

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FABÍOLA NIHI

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DOS ANTIVIRAIS ACICLOVIR E
GANCICLOVIR SOBRE O DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO DE RATOS
MACHOS EXPOSTOS *IN UTERO*

CURITIBA

2012

FABÍOLA NIHI

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DOS ANTIVIRAIS ACICLOVIR E
GANCICLOVIR SOBRE O DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO DE RATOS
MACHOS EXPOSTOS *IN UTERO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, área de concentração em Fisiologia Endócrina e do Metabolismo, Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade

CURITIBA

2012

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Nihi, Fabíola

Investigação dos efeitos antivirais aciclovir e ganciclovir sobre o desenvolvimento reprodutivo de ratos machos expostos in útero / Fabíola Nihi. – Curitiba, 2012.

70 f.: il. color. ; 30cm.

Orientador: Anderson Joel Martino Andrade

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Agentes antivirais 2. Aciclovir I. Ganciclovir III. Toxicologia IV. Andrade, Anderson Joel Martino V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 616.085



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **FABÍOLA NIHI** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à APROVAÇÃO do acadêmico.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 31 de agosto de 2012

Professora Doutora Flavia Sant'Anna Rios
UFPR - Membro Titular

Professora Doutora Alexandra Acco
UFPR - Membro Titular

Professor Doutor Anderson Joel Martino de Andrade
UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado a vida, pois sem ela este trabalho não teria ganhado vida. Também sou grata por Ele ter me dado uma família e amigos maravilhosos, pois sem eles não seria quem sou.

Aos meus pais, por toda educação e ensinamentos sobre como me comportar diante da vida e perante aos outros. Sem o incentivo financeiro de vocês eu não teria chegado até aqui. Hoje posso dizer que a pessoa que sou é devido a todo amor que vocês me proporcionam.

Ao meu “Ermão”, Ane e Caio, que foram os maiores incentivadores de que eu podia ser sempre mais. Foram muitas noites mal dormidas. Lembro até hoje de vocês dizendo nas maratonas de estudo nas altas horas da madrugada...“Dorme 15 minutinhos, aí a gente te acorda pra você continuar estudando”.

Ao “Meu Amor”, por todo amor, carinho e compreensão. Você me apoiou a lutar por esta conquista e hoje comemoramos juntos a conclusão desta etapa na minha vida profissional.

Aos meus amigos do laboratório, não só por toda mão de obra e os ensinamentos, mas também pelo ótimo ambiente de trabalho. Trabalhar com vocês foi muito prazeroso. Ganhei amigos que espero levar pra vida toda. Vocês são especiais.

Um agradecimento especial à minha amiga Gláucia e Carol, por toda a parceria. Obrigada pela companhia de vocês às minhas idas aos finais de semana e feriado ao laboratório. Graças a vocês o trabalho foi suave nesses dias de cão.

À Wanessa e a Ju, amigas que são como minha família, que aguentaram minhas reclamações sobre o trabalho e todas as minhas manias. Eu sei que morar comigo não deve ser fácil (hehe).

Aos amigos que fiz em Curitiba, por todo companheirismo nesta cidade onde é difícil encontrar amigos de verdade.

Ao último, mas não menos importante, meu orientador Anderson, por toda paciência e compreensão nessa jornada. Admiro muito essa pessoa inteligente e prestativa. Espero levar pelo menos um pouco dos ensinamentos que recebi e que eu consiga levar adiante.

Meus sinceros agradecimentos também à Capes-Reuni, cujo auxílio financeiro me ajudou a realizar a pesquisa.

RESUMO

O período pré-natal representa uma fase de grande suscetibilidade a insultos como estresse, radiação e exposição a agentes químicos. Em roedores, o processo de diferenciação testicular ocorre aproximadamente entre os dias 10 e 15 de gestação e a exposição de xenobióticos nesse período pode resultar em alteração gonadal permanente. Estudos preliminares indicam que os antivirais aciclovir e ganciclovir apresentam potencial para alterar o desenvolvimento testicular de ratos, quando a exposição ocorre no início do período de diferenciação gonadal. No presente estudo foram investigados os efeitos reprodutivos precoces e tardios, resultantes da exposição pré-natal a esses antivirais, a fim de compreender como o desenvolvimento gonadal e de órgãos reprodutivos de ratos machos expostos *in utero* pode ser afetado pela utilização desses fármacos. As progenitoras foram divididas em cinco diferentes grupos experimentais, recebendo três aplicações (08h00; 13h00 e 18h00) de veículo ou antivirais pela via subcutânea no 10º dia de gestação: (1) Veículo (3 x água destilada); (2) Aciclovir 75 mg/kg (3 x 25 mg/kg); (3) Aciclovir 300 mg/kg (3 x 100 mg/kg); (4) Ganciclovir 75 mg/kg (3 x 25 mg/kg); (5) Ganciclovir 300 mg/kg (3 x 100 mg/kg). Foram feitos dois experimentos para avaliar os efeitos precoces (experimento 1) e tardios (experimento 2) induzidos pela exposição *in utero* aos antivirais. Em ambos os experimentos não foram observados toxicidade sistêmica materna, avaliados através do ganho de peso materno, peso dos órgãos e parâmetros como número de implantes, perda pós-implantes e peso das ninhadas ao nascer. No primeiro experimento (análises feitas em fetos no 20º dia de gestação), a exposição à maior dose de aciclovir ocasionou redução no peso dos fetos avaliados. Houve redução da concentração de testosterona intratesticular dos fetos machos expostos à maior dose de aciclovir, porém sem repercussões sobre a distância anogenital e outros parâmetros andrógeno-dependentes. Além disso, a análise histológica do testículo fetal revelou diminuição significativa no diâmetro dos cordões seminíferos e redução na quantidade de gonócitos no grupo exposto à dose de 300 mg/kg de ganciclovir. No segundo experimento (análises em ratos adultos no 90º pós-natal), foi observada uma diminuição significativa no peso do testículo e epidídimo e baixa contagem de espermátides resistentes à homogeneização nos grupos expostos à maior dose de ganciclovir. Além disso, também foram observadas malformações dos túbulos seminíferos neste mesmo grupo – túbulos atrofiados e com ausência de células germinativas. Também ocorreu uma diminuição do peso do timo das ninhadas expostas à dose de 300 mg/kg de aciclovir. Os efeitos testiculares do ganciclovir manifestaram-se tanto precoce quanto tardiamente e estão provavelmente relacionados com alterações na viabilidade das células germinativas. Os dados obtidos indicam que, apesar da semelhança estrutural, os órgãos-alvo e o espectro de toxicidade dos antivirais aciclovir e ganciclovir são, assim como suas aplicações terapêuticas, amplamente distintos.

Palavras-chave: Aciclovir. Ganciclovir. Toxicologia. Testículo. Apoptose. Ratos.

ABSTRACT

The prenatal period is a stage of great susceptibility to insults such as stress, radiation and chemical agents. In rodents, the process of testicular differentiation occurs approximately between days 10 and 15 of pregnancy, and exposure to xenobiotics in this period can result in permanent gonadal changes. Preliminary studies indicate that the antiviral drugs acyclovir and ganciclovir have the potential to alter the testicular development in rats when the exposure occurs in the early stages of gonadal differentiation. In the present study we investigated the early and late reproductive effects resulting from prenatal exposure to these antivirals in order to understand how the gonadal development and reproductive organs of male rats exposed in utero may be affected by the use of these drugs. The dams were divided into five different experimental groups, receiving three applications (8:00 a.m., 13:00 and 18:00 p.m.) of vehicle or antivirals subcutaneously on the 10th day of gestation: (1) Vehicle (3 x distilled water); (2) Acyclovir 75 mg/kg (3 x 25 mg/kg); (3) Acyclovir 300 mg/kg (3 x 100 mg/kg); (4) Ganciclovir 75 mg/kg (3 x 25 mg/kg); (5) Ganciclovir 300 mg/kg (3 x 100 mg/kg). Two experiments were performed to evaluate the early (experiment 1) and late effects (experiment 2) induced by in utero exposure to antivirals. In both experiments were not observed maternal systemic toxicity, assessed by maternal weight gain, organ weights and parameters such as number of implants, post-implants loss and weight of litters at birth. In the first experiment (analyzes in fetuses on the 20th day of gestation), the exposure to higher dose of acyclovir caused fetal weights reduction. There was a reduction of intratesticular testosterone concentration of male fetuses exposed to the highest dose of acyclovir, however without repercussions on the anogenital distance and other androgen-dependent parameters. Moreover, histological analysis of the fetal testis showed significant decrease in the diameter of the seminiferous cords and reduced the number of gonocytes in the group exposed to 300 mg/kg of ganciclovir. In the second experiment (analyzes in adult rats on the 90th day postnatal), we observed a significant decrease in testis and epididymis weight and low count of homogenization resistant spermatids in the groups exposed to the highest dose of ganciclovir. Moreover, were also observed seminiferous tubules malformations in the same group - atrophic tubules and absence of germ cells. We also observed thymus weight decrease of the litters exposed to 300 mg/kg of acyclovir. The testicular effects of ganciclovir can be detected in early and late stages and are probably related to changes in the viability of germ cells. These data indicate that despite structural similarity, target organ toxicity and spectrum of antiviral acyclovir and ganciclovir are as well as their therapeutic applications widely different.

Key-words: Acyclovir. Ganciclovir. Toxicology. Testis. Apoptosis. Rats.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 01: Apresentação esquemática da diferenciação gonadal de murinos a partir de uma gônada bipotencial. No indivíduo XY, o gene Sry é expresso entre os dias 10 e 11 de gestação e inicia o processo de diferenciação celular na gônada, que irá se tornar ativa na produção de hormônios para complementar o desenvolvimento testicular e induzir a diferenciação fenotípica; dpc = dia pós-coito.....15
- FIGURA 02: Processos hormonais envolvidos na masculinização de diversos tecidos. O diagrama mostra os sítios de produção de hormônios, as células-alvo, bem como a atuação das enzimas responsáveis pela conversão de testosterona para formar diversos substratos que contribuem na masculinização de tecidos. DHT = 5 α -dihidrotestosterona; Insl 3 = fator de crescimento semelhante à insulina 3.....17
- FIGURA 03: Fórmula estrutural dos antivirais aciclovir e ganciclovir. O ganciclovir tem acréscimo de um grupo hidroximetila na cadeia lateral acíclica.....19
- FIGURA 04: Retração manual do prepúcio de um rato com separação prepucial completa.....30
- FIGURA 05: (A) Ganho de peso absoluto (g) e (B) ganho de peso percentual em relação ao primeiro dia da gestação das progenitoras tratadas com veículo (controle) ou com os antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan). Os resultados representam média $\pm$ erro padrão da média para

cada um dos pontos analisados (ANOVA de duas vias). n = número de ninhadas. A legenda refere-se ao gráfico A e B.....34

FIGURA 06: Peso corporal de fetos expostos *in utero* aos antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan). As barras horizontais indicam a média de cada grupo tratado. As progenitoras foram tratadas no décimo dia de gestação e eutanasiadas no vigésimo dia para a avaliação do peso fetal. *Difere significativamente do grupo controle (*p ≤ 0,05; ANOVA/Tukey). n = número de ninhadas; Contr = Grupo Controle tratado com veículo (solução salina).....35

FIGURA 07: Distância anogenital (DAG) de ratos machos expostos *in utero* aos antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan) nas doses de 75 e 300 mg/kg. A) DAG corrigida pela raiz cúbica do peso corporal. B) DAG absoluta (mm). As linhas horizontais indicam média da DAG das ninhadas de cada grupo de tratamento (ANOVA/Tukey). n = número de ninhadas; Contr = Grupo Controle tratado com veículo (solução salina).....37

FIGURA 08: Dosagem de testosterona intratesticular (ng/testículo) de animais expostos *in utero* aos antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan). *Difere significativamente do grupo controle (*p ≤ 0,05; Kruskal-Wallis/Dunn). n = número de ninhadas; Contr = Grupo Controle tratado com veículo (solução salina).....38

FIGURA 09: Diâmetro dos cordões seminíferos (µm) de animais expostos no décimo dia de gestação aos antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan) nas doses de 75 e 300 mg/kg. *Difere significativamente do grupo controle (*p ≤ 0,05; ANOVA/Tukey). n = número de ninhadas; Contr = Grupo Controle tratado com veículo (solução salina).....39

FIGURA 10: Quantificação de gonócitos em fetos expostos *in utero* aos antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan). O número de gonócitos por cordão foi corrigido pela espessura do corte histológico e pela média do diâmetro dos núcleos dos gonócitos. *Difere significativamente do grupo controle (*p ≤ 0,05; ANOVA/Tukey). Contr = Grupo Controle.....39

FIGURA 11: Secções de cordões seminíferos de testículos fetais de ratos expostos no décimo dia de gestação aos antivirais aciclovir e ganciclovir. A e C) Ratos expostos ao veículo; B e D) Grupo exposto ao ganciclovir 300 mg/kg. As setas indicam presença de gonócitos nos cordões seminíferos de testículo fetal exposto ao veículo (C) e ausência de gonócitos nos cordões de testículo fetal exposto ao ganciclovir na dose de 300 mg/kg (D).....40

FIGURA 12: Ganho de peso corporal (g), no período de lactação, de ratos expostos *in utero*, no 10º dia de gestação, aos antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan). O 1º dia da lactação corresponde ao dia do nascimento e o 21º ao dia do desmame (ANOVA de duas vias). n = número de ninhadas.....42

FIGURA 13: Ganho de peso corporal (g) dos indivíduos machos, expostos *in utero* aos antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan). O peso foi registrado a cada 7 dias, desde o desmame (21º dia) até o 91º dia pós-natal (ANOVA de duas vias). n = número de ninhadas.....43

FIGURA 14: Pesos absolutos (A) e relativos (B) dos timos de ratos expostos *in utero* ao veículo (Contr) e aos antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan). n = número de ninhadas. ^ap = 0,053 (ANOVA) e p = 0,064 (Tukey).....46

FIGURA 15: A) Peso absoluto (ANOVA/Tukey) e B) relativo (Kruskal-Wallis/Dunn) dos epidídimos de ratos expostos *in utero* ao veículo e aos antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan). As linhas horizontais indicam a média de cada grupo de tratamento. A) Peso absoluto (g). B) Peso relativo (%). *Difere significativamente do grupo controle (* $p \leq 0,05$). n = número de ninhadas; Contr = Grupo Controle.....46

FIGURA 16: A) Peso absoluto (g) e B) relativo (%) dos testículos de ratos expostos no décimo dia de gestação às doses de 75 e 300 mg/kg aos antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan). As linhas horizontais representam a média de cada grupo tratado. *Difere significativamente do grupo controle (* $p \leq 0,05$; ANOVA/Tukey). n = número de ninhadas; Contr = Grupo Controle. No gráfico “A”, a linha horizontal indica o valor de 1,27g, que corresponde a média do grupo controle menos 3 desvios padrões ($1,545 \text{ g} - [3 \times 0,091 \text{ g}] = 1,27 \text{ g}$).....47

FIGURA 17: Número total de espermátides resistentes à homogeneização por testículo. Os pontos representam a média da contagem de espermátides de cada ninhada e as barras horizontais indicam a média de cada grupo de tratamento. O número total de espermátides diminuiu no grupo de ganciclovir (Gan) 300 mg/kg (* $p \leq 0,05$; ANOVA/Tukey). n = número de ninhadas; Aci = Grupo Aciclovir; Contr = Grupo Controle.....48

FIGURA 18: Túbulos seminíferos de ratos adultos (90 ± 1 dia) expostos *in utero* ao veículo (controle) e ao antiviral ganciclovir, no décimo dia de gestação. A e C) Ratos expostos ao veículo; B e D) Grupo exposto ao ganciclovir 300 mg/kg. Os testículos do grupo ganciclovir apresentam túbulos severamente atrofiados com redução do diâmetro e com escassez na população de células germinativas (x). Alguns túbulos apresentam depleção total de células germinativas (y) (*Sertoli cell-*

only syndrome), vacuolizações (indicadas pelas setas) e ausência de lúmen tubular.....50

FIGURA 19: Diâmetro dos túbulos seminíferos (μm) de ratos adultos expostos ao veículo (Contr) e aos antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan) no décimo dia de gestação. Gan 300 N representa os túbulos normais e o Gan 300 M representa os túbulos com malformação (atrofia) no grupo exposto ao Ganciclovir 300 mg/kg. *Difere significativamente do grupo controle ($*p \leq 0,05$; ANOVA/Tukey). n = número de ninhadas.....51

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: Etapas do processo de emblocagem de testículo fetal, desde a desidratação até a emblocagem do material em paraplast-plus.....	27
TABELA 02: Etapas do processo de emblocagem de testículo de animais adultos, desde a desidratação até a emblocagem do material em paraplast-plus.....	31
TABELA 03: Índices reprodutivos de progenitoras tratadas pela via subcutânea no décimo dia de gestação com os antivirais aciclovir e ganciclovir, nas doses de 75 e 300 mg/kg.....	35
TABELA 04: Peso absoluto (g) e relativo (%) dos órgãos das progenitoras expostas no décimo dia de gestação aos antivirais aciclovir e ganciclovir.....	36
TABELA 05: Idade da separação prepucial (dias), peso absoluto (g) dos órgãos e testosterona sérica (ng/ml) de ratos machos expostos <i>in utero</i> aos antivirais aciclovir e ganciclovir.....	45
TABELA 06: Peso relativo (%) dos órgãos de ratos machos expostos <i>in utero</i> aos antivirais aciclovir e ganciclovir.....	45

