



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado em Saúde Pública



KARINA LIDIANNE ALCÂNTARA SARAIVA

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DA
DIETILCARBAMAZINA (DEC) SOBRE A
ESPERMATOGÊNESE DE CAMUNDONGOS**

RECIFE
2006

KARINA LIDIANNE ALCÂNTARA SARAIVA

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DA DIETILCARBAMAZINA (DEC)
SOBRE A ESPERMATOGÊNESE DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Orientação: Dr^a Christina Alves Peixoto

Recife
2006

KARINA LIDIANNE ALCÂNTARA SARAIVA

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DA DIETILCARBAMAZINA (DEC)
SOBRE A ESPERMATOGÊNESE DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ciências.

APROVADA EM: 15/12/2006

BANCA EXAMINADORA:

Dr^a Christina Alves Peixoto
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz
Departamento de Biologia Celular e Ultraestrutura

Dr^a. Ana Maria Blanco Martinez
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Departamento de Histologia

Dr^a. Lêda Narcisa Régis
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz
Departamento de Entomologia

SUPLENTE:

Dr^a. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz
Departamento de Biologia Celular e Ultraestrutura

Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

S243c Saraiva, Karina Lidianne Alcântara.

Caracterização do efeito da dietilcarbamazina sobre a espermatogênese de camundongos/ Karina Lidianne Alcântara Saraiva.

— Recife: K. L. A. Saraiva, 2007.

83 p.: il.

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2006.

Orientadora: Christina Alves Peixoto.

1. Dietilcarbamazina. 2. Morfologia. 3. Espermatogênese. 4. Esteroidogênese. I. Peixoto, Christina Alves. II. Título.

CDU 616.995.132

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) e a coordenação da Pós-Graduação do curso de Mestrado em Saúde Pública.

A Prof^a. Dr^a. Christina Alves Peixoto pela orientação e amizade.

Ao Prf^o. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior por sua importante contribuição científica no desenvolvimento deste estudo.

A todos do departamento de Biologia Celular e Ultraestrutura do CPqAM.

Aos meus queridos amigos, pelo apoio.

A minha família, pelo amor.

A Deus, por mais uma vitória.

RESUMO

A dietilcarbamazina tem sido altamente efetiva contra filariose linfática, mas seu efeito sobre células de vertebrados permanece controverso. Apesar de ter sido descrita sua ação sobre microtúbulos, a hipótese de que esta droga atue sobre a espermatogênese não havia sido testada. Após o tratamento de camundongos *Swiss* com 200mg de DEC/kg durante doze dias, as análises ultraestruturais mostraram vacuolização das células de Sertoli e espermatogônias com características morfológicas de apoptose, como condensação do citoplasma e aumento da densidade cromossomal. Algumas espermátides apresentaram mitocôndrias vacuoladas, as quais estavam desorganizadas em relação ao eixo microtubular do flagelo. Além disso, as células de Leydig mostraram numerosas gotículas de lipídio distribuídas no citoplasma, corpos multivesiculares e círculos concêntricos gigantes de retículo endoplasmático liso, alguns dos quais englobando gotículas de lipídio. Algumas células de Leydig não apresentaram núcleo indicando um processo de esteatose. Baixas dosagens de DEC produziram alterações similares nas células de Leydig, entretanto seus efeitos foram diretamente proporcionais à concentração da droga. Os níveis de testosterona no soro foram significativamente menores no grupo tratado com 200mg de DEC/kg quando comparados com o controle. Entretanto, nenhuma mudança significativa foi observada nas taxas de gravidez e no número de filhotes quando machos tratados com DEC acasalaram com fêmeas não tratadas, nas doses estudadas. Os resultados do presente estudo indicam que a DEC apresenta um importante efeito sobre a morfologia testicular e esteroidogênese de camundongos provavelmente por afetar tubulina e/ou complexo de microtúbulos. Porém, os presentes dados não excluem a possibilidade desta droga atuar diretamente sobre as vias enzimáticas hormonais.

Palavras-chave : Dietilcarbamazina, Morfologia, Espermatogênese, Esteroidogênese.

ABSTRACT

Diethylcarbamazine has been proven to be highly effective against lymphatic filariasis, however its effect on vertebrate cells remains controversial. Although its action on microtubules has been described, the hypothesis that this drug affects the spermatogenesis was not tested. After treatment of *Swiss* mice with DEC 200mg/kg for 12 days, ultrastructural analysis showed vacuolization of Sertoli cells and spermatogonies with morphological characteristics of apoptosis, as shrinkage of cytoplasm and increased chromosomal density. Several spermatids presented vacuolated mitochondriae, which were disorganized in relation to the microtubular axis of the flagellae. In addition, Leydig cells showed numerous lipid droplets, multivesicular bodies and several giant whorl-like smooth endoplasmic reticulum, some of them encircling lipids droplets. Some Leydig cells did not present nucleus, indicating an esteatosis process. Lower dosages of DEC produced similar alterations on Leydig cells, however its effects were directly proportional to the drug concentration. Serum testosterone levels were significantly lower in 200mg/kg DEC-treated group when compared to the controls. However, no significant changes were observed in the pregnancy rates and number of offspring born of DEC-treated male-mated female mice in any doses studied. The results of the present study indicate the important effect of DEC on mice testicular morphology and steroidogenesis probably by affecting tubulin and/or microtubule assembly. However, the present data not exclude the possibility that this drug can also act directly on enzymatic hormonal pathways.

Key-words: Diethylcarbamazine, Morphology, Spermatogenesis, Steroidogenesis.

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figua 1	Ciclo evolutivo da <i>W. bancrofti</i>	13
Figura 2	Distribuição geográfica da Filariose Linfática no mundo	15
Figura 3	Administração em massa de DEC	18
Figura 4	Célula de Sertoli com células germinativas associadas	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAT	Acil-Colesterol Acil-Transferase
Acetil-LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade Acetilada
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
CG	Complexo de Golgi
DEC	Dietilcarbamazina
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GA	Glutaraldeído
GL	Gotículas de Lipídio
GMPC	Guanosina Monofosfato Cíclico
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotropina
L3	Larvas Infectantes
LH	Hormônio Luteinizante
LTs	Leucotrienos
MP	Membrana Plasmática
OMS	Organização Mundial de Saúde
PFA	Parafomaldeído
REL	Retículo Endoplasmático Liso
SNC	Sistema Nervoso Central
3 β -HDS	3 β -Hidroxiesteróide Desidrogenase
17 β -HDS	17 β - Hidroxiesteróide Desidrogenase

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Apresentação	13
1.2 Considerações Gerais	14
1.3 Dietilcarbamazina	18
1.4 O efeito da DEC sobre os parasitos	21
1.5 O efeito da DEC sobre células de vertebrados	24
1.6 Espermatogênese	25
2 JUSTIFICATIVA	28
3 OBJETIVOS	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Soluções de DEC	33
4.2 Desenho experimental 1	33
4.2.1 Análise histológica	33
4.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão	34
4.3 Desenho experimental 2	34
4.3.1 Dosagem hormonal	35
4.3.2 Estudo da Fertilidade	35
4.3.3 Estudo do Peso	35
4.4.4 Análise estatística	35
5 RESULTADOS	36
5.1 Desenho experimental 1	37

5.1.1 Análise histológica do testículo	37
5.1.2 Análise ultraestrutural do testículo	37
5.2 Desenho experimental 2	38
5.2.1 Análise ultraestrutural das células de Leydig	38
5.2.2 Dosagem de testosterona	39
5.2.3 Análise da fertilidade e do peso	39
5.3 Figuras (Pranchas e Gráfico) e Tabelas	40
5.3.1 Legendas	60
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	71
APÊNDICE A – Artigo Publicado	82
APÊNDICE B – Artigo Submetido	83
ANEXO A – Parecer do CEP/CPqAM	84
ANEXO B – Parecer do CEUA/FIOCRUZ	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação

A dietilcarbamazina (DEC) é o filaricida mais amplamente utilizado no tratamento da filariose bancroftiana desde 1947 (HEWITT *et al.*, 1947; SANTIAGO-STEVENSON; OLIVER-GONZÁLEZ; HEWITT, 1947). Atualmente, têm-se realizado alguns estudos sobre o mecanismo de ação desta droga, que apesar de mais de 50 anos de uso, teve o seu potencial farmacológico tão pouco explorado. Além disso, a atividade anti-microfilarial da DEC é variável para as diversas espécies de parasitas, para os diferentes estágios da mesma espécie parasitária e para os distintos hospedeiros. Assim, os estudos com animais de experimentação não constituem um modelo ideal que retrate a infecção no homem (DREYER; NORÕES, 1997).

O uso terapêutico desta droga leva a inúmeras reações adversas claramente relacionadas à carga parasitária, chegando até a debilitar o paciente (BRYCESSON; WARRELL; POPE, 1977; FRANCIS; AWADZI; OTTESEN, 1985; PARTONO *et al.*, 1981). Além de apresentar efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC), a DEC também age sobre o sistema digestivo e chega a causar sintomas de desconforto gástrico e náusea, que podem ser provocados por ação direta da droga sobre o estômago ou SNC (HAWKING; SEWELL; THURSTON, 1948). Em pacientes com oncocercose a sua utilização tornou-se proibitiva, pois os pacientes desenvolvem uma reação de hipersensibilidade denominada “reação de Mazzotti” que inclui prurido intenso e, nos casos mais graves, cegueira (OTTESEN, 1987). Ocorre mobilização das microfilárias que se localizam na pele para o sangue e outros fluidos, por outro lado, os eosinófilos sangüíneos migram para os tecidos causando uma queda de seis a oito vezes no número destas células no sangue, após a administração da DEC (ACKERMAN *et al.*, 1990).

Um dos mecanismos de ação da DEC é que ela exerce uma ação sobre os microtúbulos, os quais são responsáveis por manter a estabilidade dinâmica da célula (FUJIMAKI *et al.*, 1988; 1990). Está claro que a tubulina e os microtúbulos atuam em vários níveis subcelulares, incluindo MP, lisossomos, REL, CG e mitocôndrias. O complexo microtubular apresenta um importante papel no processo da espermatogênese, promovendo o suporte estrutural para o desenvolvimento das células germinativas e estimulação da secreção de testosterona. Outros autores apontam a ação de agentes anti-microtubulares sobre o epitélio seminífero e células de Leydig, enfatizando

as mudanças na morfologia e função celular. Dentre as alterações observadas está o desprendimento de células germinativas, vacuolização da célula de Sertoli, distensão do retículo endoplasmático, agregação de mitocôndrias, e inibição da esteroidogênese (ALLARD; JOHNSON; BOEKELHEIDE, 1993; CLARK; SHAY, 1981; NAKAI; HESS, 1994; SALTARELLI *et al.*, 1984).

O presente trabalho se propõe a verificar a ação da DEC na espermatogênese de camundongos através de análises morfológicas (morfométricas e ultraestruturais) e hormonais (dosagem de testosterona) para possíveis analogias com casos humanos.

1.2 Considerações Gerais

A filariose linfática humana é causada por nematóides dos gêneros *Wuchereria* e *Brugia*. Os vermes adultos das espécies *Wuchereria bancrofti*, *Brugia timori* e *Brugia malayi* apresentam tropismo característico pela circulação linfática do organismo humano, onde se instalam e proliferam (SELKIRK *et al.*, 1986) (Figura 1).

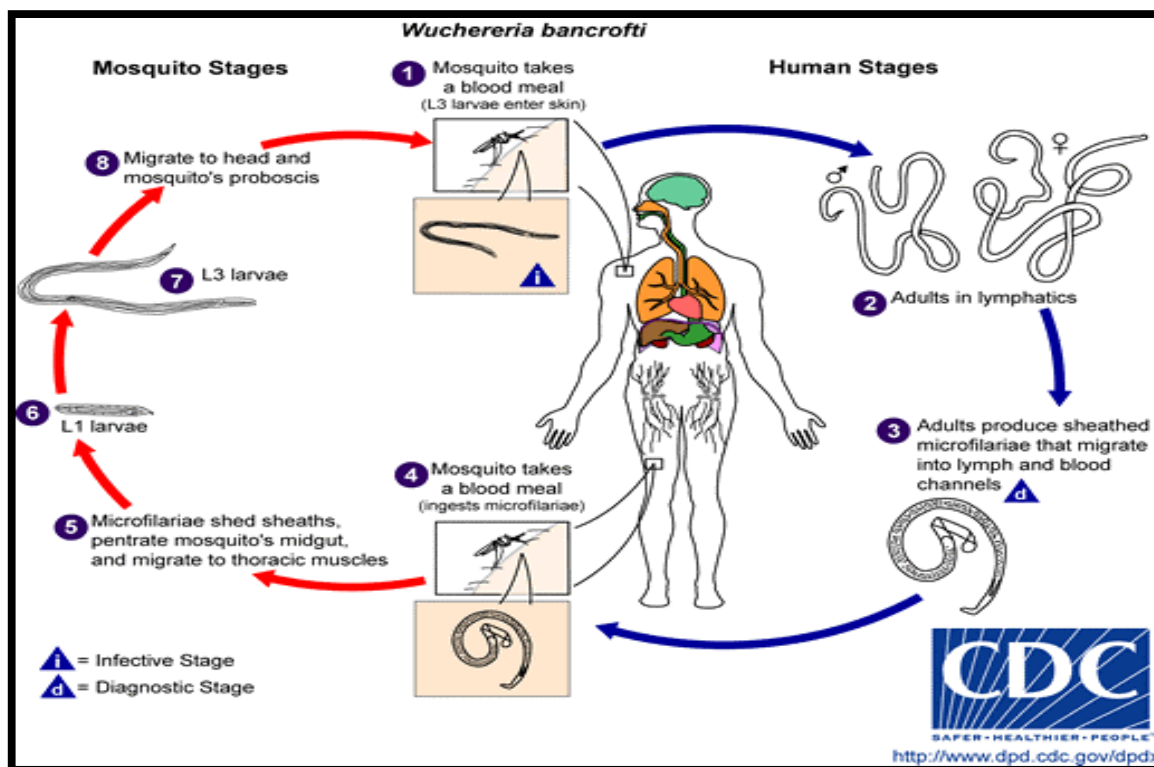


Figura 1. Ciclo evolutivo da *W. bancrofti*. 1- O mosquito infectado deposita larvas do terceiro estágio (L3) sob a pele do hospedeiro humano, estas penetram no organismo provavelmente pela mesma inserção feita pela picada. 2- As larvas alcançam os vasos e nódulos linfáticos, realizam mudas, tornam-se adultas e reproduzem-se. 3- As microfilárias migram através da linfa e canais sangüíneos movendo-se ativamente. 4- Os mosquitos ingerem as microfilárias durante o repasto sangüíneo. 5- Após a ingestão, as microfilárias perdem a bainha e algumas conseguem alcançar a parede do intestino médio do mosquito e músculos torácicos. 6- Desenvolvimento da larva de terceiro estágio. 8- L3 com movimento intenso e próximo a probóscida do mosquito. 9- Realização de novo repasto sangüíneo e infecção.

Atualmente, cerca de 120 milhões de pessoas no mundo são portadoras de filariose linfática, sendo 90% dos casos da forma bancroftiana, e 10% dos casos causados por espécies de *Brugia* (World Health Organization, 2002). Considerando que a maioria dos indivíduos que adquire esta helmintíase desenvolve a forma clínica assintomática, esse número pode ser muito mais elevado, visto que 751 milhões de pessoas vivem nas áreas endêmicas (World Health Organization, 1992).

O Sudeste da Ásia, África, Oeste do Pacífico, Leste do Mediterrâneo e alguns países da América Central e do Sul são as regiões afetadas pela filariose linfática (World Health Organization, 1992) (Fig. 2). Atualmente, no Brasil, as regiões endêmicas concentram-se nas cidades de Belém, Recife e Maceió, estimando-se em 49 mil o número de infectados (Ministério da Saúde, 2000; World Health Organization, 2000). A situação mais problemática é a do estado de Pernambuco, onde ainda são encontrados milhares de portadores de microfilaremia (VIEIRA; COELHO, 1998), sendo o principal transmissor da *W. bancrofti* o mosquito culicídeo *Culex pipiens fatigans* (RACHOU; LACERDA, 1956), hoje denominado de *Culex quinquefasciatus* (SIRIVANAKAN; WRITE, 1978).

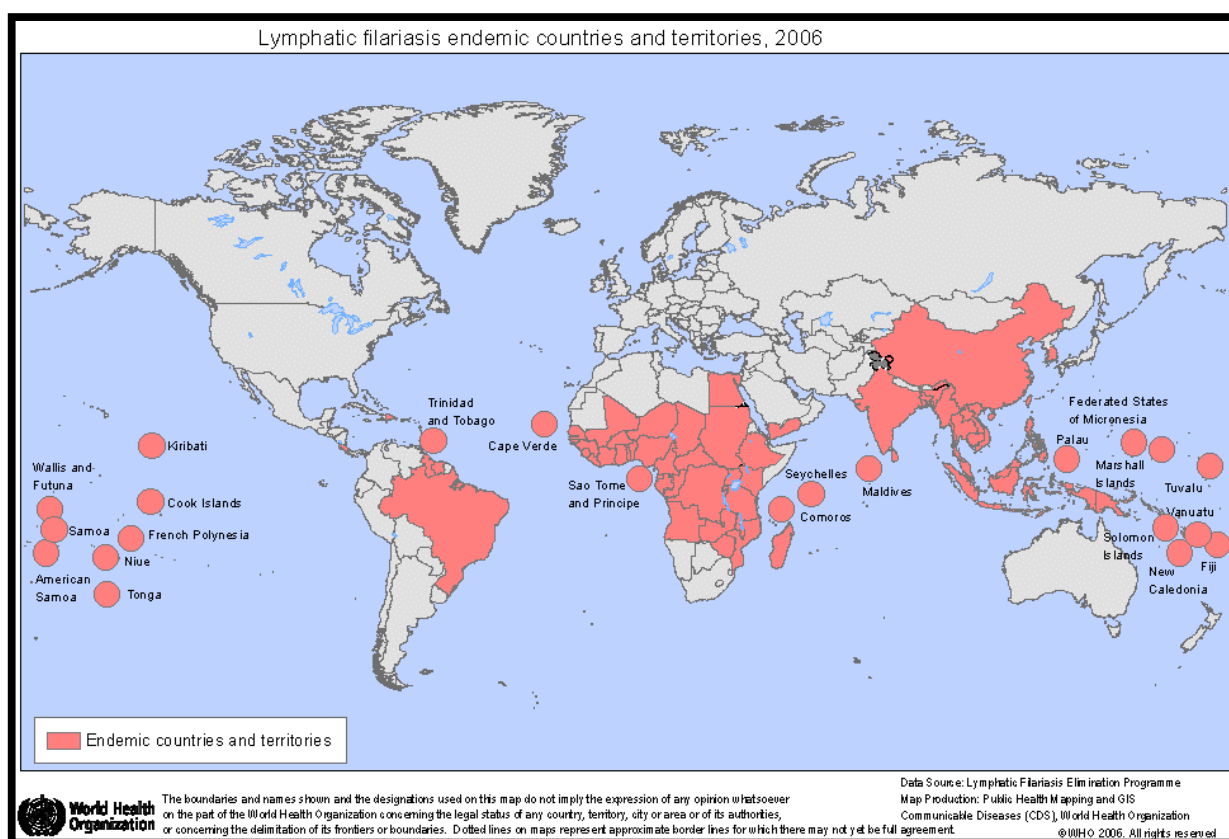


Figura 2. Distribuição geográfica da Filariose Linfática no mundo.

As conseqüências mais drásticas da filariose linfática incluem imobilidade física e morbidade clínica, provocando em regiões de alta endemicidade um grave problema de saúde

pública e comprometendo inclusive, o desenvolvimento econômico devido à redução da produtividade e, em alguns casos, levando à incapacitação do trabalhador.

A DEC é o filaricida mais amplamente utilizado no tratamento da filariose bancroftiana. A inexistência de um modelo de experimentação tem dificultado o conhecimento do mecanismo de ação desta droga sobre vermes adultos e formas larvárias, assim como o estudo da relação parasita-hospedeiro.

