



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**EFEITOS DE SULFATO DE VINCRISTINE SOBRE OS TESTÍCULOS
DE RATOS ALBINOS, TRATADOS NA FASE PRÉ-PÚBERE**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Campina Grande-UFCG, em cumprimento do requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

EDSON VINÍCIUS LEITE VELOSO

PATOS-PB

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CAMPINA GRANDE

**CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITOS DE SULFATO DE VINCRISTINE SOBRE OS TESTÍCULOS
DE RATOS ALBINOS, TRATADOS NA FASE PRÉ-PÚBERE**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Campina Grande-UFCG, em cumprimento do requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

EDSON VINÍCIUS LEITE VELOSO

Prof. Dr. Otávio Brilhante de Sousa

Orientador

PATOS-PB

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

V432e Veloso, Edson Vinícius Leite
Efeitos de sulfato de vincristine sobre os testículos de ratos
albinos, tratados na fase pré-púbere / Edson Vinícius Leite Veloso. –
Patos, 2016.
48f. : il.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade
Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural,
2016.

"Orientação: Prof. Dr. Otávio Brilhante de Sousa"

Referências.

1. Quimioterápicos. 2. Testículos. 3. Efeitos deletérios. I. Título.

612:619

CDU

**EFEITOS DE SULFATO DE VINCRISTINE SOBRE A MORFOLOGIA
TESTICULAR DE RATOS ALBINOS TRATADOS NA FASE PRÉ-PÚBERE**

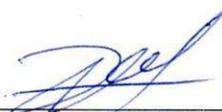
EDSON VINÍCIUS LEITE VELOSO

Dissertação aprovada em 28/06/2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Otávio Brillhante de Sousa
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG – Patos/PB
(Orientador)



Prof. Dr. Danilo José Ayres de Menezes
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG – Patos/PB



Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Departamento de Ciências Veterinárias CCA/UFPB – Areia/PB

PATOS

2016

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter dado sabedoria, coragem e determinação para a realização deste trabalho.

Aos meus pais Edson Veloso Filho e Maria Inês Leite Veloso, e a minha tia Olga Rosina Fitipalde Veloso por serem o esteio da minha vida.

A minha família pela credibilidade, apoio e confiança.

A minha namorada Lorena da Cruz Moreira de Figueirêdo, pelo amor, paciência e companheirismo em todos os momentos.

Ao professor Otávio Brilhante de Sousa pela orientação, dedicação, e amizade durante toda a realização deste trabalho.

Aos professores Danilo José Ayres de Menezes, Ricardo Romão Guerra e Rosane Maria Trindade de Medeiros, pelos ensinamentos e amizade.

Aos colegas da graduação em Medicina Veterinária Leonardo Nogueira de Souza, Rosana do Nascimento Ribeiro, Wanesk Kerly Barbosa Lucena e Carmen Sidelis.

Aos funcionários Jonas Alves, Maria das Neves e Dona Joana pela paciência e colaboração no trabalho.

A UFCG , ao Programa de Pós Graduação de Medicina Veterinária, pela ajuda e oportunidade.

A CAPES, pelo financiamento deste trabalho.

A todos aqueles que participaram direta ou indiretamente contribuindo para realização deste trabalho.

Obrigado.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II. Efeitos de sulfato de vincristine sobre os testículos de ratos albinos, tratados na fase pré-púbere.

Fig. A1: Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos do grupo controle e sacrificados aos 40 dias de vida (GC₄₀). Coloração HE. Núcleo da célula de Sertoli (S); célula mióide (M); espermatócito primário (Ep); espermátide jovem (Sj); lúmen tubular (Lt); tecido intersticial (Ti).

Fig. B1: Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos do grupo controle e sacrificados aos 64 dias de vida (GC₆₄). Coloração HE. Célula mióide (M); lúmen tubular (Lt); tecido intersticial (Ti); espermatogônia (G); lâmina limitante (Lm).

Fig. C1: Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos do grupo controle e sacrificados aos 127 dias de vida (GC₁₂₇). Coloração HE. Tecido intersticial (Ti); espermatócito primário (Ep); espermátide tardia (St); espermatogônia (G); núcleo da célula de Sertoli (S).

Fig. A2: Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com sulfato de vincristine e sacrificados aos 40 dias de vida (GV₄₀). Coloração HE. Observam-se efeitos deletérios no epitélio seminífero. Núcleo da célula de Sertoli (S); célula mióide (M); lâmina limitante (Lm); espermatogônia (G); espermatócito primário (Ep); espermátide jovem (Sj); lúmen tubular (Lt); tecido intersticial (Ti); vacuolização (V); célula multinucleada (CM).

Fig. B2: Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com sulfato de vincristine e sacrificados aos 64 dias de vida (GV₆₄). Coloração HE. Observam-se restos celulares oriundos da descamação do epitélio seminífero. Lâmina limitante (Lm); espermátide jovem (Sj); espermátide tardia (St); lúmen tubular (Lt); tecido intersticial (Ti).

Fig. C2: Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com sulfato de vincristine e sacrificados aos 127 dias de vida (GV₁₂₇). Coloração HE. Evidencia-se degeneração severa dos túbulos seminíferos, desorganização e vacuolizações (V) do epitélio seminífero.

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO II. Efeitos de sulfato de vincristine sobre os testículos de ratos albinos, tratados na fase pré-púbere.

Quadro 1: Peso corpóreo (PC), peso testicular absoluto (PTA), peso testicular relativo (PTR), volume testicular total (VTT), eixo testicular maior (ETMA), eixo testicular menor (ETME) e os respectivos desvios padrões (\pm DP) em grupos de ratos albinos controles (GC) e tratados (GV) de 40, 64 e 127 dias de idade (GC₄₀, GV₄₀, GC₆₄, GV₆₄, GC₁₂₇ e GV₁₂₇).

Quadro 2: Densidade de volume dos túbulos seminíferos (DVT), densidade de volume do tecido intersticial (DVI), volume dos túbulos seminíferos (VT), volume tecido intersticial (VI), e densidade de comprimento (DC) com os respectivos desvios padrões (\pm DP) em grupos de ratos albinos controles (GC) e tratados (GV) de 40, 64 e 127 dias de idade (GC₄₀, GV₄₀, GC₆₄, GV₆₄, GC₁₂₇ e GV₁₂₇).

Quadro 3: Diâmetro do túbulo seminífero (DT), altura do epitélio seminífero (ALES), diâmetro do lúmen tubular (DL), eixo menor do túbulo seminífero (EMTS), área do túbulo seminífero (ART), área do lúmen tubular (ARL) e área do epitélio seminífero (AREP) com os respectivos desvios padrões (\pm DP) em grupos de ratos albinos controles (GC) e tratados (GV) de 40, 64 e 127 dias de idade (GC₄₀, GV₄₀, GC₆₄, GV₆₄, GC₁₂₇ e GV₁₂₇).

Quadro 4: Valores percentuais médios das frequências dos tipos celulares espermatogônia A (GA), espermatogônia B e intermediária (GBI), espermatócito primário (EP), espermatíde jovem (SJ), espermatíde tardia (ST) e células de Sertoli (S) e desvio padrão (\pm DP) nos túbulos seminíferos em grupos de ratos albinos controles (GC) e tratados (GV) de 40, 64 e 127 dias de idade (GC₄₀, GV₄₀, GC₆₄, GV₆₄, GC₁₂₇ e GV₁₂₇).

Sumário

1 INTRODUÇÃO	12
2 DESENVOLVIMENTO.....	13
2.1 DOXORRUBICINA.....	14
2.1.1 Aplicação clínica	14
2.1.2 Efeitos adversos.....	16
2.2 VINCRISTINA.....	16
2.2.1 Aplicação clínica	16
2.2.2 Efeitos adversos.....	17
2.3 CICLOFOSFAMIDA.....	18
2.3.1 Aplicação clínica	18
2.3.2 Efeitos adversos.....	19
2.4 CISPLATINA.....	20
2.4.1 Aplicação clínica	20
2.4.2 Efeitos adversos.....	21
2.5 OUTROS QUIMIOTERÁPICOS	21
3 CONCLUSÃO	22
4 REFERÊNCIAS.....	23
5 APRESENTAÇÃO.....	29
CAPÍTULO II. EFEITOS DE SULFATO DE VINCRISTINE SOBRE OS TESTÍCULOS DE RATOS ALBINOS, TRATADOS NA FASE PRÉ-PÚBERE.....	30
RESUMO	31
1 INTRODUÇÃO	31
2 MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1 Obtenção dos animais	32
2.2 Padronização da dosagem do sulfato de vincristine.....	32
2.3 Formação dos grupos experimentais e controles.....	32
2.4 Coleta e processamento das amostras.....	33
2.5 Biometria, morfometria, estereologia e análise histológica.....	34
2.6 Análise estatística	35
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4 REFERÊNCIAS.....	47

**CAPÍTULO I. OS QUIMIOTERÁPICOS NA MEDICINA VETERINÁRIA: Uma
revisão de literatura**

CHEMOTHERAPEUTIC IN VETERINARY MEDICINE: A literature review

RESUMO

A ampliação dos serviços em saúde animal e a utilização das novas técnicas diagnósticas têm aumentado a perspectiva de vida dos animais domésticos. Consequentemente, os números de diagnósticos oncológicos em animais domésticos têm crescido na mesma proporção e a quimioterapia veterinária tem se destacado nas últimas décadas, como alternativa importante no tratamento de diversos tipos de tumores, principalmente devido a sua eficiência na recuperação do paciente e ao baixo custo de aquisição de algumas drogas. Apesar da eficácia terapêutica de muitos protocolos quimioterápicos, a utilização dessas drogas apresenta severas limitações, as quais estão relacionadas aos seus efeitos adversos, e dessa forma é imprescindível uma avaliação médica criteriosa a respeito das vantagens e desvantagens do tratamento. Esse estudo teve por objetivo compilar resultados de pesquisas realizadas na última década sobre os principais aspectos farmacológicos, clínicos e efeitos adversos das principais substâncias antineoplásicas quimioterápicas utilizadas na medicina veterinária, destacando-se a doxorrubicina, vincristina, ciclofosfamida e cisplatina. Esta revisão agrupa os trabalhos importantes do Brasil e de outros países onde as medidas terapêuticas de combate aos tumores tem avançado nos últimos anos, representando contribuição significativa para o estudo dessas patologias e de seu tratamento na Medicina Veterinária. O presente estudo foi realizado utilizando os bancos de dados Pubmed, Sielo e Portal Capes de acesso a periódicos por meio da rede mundial de computadores. **Palavras-chave:** Oncologia, Quimioterapia, Fármacos.

ABSTRACT

The expansion of services in animal health and the use of new diagnostic techniques have increased the prospect of life of pets. Consequently, the number of cancer diagnoses in domestic animals have grown at the same rate and veterinary chemotherapy has been highlighted in recent decades, as an important alternative in the treatment of various types of

tumors, mainly due to its efficiency in patient recovery and low acquisition cost of some drugs. Despite the therapeutic efficacy of many chemotherapeutic protocols, the use of these drugs has severe limitations, which are related to its adverse effects, and thus it is essential a careful medical evaluation of the advantages and disadvantages of treatment. This study aimed to compile results of research conducted in the last decade on the main pharmacological, clinical and adverse effects of antineoplastic chemotherapy main substances used in veterinary medicine, highlighting doxorubicin, vincristine, cyclophosphamide and cisplatin. This review brings together the important work of Brazil and other countries where therapeutic measures against tumors has advanced in recent years, representing a significant contribution to the study of these diseases and their treatment in veterinary medicine. This study was conducted using the databases Pubmed, Sielo Portal Capes and access to journals via the World Wide Web. **Keywords:** Oncology, Chemotherapy, Pharmaceuticals.

1 INTRODUÇÃO

Os estudos científicos das últimas décadas evidenciaram um aumento significativo no número de casos de tumores tanto em humanos como em animais domésticos. A quimioterapia antineoplásica ou antitumoral tem sido, em muitos casos, a alternativa mais indicada para o tratamento curativo de diferentes tipos de tumores, podendo ser indicada de forma adjuvante, combinada a outras medidas terapêuticas como radioterapia, crioterapia e intervenções cirúrgicas, ou ainda de forma paliativa (ALMEIDA et al, 2005; FARO et al, 2008).