TABELA 07: Resumo dos efeitos precoces e tardios observados após exposição <i>in utero</i> aos antivirais aciclovir e ganciclovir.....	52
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	O DESENVOLVIMENTO GONADAL E REPRODUTIVO E A INTERFERÊNCIA DE XENOBIÓTICOS.....	14
1.2	OS ANTIVIRAIS ACICLOVIR E GANCICLOVIR.....	18
1.2.1	Efeito da exposição pré-natal aos antivirais aciclovir e ganciclovir.....	20
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	OBJETIVO GERAL.....	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
2.2.1	Investigar a toxicidade materna nos experimentos de avaliação de efeitos precoces e tardios.....	23
2.2.2	Investigar e caracterizar os efeitos precoces, observados no 20º dia de gestação, após administração materna dos antivirais aciclovir e ganciclovir no décimo dia de gestação.....	23
2.2.3	Investigar e caracterizar os efeitos testiculares e reprodutivos tardios observados nos descendentes expostos no décimo dia de gestação.....	23
3	METODOLOGIA.....	24
3.1	ANIMAIS.....	24
3.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	25
3.2.1	Escolha das doses – Protocolo de tratamento.....	25
3.3	EXPERIMENTO 1 – EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AOS ANTIVIRAIS ACICLOVIR E GANCICLOVIR SOBRE O TESTÍCULO FETAL.....	25
3.3.1	Animais e coleta das amostras.....	25
3.3.2	Histologia testicular fetal.....	26
3.3.3	Determinação dos níveis de testosterona intratesticular.....	28
3.4	EXPERIMENTO 2 - EFEITOS TARDIOS DA EXPOSIÇÃO <i>IN UTERO</i> AOS ANTIVIRAIS ACICLOVIR E GANCICLOVIR: DESENVOLVIMENTO PUBERAL E PARÂMETROS REPRODUTIVOS NA FASE ADULTA.....	28
3.4.1	Animais, separação prepucial, e coleta das amostras na idade adulta...	28
3.4.2	Histologia testicular.....	30
3.4.3	Contagem de espermátides no testículo.....	31
3.4.4	Determinação dos níveis séricos de testosterona.....	32
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
4	RESULTADOS.....	33
4.1	EXPERIMENTO 1 - EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AOS ANTIVIRAIS ACICLOVIR E GANCICLOVIR SOBRE O TESTÍCULO FETAL.....	33
4.1.1	Dados da prenhez.....	33
4.1.2	Avaliação Reprodutiva dos descendentes machos na fase fetal.....	36
4.1.2.1	Distância Anogenital e Testosterona intratesticular.....	36
4.1.2.2	Histologia testicular fetal.....	38
4.2	EXPERIMENTO 2 - EFEITOS TARDIOS DA EXPOSIÇÃO <i>IN UTERO</i> AOS ANTIVIRAIS ACICLOVIR E GANCICLOVIR: DESENVOLVIMENTO PUBERAL E PARÂMETROS REPRODUTIVOS NA FASE ADULTA.....	40
4.2.1	Dados da prenhez.....	41

4.2.2	Separação Prepucial.....	43
4.2.3	Avaliação reprodutiva dos descendentes masculinos na fase adulta.....	43
4.2.3.1	Pesos absolutos e relativos dos órgãos.....	44
4.2.3.2	Dosagem de testosterona sérica.....	47
4.2.3.3	Número de espermátides resistentes à homogeneização.....	47
4.2.3.4	Histologia testicular.....	48
5	DISCUSSÃO.....	53
5.1	DADOS DA PRENHEZ E EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO GERAL DA PROGENIE.....	54
5.2	EFEITOS DOS ANTIVIRAIS ACICLOVIR E GANCICLOVIR SOBRE O STATUS ANDROGÊNICO.....	55
5.3	EFEITOS TESTICULARES DOS ANTIVIRAIS ACICLOVIR E GANCICLOVIR.....	57
5.4	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	60
6	CONCLUSÕES.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

Diversos estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que a exposição a substâncias químicas durante o período pré-natal pode ser um fator importante na etiologia de diversas doenças (IRVINE *et al.*, 1996; TOPPARI *et al.*, 1996; SKAKKEBAEK, MEYTS e MAIN, 2001; ANDRADE *et al.*, 2006). Desde o incidente ocorrido com o uso da talidomida na década de 1960, quando foram detectados efeitos teratogênicos em seres humanos, vários protocolos de estudo foram elaborados para determinar os possíveis efeitos tóxicos pré-natais de medicamentos e outros xenobióticos. Contudo, além dos efeitos tóxicos mais evidentes, como morte, malformações e baixo peso ao nascer, a exposição à xenobióticos pode, dependendo da substância, da dosagem e também do período de exposição, aumentar a susceptibilidade a uma série de doenças, incluindo alterações comportamentais, obesidade, doenças cardiovasculares e distúrbios endócrinos e reprodutivos (HEINDEL, 2008). A exposição durante o desenvolvimento pré-natal é particularmente preocupante, uma vez que alterações induzidas nesse período podem modificar a função de órgãos e tecidos de maneira irreversível, bem como alterar a responsividade celular a diferentes estímulos (COLBORN, SAAL e SOTO, 1993).

Nos últimos anos, diversos estudos têm sugerido um possível aumento na incidência de distúrbios reprodutivos masculinos em seres humanos, incluindo baixa contagem de espermatozóides, infertilidade, câncer testicular, criptorquidismo e malformações genitais. Em muitos casos, acredita-se que a origem desses distúrbios esteja relacionada com alterações no ambiente intrauterino causadas por fatores ambientais (ex.: exposição a substâncias químicas) ou fatores relacionados ao estilo de vida (ex.: obesidade materna, tabagismo) (TOPPARI *et al.*, 1996; IRVINE *et al.*, 1996; SHARPE *et al.*, 2003). Em mamíferos, a diferenciação sexual é um processo sequencial que se inicia com o estabelecimento do sexo genético durante a fertilização. A ativação do gene *Sry* e de outros genes inicia o processo de morfogênese do testículo, que passa a secretar hormônios essenciais para completar a diferenciação gonadal e promover a diferenciação fenotípica (masculinização). Contudo, muitos aspectos do processo de desenvolvimento testicular ainda não foram estabelecidos. Assim, um conhecimento mais profundo

dos processos moleculares e celulares que governam o desenvolvimento testicular poderia esclarecer os mecanismos envolvidos no surgimento de distúrbios reprodutivos de manifestação precoce (ex.: malformações genitais) e tardia (ex.: infertilidade e câncer testicular) (SHARPE, 2006).

A toxicologia reprodutiva é a área da toxicologia responsável por estudar os efeitos de substâncias químicas sobre diferentes aspectos da função reprodutiva, incluindo a gametogênese, *status* hormonal, comportamento sexual, fertilização, gestação, parto, lactação e puberdade. Por outro lado, a toxicologia do desenvolvimento estuda os efeitos adversos induzidos por agentes químicos durante períodos críticos do desenvolvimento, como os períodos pré e neonatal. Dentre esses efeitos destacam-se as malformações esqueléticas e viscerais, mas também efeitos sobre o funcionamento geral de órgãos e sistemas, incluindo o sistema reprodutivo. Neste contexto, a utilização de fármacos no período gestacional está se tornando cada vez mais controlada e cresce a preocupação em estudar o desenvolvimento fetal nos diferentes períodos da gestação, a fim de evitar consequências irreversíveis sobre o desenvolvimento gonadal e reprodutivo (RIECKE e STAHLMANN, 2000).

Os antivirais aciclovir e ganciclovir são drogas utilizadas no tratamento de inúmeras infecções virais em adultos, mas apresentam uso restrito durante a gestação e a lactação, especialmente o ganciclovir, em função dos possíveis efeitos teratogênicos. Apesar da similaridade estrutural, esses antivirais apresentam diferentes espectros de indicação terapêutica (eficácia) e toxicidade (GOODMAN e GILMAN, 2007). Além disso, embora o potencial teratogênico em animais de laboratório já tenha sido determinado, não existem estudos completos sobre os possíveis efeitos no desenvolvimento sexual e eventuais repercussões sobre a função reprodutiva de animais expostos *in utero* a esses antivirais.

1.1 O DESENVOLVIMENTO GONADAL E REPRODUTIVO E A INTERFERÊNCIA DE XENOBIÓTICOS

Os processos que governam a diferenciação gonadal e fenotípica masculina são particularmente suscetíveis a uma ampla variedade de insultos, uma vez que

dependem da sincronização de muitos eventos celulares e sinais químicos (endócrinos, parácrinos e autócrinos). Em mamíferos, o testículo forma-se a partir de uma gônada indiferenciada bipotencial (FIGURA 01), guiado pela expressão de uma ampla variedade de genes, com destaque para os produtos dos genes *Sry*, localizado no braço curto do cromossomo Y, e *Sox9* (ROSS e CAPEL, 2005; SHARPE, 2006). Esse processo, inicialmente independente de hormônios, tem início com a migração das células germinativas primordiais, derivadas do mesoderma do saco vitelínico para a crista genital, aproximadamente entre o 10º e o 13º dia de gestação em roedores. A seguir, ocorre a diferenciação de células do epitélio celômico das cristas genitais em células de Sertoli, que iniciam o processo de formação dos cordões seminíferos, envolvendo as células germinativas primordiais, que ao se tornarem residentes passam a ser chamadas de gonócitos. A esse processo segue-se a migração e diferenciação das células peritubulares a partir do mesonéfron, bem como o surgimento das células intersticiais (células de Leydig), cuja origem ainda é controversa. É importante destacar que a formação das células de Sertoli tem um papel fundamental para orquestrar o desenvolvimento celular do testículo no período pré-natal (SHARPE, 2006).

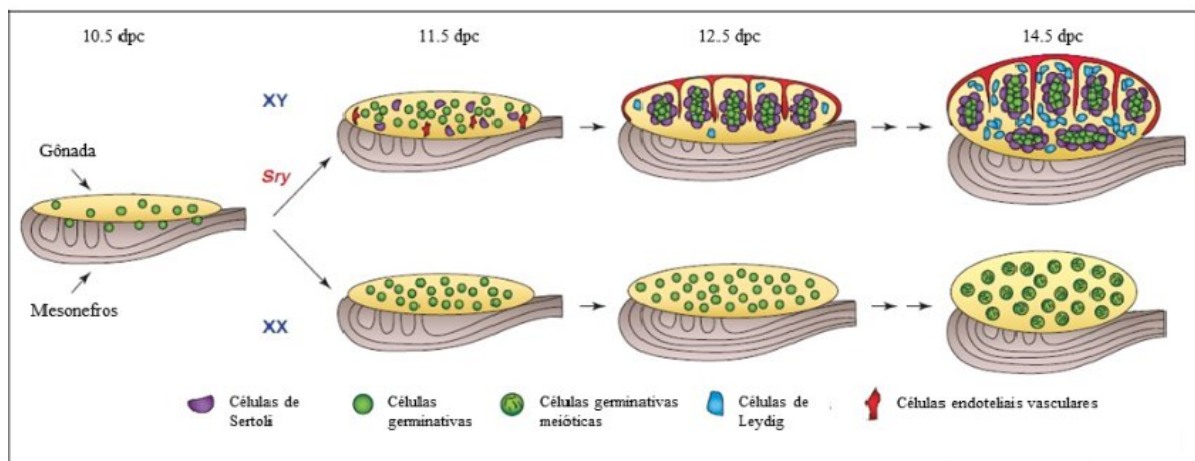


FIGURA 01: Apresentação esquemática da diferenciação gonadal de murinos a partir de uma gônada bipotencial. No indivíduo XY, o gene *Sry* é expresso entre os dias 10 e 11 de gestação e inicia o processo de diferenciação celular na gônada, que irá se tornar ativa na produção de hormônios para complementar o desenvolvimento testicular e induzir a diferenciação fenotípica; dpc = dia pós-coito.
FONTE: Modificado de ROSS e CAPEL (2005).

Em roedores, o processo de diferenciação testicular inicial ocorre aproximadamente entre os dias 10 e 15 de gestação, sendo que após essa etapa o

testículo torna-se amplamente ativo em termos de produção hormonal. As células de Sertoli no testículo recém diferenciado produzem o hormônio anti-mülleriano (AMH), que promove a regressão dos ductos paramesonéfricos (ductos de Müller), precursores dos genitais internos femininos (ovidutos, útero e porção superior da vagina). Nesse estágio, as células de Sertoli também regulam o desenvolvimento das células de Leydig, que secretam testosterona para promover a diferenciação dos ductos mesonéfricos (ductos de Wolff), que originam o epidídimo, vesícula seminal e ducto deferente. A masculinização da genitália externa e a formação da próstata também são eventos andrógeno-dependentes e ocorrem após a conversão da testosterona em 5α -dihidrotestosterona (DHT) pela ação da enzima 5α -redutase nos tecidos-alvos (TOPPARI *et al.*, 1996; US EPA, 1996; SHARPE, 2006). A distância anogenital (DAG), marcador externo do grau de androgenização pré-natal, é capaz de indicar se a exposição de xenobióticos durante o período gestacional pode resultar na supressão da síntese de testosterona pelo testículo fetal e, conseqüentemente redução nos níveis de andrógenos circulantes, importante no processo de desenvolvimento reprodutivo masculino (MYLCHREEST *et al.*, 1999).

As células de Leydig também secretam um hormônio proteico, o fator de crescimento semelhante à insulina 3 (IGF-3 ou *insl3*), envolvido no desenvolvimento do gubernáculo, estrutura responsável pela descida transabdominal do testículo. Posteriormente, a descida do testículo ao escroto é complementada pela ação da DHT, envolvida no movimento inguino-escrotal do testículo (SHARPE, 2006). Segundo Wallen e Baum (2002), a organização final do indivíduo em relação ao sexo vem com a diferenciação do sistema nervoso central (SNC). Em roedores, a exposição a andrógenos nas proximidades do nascimento promove a masculinização do cérebro. Esse processo de masculinização também depende da conversão de testosterona em estrógenos pela ação da enzima aromatase no tecido nervoso, embora o papel dos estrógenos na masculinização do cérebro em humanos ainda seja controverso. A FIGURA 02 ilustra esquematicamente as principais células, hormônios e tecidos-alvos envolvidos no processo de masculinização em mamíferos.

exposição *in utero* a desreguladores endócrinos (FISHER *et al.*, 2003; ANDRADE *et al.*, 2006). Essas substâncias incluem anti-andrógenos, como os fungicidas procloraz, linuron e vinclozolin, substâncias estrogênicas, como o bisfenol A e o pesticida metoxiclor, ou ainda substâncias que afetam a síntese de androgênios, como alguns ftalatos, aditivos químicos utilizados para conferir maleabilidade a produtos à base de plásticos de policloreto de vinila (WOLF *et al.*, 1999; LAMBRIGHT *et al.*, 2000; MYLCHREEST *et al.*, 2002; STAUB *et al.*, 2002).

Os principais efeitos reprodutivos de ftalatos e de outros desreguladores endócrinos manifestam-se quando a exposição ocorre durante a fase de diferenciação sexual dependente de andrógenos, que em ratos corresponde ao período entre os dias 15 e 21 de gestação. Quando a exposição ocorre antes desse período, normalmente não são relatados efeitos adversos nos descendentes expostos (FOSTER, 2006). Em contraste, resultados obtidos por Hartmann *et al.* (1991) mostraram que a administração materna do antiviral ganciclovir no 10º dia de gestação em ratas (3 x 100 mg/kg pela via subcutânea) ocasiona alterações testiculares graves nos descendentes masculinos (ver item 1.2.1). Esses resultados indicam que a exposição gestacional de ratos ao ganciclovir pode representar uma ferramenta potencial para o entendimento dos eventos iniciais da diferenciação testicular e dos mecanismos envolvidos na origem pré-natal de distúrbios reprodutivos masculinos. Contudo, estudos adicionais são necessários para confirmar e ampliar a descrição dos efeitos inicialmente reportados por Hartmann *et al.* (1991), assim como elucidar os mecanismos de ação responsáveis por esses efeitos.

1.2 OS ANTIVIRAIS ACICLOVIR E GANCICLOVIR

O aciclovir e o ganciclovir são derivados acíclicos da guanosina, utilizados como antivirais por serem capazes de inibir a atividade da DNA polimerase viral. Ambos dependem de três etapas de fosforilação para serem ativados. Inicialmente são fosforilados especificamente pela timidina quinase viral e, a seguir, nos compostos di e trifosfato pelas enzimas da célula hospedeira (RANG *et al.*, 2007; SAFRIN, 2006). Devido à necessidade da fosforilação inicial pela quinase viral,

essas drogas são seletivamente ativadas e acumuladas nas células infectadas. Contudo, tanto o aciclovir quanto o ganciclovir apresentam meia vida curta (entre 2 e 4 horas) (FAULDS e HEEL, 1990) e são comumente administrados em humanos pela via endovenosa. Em estudos experimentais, a administração desses antivirais em ratos ocorre frequentemente pela via subcutânea ao invés da via oral (gavagem), uma vez que a biodisponibilidade pela via oral é baixa para as duas drogas (MONEY, 2003).

As moléculas dos antivirais aciclovir e ganciclovir são bem similares (FIGURA 03), havendo apenas a adição de um grupo hidroximetila na cadeia lateral acíclica no ganciclovir (GOODMAN e GILMAN, 2007). Apesar da grande similaridade estrutural, o aciclovir apresenta alta especificidade para o vírus herpes simples e varicela zoster, mas também tem ação contra o Epstein-Barr e, em menor grau contra o citomegalovírus (RANG *et al.*, 2007). O ganciclovir é utilizado no tratamento de infecções causadas pelo citomegalovírus, principalmente em pacientes imunodeficientes.

