



---

**EFEITO DA DOXICICLINA NO COMPARTIMENTO INTERTUBULAR  
TESTICULAR DE RATOS WISTAR: morfometria e volumetria**

**Veronica A. SIMAN<sup>2</sup>; Fernanda C.R DIAS<sup>1</sup>; Janaina SILVA<sup>1</sup>; Viviane G.S MOURO<sup>1</sup>;  
Eduardo M. DAMASCENO<sup>1</sup>; Mariáurea M. SARANDY<sup>1</sup>; Rômulo D. NOVAES<sup>3</sup>; Reggiane  
V. GONÇALVES<sup>2</sup>; Sérgio L.P. da MATTA<sup>1</sup>.**

**RESUMO**

A Doxiciclina, é um derivado semissintético que apresenta maior penetração em fluidos e tecidos corporais. Poucos estudos relacionam o uso de antibióticos e sua interferência nas células produtoras de andrógenos. Este estudo visou avaliar o efeito da Doxiciclina sobre o intertúbulo testicular de ratos Wistar. Utilizaram-se 2 concentrações: 10 e 30 mg/kg de peso corporal, por 21 dias consecutivos. Foi observado que a doxiciclina promoveu aumento de 38% no número de Leydig em C1 e de 73% em C2.

**INTRODUÇÃO**

Os antibióticos, naturais ou sintéticos, são capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Eles são classificados como bactericidas e bacteriostáticos, de acordo com sua ação biológica, sendo elas, promover a morte bacteriana e a inibição do crescimento microbiano, respectivamente (WALSH, 2003).

Os antibióticos naturais e seus derivados compreendem a maior parte dos compostos indicados em uso clínico. Dentre eles está a família das Tetraciclinas, um grupo de bacteriostáticos, de amplo espectro, e muito eficaz no controle de diversas bactérias (PATRICK et al., 1995; WRIGHT et al., 2003). Entre os representantes desse grupo citamos a Doxiciclina, um derivado semissintético, que se diferencia dos outros membros deste grupo por ser mais lipofílico, o que promove maior penetração em fluidos e tecidos corporais (TROY; FORRESTER, 1990).

<sup>1</sup> Universidade Federal de Viçosa. Viçosa/MG. Email: [vsiman.bio@gmail.com](mailto:vsiman.bio@gmail.com); [fernandaribeiro.dias@hotmail.com](mailto:fernandaribeiro.dias@hotmail.com); [janaina.silva2@ufv.br](mailto:janaina.silva2@ufv.br); [vivimouro@yahoo.com.br](mailto:vivimouro@yahoo.com.br); [edumdamasceno@hotmail.com](mailto:edumdamasceno@hotmail.com); [mariauriasarandy@gmail.com](mailto:mariauriasarandy@gmail.com); [romulo.novaes@ufv.br](mailto:romulo.novaes@ufv.br); [reggysvilela@yahoo.com.br](mailto:reggysvilela@yahoo.com.br); [smatta@ufv.br](mailto:smatta@ufv.br)

Poucos estudos relacionam o uso de antibióticos sobre eventos espermatogênicos, mas trabalhos realizados mostram que a maioria dos antibióticos, dentre eles as Tetraciclina, possuem característica espermatotóxica (HARGREAVES et al. 1998). A ação de antibióticos no compartimento intertubular foi demonstrada por Liu et al. (2012), observando o efeito da citrinina em células de Leydig de ratos. Ainda assim, há poucos dados na literatura referentes à ação de antibióticos sobre o intertúbulo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais**

Foram utilizados 15 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos jovens, com idade de 50 dias. Durante todo o tratamento, os animais foram mantidos em gaiolas com dieta de manutenção (Labina® - Purina) e água *ad libitum*, sendo submetidos a um ciclo diário de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, em temperatura de 22±2°C.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos (n=5): Controle (C) - nenhuma substância administrada; Concentração 1 (C1) - 10 mg/kg de Doxiciclina; e Concentração 2 (C2) - 30 mg/kg de Doxiciclina. Os animais receberam doses diárias por gavagem, durante 21 dias consecutivos.