1.3 Dietilcarbamazina

A DEC é um derivado da piperazina sintetizada como 1-dietilcarbamil-4-metilpiperazina e preparada na forma de cloridrato, citrato ou fosfato. A partir de 1950, foi distribuída como sal citratado por inúmeras companhias farmacêuticas sob diferentes nomes, como Hetrazan, Banocide, Caricide, Carbilazine, entre outros. É um pó branco, muito solúvel em água, estável, mesmo em condições de umidade e temperatura muito elevadas, e resiste, inclusive, à autoclavagem. A denominação dietilcarbamazina genericamente se refere à sua forma citratada, uma vez que é mais comumente utilizada (DREYER; NORÕES, 1997).

Esta droga tem atividade farmacológica comprovada contra microfilárias e vermes adultos de *W. bancrofti*, *B. timori*, *B. malayi*, *Loa loa* e *Mansonella streptocerca*, e apenas contra a microfilária de *Onchocerca volvulus*. Porém, ela não tem qualquer efeito sobre nenhuma das formas larvárias de *Mansonella ozzardi* e *Mansonella perstans* (MAIZELS; DENHAM, 1992).

Na filariose linfática ela exerce uma significativa ação contra as microfilárias, reduzindo rapidamente a densidade desses embriões circulantes. Esse efeito, mantido por longo prazo, tem sido atribuído à ação microfilaricida da droga. Por outro lado, estudos demonstraram que a mesma exerce seu efeito filaricida também sobre vermes adultos desse parasito (DREYER *et al.*, 1995). Chen (1964) evidenciou, pela primeira vez, vermes adultos degenerados em linfonodos biopsiados de pacientes tratados com DEC. Peixoto (2005) descreveu os aspectos morfológicos do útero da *W. Bancrofti*, a nível ultraestrutural, após o tratamento com DEC, indicando uma possível diminuição de sua fecundidade. Fêmeas obtidas de voluntários que receberam a dose terapêutica recomendada de DEC apresentaram poucos ou até mesmo, nenhum embrião.

O alvo primário no tratamento da filariose é a eliminação das microfilárias sanguíneas de indivíduos infectados, logo a transmissão da infecção para o mosquito seria interrompida. A eficácia da DEC na cura de indivíduos com *W. bancrofti* e na interrupção da transmissão da doença tem sido avaliada sob vários esquemas terapêuticos. Estudos recentes têm demonstrado que uma dose única de DEC tem o mesmo efeito em longo prazo (1 ano) na queda da microfilaremia, quando comparado ao regime recomendado de 12 dias de tratamento. O esquema terapêutico com duas drogas (albendazol com DEC ou ivermectina) combinadas, em dose única,

é 99% efetivo na remoção das microfilárias do sangue por um ano inteiro após o tratamento. Albendazol e DEC têm sido mostradas por serem efetivas na morte dos vermes adultos de parasitas filariais (necessário para a completa cura da infecção), mas regimes de tratamento ideais ainda não estão bem definidos (World Health Organization, 2000).

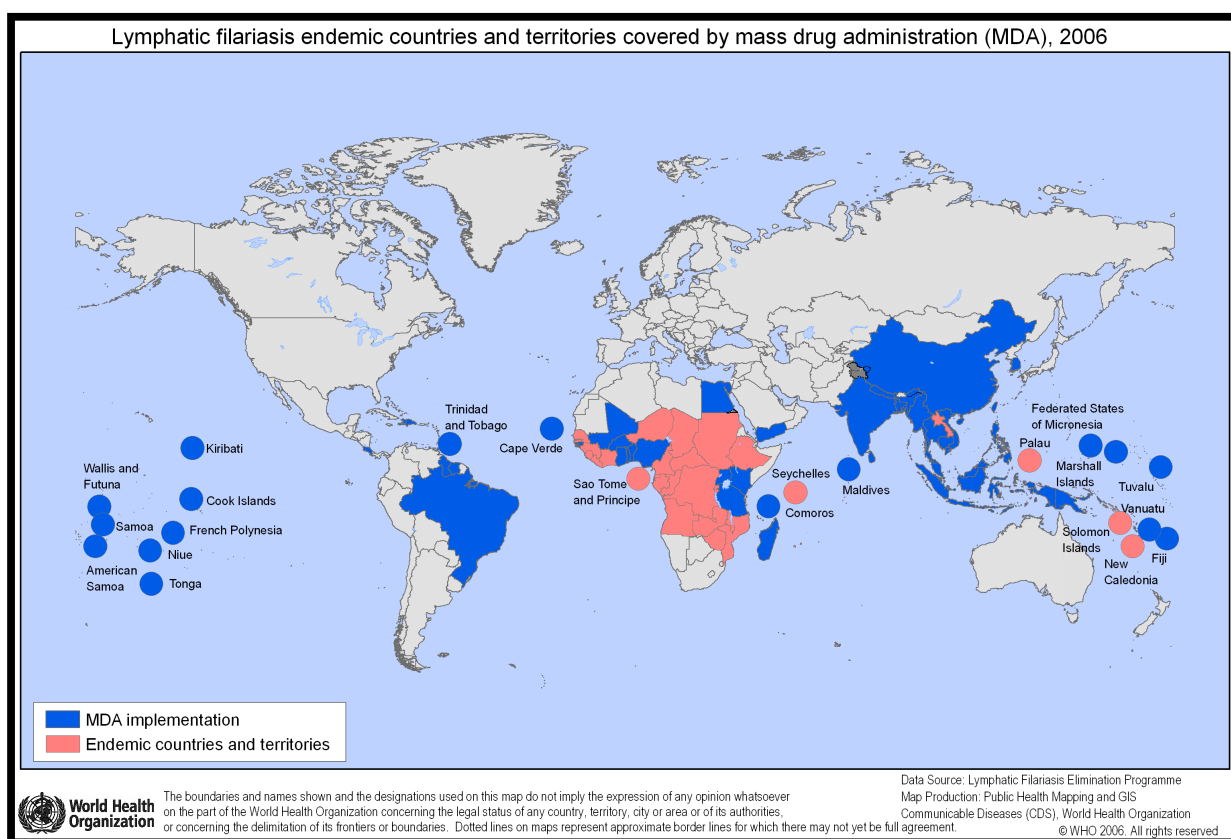


Figura 3. Administração em massa da DEC.

A DEC é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal e atinge o pico da sua concentração plasmática entre uma e três horas após a ingestão (HAWKING, 1979; RÉE *et al.* 1977; SAKUMA *et al.*, 1967). De acordo com Ilondu *et al.* (2000), ela está quase ausente na urina, plasma e saliva de humanos após 24h da ingestão. Por outro lado, estudos toxicológicos e farmacológicos em camundongos indicaram que após 3h o composto é completamente excretado pelo rim (HARNED *et al.*, 1948). Horii e Aoki (1997) descreveram o nível plasmático de DEC em ratos após a administração de 200mg/kg, registrando valores de 30µg/ml após 30-60 min da

injeção, decrescendo rapidamente para 1,5 µg/ml após 4h e atingindo 0,1µg/ml após 8h do tratamento.

As reações adversas são o principal obstáculo ao uso terapêutico desta droga. As queixas mais comumente encontradas são náuseas, vômito, dores abdominais, diarréias, dores de cabeça, febre, sono, dores escrotais e mialgia que se estendem por um ou mais dias. Essas reações relacionam-se claramente à carga parasitária (FRANCIS ; AWADZI; OTTESEN, 1985; PARTONO *et al.*, 1981).

1.4 O efeito da DEC sobre os parasitos

Os resultados dos diversos esquemas terapêuticos mostram que, apesar da rápida e profunda redução do número de microfilárias, muitos indivíduos apresentam microfilaremiias persistentes após o tratamento (EBERHARD *et al.*, 1991; EBERHARD *et al.*, 1989; EBERHARD; LOWRI Jr.; LAMMIE, 1988; KESSEL *et al.*, 1970; KIMURA; PENAI; SPEARS, 1985; MAHONEY; KESSEL, 1971; SETHUMADHAVAN *et al.*, 1978; SRIVASTAVA; PRASAD, 1970; VENKATANARAYANA *et al.*, 1983). Essa persistência é independente dos esquemas posológicos de DEC utilizados e dos níveis plasmáticos da droga alcançados (EBERHARD *et al.*, 1991).

Maizels e Denham (1992) apresentaram uma hipótese para explicar o mecanismo microfilaricida *in vivo* da DEC. Esta droga alteraria o metabolismo do ácido aracdônico nas microfilárias e nas células endoteliais do hospedeiro, visto que bloqueia a produção de leucotrienos (LTs) que são potentes vaso-bronco-constrictores. Mas, além de bloquear a via da 5-lipoxigenase, produtora de LTs, também inibe a produção pelas células endoteliais de prostaglandina (PGE2), prostaciclina (PGI2) e tromboxano A2, por bloquear a via da ciclooxigenase. A PGI2, e em menor proporção a PGE1 e PGE2, são vasodilatadores e inibidores potentes da agregação plaquetária e da adesão endotelial. A ação da DEC sobre o metabolismo do ácido aracdônico, bloqueando a produção de PGE2 e PGI2 tanto na célula endotelial quanto nas microfilárias, levaria a uma vasoconstricção amplificando a adesão endotelial, e assim, propiciaria a imobilização do parasito circulante, aumentando a aderência e a atividade citotóxica das plaquetas e granulócitos do hospedeiro.

A DEC apresenta uma resposta quase imediata *in vivo*. Após aproximadamente 4 minutos da injeção endovenosa da droga, o número de microfilárias sanguíneas diminui em 60% (HAWKING; LAURIE, 1949). De acordo com Hawking, Sewell e Thurston (1948), ela atuaria como uma opsonina, modificando de tal forma as microfilárias que estas seriam capturadas por fagócitos do sistema retículo-endotelial, e subseqüentemente destruídas.

Está claro que a DEC apresenta uma multiplicidade de ações na fisiologia de parasitas e hospedeiro, e que possui efeitos diretos e indiretos na mobilização de microfilárias, agindo no

sistema muscular desse parasito. A sua administração pode potencializar a ação da acetilcolina nas microfilárias resultando no aumento da mobilidade. Nas infecções com *W. bancrofti*, a DEC estimula o transporte das microfilárias dos pulmões para a circulação. Alterações no AMPc/GMPc nessas formas parasitárias podem contribuir na mobilização desses parasitas (HENSON; MACKENZIE; SPECTOR, 1979). Em microfilárias de *B. pahangi*, observa-se diminuição na mobilidade (SIM; MAK; KWA, 1983), efeito oposto ao encontrado em *W. bancrofti*. A ação desta droga em expor a superfície do parasita ao sistema imune do hospedeiro foi proposta por Gibson *et al.* (1976), Bryceson, Warrel e Pope (1977). Outros autores sugeriram que a DEC favorece a perda da bainha de microfilárias *L. carinii*, facilitando a fagocitose pelas células de Kupffer e neutrófilos (SCHARDEIN; LUCAS; DICKERSON, 1968).

Um dos efeitos mais bem conhecidos da DEC é o aumento da adesão das microfilárias às paredes vasculares, plaquetas e granulócitos após poucos minutos da administração de DEC (SCHARDEIN; LUCAS; DICKERSON, 1968; TAYLOR, 1960). Em *Litomosoides sigmodontis*, uma filária de roedores, mais de 99% das microfilárias são normalmente encontradas isentas de células aderidas. Porém, após 4 horas do tratamento com DEC, 21% das microfilárias apresentam células aderidas à sua superfície (ZAHNER *et al.*, 1978). A aderência de eosinófilos torna-se intensa após a administração da DEC (RÁCZ *et al.*, 1982).

Johnson *et al.* (1988) mostraram que a DEC estimula a adesão de granulócitos às microfilárias de *B. pahangi* em presença de soro imune específico. Este estudo revelou a importância de anticorpos específicos como mediadores da aderência, os quais são mais importantes que os fatores do Complemento, embora estes também não possam ser descartados do processo de adesividade. De acordo com os autores, o máximo de adesão foi alcançado quando as células eram pré-tratadas com DEC antes da incubação com as microfilárias. O pré-tratamento das microfilárias com DEC estimulou a adesão celular em grau bem menor. Esses resultados não conferem com os obtidos por Piessens e Baldekas (1979), os quais reportaram que apenas o tratamento das microfilárias com DEC é que resultava em aumento da aderência.

Estudos ultraestruturais sobre a ação da DEC em microfilárias de *Wuchereria bancrofti in vitro*, revelaram importantes alterações morfológicas nestes parasitos. Uma das primeiras alterações morfológicas observadas com o tratamento a 5, 10 e 50 µg/ml, foi a perda da bainha microfilarial, sendo os demais efeitos causados pela incubação com a droga, mais evidentes

após este evento. As alterações mais frequentes foram a formação de inúmeros vacúolos na hipoderme e destruição do citoplasma de células somáticas. Algumas microfilárias apresentaram drástica desorganização celular com várias organelas degeneradas e condensação nuclear. Corpos lamelares também foram detectados indicando um possível processo de envenenamento celular. Tais resultados revelaram indubitavelmente que a DEC exerce um efeito microfilaricida direto sobre microfilárias de *W. bancrofti* (FLORENCIO; PEIXOTO, 2003). De forma similar, após 40 minutos do tratamento de um indivíduo microfilarêmico, a DEC também exerceu um mecanismo de ação direto sobre as microfilárias de *W. bancrofti*, incluindo degeneração de organelas e apoptose (PEIXOTO *et al.*, 2004).

1.5 O efeito da DEC sobre células de vertebrados

Apesar dos inúmeros trabalhos sobre o mecanismo de ação da DEC em larvas e vermes adultos filariais, poucos autores têm se detido sobre seus efeitos em células de vertebrados. De acordo com Fujimaki *et al.* (1988), a DEC inibe o crescimento de células LLC-MK₂ *in vitro*, além de modificar sua morfologia, tornando-as arredondadas, indicando uma possível alteração da função dos microtúbulos. Estudos posteriores confirmaram que a DEC não só promove a inibição da formação dos microtúbulos, como também induz a desorganização dos microtúbulos pré-formados (FUJIMAKI *et al.*, 1990).

Esta droga apresenta uma série de efeitos bioquímicos em diferentes sistemas enzimáticos, incluindo glicólise, metabolismo do folato e acetilcolinesterase (SUBRAHMANYAM, 1987). Após a incubação de condrócitos com DEC (2-20mM) foi observado grandes vacúolos no citoplasma, distensão do complexo de Golgi (CG) e um material eletrôn-denso no interior do retículo endoplasmático liso (REL). Após a remoção da droga as alterações desapareceram, o que foi coincidente com o início da exocitose de proteoglicanos e ³⁵S-glycosaminoglicanos. Os estudos bioquímicos revelaram que a DEC interfere no transporte intracelular entre o REL, o CG e a membrana plasmática (MP) (STEVENS *et al.*, 1985).

Outros estudos revelaram também que o tratamento com DEC a 5 mM/mL durante dez dias produziu drásticos efeitos em neurônios em cultura, induzindo uma completa desorganização do CG, e a formação de grandes vacúolos no citoplasma. Análises quantitativas comparando neurônios tratados e não-tratados com DEC demonstraram diferenças significativas no tamanho das cisternas do CG, bem como no número de vesículas vazias e secretórias, sugerindo um dano severo de várias atividades sintéticas e secretoras (BIRD, 2000).

A DEC possui outro papel terapêutico como uma droga antiinflamatória para condições asmáticas (SALAZAR-MALLÉM, 1971; SRINIVAS e ANTANI, 1971; THIRUVENGADAM *et al.*, 1974). Estudo realizado por Florêncio, Saraiva e Peixoto (2005) demonstrou que após 12 dias de tratamento com DEC os pneumócitos do tipo II apresentaram um grande número de vesículas maduras levando a uma ativação do metabolismo de surfactante pulmonar. Nos macrófagos alveolares foram detectadas várias características morfológicas de ativação celular, que poderiam

ser explicadas por uma maior atividade endocítica dessas células, as quais são responsáveis pela fagocitose do surfactante secretado pelos pneumócitos do tipo II. O aumento da síntese e secreção de surfactante promoveria uma diminuição da tensão superficial dos alvéolos, reduzindo os esforços musculares decorrentes dos movimentos respiratórios. Tais resultados poderiam explicar o alívio dos sintomas da asma causados pelo tratamento com DEC como previamente observado por outros autores (LIU; WANG; ENHORNING, 1995; LIU *et al.*, 1996).

Poucos estudos foram realizados até o momento sobre a ação da DEC no sistema reprodutor. Hawking (1979) demonstrou que doses elevadas (100 - 200mg/kg) administradas diariamente por via oral a ratas grávidas, não exerceram ação abortiva nem efeito nocivo no feto. Entretanto, quando administrada a camundongos numa dose de 200mg/kg, diariamente por dez dias, produziu infertilidade em 50% dos animais fêmeas. Outros autores não observaram alterações nos índices de fertilidade de cães tratados com 13.2mg de DEC/kg/dia durante seis meses (COURTNEY; NACHREINER, 1976).

1.6 Espermatogênese

A espermatogênese é um processo complexo e bem organizado que ocorre nas gônadas masculinas, os testículos. Estes órgãos são constituídos por numerosos túbulos seminíferos, dedicados à produção de espermatozóides, que são circundados por um tecido conjuntivo frouxo altamente vascularizado. Dispersos nesse tecido conjuntivo encontram-se pequenos aglomerados de células endócrinas, as células intersticiais ou de Leydig, as quais são responsáveis pela síntese de testosterona. O epitélio seminífero ou germinativo é composto por dois tipos celulares, as células de Sertoli, e as células espermatogênicas que são encontradas em diferentes estágios de maturação (espermatogônias, espermatoócitos primários e secundários, espermátides e espermatozóides) (Fig. 4) (GARTNER; HIATT, 1997).

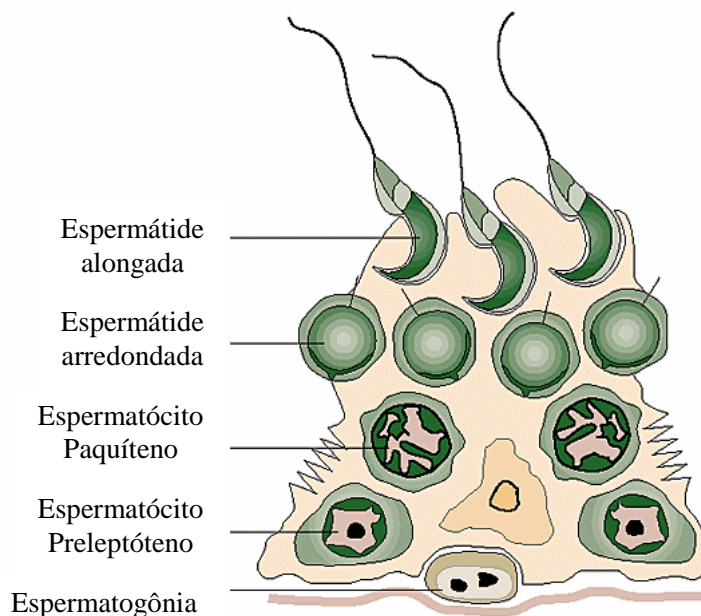


Figura 4. Célula de Sertoli com células germinativas associadas (COOKE; SAUNDERS, 2000).

O sucesso da espermatogênese em vertebrados requer células de Sertoli funcionantes. Estas são arrançadas de tal forma que possam manter o contato com as outras células do epitélio, regulando assim, os fatores necessários para a progressão das células germinativas em espermatozoides. As células de Sertoli possuem funções de suporte físico e nutricional; fagocitose de restos citoplasmáticos de espermatídes, durante o processo de espermiogênese; estabelecimento de uma barreira hematotesticular através da formação de zônulas de oclusão entre as células de Sertoli adjacentes; secreção de proteínas, tais como a proteína de ligação de andrógeno (ABP) e a transferrina testicular que capta o ferro da transferrina sérica e conduz para os gametas em maturação; síntese e secreção de hormônio antimülleriano e inibina (GRISWOLD, 1998; GARTNER; HIATT, 1997).