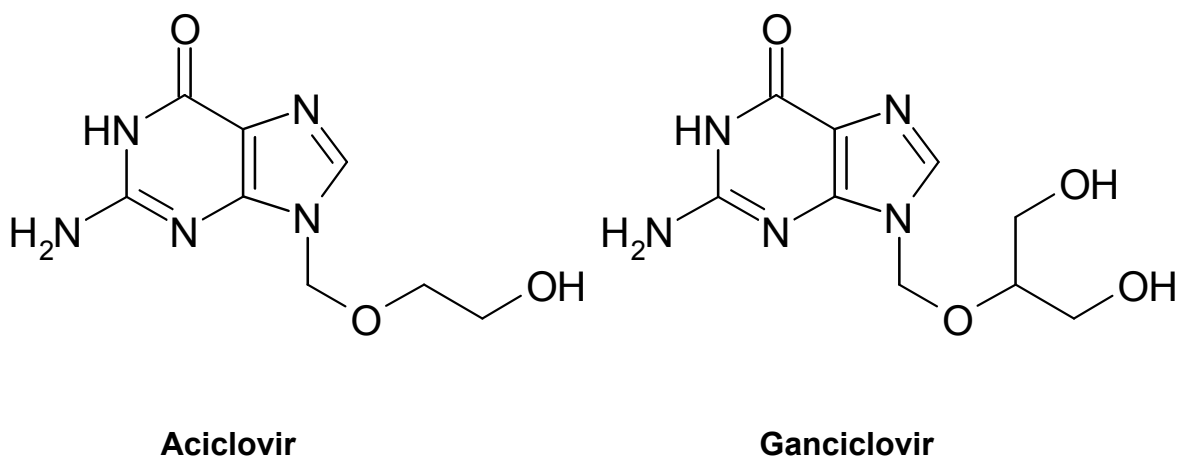


FIGURA 03: Fórmula estrutural dos antivirais aciclovir e ganciclovir. O ganciclovir tem acréscimo de um grupo hidroximetila na cadeia lateral acíclica.
FONTE: GOODMAN e GILMAN (2007).

Um estudo publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) analisou a incidência de contaminação mundial por herpes genital no ano de 2003 e constatou uma maior incidência da doença em mulheres do que em homens, com cerca de 314 milhões de mulheres contaminadas somente naquele ano (LOOKER, GARNETT e SCHMID, 2008). Do total de mulheres infectadas, cerca de 2% adquirem o vírus

durante a gestação (BROWN *et al.*, 1997). Só nos Estados Unidos, aproximadamente 2000 neonatos contraem o vírus herpes simples por ano e o aciclovir é amplamente utilizado por gestantes para tentar evitar a transmissão vertical do vírus ao feto (ENRIGHT e PROBER, 2002).

Como mencionado anteriormente, outro grande alvo desses antivirais, especialmente do ganciclovir, é o citomegalovírus. Um dos principais problemas associados à citomegalovirose é a possibilidade de infecção congênita. Embora a maioria das crianças nascidas seja assintomática, a infecção congênita pode ocasionar danos graves em alguns pacientes, incluindo perda da audição e retardo mental (PULIYANDA *et al.*, 2005; ADLER, NIGRO e PEREIRA, 2007). Apesar da administração materna de ganciclovir ser relativamente eficaz na redução da carga viral fetal, o uso dessa droga é bastante restrito em função dos efeitos teratogênicos observados em animais de laboratório e possíveis efeitos adversos também em seres humanos. No entanto, o uso de ganciclovir durante a gestação tem sido relatado em alguns casos, principalmente no tratamento de gestantes imunodeficientes (PULIYANDA *et al.*, 2005).

1.2.1 Efeito da exposição pré-natal aos antivirais aciclovir e ganciclovir

De acordo com a Food and Drug Administration, instituição Norte-Americana responsável pela regulação de alimentos e medicamentos, o aciclovir e o ganciclovir enquadram-se nas categorias B e C de risco teratogênico, respectivamente. A categoria B inclui substâncias para as quais estudos animais falharam em demonstrar risco ao feto e não há estudos adequados e controlados em seres humanos. Por outro lado, a categoria C inclui drogas para as quais estudos animais revelaram efeitos adversos nos fetos, porém sem dados adequados em seres humanos, e os benefícios potenciais podem justificar o uso a despeito dos riscos (FDA, 2010).

Diversos estudos têm demonstrado que a administração dos antivirais aciclovir e ganciclovir em ratos ocasiona efeitos tóxicos evidentes. Neyts *et al.* (1995), estudando efeitos da administração de antivirais em ratos infectados com herpes simples, demonstrou que a administração do ganciclovir é capaz de causar

atrofia do epitélio germinativo testicular, com presença de túbulos seminíferos contendo apenas células de Sertoli (*Sertoli cell-only syndrome*), além de diminuir significativamente o peso testicular. Além disso, a administração de aciclovir revelou atrofia dos túbulos renais, evidenciando um efeito nefrotóxico deste medicamento. Mamede *et al.* (1995) investigaram os efeitos da administração materna do aciclovir sobre o desenvolvimento da prole e comprovaram que a administração desse antiviral, na dose de 60 mg/kg do primeiro ao vigésimo dia de gestação de ratos, causa diminuição significativa no ganho de peso das progenitoras. Além disso, foram analisados alguns índices reprodutivos que revelaram aumento na razão de reabsorção/implantação, indicando um possível efeito abortivo do aciclovir. Em um estudo clínico, Dasanu e Alexandrescu (2010) reportaram que a utilização de aciclovir pode resultar em efeitos neuro e nefrotóxicos. Os sintomas incluíam delírio, ataxia, coma, alucinações, convulsões, entre outros, principalmente entre adultos mais velhos tratados com o antiviral. O relato de nefrotoxicidade tem sido comumente demonstrado em outros estudos (GUNNESS *et al.*, 2011; FLEISCHER e JOHNSON, 2010). Apesar de evidências do potencial deletério causado por aciclovir em roedores (STALMANN *et al.*, 1988), um estudo publicado por Stone e colaboradores (2004) reuniu registros internacionais da exposição gestacional ao aciclovir entre 1984 e 1989 e não demonstrou potencial teratogênico dessa droga em humanos.

Em estudos experimentais, a nefrotoxicidade induzida pelo aciclovir representa uma limitação no espectro de doses que pode ser testado – por exemplo, doses diárias acima de 50 mg/kg resultam na cristalização do aciclovir nos túbulos renais de ratos (STAHLMANN *et al.*, 1988). Com o objetivo de investigar os possíveis efeitos adversos de doses mais elevadas de aciclovir, Klug *et al.* (1985) utilizaram um sistema de cultura de embriões *in vitro*. Dessa forma, foi possível demonstrar que o décimo dia de gestação representa um período de alta suscetibilidade para efeitos teratogênicos em ratos, com indução de alterações caudais e na região da cabeça como defeitos nos ouvidos e mandíbula. A partir desses resultados preliminares, foram conduzidos experimentos *in vivo* com a administração de doses entre 100 e 300 mg/kg, fracionadas e administradas exclusivamente no décimo dia de gestação. Essa abordagem eliminou o problema da nefrotoxicidade e ainda revelou que o aciclovir pode causar alterações estruturais e prejuízo no crescimento embriofetal, confirmando alguns dos efeitos

observados no estudo com cultura de embriões. Nesse estudo foram observadas alterações no comprimento do tronco (*crown-rump length*), malformações na região do crânio, como diminuição da largura do crânio, e modificações na cauda (STALMANN *et al.*, 1988). Contudo, as consequências da exposição pré-natal sobre o desenvolvimento gonadal e função reprodutiva na idade adulta não foram investigadas.

Adotando a mesma abordagem de combinação de estudos *in vitro* (cultura de embriões) e *in vivo* de curta duração (exposição no décimo dia de gestação), Klug e colaboradores (1991) demonstraram que o ganciclovir também apresenta potencial teratogênico nesses modelos. Além disso, resultados obtidos por Hartmann *et al.* (1991) e publicados em forma de resumo mostraram que a administração de ganciclovir no 10º dia de gestação em ratas (3 x 100 mg/kg pela via subcutânea) ocasiona alterações testiculares graves nos descendentes masculinos. No entanto, de acordo com Chahoud (comunicação pessoal), o aciclovir não é capaz de induzir alterações testiculares severas, quando se utiliza esse mesmo protocolo de exposição (10º dia de gestação). Esses resultados indicam que essas duas substâncias, embora estruturalmente relacionadas, podem influenciar o desenvolvimento gonadal de maneira distinta. Posteriormente, Faqi e colaboradores (1997) reportaram atrofia testicular severa em ratos expostos ao ganciclovir na idade adulta.

Os resultados obtidos preliminarmente por Stahlmann *et al.* (1988), Klug *et al.* (1991) e Hartmann *et al.* (1991) indicam que os antivirais aciclovir e ganciclovir podem ocasionar alterações estruturais em ratos expostos durante uma curta janela do desenvolvimento pré-natal (décimo dia de gestação). Considerando que a diferenciação gonadal em roedores tem início nesse período e com base nos resultados reportados por Hartmann *et al.* (1991) para o ganciclovir, torna-se evidente a necessidade da investigação dos efeitos adversos dessas drogas sobre o desenvolvimento e função testicular. Nesse sentido, um estudo mais detalhado desses efeitos, fornecendo dados mais completos sobre os efeitos que esses antivirais acarretam sobre o sistema reprodutor em termos de morfologia e função testicular, poderia não somente indicar possíveis riscos associados à exposição pré-natal a essas drogas antivirais, como também fornecer um modelo de estudo dos processos envolvidos na diferenciação e desenvolvimento gonadal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar e detalhar os efeitos precoces e tardios sobre o sistema reprodutivo observados em ratos machos após exposição *in utero* aos antivirais Ganciclovir e Aciclovir.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Investigar a toxicidade materna nos experimentos de avaliação de efeitos precoces e tardios.

2.2.2 Investigar e caracterizar os efeitos precoces, observados no 20º dia de gestação, após administração materna dos antivirais aciclovir e ganciclovir no décimo dia de gestação:

- Avaliação do *status androgênico* através da determinação da medida da distância anogenital e níveis de testosterona intratesticular.
- Avaliação da histologia do testículo fetal através do diâmetro dos cordões seminíferos e quantificação de gonócitos.

2.2.3 Investigar e caracterizar os efeitos testiculares e reprodutivos tardios observados nos descendentes expostos no décimo dia de gestação:

- Análise do dia da separação prepucial a partir do 38º dia de vida.
- Investigação do peso absoluto e relativo dos órgãos reprodutivos e do fígado, baço, rins e timo nos descendentes adultos.
- Determinação dos níveis de testosterona sérica e avaliação da histologia do testículo através da análise do diâmetro dos túbulos seminíferos nos descendentes adultos.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos, *Rattus norvegicus* variedade Wistar, criados no biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (Curitiba). Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno (414 x 344 x 168 mm), mantidos em condições controladas de temperatura, $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) e receberam água e ração comercial (Nuvital CR-1, Colombo/PR) *ad libidum*. Para a obtenção das progenitoras, ratas com aproximadamente 90 dias de vida, foram acasaladas diariamente com ratos machos adultos durante 3 horas da fase escura do ciclo de luz, na proporção de um macho para três fêmeas. Lavados vaginais diários foram obtidos para confirmar a cópula. Os lavados vaginais foram feitos com auxílio de uma micropipeta contendo 30 μL de solução de cloreto de sódio 0,9% e analisados em microscópio óptico para confirmar a presença de espermatozóides. O dia de detecção de espermatozóides no esfregaço vaginal foi considerado como dia zero da gestação (CHAHOUUD e KWASIGROCH, 1977). Os acasalamentos foram repetidos diariamente até a obtenção de um número suficiente de progenitoras (12 a 14 por grupo experimental) para a realização dos experimentos. As fêmeas que não se tornaram prenhas e os machos utilizados nos acasalamentos foram sacrificados com *overdose* de isoflurano em câmara anestésica. Todos os procedimentos realizados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA), Número 522, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

As progenitoras foram divididas em cinco grupos experimentais, recebendo três aplicações (08h00; 13h00 e 18h00) de veículo ou antivirais (aciclovir ou ganciclovir) pela via subcutânea no 10º dia de gestação, conforme descrito abaixo:

- (1) Controle: Veículo (3x solução fisiológica);
- (2) Aciclovir 75 mg/kg (3 x 25 mg/kg)
- (3) Aciclovir 300 mg/kg (3 x 100 mg/kg)
- (4) Ganciclovir 75 mg/kg (3 x 25 mg/kg)
- (5) Ganciclovir 300 mg/kg (3 x 100 mg/kg)

3.2.1 Escolha das doses – Protocolo de tratamento

As doses, bem como o período, a via e os intervalos de administração foram baseados nos estudos prévios de Stahlmann *et al.* (1987, 1988), Hartmann *et al.* (1991) e Faqi *et al.* (1997). De acordo com esses estudos, esse protocolo de tratamento permite a observação de efeitos tóxicos específicos que não são decorrentes de toxicidade materna/sistêmica.

3.3 EXPERIMENTO 1 – EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AOS ANTIVIRAIS ACICLOVIR A GANCICLOVIR SOBRE O TESTÍCULO FETAL

3.3.1 Animais e coleta das amostras

Foram utilizadas 12 a 14 progenitoras por grupo experimental. As ratas prenhes, tratadas no 10º dia de gestação com veículo, aciclovir ou ganciclovir, foram eutanasiadas por decapitação no 20º dia de gestação para a avaliação dos fetos. Foram registrados o número total e peso individual dos fetos, bem como o

percentual de fetos vivos e o sexo. Também foi determinado visualmente o número total de implantes e calculadas as perdas pós-implantes, definidas como:

$$\text{Perdas pós-implantes} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ total de implantes uterinos} - \text{N}^\circ \text{ de fetos viáveis})}{\text{N}^\circ \text{ total de implantes}} \times 100$$

Ratas sem evidência de prenhez (sem ganho de peso) também foram eutanasiadas para a avaliação de possíveis pontos uterinos de implantação.

Os fetos, machos e fêmeas, foram eutanasiados por decapitação e a distância anogenital (DAG) medida com o auxílio de um paquímetro digital. Para corrigir a influência do tamanho do animal na medida da distância anogenital, os valores obtidos de cada animal foram corrigidos pela raiz cúbica do respectivo peso corporal (DAG corrigida = DAG/peso corporal^{1/3}).

Os testículos direitos de três fetos machos por ninhada foram fixados por imersão em solução de Bouin (ácido pícrico saturado 75%, formalina 20%, ácido acético glacial 5%) por uma hora e subsequentemente mantidos em etanol 70% até o processamento histológico. Foram escolhidos preferencialmente (sempre que possível) machos que estavam em posição uterina entre um macho e uma fêmea, a fim de padronizar ao máximo as condições do ambiente pré-natal e evitar a possível influência da posição intrauterina e dos hormônios gonadais dos filhotes adjacentes. Os testículos esquerdos foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos à -80°C para análise posterior dos níveis de testosterona intratesticular. A decapitação foi realizada sem anestesia prévia para evitar a influência dos anestésicos nas dosagens hormonais.

3.3.2 Histologia testicular fetal

Os testículos fetais fixados em Bouin foram submetidos à desidratação com concentrações crescentes de etanol, diafanização em xilol, e inclusão e emblocagem do material em Paraplast-plus (TABELA 01). Secções transversais de 5 µm foram obtidas e coradas com hematoxilina e eosina. Os testículos de um ou dois fetos por ninhada foram analisados quanto ao diâmetro dos cordões seminíferos e quanto ao

número de gonócitos por cordão. Em cada testículo foi realizada a medida do diâmetro dos cordões seminíferos (menor diâmetro) em 20 secções transversais circulares escolhidas ao acaso. As medidas foram feitas em imagens capturadas em microscópio óptico (Leica®, Alemanha), acoplado a um sistema de imagens (Leica Microsystems LAS Software, Version 3.5.0, Wetzlar, Germany) em um aumento de 200x. O diâmetro dos cordões foi medido nas imagens capturadas com o auxílio do programa Image Tool versão 3.0 (UTHSCSA, San Antonio, TX, USA).

A quantificação de gonócitos foi realizada por meio da contagem microscópica dos núcleos dessas células (aumento de 400x) em 15 a 20 cordões circulares por testículo escolhidos ao acaso. A contagem bruta foi corrigida pela espessura do corte e pelo diâmetro nuclear dos gonócitos de acordo com a fórmula de Abercrombie (1946):

Contagem corrigida = contagem bruta x (espessura do corte / [espessura do corte + diâmetro nuclear])

O diâmetro nuclear dos gonócitos foi medido nas imagens capturadas (aumento de 630x) com o auxílio do programa Image Tool versão 3.0 (UTHSCSA, San Antonio, TX, USA). Todas as análises histológicas foram feitas sem o conhecimento dos grupos experimentais pelo experimentador (cego).

TABELA 01: ETAPAS DO PROCESSO DE EMBLOCAGEM DE TESTÍCULO FETAL, DESDE A DESIDRATAÇÃO ATÉ A EMBLOCAGEM DO MATERIAL EM PARAPLAST-PLUS.

Protocolo de emblocagem		
Etapas	Solução (%)	Tempo (min)
Desidratação	Etanol (80%)	35
	Etanol (90%)	30
	Etanol (95%)	30
	Etanol (100%)	30
	Etanol (100%)	30
	Etanol (100%)	30
Diafanização	Xilol:Etanol (1:1)	30
	Xilol	15
	Xilol	5
	Xilol	1 a 5
Inclusão	Paraplast-plus	120 a 180
Emblocagem	Paraplast-plus	-

FONTE: O autor (2012).