Substâncias antineoplásicas incluem agentes quimioterápicos e radioterápicos. O principal objetivo dos protocolos quimioterápicos é a destruição específica das células cancerígenas, porém, o mecanismo de ação de grande parte dessas substâncias está diretamente ligado aos ciclos celulares de divisão e a alta capacidade proliferativa das células tumorais e de alguns tipos de células normais. Desta forma todos os tecidos com níveis

elevados de divisão celular, incluindo tumores e tecidos normais podem ser alvo da ação dos antineoplásicos quimioterápicos (KARASU et al, 2005).

Este trabalho tem por objetivo compilar os principais resultados dos estudos científicos que dispõem sobre aspectos farmacológicos, clínicos e efeitos adversos dos quimioterápicos de uso corrente na medicina veterinária. Esse estudo é uma pesquisa do tipo bibliográfica com base no banco de dados de artigos científicos disponibilizados nos sites de revistas científicas nacionais e internacionais (SAMPAIO & MANCINI, 2007).

2 DESENVOLVIMENTO

Os primeiros quimioterápicos foram descobertos em 1946 quando na Segunda Guerra Mundial observou-se que pessoas expostas ao gás mostarda (até então arma de guerra) desenvolviam hipoplasia medular e linfóide. A partir daí iniciaram-se pesquisas com objetivo de empregar essas substâncias no tratamento de linfomas malignos. A cada período, uma nova gama de antineoplásicos quimioterápicos é descoberta ou desenvolvida em laboratórios possibilitando a elaboração de diversos protocolos e estratégias de tratamento que possibilitem máximo desempenho dos medicamentos e atenuem os efeitos indesejados (COSTA-LOTUFO et al, 2010; FERDINANDI&FERREIRA, 2009;MACIEL et al, 2007).

Atualmente os quimioterápicos podem ser classificados de acordo a sua função a nível celular, sendo divididos em: 2.1 Alquilantes: Mostarda nitrogenada e derivados (mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucil), etilenamina, epoxidos (dibromomanitol, dibromocitrol), alquilsifonatos (bussulfan), nitrosouréias (carmustine, lomustine, streptomizicín), diaquiritriazenes (dacarbazina), streptozocina, ifosfamida, melfalan, cisplatina, estramustina, melfalano, tiopeda, semustina, dacarbazina, carboplatina (FERDINANDI&FERREIRA, 2009); 2.2 Antimetabólitos: Metotrexato, análogos da purina (6-mercaptopurina, 6- tioguanina, azatioprina), análogos da pirimidina (5-fluorouracil, citosin-arabinosídeo) (ALMEIDA et al, 2005); 2.3 Alcalóides: Vincristina e vimblastina, paclitaxel,

teniposido e etoposido (COSTA-LOTUFO et al, 2010; MACIEL et al, 2007; LEVÊQUE & JEHL, 2007); 2.4 Antibióticos: Antacíclicos (doxorubicina, daunoblastina, epirubicina, idarubicina), bleomicina, mitomicina, mitoxotona (SILVA & CAMACHO, 2005); 2.5 Micelâneas: Hidroxiuréia, procarbazona e asparaginase (REIS et al, 2008).

Os fármacos antineoplásicos também podem ser classificados de acordo com sua atuação sobre as fases do ciclo celular. As drogas ciclo-específicas são classificadas em fase-específicas e fase-inespecíficas. As substâncias de ação fase-específicas atuam apenas em células com divisões ativas e em determinadas fases do ciclo celular, já as fase-inespecíficas atuam em várias fases do ciclo. As drogas ciclo-inespecíficas podem atuar em todas as fases do ciclo celular de forma que podem ser indicadas para tratamento de tumores de crescimento lento e que apresentam menos células ativas em processo de divisão (FERDINANDI & FERREIRA, 2009).

Os antibióticos são exemplos de drogas ciclo-específicas fase-inespecíficas, enquanto que antimetabólicos e alcalóides são ciclo-específicos fase-específicos. Os alquilantes são classificados como ciclo-inespecíficos. Micelâneas são quimioterápicos de composição química e mecanismos de ação ainda não esclarecidos (FERDINANDI & FERREIRA, 2009).

2.1 DOXORRUBICINA

2.1.1 Aplicação clínica

O cloridrato de doxorubicina é um quimioterápico antibiótico da classe das antraciclinas que pode ser isolado a partir de culturas do fungo *Streptomyces peucetius* variedade *caesi* tendo sido identificada pela primeira vez por Arcamone em 1967. Outros exemplos de quimioterápicos antibióticos são bleomicina, actinomicina e mitomicina (ANTUNES et al, 2007; SILVA & CAMACHO, 2005).

Doxorrubicina (outrora adriamicina) tem sido administrada por via endovenosa devido à toxicidade tecidual. É uma droga largamente empregada no tratamento de diversos tipos de

tumores sólidos e hematológicos com destaque para carcinomas de mama e pulmão, osteossarcoma, rabiomiossarcoma, leiomiossarcoma, mesotelioma, linfoma linfocítico nodular, linfoma histiocítico difuso, leucemialinfoblástica aguda, TVT (nos casos arresponsivos a sulfato de vincristina) e sarcoma de Kaposi (ADÃO et al, 2013;ANTUNES et al, 2007;CAZÉ et al, 2010; CIRILLO, 2008;EL-SAYYAD et al, 2009;HIDDEMANN et al, 2005;MACDONALD et al, 2005;SIMON et al, 2006).

Aplicações de 30mg/m² de doxorubicina em cães com TVT arresponsivos a vincristina, mostraram-se 80% eficazes na segunda aplicação. A Doxorubicina tem assumido papel de destaque no tratamento de linfomas em cães(CIRILLO, 2008;SILVA& CAMACHO, 2005).

A doxorubicina e adaunomicina, assim como a maior parte das drogas quimioterápicas, atuam sobre a síntese de DNA. Nesse caso, os antibióticos promovem a quebra das fitas duplas impedindo sua restauração e a síntese de ácidos nucléicos(BRILHANTE et al, 2012).

A metabolização da doxorubicina ocorre principalmente no fígado apresentando meia vida de 20 a 48 horas, porém, órgãos como coração, rim, pulmões e baço captam a substância rapidamente. Devido à baixa solubilidade acredita-se que não atravesse a barreira hematoencefálica. Estudos mostraram que 40% da dose ministrada e seus metabólicos (doxorubicinol e doxorubicina conjugada) podem ser coletados na vesícula biliar ou nas fezes cerca de cinco dias após a aplicação, nesse mesmo período é possível recuperar entre 5 e 12% da droga na urina (BRILHANTE et al, 2012).

A doxorubicina apresenta vários mecanismos citotóxicos. A interação com a enzima topoisomerase II pode causar a abertura irreversível das fitas duplas de DNA que possuem topologia controlada pela enzima. Cães com tumores mamários podem apresentar amplificação dos genes que codificam a topoisomerase II o que potencializa a ação citotóxica

da droga em células tumorais. A doxorubicina é responsável por estabilizar o complexo DNA-Topoisomerase II mudando a conformação do DNA. Células normais também podem sofrer apoptose por meio desse mecanismo. O quimioterápico também pode atuar de forma a reduzir o anel quinona a radical semiquinona que possui potencial citotóxico devido à liberação de radicais livres prejudiciais às células normais e tumorais (FRAGIORGE et al, 2007; KALENDER et al, 2005).

2.1.2 Efeitos adversos

A cardiotoxicidade é o principal fator limitante ao uso da doxorubicina já que esse efeito é irreversível, progressivo e potencialmente fatal em homens e em cães. Pesquisas indicam que a administração concomitante de vincristina pode atenuar a cardiotoxicidade da doxorubicina (CAZÉ et al, 2010). Outros efeitos colaterais como mielossupressão, leucopenia, trombocitopenia, anemia, estomatite, náusea, vômito, perda de peso, necrose tecidual, alopecia, hiperpigmentação cutânea, eritema e prurido no trajeto da veia canulada também são relatados, porém, são de caráter reversível dependendo da dose empregada. A droga apresenta potencial teratogênico, carcinogênico e mutagênico (BECKER & NARDIN, 2011; CIRILLO, 2008; EL-SAYYAD et al, 2009; SILVA & CAMACHO, 2005). O uso da doxorubicina associada à radioterapia pode potencializar os efeitos adversos da radiação (ADÃO et al, 2013).

2.2 VINCRISTINA

2.2.1 Aplicação clínica

A vincristina e a vimblastina são alcalóides presentes em plantas da espécie *Catharanthus roseus*, também conhecida como “vinca rósea”, e atuam de forma citostática por meio da ligação à proteína tubulina, impedindo sua polimerização e causando sua precipitação. Dessa forma, a droga compromete a migração cromossomal e afeta a divisão celular. Mantendo os cromossomos unidos, o fuso mitótico é interrompido na fase “M”

(metáfase), e a progressão da replicação das células normais e tumorais é impedida (BRANDÃO et al, 2010; COSTA-LOTUFO et al, 2010; FARO et al, 2008; MACIEL et al, 2007; LEVÊQUE & JEHL, 2007).

A vincristina e a vimblastina são antineoplásicos que podem ser utilizados no tratamento de tumores no homem e em outros animais, incluindo sarcoma hiperpigmentado múltiplo (sarcoma de Kaposi), sarcoma de células reticulares, linfossarcoma, leucemia linfoblástica aguda, nefroblastoma renal, tumor venéreo transmissível (TVT) e distúrbios como trombocitopenia imunomediada. Os alcalóides existentes na vinca, juntamente com bleomicina e as antraciclina, têm sido as drogas quimioterápicas sistêmicas mais largamente estudadas nos últimos anos (ADÃO et al, 2013; BRANDÃO et al, 2010; CAZÉ et al, 2010; COSTA-LOTUFO et al, 2010; DRUMOND et al, 2013; FARO et al, 2008; HIDDEMANN et al, 2005; MACDONALD et al, 2005; MACIEL et al, 2007; KARASU et al, 2005; SANTOS et al, 2010; TESKE et al, 2014).

Geralmente o protocolo padrão de tratamento no TVT consiste em aplicações semanais na dose de 0,025 a 0,05mg/kg de peso vivo por via endovenosa por quatro a sete semanas; porém, vários outros protocolos são testados e relatados por pesquisadores. Aplicações por outras vias além da endovenosa podem causar reações indesejadas ou diminuição nos efeitos esperados, já à administração intratecal pode levar o animal a óbito (SILVA et al, 2007).

2.2.2 Efeitos adversos

Neuropatia periférica, mielossupressão, trombocitopenia, hipoplasia linfóide, azoospermia, constipação (neuropatia do sistema nervoso autônomo), necrose da mucosa do trato gastrointestinal, cólica, vômito, diarreia, retenção urinária, anorexia, náusea e alopecia foram observados em pacientes tratados com vincristina, principalmente quando a droga não é aplicada por via endovenosa, pois, seu extravasamento além de acentuar alguns efeitos

indesejados gera vesículas cutâneas e necrose tecidual (BECKER & NARDIN, 2011; BRANDÃO et al, 2010; CAZÉ et al, 2010; SANTOS et al, 2010). A alopecia é mais comum em seres humanos, porém, relatos de alopecia severa já foram descritos em cães da raça Poodle (CIRILLO, 2008; FARO et al, 2008).

2.3 CICLOFOSFAMIDA

2.3.1 Aplicação clínica

A ciclofosfamida juntamente com as nitrosuréias são os alquilantes mais difundidos. A droga é indicada nos casos de leucemias agudas, linfomas, mieloma múltiplo, adenocarcinoma do ovário, retinoblastoma, neuroblastomas, carcinoma de mama, neoplasias malignas do pulmão e colo de útero e sarcoma. As neoplasias linfoproliferativas em cães têm sido amplamente tratadas com ciclofosfamida. A droga atua por meio da alquilação do DNA, por ativação pelo sistema do citocromo P450 hepático formando as substâncias aldofosfamida, (metabólito que apresenta atividade antitumoral), fosforamida e a acroleína responsável por causar alguns dos efeitos adversos da droga como cistite, pois, é eliminado pela urina (CAZÉ et al, 2010; CIRILLO, 2008; ELMSLIE et al, 2008; EMADI et al, 2009; FARO et al, 2008; HIDDEMANN et al, 2005; LANA et al, 2007; MACDONALD et al, 2005; MITCHELL et al, 2012; SANTOS et al, 2010; SIMON et al, 2006; SOUSA NETO & SCALDAFERRI, 2005; TESKE et al, 2014).