Em humanos e camundongos, a maturação das células germinativas do testículo é subdividida em três fases: proliferativa (espermatogônias), meiótica (espermatócitos) e espermiogênica (espermatídes), onde todas culminam na liberação de espermatozoides maduros (espermição). Duas classes de espermatogônias têm sido identificadas, as do tipo A e B. Estas são submetidas a várias divisões mitóticas antes de entrarem na prófase da meiose como espermatócitos pré-leptótenos, que se maturam em leptóteno, zigóteno e paquíteno (fases da

meiose). Ao final da prófase meiótica, estas células são submetidas a divisões finais para formar espermátides haplóides que farão parte da espermiogênese, durante a qual o núcleo das células germinativas é remodelado e compactado, como observado nos espermatozóides adultos (COOKE; SAUNDERS, 2002).

A produção de espermatozóides depende da ação de hormônios gonadotrópicos, o hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Ambos produzidos pela glândula pituitária em resposta ao hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) proveniente do hipotálamo. Em resposta ao LH, a testosterona é produzida pelas células de Leydig. Está claro que a testosterona é um pré-requisito necessário para a manutenção da espermatogênese (ZIRKIN, 1999).

Dadas as complexas interações celulares que estão envolvidas na espermatogênese, este processo não pode ser desenvolvido *in vitro*, e modelos de camundongos oferecem uma via alternativa. A espermatogênese destes animais é comparável com a de humanos, uma vez que os termos histológicos e o desenvolvimento são bem definidos.

2 JUSTIFICATIVA

A Filariose Linfática continua sendo um dos principais problemas de saúde pública em países tropicais com 120 milhões de pessoas infectadas, onde a maioria dos casos é acometida pela *Wuchereria bancrofti* (World Health Organization, 2002). Esta doença é uma parasitose crônica, de longo tempo de evolução, e com elevada morbidade.

A droga filaricida, dietilcarbamazina, tem sido amplamente utilizada em programas de controle, mas seu mecanismo farmacológico de ação permanece controverso. Ela exerce um efeito sobre as microfilárias, reduzindo rapidamente a densidade dos embriões circulantes (HAWKING; LAURIE, 1949), como também altera sua morfologia (PEIXOTO *et al.*, 2004). Além da ação microfilaricida, a DEC ainda possui um efeito macrofilaricida, atuando sobre os vermes adultos de *W. bancrofti* (CHEN, 1964; PEIXOTO, 2005).

Apesar de sua poderosa ação filaricida, a DEC age sobre uma variedade de células de mamíferos (BIRD, 2000; FLORÊNCIO; SARAIVA; PEIXOTO, 2005; FUJIMAKI *et al.*, 1990; SAREEN *et al.*, 1961; STEVENS *et al.*, 1985). Logo, torna-se necessário observar o efeito desta droga sobre os diferentes tecidos animais. O presente trabalho enfoca a ação da DEC sobre a espermatogênese de camundongos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Analisar a ação da dietilcarbamazina sobre a espermatogênese de camundongos *Swiss albino*, machos e adultos.

3.2 Objetivos Específicos:

- Caracterizar o efeito do tratamento *in vivo* da DEC em diferentes doses sobre células germinativas e células de Leydig de camundongos através da microscopia eletrônica de transmissão e microscopia óptica;
- Avaliar possíveis alterações na produção de testosterona após o tratamento com DEC;
- Analisar a fertilidade dos camundongos após tratamento com DEC.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Soluções de DEC

As soluções foram constituídas por água destilada e DEC nas concentrações de 25mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kg e 200mg/kg.

4.2 Desenho experimental 1

Quatorze camundongos com 45 dias, pesando entre 27-30g, foram usados neste experimento. Foi examinado o estado de saúde dos camundongos, os quais foram aclimatados a 25°C, em um fotoperíodo de 12h claro:12h escuro, e alimentados com a dieta padrão do laboratório. Um grupo experimental composto por 7 animais recebeu 200mg de DEC/kg durante 12 dias através de um tubo estomacal (FLORENCIO; SARAIVA; PEIXOTO, 2005). Ao grupo controle, também composto por 7 animais, foi administrado água destilada usando o mesmo procedimento descrito acima. Após o tratamento com DEC, o grupo experimental e o controle foram sacrificados e fragmentos do testículo foram rapidamente retirados e fixados para microscopia óptica e eletrônica.

4.2.1 Análise histológica

Os fragmentos do testículo foram lavados duas vezes em PBS pH 7.2 e fixados por duas horas em solução contendo glutaraldeído (GA) 2,5%, paraformaldeído (PFA) 4% e tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2. A seguir, foram desidratados em séries crescentes de álcool etílico, incluídos em glicol metacrilato (Historesin, Leica Instruments, GmbH, Heidelberg), cortados e corados com azul de toluidina e borato de sódio (SARAIVA *et al.*, 2006).

4.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os fragmentos do testículo foram lavados duas vezes em PBS pH 7,2 e fixados por duas horas em solução contendo GA 2,5%, PFA 4% e tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2. Após o processo de fixação foram lavados no mesmo tampão e pós-fixados, por 1 hora, numa solução contendo 1% de tetróxido de ósmio, 5mM CaCl₂ e 0,8% de ferricianeto de potássio em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2. Novamente lavados com tampão e contrastados em bloco, por 1 hora, com acetato de uranila a 2,5% em água. A seguir, foram desidratados em séries crescentes de acetona, infiltrados e emblocados em resina SPIN-PON (Sigma Company, St Louis, MO). A polimerização foi feita a 60°C por 2 dias. Cortes ultrafinos foram coletados em grades de cobre 300-mesh, corados e contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo, e examinados no microscópio eletrônico de transmissão ZEISS EM 109 (SARAIVA *et al.*, 2006).

4.3 Desenho experimental 2

Vinte e cinco camundongos com 45 dias, pesando entre 27-30g, foram usados neste experimento. Foi examinado o estado de saúde dos camundongos, os quais foram aclimatados a 25°C, em um fotoperíodo de 12h claro:12h escuro, e alimentados com a dieta padrão do laboratório. Os grupos experimentais, compostos por cinco animais cada, receberam as seguintes doses: 25, 50, 100 e 200mg de DEC/kg durante 12 dias através de um tubo estomacal (FLORENCIO; SARAIVA; PEIXOTO, 2005). O grupo controle, também composto por cinco animais, recebeu água destilada usando o mesmo procedimento descrito acima.

O peso dos camundongos foi registrado todos os dias. Após o tratamento com DEC, o sangue dos animais tratados e controles foi coletado por punção cardíaca sem anticoagulante. O soro foi separado e armazenado a -70°C para dosagem de testosterona. Os testículos e epidídimos foram rapidamente dissecados e pesados. Os fragmentos do testículo foram processados de acordo com o item 4.2.2.

4.3.1 Dosagem hormonal

A concentração de testosterona no soro foi medida por ensaio imunoenzimático (ELISA) como descrito nas instruções do Kit (Diagnostics biochem Inc).

4.3.2 Estudo da Fertilidade

Para o estudo da fertilidade e desempenho reprodutivo, um grupo experimental composto por 10 animais machos e tratados com 200mg de DEC/kg foi acasalado (1:2) com fêmeas saudáveis durante 5 dias. Estas estavam no proestro como determinado por esfregaço vaginal. A presença do plug vaginal caracterizou o dia 0 da gestação para as fêmeas acasaladas e consideradas como grávidas. O número de fêmeas grávidas e de filhotes foi registrado no grupo controle e tratado (SARKAR *et al.*, 2000).

4.3.3 Avaliação do Peso

O peso dos testículos e epidídimos foram registrados rapidamente após o sacrifício dos camundongos.

4.4.4 Análise estatística

Os dados foram analisados com ANOVA one-way, seguido de um teste a posteriori de Tukey, quando as diferenças foram significativas (AYRES ; AYRES JUNIOR ; SANTOS, 2003).

5 RESULTADOS

5.1 Desenho experimental 1

5.1.1 Análise histológica do testículo

A análise histológica do testículo do grupo controle mostrou uma espermatogênese normal com células germinativas, células de Sertoli e células de Leydig (Figuras 1 e 2).

Após 12 dias de tratamento com DEC, foi observado nas células de Sertoli vacuolização entre as células germinativas. No espaço intertubular, muitas células de Leydig apresentaram-se hipertrofiadas e repletas de gotículas de lipídios (GL), enquanto outras, apesar de numerosas GL, não tinham núcleo, caracterizando um evidente processo de esteatose (Figura 3).

5.1.2 Análise ultraestrutural do testículo

O exame de seções ultrafinas do testículo após tratamento com DEC revelou que as células de Sertoli mantiveram algumas características morfológicas como um núcleo indentado e cromatina associada a um evidente nucléolo. Entretanto, numerosos e largos vacúolos foram observados no citoplasma (Figura 4). Algumas espermatogônias mostraram características morfológicas de apoptose, como encolhimento do citoplasma e aumento da densidade cromossomal. Uma distensão do REL e depósitos de materiais eletrondensos em torno das organelas intracelulares degeneradas foram também observados (Figura 5).

Os testículos não tratados mostraram espermátides com mitocôndrias distribuídas em torno do eixo microtubular (Figura 6 e 8). Por outro lado, em testículos tratados com DEC, algumas espermátides apresentaram mitocôndrias vacuoladas, as quais estavam desorganizadas em relação ao eixo microtubular do flagelo (Figura 7). Além dessas alterações, também foram observados numerosos e largos vacúolos no citoplasma dessas células (Figura 9).

As células de Leydig do grupo controle mostraram características morfológicas normais, tais como áreas de citoplasma ricas em anastomose tubular e círculos concêntricos de REL.

Outras áreas apresentaram poucas GL, lisossomos, Golgi, mitocôndrias com cristas tubulares e retículo endoplasmático rugoso (dados não mostrados).

Após o tratamento com DEC, as células de Leydig mostraram numerosas GL espalhadas através do citoplasma, algumas delas apresentando hidrólise (Figura 10), e corpos multivesiculares quando comparadas com as células controle. Vários círculos concêntricos gigantes de REL foram observados, alguns deles englobando grandes GL (Figura 11). As células de Leydig em processo de esteatose mostraram núcleo picnótico com cromatina condensada perinuclear e citoplasma repleto de GL. Estas células também apresentaram mitocôndrias degeneradas em torno das GL, as quais estavam parcialmente circundadas por um material densamente corado (Figura 12).

5.2 Desenho experimental 2

5.2.1 Análise ultraestrutural das células de Leydig

As células de Leydig no grupo controle mostraram características morfológicas como áreas ricas em anastomose tubular e círculos concêntricos de REL. Outras áreas contendo GL, e mitocôndrias com cristas tubulares (Figuras 1 e 2).

Como descrito previamente, as células de Leydig após o tratamento com 200mg de DEC/kg apresentaram as seguintes características: 1- numerosas GL, 2- corpos residuais, 3- vários círculos concêntricos gigantes de REL, alguns deles englobando grandes GL (Figuras 3-6). O tratamento com doses menores mostrou alterações similares nas células de Leydig, porém em intensidades proporcionais às concentrações utilizadas (Figuras 7-12).

5.2.2 Dosagem de testosterona

O nível de testosterona no soro decresceu em torno de 78% no grupo tratado com 200mg de DEC/kg quando comparado ao grupo controle (ANOVA, $p=0,00747$) (Figura 13).

Os animais tratados com 50 e 100mg de DEC/kg apresentaram níveis proporcionalmente menores de testosterona no soro, entretanto, não houve diferença estatística quando comparado com os animais não tratados.

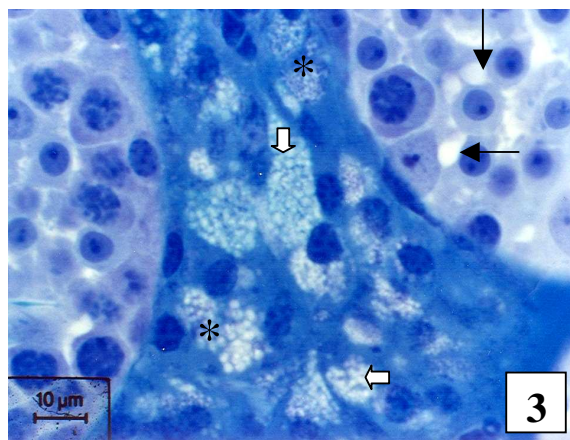
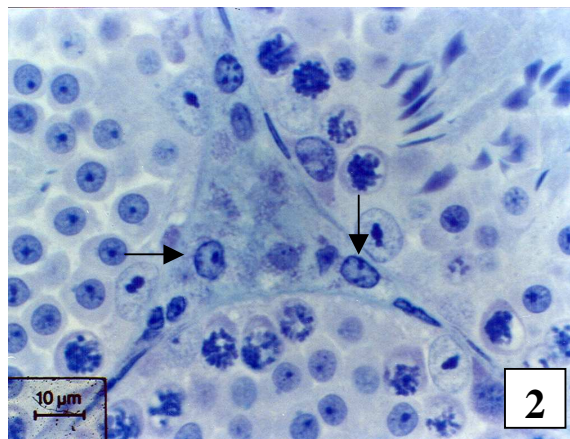
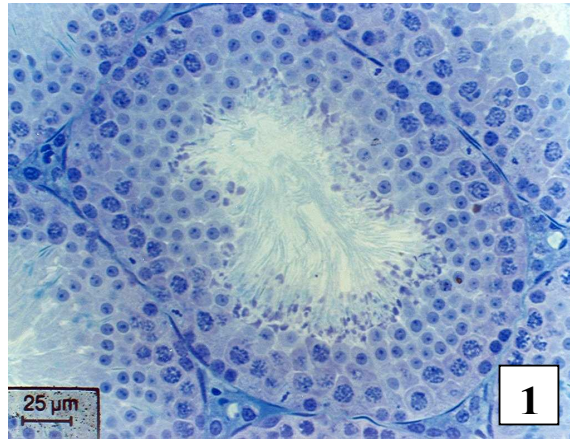
5.2.3 Análise da fertilidade e do peso

Embora tenham sido detectadas mudanças evidentes nos níveis de testosterona, nenhuma alteração foi observada nas taxas de gravidez e no número de filhotes de fêmeas acasaladas com machos tratados com 200mg/kg (Tabela 1). Similarmente, não houve diferenças estatísticas significantes entre o peso absoluto dos testículos e epidídimos dos animais tratados e controles (Tabela 2).

5.3 Figuras (Pranchas e Gráfico) e Tabelas

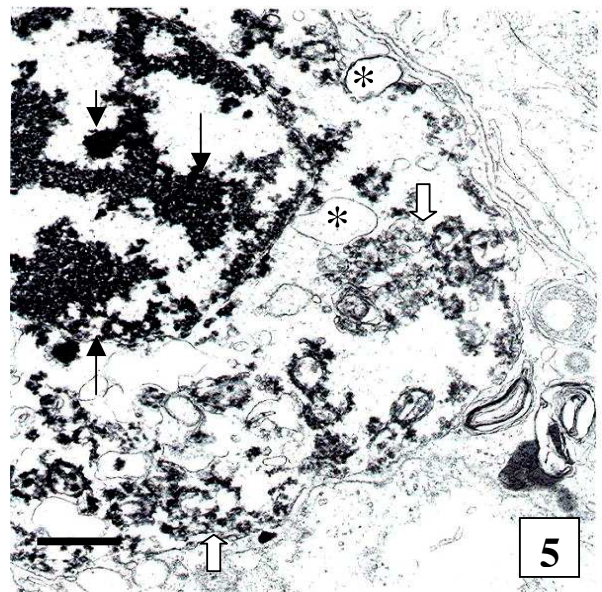
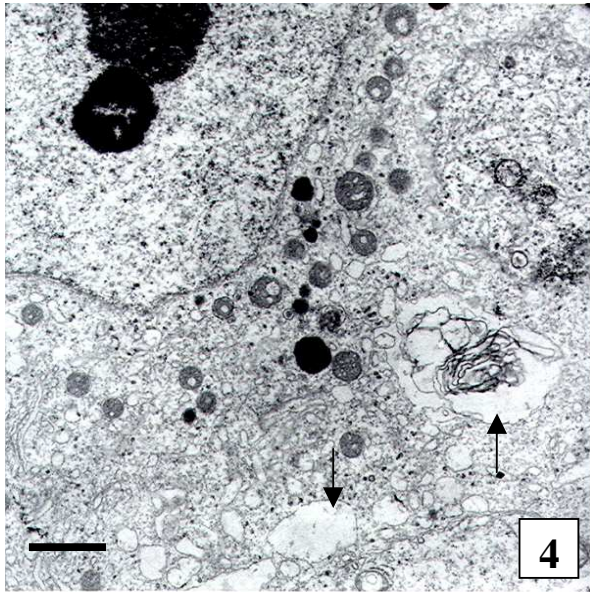
DESENHO EXPERIMENTAL 1

PRANCHA – I

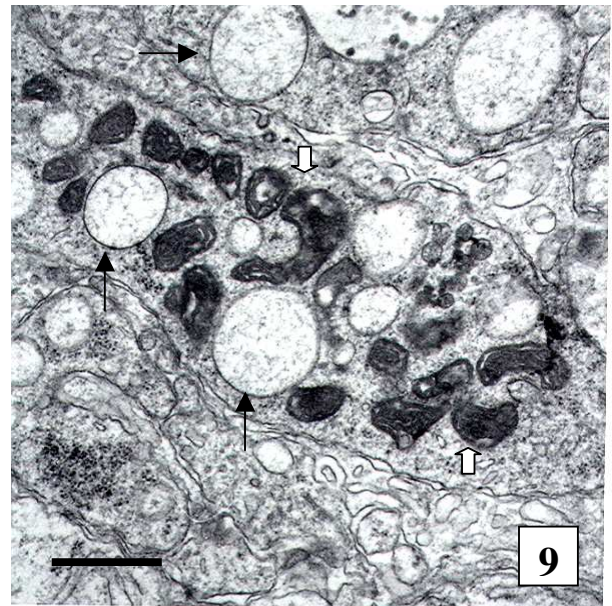
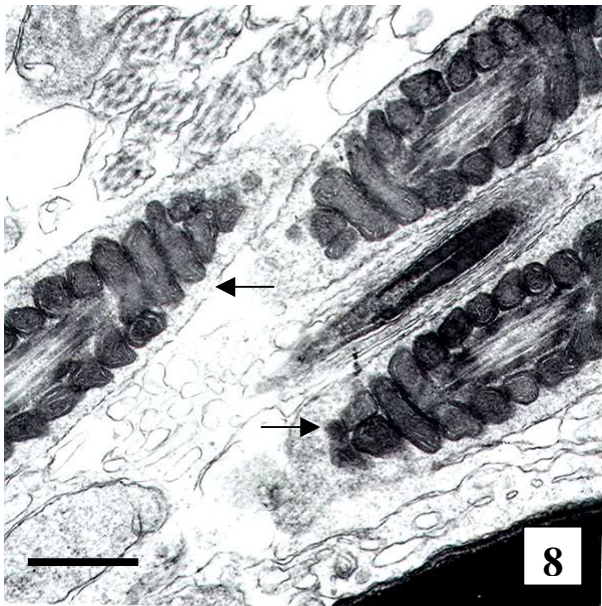
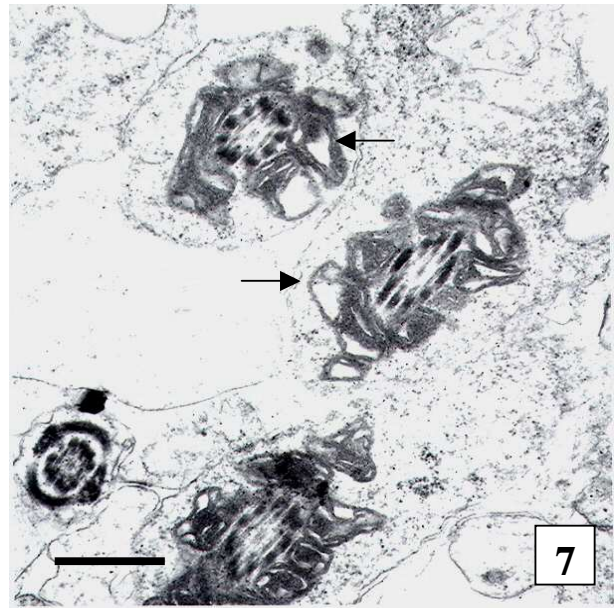
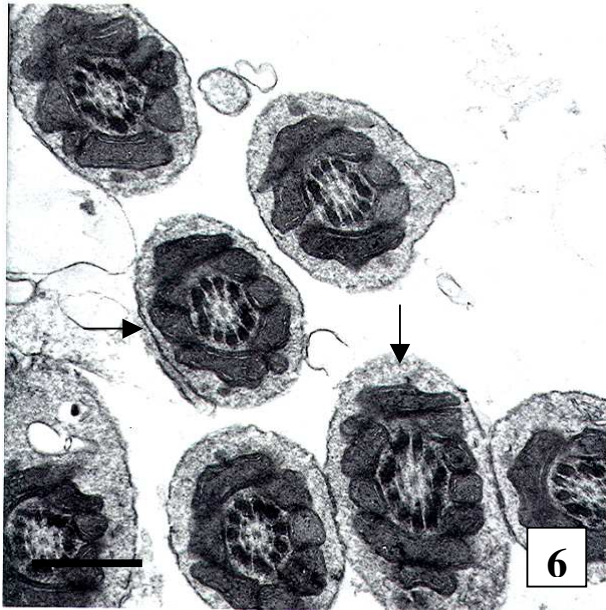