3.3.3 Determinação dos níveis de testosterona intratesticular

A extração dos esteróides foi feita como descrito por Andrade *et al.* (2006). Os testículos fetais foram homogeneizados individualmente com 200 µL de tampão de Enzimoimunoensaio (NaH_2PO_4 ; Na_2HPO_4 ; NaCl ; pH ajustado para 7,4). Em seguida, os homogenatos foram extraídos com 500 µL de dietil éter sob agitação durante um minuto, sendo a fração etérea separada em um tubo de ensaio. Este procedimento foi repetido mais duas vezes, totalizando 1,5 mL de dietil éter. O volume total de éter foi evaporado em capela e o conteúdo restante reconstituído com o tampão de enzimoimunoensaio. O extrato foi então utilizado para a quantificação dos níveis de testosterona.

A quantificação de testosterona nas amostras foi feita por meio de enzimoimunoensaio (EIE), utilizando-se anticorpos anti-testosterona obtidos da Dra Coralie Munro (University of California), e testosterona conjugada com a enzima peroxidase (Horseradish peroxidase – HRP) como competidora. Os ensaios foram realizados de acordo com Munro *et al.* (1991) e Martino-Andrade *et al.* (2009). Diluições seriadas de “poll” de extratos testiculares produziram curvas de deslocamento paralelo aos padrões e a sensibilidade do ensaio foi de 2,3 pg/poço. As amostras foram medidas em um único ensaio, com um coeficiente de variação intra-ensaio de menos de 10%.

3.4 EXPERIMENTO 2 - EFEITOS TARDIOS DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* AOS ANTIVIRAIS ACICLOVIR E GANCICLOVIR: DESENVOLVIMENTO PUBERAL E PARÂMETROS REPRODUTIVOS NA FASE ADULTA

3.4.1 Animais, separação prepucial, e coleta das amostras na idade adulta

Foram utilizadas 12 progenitoras por grupo experimental, tratadas no 10º dia de gestação com veículo, aciclovir ou ganciclovir. No entanto, nesta etapa, a

gestação não foi interrompida e os filhotes nascidos foram avaliados quanto a possíveis efeitos tardios sobre órgãos reprodutivos. As ratas com lavado vaginal positivo (presença de espermatozóides), mas que não pariram, foram acompanhadas até o 25º dia pós-coito, quando foram eutanasiadas e investigadas quanto a possível presença de sítios de implantação.

Após o parto, os filhotes permaneceram com as progenitoras até o 21º dia pós-natal (desmame). Nesse período, os filhotes foram observados e avaliados quanto a possíveis malformações externas evidentes, como falha na abertura dos olhos e defeitos na cauda. Logo após o desmame, no 21º dia pós-natal, as progenitoras e os filhotes do sexo feminino foram eutanasiados por meio de *overdose* de isoflurano em câmara anestésica e deslocamento cervical, respectivamente.

Os descendentes masculinos das progenitoras tratadas no décimo dia de gestação com os antivirais foram investigados diariamente a partir do 38º dia pós-natal quanto à separação prepucial, marcador externo do início da puberdade em ratos, por meio da retração manual do prepúcio (FIGURA 04). Foi registrado o dia em que ocorreu a completa separação do prepúcio de cada animal. Após essa avaliação, 2 a 3 filhotes machos por ninhada foram selecionados randomicamente e mantidos até o $91^\circ \pm 1$ dia pós-natal, quando foram eutanasiados por decapitação. O sangue desses animais foi coletado e, após centrifugação, o soro foi armazenado a -20°C para posterior análise hormonal por imunensaio. Além disso, foram retirados e pesados os seguintes órgãos e tecidos: fígado, rins, timo, baço, próstata, vesícula seminal, epidídimos, testículos e o complexo “músculo bulbocavernoso/levantador do ânus”. O testículo direito foi fixado em solução de Bouin e posteriormente armazenado em etanol 70%, até o processamento histológico. O testículo esquerdo foi utilizado para a determinação do número de espermátides resistentes à homogeneização. A decapitação foi realizada sem anestesia prévia para evitar a influência dos anestésicos nas dosagens hormonais. Os descendentes masculinos que não foram selecionados para continuarem no estudo após a separação prepucial foram eutanasiados por deslocamento cervical.



FIGURA 04: Retração manual do prepúcio de um rato com separação prepucial completa.
FONTE: O autor (2011).

3.4.2 Histologia testicular

Assim como na histologia testicular fetal, foi feita uma bateria de desidratação e diafanização, seguida de impregnação e emblocagem em Paraplast-plus (TABELA 02). Secções transversais de 6 μm foram obtidas e coradas com hematoxilina e eosina. Os testículos de um animal por ninhada foram avaliados quanto ao diâmetro dos túbulos seminíferos e quanto a presença de alterações morfológicas. Em cada testículo foi realizada a medida do diâmetro em 30 secções transversais circulares (menor diâmetro) escolhidas ao acaso (exceto nos túbulos com malformações, em que foi utilizado um mínimo de 10 e máximo de 30 túbulos circulares). As medidas foram feitas em imagens capturadas em microscópio óptico (Leica®, Alemanha) acoplado a um sistema de imagens (Leica Microsystems LAS Software, Version 3.5.0, Wetzlar, Germany) em um aumento de 100x. O diâmetro

dos túbulos foi medido nas imagens capturadas com o auxílio do programa Image Tool versão 3.0 (UTHSCSA, San Antonio, TX, USA).

TABELA 02: ETAPAS DO PROCESSO DE EMBLOCAGEM DE TESTÍCULO DE ANIMAIS ADULTOS, DESDE A DESIDRATAÇÃO ATÉ A EMBLOCAGEM DO MATERIAL EM PARAPLAST-PLUS.

Protocolo de emblocagem		
Etapas	Solução (%)	Tempo (min)
Desidratação	Etanol (70%)	90
	Etanol (80%)	90
	Etanol (90%)	90
	Etanol (95%)	90
	Etanol (100%)	60
	Etanol (100%)	60
	Etanol (100%)	30
Diafanização	Etanol (100%)	30
	Xilol:Etanol (1:1)	60
	Xilol	40
	Xilol	30
Inclusão	Xilol	15
	Paraplast-plus	120
Emblocagem	Paraplast-plus	120
	-	-

FONTE: O autor (2012).

3.4.3 Contagem de espermátides no testículo

Após a remoção da túnica albugínea, cada testículo foi homogeneizado em 10 mL de cloreto de sódio 0,9% (salina) contendo 0,5% de Triton X-100 em homogeneizador de tecidos por 1 minuto. O homogeneizado foi diluído 10 vezes em solução salina para a contagem microscópica do número de espermátides resistentes a homogeneização (espermátides nos estágios 17 a 19), em câmara hemocitométrica (Bürker, Alemanha), conforme previamente descrito (DALSENTER *et al.*, 1997; ANDRADE *et al.*, 2002). As contagens foram feitas sem o conhecimento dos grupos experimentais pelo experimentador (cego).

3.4.4 Determinação dos níveis séricos de testosterona

A testosterona sérica foi quantificada por enzimoimunoensaio, conforme descrito no item 3.3.3, não havendo, no entanto, a necessidade de extração.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade entre as variâncias foram analisadas através de análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os grupos foram determinadas pelos testes de Tukey. O ganho de peso materno durante a gestação foi avaliado por ANOVA de duas vias, tendo “tempo” e “tratamento” como fatores fixos. As variáveis que não apresentaram distribuição normal ou homogeneidade entre as variâncias foram analisadas através do teste Kruskal-Wallis. Neste caso, as diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste de Dunn. Todos os dados dos descendentes foram avaliados com as ninhadas como unidades estatísticas. O nível de significância utilizado foi de 5% ($p \leq 0,05$). Para a análise estatística e a confecção dos gráficos foram utilizados os programas GraphPad Prism[®] versão 5.0 e SPSS versão 13.0.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1 - EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AOS ANTIVIRAIS ACICLOVIR E GANCICLOVIR SOBRE O TESTÍCULO FETAL

4.1.1 Dados da prenhez

Após o acasalamento, foram obtidas 12 a 14 ratas com presença de espermatozóides no lavado vaginal para cada grupo de tratamento. Desse total, a prenhez foi confirmada em 8 a 11 animais por grupo (TABELA 03). As demais fêmeas não apresentaram sítios uterinos de implantação.

O ganho de peso corporal das progenitoras foi analisado durante todo o período de gestação. Os dados de ganho peso são apresentados como ganho de peso em gramas e ganho de peso percentual em relação ao primeiro dia da gestação. Em ambos os casos não houve diferenças entre os grupos experimentais (FIGURA 05).

Os parâmetros como tamanho da ninhada, número de implantes, perdas pós-implantes e razão sexual também foram analisados, porém não demonstraram qualquer alteração em relação ao grupo controle, com exceção do grupo exposto a menor dose de aciclovir, o qual apresentou um número de implantes maior quando comparado ao controle (TABELA 03).

Os fetos cujas mães foram tratadas com a dose de 300 mg/kg de aciclovir apresentaram uma diminuição significativa do peso corporal ao final da gestação, quando comparados aos animais do grupo controle (veículo). Nos demais grupos não houve diferença no peso dos fetos em relação ao controle (FIGURA 06). Os pesos absolutos e relativos dos órgãos das progenitoras tratadas com os antivirais não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos do grupo controle (TABELA 04).

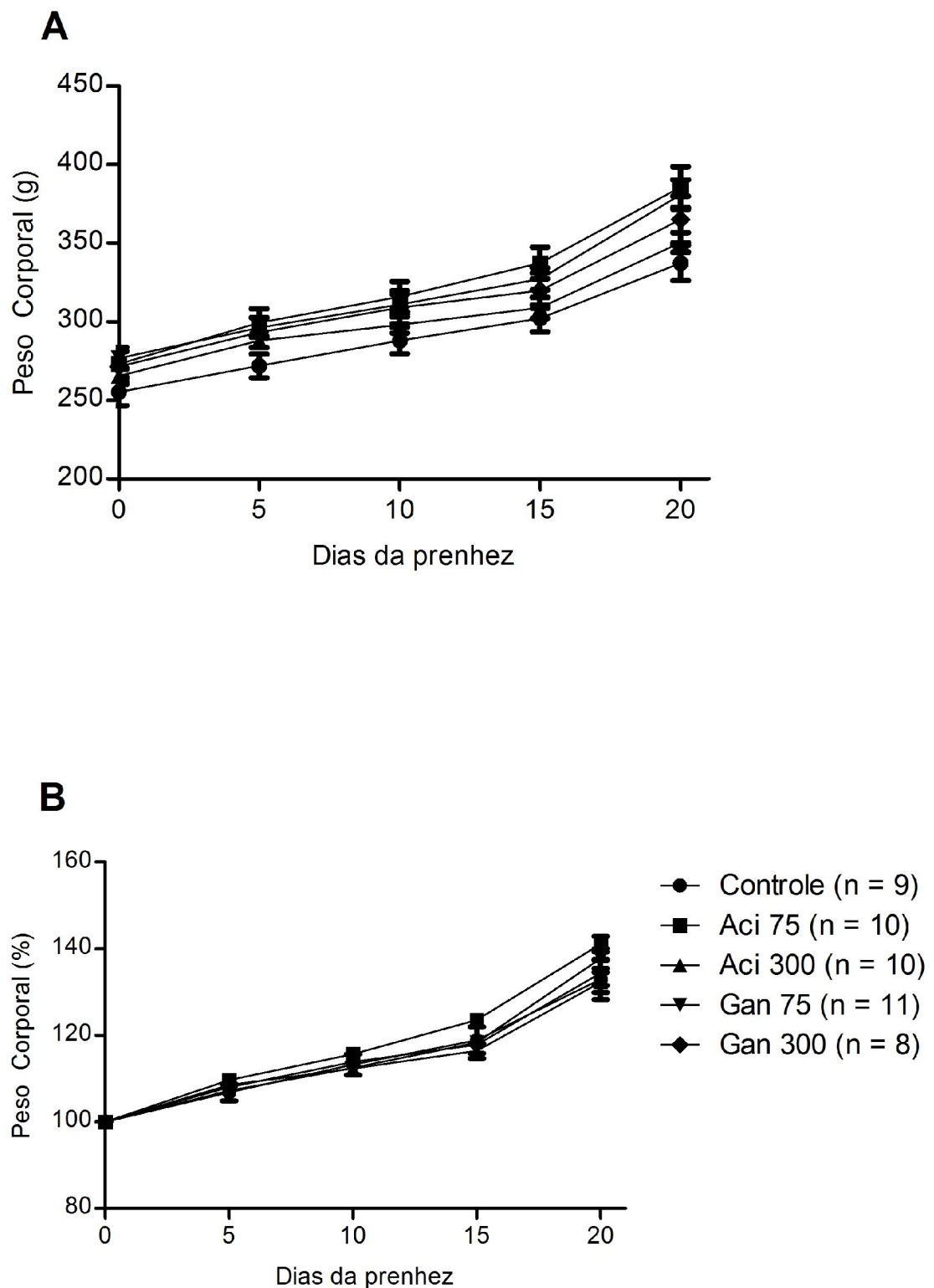


FIGURA 05: (A) Ganho de peso absoluto (g) e (B) ganho de peso percentual em relação ao primeiro dia da gestação das progenitoras tratadas com veículo (controle) ou com os antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan). Os resultados representam média $\pm$ erro padrão da média para cada um dos períodos analisados (ANOVA de duas vias). n = número de ninhadas. A legenda refere-se aos gráficos A e B.

FONTE: O autor (2012).

TABELA 03: ÍNDICES REPRODUTIVOS DE PROGENITORAS TRATADAS PELA VIA SUBCUTÂNEA NO DÉCIMO DIA DE GESTAÇÃO COM OS ANTIVIRAIS ACICLOVIR E GANCICLOVIR, NAS DOSES DE 75 E 300 mg/kg.

Parâmetros	Controle	Aciclovir (mg/kg)		Ganciclovir (mg/kg)	
	0	75	300	75	300
Nº de progenitoras	9	10	10	11	8
Tam. das ninhadas	7,33 ± 4,33	11,5 ± 4,98	9,90 ± 3,11	10,4 ± 2,29	10,2 ± 3,65
Nº de implantes	7,78 ± 3,87	12,5 ± 4,50*	10,4 ± 2,63	11,4 ± 1,80	11,1 ± 3,23
Perdas pós-impl.	0 (0; 67)	0 (0; 54)	0 (0; 43)	8 (0; 40)	3 (0; 33)
Índice de machos(%)	52,0 ± 26,8	52,1 ± 12,5	58,9 ± 19,5	56,9 ± 13,9	51,5 ± 9,72

Nota: Resultados apresentados como média ± desvio padrão (ANOVA/Tukey). Exceto as perdas pós-implantes, que são apresentadas como mediana (mínimo; máximo) (Kruskal-Wallis/Dunn). *Difere significativamente do grupo controle (*p ≤ 0,05; ANOVA/Tukey). Tam. das ninhadas = Tamanho das ninhadas; Perdas pós-impl. = Perdas pós-implantes.

FONTE: O autor (2012).

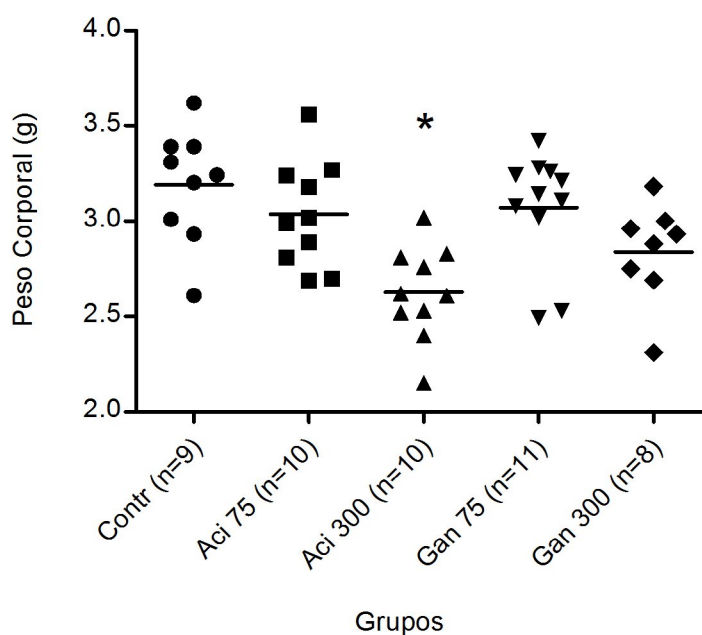


FIGURA 06: Peso corporal de fetos expostos *in utero* aos antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan). As barras horizontais indicam a média de cada grupo tratado. As progenitoras foram tratadas no décimo dia de gestação e eutanasiadas no vigésimo dia para a avaliação do peso fetal. *Difere significativamente do grupo controle (*p ≤ 0,05; ANOVA/Tukey). n = número de ninhadas; Contr = Grupo Controle tratado com veículo (solução salina).

FONTE: O autor (2012).

TABELA 04: PESO ABSOLUTO (g) E RELATIVO (%) DOS ÓRGÃOS DAS PROGENITORAS EXPOSTAS NO DÉCIMO DIA DE GESTAÇÃO AOS ANTIVIRAIS ACICLOVIR E GANCICLOVIR.

Órgão	Controle	Aciclovir (mg/kg)		Ganciclovir (mg/kg)	
	0	75	300	75	300
Nº de progenitoras	9	10	10	11	8
Fígado Absoluto	13,6 ± 2,23	15,7 ± 2,31	14,1 ± 1,60	15,5 ± 1,93	14,8 ± 2,14
Rins Absoluto	0,87 ± 0,08	0,94 ± 0,08	0,92 ± 0,10	0,95 ± 0,09	0,95 ± 0,13
Baço Absoluto	1,01 ± 0,16	1,06 ± 0,15	0,97 ± 0,16	1,05 ± 0,11	1,02 ± 0,20
Timo Absoluto	0,22 ± 0,06	0,26 ± 0,06	0,20 ± 0,04	0,25 ± 0,08	0,30 ± 0,09
Fígado Relativo	4,04 ± 0,45	4,07 ± 0,39	4,02 ± 0,36	4,06 ± 0,33	4,07 ± 0,32
Rins Relativo	0,26 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,26 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,26 ± 0,03
Baço Relativo	0,30 ± 0,03	0,25 ± 0,09	0,28 ± 0,04	0,28 ± 0,04	0,28 ± 0,05
Timo Relativo	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,08 ± 0,02

Nota: Os resultados mostram a média ± desvio padrão (ANOVA/Tukey). O peso relativo do baço foi avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis/Dunn.