A ciclofosfamida pode ser ministrada por via oral, tópica ou endovenosa. Na medicina veterinária, cadelas e gatas com neoplasias de mama são tratadas com dosagens que variam de 50 a 250mg/m². É comum utilizar uma associação da ciclofosfamida com doxorubicina e vincristina para tratamento de cães com linfomas. A droga inalterada geralmente não se liga a proteínas plasmáticas, porém é capaz de cruzar a barreira hematoencefálica assumindo concentração similar a observada no sangue. Dessa forma pode ser indicada em casos de

metástases no sistema nervoso central (HIDDEMANN et al, 2005;SANTOS et al, 2010; TRIPP et al, 2011).

Esse quimioterápico é metabolizado inicialmente pelas enzimas existentes no fígado, produzindo vários metabólitos tóxicos já descritos. As concentrações plasmáticas das substâncias metabólicas são proporcionais à dose ministrada sendo que o pico plasmático desses metabólitos é alcançado 2 a 3 horas após a aplicação de ciclofosfamida (CIRILLO, 2008, PIRES et al, 2010;SANTOS et al, 2010).

2.3.2 Efeitos adversos

Os principais efeitos colaterais do uso de ciclofosfamida incluem leucopenia, náuseas, vômitos, anorexia, amenorreia,infertilidade temporária ou definitiva, alopecia, hiperpigmentação cutânea e alterações na cicatrização normal. A cistite hemorrágica e a possibilidade de câncer de bexiga devem receber especial atenção no tratamento e convalescência, pois, podem ser severas e até mesmo fatais. A administração de fluidos em grandes quantidades e o conseqüente aumento na frequência da micção pode ajudar a prevenir o aparecimento de cistite, todavia, se mesmo assim ainda ocorrer, faz-se necessário interromper o uso da droga. Os efeitos adversos da ciclofosfamida e de outras mostardas nitrogenadas (clorambucila,ifosfamida, mecloretamina e melfalana) são os mais conhecidos e amplamente estudados(ADÃO et al, 2013; AUGÉ et al, 2013; BECKER & NARDIN, 2011;BRITO et al, 2008; CIRILLO, 2008, DANTAS et al, 2010;DORNELLES et al, 2014;ELMSLIE et al, 2008; FARO et al, 2008;FERDINANDI&FERREIRA, 2009; MARTINS et al, 2012;MITCHELL et al, 2012;MUKHTAR & WOODHOUSE, 2010; SANTOS et al, 2010).

A velocidade do metabolismo e a atividade leucopênica da ciclofosfamida são comprovadamente aumentadas pela administração de fenobarbital, já que ocorre aumento da incidência de depressão da medula óssea. Na administração conjunta de agentes

antidiabéticos, ocorre potencialização do efeito hipoglicêmico. Associada a doses elevadas de citarabina acarreta aumento em cardiomiopatia com morte subsequente dos cardiomiócitos (CONTI et al, 2007;DE JONGE et al, 2005;SILVA et al, 2008).

2.4 CISPLATINA

2.4.1 Aplicação clínica

Cisplatina, platinol ou neoplatin é um antineoplásico quimioterápico que foi sintetizado pela primeira vez no século XIV por Michele Peyrone, entretanto, apenas na década de 70 descobriu-se que a substância inibia a replicação do DNA e a subsequente divisão celular. A cisplatina é definida por alguns autores como substância alquilante do DNA por impedir sua síntese durante todas as fases do ciclo celular de forma citostática. Todavia, há divergências quanto a sua classificação podendo ser agrupada como antimetabólito ou composto de platina (ARNESANO & NATILE, 2009; HOWELL & SHALET, 2005;SAWHNEY et al, 2005). Esse quimioterápico adentra a célula por difusão, age sobre os ácidos nucléicos geralmente na fase S (síntese de DNA), interpondo-se nas moléculas de DNA impedindo sua transcrição e replicação (ALMEIDA et al, 2005;ARMSTRONG et al, 2006; BERG et al, 2006;DELLAMORA& OLIVEIRA, 2011;FERDINANDI&FERREIRA, 2009).

O quimioterápico deve ser ministrado por infusão intravenosa. As aplicações de cisplatina são realizadas no tratamento de tumor metastático do testículo, carcinoma do ovário, carcinoma da bexiga, carcinoma das células escamosas e melanoma. A cisplatina é contraindicada para felinos, pacientes com histórico com insuficiência renal pré-existente, pacientes com mielossupressão e pacientes com deficiência auditiva (ADÃO et al, 2013;BARABAS et al, 2008; BERG et al, 2006;CAZÉ et al, 2010;EL-SAYYAD et al, 2009;KONDAGUNTA et al, 2005; PEREIRA et al, 2010; SIMON et al, 2006; SOUSA NETO & SCALDAFERRI, 2005; TOZON et al, 2005).

A cisplatina apresenta meia-vida de 2 a 72 horas, dependendo principalmente da velocidade de depuração renal, mecanismo pelo qual a droga é eliminada. Agulhas ou equipamentos que contenham partes de alumínio que possam entrar em contato com a cisplatina não devem ser usados na sua preparação ou administração. O alumínio reage com a cisplatina levando a formação de um precipitado e a perda dos efeitos, sendo assim os instrumentos que contenham convencionalmente alumínio na composição devem ser substituídos por aço inoxidável durante o tratamento com cisplatina (BERG et al, 2006; JACOBS et al, 2005).

2.4.2 Efeitos adversos

Insuficiência renal é um dos efeitos colaterais mais importantes do uso acumulativo de cisplatina. Outros efeitos adversos como leucopenia, náuseas, vômitos, anorexia, neuropatia periférica, ototoxicidade, distúrbios eletrolíticos, amenorréia, azoospermia e sangramento gengival também estão incluídos. A Cisplatina apresenta características mutagênicas, carcinogênicas e teratogênicas. A sensibilidade à radioterapia pode aumentar com o uso de cisplatina, a ototoxicidade e a insuficiência renal causada pelo quimioterápico aumentam em uso concomitante com furosemida, anfotericina B, cefalotina e amiglicosídeos. Os efeitos dos anticonvulsivantes podem ser diminuídos se usados durante o tratamento com cisplatina, já as vacinas de vírus vivos não devem ser utilizadas durante o tratamento. Cisplatina não deve ser ministrada em gatos sob nenhum pretexto, pois, pode causar edema pulmonar fulminante (ASNA et al, 2005; BECKER & NARDIN, 2011; BERG et al, 2006; CAZÉ et al, 2010; EL-SAYYAD et al, 2009; KATAYAMA et al, 2011; ROSS, 2011).

2.5 OUTROS QUIMIOTERÁPICOS

Outros antineoplásicos quimioterápicos são empregados em menor escala na medicina veterinária devido ao custo elevado ou por estar em fase de experimentação em tumores diagnosticados nos animais. Muitos quimioterápicos ainda estão sendo testados em pacientes

veterinários, tais quais mitoxantrone (SICOTTE et al, 2012). O 5-Fluorouracil é um antimetabólito utilizado na dose de 150 mg/m², por via intravenosa em neoplasias de mama. Esta droga é totalmente contraindicada para a espécie felina, em virtude da neurotoxicidade que leva o animal à óbito, mesmo em doses pequenas(CIRILLO, 2008; EL-SAYYAD et al, 2009; SIMON et al, 2006;).

A asparaginase é administrada diretamente por via intramuscular ou subcutânea, porém, a aplicação dessa droga em tumores de animais ainda está sendo avaliada. Nos protocolos utilizados em cães com linfoma, incluindo o tratamento com vincristina, doxorubicina, ciclofosfamida e prednisona, observou-se que a inclusão da asparaginase no protocolo pouco interferiu nos resultados do tratamento. O efeito colateral inclui uma reação alérgica aguda, vermelhidão, urticária, dificuldade respiratória ou colapso (MACDONALD et al, 2005).

A bleomicina é um antibiótico antineoplásico utilizado em larga escala na quimioterapia humana. Na medicina veterinária, a droga é utilizada na composição de alguns protocolos quimioterápicos, incluindo o tratamento de neoplasias perianais em cães em conjunto com cisplatina, obtendo resultados significantes ainda nas primeiras seções de tratamento. O protocolo utilizado não causou efeitos adversos sistêmicos (TOZON et al, 2005).

3 CONCLUSÃO

Na busca pelo protocolo quimioterápico ideal, pesquisadores tem se deparado com um grande desafio que é o desenvolvimento de drogas ou técnicas que atuem de forma eficiente na depleção dos tumores, mas, que ao mesmo tempo não danifiquem as células normais do organismo, minimizando ao máximo os efeitos colaterais que dificultam recuperação do paciente debilitado pela patologia.

4 REFERÊNCIAS

ADÃO, R. et al. Cardiotoxicidade associada à terapêutica oncológica: mecanismos fisiopatológicos e estratégias de prevenção. **Revista Portuguesa de Cardiologia**: 2013, 32(5), p.395-409.

ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular nãoespecíficos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**: 2005, v. 28, n. 1, p. 118-129.

ANTUNES, L. M. G., et al. Acetylsalicylic acid exhibits anti-clastogenic effects on cultured human lymphocytes exposed to doxorubicin. **Mutation Research**: 2007, v. 626, p.155–161.

ARMSTRONG, D. K. et al. Intraperitonealcisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. **New England Journal of Medicine**: 2006, v. 354, p. 34-43.

ARNESANO, F., & NATILE, G. Mechanistic insight into the cellular uptake and processing of cisplatin 30 years after its approval by FDA. **Coordination Chemistry Reviews**: 2009, v. 253, p. 2070–2081.

ASNA, N. et al. Time dependent protection of amifostine from renal and hematopoietic cisplatin induced toxicity. **Life Science**: 2005, v. 76, p. 1825-1834.

AUGÉ C, et al. Relevance of the cyclophosphamide-induced cystitis model for the pharmacological studies targeting inflammation and pain of the bladder. **European Journal of Pharmacology**: 2013, v. 707, p.32-40.

BARABAS, K. et al. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. **Veterinary and Comparative Oncology**: 2008, v. 6, p. 1–18.

BECKER, J. & NARDIN, J. M. Utilização de antieméticos no tratamento antineoplásico de pacientes oncológicos. **Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde**: São Paulo, 2011, v. 2, n. 3, p. 18-22 set./dez.

BERG, J. et al. Future opportunities in preventing cisplatin induced ototoxicity. **Cancer Treatment Reviews**: 2006, p.390-397.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**: 2010, v. 33, n. 6, p. 1359-1369.

BRILHANTE, O. et al. Late morfofunctional alterations of the sertoli cell caused by doxorubicin administered to prepubertal rats. **Reproductive Biology and Endocrinology**: 2012, v.10, p.79.

BRITO, O. M. et al. Ciclofosfamida e função ovariana. **Revista Brasileira de Reumatologia**: 2008, v. 48, n.1, p. 39-45, jan/fev.

CAZÉ, M. O.; et al. Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para leucemia linfocítica aguda infantil. **Revista HCPA**: 2010, 30 (1), p. 5-12.

CIRILLO, J. V. Tratamento quimioterápico das neoplasias mamárias em cadelas e gatas. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**: 2008, 26(3), p. 325-7.

CONTI, F. et al. High-dose CEF (cyclophosphamide, epirubicin, fluorouracil) as primary chemotherapy in locally advanced breast cancer: long-term results. **La Clinica Terapeutica**: Roma, 2007, v. 158, n. 4, p. 331-41.

COSTA, W. F. & NEPOMUCENO, J. C. Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and minerals on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**: 2006, n. 47, p.18-24.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**: 2010, v. 2. n. 1, p. 47-58.

DANTAS, A. C. B., et al. Protective effect of simvastatin in the cyclophosphamide induced hemorrhagic cytitis in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**: 2010, 25(1), p. 43-56.

DE JONGE, M.E.; et al. Clinical pharmacokinetic of cyclophosphamide. **Clinical Pharmacokinetic**: New York,2005,v. 44, n. 11, p. 1135–1164.