DESENHO EXPERIMENTAL 1

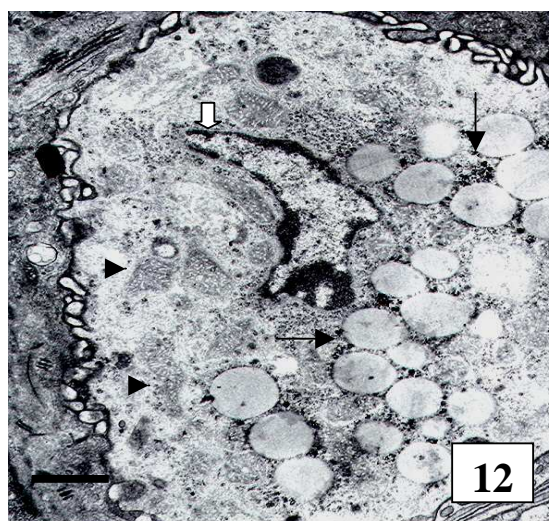
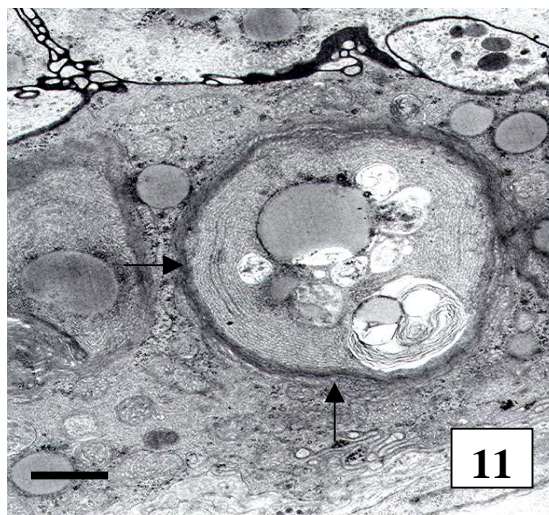
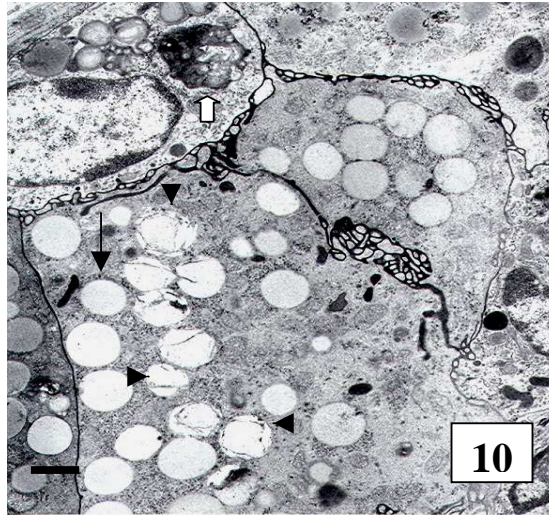
PRANCHA – II



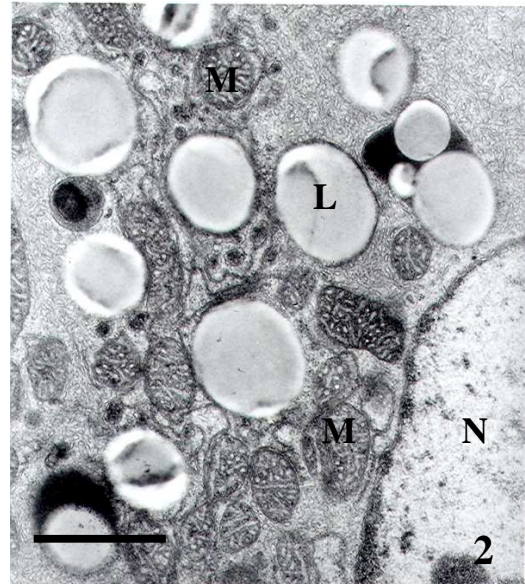
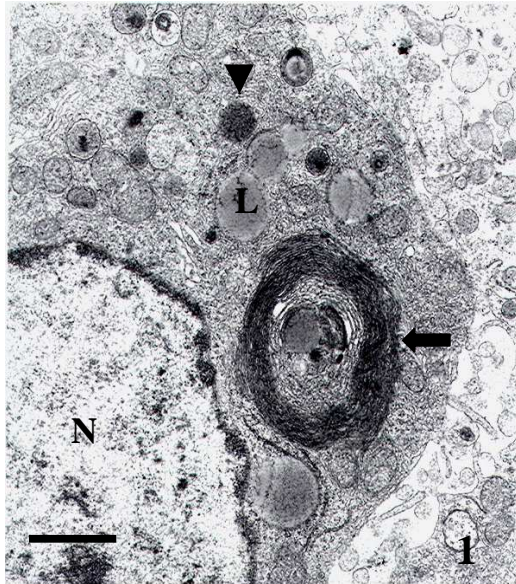
DESENHO EXPERIMENTAL 1
PRANCHA – III



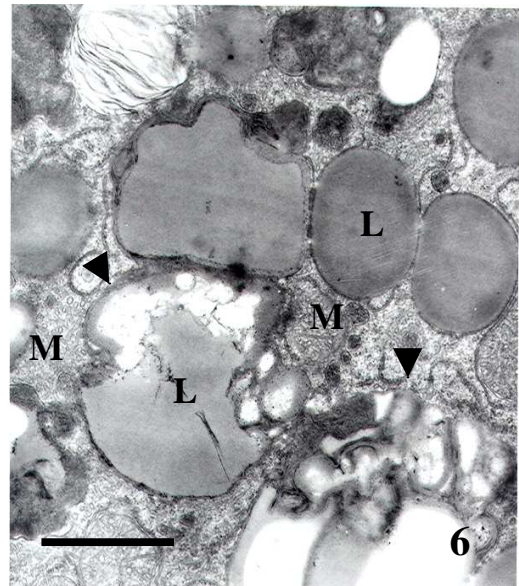
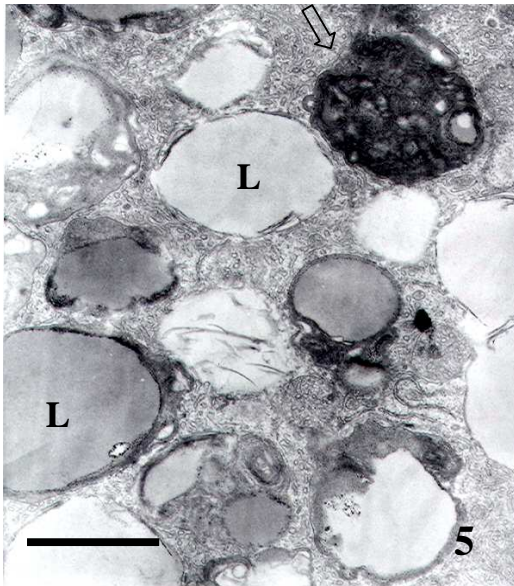
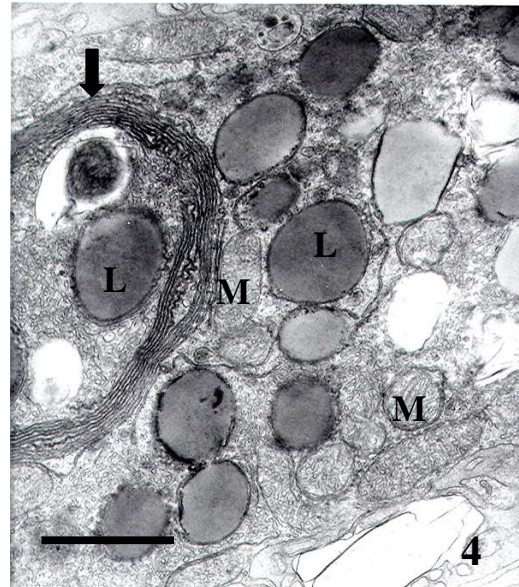
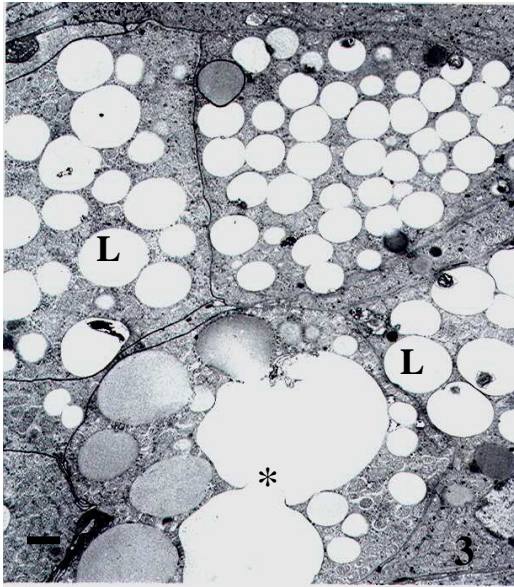
DESENHO EXPERIMENTAL 1
PRANCHA – IV



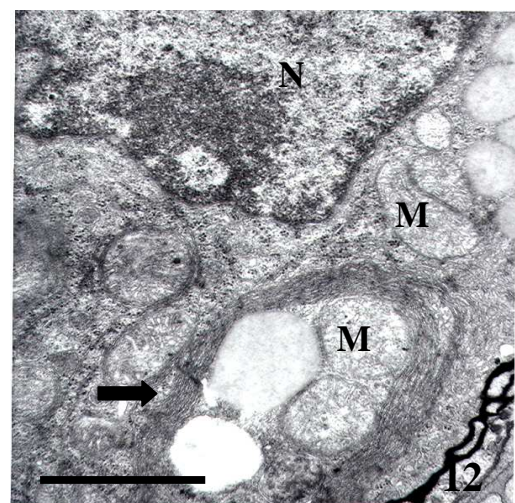
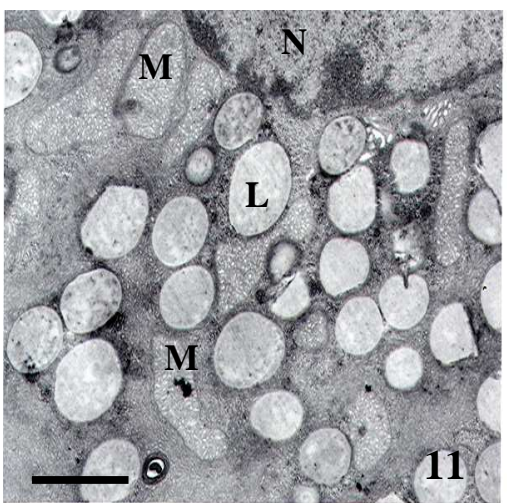
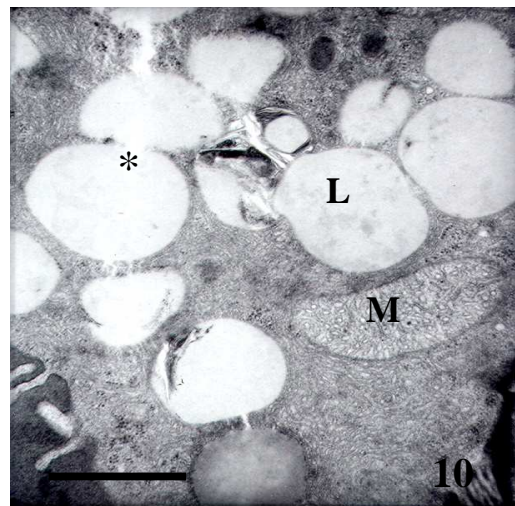
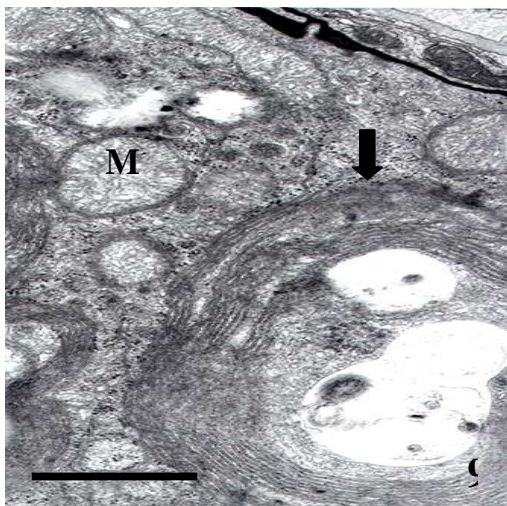
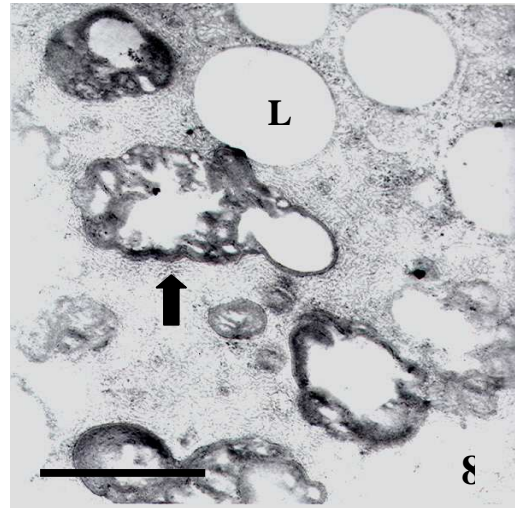
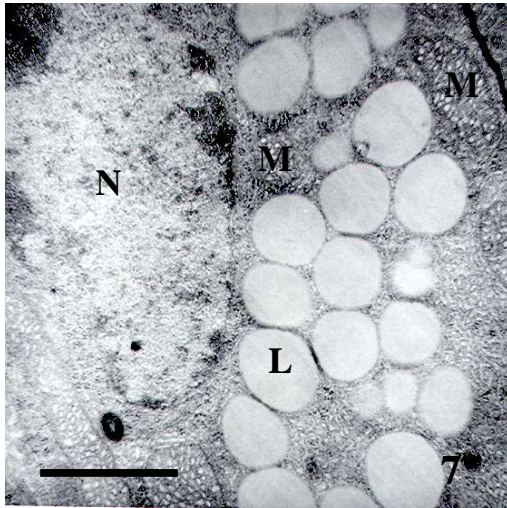
DESENHO EXPERIMENTAL 2
PRANCHA – I



DESENHO EXPERIMENTAL 2
PRANCHA – II

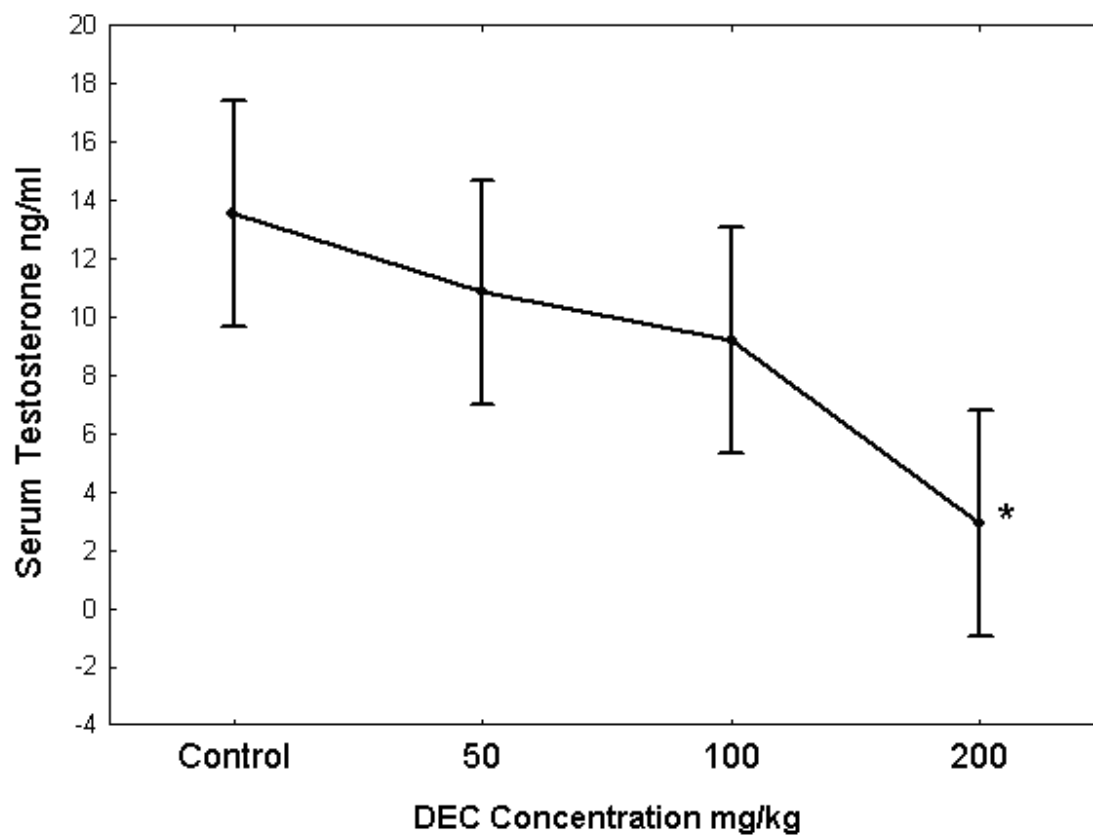


DESENHO EXPERIMENTAL 2
PRANCHA – III



DESENHO EXPERIMENTAL 2

FIGURA 13



DESENHO EXPERIMENTAL 2

TABELA 1

NÚMERO DE FILHOTES

CAIXA (1 macho:2 Fêmeas)	MACHOS TRATADOS 200mg/kg	MACHOS CONTROLES
1	12	10
2	11	25
3	21	22
4	24	22
5	24	12
6	19	21
7	12	14
8	21	17
9	23	25
10	20	16
Total de Filhotes	187	186
Média	18,7	18,4
Desvio-padrão	5,12	5,35

Dados estatisticamente não significantes ($P > 0,05$).

DESENHO EXPERIMENTAL 2

TABELA 2

Parâmetro	Controle	DEC	DEC	DEC	DEC
		25mg/kg	50mg/kg	100mg/kg	200mg/kg
Peso do testículo (mg)	144 ± 19.93	130.6 ± 14.47	128.17 ± 10.38	122.76 ± 10.37	129.7 ± 10.34
Peso do epidídimo (mg)	59.6 ± 14.47	52.9 ± 8.83	64.62 ± 11.73	68.6 ± 19.33	68.9 ± 10.9

Dados estatisticamente não significantes ($P > 0,05$).

5.3.1 Legendas

Desenho experimental 1

Figura 1 – Testículo não tratado mostrando túbulo seminífero no estágio VII.

Figura 2 – Espaço intertubular de testículo não tratado apresentando células de Leydig normais (setas).

Figura 3 – Células de Leydig hipertrofiadas de testículo tratado com DEC mostrando várias GL (setas brancas). Algumas destas células não apresentam núcleo, e estão repletas de GL (asteriscos). Notar vacuolização das células de Sertoli entre as células germinativas (setas).

Figura 4 – Testículo tratado com DEC mostrando células de Sertoli com numerosos vacúolos no citoplasma (setas). Barra 1 μ m.