FONTE: O autor (2012).

4.1.2 Avaliação reprodutiva dos descendentes machos na fase fetal

Os fetos expostos *in utero* foram avaliados quanto ao *status* androgênico (distância anogenital e concentração de testosterona intratesticular) e quanto a possíveis alterações na histologia testicular.

4.1.2.1 Distância anogenital e concentração de testosterona intratesticular

A distância anogenital (DAG), absoluta e corrigida pela raiz cúbica do peso corporal, foi um dos parâmetros avaliados para verificar se os antivirais poderiam influenciar no padrão de androgenização dos fetos machos. Como demonstrado na FIGURA 07, não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos tratados e o grupo controle para essa variável. Além da DAG, também foram quantificados os níveis de testosterona intratesticular nos fetos eutanasiados no vigésimo dia de gestação. As análises mostraram que os níveis de testosterona (ng/testículo)

encontravam-se reduzidos no grupo exposto à maior dose de aciclovir, quando comparados ao grupo controle (FIGURA 08).

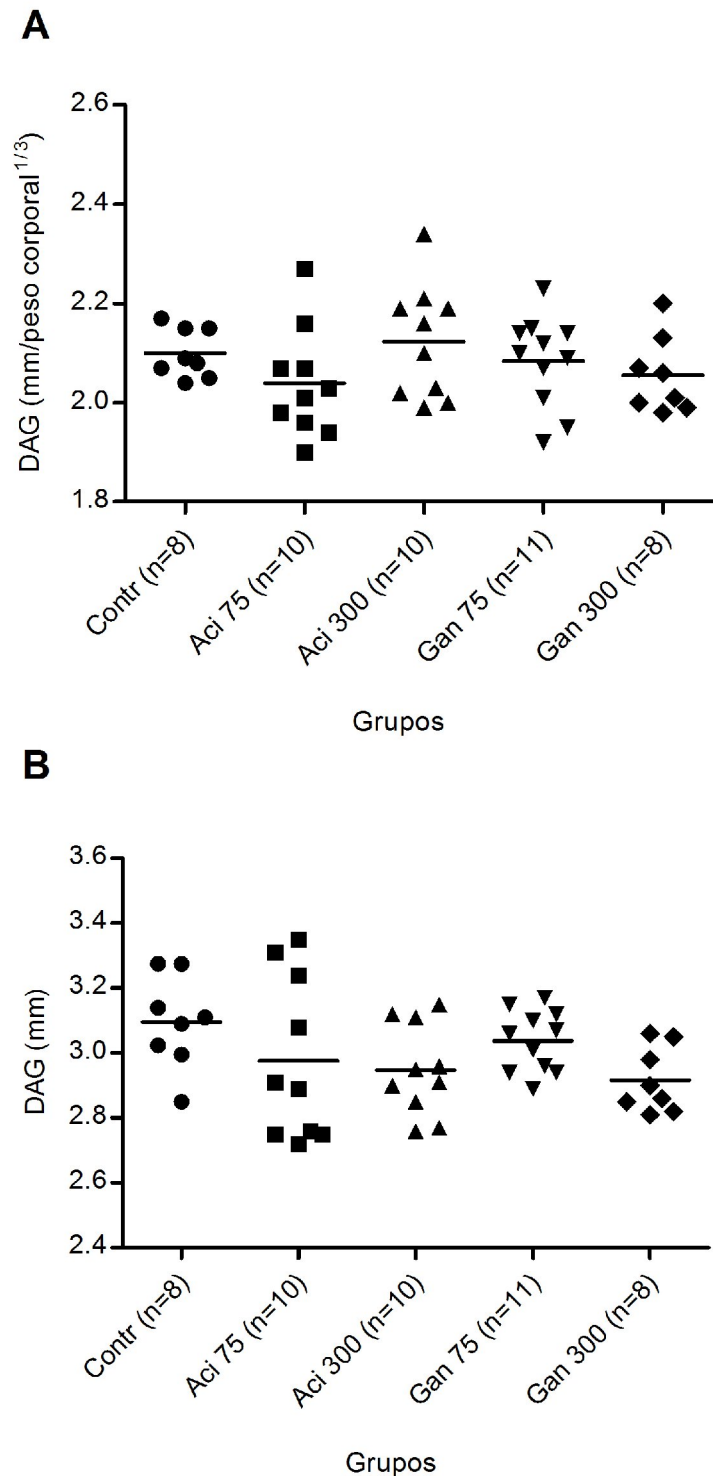


FIGURA 07: Distância anogenital (DAG) de ratos machos expostos *in utero* aos antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan) nas doses de 75 e 300 mg/kg. A) DAG corrigida pela raiz cúbica do peso corporal. B) DAG absoluta (mm). As linhas horizontais indicam média da DAG das ninhadas de cada grupo de tratamento (ANOVA/Tukey). n = número de ninhadas; Contr = Grupo Controle tratado com veículo (solução salina).
 FONTE: O autor (2012).

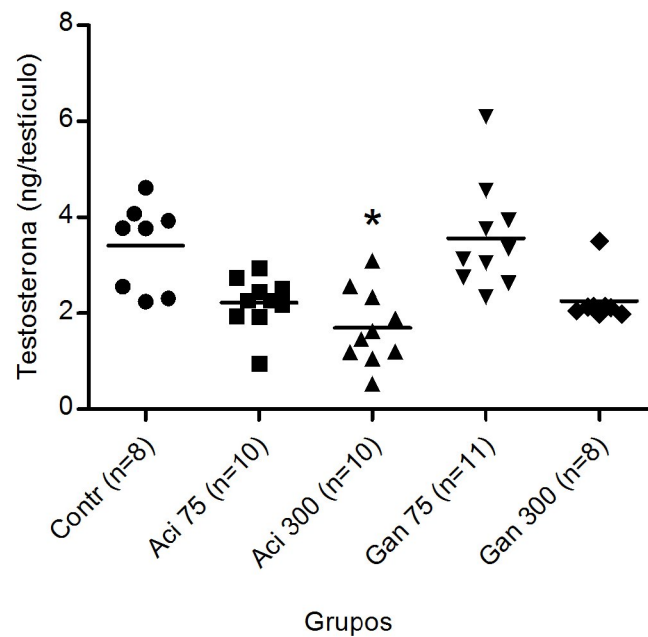


FIGURA 08: Dosagem de testosterona intratesticular (ng/testículo) de animais expostos *in utero* aos antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan). *Difere significativamente do grupo controle (* $p \leq 0,05$; Kruskal-Wallis/Dunn). n = número de ninhadas; Contr = Grupo Controle tratado com veículo (solução salina).

FONTE: O autor (2012).

4.1.2.2 Histologia testicular fetal

Análises dos cortes histológicos dos testículos fetais revelaram que o diâmetro dos cordões seminíferos dos animais expostos à maior dose de ganciclovir é significativamente menor quando comparado ao grupo controle (FIGURA 09). O número de gonócitos por cordão também foi significativamente reduzido nesse grupo (FIGURA 10). Como podem ser observados na FIGURA 11, os testículos fetais dos animais expostos à maior dose de ganciclovir apresentaram secções transversais de cordões seminíferos com ausência total de gonócitos.

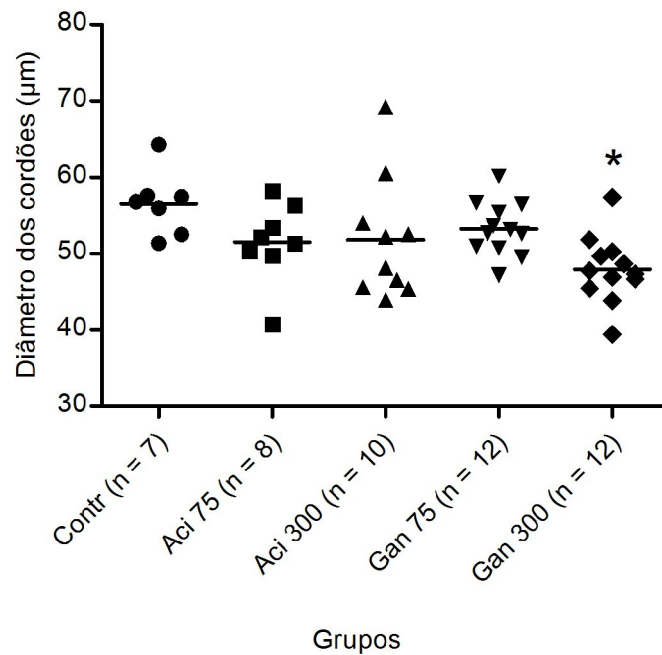


FIGURA 09: Diâmetro dos cordões seminíferos (μm) de animais expostos no décimo dia de gestação aos antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan) nas doses de 75 e 300 mg/kg. *Difere significativamente do grupo controle (* $p \leq 0,05$; ANOVA/Tukey). n = número de ninhadas; Contr = Grupo Controle tratado com veículo (solução salina).
 FONTE: O autor (2012).

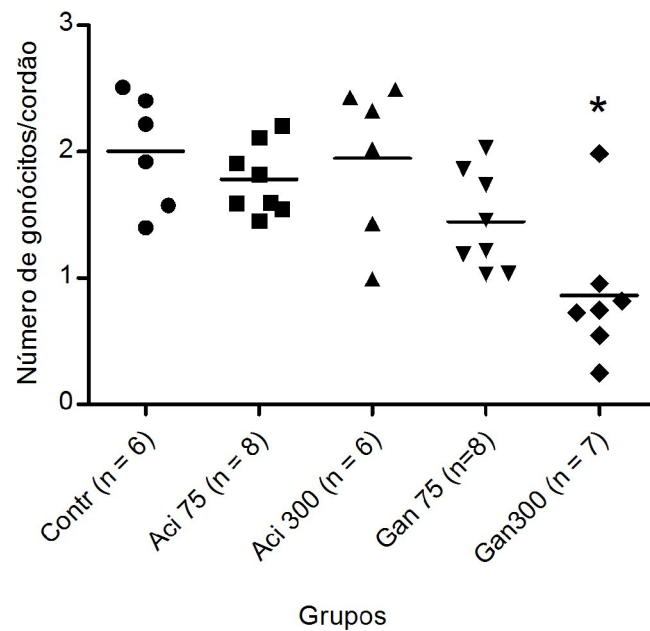


FIGURA 10: Quantificação de gonócitos em fetos expostos *in utero* aos antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan). O número de gonócitos por cordão foi corrigido pela espessura do corte histológico e pela média do diâmetro dos núcleos dos gonócitos. *Difere significativamente do grupo controle (* $p \leq 0,05$; ANOVA/Tukey). Contr = Grupo Controle.
 FONTE: O autor (2012).

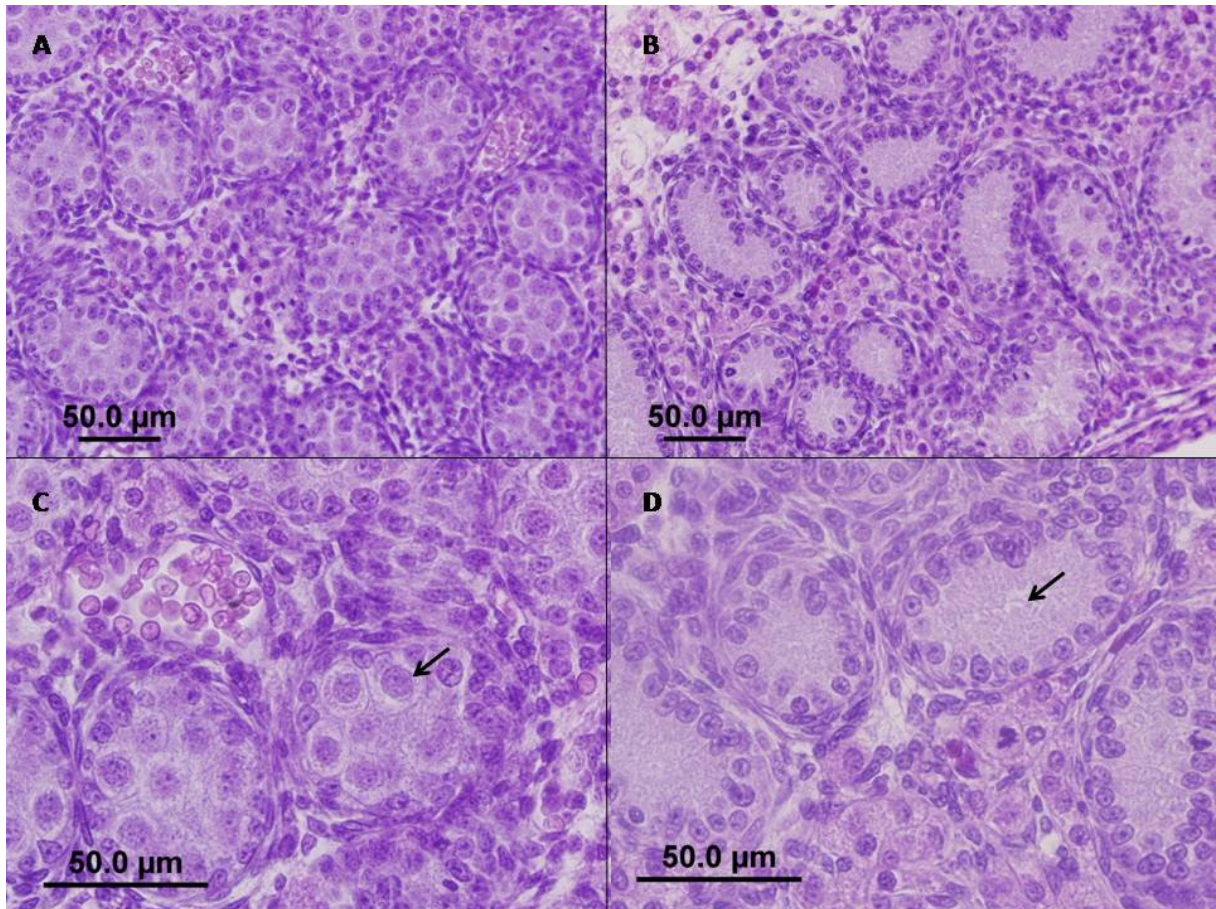


FIGURA 11: Secções de cordões seminíferos de testículos fetais de ratos expostos no décimo dia de gestação aos antivirais aciclovir e ganciclovir. A e C) Ratos expostos ao veículo; B e D) Grupo exposto ao ganciclovir 300 mg/kg. As setas indicam presença de gonócitos nos cordões seminíferos de testículo fetal exposto ao veículo (C) e ausência de gonócitos nos cordões de testículo fetal exposto ao ganciclovir na dose de 300 mg/kg (D).

FONTE: O autor (2012).

4.2 EXPERIMENTO 2 - EFEITOS TARDIOS DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* AOS ANTIVIRAIS ACICLOVIR E GANCICLOVIR: DESENVOLVIMENTO PUBERAL E PARÂMETROS REPRODUTIVOS NA FASE ADULTA

Um segundo experimento foi conduzido para avaliar os possíveis efeitos pós-natais da exposição *in utero* aos antivirais aciclovir e ganciclovir. Assim como no primeiro experimento, ratas prenhes foram tratadas com três aplicações subcutâneas dos antivirais no décimo dia de gestação. Após o nascimento, os descendentes masculinos foram avaliados quanto ao desenvolvimento ponderal e quanto a idade para a separação prepucial. Na idade adulta, foram avaliados o peso

de órgãos reprodutivos, contagem de espermátides, histologia testicular e a concentração sérica de testosterona.

4.2.1 Dados da prenhez

Foram obtidas 12 ratas com lavados vaginais positivos (presença de espermatozóides) para cada grupo de tratamento. Desse total, a prenhez foi confirmada em 9 a 12 animais por grupo. As ratas que não tiveram filhotes até o 25º dia pós-coito foram eutanasiadas e o útero foi observado para verificar os possíveis sítios de implantação. A maior parte das fêmeas sem evidência de prenhez (ganho de peso) não pariu e não apresentou sítios de implantação no dia 25 pós-coito. Em apenas uma dessas fêmeas, tratada com ganciclovir 300 mg/kg, foram observados sítios de implantação, indicando que houve reabsorção total. Além disso, duas ninhadas não apresentaram filhotes vivos no dia do nascimento, sendo observados apenas filhotes mortos nas caixas (uma ninhada do grupo controle e outra do grupo aciclovir 300 mg/kg).

O ganho de peso corporal, reportado como ganho absoluto (g) ou relativo (%) ao primeiro dia de gestação, não foi diferente entre os grupos experimentais. Além disso, o peso das progenitoras também foi acompanhado durante o período de lactação e não demonstrou diferença entre os grupos (dados não mostrados).