DELLAMORA, E. C. L. & OLIVEIRA, F. K. V. L. Prevenção da exposição ocupacional: recomendações para a atenção ao paciente oncológico.**Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços deSaúde**: São Paulo, 2011, v.2 n.1, p. 21-25 jan./abr.

DORNELLES, F. N., et al.Role of CXCR2 and TRPV1 in functional, inflammatory and behavioural changes in the rat model of cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis. **British Journal Pharmacology**:2014, 171(2), p. 452-67.

DRUMOND, K. O. et al.Transmissible venereal tumor treated with autochemotherapy. **Acta Scientiae Veterinariae**: 2013, v. 41, p. 1107.

EL-SAYYAD, H. I. et al.Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5 fluorouracil (5-fu) on the liver of male albino rats.**International Journal of Biological Sciences**:2009, 5(5), p.466-473.

ELMSLIE, R. E. et al. Metronomic therapy with cyclophosphamide and piroxicam effectively delays tumor recurrence in dogs with incompletely resected soft tissue sarcomas.**Journal of Veterinary Internal Medicine**:2008, n.22, p.1373–1379.

EMADI. A., et al.Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. **Nature Reviews Clinical Oncology**:2009, n.6, p.638-647.

FARO, A. M. et al.Avaliação hematológica em cães submetidos aotratamento quimioterápico com sulfato de vincristina,prednisona e ciclofosfamida. Estudo experimental. **Arsveterinaria**:Jaboticabal,2008, v.24, n.1, p. 001-008.

FERDINANDI D. M, & FERREIRA A. A. Agentes alquilantes: reações adversas e complicações hematológicas. **AC &T Científica**: 2009, 1(1), p. 1-12.

FRAGIORGE, E. J.; et al. Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Biology**:2007, n. 2, p.449-455.

HIDDEMANN, W. et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (chop) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with chop alone: results of a prospective randomized study of the German low-grade lymphoma study group. **Blood Journal**:2005, v. 106, n. 12.

HOWELL, S. J. E.; & SHALET, S. M. Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**: Bethesda, 2005, n.34, p.12-17.

JACOBS, et al. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of intravenous oxaliplatin, cisplatin and carboplatin in nonhuman primates. **Clinical Cancer Research**:2005, p.1669-1674.

KALENDER Y., et al. Doxorubicin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats. the effects of vitamin e and cathecin. **Toxicology**:2005, v.209, p.39-45.

KARASU, S., et al. Successful treatment of liver transplant-associated kaposi's sarcoma with long-term vincristine. **Transplantation proceedings**:2005, v.37, p.2188–2189.

KATAYAMA, R., et al. Possible role of cysteine-s-conjugate β -lyase in species differences in cisplatin nephrotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**:2011, v.49, p.2053–2059.

KONDAGUNTA, G. V., et al. Combination of paclitaxel, ifosfamide and cisplatin is an effective second-line therapy for patients with relapsed testicular germ cell tumors. **Journal of Clinical Oncology**:2005, v. 23, p. 6549-6555.

LANA S, et al. Continuous low-dose oral chemotherapy for adjuvant therapy of splenic hemangiosarcoma in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**:2007, v.21, p. 764-69.

LEVÊQUE, D.; & JEHL, F. Molecular pharmacokinetics of catharanthus (vinca) alkaloids. **The Journal of Clinical Pharmacology**:2007, v.47, p.579-588.

MACDONALD, V. S. et al. Does l-asparaginase influence efficacy or toxicity when added to a standard chop protocol for dogs with lymphoma? **Journal of Veterinary Internal Medicine**:2005, n.19, p.732–736.

MACIEL, M. A. M. et al. Aspectos sobre produtos naturais na descoberta de novos agentes antitumorais e antimutagênicos. **Revista Fitos**: 2007, v.3 n.01.

MARTINS, J. P., et al. The role of p2x7 purinergic receptor in inflammatory and nociceptive changes accompanying cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in mice. **British Journal Pharmacology**:2012, 165(1), p.183-96.

MITCHELL, L. et al. Clinical and immunomodulatory effects of toceranib combined with low-dose cyclophosphamide in dogs with cancer. **Journal of Veterinary Internal Medicine**: 2012, v.26, p.355–362.

MUKHTAR, S.; & WOODHOUSE, C. The management of cyclophosphamide-induced haematuria. **BJU International**:2010, v.105, p.908-912.

PEREIRA, A. T. A. R. et al. Comparação entre pemetrexede e cisplatina versus pemetrexede e carboplatina no tratamento de primeira linha de carcinoma de pulmão de células não-pequenas avançado. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**:2010, v. 7, n. 22.

PIRES I; et al. Cox-1 and cox-2 expression in canine cutaneous, oral and ocular melanocytic tumors. **Journal of Comparative Pathology**: 2010, v.143, p.142-49.

REIS, P. E. D. et al. Efeitos adversos identificados em local de infusão intravenosa periférica por drogas quimioterápicas. **Ciencia y Enfermeria**:2008, XIV (2), p. 55-64.

ROSS, L. Acute kidney injury in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**:2011, v.41, p. 1–14.

- SAMPAIO, R.F.; & MANCINI, M.C. Estudos de revisão sistemática: um guia para síntese criteriosa da evidência científica. **Revista Brasileira de Fisioterapia**:2007, 11(1), p.83-9.
- SANTOS, L. M. et al. Quimioterapia antineoplásica no tratamento de mastocitoma de bolsa escrotal em boxer –relato de caso. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**: 2010, Ano VIII, n. 14.
- SAWHNEY, P. et al. Cisplatin-induced long-term failure of spermatogenesis in adult c57/bl⁶/j mice. **Journal of Andrology**: Texas,2005, v.26, n.1, p.136-145.
- SICOTTE, D. V. M. V. et al. Use of surgery and mitoxantrone chemotherapy in a dog with disseminated lymphangiosarcoma. **Journal of the American Veterinary Medical Association**:2012, v. 241, n. 12, p. 1639-1644.
- SIMON, D. et al. Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel. **Journal of Veterinary Internal Medicine**:2006, v.20, p. 1184–1190.
- SILVA, C. E. V. & CAMACHO, A. A. Alterações ecocardiográficas em cães sob tratamento prolongado com doxorubicina. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**:2005,v.57, n.3, p.300-306.
- SILVA, M. C. V. et al. Avaliação epidemiológica, diagnóstica e terapêutica do tumor venéreo transmissível (TVT) na população canina atendida no Hospital Veterinário da UFERSA. **Acta Veterinaria Brasília**: 2007, v.1, n.1, p.28-32.
- SILVA, C. M. et al. Determination of cyclophosphamide enantiomers in plasma by lc-ms/ms: application to pharmacokinetics in breast cancer and lupus nephritis patients. **Chirality**:2008, 00:000-000.
- SOUSA NETO, J. A. & SCALDAFERRI, P. M. Melatonina e câncer- revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**:2005, 51(1), p. 49-58.

TESKE, E., et al. R. Intraperitoneal antineoplastic drug delivery: experience with a cyclophosphamide, vincristine and prednisolone protocol in cats with malignant lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*:2014, n. 12, p. 37–46.

TOZON, N. et al. Effective treatment of perianal tumors in dogs with electrochemotherapy. *Anticancer Research*:2005, n. 25, p. 839-846.

TRIPP, C. D., et al. Tolerability of metronomic administration of lomustine in dogs with cancer. *Journal of Veterinary Internal Medicine*:2011, n. 25, p. 278-84.

5 APRESENTAÇÃO

1 Edson Vinícius Leite Veloso é médico veterinário, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campus de Patos-PB.

2 Lorena da Cruz Moreira de Figueirêdo é graduada em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campus de Patos-PB.

3 Danilo José Ayres de Menezes é médico veterinário, Prof. Dr. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campus de Patos-PB.

4 Otávio Brilhante de Sousa é médico veterinário, Prof. Dr. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campus de Patos-PB.

5 José Rômulo Soares dos Santos é médico veterinário, Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campus de Patos-PB.

**CAPÍTULO II. EFEITOS DE SULFATO DE VINCRISTINE SOBRE OS
TESTÍCULOS DE RATOS ALBINOS, TRATADOS NA FASE PRÉ-PÚBERE**

RESUMO

VELOSO, Edson Vinícius Leite. **EFEITOS DE SULFATO DE VINCRIStINE SOBRE OS TESTÍCULOS DE RATOS ALBINOS, TRATADOS NA FASE PRÉ-PÚBERE.** [Effect of vincristine sulfate on testis albino rats treated in prepubertal]. 2016. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação de Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande – UFCG. Patos, 2016 (Enviado a revista Pesquisa Veterinária Brasileira).

Este trabalho visou avaliar os efeitos de sulfato de vincristine sobre os testículos de ratos tratados na fase pré púbere, sobretudo quanto às alterações das células de Sertoli e das células germinativas. Foram utilizados 30 animais controles e 30 tratados com sulfato de vincristine. As aplicações da droga ocorreram aos 15 dias de vida, e a eutanásia aos 40, 64 e 127 dias de vida para possibilitar a avaliação em diferentes estágios de desenvolvimento reprodutivo. Foram realizadas medidas biométricas (pesos corpóreos e testiculares), medidas morfométricas testiculares, (eixos testiculares maiores e menores, diâmetros testiculares de túbulo e lúmen seminíferos, e altura do epitélio seminífero) e estereológicas (volumes testiculares e as densidades de volume do tecido tubular e do tecido intersticial testicular). As medidas biométricas foram feitas em todos os animais do experimento, e as avaliações morfométricas e estereológicas foram realizadas em 200 túbulos seminíferos. Os resultados demonstraram que sulfato de vincristine reduz parâmetros biométricos como peso corpóreo, peso testicular e volume testicular total. Variáveis morfométricas e estereológicas como diâmetro dos túbulos seminíferos, altura do epitélio seminífero e volume dos túbulos seminíferos também foram reduzidos. Os tipos celulares mais atingidos foram as espermatogônias, espermátides tardias e células de Sertoli.

Palavras-chave: Quimioterápico, morfofisiologia, epitélio seminífero.

1 INTRODUÇÃO

O sulfato de vincristine é largamente utilizado na medicina veterinária para tratamento de diversos tipos de tumores medulares, além de ser a droga de eleição no tratamento de tumor venéreo transmissível (TVT) em cães (NAK, et al, 2005; ROSENTHAL, 1981). Trata-se de uma droga que atua sobre as células em processo de replicação, embora não apresenta especificidade para células neoplásicas.

Assim, todas as células em processo de divisão, saudáveis ou tumorais, são alvo da ação da droga. Estudos demonstram que drogas como a sulfato de vincristine, que atuam na replicação celular, podem danificar alguns tecidos normais, em especial aqueles com rápida proliferação celular (DALECK, et al, 1995; DELBÈS, et al, 2010; DINIZ, et al, 1999; HODEL, et al, 1984; MARTINS, et al, 2011; VAISHEVA, et al, 2007).

O presente estudo visa avaliar histologicamente, morfometricamente e estereologicamente os testículos de ratos albinos tratados com sulfato de vincristine na fase pré-púbere, e eutanasiados ainda na fase pré-púbere, e nas fases púbere e adulta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV), do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos-Paraíba, sendo aprovado sob o protocolo CEP 185/2014.

2.1 Obtenção dos animais

Sessenta (60) ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus albinus*) oriundos do acasalamento de matrizes provenientes do biotério do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande foram utilizados para avaliar os efeitos do sulfato de vincristine. Os acasalamentos ocorreram no período noturno, e na manhã do dia seguinte, foram realizados esfregaços vaginais para averiguar a presença de espermatozóides, atestando assim a cobertura. Esse dia foi considerado o dia 1 de gestação.

2.2 Padronização da dosagem do sulfato de vincristine

Trinta animais receberam dose de 0,05mg/kg de peso vivo de sulfato de vincristine por via intraperitoneal. Trinta animais foram utilizados como grupo controle recebendo solução salina na mesma dose do quimioterápico.