Figura 5 – Espermatogônia apresentando encolhimento do citoplasma e condensação nuclear. Observar a intensa densidade cromossomal (setas), nucléolo (seta pequena), distensão do REL (asteriscos) e deposição de material eletrôn-denso em torno das organelas intracelulares (setas brancas). Barra 1 μ m.

Figuras 6 e 8 – Espermátides não tratadas com mitocôndrias distribuídas em torno do eixo microtubular (setas). Barra 0,5 μ m.

Figura 7 – Espermátides de testículo tratado apresentando mitocôndrias vacuoladas (setas), as quais estão desorganizadas em relação ao eixo microtubular do flagelo. Barra 0,5 μ m.

Figura 9 – Espermátides tratadas com DEC com numerosos vacúolos no citoplasma (setas) e mitocôndrias espalhadas no citoplasma (setas brancas). Barra 0,5 μ m.

Figura 10 – Células de Leydig tratadas com DEC apresentando numerosas GL espalhadas no citoplasma (setas), corpos multivesiculares (seta branca) e GL com hidrólise (cabeças de seta). Barra 1 μ m.

Figura 11 – Círculos concêntricos gigantes de REL (setas) englobando GL. Barra 1 μ m.

Figura 12 - Célula de Leydig com mitocôndrias degeneradas (cabeças de seta), GL circundadas por um material densamente corado (setas) e núcleo picnótico (seta branca). Barra 1 μ m.

Desenho experimental 2

Figuras 1 e 2 – Células de Leydig não tratadas mostrando círculo concêntrico de REL (seta), GL (L), mitocôndrias com cristas tubulares (M) e núcleo (N). Barra 1 μ m.

Figuras 3-6 – Células de Leydig tratadas com DEC apresentando numerosas GL (L), algumas delas com hidrólise (cabeças de seta) e outras exibindo fusão (asterisco), círculos concêntricos gigantes de REL englobando GL (seta), corpo residual (seta vazada) e mitocôndrias degeneradas (M). Barra 1µm.

Figuras 7-12 – (7 e 8) Células de Leydig tratadas com 25mg de DEC/kg mostrando numerosas GL no citoplasma (L), algumas delas exibindo hidrólise (seta). Barra 0,5 µm ; Barra 1µm. (9 e 10) Células de Leydig tratadas com 50mg de DEC/kg com círculo concêntrico gigante de REL (seta), fusão de GL (asterisco) e mitocôndria degenerada (M). Barra 1µm; Barra 0,5µm. (11 e 12) Células de Leydig tratadas com 100mg de DEC/kg apresentando numerosas GL (L), círculo concêntrico gigante de REL, englobando GL (seta) e mitocôndrias degeneradas (M). Barra 1µm.

Figura 13 – Efeito da DEC sobre o nível de testosterona no soro de camundongos.

* Diferença significativa entre o grupo de 200mg/kg e o grupo controle.

Tabela 1 - Efeito da DEC sobre o número de filhotes de fêmeas acasaladas com machos tratados nas doses estudadas.

Tabela 2 - Efeito da DEC sobre o peso dos testículos e epidídimos de animais controles e tratados (média ± desvio padrão).

6 DISCUSSÃO

A DEC tem sido a droga de escolha para o tratamento da filariose linfática desde 1947, em decorrência do rápido desaparecimento das microfilárias da corrente sanguínea, embora seja pouco efetiva contra os vermes adultos. Estudos têm sido realizados sobre o mecanismo de ação desta droga, cujo potencial farmacológico foi pouco explorado.

Até o momento, há uma escassez de trabalhos na literatura sobre a ação da DEC na espermatogênese. Portanto, existe uma lacuna no que se refere a sua ação sobre a morfologia dos diferentes tipos celulares do testículo e sobre a esteroidogênese de indivíduos com filariose.

Estudos bioquímicos e morfológicos indicaram que o tratamento de condrócitos de condrossarcoma com DEC altera o transporte de moléculas do REL para o CG e deste para a superfície celular, visto que os condrócitos após incubação com esta droga apresentaram largos vacúolos, um Golgi distendido, e um aumento do REL, o qual continha material eletrôn-denso. Com a remoção de DEC os vacúolos desapareceram e as organelas distendidas retornaram a sua aparência normal, coincidente com o início da exocitose de S-proteoglicano e β -D-xyloside-bound³⁵S-glicosaminoglicano (STEVENS *et al.*, 1985).

A DEC apresenta um número de efeitos bioquímicos em diferentes sistemas enzimáticos, incluindo glicólise, metabolismo do folato e acetilcolinesterase (SUBRAHMANYAM, 1987). Outros estudos também mostraram que ela interrompe o transporte de vesículas do e para o CG. Spiro *et al.* (1986) demonstraram que a DEC altera o transporte vesicular do REL para o Golgi, e deste para a MP inibindo a expressão de um proteoglicano de sulfato de condroitina associado à melanoma na superfície. Por outro lado, Bird (2000) descreveu drásticos efeitos da DEC em um estudo com neurônios cerebelares de camundongos fetais em cultura, com uma completa desorganização do CG e aparecimento de grandes vacúolos no citoplasma.

O efeito da DEC sobre o complexo de microtúbulos foi estudado por Fujimaki (1988 ; 1990). Esta droga inibiu a formação de microtúbulos e desagregou aqueles pré-formados, alterando a morfologia e proliferação de células LLC-MK₂ *in vitro*. As células que cresceram na presença desta droga estavam separadas uma das outras, e com forma arredondada.

No presente estudo, análises histopatológicas de testículos tratados com DEC apresentaram células de Leydig contendo numerosas GL mostrando evidentes fatores de esteatose. Em adição, foram observados vacúolos distribuídos nas células de Sertoli entre as células germinativas.

As análises ultraestruturais identificaram vacúolos citoplasmáticos nas células de Sertoli como um REL distendido. Resultados similares têm sido observados após o tratamento com agentes que atuam sobre microtúbulos, os quais oferecem o suporte estrutural para o desenvolvimento das células germinativas (CHAPIN; MORGAN; BUS, 1983 ; BOEKELHEIDE^a, 1987 ; BOEKELHEIDE^b, 1987 ; NAKAI; HESS, 1994). A administração de benomil ou seu metabólito, carbendazina, levou a uma desorganização dos microtúbulos nos túbulos seminíferos de ratos, evento este evidenciado por um aumento no *pool* solúvel de tubulina (CORREA; MILLER, 2001). Este aumento nos níveis de tubulina, por uma provável ligação da droga à tubulina livre e conseqüente inibição da formação de microtúbulos, deve caracterizar os danos histológicos, tais como vacuolização da célula de Sertoli e desprendimento de espermátides alongadas e espermatócitos (HESS; NAKAI, 2000).

No testículo tratado com 200mg de DEC/kg, algumas espermatogônias apresentaram características morfológicas de apoptose, como condensação da cromatina, encolhimento do citoplasma e distensão do REL, como descrito anteriormente por outros autores (KON; ENDOH, 2000). Essas alterações celulares poderiam ser explicadas por uma desorganização dos microtúbulos, os quais são responsáveis pela estabilidade dinâmica de várias funções dentro da célula. Recentemente a tubulina foi encontrada dentro do núcleo de células e em mitocôndrias. Por outro lado, eventos de ligação de tubulina são críticos na geração de apoptose (PELLEGRINI; BUDMAN, 2005).

Os macrófagos possuem sítios na superfície celular de alta afinidade para lipoproteína de baixa densidade acetilada (acetil-LDL), permitindo estudos morfológicos e bioquímicos do mecanismo de deposição de ésteres de colesteril nestas células. A questão era se os macrófagos acumulavam esses ésteres devido a uma falha na hidrólise lisossomal, ou se estas células hidrolisavam os ésteres e re-esterificam o colesterol para armazenamento no citoplasma (GOLDSTEIN *et al.*, 1979). A demonstração ultraestrutural de numerosas GL não circundadas por uma membrana limitante é uma evidência que suporta o mecanismo de hidrólise-re-esterificação (BROWN *et al.*, 1979).

Posteriormente, outros autores observaram que em macrófagos peritoneais de camundongos o ciclo de ésteres de colesteril é caracterizado por um processo de de-esterificação dos ésteres das GL através de uma esterase não-lisossomal e uma subseqüente re-esterificação

pela acil-colesterol acil-transferase (ACAT) no citoplasma (BROWN; HO; GOLDSTEIN, 1980). De acordo com Brown *et al.* (1979), os macrófagos utilizam as lipoproteínas por endocitose adsorptiva, e cada uma delas são reconhecidas por diferentes sítios na superfície celular. As lipoproteínas são entregues aos lisossomos, onde seus ésteres de colesterol são hidrolisados. No caso da acetil-LDL, em torno de 50% do colesterol liberado é excretado pela célula, e os 50% remanescentes são re-esterificados pela ACAT. Este colesterol re-esterificado acumula-se dentro de GL, ausentes de membrana limitante, no citoplasma. Quando a fonte de colesterol-lipoproteína é removida, esses ésteres de colesterol armazenados são hidrolisados e as inclusões lipídicas citoplasmáticas desaparecem.

As GL das células de Leydig tumorais em cultura também apresentam um ciclo contínuo e dinâmico, onde o colesterol livre é liberado das gotículas (de-esterificação), estando disponível para ser usado na esteroidogênese, ou como substrato para ACAT (re-esterificação) para ser armazenado (FREEMAN, 1987). O uso do colesterol livre no processo de esteroidogênese reduz o número de GL, enquanto o bloqueio deste processo leva a um acúmulo de GL com ésteres de colesterol armazenados.

Todos os hormônios esteróides são derivados do colesterol. A reação inicial da síntese de hormônios esteróides é a conversão do colesterol em pregnolona, pela enzima desmolase, nas mitocôndrias. Em seguida, a pregnolona é transportada ao REL onde é convertida em progesterona, e subseqüentemente, em testosterona (HAIDER, 2004).

Os presentes resultados mostraram que a DEC também exerce um efeito nas células de Leydig. Estas células apresentaram-se hipertrofiadas com círculos concêntricos gigantes de REL e numerosas GL espalhadas ao longo do citoplasma. Os círculos concêntricos circundando GL possivelmente poderiam estar atuando como vacúolos autofágicos, como sugerido por outros autores (DEES; GAZOULI; PAPADOPOULOS, 2001). Todas essas mudanças ultraestruturais indicam uma inibição da esteroidogênese e ausência de drenagem de colesterol livre, permitindo assim que este seja re-esterificado e armazenado em GL. Outros estudos mostraram alterações similares de células de Leydig, as quais estavam relacionadas ao declínio da secreção de testosterona após tratamento com droga (DEES; GAZOULI; PAPADOPOULOS, 2001; SANGUINETTI *et al.*, 1995). Por outro lado, o processo esteroidogênico poderia ser influenciado pelo estado de polimerização da tubulina. Esta, possivelmente, estaria envolvida na

interrupção do transporte do colesterol para as mitocôndrias, onde ocorre sua conversão em pregnolona (CLARK *et al.*, 1984). A atividade esteroidogênica diminuída tem sido sugerida como causa primária da falha da produção espermática (CICERO *et al.*, 1980 ; VAN THIEL *et al.*, 1981). Logo, as células germinativas degeneradas observadas neste estudo poderiam ser explicadas como resultado da deficiência hormonal.

Estudos prévios tentaram relacionar alterações nos níveis de testosterona com mudanças na morfologia das células de Leydig em condições naturais e experimentais. Zirkin *et al.* (1980) correlacionaram níveis aumentados de secreção de testosterona com proliferação de REL e um número diminuído de GL, como reportado previamente por outros autores (DE KRESTSER, 1967 ; NEAVES, 1978; NEAVES, 1975; NEAVES, 1973).

Outros autores estudaram os efeitos de ésteres de fitalato *in vivo* e *in vitro*. Estes produziram alterações altamente significantes na ultraestrutura de células de Leydig, tais como distensão de mitocôndrias, dilatação e vesiculação do REL, e diminuição da secreção de testosterona quando comparado aos controles. No epitélio seminífero foram encontradas células de Sertoli vacuoladas, espermatogônias em processo de necrose, espermatócitos e espermátides espalhadas no lúmen tubular. Como certos estágios da espermatogênese são dependentes dos níveis de androgênio, o estudo enfoca a relação parácrina entre má função das células de Leydig afetando diretamente a fisiologia das células de Sertoli adjacentes (JONES *et al.*, 1993).

Sanguinetti *et al.* (1995) estudando o efeito da estreptozotocina na ultraestrutura de células de Leydig de camundongos correlacionaram a atividade secretória diminuída com um aumento no número de GL, reduzido REL e círculos concêntricos gigantes de REL. Dees *et al.* (2001) demonstraram numerosas GL em células de Leydig tumorais MA-10 após o tratamento com mono-etilexil fitalato, as quais estavam relacionadas com o declínio da esteroidogênese.

De forma semelhante, os resultados obtidos no presente estudo indicam uma clara correlação da diminuição do nível de testosterona com as drásticas alterações morfológicas nas células de Leydig, após o tratamento com DEC. Por outro lado, nenhuma mudança significativa foi observada na taxa de gravidez e no número de filhotes de machos tratados com DEC acasalados com fêmeas não tratadas. Talvez este fato seja decorrência do curto período de tratamento, visto que a espermatogênese apresenta uma duração de 35 dias em camundongos.

O tratamento de camundongos com organotinas, que são substâncias amplamente utilizadas na agricultura e indústria, produziu uma significativa redução na espermatogênese e esteroidogênese, levando a um decréscimo na contagem, motilidade, viabilidade e função dos espermatozóides, quando comparado ao grupo controle. A diminuição no nível de testosterona, induzida por estas drogas, poderia estar relacionada a uma resposta diminuída das células de Leydig ao LH e/ou uma inibição direta da esteroidogênese testicular, através da ação sobre a 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HDS) e 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase (17 β -HDS), que são suas principais enzimas regulatórias. Estes resultados seriam responsáveis pelas alterações na quantidade e qualidade dos espermatozóides (SREEDHAR REDDY; PUSHPALATHA; SREENIVASULA REDDY, 2006).

Estudos realizados por Aoki e Massa (1972) e Neaves (1973) demonstraram que o aumento no número de GL encontra-se envolvido com a atividade secretória diminuída das células de Leydig. Outros autores relacionaram tais alterações com uma sensibilidade reduzida destas células às gonadotropinas (MENDIS-HANDAGAMA; KRETSER, 1992).

Estudos farmacológicos têm demonstrado que a DEC apresenta um importante papel sobre diversas vias metabólicas (SUBRAHMANYAM, 1987), podendo inclusive atuar como antiinflamatório para condições asmáticas, uma vez que ela interfere no metabolismo do ácido aracdônico (MAIZELS; DENHAM, 1992). Logo, não se pode descartar a possibilidade da ação desta droga sobre as enzimas esteroidogênicas.

Para o tratamento da filariose linfática, a dose terapêutica recomendada pela OMS é 6mg de DEC/kg durante 12 dias. De acordo com Ilondu *et al.* (2000), a DEC está quase ausente na urina, plasma e saliva após 24h da ingestão. Por outro lado, estudos toxicológicos e farmacológicos em camundongos indicaram que após 3h o composto é completamente excretado pelo rim (HARNED *et al.*, 1948). Horii e Aoki (1997) descreveram o nível plasmático de DEC em ratos após a administração de 200mg/kg, registrando valores de 30 μ g/ml após 30-60 min da injeção, decrescendo rapidamente para 1.5 μ g/ml após 4h e atingindo 0.1 μ g/ml após 8h do tratamento.

Os resultados obtidos no presente estudo confirmam e ampliam as observações anteriores. Sareen *et al.*, (1961) mostraram que a administração oral de 200mg de DEC/kg produziu infertilidade em 50% dos camundongos. Outros estudos, entretanto, descreveram nenhum efeito

na motilidade dos espermatozóides de cães tratados com 13.2mg/kg/dia durante seis meses. E em humanos, não existem dados sobre possíveis sequelas resultantes de overdose de DEC.

A fim de esclarecer o efeito *in vivo* da DEC sobre a espermatogênese de mamíferos, foram realizados os trabalhos intitulados: “Morphological changes in testis induced by diethylcarbamazine” e “Changes in mouse Leydig cells ultrastructure and testosterone secretion after diethylcarbamazine administration”, os quais são parte integrante desta dissertação.

O presente estudo mostrou que a DEC, nas doses estudadas, exerce um efeito na espermatogênese e esteroidogênese de camundongos. Os resultados apóiam a hipótese de que o alvo testicular primário da toxicidade desta droga seja provavelmente a função microtubular, entretanto não exclui a possibilidade de que ela esteja atuando diretamente sobre vias hormonais enzimáticas.

7 CONCLUSÕES

1. A análise histológica de testículos tratados com DEC revelou células de Sertoli com vacuolização, e células de Leydig hipertrofiadas e repletas de GL, algumas delas sem núcleo, caracterizando um processo de esteatose.
2. Através da microscopia eletrônica de transmissão, após o tratamento *in vivo* com DEC, foram observadas inúmeras alterações no epitélio seminífero, incluindo vacuolização de células de Sertoli, apoptose de espermatogônias, vacuolização e desorganização de mitocôndrias de espermátides. As células de Leydig apresentaram numerosas GL, corpos multivesiculares, círculos concêntricos gigantes de REL, provavelmente atuando como autofagossoma e englobando GL, mitocôndrias degeneradas, e outras células em processo degenerativo. Todas essas características mostram um efeito direto da droga sobre o testículo de camundongos afetando, assim, sua morfologia, e possivelmente sua função.
3. Houve uma queda significativa de testosterona no grupo tratado com 200mg de DEC/kg quando comparado ao grupo controle. Possivelmente, a função parácrina da célula de Leydig sobre o epitélio seminífero estaria sendo afetada, levando às inúmeras alterações observadas.
4. Não foram observadas alterações significativas nas taxas de gravidez e número de filhotes, como também no peso dos testículos e epidídimos. Acredita-se que o período de tratamento foi curto, uma vez que a completa espermatogênese de camundongos é realizada somente após 35 dias.
5. O presente estudo mostra o mecanismo de ação da DEC sobre a morfologia testicular e esteroidogênese de camundongos, possivelmente por agir via microtúbulos e/ou sobre vias enzimáticas hormonais. Apesar de não terem sido observadas alterações no índice de fertilidade dos camundongos, não se pode afirmar que esta não tenha sido afetada, dado o curto período de tratamento.

REFERÊNCIAS

ACKERMAN, S. J., *et al.* Eosinophil degranulation. An immunologic determinant in the pathogenesis of the Mazzotti reaction in human onchocerciasis. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 144, n. 10, p. 3961-3969, 1990.

ALLARD, E. K.; JOHNSON, K. J.; BOEKELHEIDE, K. Colchicine disrupt the cytoskeleton of rat testis seminiferous epithelium in a stage-dependent manner. **Biology of Reproduction**, New York, v.48, n.1, p.143-153, 1993.

AOKI, A.; MASSA, E. M. Early responses of testicular interstitial cells to stimulation by interstitial-cell-stimulating hormone. **American Journal of Anatomy**, Philadelphia, v. 134, n. 2, p. 239-262, 1972.

AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; SANTOS, A. A. S. **Bio Stat 3.0**: Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2003.

BIRD, M. M. The effects of diethylcarbamazine on the morphology and ultrastructure of foetal mouse cerebellar neurons in culture. **Journal of Electron Microscopy**, New York, v. 49, n. 5, p. 669-674, 2000.

BOEKELHEIDE, K. 2,5-Hexanedione alters microtubule assembly. I. Testicular atrophy, not nervous system toxicity, correlates with enhanced tubulin polymerization. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 88, n. 3, p. 370-382, 1987a.

BOEKELHEIDE, K. 2,5-Hexanedione alters microtubule assembly. II. Enhanced polymerization of crosslinked tubulin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 88, n. 3, p. 383-396, 1987b.

BROWN, M. S., *et al.* Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 82, n. 3, p. 597-613, 1979.

BROWN, M. S.; HO, Y. K.; GOLDSTEIN, J. L. The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 255, n. 19, p. 9344-9352, 1980.

BRYCESSON, A. D. M.; WARRELL, D. A.; POPE, H. M. Dangerous reactions to treatment of onchocerciasis with diethylcarbamazine. **British Medical Journal**, London, v. 1, p. 742-744, 1977.

