a proliferação e diferenciação de células de Leydig imaturas, contribuindo para o desenvolvimento normal destas células (Hales, 2002). Nos testículos de ratos adultos, além da interdependência funcional entre células de Leydig e macrófagos, existe também o acoplamento estrutural entre estas células. Este acoplamento consiste de projeções citoplasmáticas das células de Leydig localizadas dentro de invaginações citoplasmáticas dos macrófagos. Estas estruturas variam de simples projeções tubulares a complexas estruturas ramificadas, sugerindo que a interdigitação é mais que simples invaginações das microvilosidades em vesículas revestidas (Hutson et al., 1992 e Hutson, 2006).

Podem ocorrer mitoses de células de Leydig em animais adultos (Russell, 1996) e, segundo Hales (1996), o número de macrófagos intertubulares também pode aumentar no adulto e a sua taxa de proliferação está sob controle indireto da hipófise. Estudos correlacionando estrutura e função de células de Leydig, em várias espécies de mamíferos, mostraram que variações na síntese e secreção de testosterona dependem mais da capacidade individual desta célula do que do volume total delas no testículo (Ewing et al., 1979). Esta capacidade está altamente associada com a quantidade de retículo endoplasmático liso presente na célula de Leydig (Zirkin et al., 1980). De acordo com Castro et al. (2002), o volume nuclear da célula de Leydig e o número de células de Leydig por grama de testículo estão altamente correlacionados com a concentração de testosterona testicular e plasmática; a redução do número de células de Leydig levou à redução da síntese de testosterona pelo testículo.

Neste estudo, os animais tratados com isotretinoína, apesar de não apresentarem diferença significativa no volume individual de células de Leydig, tiveram redução de níveis plasmáticos de testosterona. Uma vez que os macrófagos auxiliam regulando a produção de testosterona pela célula de Leydig, os níveis plasmáticos de testosterona podem ter se alterado em decorrência da redução destas duas células, o que implicaria na inibição da secreção de testosterona pelas células de Leydig. Hutson et al. (1996 e 2006) sugeriram que macrófagos testiculares secretam um fator lipofílico capaz de estimular a produção de testosterona pelas

células de Leydig. Este fator pode estimular células de Leydig cultivadas a produzirem mais testosterona do que quando estas células são estimuladas pelo LH (Hutson, 1998). Assim, a redução de macrófagos observada neste trabalho pode ter colaborado para a redução da síntese de testosterona pelas células de Leydig. Segundo Creasy (2001), o peso da próstata pode indicar mudanças nas concentrações de testosterona circulante, uma vez que o crescimento, a diferenciação e a manutenção da próstata são controlados principalmente por andrógenos. A redução dos níveis plasmáticos de testosterona dos animais tratados com Roacutan®, em ambas as doses, foram compatíveis com a redução do peso da próstata destes mesmos animais.

A avaliação do índice Leydigossomático indicou que animais tratados com isotretinoína apresentaram menor proporção de peso corporal alocado em células de Leydig, justificado pela redução do número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo. Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies quanto à proporção volumétrica (%) dos diferentes componentes do compartimento intertubular, de maneira geral a célula de Leydig é o tipo celular mais abundante neste compartimento (Russell, 1996; Godinho, 1999; Gomes, 2007). Assim, entende-se que a redução do percentual e do volume do compartimento intertubular tenha ocorrido principalmente devido à redução da população das células de Leydig, associada à redução de macrófagos, comprovada pela redução do ILS.

## **5. CONCLUSÕES**

O tratamento com Roacutan® nas doses 0,2 e 0,4mg/animal/dia causou redução do compartimento intertubular, acompanhado pela redução do percentual de macrófagos, do número de células de Leydig e, conseqüentemente, a redução dos níveis de testosterona plasmática. Entende-se que o uso de Roacutan® por homens deve ser feito com cautela.

## **6. REFERÊNCIAS**

- Barros, J.B.G., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Guião-Leite, F.L., Rossi, J.L., Oliveira, P.C., Costa, E.P. 2007. Sertoli cell index and spermatic reserves in adult captive African lions (*Panthera leo* Linnaeus, 1758). *Animal Reproduction Science*, 102:(3-4)350-356.