2.3 Formação dos grupos experimentais e controles

O grupo GC recebeu solução salina por via intraperitoneal aos 15 dias de idade, na mesma dose empregada no grupo GV. Objetivou-se com isso simular as condições de manipulação do grupo tratado, efetuando-se os mesmos procedimentos em todos os grupos. Os animais do grupo GV receberam sulfato de vincristine em dose única por via

intraperitoneal de 0,05 mg/kg de peso vivo aos 15 dias idade (HODEL, et al, 1984). O dia da administração da droga foi escolhido com base no tempo de desenvolvimento da barreira hematotesticular e na maturação das células de Sertoli, visto que até 18º dia de vida essas células ainda não estão completamente maduras e a barreira hematotesticular ainda está em formação (CLEGG, 1960; RUSSELL, et al, 1990).

Os grupos GC e GV foram divididos em três subgrupos de dez animais cada, de acordo com as idades em que foram eutanasiados: 40 dias de vida (subgrupos GC₄₀ e GV₄₀); 64 dias de vida (subgrupos GC₆₄ e GV₆₄) e 127 dias de vida (subgrupos GC₁₂₇ e GV₁₂₇).

Os grupos foram designados por índices numéricos de acordo as idades em que foram submetidos à eutanásia. As idades foram escolhidas com base em fases importantes do desenvolvimento do aparelho reprodutor masculino da espécie segundo CLEGG, (1960); onde, os ratos de 40 dias são considerados pré-pubere, com 64 dias são púberes, mas não sexualmente maduros, e com 127 dias são sexualmente maduros. Nas idades especificadas, os animais foram anestesiados com propofol (**Propovan®**) (12.5 mg/kg de peso corpóreo) segundo recomendações do fabricante; seguida de remoção de ambos os testículos.

2.4 Coleta e processamento das amostras

Nas idades especificadas, os ratos foram pesados e submetidos à eutanásia. Os testículos foram removidos e pesados em balança semi-analítica de precisão **BG 1000 GEHAKA®**. Os eixos maiores e menores foram mensurados com auxílio de um paquímetro **MITUTOYO**. A estereologia foi realizada por meio da medição do volume testicular pelo método de SCHERLE (1970).

As amostras foram pré-fixadas por imersão em Bouin e após 30 minutos foram hemisseccionadas e as hemisseções retornaram a solução de Bouin permanecendo por 24 horas. Após a fixação, as amostras foram no Laboratório de Patologia Animal (LPA) do Hospital Veterinário (HV) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos, Paraíba em processo semelhante ao realizado por MICHALANY(1998).

Foram obtidas secções de 5µm de cada testículo (direito/esquerdo) por meio do micrótomo manual **LEICA RM2125 RT** e navalhas descartáveis **Easy Path DURAEDGE**. Uma secção do testículo direito e outra do esquerdo de cada animal foi corada com

Hematoxilina e Eosina (HE), possibilitando a identificação dos tipos celulares e a realização da avaliação morfométrica e estereológica do parênquima testicular.

2.5 Biometria, morfometria, estereologia e análise histológica

A análise biométrica compreendeu a pesagem dos animais do dia seguinte ao nascimento até o momento da eutanásia, a determinação do peso testicular absoluto (em grama), do peso testicular relativo segundo a fórmula (peso testicular absoluto/100g de peso vivo) descrita por BRILHANTE (1999); e dos eixos testiculares maiores e menores. A análise biométrica incluiu a mensuração do volume testicular segundo o método de SCHERLE (1970), o qual consiste em imergir o órgão suspenso por um fio cirúrgico agulhado em recipiente contendo solução salina isotônica. Utiliza-se uma balança semi analítica tarada e o valor deve ser registrado e descontado o peso do fio agulhado para obter o volume do órgão (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995). A gravidade específica é a razão entre a densidade do órgão avaliado e a densidade da substância de referência (água), segundo MOURA (2006), a gravidade específica do testículo do rato deve ser considerada como igual a da água 1.0 (RUSSEL & FRANÇA, 1995). Desta forma, o volume testicular total foi obtido a partir da seguinte fórmula: **VOLUME=Densidade X Massa**

A média do volume testicular total de cada grupo foi obtida por meio do cálculo das médias aritméticas dos volumes dos dois testículos de cada animal dos seus respectivos grupos controles e experimentais.

A avaliação morfométrica foi realizada com auxílio do software **IMAGE-PRO EXPRESS 6.0** em computador acoplado ao microscópio binocular de luz **OLYMPUS BX40** com objetiva de 20x. Foram mensurados de forma aleatória 200 túbulos seminíferos em corte transversal por animal (100 em cada testículo). Os cortes testiculares foram totalmente e sequencialmente varridos, evitando-se a análise em duplicidade de uma mesma área. Mensurou-se o diâmetro dos túbulos, diâmetro do lúmen tubular, altura do epitélio seminífero, área do túbulo, do lúmen e do epitélio seminífero, e eixos maiores (diâmetro) e menores dos túbulos seminíferos. Todos os parâmetros foram mensurados de forma individual e em seguida calculada a média ponderada de cada grupo.

Microscopicamente a estereologia foi realizada em cortes dos testículos esquerdos e direito, um corte de cada testículo (esquerdo e direito) foi submetido à análise da densidade de volume (Vv) tubular e do tecido intersticial do parênquima testicular. As variáveis

estereológicas de densidade de volume (V_v) foram obtidas por meio da contagem dos pontos por alocação sistemática e aleatória das imagens obtidas através do software **IMAGE-PRO EXPRESS 6.0** em computador acoplado em microscópio binocular de luz **OLYMPUS BX40** no aumento de 20x e posteriormente empregada no software **IMAGEJ** para a contagem de pontos, totalizando 840 pontos por testículo (GUNDERSEN, et al, 1988; MANDARIM-DE-LACERDA, 1995).

A densidade dos tecidos intersticiais e dos túbulos seminíferos em mm^3 foram calculadas a partir do percentual obtido na densidade de volume (V_v) de cada tecido segundo MIRAGLIA & HAYASHI(1993). Os volumes tubulares e intersticiais médios por animal também foram obtidos através do cálculo com os dados obtidos para o volume total dos testículos direito e esquerdo.

A densidade de comprimento dos túbulos seminíferos (L_v) foi obtida utilizando a fórmula $L_v=2Q_a$ descrita por GUNDERSEN, et al, (1988), sendo Q_a a somatória das secções tubulares existentes na área teste gravada em escala de 1mm e intervalos do sistema métrico de $10\mu\text{m}$. Desta forma $Q_a=\sum\text{perfis}/A_t$.

Os tipos celulares básicos da linhagem germinativa e as células de Sertoli tiveram suas frequências calculadas por 100 secções tubulares por animal analisadas sob objetiva de 100x utilizando critérios estabelecidos por LEBLOND & CLERMONT (1952) e complementados por RUSSELL, et al, (1990). Espermatogônias tipo A, tipo B, intermediária, espermatócitos primários, espermátides jovens, espermátides tardias e células de Sertoli foram observadas.

2.6 Análise estatística

Os dados foram avaliados pelo teste não paramétrico "U" de Mann Whitney. Os resultados foram considerados significantes quando $p\leq 0,05$ e muito significantes quando $p\leq 0,01$. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software **Bioestat 5.0**. Utilizou-se letras iguais para valores não significantes quando $p>0,05$; letras diferentes para valores considerados significantes ($p\leq 0,05$) e os valores muito significantes ($p\leq 0,01$) foram marcados com "*".

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram obtidos com base na média aritmética dos testículos (direito e esquerdo) de cada animal e, por conseguinte, de cada grupo (40, 64 e 127 dias). Os dados foram apresentados em quadros contendo três grupos tratados com sulfato de vincristine e seus respectivos controles.

As variáveis Biométricas (Quadro 1) incluíram peso corpóreo, peso testicular absoluto, peso testicular relativo, volume testicular total, eixo testicular maior e eixo testicular menor.

Quadro 1: Peso corpóreo (PC), peso testicular absoluto (PTA), peso testicular relativo (PTR), volume testicular total (VTT), eixo testicular maior (ETMA), eixo testicular menor (ETME) e os respectivos desvios padrões (\pm DP) em grupos de ratos albinos controles (GC) e tratados (GV) de 40, 64 e 127 dias de idade (GC₄₀, GV₄₀, GC₆₄, GV₆₄, GC₁₂₇ e GV₁₂₇).

	GRUPOS					
	GC-127	GV-127	GC-64	GV-64	GC-40	GV-40
PC (g)	308.7a	283.0a	228.2a	225.0a	136.4a*	116.6b*
\pm DP	27.2	39.8	17	23.2	9.1	6.2
PTA (g)	1.8a*	0.9b*	1.6a*	1.2b*	0.6a*	0.4b*
\pm DP	0.06	0.18	0.04	0.06	0.03	0.02
PTR (%)	0.59a*	0.34b*	0.71a*	0.56b*	0.51a*	0.42b*
\pm DP	0.04	0.05	0.05	0.08	0.03	0.04
VTT (mm³)	1657.16a*	1081.11b*	1450.12a	1293.01b	600.16a	517.11b
\pm DP	88.62	323.06	131.19	109.45	69.05	58.55
ETMA (mm)	17.02a*	12.55b*	16.88a*	13.43b*	16.88a*	6.43b*
\pm DP	0.3	1.19	0.45	0.82	0.45	0.78
ETME (mm)	7.73a*	5.46b*	6.79a*	5.55b*	4.41a*	2.28b*
\pm DP	0.45	0.65	0.34	0.53	0.34	0.47

Letras diferentes-Médias diferiram entre si pelo teste "U" de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Letras diferentes com "*" -Médias diferiram entre si pelo teste "U" de Mann-Whitney ($p \leq 0,01$).

Letras iguais-Médias não diferiram entre si pelo teste "U" de Mann-Whitney ($p > 0,05$).

As médias dos pesos corpóreos dos animais nos grupos GV₁₂₇ e GV₆₄ não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) quando comparados aos seus controles respectivos, embora tenha havido redução percentual de 8,3% no grupo tratado de 127 dias e de 1,39% no grupo tratado de 64 dias. Porém, houve redução muito significativa ($p \leq 0,01$) na média de peso corpóreo dos animais do grupo GV₄₀ quando comparado ao controle de mesma idade, com redução percentual de 14,49%.

Os pesos testiculares absolutos e relativos apresentaram tendência de diminuição, estando em conformidade com outros estudos (ROSENTHAL, 1981). Vale salientar que em todos os grupos experimentais (GV₁₂₇, GV₆₄ e GV₄₀) houve reduções muito significantes

($p \leq 0,01$). O peso testicular absoluto reduziu 47,05% no grupo GV_{127} quando comparado ao controle de mesma idade, já nos grupos GV_{64} e GV_{40} houve reduções de 21,88% e 29,32% respectivamente. O peso testicular relativo reduziu 42,26% no grupo GV_{127} quando comparado ao controle de mesma idade, já nos grupos GV_{64} e GV_{40} houve reduções de 20,12% e 17,29% respectivamente.

A redução do peso corpóreo, peso testicular assim como das demais variáveis estudadas possui relação dose dependente na maioria das drogas, ademais, o peso testicular é considerado uma variável importante na avaliação dos níveis de perda celular do epitélio seminífero (BORDALLO, et al, 2001; HACKER-KLOM, et al, 1986; HOWELL & SHALET, 2001). Todos os grupos experimentais apresentaram reduções muito significantes ($p \leq 0,01$) dos pesos testiculares absolutos e relativos quando comparado a seus referentes controles.

Os volumes testiculares totais acompanharam a tendência de redução observada nas demais variáveis biométricas. Os animais de grupo GV_{127} mostraram reduções muito significativas ($p \leq 0,01$) em comparação com o grupo GC_{127} , mostrando que o quimioterápico demonstra seus efeitos citotóxicos no volume do testículo de forma tardia. Os animais dos grupos GV_{64} e GV_{40} apresentaram reduções significantes ($p \leq 0,05$), de forma que a droga afetou ativamente o volume testicular total de todos os animais do grupo experimental.