Vinte e quatro horas após a administração da última dose, os animais foram pesados e anestesiados. Os animais foram orquiequitomizados e os testículos foram pesados com a albugínea intacta.

### **Processamento Histológico**

Os testículos dos animais foram fixados em Karnovsky e seccionados perpendicularmente ao seu maior eixo para obtenção de quatro fragmentos testiculares armazenados em etanol 70%. Os fragmentos foram desidratados em séries crescentes de álcoois, incluídos em resina (Historesin®, Leica) e cortados em micrótomo em secções de 3µm de espessura. As secções foram coradas com azul de toluidina/borato de sódio e levadas ao microscópio de luz para análises morfológicas e morfométricas.

### **Análises Morfométricas**

#### *Proporção volumétrica dos componentes intertubulares*

As imagens do parênquima testicular foram obtidas por fotomicroscopia, e as análises morfométricas foram realizadas através do programa Image Pro Plus. As proporções volumétricas dos componentes do intertúbulo foram estimadas

utilizando-se retículo com 300 intersecções por campo, em aumento de 400X. Para cada animal foram analisados campos escolhidos ao acaso, até totalizar 1000 intersecções. Foram contabilizados pontos sobre núcleo de célula de Leydig, citoplasma de célula de Leydig, vaso sanguíneo, espaço linfático, macrófago e elementos do tecido conjuntivo.

#### *Quantificação de Células de Leydig*

Tendo-se realizado a proporção, sabe-se o percentual de citoplasma e núcleo de célula de Leydig. O diâmetro nuclear dessas células foi obtido através de medições feitas com o auxílio do programa Image Pro Plus. As imagens foram obtidas em aumento final de 400x. Trinta núcleos de células de Leydig foram medidos em cada animal. Os núcleos medidos foram aqueles que se apresentavam o mais esférico possível e com cromatina perinuclear e nucléolo bastante evidentes. A partir dos dados acima obtidos e aplicando-se as fórmulas abaixo, foram calculados o volume nuclear, o volume do citoplasma e, conseqüentemente, o volume de cada célula de Leydig, por animal. Esses valores foram expressos em micrômetros cúbicos.

$$\text{Vol. Nuclear de Leydig} = \frac{4}{3} \pi R^3$$

$$\text{Volume citoplasmático de Leydig} = \frac{\% \text{ de citoplasmas} \times \text{volume nuclear de Leydig}}{\% \text{ de núcleo}}$$

$$\text{Volume celular de Leydig} = \text{Volume do núcleo} + \text{Volume citoplasmático}$$

Onde R=raio nuclear.

De posse do volume ( $\mu\text{m}^3$ ) das células de Leydig, da proporção volumétrica (%) das mesmas no testículo e do volume total (ml) ocupado por estas células no testículo, calculou-se o número total de células de Leydig por testículo e por grama de testículo, em cada animal.

#### **Análise Estatística**

A análise estatística para todos os parâmetros foi realizada ANOVA com post hoc SNK, usando o programa Statistica. Os valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos (MORETTIN; BUSSAB, 2010).

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

De acordo com Fawcett et al. (1973) e Russell (1996), o arranjo dos elementos do intertúbulo provavelmente está relacionado à habilidade dos vasos linfáticos em mover para fora dos testículos material vascularmente secretado e em

manter concentrações adequadas de andrógenos nos testículos e nos vasos sanguíneos. Quando avaliados os percentuais dos compartimentos intertubulares, o vaso sanguíneo, espaço linfático, macrófago, tecido conjuntivo, núcleo de células de Leydig não foram alterados entre os grupos. O percentual de intertúbulo aumentou em 42% no grupo C1, o percentual de citoplasma de Leydig aumentou significativamente no grupo C1 (44%) e o percentual de célula de Leydig aumentou em 42% no mesmo grupo. Esses dois parâmetros não aumentaram significativamente no grupo C3, mas apresentaram valor de  $p=0,08$  quando comparados ao controle.