CHAPIN, R. E.; MORGAN, K. T.; BUS, J. S. The morphogenesis of testicular degeneration induced in rats by orally administered 2,5-hexanedione. **Experimental and Molecular Pathology**, New York, v. 38, n. 2, p. 149-169, 1983.

CHEN, T. T. Demonstration of the macrofilaricidal action of Hetrazan, antimony and arsenic preparation in man. **Chinese Medical Journal**, Beijing, v. 83, p. 625-640, 1964.

CICERO, T. J.; BELL, R. D. Effects of ethanol and acetaldehyde on the biosynthesis of testosterone in the rodent testes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 94, n. 3, p. 814-819, 1980.

CICERO, T. J., *et al.* Ethanol and acetaldehyde directly inhibit testicular steroidogenesis. **The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics**, Baltimore, v. 213, n. 2, p. 228-233, 1980.

CLARK, M. A.; SHAY, J. W. The role of tubulin in the steroidogenic response of murine adrenal and rat Leydig cells. **Endocrinology**, Baltimore, v. 109, n. 6, p. 2261-2263, 1981.

COOKE, H. J.; SOUNDERS, P. T. K. Germ cell transplantation—a fertile field. **Nature Medicine**, New York, v. 6, n. 1, p. 16-17, 2000.

CORREA, L. M.; MILLER, M. G. Microtubule depolymerization in rat seminiferous epithelium is associated with diminished tyrosination of α -tubulin. **Biology of Reproduction**, New York, v. 64, p. 1644-1652, 2001.

COURTNEY, C. H.; NACHREINER, R.F. Effect of diethylcarbamazine on indexes of fertility in the male dog. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 37, n. 9, p. 1095-1097, 1976.

DEES, J. H.; GAZOULI, M.; PAPADOPOULOS, V. Effect of mono-ethylhexyl phthalate on MA-10 Leydig tumor cells. **Reproductive Toxicology**, Elmsford NY, v. 15, n. 2, p. 171-87, 2001.

DE KRETZER, D. M. Changes in the fine structure of the human testicular interstitial cells after treatment with human gonadotrophins. **Zeitschrift Fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, Berlin, v. 83, n. 3, p. 344-358, 1967.

DREYER, G. *et al.* A new tool to assess the adulticidal efficacy in vivo of antifilarial drugs for bancroftian filariasis. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 89, n. 2, p. 225-225, 1995.

DREYER, G.; NORÕES, J. Dietilcarbamazina no Tratamento da Filariose Bancroftiana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 229- 240, 1997.

EBERHARD, M. L. *et al.* Bancroftian filariasis: long term effects of treatment with diethylcarbamazine in a Haitian population. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 45, n. 6, p. 728-733, 1991.

EBERHARD, M. L. *et al.* Effectiveness of spaced doses of diethylcarbamazine citrate in the control of bancroftian filariasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 40, n. 2, p. 111-113, 1989.

EBERHARD, M. L.; LOWRI Jr. R. C.; LAMMIE, P. J. Persistence of microfilaremia in bancroftian filariasis after diethylcarbamazine citrate therapy. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 39, n. 2, p. 128-130, 1988.

FLORÊNCIO, M. S.; PEIXOTO, C. A. The effects of diethylcarbamazine on the ultrastructure of microfilariae of *Wuchereria bancrofti*. **Parasitology**, London, v. 126, n. 6, p. 551-554, 2003.

FLORÊNCIO, M. S.; SARAIVA, K. L. A.; PEIXOTO, C. The effects of diethylcarbamazine on ultrastructure of lung cells *in vivo*. **Tissue Cell**, Edinburgh, v. 37, n. 3, p. 241-246, 2005.

FRANCIS, H.; AWADZI, K.; OTTESEN, E. A. The Mazzotti reaction following treatment of onchocerciasis with diethylcarbamazine; clinical severity as a function of infection intensity. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 34, n. 3, p. 529-536, 1985.

FREEMAN, D. A. Regulation of the cholesterol ester cycle of cultured Leydig tumor cells. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 164, n. 2, p. 351-356, 1987.

FUJIMAKI, Y. *et al.* Diethylcarbamazine, antifilarial drug, inhibits microtubule polymerisation and disrupts preformed microtubules. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 851-856, 1990.

FUJIMAKI, Y. *et al.* DEC-inhibited development of third-stage *Brugia pahangi* *in vitro*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 74, n. 3, p. 299-300, 1988.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia**. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1999.

GIBSON, D. W. *et al.* Onchocercal dermatitis: ultrastructural studies of microfilariae and host tissues before and after treatment with diethylcarbamazine (Hetrazan). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 25, n. 1, p. 74-87, 1976.

GOLDSTEIN, J. L. *et al.* Binding site on macrophages that mediates the uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 76, n. 1, p. 333-337, 1979.

GRISWOLD, M. D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, London, v. 9, n. 4, p. 411-416, 1998.

HAIDER, S. G. Cell biology of Leydig cells in the testis. **International Review of Cytology**, New York, v. 233, p. 181-241, 2004.

HARNED, B. K. *et al.* Some toxicological and pharmacological properties of 1-diethylcarbamyl-4-methylpiperazine hydrochloride, hetrazan. **Annals of New York Academy of Science**, New York, p.141-160, 1948.

HAWKING, F. Diethylcarbamazine and new compounds for the treatment of filariasis. **Advances in Pharmacology and Chemoterapy**, New York, v. 16, p. 129-194, 1979.

HAWKING, F.; LAURIE, W. Action of hetrazan on filariasis and onchocerciasis. **Lancet**, London, v. 2, p. 146-7, 1949.

HAWKING, F.; SEWELL, P.; THURSTON, J. P. Mode of action of hetrazan in filariasis. **Lancet**, London, v. 2, p.730-731, 1948.

HENSON, P. M.; MACKENZIE, C. D.; SPECTOR, W. G. Inflammatory reactions in onchocerciasis: a report on current knowledge and recommendations for further study. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v. 57, n. 5, p. 667-682, 1979.

HESS, R. A.; NAKAI, M. Histopathology of the male reproductive system induced by the fungicide benomyl. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 15, n. 1, p. 207-224, 2000.

HEWITT, R. I. S. *et al.* Experimentaal chemotherapy of filariasis III. Effect of 1-diethylcarbamazine-4-methylpiperazine hydrochloride against naturally acquired filarial infections in cotton rats and dogs. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v. 32, p. 1341-1329, 1947.

HO, Y. K.; BROWN, M. S.; GOLSTEIN, J. L. Hydrolysis and excretion of cytoplasmic cholesteryl esters by macrophages: stimulation by high density lipoprotein and other agents. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 21, n. 4, p. 391-380, 1980.

HORII, Y.; AOKI, Y. Plasma levels of diethylcarbamazine and their effects on implanted microfilariae of *Brugia pahangi* in rats. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v.59, n. 10, p.961-963, 1997.

ILONDU, N. *et al.* Pharmacokinetics of diethylcarbamazine: production by concentration in saliva. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.23, n.4, p. 443-445, 2000.

JOHNSON, P. *et al.* The effect of diethylcarbamazine on the *in vitro* serum-mediated adherence of feline granulocytes to microfilariae of *Brugia pahangi*. **Tropical Medicine and Parasitology**, Stuttgart, v. 39, n. 4, p. 291-294, 1988.

JONES, H.B. *et al.* The influence of phthalate esters on leydig cell structure and function *in vitro* e *in vivo*. **Experimental and Molecular Pathology**, New York, v. 58, n. 3, p. 179-193, 1993.

KESSEL, J. F. *et al.* Periodic mass treatment with diethylcarbamazine for the control of filariasis in American Samoa. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v. 43, n. 6, p. 817-825, 1970.

KIMURA, E.; PENAI, L.; SPEARS, G. F. S. The efficacy of annual single-dose treatment with diethylcarbamazine citrate against diurnally subperiodic bancroftian filariasis in Samoa. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v. 63, n. 5, p. 1097-1106, 1985.

KON, Y.; ENDOH, D. Morphological study of metaphase-specific apoptosis in MRL mouse testis. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlin, v. 29, n. 5, p. 313-319, 2000.

LIU, M.; WANG, L.; ENHORNING, G. Surfactant dysfunction develops when the immunized guinea-pig is challenged with ovalbumin aerosol. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 25, n. 11, p. 1053-1060, 1995.

LIU, M. *et al.* Pulmonary surfactant given prophylactically alleviates an asthma attack in guinea pigs. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 270-275, 1996.

MAHONEY, L. E.; KESSEL, J. F. Treatment failure in filariasis treatment programmes. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v. 45, p. 35-42, 1971.

MAIZELS, R. M.; DENHAM, D. A. Diethylcarbamazine (DEC): immunopharmacological interactions of an anti-filarial drug. **Parasitology**, London, v. 105, p. 849-860, 1992.

MENDES-HANDAGAMA, S.M.L.C.; KRETSER, D.M. Heterogeneity of adult mouse leydig cells with different buoyant densities. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 13, n. 3, p.274-282, 1992.

Ministério da Saúde. Reunião da avaliação do Programa de Controle da Filariose Linfática no Brasil. **Brasília**: Centro Nacional de Epidemiologia. 2000.

NAKAI, M.; HESS, R. A. Morphological changes in the rat Sertoli cell induced by the microtubule poison carbendazim. **Tissue and Cell**, Edinburgh, v. 26, n. 6, p.917-927, 1994.

NEAVES, W. B. Changes in testicular Leydig cells and in plasma testosterone levels among seasonally breeding rock hyrax. **Biology of Reproduction**, New York, v. 8, n. 4, p. 451-466, 1973.

NEAVES, W. B. Gonadotropin-induced proliferation of endoplasmic reticulum in an androgenic tumor and its relation to elevated plasma testosterone levels. **Cancer Research**, Baltimore, v. 35, n. 10, p. 2663-2669, 1975.

NEAVES, W. B. The pattern of gonadotropin-induced changes in plasma testosterone, testicular esterified cholesterol and Leydig lipid droplets in immature mice. **Biology of Reproduction**, New York, v. 19, n. 4, p. 864-871, 1978.

OTTESEN, E. A. Description, mechanisms and control of reactions to treatment in the human filariases. **Ciba Foundation Symposium**, Amsterdam, v. 127, p. 265-283, 1987.

PARTONO, F. *et al.* The long term effects of repeated diethylcarbamazine administration with special reference to microfilaraemia and elephantiasis. **Acta Tropica**, Basel, n. 38, n. 3, p. 217-225, 1981.

PEIXOTO, C.A. Some morphological aspects of *Wuchereria bancrofti* uterus after treatment with diethylcarbamazine. **Micron**, Oxford, v.36, n. 1, p. 17-22, 2005.

PEIXOTO, C.A. *et al.* The effects of diethylcarbamazine on the ultrastructure of microfilariae of *Wuchereria bancrofti* *in vivo* e *in vitro*. **Parasitology Research**, Berlin, v.92, n. 6, p.513-517, 2004.

PELLEGRINI, F.; BUDMAN, D. R. Tubulin function, action of antitubulin drugs, and new drug development. **Cancer Investigation**, New York, v. 23, n. 3, p. 264-273, 2005.

PIESSENS, W. F.; BELDEKAS, M. Diethylcarbamazine enhances antibody-mediated cellular adherence to *Brugia malayi* microfilariae. **Nature**, London, v. 282, n. 5741, p. 845-847, 1979.

RACHOU, R. G.; LACERDA, N. B. Transmissão da filariose bancroftiana em Manaus (Amazonas). **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, Brasília, v.8, p.368-371, 1956.

RACZ, P. *et al.* Ultrastructural evidence for eosinophil – parasite adherence (EPA) reaction in human onchocercal lymphadenitis in the early period following diethylcarbamazine treatment. **Tropenmedizin und Parasitologie**, Stuttgart, v. 33, n. 4, p. 213 – 218, 1982.

RÉE, G.H. *et al.* Plasma level of diethylcarbamazine in man. **Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.71, n.6, p. 542-543, 1977.

SAKUMA, S. *et al.* Study of the distribution of the antifilarial agent diethylcarbamazine within the body using tritium labeling and whole-body autoradiography. **Japanese Journal of Parasitology**, Tokyo, v.16, p.179-187, 1967.

SALAZAR-MALLÉN, M. Treatment of intractable asthma with diethylcarbamazine citrate. **Annals of Allergy**, St. Paul, v. 23, n. 11, p. 534-537, 1971.

SALTARELLI, D. *et al.* Effects of antimicrotubular agents in cAMP production and in steroidogenic response of isolated rat Leydig cells. **Biologie Cellulaire**, Paris, v. 52, n. 3, p. 259-266, 1984.

SANGUINETTI, R. E. *et al.* Ultrastructural changes in mouse Leydig cells after streptozotocin administration. **Journal of experimental Animal science**, Jena, v. 44, n. 1, p. 71-73, 1995.

SANTIAGO-STEVENSON, D.; OLIVER-GONZÁLEZ, J.; HEWITT, R. I. Treatment of filariasis bancrofti with 1-diethylcarbamil-4-methylpiperazine hydrochloride ("Hetrazan"). **Journal of American Medicine Association**, Washington, v. 135, p. 708-712, 1947.

SARAIVA, K. L. A. *et al.* Morphological changes in the testis induced by diethylcarbamazine. **Reproductive Toxicology**, Elmsford NY, v. 22, n. 4, p. 754-759, 2006.

SAREEN, K. *et al.* Oral contraceptives. V. Anthelmintics as antifertility agents. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, New Delhi, v. 5, p. 125-135, 1961.

SARKAR, M. *et al.* The reversible antifertility effect of *Piper betle* Linn. on Swiss albino male mice. **Contraception**, Los Altos, v. 62, n. 5, p. 271-274, 2000.

SCHARDEIN, J. L.; LUCAS, J. A.; DICKERSON, C. W. Ultrastructural changes in *Litomosoides carinii* microfilariae in gerbils treated with diethylcarbamazine. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 54, n. 2, p. 351-358, 1968.

SELKIRK, M. E. *et al.* Molecular characterization of antigens of lymphatic filarial parasites. **Parasitology**, London, v. 92, Si5-S38, 1986.

SETHUMADHAVAN, K. V. P. *et al.* Clearance of microfilaremia among bancrofti carriers after diethylcarbamazine. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 67, p. 759-762, 1978.

SIM, B. K. L.; MAK, J. W.; KWA, B. H. Effects of serum from treated patients on antibody-dependent cell adherence to the infective larvae of *Brugia malayi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 32, n. 5, p. 1002-1012, 1983.

SIRIVANAKAN, S.; WRITE, G. B. Neotype designation of *Culex quinquefasciatus* of say (Diptera: Culicidae). **Proceedings of Entomology Society of Washington**, Washington, v.8, p. 360-372, 1978.

SPIRO, R. C. *et al.* Inhibition of post-translational modification and surface expression of a melanoma associated chondroitin sulfate proteoglycan by diethylcarbamazine or ammonium chloride. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 261, p. 5121-5129, 1986.

SREEDHAR REDDY, P.; PUSHPALATHA, T.; SREENIVASULA REDDY, P. Reduction of spermatogenesis in mice after fentin and fenbutatin administration. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 166, n. 1, p. 53-59, 2006.

SRINIVAS, H.V.; ANTANI, J. Diethylcarbamazine in bronchial asthma. **Annals of Allergy**, St. Paul, v. 29, n. 8, p. 418-421, 1971.

SRIVASTAVA, R.; PRASAD, B. G. The microfilaricidal effect of diethylcarbamazine. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 58, n. 10, p.1480-1486, 1970.

STEVENS, R.L. *et al.* Novel inhibition of proteoglycan synthesis and exocytosis by diethylcarbamazine in the swarm rat chondrocyte. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 260, n. 9, p. 5777-5786, 1985.

SUBRAHMANYAM, D. Antifilarials and their mode of action. **Ciba Foundation Symposium**, Amsterdam, v. 127, p. 246-264, 1987.

TAYLOR, A. E. R. Observations with the ultrapak microscope on microfilariae of *L. carinii* circulating in the liver of a cotton rat before and after the administration of hetrazan. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 54, p. 450-453, 1960.

THIRUVENGADAM, K.V. *et al.* Diethylcarbamazine citrate in bronchial asthma. **Journal of the Indian Medical Association**, Calcutta, v. 63, n. 9, p. 278-281, 1974.

VAN THIEL, D. H. *et al.* An examination of various mechanisms for ethanol-induced testicular injury: studies utilizing the isolated perfused rat testes. **Endocrinology**, Baltimore, v. 109, n. 6, p. 2009-2015, 1981.

VENKATANARAYANA, M. *et al.* Effect of repeated of diethylcarbamazine on persistent bancrofti microfilaria carriers. **Journal of Communicable Diseases**, Delhi, v. 15, n. 2, p. 141-143, 1983.

VIEIRA, J. B. F.; COELHO, G. E. Filariose: aspectos epidemiológicos e de controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 31, p. 79-83, 1998.

World Health Organization. Eliminate Filariasis: Attack Poverty. **Proceedings of the First Meeting of the Global Alliance to Eliminate Lymphatic Filariasis**. Geneva, 2000.

World Health Organization. Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariases. **Annual Report on Lymphatic Filariases**. Geneva, p. 113, 2002.

World Health Organization. Lymphatic filariases: the disease and its control. **Fifth report of the WHO Expert Committee on Filariases**. Geneva, 1992.

ZAHNER, H. *et al.* Effect of diethylcarbamazine on the microfilariae of *Litomosoides carinii* in *Mastomys natalensis*: dynamic of cell adhesion, immobilization and elimination of microfilariae. **Tropenmedizin und Parasitologie**, Stuttgart, v. 29, n. 1, p. 15-26, 1978.

ZIRKIN, B. R. Spermatogenesis: its regulation by testosterone and FSH. **Seminars in cell & developmental biology**, London, v. 9, n. 4, p. 417-421, 1998.

ZIRKIN, B. R. *et al.* Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testis perfused *in vitro*: correlation with Leydig cell ultrastructure. **Endocrinology**, Baltimore, v. 107, n. 6, p. 1867-1874, 1980.

APÊNDICE A

Morphological changes in the testis induced by diethylcarbamazine

Karina Lidianne Alcântara Saraiva^a, Valdemiro Amaro Silva Junior^b,
Elisângela Santos Ferreira Dias^a, Christina Alves Peixoto^{a,*}

^a Departamento de Biologia Celular e Ultraestrutura, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ),
e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

^b Departamento de Histologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil

Received 17 April 2006; received in revised form 2 June 2006; accepted 18 July 2006

Available online 28 July 2006

Abstract

Diethylcarbamazine (DEC) had been proved to be highly effective against lymphatic filariasis, however its effect on vertebrate cells remains uncertain. After 12 days treatment with DEC, most of the Leydig cells were hypertrophied with several lipid droplets, and others had no nucleus and presented characteristic steatosis features. Vacuolization of Sertoli cells was also noted. Ultrastructural analyses of DEC-treated testes revealed spermatogonies with morphological characteristics of apoptosis, as shrinkage of cytoplasm and increased chromosomal density. In addition, Leydig cells showed numerous lipid droplets scattered throughout the cytoplasm, multivesicular bodies and giant whorl-like smooth endoplasmic reticulum. Several spermatids presented vacuolated mitochondria, which were disorganized in relation to the microtubular axis of the flagellae. These results indicate that DEC probably affects the microtubular function, however the present data does not exclude the possibility that DEC also can act directly on enzymatic hormonal pathways.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Male reproductive toxicology; Diethylcarbamazine; Histopathology; Ultrastructure; Testis; Spermatogenesis

1. Introduction

Lymphatic filariasis, a mosquito-borne parasitic disease, is endemic in more than 80 countries with approximately 120 million people infected and over a billion people at risk [1]. The mainstay of filariasis control is chemotherapy. Diethylcarbamazine (DEC), the most widely used drug, had been proved to be highly effective, but its pharmacological mechanism of action remains uncertain.

Several studies have been done about mechanism of action, pharmacokinetics, tolerability and efficacy of DEC [2–5], and some of them focused on the *in vitro* effect on filarial worms. Although previous studies showed that DEC had no effect on filarial parasites *in vitro* [6–9], recently other authors described that DEC promotes severe cellular damage on *Wuchereria bancrofti* *in vitro* and *in vivo* [10–12].