O grupo GV_{127} apresentou redução de 34,76% de volume testicular total quando comparado ao atinente controle. Os grupo GV_{64} e GV_{40} reduziram 10,83% e 13,83% respectivamente. Os eixos testiculares maiores e menores se mostraram diminuídos nos animais de todos os grupos tratados com sulfato de vincristine quando comparados a seus respectivos controles. O eixo testicular maior no grupo GV_{127} mostrou-se diminuído 26,26% quando comparado ao controle de mesma idade, os grupos GV_{64} e GV_{40} reduziram 20,43% e 61,90% respectivamente. O eixo testicular menor no grupo GV_{127} mostrou-se diminuído 29,36% quando comparado ao controle de mesma idade, os grupos GV_{64} e GV_{40} reduziram 18,26% e 48,29% respectivamente. É válido ressaltar que os eixos testiculares maiores e menores dos animais dos grupos experimentais mostraram reduções muito significantes ($p \leq 0,01$) quando comparados aos referentes controles.

As variáveis estereológicas densidade de volume dos túbulos seminíferos e do tecido intersticial, volume dos túbulos seminíferos e do tecido intersticial e densidade de comprimento estão descritas no quadro 2.

Quadro 2: Densidade de volume dos túbulos seminíferos (DVT), densidade de volume do tecido intersticial (DVI), volume dos túbulos seminíferos (VT), volume tecido intersticial (VI), e densidade de comprimento (DC) com os respectivos desvios padrões (\pm DP) em grupos de ratos albinos controles (GC) e tratados (GV) de 40, 64 e 127 dias de idade (GC₄₀, GV₄₀, GC₆₄, GV₆₄, GC₁₂₇ e GV₁₂₇).

	GRUPOS					
	GC ₁₂₇	GV ₁₂₇	GC ₆₄	GV ₆₄	GC ₄₀	GV ₄₀
DVT (%)	71.42a*	37.42b*	73.42a	69.14a	77.42a	72.57a
\pm DP	11.74	5.62	9.43	8.05	12.59	7.99
DVI (%)	28.57a*	62.57b*	26.57a	30.85a	22.57a	27.42a
\pm DP	11.74	5.62	9.43	8.05	12.59	7.99
VT (mm³)	1185.55a*	407.13b*	1058.81a*	891.43b*	462.72a*	375.1b*
\pm DP	219.33	141.15	119.75	105.75	77.28	58.74
VI (mm³)	471.6a	673.97b	391.31a	401.57a	137.44a	142a
\pm DP	191.98	206.88	148.69	119.57	75.04	44.58
DC (μm²)	28.34a*	34.31b*	20.74a	23.67b	37.88a*	43.69b*
\pm DP	2.28	1.75	2.25	2.76	2.97	3.02

Letras diferentes-Médias diferiram entre si pelo teste "U" de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Letras diferentes com "*" -Médias diferiram entre si pelo teste "U" de Mann-Whitney ($p \leq 0,01$).

Letras iguais-Médias não diferiram entre si pelo teste "U" de Mann-Whitney ($p > 0,05$).

O presente estudo evidenciou alterações nas médias das densidades de volume dos túbulos seminíferos e do tecido intersticial testicular. Constatou-se que as densidades de volume dos túbulos seminíferos do grupo GV₁₂₇ reduziu 47,59%, já os grupos G64 e G40 tiveram discretas reduções quando comparados os grupos experimentais com seus relativos controles de 5,83% no grupo GV₆₄ e 6,27% no grupo GV₄₀, porém, tais variações não diferiram significativamente ($p > 0,05$). Além disso, as variações numéricas entre GC₁₂₇ e GV₁₂₇ quanto ao volume dos túbulos seminíferos foram altamente significantes ($p \leq 0,01$) demonstrando que os efeitos deletérios de sulfato de vincristine sobre a densidade de volume dos túbulos seminíferos foram tardios incidindo significativamente em animais adultos (127 dias).

As densidades volumes testiculares do tecido intersticial apresentaram tendências inversas as observadas na densidade de volume dos túbulos seminíferos, pois, há relação de proporcionalidade entre as duas variáveis. Desse modo, o grupo GV₁₂₇ apresentou aumento de 54,33% demonstrando aumento relativo muito significativo ($p \leq 0,01$) da densidade de volume do tecido intersticial testicular nos animais adultos (127 dias) tratados com sulfato de

vincristine. A diferença entre os grupos tratados e controles de 40 e 64 dias foi de 13,88% e 17,70% respectivamente, não revelando valores diferenciais significantes ($p > 0,05$).

ROSENTHAL (1981) descreveu retardo da espermatogênese em animais tratados com sulfato de vincristine, levando a crer que os efeitos deletérios da droga sobre as células da linhagem germinativa venham a ser identificados de forma tardia.

Os volumes dos túbulos seminíferos mostraram-se em tendência descendente semelhante à observada no volume testicular total, mostraram reduções muito significantes ($p \leq 0,01$) em todos os grupos experimentais (GV_{127} , GV_{64} e GV_{40}) quando comparados aos atinentes controles. O grupo GV_{127} apresentou redução de 65,65%, os animais do grupo GV_{64} reduziram 15,80%, já os animais do grupo GV_{40} diminuíram 18,93% quando comparados aos controles de mesma idade.

Os volumes dos tecidos intersticiais testiculares se mostraram com variações não significantes ($p > 0,05$) nos grupos GV_{64} e GV_{40} (variações de 2,55% e 3,21% respectivamente) quando comparados aos atinentes controles. Porém, o grupo GV_{127} demonstrou aumento significativo ($p \leq 0,05$) do volume do tecido intersticial testicular quando comparados os grupos controle (GC_{127}) e experimentais (GV_{127}), com variação de 30,02%.

O número de perfis na área teste da densidade de comprimento tubular nos animais do GV_{127} aumentou 17,40% quando comparado ao controle de mesma idade, os animais do grupo GV_{64} aumentaram 0,8%, já os animais do grupo GV_{40} aumentaram 0,57% o número de perfis quando comparado ao atinente controle. Os grupos GV_{40} e GV_{64} não apresentaram diferenças significantes quando comparados aos relativos controles. O grupo GV_{127} mostrou-se diferente do grupo controle de mesma idade, sendo essa diferença muito significante ($p \leq 0,01$).

Segundo EBOETSE et al. (2011), substâncias com efeitos deletérios para a espermatogênese podem acarretar aumento do número de perfis em uma determinada área teste, pois, dentre as alterações causadas pelas substâncias destaca-se a diminuição dos eixos dos túbulos seminíferos, dessa forma, as estruturas ocupam espaço físico menor aumentando o número de perfis computados.

As variáveis morfométricas diâmetro do túbulo seminífero, altura do epitélio seminífero, diâmetro do lúmen tubular, eixo menor do túbulo seminífero, área do túbulo seminífero, área do lúmen tubular e área do epitélio seminífero estão descritas no quadro 3.

Quadro 3: Diâmetro do túbulo seminífero (DT), altura do epitélio seminífero (ALES), diâmetro do lúmen tubular (DL), eixo menor do túbulo seminífero (EMTS), área do túbulo seminífero (ART), área do lúmen tubular (ARL) e área do epitélio seminífero (AREP) com os respectivos desvios padrões (\pm DP) em grupos de ratos albinos controles (GC) e tratados (GV) de 40, 64 e 127 dias de idade (GC₄₀, GV₄₀, GC₆₄, GV₆₄, GC₁₂₇ e GV₁₂₇).

	GRUPOS					
	GC ₁₂₇	GV ₁₂₇	GC ₆₄	GV ₆₄	GC ₄₀	GV ₄₀
DT (μm)	416a*	320.29b*	421.55a*	400.94b*	335.94a*	292.62b*
\pm DP	16.37	34.67	10.92	7.41	10.43	9.39
ALEP (μm)	125.4a*	50.75b*	131.86a*	101.54b*	111.81a*	87.75b*
\pm DP	6.25	21.17	8.04	3.64	4.44	6.23
DL (μm)	165.2a*	218.78b*	157.83a*	197.86b*	112.32a	117.1a
\pm DP	10.26	25.02	14.4	6.7	10.55	9.63
EMTS (μm)	316.07a*	236.12b*	324.01a	319.77a	261.87a*	229.99b*
\pm DP	11.55	33.45	15.61	8.14	18.78	7.57
ART (μm^2)	104028.52a*	61166.17b*	107211.05a	101443.67b	69636.76a*	53117.84b*
\pm DP	7210.53	14841.33	6306.33	3304.8	5614.82	2354.55
ARL (μm^2)	15331.43 a*	25396.98b*	14295.65a*	24318.66b*	6840.44a	7702.29a
\pm DP	1730.9	4143.67	2980.52	1561.63	1624.45	1236.97
AREP (μm^2)	88697.09a*	35769.18b*	92915.39a*	77125.01b*	62796.31a*	45415.54b*
\pm DP	6146.02	15546.97	4329.86	2910.88	4147.54	2302.26

Letras diferentes-Médias diferiram entre si pelo teste “U” de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Letras diferentes com “*”-Médias diferiram entre si pelo teste “U” de Mann-Whitney ($p \leq 0,01$).

Letras iguais-Médias não diferiram entre si pelo teste “U” de Mann-Whitney ($p > 0,05$).

Os diâmetros dos túbulos seminíferos revelaram-se diminuídos nos grupos experimentais quando comparados aos seus referentes controles. Os grupos GC₁₂₇ e GV₁₂₇ variaram 23%, o grupo GV₆₄ reduziu 4,88%, enquanto que o grupo GV₄₀ reduziu 12,89% quando comparados aos atinentes controles. É válido ressaltar que todos os animais dos grupos experimentais apresentaram reduções muito significantes ($p \leq 0,01$) do diâmetro do túbulo seminífero quando comparados aos respectivos controles.

A altura do epitélio seminífero revelou-se reduzida em todos os animais dos grupos experimentais, tais reduções foram altamente significativas ($p \leq 0,01$). O grupo GV₁₂₇ diminuiu 59,52%, o grupo GV₆₄ reduziu 22,99%, já os animais do grupo GV₄₀ reduziram 21,51% quando comparados aos respectivos controles.

As médias dos diâmetros dos lumens dos túbulos seminíferos revelaram-se aumentadas nos animais dos grupos experimentais de 64 (GV₆₄) e 127 (GV₁₂₇) dias. As médias desses dois grupos comparadas às médias de seus respectivos controles apresentaram

diferenças muito significantes ($p \leq 0,01$), em contrapartida, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) no grupo de 40 dias quando comparadas as médias dos grupos experimental e controle.

A média de diâmetro do lúmen do túbulo seminífero do grupo GV_{127} aumentou 24,49% em relação ao controle de mesma idade, os animais do grupo GV_{64} tiveram médias 20,23% maiores, já os animais do grupo GV_{40} obtiveram médias 4,08% maiores que os atinentes controles.

As reduções no diâmetro e aumento do lúmen dos túbulos seminíferos já foram relatadas por NASRABADI, MOHAMMADNEJAD, NIKPOUR (2012) e por VAISHEVA, et al, (2007), quando avaliaram os efeitos de sulfato de vincristine sobre as estruturas morfológicas do testículo.

As médias dos eixos menores dos túbulos seminíferos se mostraram reduzidas nos grupos experimentais GV_{127} e GV_{40} , tais reduções foram muito significantes ($p \leq 0,01$), contudo, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos GC_{64} e GV_{64} com redução de 1,3% na média do grupo experimental. As médias do grupo GV_{127} reduziram 25,29%, os animais do grupo GV_{40} tiveram média reduzida em 12,17% quando comparados os grupos experimentais e controles.

Ao mesmo tempo em que se observou aumento do diâmetro do lúmen dos túbulos seminíferos, os animais dos grupos experimentais de 40 e 127 dias apresentaram reduções das médias dos eixos menores dos túbulos seminíferos, ou seja, o espaço que deveria ser ocupado por células da linhagem germinativa foi reduzido em duas frentes, eixo maior (diâmetro) e eixo menor do túbulo seminífero. Internamente ocorreu aumento do lúmen tubular decorrente da diminuição da celularidade do epitélio seminífero. Externamente a redução do eixo maior (diâmetro tubular) e do eixo menor dos túbulos seminíferos deflagram a atrofia dos túbulos seminíferos em decorrência da ação deletéria da droga (NASRABADI, MOHAMMADNEJAD, NIKPOUR, 2012; VAISHEVA, et al, 2007).

A área total do túbulo seminífero no grupo GV_{127} reduziu 41,20% quando comparado ao atinente controle, os animais do grupo GV_{64} obtiveram média 5,37% menor que o respectivo controle, já os animais do grupo GV_{40} apresentaram média 23,72% menor que o grupo controle de mesma idade.