- Caldeira, B.C. 2005. Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do cachorro-do-mato (*Cercyon thous* Linnaeus, 1766) adulto. Dissertação Mestrado, Medicina Veterinária. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 48p.
- Carvalho, T.L.L., Lopes, R.A., Azoubel, R, Ferreira, A.L. 1978 (2). Morphometric study of reversibility of testicle alterations in rats submitted to hypervitaminosis A. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*, 48(4):316-324.
- Castro, A.C.S., Berndtson, W.E., Cardoso, F.M. 2002. Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35:493-498.
- Colleta, H.H.M.D., Carvalho, H.F. 2005. Células de Leydig. In: Carvalho, H.F., Colares-Buzato, C.B., (Eds). *Células: Uma abordagem multidisciplinar*. São Paulo: Malone, Cap. 25, p. 325-334.
- Comitato, R., Esposito, T., Cerbo, G., Angelini, F., Varriale, B., Cardone, A. 2006. Impairment of spermatogenesis and enhancement of testicular germ cell apoptosis induced by exogenous all-trans-retinoic acid in adult lizard *Podarcis sicula*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 305:288-298.
- Costa, K. L. C.; Matta, S. L. P.; Gomes, M. L. M.; Paula, T. A. R.; Freitas, K. M.; Carvalho, F. A. R.; Silveira, J. A.; Dolder, H.; Mendis-Handagama, C. 2011. Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Animal Reproduction Science*, 127:202-212.
- Creasy, D.M. 2001. Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicologic Pathology*, 29:64-76.
- Cupertino, M.C. 2012. Danos oxidativos e histológicos crônicos causados pelo cádmio no fígado e na espermatogênese de ratos. Dissertação Mestrado, Biologia Animal. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 69p.
- Da Ros, C.T., Telöken, C., Tannhauser, M., Hartmann, A.A. 1998. Does intratesticular testosterone administration modify the evolution of transitory testicular ischemia in prepubertal rats? *Journal of Urology*, 159:1752-1754.
- Ewing, L.L., Zirkin, B.R., Cochran, R.C., Kromann, N., Peters, C., Ruiz-Bravo, N. 1979. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. *Endocrinology*, 105(5):1135-1142.
- Fawcett, D.W., Neaves, W.B., Flores, M.N. 1973. Comparative observations on intertubular

- Lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of Reproduction*, 9:500-532.
- França, L.R., Russell, L.D. 1998. The testis of domestic mammals. In: Regadera, J., Martinez-Garcia, R. (Eds.). *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. Madrid, Churchill Communications, pp.198-219.
- França, L.R. 1991. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Tese Doutorado, Morfologia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 180p.
- Frota Junior, M.L.C.F. 2005. Ação extracelular do ácido retinoico via espécies reativas do oxigênio em células de Sertoli. Dissertação Mestrado, Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 86p.
- Gencoglan, G., Tosun, M. 2011. Effects of isotretinoin on spermatogenesis of rats. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 30(1):55-60.
- Godinho, C.L. 1999. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros. Dissertação Mestrado, Departamento de Morfologia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 79p.
- Gomes, M.L.M. 2007. Morfometria testicular de ratos Wistar adultos tratados com infusão aquosa de catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss. MELIACEAE). Dissertação Mestrado, Departamento de Biologia Celular e Estrutural. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 38p.
- Hales, D.B. 1996. Leydig cell-macrophage interactions: an overview. In: Payne, A.H., Hardy, M.P., Russell, L.D. (Org.), *The Leydig cell*. Vienna: Cache River Press, Cap. 21, p.452-463.
- Hales, D.B. 2002. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *Journal of Reproductive Immunology*, 57:3-18.
- Hutson, J.C. 1992. Development of cytoplasmic digitations between Leydig cells and testicular macrophages of the rat. *Cell and Tissue Research*, 267:385-389.
- Hutson, J.C., Garner, C.W., Doris, P.A. 1996. Purification and characterization of a lipophilic factor from testicular macrophages that stimulates testosterone secretion. *Journal of Andrology*, 17:502-508.
- Hutson, J.C. 1998. Interactions between testicular macrophages and Leydig cells. *Journal of Andrology*, 19(4):394-398.
- Hutson, J.C. 2006. Physiologic interactions between macrophages and Leydig cells.