O volume desses componentes em ml, além do espaço linfático, macrófago, tecido conjuntivo, não foram alterados entre os grupos. O volume de vasos sanguíneos aumentou 69% no grupo C1 e 96% no grupo C3, enquanto o volume do núcleo de Leydig aumentou 53% no grupo C1. O volume do intertúbulo aumentou em 70% no grupo C1 e 55% no grupo C3, o volume de citoplasma de Leydig aumentou 77% no grupo C1 e 69% no grupo C3 e o volume da célula de Leydig aumentou 69% no grupo C1 e 61% no grupo C3 quando comparados ao controle. Esses aumentos podem refletir aumento de atividade, mas também uma hipertrofia tentando compensar uma possível queda hormonal plasmática.

O volume em  $\mu\text{m}^3$  do citoplasma de Leydig foi 25% maior no grupo C1 e o volume desta célula foi 23% maior no grupo C1. Embora o volume nuclear não tenha sofrido alteração no grupo C3 em relação ao controle, apresentou um  $p=0,08$ . O índice Leydigossomático aumentou em 44% e 54% justificado pelo aumento do número de células por testículo de 38% e 73%, respectivamente, nos grupos C1 e C3. O número de células de Leydig por grama de testículo, assim como seu diâmetro nuclear, não sofreram alterações quando comparados ao controle.

A administração de ofloxacina por 14 dias (34<sup>o</sup> ao 48<sup>o</sup> de vida), 12mg/kg via gavagem, não afetou o tamanho e a forma dos núcleos das células de Leydig, das espermatogônias e das células de Sertoli (PASCHOAL et al. 2005). Abd-ailah et al. (2000) mostraram que o uso de ofloxacina em concentração gradativa (36,72,360 mg/Kg) por 15 dias levou à redução gradativa da produção espermática diária e à diminuição da motilidade dos espermatozoides. Adicionalmente, em doses superiores a 135 mg/Kg, os túbulos seminíferos apresentam atrofia e a partir da dose 360 mg/kg as células de Leydig desapareceram.

Tabela 1: Dados dos parâmetros intertubulares de ratos wistar tratados com doxiciclina 10 mg/kg (C1) e 30 mg/kg (C2) e o controle (C). Valores analisados com o teste ANOVA com post hoc SNK, considerados significativos  $p \leq 0,05$