As reduções observadas nos grupos experimentais de 40 (GV_{40}) e 127 (GV_{127}) dias foram muito significantes ($p \leq 0,01$), enquanto que os animais do grupo GV_{64} apresentaram

média com redução significativa ($p \leq 0,05$) quando comparada a média do grupo controle de mesma idade (GC_{64}).

A área do lúmen tubular apresentou-se aumentada nos grupos experimentais GV_{64} e GV_{127} sendo as diferenças muito significantes ($p \leq 0,01$) quando comparado aos referentes controles. Já os grupos GC_{40} e GV_{40} não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) quando comparados entre si, demonstrado aumento de 11,18% na média do grupo GV_{40} . As médias do grupo GV_{127} foram 39,63% maiores que o atinente controle, no grupo GV_{64} as médias foram 41,21% maiores que o grupo controle de mesma idade.

A área do epitélio seminífero mostrou-se reduzida em todos os grupos experimentais (GV_{127} , GV_{64} e GV_{40}). As reduções foram classificadas como muito significantes ($p \leq 0,01$) em todas as idades estudadas (40, 64 e 127 dias). A média da área do epitélio seminífero do grupo GV_{127} foi 59,67% menor que a média do grupo controle de mesma idade, os animais do grupo GV_{64} tiveram médias 16,99% menor que a média do grupo GC_{64} , já os animais do grupo GV_{40} apresentaram médias 27,67% menores que as médias dos animais do grupo GC_{40} .

TEWARI (1981) avaliou os efeitos do quimioterápico sulfato de vincristine sobre os testículos de ratos. Alterações como reduções no peso testicular e da quantidade de espermatozoides foram descritas, constatando danos substanciais a espermatogênese e consequente atrofia dos testículos dos animais tratados.

Uma das metas estabelecidas nesse estudo foi de quantificar as frequências dos principais tipos celulares do epitélio seminífero (Quadro 4), com o objetivo de avaliar as influências causadas pelo sulfato de vincristine sobre a população celular.

Quadro 4: Valores percentuais médios das frequências dos tipos celulares espermatogônia A (GA), espermatogônia B e intermediária (GBI), espermatócito primário (EP), espermátide jovem (SJ), espermátide tardia (ST) e células de Sertoli (S) e desvio padrão ($\pm DP$) nos túbulos seminíferos em grupos de ratos albinos controles (GC) e tratados (GV) de 40, 64 e 127 dias de idade (GC_{40} , GV_{40} , GC_{64} , GV_{64} , GC_{127} e GV_{127}).

GRUPOS						
TIPOS CELULARES (%)	GC₁₂₇	GV₁₂₇	GC₆₄	GV₆₄	GC₄₀	GV₄₀
GA	97.4a*	46.05b*	93a*	76.8b*	74.8a*	60.2b*
$\pm DP$	2.3	5.3	3.7	4.3	4.1	6.8
GBI	71.07 a*	55.7 b*	54.25a	52.55a	44.1a	41.95a
$\pm DP$	2.6	3.9	3.3	3.3	4	3.1
EP	100a*	80.95b*	100a	99.45a	100a	99.65a

±DP	0	1.4	0	0.7	0	0.6
SJ	100a*	40.4b*	95.55a	94.15a	66.25a	66.3a
±DP	0	3.5	3.5	3.3	3.2	3.2
ST	100a*	39.3b*	98.85a*	74.7b*	54.45a	54.65a
±DP	0	2.9	0.3	3.7	2.8	2.8
S	100a*	91.25b*	100a	99.7a	100a	100a
±DP	0	6.9	0	0.4	0	0

Letras diferentes-Médias diferiram entre si pelo teste “U” de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Letras diferentes com “*”-Médias diferiram entre si pelo teste “U” de Mann-Whitney ($p \leq 0,01$).

Letras iguais-Médias não diferiram entre si pelo teste “U” de Mann-Whitney ($p > 0,05$).

Os grupos controles (GC_{40} , GC_{64} e GC_{127}) apresentaram características morfológicas normais (Fig. A1; Fig. B1 e Fig. C1). As associações celulares da linhagem germinativa, caracterizando os estágios do ciclo do epitélio seminífero estavam bem definidas, sem alterações celulares evidentes.

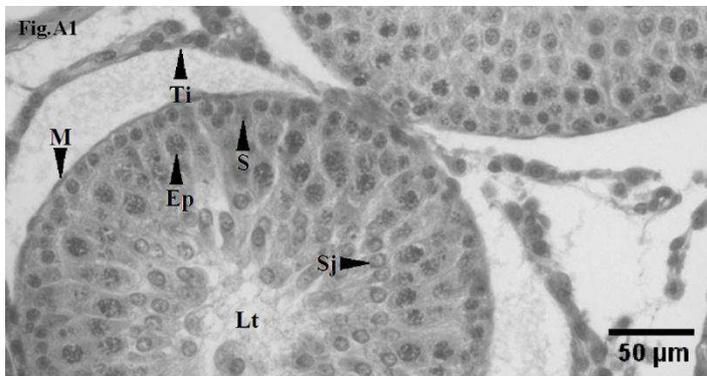


Fig. A1: Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos do grupo controle e sacrificados aos 40 dias de vida (GC_{40}). Coloração HE. Núcleo da célula de Sertoli (S); célula mióide (M); espermatócito primário (Ep); espermátide jovem (Sj); lúmen tubular (Lt); tecido intersticial (Ti).

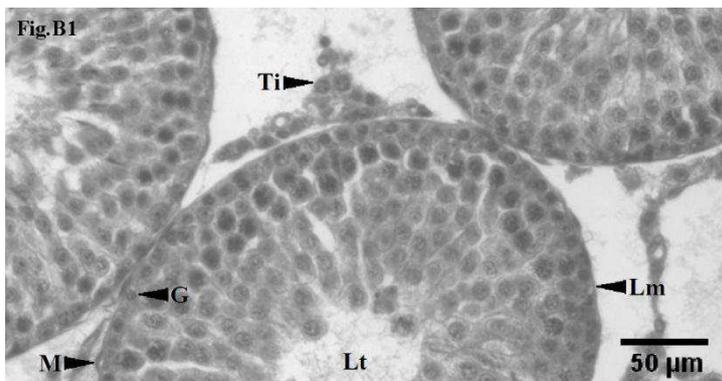


Fig. B1: Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos do grupo controle e sacrificados aos 64 dias de vida (GC_{64}). Coloração HE. Célula mióide (M); lúmen tubular (Lt); tecido intersticial (Ti); espermatogônia (G); lâmina limitante (Lm).

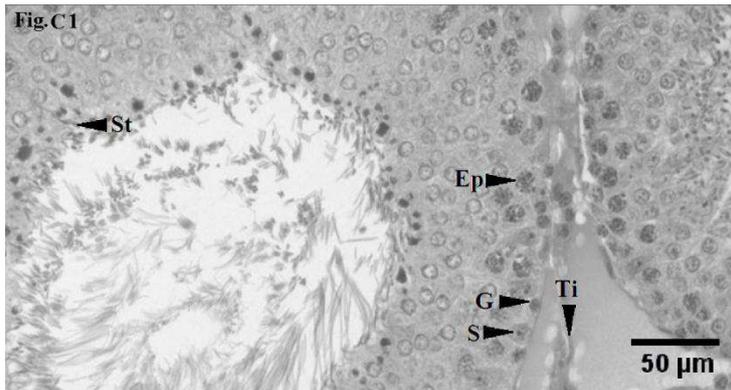


Fig. C1: Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos do grupo controle e sacrificados aos 127 dias de vida (GC₁₂₇). Coloração HE. Tecido intersticial (Ti); espermatócito primário (Ep); espermátide tardia (St); espermatogônia (G); núcleo da célula de Sertoli (S).

Houve uma redução muito significativa ($p \leq 0,01$) na frequência dos túbulos seminíferos contendo espermatogônias do tipo A em todos os grupos tratados com sulfato de vincristine quando comparados aos controles respectivos. Não houve indícios de recuperação do epitélio seminífero à longo prazo (127 dias), sugerindo um possível dano permanente e de caráter irreversível.

Os resultados desse trabalho corroboram em parte com os estudos realizados por JOSHI (1968), que estudou os efeitos do extrato de *vinca rosea* sobre os testículos de ratos. A pesquisa descreve danos às células da linhagem germinativa, principalmente espermatogônias indiferenciadas do tipo A, sendo esse um dos tipos celulares mais danificados pelo quimioterápico.

Em relação aos animais tratados, as espermatogônias diferenciadas tipo B e intermediária revelaram frequência reduzida no grupo tratado de 127 dias de vida, e essa redução foi considerada muito significativa ($p \leq 0,01$) quando comparado ao grupo controle de mesma idade.

Nesse estudo, a frequência dos espermatócitos primários em túbulos seminíferos foi estatisticamente menor no grupo tratado de 127 dias de idade (GV₁₂₇), sendo essas reduções muito significativas ($p \leq 0,01$). Os demais grupos experimentais não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$).

Em relação às espermátides jovens verificou-se reduções muito significativas ($p \leq 0,01$) nos animais do grupo GV₁₂₇ quando comparado ao grupo controle de mesma idade. Não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) nos grupos GV₄₀ e GV₆₄ quando comparados aos respectivos controles.

As médias dos túbulos seminíferos com espermátides tardias acompanharam comportamento semelhante ao observado com a variável espermátides jovens. Não houve diferenças relevantes ($p > 0,05$) entre o grupo GV_{40} quando comparado ao controle de mesma idade, em contrapartida, os grupos GV_{64} e GV_{127} revelaram diferenças muito significantes ($p \leq 0,01$) quando comparados aos seus atinentes grupos controles.

As médias dos túbulos seminíferos com células de Sertoli não apresentaram alterações ($p > 0,05$) nos grupos GV_{40} e GV_{64} quando comparadas aos referentes grupos controles, porém, o grupo tratado GV_{127} demonstrou diferenças altamente significantes ($p \leq 0,01$) quando comparado ao grupo controle de mesma idade.

Segundo PARVINEN, et al, (1978), ratos tratados com altas doses de sulfato de vincristine podem apresentar destruição das células de Sertoli através de arrasamento dos seus microtúbulos e mitocôndrias. Além disso, observou-se uma paralisação dos processos de divisão celular (mitose e meiose) seguida de morte das células da linhagem germinativa.

Formações multinucleadas (Fig. A2) oriundas de espermátides jovens, descamação do epitélio seminífero com presença de restos celulares e de células da linhagem germinativa no lúmen dos túbulos seminíferos e vacuolizações foram alterações morfológicas comumente observadas nos testículos dos animais dos grupos tratados.

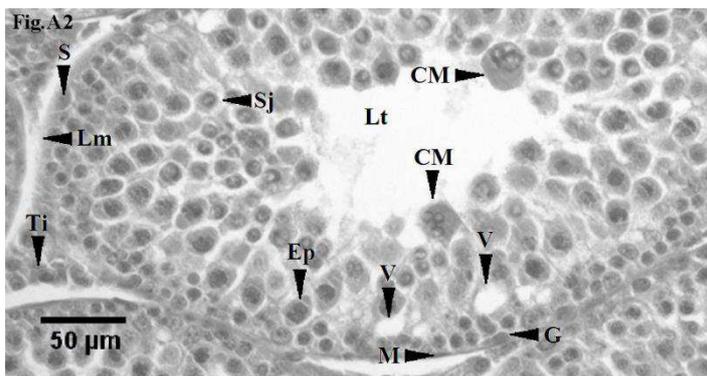


Fig. A2 – Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com sulfato de vincristine e sacrificados aos 40 dias de vida (GV_{40}). Coloração HE. Observam-se efeitos deletérios no epitélio seminífero. Núcleo da célula de Sertoli (S); célula mióide (M); lâmina limitante (Lm); espermatogônia (G); espermatócito primário (Ep); espermátide jovem (Sj); lúmen tubular (Lt); tecido intersticial (Ti); vacuolização (V); célula multinucleada (CM).