- Experimental Biology and Medicine, 231:1-7.
- Johnson, L., Neaves, W.B. 1981. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. *Biology of Reproduction*, 24:703-712.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cellular Biology*, 27:137-138.
- Matta, A.P.L.F. 2012. Efeitos do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen sobre testículo e pênis de camundongos adultos. Tese Doutorado, *Biologia Celular e Estrutural*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 93p.
- Melo, F.C.S.A., Matta, S.L.P., Paula, T.A.R., Gomes, M.L.M., Oliveira, L.C. 2010. The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult Wistar rats. *Biological Research*, 43(4):445-450.
- Ministério da Saúde. Em Busca de uma pele sem marcas. Portal da Saúde. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/> Acesso em 12 de Novembro de 2012.
- O'Donnell, L., Robertson, K.M., Jones, M.E., Simpson, E.R. 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews*, 22(3):289-318.
- Paula T.A.R. 1999. Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Tese Doutorado, *Morfologia*. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 84p.
- Roser, J.F. 2000. Reproductive endocrinology of the stallion. In: *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*, Samper JC (ed). Saunders Company, Philadelphia, 123-132.
- Russell, L.D. 1996. *The Leydig Cell*. Cache River Press. Vienna. p. 43-96.
- Sadek, I.A. Abdul Mohsen, M.H. 1999. Long-term administration of vitamin A and the process of spermatogenesis. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 5(1):123-129.
- Sarti, P., Paula, T.A.R., Polli, G.O., Deco Souza, T., Araujo, G.R. 2011. Morfofisiologia do tecido intertubular e das células de Leydig de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) adulta. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63(5):1060-1065.
- Saurat, J.H. 1997. Oral isotretinoin. Where now, where next? *Dermatology Basel*, 195(1):1-3.
- Setchel, B.P. 1991. Male reproductive organs and semen. In Cupps, P.T. (Ed.): *Reproduction in domestic animals*. 4<sup>th</sup> Ed. San Diego: Academic Press, Cap.6, p. 221-250.

- Sharpe, R.M. 1994. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.). The physiology of reproduction, ed.2, New York, Raven Press, Cap. 22, p. 1363-1434.
- Skinner, M.K. 1991. Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Reviews* 12:45-77.
- Tae, H.J., Jang, B.G., AHN, D.C., Chooi, E.Y., Kang, H.S., Kim, N.S., Lee, J.H., Park, S.Y., Yang, H.H., Kim, I.S. 2005. Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus Karpowi*) during the breeding and non-breeding seasons. *Veterinary Research Communications*, 29:629-643.
- Zirkin, B.R., Ewing, L.L., Kromann, N., Cochran, R.C. 1980. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes in vitro: correlation with Leydig cells ultrastructure. *Endocrinology*, 107:1867-1874.

## CONCLUSÕES GERAIS

- Doses terapêuticas de Roacutan® mostraram pouca interferência sobre os túbulos seminíferos, porém causaram redução do peso da próstata.
- O tratamento com Roacutan® durante 60 dias, nas doses 0,2 e 0,4mg/animal/dia, pareceu exercer efeito tóxico para a linhagem de células de Leydig, macrófagos e espermatozoides.
- O Roacutan® em doses terapêuticas afetou a porção endócrina dos testículos dos animais que receberam este tratamento por 60 dias.

## **PERSPECTIVAS**

Baseado nos importantes resultados para o compartimento intertubular e, a despeito das alterações tubulares não serem expressivas, sugere-se ainda:

- a. Realizar análises bioquímicas sorológicas;
- b. Realizar a contagem das populações celulares no estágio 1 do ciclo do epitélio germinativo;
- c. Realizar o cálculo da produção e da reserva espermática;
- d. Realizar estudos mais detalhados utilizando microscopia eletrônica de transmissão;
- e. Realizar novo experimento adicionando maior dose, além das utilizadas, e verificar se o processo ocorrido no intertúbulo é reversível;
- f. Realizar técnica de TUNEL para detectar apoptoses no túbulo e intertúbulo.