The effect of DEC on vertebrate cells has also been indicated. It has a number of direct biochemical effects

on a wide range of different enzyme systems, including glycolysis, folate metabolism and acetylcholinesterase [13], and on intracellular transport between the endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus and the plasma membrane [14].

Some clinical reports have reported favorable results with the use of DEC in patients with bronchial asthma showing that DEC was effective in terminating acute attacks of bronchial asthma [15–19]. Florêncio et al. [20] demonstrated by ultrastructural analysis an enhancement of surfactant synthesis and secretion after DEC treatment, in which outcome is the alveolar surfaces stability, probably related to the clinical improvement of asthma symptoms.

According to Fujimaki et al. [21], DEC inhibited the proliferation of LLC-MK₂ cells, which turn into round in shape, indicating a possible interference with microtubules function. These authors also showed that DEC promoted the inhibition of microtubules assembly and induced the disassembly of the preformed ones *in vitro* [22]. It is well known that dynamic changes in the cytoskeleton are present during the spermatogenesis and since until now there were no available data about DEC action on this issue.

* Corresponding author. Tel.: +55 81 21012557; fax: +55 81 34532449.
E-mail address: cpeixoto@cpqam.fiocruz.br (C.A. Peixoto).

APÊNDICE B

Running title: Changes in Leydig cells induced by DEC

**CHANGES IN MOUSE LEYDIG CELLS ULTRASTRUCTURE AND
TESTOSTERONE SECRETION AFTER DIETHYLCARBAMAZINE
ADMINISTRATION**

^aKARINA LIDIANNE ALCÂNTARA SARAIVA, ^bVALDEMIRO AMARO
DA SILVA JUNIOR, ^cDILÊNIA DE OLIVEIRA CIPRIANO TORRES,
^aMARIANA ARAGÃO MATOS DONATO, ^aNILTON GIL PERES, ^dJOSÉ
ROBERTO BOTELHO DE SOUZA AND ^{a,*}CHRISTINA ALVES
PEIXOTO

^aDepartamento de Biologia Celular e Ultraestrutura, Centro de Pesquisas
Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), e Laboratório de Imunopatologia Keizo
Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

^bDepartamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal
Rural de Pernambuco, Recife, Brasil. ^cLaboratório de Análises Clínicas do
Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Universidade de Pernambuco, Recife,
Brasil. ^dDepartamento de Zoologia, Centro de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

*Mailing adress: Dr^a. Christina A. Peixoto, Departamento Biologia Celular e
Ultraestrutura, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av.
Moraes Rego s/n, Recife, Brasil. CEP 50670-420. Fax number: (55) 81
21012516. Email: cpeixoto@cpqam.fiocruz.br.

ABSTRACT

Diethylcarbamazine (DEC) has been proven to be highly effective against lymphatic filariasis, although its effect on vertebrate cells remains uncertain. Mice Leydig cells after treatment with 200mg/kg of DEC for 12 days showed numerous lipid droplets, degenerated mitochondria, residual bodies and several giant whorl-like smooth endoplasmic reticulum, some of them encircling large lipids droplets. Treatment with lower dosages showed similar alterations on Leydig cells and the morphological effects decreased directly proportional to the drug concentration. Serum testosterone levels were significantly lower only in 200mg/kg DEC-treated group when compared to the controls. However, no significant changes were observed in the pregnancy rates and offspring number of DEC-treated male-mated female mice in any doses studied. The results obtained in the present study are consistent with the hypothesis that DEC has some effects on mice Leydig cells, although they were not sufficient enough to interfere with the rodent fertility.

Keywords: Diethylcarbamazine; Leydig Cells; Steroidogenesis; Ultrastructure.

INTRODUCTION

Diethylcarbamazine citrate (DEC) is a piperazine derivative recognized as highly effective against filarial parasites. Despite its widespread use with million of doses administered to endemic regions, its mechanism of action remains basically unknown (Maizels, Denham, 1992). Proposals have been done, but none resulted in a conclusive delineation of the mechanism of action of the drug.

Several studies have analyzed the mechanism of action, pharmacokinetics, tolerability and efficacy of DEC (Norões et al., 1997; Dreyer et al., 1998; Shenoy et al., 2002; McGarry et al., 2005), and some of them focused on the *in vitro* effect on filarial worm. These authors suggested by optical analyses that DEC does not have a direct effect on filarial parasites *in vitro* since exposure to high concentrations leaves them unharmed (Hawking et al., 1948; Hawking, Laurie, 1949; Hawking et al., 1950; Johnson et al., 1988). However, other authors showed by ultrastructural studies that DEC causes severe damage of microfilarial organelles including lysis and apoptosis (Peixoto et al., 2003). Similar results were also observed on blood microfilariae after *in vivo* treatment with DEC (Alves et al., 2005).

This filaricidal drug has important actions on a variety of mammalian cells, including changes on different enzyme systems (Subrahmanyam, 1987), and on intracellular transport (Stevens, 1985).

Fujimaki et al. (1988) demonstrated that DEC interrupts the proliferation of LLC-MK₂ cells, which turn into round in shape, indicating a possible interference with microtubules function. In subsequent studies these authors showed that DEC promotes inhibition of microtubules assembly and also induces the disassembly of the preformed ones *in vitro* (Fujimaki et al., 1990). It is well known that anti-microtubular agents affects the cytoskeleton dynamic present during the spermatogenesis, however until now little data is available about DEC action on this issue.

Sareen et al. (1961) related that oral administration of DEC 200mg/kg produced infertility in 50 per cent of mice. Conversely, other reports described no effects on sperm motility of dogs treated for 6 months at the rate of 13.2 mg/kg/day (Courtney, Nachreiner, 1976).

Recently, Saraiva et al. (2006) described significant damage in mouse testis after treatment with 200mg/kg of DEC including vacuolization of Sertoli cells and hypertrophied Leydig cells, which showed numerous lipid droplets scattered throughout the cytoplasm, multivesicular bodies and giant whorl-like smooth endoplasmic reticulum. All these ultrastructural changes indicate an inhibition of the steroidogenesis and no longer drain off free cholesterol, thus allowing the free cholesterol to be re-esterified and stored in lipid droplets. However, those results are related to DEC toxic reproductive sequelae, which could overcome from overdose.

The present work describes the effects of different concentrations of DEC on mouse Leydig cells and testosterone secretion in order to contribute to a better knowledge about its action on the steroidogenesis.

MATERIAL AND METHODS

Experimental design

Twenty-five adult Swiss mice with 45 days old and weighting 27-30g were used in all experiments. Mice were examined for health status and acclimated to the laboratory environment at 25°C and 12h light : 12h dark photoperiod. The animals were housed in metal cages and fed a standard laboratory diet. Experimental groups composed by five animals each received the following doses: 25, 50, 100 and 200mg/kg body weight of DEC (Sigma Company, St Louis, MO) for 12 days per os in aqueous solution by stomach tube. The control group also composed by five animals received only pure water using the same procedure described above for 12 days (Florêncio et al., 2005). All experiments were carried out according to ethical guidelines (P.0169-03/CEUA-FIOCRUZ).

Body weights were recorded every day. After treatment with DEC the experimental and control animals were anesthetized before the blood collection by cardiac puncture without anticoagulant. Serum was separated and stored at -70°C for enzyme immunoassays of testosterone. Testes and epididymis were quickly dissected and weighted.

Electron transmission microscopy

The fragments of testis were fixed for 2hr in a solution containing 2.5% glutaraldehyde and 4% formaldehyde in 0.1M cacodylated buffer. After

fixation, the samples were washed twice in the same buffer, and then they were post-fixed in a solution containing 1% osmium tetroxide, 2 mM CaCl₂ and 0.8% potassium ferricyanide in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, dehydrated in acetone, and embedded in Epon 812 resin (Sigma Company, St Louis, MO). Polymerization was done at 60°C for 2 days. Ultrathin sections were collected on 300-mesh copper grids, counterstained with uranyl acetate and lead citrate, and examined with a ZEISS EM 109 transmission electron microscope.

Hormone assays

Serum concentration of testosterone was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described in the instructions provided by manufacturer's kits (Diagnostics Biochem Canada Inc), which presents 0.022ng/ml of sensitivity, and 100% of specificity.

Study of male fertility

For the study of fertility and general reproductive performance, an experimental group composed by 10 male mice treated with 200mg/Kg of DEC for 12 days, was mated 1:2 with untreated healthy female for 5 days. The females were in proestrous determined by a vaginal smear method. The presence of vaginal mucous plug was taken as day 0 of gestation for the mated females and considered as impregnated female mice. The number of

pregnant females and litter size was noted in the control and DEC-treated groups.

Statistics analysis

Data were analyzed with one-way ANOVA, followed by post-Hoc Tukey test using BioEstat (v.3.0) (Ayres et al., 2003).

RESULTS

Leydig cells in control group showed morphological characteristics as areas of cytoplasm rich in anastomosing tubular and whorled endoplasmic reticulum. Other areas contained lipid droplets, and mitochondria with tubular cristae (Figures 1, 2).

As described previously by Saraiva et al. (2006), Leydig cells after treatment with 200 mg/kg of DEC showed the following features: 1- numerous lipid droplets, some of them showing hydrolysis at edges and others exhibiting fusion, 2- residual bodies, 3- several giant whorl-like smooth endoplasmic reticulum, some of them encircling large lipids droplets (Figures 3-6). Also some cells showed picnotic nucleus with condensed perinuclear chromatin and cytoplasm fulfilled with lipid droplets and degenerated mitochondria, indicating a steatosis process (data not shown). In relation to DEC lower dosages, the morphological effects on Leydig cells decreased directly proportional to the drug concentration (Figures 7-12).

Serum testosterone level decreased significantly in 200mg/kg DEC-treated group when compared to the controls (ANOVA, $p < 0.05$) (Figure 13). DEC-treated animals with 50 and 100 mg/kg had proportionally low levels of serum testosterone, however, no statistical difference were achieved when compared with the untreated animals.

Although the evident changes in the testosterone levels, no changes were observed in the pregnancy rates and offspring number of DEC-treated male-mated female mice in any doses studied. Similarly, no statistically significant differences in body, absolute testes and epididymis weights were noted in any DEC-treated groups compared to the control group (Table 1).

DISCUSSION

In mouse peritoneal macrophages the cholesterol ester cycle is characterized by the de-esterification of the cholesteryl esters in the lipid droplets by a nonlysosomal esterase and a subsequent re-esterification by acyl-cholesterol acyl transferase (ACAT) (Brown et al., 1980). Lipid droplets of cultured Leydig tumor cells also presents a continuous and dynamic cycle, where the free cholesterol is released from the lipid droplets (de-esterification), being available for use in steroidogenesis, or as a substrate for ACAT (re-esterification) to be stored (Freeman, 1987). The use of free cholesterol in the process of steroidogenesis draws off substrate, therefore reducing the number of lipid droplets, whereas the blocking of this process would build up lipid droplets as cholesteryl ester storage.

Our study demonstrated that 200mg/kg of DEC exerts a striking effect on Leydig cells. These cells were hypertrophied showing giant whorl-like smooth endoplasmic reticulum and numerous lipid droplets scattered throughout the cytoplasm. All these ultrastructural changes indicate an inhibition of the steroidogenesis by a probably reduced utilization of cholesterol. However, lower dosages of DEC produced little morphological alteration on Leydig cells.

A number of previous reports have attempted to relate changes in testosterone levels to changes in Leydig cell morphology under natural or

experimental conditions. Zirkin et al. (1980) correlated increased levels of testosterone secretion with proliferation of smooth endoplasmic reticulum (sER) and a diminished number of lipid droplets, as reported previously by other authors (DeKrestser, 1967; Neaves, 1973; Neaves, 1975; Neaves, 1978).

On the other hand, Sanguinetti et al. (1995) studying the effect of streptozotocin on the ultrastructure of mouse Leydig cells correlated a declined secretory activity with an increased number of lipid droplets, reduced sER and giant whorl-like smooth endoplasmic reticulum. Similarly, Dees et al. (2001) reported numerous lipid droplets in MA-10 Leydig tumor cells after treatment with mono-ethylhexyl phthalate, which were related to a declined steroidogenesis.

In the present study, the decrease of testosterone level after treatment with 200mg/kg DEC for 12 days is correspondent to the noticeable changes in the Leydig cells. Conversely, no significant changes were observed in the pregnancy rates and offspring number of DEC-treated male-mated female mice, perhaps this fact is due to the short assay period, since the complete spermatogenesis in mice is accomplished only after 35 days.

For lymphatic filariasis treatment, the therapeutic dose regimen recommended by OMS is 6mg/kg for 12 days. In human, little is known about DEC toxic sequelae, which can result from overdose. Horii and Aoki (1997) described the plasma level of 200mg/kg of DEC in rats by using a gas-liquid

chromatograph equipped with a flame ionization detector, registering values of 30µg/ml at 30 to 60 min after injection, decreasing rapidly to 1.5µg/ml after 4 hr. This study indicated that in rats the oral administration of 200mg/Kg of DEC presented a mean elimination of half-life of ~1,5 hours. On the other hand, in humans, after oral administration of 150 mg of DEC, the plasma concentration achieves values of 0.5 µg/ml at 147 min and a half-life of 14.63 hours (Bolla et al., 2002). Since the clearance of this compound is higher in rodents than humans, in the present study we utilized a higher dose of DEC as described elsewhere (Horii, Aoki, 1997).

According to Fujimaki et al. (1988) DEC inhibited the proliferation of LLC-MK₂ cells, which turn into round in shape, indicating a possible interference with microtubules function. These authors also showed that DEC promoted the inhibition of microtubules assembly and induced the disassembly of the preformed ones *in vitro* (1990). Recently, Saraiva et al. (2006) studying the effect of DEC on mice testes described important swollen endoplasmic reticulum observed as vacuolization of Sertoli cells. Similar results have also been shown to occur following treatment with microtubule disrupting agents (Chapin et al., 1983; Boekelheide, 1987a; Boekelheide, 1987b; Nakai, Hess, 1994). These cellular alterations could be explained by a microtubular disorganization, which is responsible for the dynamic stability of several functions inside the cell. Besides, some studies have demonstrated that

the steroidogenic process could be influenced by the state of tubulin polymerization inside the Leydig cells (Clark, Shay, 1981; Saltarelli, et al., 1984).

Decreased steroidogenic activity has been suggested as the primary cause of spermatogenic production failure (Cicero, Bell, 1980; Cicero et al., 1980; Van Thiel, 1981). Therefore, the presence of degenerated germ cells in mice testis after DEC treatment as stated by Saraiva et al. (2006) could also be explained as a result of hormonal deficiency.

DEC has a number of direct biochemical effects on a wide range of different enzyme systems, including glycolysis, folate metabolism and acetylcholinesterase (Subrahmanyam, 1987), and on intracellular transport between the endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus and the plasma membrane (Stevens et al., 1985). Pharmacological studies also have pointed out that DEC has an important antiinflammatory role since it interferes with arachidonic acid metabolism (Maizels, Denham, 1992). These findings indicated that DEC interferes with important enzymatic pathways, and therefore we cannot exclude the possibility that DEC also can act directly on enzymatic hormonal pathways.

In conclusion, the results obtained in the present study are consistent with the hypothesis that, although some morphological alterations of Leydig cells were observed, DEC has no noticeable effect on male mice fertility.

Acknowledgements: This work has been supported by Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

Alves, L.C., Brayner, F.A., Silva, L.F., Peixoto, C.A., 2005. The ultrastructure of infective larvae (L3) of *Wuchereria bancrofti* after treatment with diethylcarbamazine. *Micron* 36, 67--72.

Ayres, M., Ayres Junior, M., Santos, A.A.S., 2003. *Bio Estat 3.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências Biológicas e Médicas*. Sociedade Civil Mamirauá, Brazil, Belém.

Boekelheide, K., 1987a. 2,5-Hexanedione alters microtubule assembly. I. Testicular atrophy, not nervous system toxicity, correlates with enhanced tubulin polymerization. *Toxicology and applied pharmacology* 88, 370--382.

Boekelheide, K., 1987b. 2,5-Hexanedione alters microtubule assembly. II. Enhanced polymerization of crosslinked tubulin. *Toxicology and applied pharmacology* 88, 383--396.

Bolla, S., Boinpally, R.R., Poondru, S., Devaraj, R., Jasti, B.R., 2002. Pharmacokinetics of diethylcarbamazine after single oral dose at two different times of day in human subjects. *British journal of clinical pharmacology* 42, 327--331.

Brown, M.S., Ho, Y.K., Goldstein, J.L., 1980. The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. *Journal of biological chemistry* 255, 9344--9352.

Chapin, R.E., Morgan, K.T., Bus, J.S., 1983. The morphogenesis of testicular degeneration induced in rats by orally administered 2,5-hexanedione. *Experimental and molecular pathology* 38,149--169.

Cicero, T.J., Bell, R.D., 1980. Effects of ethanol and acetaldehyde on the biosynthesis of testosterone in the rodent testes. *Biochemical and biophysical research communications* 94, 814--819.

Cicero, T.J., Bell, R.D., Meyer, E.R., Badger, T.M., 1980. Ethanol and acetaldehyde directly inhibit testicular steroidogenesis. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 213, 228--233.

Clark, M.A., Shay, J.W., 1981. The role of tubulin in the steroidogenic response of murine adrenal and rat Leydig cells. *Journal of Endocrinology* 109, 2261--2263.

Courtney, C.H., Nachreiner, R.F., 1976. Effect of diethylcarbamazine on indexes of fertility in the male dog. *American journal of veterinary research* 37, 1095--1097.

Dees, J.H., Gazouli, M., Papadopoulos, V., 2001. Effect of mono-ethylhexyl phthalate on MA-10 Leydig tumor cells. *Reproductive Toxicology* 15, 171--187.

De Kretser, D.M., 1967. Changes in the fine structure of the human testicular interstitial cells after treatment with human gonadotrophins. *Zeitschrift für zellforschung und mikroskopische anatomie* 83, 344--358.

Dreyer, G., Addiss, D., Santos, A., Figueredo-Silva, J., Noroes, J., 1998. Direct assessment in vivo of the efficacy of combined single-dose ivermectin and diethylcarbamazine against adult *Wuchereria bancrofti*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 92, 219--222.

Florencio, M.S., Saraiva, K.L., Peixoto, C.A., 2005. The effects of diethylcarbamazine on the ultrastructure of lung cells in vivo. *Tissue Cell* 37, 241--246.

Freeman, D.A., 1987. Regulation of the cholesterol ester cycle of cultured Leydig tumor cells. *European journal of biochemistry* 164, 351--356.

Fujimaki, Y., Shimada, S., Kimura, E., Aoki, Y., 1988. DEC-inhibited development of third-stage *Brugia pahangi* in vitro. *Parasitology Research* 74, 299--300.

Fujimaki, Y., Ehara, M., Kimura, E., Shimida, M., Aoki, Y., 1990. Diethylcarbamazine, antifilarial drug, inhibits microtubule polymerization and disrupts preformed microtubules. *Biochemical pharmacology* 39, 851--856.

Hawking, F., Sewell, P., Thurston, J.P., 1948. Mode of action of hetrazan in filariasis. *Lancet* (ii) 730--731.

Hawking, F., Laurie, W., 1949. Action of hetrazan on filariasis and onchocerciasis. *Lancet* 2, 146--147.

- Hawking, F., Sewell, P., Thurston, J.P., 1950. The mode of action of hetrazan on filarial worms. *British journal of pharmacology* 5, 217--238.
- Horii, Y., Aoki, Y., 1997. Plasma levels of diethylcarbamazine and their effects on implanted microfilariae of *Brugia pahangi* in rats. *Journal of veterinary medical science* 59, 961--963.
- Johnson, P., Mackenzie, C.D., Denham, D.A., Suswillo, R.R., 1988. The effect of diethylcarbamazine on the *in vitro* serum-mediated adherence of feline granulocytes to microfilarie of *Brugia pahangi*. *Tropical medicine and parasitology* 39, 291--294.
- Maizels, R.M., Denham, D.A., 1992. Diethylcarbamazine (DEC): Immunopharmacological interactions of anti-filarial drug. *Parasitology* 105, S49--S60.
- McGarry, H.F., Plant, L.D., Taylor, M.J., 2005. Diethylcarbamazine activity against *Brugia malayi* microfilariae is dependent on inducible nitric-oxide synthase and the cyclooxygenase pathway. *Filaria Journal* 4, 4.
- Nakai, M., Hess, R.A., 1994. Morphological changes in the rat Sertoli cell induced by the microtubule poison carbendazim. *Tissue Cell* 26, 917--927.
- Neaves, W.B., 1973. Changes in testicular Leydig cells and in plasma testosterone levels among seasonally breeding rock hyrax. *Biology of reproduction* 8, 451--466.