	<b>Controle</b>	<b>C1</b>	<b>C3</b>
<b>Percentual de vaso sanguíneo</b>	0,89 <sup>a</sup>	1,22 <sup>a</sup>	1,32 <sup>a</sup>
<b>Percentual de espaço linfático</b>	1,00 <sup>a</sup>	1,55 <sup>a</sup>	0,78 <sup>a</sup>
<b>Percentual de macrófago</b>	0,039 <sup>a</sup>	0,072 <sup>a</sup>	0,035 <sup>a</sup>
<b>Percentual de tecido conjuntivo</b>	0,25 <sup>a</sup>	0,22 <sup>a</sup>	0,24 <sup>a</sup>
<b>Percentual de núcleo de Leydig</b>	0,564 <sup>a</sup>	0,713 <sup>a</sup>	0,687 <sup>a</sup>
<b>Percentual de citoplasma de Leydig</b>	3,83 <sup>a</sup>	5,55 <sup>b</sup>	4,90 <sup>a</sup>
<b>Percentual de intertúbulo</b>	6,58 <sup>a</sup>	9,33 <sup>b</sup>	7,97 <sup>a</sup>
<b>Percentual de Leydig</b>	4,40 <sup>a</sup>	6,26 <sup>b</sup>	5,59 <sup>a</sup>
<b>Diâmetro de Leydig</b>	5,64 <sup>a</sup>	5,74 <sup>a</sup>	5,46 <sup>a</sup>
<b>Volume de vaso sanguíneo(ml)</b>	0,026 <sup>a</sup>	0,044 <sup>b</sup>	0,051 <sup>b</sup>
<b>Volume de espaço linfático(ml)</b>	0,034 <sup>a</sup>	0,056 <sup>a</sup>	0,030 <sup>a</sup>
<b>Volume de macrófago(ml)</b>	0,001 <sup>a</sup>	0,003 <sup>a</sup>	0,001 <sup>a</sup>
<b>Volume de Tecido conjuntivo(ml)</b>	0,006 <sup>a</sup>	0,008 <sup>a</sup>	0,009 <sup>a</sup>
<b>Volume de núcleo de Leydig(ml)</b>	0,017 <sup>a</sup>	0,026 <sup>b</sup>	0,026 <sup>a</sup>
<b>Volume de Citoplasma de Leydig(ml)</b>	0,112 <sup>a</sup>	0,198 <sup>b</sup>	0,189 <sup>b</sup>
<b>Volume de intertúbulo</b>	0,197 <sup>a</sup>	0,335 <sup>b</sup>	0,306 <sup>b</sup>
<b>Volume de Célula de Leydig(ml)</b>	0,13 <sup>a</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,21 <sup>b</sup>
<b>Volume de núcleo de Leydig(<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	94,56 <sup>a</sup>	101,1 <sup>a</sup>	85,75 <sup>a</sup>
<b>Volume de Citoplasma de Leydig(<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	630,85 <sup>a</sup>	891,96 <sup>b</sup>	696,70 <sup>a</sup>
<b>Volume de Célula de Leydig(<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	725,41 <sup>a</sup>	891,96 <sup>b</sup>	696,70 <sup>a</sup>
<b>ILS</b>	0,048 <sup>a</sup>	0,069 <sup>b</sup>	0,074 <sup>b</sup>
<b>Número de Leydig/T</b>	89,66 <sup>a</sup>	124,08 <sup>b</sup>	155,56 <sup>b</sup>
<b>Número de Leydig/g</b>	60,60 <sup>a</sup>	70,34 <sup>a</sup>	80,92 <sup>a</sup>

## CONCLUSÕES

O tratamento com doxiciclina promoveu alteração no volume e número de célula de Leydig e também no volume de vaso sanguíneos, podendo ocorrer modificações nas concentrações de testosterona, e assim, influenciar no processo espermato gênico. Análises ultraestruturais devem ser realizadas para avaliar o aumento dessas células.

## REFERÊNCIAS

ABD-ALLAH A.R et al. Adverse testicular effects of some quinolone members in rats. **Pharmacological Research**. V. 41, n. 2, p. 211-219. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10623489>>

FAWCETT, D.W et al. Comparative observations on intertubular lymphatic and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. **Biology Reproduction**. v. 9, n. 5, p. 500-532, 1973. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4203289>>

HARGREAVES, C.A. et al. Effects of co-trimoxazole, erythromycin, amoxycillin, tetracycline and chloroquine on sperm function *in vitro*. **Human Reproduction**, v. 13, n. 7 p. 1878–1886, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9740442>>

LIU, S. et al. Citrinin reduces testosterone secretion by inducing apoptosis in rat Leydig cells. **Toxicology in Vitro**. v. 26, n. 6, p. 856–861. 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22564900>>

MORETTIN, P.A; BUSSAB, W.O. **Estatística Básica**. 6ª ed. São Paulo: Saraiva, 2010.

PASCHOAL. V.D. et al. Volume dos núcleos das células do testículo de ratos sob efeitos da ofloxacina. **Hansenologia Internationalis**. V. 30, n. 1, p. 03-08. 2005. Disponível em: < <http://saudepublica.bvs.br/pesquisa/resource/pt/han-23147>>

PATRICK, G.L. et al. **An Introduction to Medicinal Chemistry**, Oxford University Press: New York, 1995, cap. 10.

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

TROY, G.C; FORRESTER, S.D. Canine ehrlichiosis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: Saunders, p.404-414. 1990

WALSH, C.; Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. **American Society for Microbiology**. v. 13, n. 11, p. 3059-3060. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2286585/>>

WRIGHT, G.D. et al. Burger's Medicinal Chemistry & Drug Discovery. **Chemotherapeutic Agents**, vol. 5, cap. 15, 2003.