O ganho de peso da ninhada foi acompanhado durante todo o período de lactação (FIGURA 12) e, assim como para as progenitoras, não houve diferença entre os grupos. Após o período de lactação, somente o desenvolvimento ponderal dos descendentes do sexo masculino foi avaliado. Como demonstrado na FIGURA 13, não houve diferença significativa no ganho de peso do desmame até a idade adulta (91º dia pós-natal) entre os grupos experimentais. Além disso, no período de lactação, os animais foram avaliados quanto a possíveis malformações externas evidentes, especialmente na região da cabeça e da cauda. Foram observados problemas oftalmológicos em cinco animais de três ninhadas diferentes (pálpebra avermelhada, com aspecto de sangue coagulado) do grupo tratado com a maior dose de aciclovir (300 mg/kg). Malformações no desenvolvimento caudal, com padrões de forquilha e formato de hélice, foram observadas em três animais de uma

das ninhadas tratadas com a maior dose de aciclovir e em um animal tratado com a maior dose de ganciclovir. Além disso, os filhotes de uma ninhada do grupo aciclovir 300 mg/kg eram visivelmente menores que os filhotes das demais ninhadas e permaneceram com um peso corporal inferior à média do grupo durante todo o período de lactação: peso do grupo aciclovir 300 mg/kg ao nascimento (média $\pm$ desvio padrão) = $5,9 \pm 0,76$ g; peso da ninhada afetada = 4,2 g; peso do grupo aciclovir 300 mg/kg ao desmame (média $\pm$ desvio padrão) = $40,3 \pm 8,71$ g; peso da ninhada afetada = 17,4 g). A viabilidade dos filhotes dessa ninhada foi severamente afetada, sendo que após o desmame não restaram filhotes machos vivos.

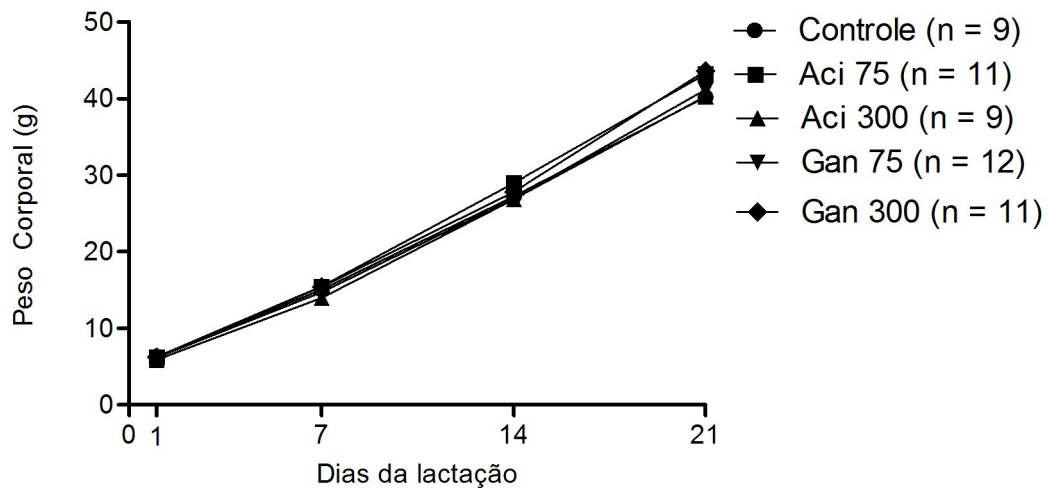


FIGURA 12: Ganho de peso corporal (g), no período de lactação, de ratos expostos *in utero*, no 10º dia de gestação, aos antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan). O 1º dia da lactação corresponde ao dia do nascimento e o 21º ao dia do desmame (ANOVA de duas vias). n = número de ninhadas.
FONTE: O autor (2012).

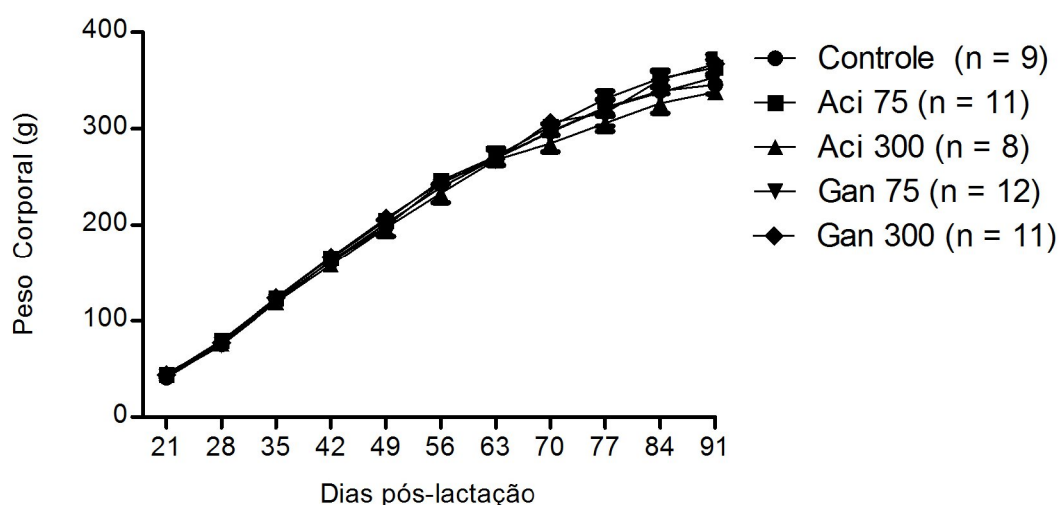


FIGURA 13: Ganho de peso corporal (g) dos indivíduos machos, expostos *in utero* aos antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan). O peso foi registrado a cada 7 dias, desde o desmame (21º dia) até o 91º dia pós-natal (ANOVA de duas vias). n = número de ninhadas.

Nota: para os animais eutanasiados no dia 90 pós-natal, foi utilizado o peso corporal obtido no dia da eutanásia como equivalente ao peso do dia 91 pós-natal.

FONTE: O autor (2012).

4.2.2 Separação prepucial

Os indivíduos machos foram acompanhados diariamente desde o trigésimo oitavo dia pós-natal quanto à separação prepucial, marcador externo do início da puberdade em ratos. Como demonstrado na TABELA 05, não foram observadas diferenças significativas no dia médio de separação prepucial entre os grupos experimentais.

4.2.3 Avaliação reprodutiva dos descendentes masculinos na fase adulta

Na idade adulta, os descendentes masculinos foram eutanasiados para a avaliação dos efeitos dos antivirais sobre o peso de órgãos, número de espermátides e histologia testicular.

4.2.3.1 Pesos absolutos e relativos dos órgãos

Os pesos absolutos e relativos do fígado, rins, baço, e de alguns órgãos e tecidos reprodutivos, incluindo próstata, vesícula seminal e músculo levantador do ânus/bulbocavernoso são apresentados nas TABELAS 05 e 06. O peso absoluto e relativo do timo é mostrado na FIGURA 14. Os pesos dos epidídimos e testículos também foram avaliados e são mostrados nas FIGURAS 15 e 16, respectivamente. Houve uma redução no peso absoluto do timo no grupo exposto ao Aciclovir 300 mg/kg em relação ao controle (FIGURA 14), porém essa diferença não foi significativa (ANOVA: $p = 0.053$; Tukey: Controle *versus* Aciclovir 300 mg/kg; $p = 0.064$). Para os demais órgãos, não foram observadas diferenças significativas nos pesos avaliados, com exceção dos testículos e epidídimos. Os pesos absolutos e relativos dos epidídimos dos animais expostos ao ganciclovir 300 mg/kg foram significativamente reduzidos em relação ao grupo controle (FIGURA 15). Além disso, foi observado um aumento no peso do epidídimo no grupo aciclovir 75 mg/kg, porém apenas para os dados de peso absoluto (FIGURA 15). Também foi observada uma redução significativa no peso relativo dos testículos dos animais expostos ao ganciclovir 300 mg/kg, quando comparado ao grupo controle (FIGURA 16). Com relação ao peso absoluto dos testículos, 4 em 11 ninhadas apresentaram valor médio igual ou inferior a 1,27g no grupo ganciclovir 300 mg/kg e 1 em 9 ninhadas no grupo aciclovir 300 mg/kg. No grupo controle, o valor mínimo observado para o peso testicular médio das ninhadas foi de 1,43g, sendo que o valor de 1,27g corresponde a média desse grupo menos 3 desvios padrões ($1,545 \text{ g} - [3 \times 0,091 \text{ g}] = 1,27 \text{ g}$).

TABELA 05: IDADE DA SEPARACAO PREPUCIAL (DIAS), PESO ABSOLUTO (g) DOS ÓRGÃOS E TESTOSTERONA SÉRICA (ng/mL) DE RATOS MACHOS EXPOSTOS *IN UTERO* AOS ANTIVIRAIS ACICLOVIR E GANCICLOVIR.

	Controle	Aciclovir (mg/kg)		Ganciclovir (mg/kg)	
	0	75	300	75	300
N. progenitoras	9	11	8	12	11
Peso corporal	346 ± 26,7	366 ± 25,1	338 ± 21,6	353 ± 22,6	367 ± 33,6
Sep. Prepucial	47,4 ± 2,66	48,6 ± 2,84	49,4 ± 2,31	49,6 ± 2,45	51,4 ± 5,63
Próstata	0,27 ± 0,03	0,30 ± 0,06	0,24 ± 0,04	0,25 ± 0,04	0,28 ± 0,05
Vesícula Seminal	0,54 ± 0,07	0,58 ± 0,10	0,48 ± 0,10	0,49 ± 0,08	0,53 ± 0,06
MLA	0,92 ± 0,05	0,95 ± 0,07	0,84 ± 0,09	0,90 ± 0,09	0,94 ± 0,09
Fígado	12,9 ± 1,10	13,7 ± 1,80	12,1 ± 1,31	13,2 ± 1,72	13,9 ± 1,44
Rins	1,23 ± 0,10	1,27 ± 0,13	1,18 ± 0,11	1,20 ± 0,12	1,24 ± 0,12
Baço	0,94 ± 0,24	1,08 ± 0,24	1,08 ± 0,25	1,02 ± 0,31	0,83 ± 0,10
Testosterona sérica	1,89 ± 0,89	1,54 ± 0,63	1,52 ± 1,08	1,77 ± 1,08	1,50 ± 0,90

Nota: Os resultados representam média ± desvio padrão. (ANOVA/Tukey); N. progenitoras = Número de progenitoras; Sep. Prepucial = Dia médio de separação prepucial (Kruskal-Wallis/Dunn); MLA = músculo levantador do ânus/bulbocavernoso.

FONTE: O autor (2012).

TABELA 06: PESO RELATIVO (%) DOS ÓRGÃOS DE RATOS MACHOS EXPOSTOS *IN UTERO* AOS ANTIVIRAIS ACICLOVIR E GANCICLOVIR.

	Controle	Aciclovir (mg/kg)		Ganciclovir (mg/kg)	
		75	300	75	300
N. progenitoras	9	11	8	12	11
Próstata	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01
Vesícula Seminal	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,14 ± 0,03	0,14 ± 0,02	0,15 ± 0,02
MLA	0,27 ± 0,03	0,26 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,25 ± 0,03	0,26 ± 0,02
Fígado	3,75 ± 0,35	3,72 ± 0,26	3,54 ± 0,21	3,72 ± 0,25	3,79 ± 0,16
Rins	0,36 ± 0,03	0,35 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,34 ± 0,02
Baço	0,27 ± 0,08	0,29 ± 0,05	0,32 ± 0,08	0,28 ± 0,09	0,23 ± 0,03

Nota: Os resultados mostram as médias ± desvio padrão. (ANOVA/Tukey). N. progenitoras = Número de progenitoras; MLA = músculo levantador do ânus/bulbocavernoso (Kruskal-Wallis/Dunn).

FONTE: O autor (2012).

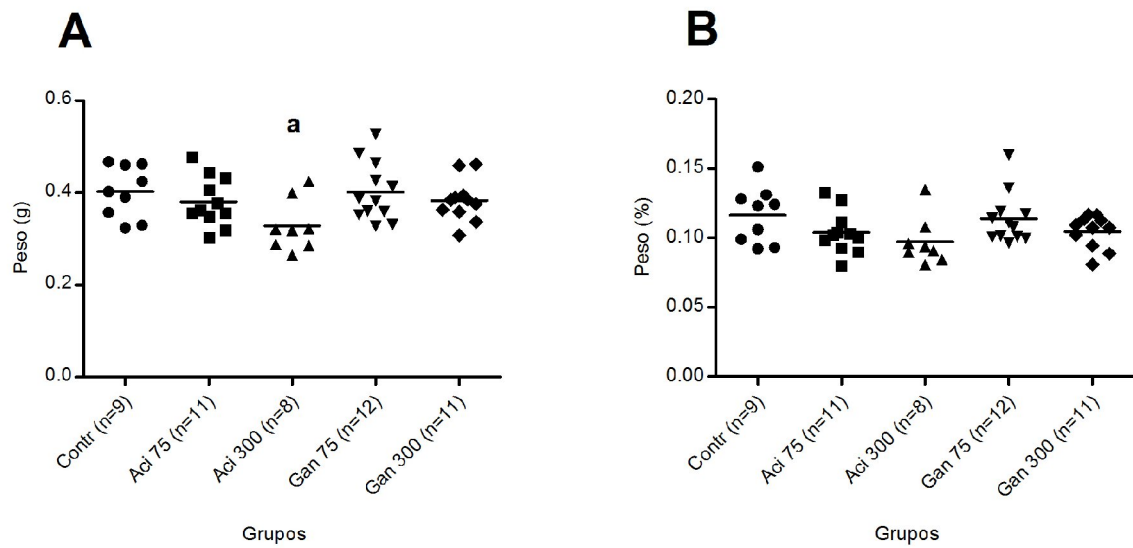


FIGURA 14: Pesos absolutos (A) e relativos (B) dos timos de ratos expostos *in utero* ao veículo (Contr) e aos antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan). n = número de ninhadas. ^ap = 0,053 (ANOVA) e p = 0,064 (Tukey).
 FONTE: O autor (2012).

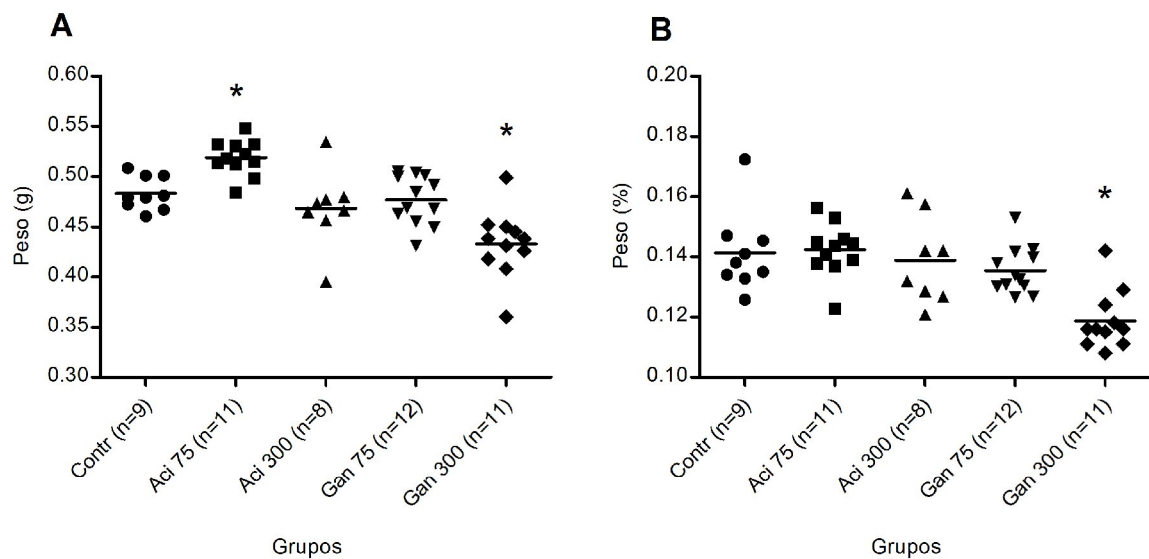


FIGURA 15: A) Peso absoluto (ANOVA/Tukey) e B) relativo (Kruskal-Wallis/Dunn) dos epidídimos de ratos expostos *in utero* ao veículo e aos antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan). As linhas horizontais indicam a média de cada grupo de tratamento. A) Peso absoluto (g). B) Peso relativo (%). *Difere significativamente do grupo controle (*p ≤ 0,05). n = número de ninhadas; Contr = Grupo Controle.
 FONTE: O autor (2012).

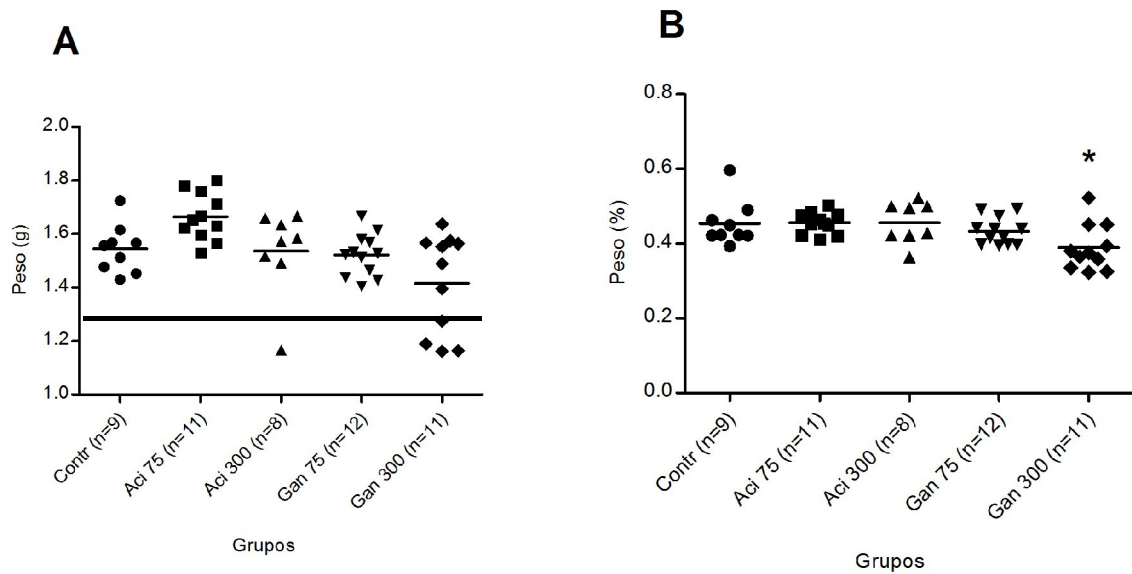


FIGURA 16: A) Peso absoluto (g) e B) relativo (%) dos testículos de ratos expostos no décimo dia de gestação às doses de 75 e 300 mg/kg aos antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan). As linhas horizontais representam a média de cada grupo tratado. *Difere significativamente do grupo controle (* $p \leq 0,05$; ANOVA/Tukey). n = número de ninhadas; Contr = Grupo Controle. No gráfico “A”, a linha horizontal indica o valor de 1,27g, que corresponde a média do grupo controle menos 3 desvios padrões ($1,545 \text{ g} - [3 \times 0,091 \text{ g}] = 1,27 \text{ g}$). FONTE: O autor (2012).