Neaves, W.B., 1975. Gonadotropin-induced proliferation of endoplasmic reticulum in an androgenic tumor and its relation to elevated plasma testosterone levels. *Cancer Research* 35, 2663--2669.

Neaves, W.B., 1978. The pattern of gonadotropin-induced changes in plasma testosterone, testicular esterified cholesterol and Leydig lipid droplets in immature mice. *Biology of Reproduction* 19, 864--871.

Norões, J., Dreyer, G., Santos, A., Mendes, V.G., Medeiros, Z., Addiss, D., 1997. Assessment of the efficacy of diethylcarbamazine on adult *Wuchereria bancrofti* *in vivo*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 91, 78--81.

Peixoto, C.A., Alves, L.C., Brayner, F.A., Florêncio, M.S., 2003. Diethylcarbamazine induces loss of microfilarial sheath of *Wuchereria bancrofti*. *Micron* 34, 381--385.

Saltarelli, D., De la Llosa-Hermier, M.P., Tertrin-Clary, C., Hermier, C., 1984. Effects of antimicrotubular agents in cAMP production and in steroidogenic response of isolated rat Leydig cells. *Biology of the cell* 52, 259--266.

Sanguinetti, R.E., Ogawa, K., Kurohmaru, M., Hayashi, Y., 1995. Ultrastructural changes in mouse Leydig cells after streptozotocin administration. *Experimental animals* 44, 71--73.

Saraiva, K.L.A., Silva Junior, V.A., Dias, E.S.F., Peixoto, C.A., 2006. Morphological changes in the testis induced by diethylcarbamazine. *Reproductive Toxicology* 22, 754--759.

Sareen, K., Misra, N., Varma, D.R., Amma, M.K., Gujral, M.L., 1961. Oral contraceptives. V. Anthelmintics as antifertility agents. *Indian journal of physiology and pharmacology* 5, 125--135.

Shenoy, R.K., Suma, T.K., John, A., Arun, S.R., Kumaraswami, V., Fleckenstein, L.L., Na-BangChang, K., 2002. The pharmacokinetics, safety and tolerability of the co-administration of diethylcarbamazine and albendazole. *Annals of tropical medicine and parasitology* 96, 603--614.

Stevens, R.L., Parsons, W.G., Austen, K.F., Hein, A., Caulfield, J.P., 1985. Novel inhibition of proteoglycan synthesis and exocytosis by diethylcarbamazine in the swarm rat chondrocyte. *Journal of biological chemistry* 260, 5777--5786.

Subrahmanyam, D., 1987. Antifilarials and their mode of action. *Filariasis, Ciba Symposium* 127, 246--264.

Van Thiel, D.H., Cobb, C.F., Herman, G.B., Perez, H.A., Estes, L., Gavalier, J.S., 1981. An examination of various mechanisms for ethanol-induced testicular injury: studies utilizing the isolated perfused rat testes. *Endocrinology* 109, 2009--2015.

Zirkin, B.R., Ewing, L.L., Kromann, N., Cochran, R.C., 1980. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testis perfused *in vitro*: correlation with Leydig cell ultrastructure. *Endocrinology* 107, 1867--1874.

Legend to figures:

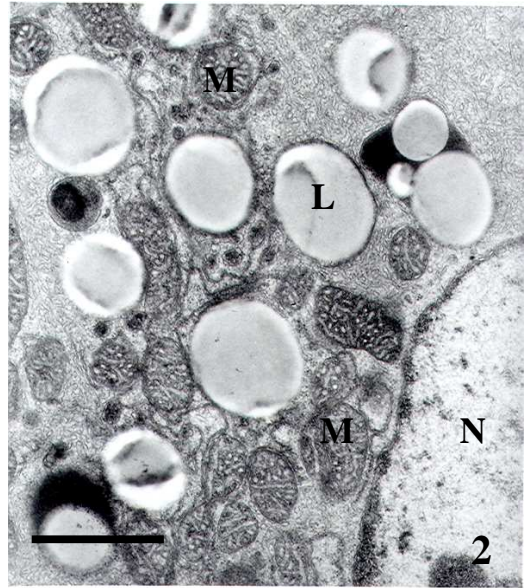
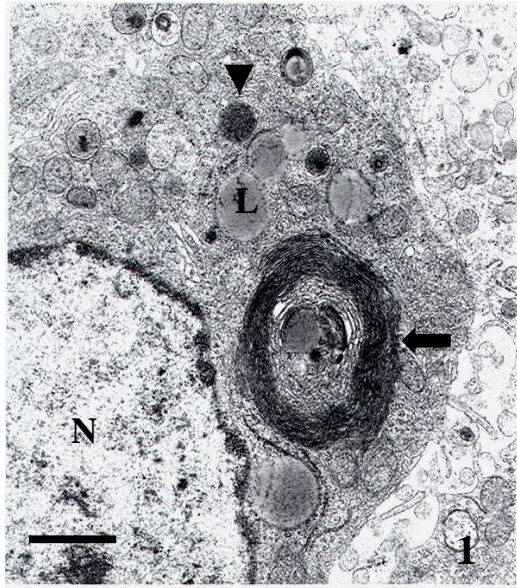
Figures 1-2. Untreated Leydig cells showing whorled endoplasmic reticulum (arrow), lipid droplets (L), scattered lysosomes (arrowhead), several mitochondria with tubular cristae (M), and nucleus (N). Bars, 1 μ m.

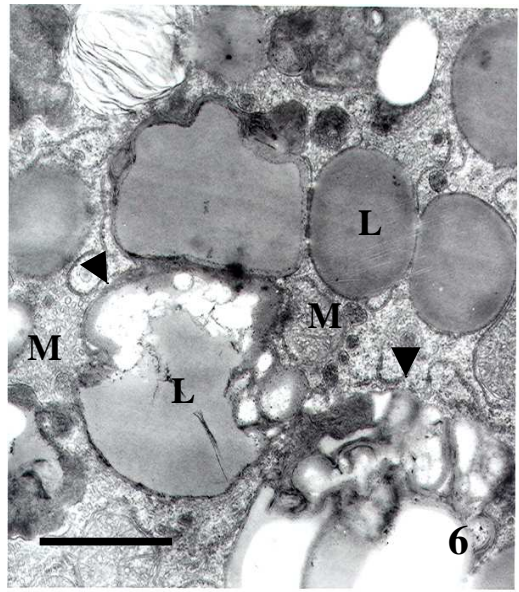
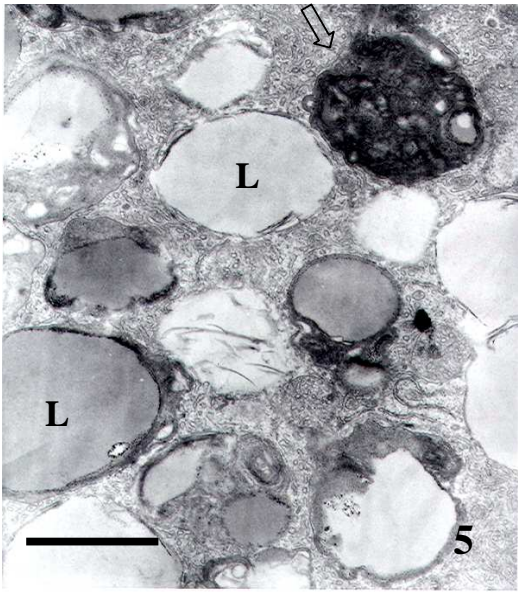
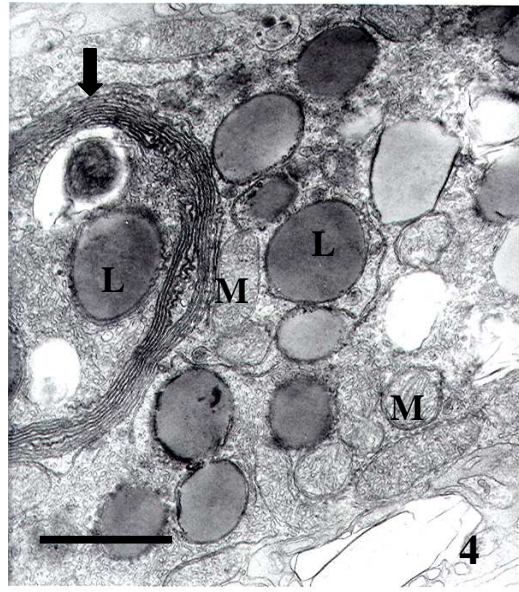
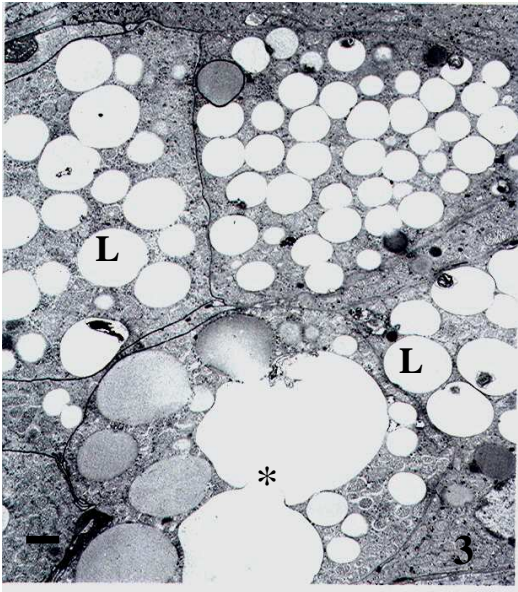
Figures 3-6 – 200mg/kg DEC-treated Leydig cells showing several lipid droplets (L), some of them are showing hydrolysis at edges (arrowheads) and others exhibiting fusion (asterisk), giant whorl-like smooth endoplasmic reticulum encircling large lipids droplets (arrow), residual body (open arrow) and degenerated mitochondria (M). Bars, 1 μ m.

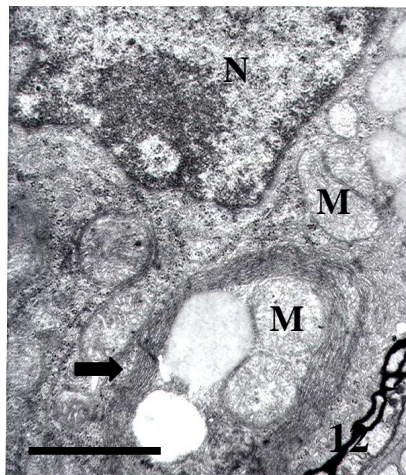
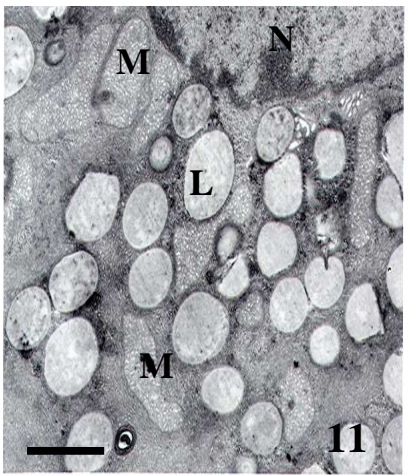
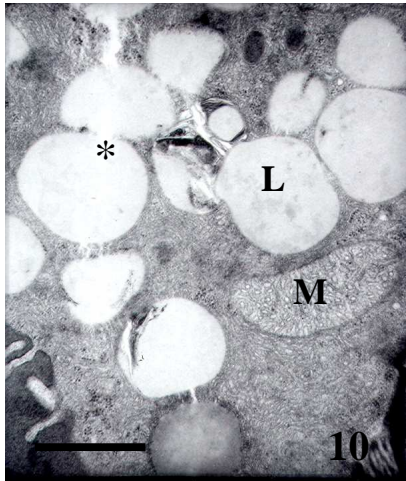
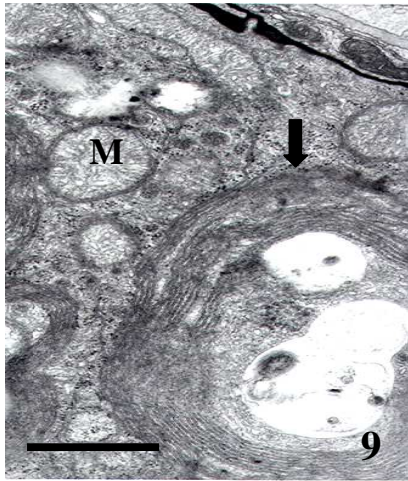
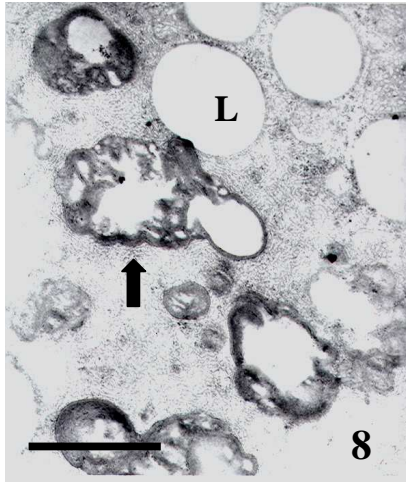
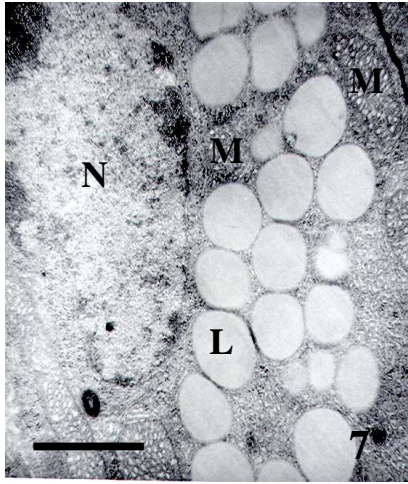
Figures 7-12. (7-8) 25mg/kg DEC-treated Leydig cells showing numerous lipid droplets within the cytoplasm (L), some of them exhibiting hydrolysis (arrow). Bar, 0,5 μ m; Bar, 1 μ m. (9-10) 50mg/kg DEC-treated Leydig cells with giant whorl-like smooth endoplasmic reticulum (arrow), fusion of lipid droplets (asterisk) and degenerated mitochondria (M). Bar, 1 μ m; Bar, 0,5 μ m. (11-12) 100mg/kg DEC-treated Leydig cells presenting numerous lipid droplets (L), giant whorl-like smooth endoplasmic reticulum encircling lipids droplets (arrow) and degenerated mitochondriae (M). Bars, 1 μ m.

Table 1. Body and organ weights and male fertility of control and experimental animals

<i>Parameter</i>	<i>Control</i>	<i>Treated (DEC 200mg/kg)</i>
Body weight (g)	38.5 ± 1.96	39.1 ± 1.78
Testis (mg)	144 ± 19.93	129.7 ± 10.34
Epididymis (mg)	59.6 ± 14.47	68.9 ± 10.9
Male fertility	18.7 ± 5.12	18.4 ± 5.35







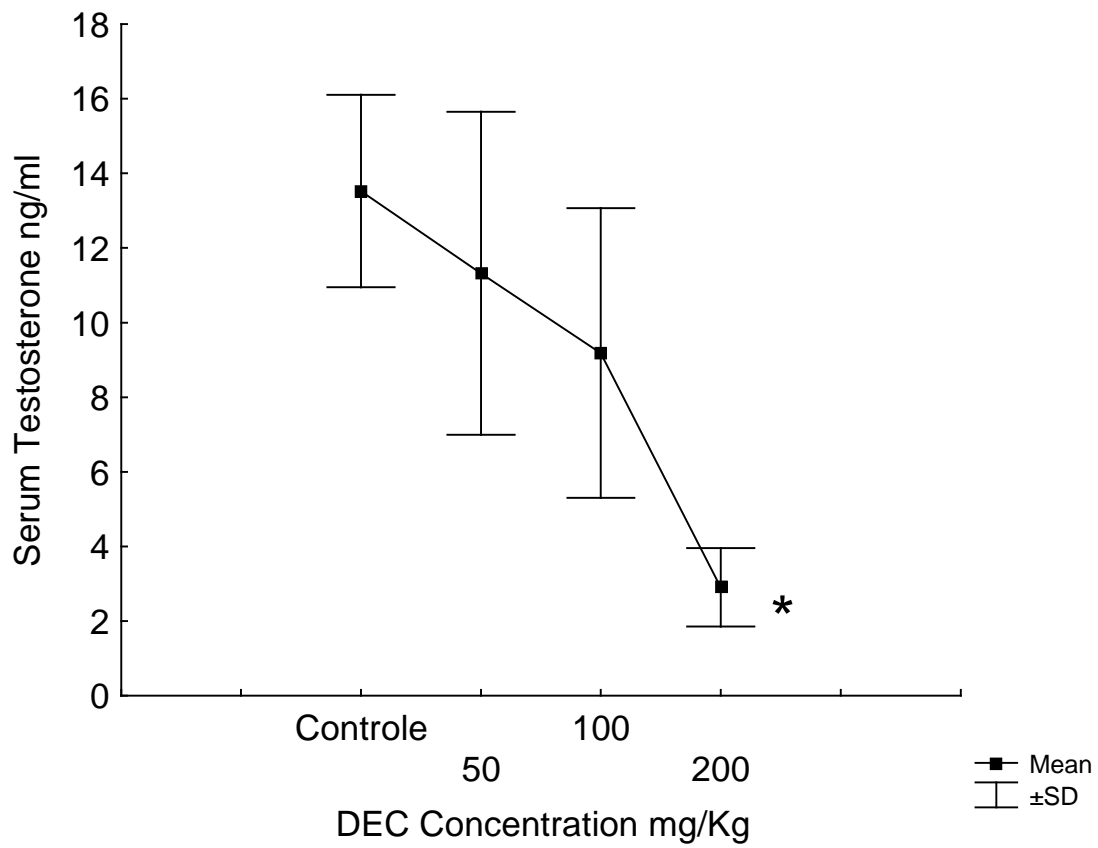


Figure 13 - Effect of DEC treatment on mice serum testosterone. *Significant difference between DEC 200mg/kg and control samples, $p < 0.05$.

Table 1. Body and organ weights and male fertility of control and experimental animals

<i>Parameter</i>	<i>Control</i>	<i>Treated (DEC 200mg/kg)</i>
Body weight (g)	38.5 ± 1.96	39.1 ± 1.78
Testis (mg)	144 ± 19.93	129.7 ± 10.34
Epididymis (mg)	59.6 ± 14.47	68.9 ± 10.9
Male fertility	18.7 ± 5.12	18.4 ± 5.35

ANEXO A



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CPqAM

Título: "Caracterização do efeito da dietilcarbamazina (DEC) sobre a espermatogênese de camundongos"

Pesquisador responsável: Karina Lidiane Alcântara Saraiva

Instituição onde se realizará o projeto: CPqAM/ FIOCRUZ

Data de apresentação ao CEP: 28/01/2006

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 75/05

CAAE: 0774.0.095.000-05

PARECER

O Comitê avaliou e considera que o Projeto em questão não envolve procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, resolução CNS 196/96 e complementares.

Recife, 13 de fevereiro de 2006

Ana Maria dos Santos

Dr.^a Ana Maria Aguiar dos Santos
Médica
Coordenação
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

ANEXO B



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o Programa nº **P.0169-03**, intitulado “Análise Ultraestrutural de células de mamíferos após tratamento com dietilcarbamazina” sob a responsabilidade da **Dra. Christina Alves Peixoto - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Campus UFPE - Pernambuco**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ)** em reunião de 19/12/05. Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade 03 de janeiro de 2010.

Rio de Janeiro, 03 de janeiro de 2006.



Dr. Hugo Caire C. Faria Neto
Coordenador da CEUA-FIOCRUZ