Diversos estudos constataram a ocorrência de células gigantes, vacuolizações e descamação de células do epitélio seminífero (Fig. B2) em testículos de ratos tratados com agentes antineoplásicos quimioterápicos (BRILHANTE, 1999; CABRAL, et al, 1997;

DALECK, et al, 1995; NOLTE, 1995; VENDRAMINI, et al, 2010; VENDRAMINI, et al, 2012).

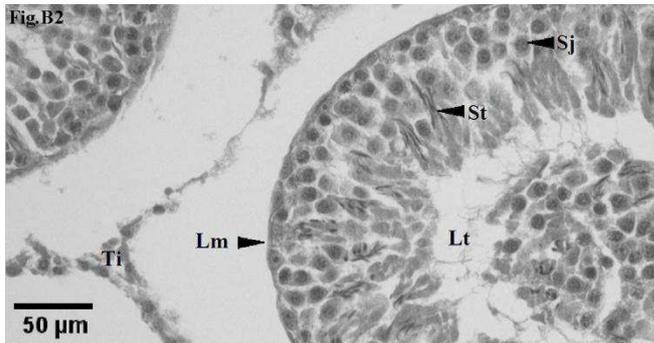


Fig. B2 – Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com sulfato de vincristine e sacrificados aos 64 dias de vida (GV_{64}). Coloração HE. Observam-se restos celulares oriundos da descamação do epitélio seminífero. Lâmina limitante (Lm); espermatíde jovem (Sj); espermatíde tardia (St); lúmen tubular (Lt); tecido intersticial (Ti).

Aglomerados de células germinativas e de restos celulares no lúmen dos túbulos seminíferos originam-se do processo de descamação do epitélio seminífero. Tal descamação provêm da ação citotóxica de sulfato de vincristine sobre as células do epitélio seminífero. Nesse estudo, descamação do epitélio seminífero foi observada nos animais do grupo tratado, principalmente o grupo GV_{64} . Os animais do grupo GV_{127} apresentaram danos severos ao epitélio seminífero (Fig. C2).

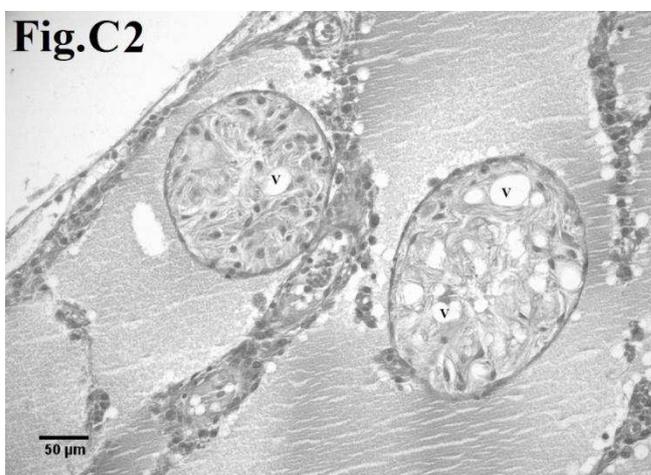


Fig. C2 – Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com sulfato de vincristine e sacrificados aos 127 dias de vida (GV_{127}). Coloração HE. Evidencia-se degeneração severa dos túbulos seminíferos, desorganização e vacuolizações (V) do epitélio seminífero.

Desta forma, é evidente que a citotoxicidade de sulfato de vincristine para o epitélio seminífero está intimamente relacionada com a dose ministrada e a idade de aplicação da droga. Esses fatores tem se mostrado predisponentes das alterações morfofuncionais causadas pela substancia aos testículos.

4 REFERÊNCIAS

BORDALLO, M. A. N. et al, FUNÇÃO GONADAL DE SOBREVIVENTES DE DOENÇA DE HODGKIN TRATADOS NA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA COM QUIMIOTERAPIA, Instituto Nacional de Câncer do Rio de Janeiro (INCa-RJ), Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), **Arq Bras Endocrinol Metab** vol 45 n° 1, 2001.

BRILHANTE, O. ESTUDO MORFOMÉTRICO E ESTEREOLÓGICO DOS TESTÍCULOS DE RATOS ALBINOS, IMATUROS SEXUALMENTE, TRATADOS SUBCRONICAMENTE COM DOXORRUBICINA, **Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de Mestre em Morfologia**, São Paulo, 1999.

BRILHANTE, O. et al, LATE MORFOFUNCTIONAL ALTERATIONS OF THE SERTOLI CELL CAUSED BY DOXORUBICIN ADMINISTERED TO PREPUBERTAL RATS, **Rev. Reproductive Biology and Endocrinology**, 10:79, 2012.

CABRAL, B. M. G., et al. HISTOMORPHOMETRY OF SEXUALLY IMMATURE ALBINO RAT TESTIS AFTER X RAY-IRRADIATION. **Interciencia**, 22:71-80, 1997.

CLEGG, E. J. THE AGE AT WHICH MALE RATS BECOME FERTILE. **J. Reprod. Fert.**, 1:119-20, 1960.

DALECK, C. R. et al, ALTERAÇÕES PRODUZIDAS A NÍVEL DE TESTÍCULO E SÊMEN DE CÃES SUBMETIDOS À ADMINISTRAÇÃO DE SULFATO DE VINCRISTINA, **Rev. Pesquisa Veterinária Brasileira**, São Paulo: V. 32, N. 1, p. 51-6, 1995.

DELBÈS, G. et al, REVERSIBILITY OF THE EFFECTS OF THE CHEMOTHERAPEUTIC REGIMEN FOR NON-HODGKIN LYMPHOMA, CYCLOPHOSPHAMIDE, DOXORUBICIN, VINCRISTINE, AND PREDNISONE, ON THE MALE RAT REPRODUCTIVE SYSTEM AND PROGENY OUTCOME. **Reprod Toxicol**. Jun;29(3):332-8, 2010.

DINIZ, P.P.V.P.; et al. ELETROCARDIOGRAFIA E AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS MUSCULARES EM CÃES TRATADOS COM SULFATO DE VINCRISTINA. **ARS Veterinária**, v. 15, p.170-176, 1999.

EBOETSE, Y. O. et al. THREE-DIMENSIONAL QUANTITATIVE ANALYSIS OF TESTICULAR TISSUE SECTIONS OF SPRAGUE-DAWLEY RAT: THE AFTER TREATMENT RESPONSES TO VARYING DOSES OF *Momordica charantia*. **Agric. Biol. J. N. Am.**, 2(11): 1390-1394, 2011.

GUNDERSEN, H. J. G. et al. SOME NEW, SIMPLE AND EFFICIENT STEREOLOGICAL METHODS AND THEIR USE IN PATHOLOGICAL RESEARCH AND DIAGNOSIS. **APMIS**, 96:379-94, 1988.

HACKER-KLOM, U. B., et al. EFFECT OF DOXORUBICIN AND 4'-EPI-DOXORUBICIN ON MOUSE SPERMATOGENESIS. **Mutat. Res.**, 160:39-46, 1986.

HODEL, C. et al, MORPHOLOGICAL CHANGES PRODUCED IN RAT TESTIS BY ANTICANCER DRUGS, **Rev. Metabolism and Reproduction in the Toxic Response to Drugs and Other Chemicals Arch. Toxicol**, V. 7, p. 147-150, Springer-Verlag, 1984.

HOWELL, S. J., & SHALET S. M. TESTICULAR FUNCTION FOLLOWING CHEMOTHERAPY. **Hum Reprod Update**; 7:363-9. 2001.

JOSHI MS, AMBAYE RY. EFFECT OF ALKALOIDS FROM *VINCA ROSEA L.* ON SPERMATOGENESIS IN MALE RATS. **Indian. J. Exp. Biol.**, 6:256-7. 1968.

LEBLOND, C.P.; & CLERMONT, Y. - DEFINITION OF THE STAGES OF THE CYCLE OF THE SEMINIFEROUS EPITHELIUM IN THE RAT. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 55:548-73, 1952.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. MÉTODOS QUANTITATIVOS EM MORFOLOGIA. **EdUERJ**, Rio de Janeiro, 131p. 1995.

MARTINS, D. B. et al, LIPID PEROXIDATION IN RATS TREATED WITH VINCRISTINE SULPHATE AND NANDROLONE DECANOATE, **Rev. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** vol.63 no.1 Belo Horizonte: 2011.

MICHALANY J., TÉCNICA HISTOLÓGICA EM ANATOMIA PATOLÓGICA: COM INSTRUÇÕES PARA O 10 CIRURGIÃO, ENFERMEIRAS E CITOTÉCNICO, 3º Ed. **Michalany**. São Paulo. 295p. 1998.

MIRAGLIA, S. M. & HAYASHI, H. HISTOMORPOMETRY OF IMATURE RAT TESTIS AFTER HEATING. **J. Morphol.**, 217:65-74, 1993.

MOURA, C. S. et al. AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO PARÊNQUIMA TESTICULAR DE RATOS ADULTOS TRATADOS COM DIFERENTES DOSES DE IVERMECTINA. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, n.5, 58:799-808, 2006.

NAK, D.; et al. A CLINICAL-PATHOLOGICAL STUDY ON THE EFFECT OF VINCRISTINE ON TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOUR IN DOGS. **J. Vet. Med.**, v.52, p.366-370, 2005.

NASRABADI, T. H., et al. PROTECTIVE ROLE OF GNRH ANTAGONIST (CETRORELIX) ON SIDE EFFECT OF VINCRISTINE ON DIAMETER OF SEMINIFEROUS TUBULES OF MICE. **International Journal Of Fertility And Sterility**, suppl 1, 6:75-75. 2012.

NOLTE, T., HARLEMAN, J. H., JAHN, W. HISTOPATHOLOGY OF CHEMICALLY INDUCED TESTICULAR ATROPHY IN RATS. **Exp. Toxic. Pathol.**, 47:267-86, 1995.

PARVINEN, L.M.; SODERSTROM, K.O.; PARVINEM, M. – EARLY EFFECTS OF VINBLASTINE AND VINCRISTINE ON THE RAT SPERMATOGENESIS: ANALYSES BY A NEW TRANSILLUMINATION-PHASE CONTRAST MICROSCOPIC METHOD. **Exp. Pathol.(Jena)**, 15(2):85-96, 1978.

ROSENTHAL, R.C. CLINICAL APPLICATIONS OF VINCA ALKALOIDS. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.179, n.l 1, p. 1084-6, 1981.

RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHAHAKIM, A. P.; CLEGG, E.D. – THE CLASSIFICATION AND TIMING OF SPERMATOGENESIS. In: **Histological and histopathological: evaluation of the testis. 1ed.** United States, Cache River Press, p 41-58. 1990.

RUSSELL, L. D. & FRANÇA, L. R. BUILDING A TESTIS. **Tissue & Cell**, 27:129-147, 1995.

SCHERLE, W. – A SIMPLE METHOD FOR VOLUMETRY OF ORGANS IN QUANTITATIVE STEREOLOGY. **Mikroskopie**, 26:57-63, 1970.

TEWARI, S.P. EFFECT OF VINCRISTINE ON TESTIS OF RATS, **Abst. Anat. Soc. Ind.Histochem. V**, 1981.

VAISHEVA, F. et al, EFFECTS OF THE CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS FOR NON-HODGKIN LYMPHOMA, CYCLOPHOSPHAMIDE, DOXORUBICIN, VINCRISTINE, AND PREDNISON (CHOP), ON THE MALE RAT REPRODUCTIVE SYSTEM AND PROGENY OUTCOME, **Rev. American Society of Andrology**, V. 28, p. 578-587, 2007.

VENDRAMINI, V. SASSO-CERRI, E., MIRAGLIA, S. M. AMIFOSTINE REDUCES THE SEMINIFEROUS EPITHELIUM DAMAGE IN DOXORUBICIN-TREATED PREPUBERTAL RATS WITHOUT IMPROVING THE FERTILITY STATUS, **Reproductive Biology and Endocrinology**, 8:3, 2010.

VENDRAMINI, V. ROBAIRE, B. MIRAGLIA, S. M. AMIFOSTINE–DOXORUBICIN ASSOCIATION CAUSES LONG-TERM PREPUBERTAL SPERMATOGONIA DNA DAMAGE AND EARLY DEVELOPMENTAL ARREST. **Human Reproduction**, Vol.27, No.8 pp. 2457–2466, 2012.