4.2.3.2 Dosagem de testosterona sérica

A exposição *in utero* aos antivirais não alterou a concentração sérica de testosterona nos animais adultos, não sendo observadas diferenças entre os grupos tratados e o grupo controle (TABELA 05).

4.2.3.3 Número de espermátides resistentes à homogeneização

A FIGURA 17 mostra o número de espermátides resistentes à homogeneização nos ratos machos adultos que foram expostos ao veículo ou aos antivirais no período de gestação. A exposição *in utero* ao ganciclovir na dose de 300 mg/kg reduziu em cerca de 15% o número de espermátides no testículo em relação aos animais do grupo controle ($p \leq 0,05$, ANOVA/Tukey). O número médio

de espermátides no grupo ganciclovir 300 mg/kg foi de 223,8 milhões de espermátides por testículo enquanto no grupo controle o valor médio observado foi de 264,2 milhões.

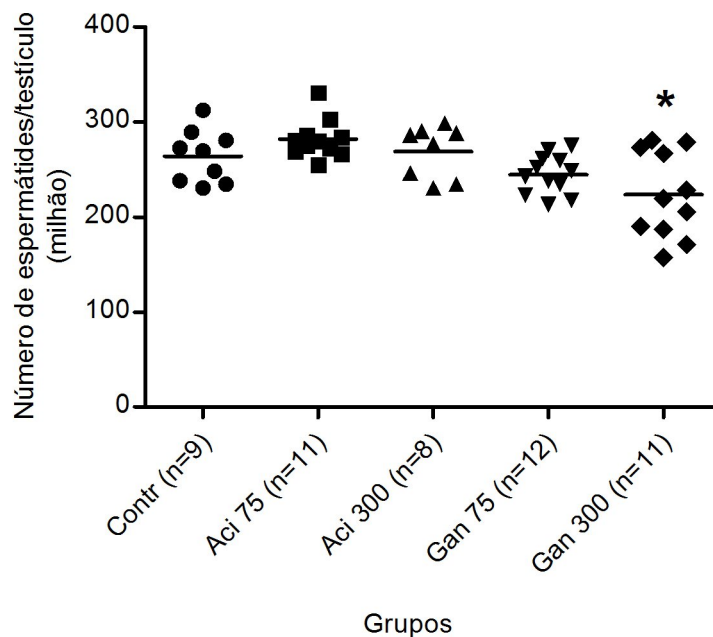


FIGURA 17: Número total de espermátides resistentes à homogeneização por testículo. Os pontos representam a média da contagem de espermátides de cada ninhada e as barras horizontais indicam a média de cada grupo de tratamento. O número total de espermátides diminuiu no grupo de ganciclovir (Gan) 300 mg/kg (* $p \leq 0,05$; ANOVA/Tukey). n = número de ninhadas; Aci = Grupo Aciclovir; Contr = Grupo Controle.
FONTE: O autor (2012).

4.2.3.4 Histologia testicular

Nos cortes histológicos de testículos do grupo exposto *in utero* a maior dose de ganciclovir, foram encontrados padrões de malformação dos túbulos seminíferos. Foi observada uma grande quantidade de túbulos atrofiados entre os túbulos normais, muitas vezes com ausência total de células germinativas e apenas a presença de células de Sertoli (*Sertoli cell-only syndrome*) (FIGURA 18). Os túbulos anormais muitas vezes apresentavam vacuolizações e ausência de lúmen tubular. Os túbulos seminíferos atrofiados, com células germinativas escassas ou ausentes,

foram observados somente em animais do grupo exposto à maior dose de ganciclovir (300 mg/kg). Tais alterações foram observadas em 8 animais, provenientes de 8 diferentes ninhadas, sendo um total de 10 ninhadas investigadas histologicamente nesse grupo.

Considerando a presença de túbulos severamente atrofiados no grupo ganciclovir 300 mg/kg, as medidas de diâmetro foram feitas separadamente tanto para túbulos considerados normais (com presença de células germinativas nos túbulos) quanto para túbulos atrofiados, definidos como túbulos com ausência ou escassez severa de células germinativas. Como demonstrado na FIGURA 19, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, quando considerados apenas os túbulos normais. No entanto, os túbulos atróficos (“malformados”), presentes apenas no grupo Ganciclovir 300 mg/kg, apresentaram redução significativa nos diâmetros quando comparados ao controle (* $p \leq 0,05$). É possível observar nas FIGURAS 18 e 19 que existem duas populações distintas de túbulos seminíferos, “normais” e “atróficos”, em alguns animais do grupo ganciclovir 300 mg/kg.

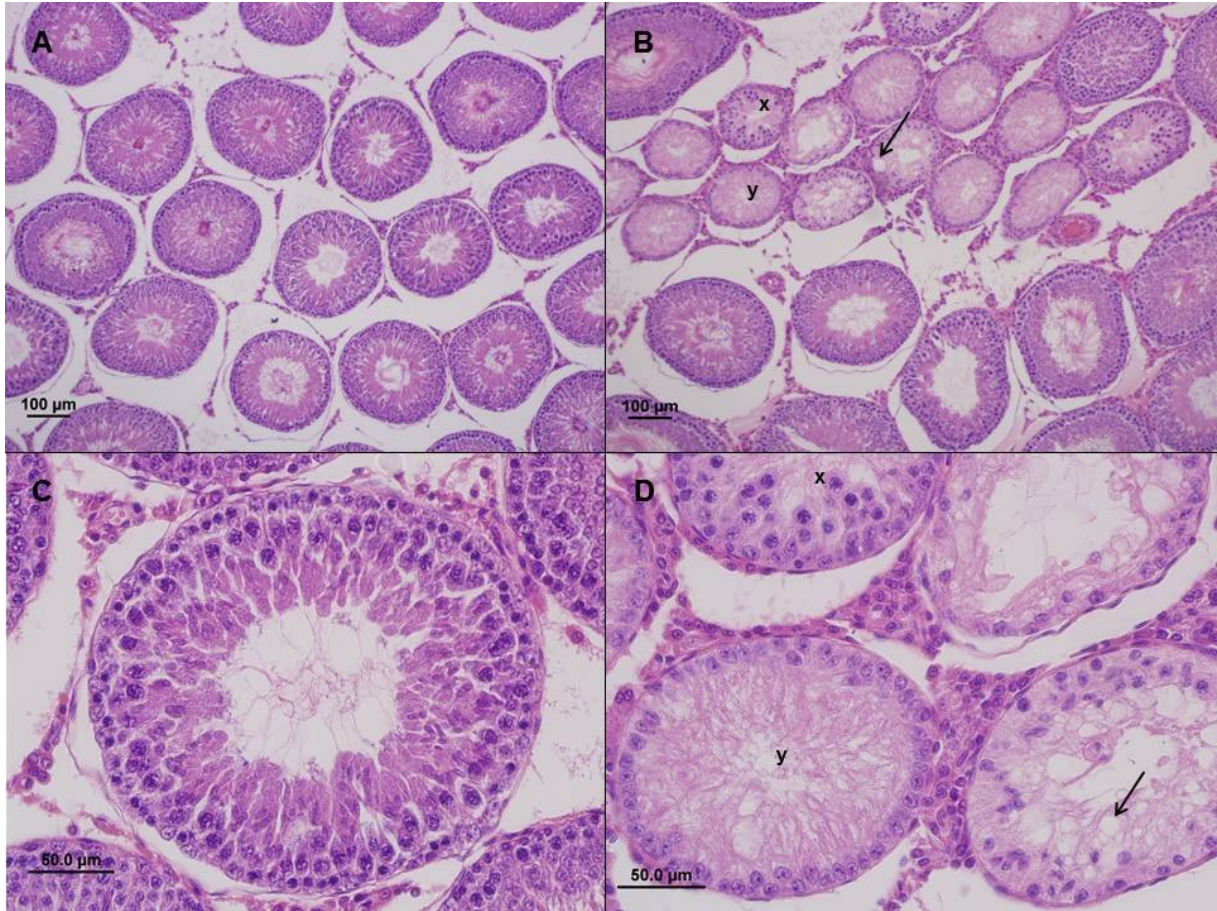


FIGURA 18: Túbulos seminíferos de ratos adultos (90 ± 1 dia) expostos *in utero* ao veículo (controle) e ao antiviral ganciclovir, no décimo dia de gestação. A e C) Ratos expostos ao veículo; B e D) Grupo exposto ao ganciclovir 300 mg/kg. Os testículos do grupo ganciclovir apresentam túbulos severamente atrofiados com redução do diâmetro e com escassez na população de células germinativas (x). Alguns túbulos apresentam depleção total de células germinativas (y) (*Sertoli cell-only syndrome*), vacuolizações (indicadas pelas setas) e ausência de lúmen tubular.

FONTE: O autor (2012).

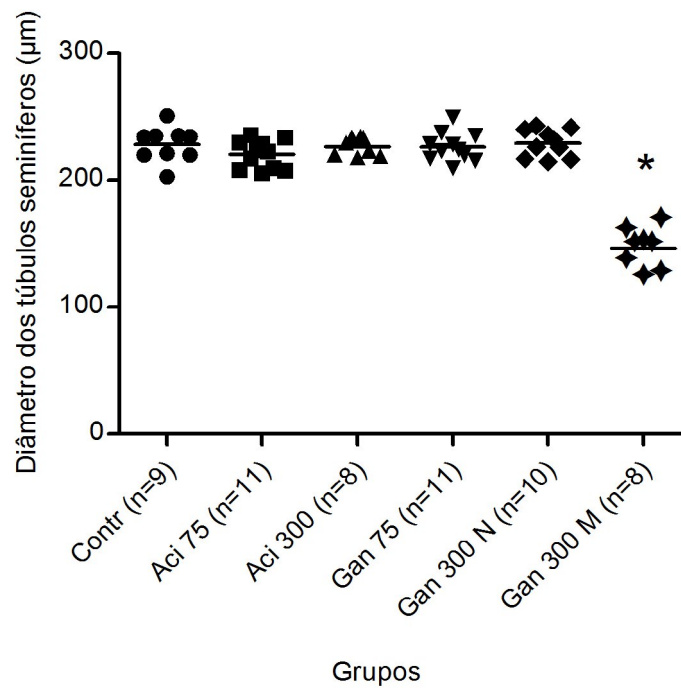


FIGURA 19: Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm) de ratos adultos expostos ao veículo (Contr) e aos antivirais aciclovir (Aci) e ganciclovir (Gan) no décimo dia de gestação. Gan 300 N representa os túbulos normais e o Gan 300 M representa os túbulos com malformação (atrofia) no grupo exposto ao Ganciclovir 300 mg/kg. *Difere significativamente do grupo controle (* $p \leq 0,05$; ANOVA/Tukey). n = número de ninhadas.

FONTE: O autor (2012).

TABELA 07: RESUMO DOS EFEITOS PRECOCES E TARDIOS OBSERVADOS APÓS EXPOSIÇÃO *IN UTERO* AOS ANTIVIRAIS ACICLOVIR E GANCICLOVIR

	Dose (mg/kg)	Aciclovir	Ganciclovir
	75	↑ n° de implantes	
Efeitos precoces	300	↓ Peso Corporal dos fetos no 20° dia de gestação	↓ Diâmetro dos cordões seminíferos
		↓ [Testosterona intratesticular]	↓ N° de gonócitos por cordão seminífero
	75	↑ Peso absoluto do epidídimo	
Efeitos tardios		↓ Peso absoluto do timo	↓ Peso absoluto do epidídimo
			↓ Peso relativo do epidídimo
	300		↓ Peso relativo do testículo
			↓ Contagem de espermátides por testículo
			↓ Diâmetro dos túbulos seminíferos

Nota: ↓ = Redução; ↑ = Aumento; [Testosterona intratesticular] = Concentração de testosterona intratesticular.

FONTE: O autor (2012).

5 DISCUSSÃO

A exposição a xenobióticos no período pré-natal pode causar diversos distúrbios, incluindo efeitos precoces e tardios sobre a morfologia e função de componentes do sistema reprodutivo. A diferenciação gonadal, determinada pelo sexo genético, ocorre em estágios iniciais do desenvolvimento embrionário de mamíferos e é essencial para as etapas posteriores da diferenciação sexual. Embora muitas substâncias químicas possam afetar o desenvolvimento fenotípico do sistema reprodutivo masculino (ex.: antiandrógenos), a interferência sobre os processos de diferenciação gonadal é menos conhecida. No presente estudo, foram investigados os efeitos causados em ratos expostos *in utero* aos antivirais aciclovir e ganciclovir em uma estreita janela do desenvolvimento pré-natal. Os resultados obtidos demonstraram que a administração pontual do ganciclovir em ratas gestantes em um único dia do período gestacional - décimo dia de gestação - foi capaz de produzir efeitos testiculares precoces e tardios sobre os descendentes masculinos e esses efeitos podem ter causado consequências irreversíveis para os descendentes. Esses efeitos sobre o desenvolvimento e função testicular foram observados apenas no grupo ganciclovir 300 mg/kg, indicando que o aciclovir apresenta um diferente espectro de toxicidade. O décimo dia de gestação é um período crítico no desenvolvimento reprodutivo em roedores, pois a partir dessa fase a gônada bipotencial é guiada a se diferenciar para definir o sexo gonadal (ROSS e CAPEL, 2005).

As doses, a via, o período de exposição pré-natal, bem como os intervalos de administração dos antivirais aciclovir e ganciclovir foram baseados em estudos prévios de Stahlmann *et al.* (1987, 1988); Hartmann *et al.* (1991) e Faqi *et al.* (1997). Dados desses estudos demonstraram que as doses e os intervalos da administração dos antivirais utilizados no presente estudo não causam toxicidade materna e não prejudicam o funcionamento renal das progenitoras, ao contrário de outros protocolos de exposição contínua com doses acima de 50 mg/kg/dia, que promovem a cristalização dessas drogas nos túbulos renais (STAHLMANN *et al.*, 1988). Além disso, Stahlmann e colaboradores (1987) demonstraram que a administração subcutânea em ratos, nas condições descritas no presente estudo, é capaz de produzir concentrações plasmáticas próximas daquelas observadas em

seres humanos tratados pela via endovenosa. Por exemplo, a concentração plasmática máxima atingida em ratas gestantes (n=6), 90 minutos após uma injeção subcutânea de 100 mg/kg de aciclovir no 10º dia de gestação, foi de 99 ± 22 mg/L. Isso corresponde a sete vezes as concentrações plasmáticas observadas 60 minutos após a injeção intravenosa de uma dose terapêutica de 10 mg/kg em humanos ($15 \pm 2,3$ mg/L) (STAHLMANN *et al.*, 1987).

5.1 DADOS DA PRENHEZ E EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO GERAL DA PROGENIE

Na investigação de efeitos induzidos pela exposição *in utero* a substâncias químicas, é importante avaliar se os efeitos observados nos descendentes expostos não são consequência de toxicidade materna. Na avaliação dos efeitos precoces dos antivirais (experimento 1), não foram observadas alterações no ganho de peso corporal das progenitoras durante o período de gestação, assim como não houve alterações nos tamanhos das ninhadas e nas perdas pós-implante, indicando ausência de toxicidade materna. Mamede *et al.* (1995) reportou uma diminuição significativa no ganho de peso corporal das progenitoras tratadas com aciclovir na dose de 60 mg/kg de peso corporal, entretanto, nesse estudo, as progenitoras foram tratadas continuamente com o antiviral do primeiro ao vigésimo dia de gestação, indicando que o protocolo de tratamento com doses repetidas pode ter causado toxicidade sistêmica materna. Por outro lado, os resultados do presente estudo mostraram que o peso das ninhadas, avaliado no 20º dia de gestação, foi significativamente menor no grupo aciclovir 300 mg/kg quando comparado ao grupo controle, resultados que estão de acordo com os dados reportados por Chahoud *et al.* (1988) e Mamede *et al.* (1995).

O ganho de peso das progenitoras durante o período de gestação e lactação no segundo experimento (investigação dos efeitos tardios) não foi alterado pela administração dos antivirais no 10º dia de gestação, confirmando a ausência de toxicidade materna no período gestacional e também no período de lactação. Além disso, o ganho de peso das ninhadas do primeiro ao vigésimo primeiro dia de lactação não foi diferente do ganho de peso observado nas ninhadas expostas ao

veículo, evidenciando que a exposição aos fármacos não afetou o desenvolvimento geral dos filhotes. O peso corporal no período pós-desmame, monitorado semanalmente do 21º ao 91º dia de vida, também não foi afetado pela exposição *in utero* aos antivirais. Entretanto, apesar do aparente desenvolvimento normal da prole, foram observados alguns problemas oftalmológicos em filhotes de três ninhadas expostas à maior dose de aciclovir, com padrões de vermelhidão na pálpebra e, em um dos casos, ausência completa da abertura dos olhos. Além disso, malformações caudais foram observadas em três animais expostos à maior dose de aciclovir (uma ninhada) e em um animal exposto à maior dose de ganciclovir. Estes dados são consistentes com os resultados encontrados por Stahlmann e colaboradores (1987) ao administrar aciclovir em ratas gestantes no mesmo período de desenvolvimento.

5.2 EFEITOS DOS ANTIVIRAIS ACICLOVIR E GANCICLOVIR SOBRE O *STATUS ANDROGÊNICO*.

A distância anogenital não foi alterada nas ninhadas expostas aos antivirais em comparação ao grupo controle. Já os níveis de testosterona intratesticular se mostraram reduzidos, mas apenas no grupo exposto à maior dose de aciclovir. Esse efeito sobre os níveis de testosterona intratesticular é aparentemente conflitante com a ausência de efeitos sobre a distância anogenital, marcador externo do grau de androgenização pré-natal em ratos. Entretanto, é importante destacar que a janela crítica para a determinação da distância anogenital e masculinização do trato reprodutor masculino em ratos ocorre entre os dias 16 e 19 de gestação (WELSH *et al.*, 2008), ou seja, anteriormente a mensuração dos níveis de testosterona intratesticular no nosso estudo. Assim, é possível que não tenha havido supressão da produção de androgênios nesse período crítico, conhecido como "janela de programação de masculinização do trato reprodutor". Durante essa janela, a ação dos androgênios programa o desenvolvimento do trato reprodutor masculino mesmo antes da diferenciação morfológica (WELSH *et al.*, 2008). Por exemplo, eventos como o desenvolvimento da próstata, vesícula seminal e do pênis, o aumento da distância anogenital ou mesmo a descida transinguinal dos testículos, que em ratos

ocorre somente cerca de três semanas após o nascimento, parecem depender da correta ação androgênica nessa crítica janela de programação (WELSH *et al.*, 2008). No presente estudo, a ausência de alterações na distância anogenital dos animais expostos aos antivirais aciclovir e ganciclovir é corroborada pela ausência de outras malformações induzidas por insuficiência androgênica, como hipospádias e criptorquidismo.

Na idade adulta, não foram observadas alterações no peso de órgãos e tecidos andrógeno-dependentes, como próstata, vesícula seminal e músculo bulbocavernoso/levantador do ânus. Da mesma forma, não houve diferença na concentração de testosterona sérica entre os diferentes grupos experimentais nessa fase. A exposição pré-natal a hormônios androgênicos é essencial para o desenvolvimento desses tecidos e também para que os mesmos respondam adequadamente a esses hormônios na puberdade e na idade adulta (US EPA, 1997; WELSH *et al.*, 2008). De maneira geral, os resultados obtidos para a concentração sérica de testosterona e para o peso de tecidos andrógeno-dependentes indicam que não há alterações evidentes na produção de androgênios ou na responsividade dos tecidos-alvos nos descendentes adultos.

A exposição *in utero* ao aciclovir e ao ganciclovir também não afetou a idade média de separação prepucial dos descendentes expostos. Esse evento é considerado um marcador externo do início da puberdade em ratos e foi acompanhado diariamente a partir do 38º dia pós-natal. Acredita-se que a separação prepucial seja dependente do aumento do peso corporal e também da concentração sérica de androgênios na puberdade (US EPA, 1996). Vetter e Spear (2012) reportaram a importância dos níveis de testosterona plasmática para a separação prepucial, bem como sugeriram que outros hormônios, como a dihidrotestosterona (DHT), estão envolvidos nos processos de desenvolvimento da genitália no período da puberdade. A ausência de efeitos sobre a idade de separação prepucial indica que os antivirais aciclovir e ganciclovir não afetam o desenvolvimento geral e o início da puberdade dos descendentes masculinos expostos *in utero*, corroborando os demais dados que apontam para ausência de efeitos evidentes sobre o *status androgênico* dos animais no período pós-natal.

5.3 EFEITOS TESTICULARES DOS ANTIVIRAIS ACICLOVIR E GANCICLOVIR

Os dados da histologia testicular fetal demonstraram uma redução no número de gonócitos por cordão e no diâmetro dos cordões seminíferos de ratos expostos à dose de 300 mg/kg de ganciclovir. Algumas secções transversais de cordões seminíferos apresentavam ausência total de gonócitos. De maneira similar, as análises dos descendentes adultos expostos no mesmo período à mesma dose de ganciclovir (experimento 2) revelaram a presença de túbulos seminíferos atróficos com severa redução no diâmetro e na população de células germinativas. Assim como nos cordões fetais, muitos desses túbulos apresentavam ausência total de células germinativas, sendo observadas apenas células de Sertoli (*Sertoli cell-only syndrome*). Muitos desses túbulos atróficos não tinham lúmen tubular e apresentavam vacuolização.

Nos animais adultos, expostos ao ganciclovir na dose de 300 mg/kg, também foram detectadas reduções nos pesos dos testículos e epidídimos e na contagem de espermátides resistentes à homogeneização. Alterações no peso de órgãos usualmente fornecem informações iniciais sobre o potencial tóxico de uma determinada substância. As espermátides resistentes à homogeneização correspondem às células mais maduras no epitélio germinativo e a baixa contagem observada pode ser resultado do alto número de túbulos seminíferos atróficos encontrados nos cortes histológicos dos descendentes adultos. A atrofia tubular e abaixa da produção de gametas também podem explicar a redução no peso dos testículos e epidídimos. Analisados conjuntamente, os dados da histologia testicular fetal e adulta e os resultados da contagem de espermátides e peso testicular indicam que a exposição ao ganciclovir em uma estreita janela do desenvolvimento pré-natal, dia 10 de gestação, ocasiona efeitos precoces e tardios nos testículos dos animais expostos.

Considerando que a exposição ocorreu em um estágio inicial da diferenciação gonadal, e a curta meia-vida dessa classe de antivirais, é possível evidenciar que o ganciclovir afetou de maneira permanente a viabilidade das células germinativas. Os gonócitos são os precursores fetais/neonatais das espermatogônias indiferenciadas, as células-tronco que constituem a reserva da linhagem germinativa. Os gonócitos, por sua vez, são derivados das células

germinativas primordiais de origem extragonadal (saco vitelínico). Durante o processo de migração, as células germinativas primordiais proliferam e ao colonizarem a gônada em desenvolvimento são envoltas pelas células de Sertoli (OLASO e HABERT, 2000). Essas células germinativas residentes, agora denominadas de gonócitos, passam por um período de proliferação (dias 13 a 18 de gestação em ratos), seguido de uma fase de quiescência e retomada da proliferação no período neonatal (dias 3 a 5 de vida em ratos). A seguir, os gonócitos diferenciam-se em espermatogônias ou sofrem degeneração. O processo de degeneração dos gonócitos ocorre por apoptose e também é observado no período pré-natal (OLASO e HABERT, 2000; CULTY, 2009). O significado fisiológico da apoptose de gonócitos e outras células germinativas não é totalmente conhecido, mas parece ser responsável pela manutenção de uma razão ideal entre células germinativas e células de Sertoli ou pela eliminação de células germinativas com anormalidades cromossômicas (HERMO *et al.*, 2010). Embora não seja possível delinear os mecanismos de ação do ganciclovir, os resultados obtidos indicam que esse antiviral pode alterar o processo de proliferação das células germinativas primordiais durante sua migração à crista genital ou afetar a proliferação e/ou sobrevivência dos gonócitos fetais nos cordões seminíferos. Alternativamente, o ganciclovir poderia atuar de maneira indireta nos gonócitos por alterar a função das células de Sertoli, componentes fundamentais para a proliferação e viabilidade dos gonócitos no ambiente testicular. De qualquer forma, os dados obtidos indicam que os efeitos do ganciclovir sobre o número de células germinativas estendem-se pelo menos até a idade adulta, quando foram observados túbulos seminíferos atrofiados sem células germinativas e redução no número de espermátides alongadas resistentes à homogeneização.

Faqi e colaboradores (1997) demonstraram que ratos adultos tratados em um único dia com 300 mg/kg de ganciclovir (dose fracionada em 3 aplicações de 100mg/kg) ou durante 5 dias com 60 mg/kg apresentam alterações histológicas nos testículos e severa redução na contagem de espermátides. Também foram observadas reduções nos pesos dos testículos e epidídimos. Os animais foram investigados 2, 4, 6, 8, 16 e 24 semanas após o tratamento, sendo que os efeitos mais pronunciados foram observados nos animais investigados na 8ª semana. Essa latência no surgimento dos efeitos indica que as principais células afetadas são células indiferenciadas da linhagem germinativa (espermatogônias), uma vez que a

duração da espermatogênese em ratos é de cerca de 58 dias. Os dados de histologia testicular também confirmaram uma possível ação do ganciclovir sobre as espermatogônias. No entanto, os efeitos observados foram amplamente atenuados na 16^a e 24^a semana pós-tratamento, indicando potencial para recuperação e preservação de células tronco capazes de repovoar o testículo (FAQI *et al.*, 1997).

A espermatogênese é um processo altamente complexo que envolve a formação de espermatozóides a partir das espermatogônias, enquanto conserva a população de células tronco. De acordo com Jahnukainen *et al.* (2004), processos de apoptose nas primeiras ondas de espermatogênese no período peripubertal são fundamentais para o desenvolvimento da maturação sexual e capacitação testicular em ratos. O estudo sugere que genes da família Bcl-2 estão envolvidos em diferentes estágios de desenvolvimento do testículo, tendo um importante papel regulatório da espermatogênese. Os eventos bioquímicos responsáveis pelo processo de apoptose dependem de uma família de proteases denominadas caspases. Esses eventos são em parte modulados por proteínas Bcl-2, que incluem moléculas anti-apoptóticas (ex.: Bcl-2) e pró-apoptóticas (ex.: Bax). A regulação da expressão das proteínas Bax e Bcl-2 e a atuação de caspases estariam envolvidas nos processos de apoptose das células germinativas e seriam de extrema importância para o bom desenvolvimento dos estágios da espermatogênese (JAHNUKAINEN *et al.*, 2004). Parte dos efeitos citotóxicos do ganciclovir são mediados por apoptose das células infectadas com vírus, sendo que a presença da enzima timidina quinase viral é essencial para a ativação da droga (TOMICIC, THUST e KAINA, 2002; SONG *et al.*, 2011). Tomicic, Thust e Kaina (2002) reportaram o declínio de Bcl-2 e aumento da atividade da caspase-9 em células de ovário de hamster chinês (Chinese Hamster Ovary - CHO cells) transfectadas com a enzima timidina quinase. Recentemente, o ganciclovir tem recebido significativa atenção como potencial candidato na terapia gênica do câncer, uma vez que foi demonstrado que células tumorais transfectadas com genes da timidina quinase do vírus da herpes (“genes suicidas”), podem se tornar seletivamente suscetíveis aos efeitos citotóxicos dessa droga e causar apoptose (ARNOLD *et al.*, 2011; SONG *et al.*, 2011). Embora, células não infectadas ou desprovidas de timidina quinase apresentem uma susceptibilidade menor ao ganciclovir, é possível que nas doses e períodos de tratamento testados no presente estudo essa droga possa ter afetado a viabilidade de células tronco da linhagem germinativa. Nesse sentido, a investigação

futura de marcadores de apoptose em diferentes estágios de desenvolvimento testicular (fetal, neonatal, puberal e adulto), após a exposição *in utero* ao ganciclovir, poderia auxiliar na confirmação dessa hipótese.

Também é importante salientar que os efeitos testiculares foram observados apenas para o ganciclovir e na maior dose testada (300 mg/kg). Enquanto o desenvolvimento testicular foi severamente afetado por esse antiviral, não foram observados efeitos tardios sobre o testículo ou mesmo qualquer alteração no número de células germinativas, seja no período fetal ou adulto dos animais expostos *in utero* ao aciclovir. Por outro lado, a administração materna de aciclovir (300 mg/kg) parece ter resultado em efeitos mais evidentes sobre o desenvolvimento da prole, com alterações no peso fetal e também presença de malformações externas evidentes na cauda e nos olhos. Além disso, a administração de aciclovir parece ter efeitos sobre o timo dos descendentes machos de expostos *in utero*. Entretanto, a redução no peso do timo e outros possíveis efeitos imunotóxicos do aciclovir devem ser investigados por meio de estudos adicionais.

De maneira geral, os dados do presente estudo confirmam o potencial do ganciclovir em afetar o desenvolvimento gonadal, após a exposição em uma curta janela do desenvolvimento pré-natal (dia 10 de gestação). Os efeitos testiculares manifestam-se tanto precoce quanto tardiamente e estão provavelmente relacionados com alterações na viabilidade das células germinativas. Da mesma forma, os resultados apresentados confirmam que, apesar da semelhança estrutural, os órgãos-alvo e o espectro de toxicidade dos antivirais aciclovir e ganciclovir são, assim como suas aplicações terapêuticas, amplamente distintos.

5.4 PERSPECTIVAS FUTURAS

Eventualmente, a elucidação dos mecanismos responsáveis pelos efeitos testiculares do ganciclovir poderá auxiliar no entendimento dos processos iniciais de diferenciação gonadal, como a migração, proliferação e sobrevivência de células germinativas na gônada em desenvolvimento. A utilização de marcadores de apoptose em diferentes estágios é uma das possíveis abordagens para detectar os efeitos do ganciclovir sobre as células germinativas. Além disso, a identificação dos

possíveis efeitos sobre o ovário é outra abordagem que poderá ser investigada em estudos futuros.

6 CONCLUSÕES

Não foram observados indícios de toxicidade materna causada pela administração dos antivirais. Análise do ganho de peso das progenitoras, peso absoluto e relativo dos órgãos e índices reprodutivos como tamanho das ninhadas, número de implantes e perdas pós-implantes não demonstraram alterações que indicassem que a toxicidade induzida na prole fosse decorrente da toxicidade sistêmica materna. A avaliação dos efeitos precoces, causados pela exposição *in utero* aos antivirais, revelou que a concentração de testosterona intratesticular foi reduzida no grupo exposto à maior dose de aciclovir, porém sem repercussões sobre a distância anogenital e outros parâmetros andrógeno-dependentes. Além disso, a exposição à maior dose de aciclovir resultou em redução do peso fetal e malformações externas em algumas ninhadas. A exposição à maior dose de ganciclovir resultou em efeitos testiculares precoces tais como, redução do diâmetro dos cordões seminíferos e no número de gonócitos. Com relação aos efeitos tardios, a exposição *in utero* à maior dose de ganciclovir resultou na redução no peso de testículos e epidídimos, baixa contagem de espermátides e alterações histológicas nos testículos com túbulos seminíferos atrofiados e com ausência de células germinativas. A exposição à maior dose de aciclovir ocasionou a redução do peso do timo. Os pesos dos demais órgãos não sofreram alteração pela exposição aos antivirais, assim como a separação prepucial e os níveis de testosterona sérica.

O presente estudo confirmou o potencial dos antivirais ganciclovir e aciclovir em causar efeitos deletérios em ratos após a exposição em uma estreita janela do desenvolvimento pré-natal (décimo dia de gestação). Dentre os efeitos observados destacam-se as alterações testiculares induzidas pela maior dose de ganciclovir, que parece reduzir a viabilidade das células germinativas, ocasionando efeitos de curto e longo prazo sobre o testículo.

REFERÊNCIAS

ABERCROMBIE M. Estimation of nuclear population from microtome sections. **Anat Rec**, v. 94, 1946, p. 239-47. DOI: 10.1002/ar.1090940210.

ADLER, S. P.; NIGRO, G.; PEREIRA, L. Recent advances in the prevention and treatment of congenital cytomegalovirus infections. **Semin Perinatol**, v. 31, n. 1, p. 10-18, 2007.

ANDRADE, A. J.; ARAUJO, S.; SANTANA, G. M.; OHI, M.; DALSENER, P. R. Reproductive effects of deltamethrin on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. **Regul Toxicol Pharmacol**, v.36, n. 3, p. 310-317, 2002.

ANDRADE, A. J.; GRANDE, S. W.; TALSNESS, C. E.; GROTE, K.; GOLOMBIEWSKI, A.; STERNER-KOCK, A.; CHAHOUD, I. A dose-response study following *in utero* and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): Effects on androgenic status, developmental landmarks and testicular histology in male offspring rats. **Toxicology**, v. 225, n. 1, p. 64-74, 2006.

ARNOLD, K.; SARKAR, A.; YRAM, M. A.; POLO, J. M.; BRONSON, R.; SENGUPTA, S.; SEANDEL, M.; GEIJSEN, N.; HOCHEDLINGER, K. Sox2⁺ Adult Stem and Progenitor Cells Are Important for Tissue Regeneration and Survival of Mice. **Cell Stem Cell**, v. 9, n. 4, p. 317-329, 2011.

BROWN, Z. A.; SELKE, S.; ZEH, J.; KOPELMAN, J.; MASLOW, A.; ASHLEY, R. L.; WATTS, D. H.; BERRY, S.; HERD, M.; COREY, L. The acquisition of herpes simplex virus during pregnancy. **N Engl J Med**, v. 337, n. 8, p. 509-515, 1997.

CHAHOUD, I.; STAHLMANN, R.; BOCHERT, G.; DILLMANN, I. NEUBERT, D. Gross-structural defects in rats after acyclovir application on day 10 of gestation. **Arch Toxicol**, v. 62, n. 1, p. 8-14, 1988.

CHAHOUD, I.; KWASIGROCCH, T. E. Controlled breeding of laboratory animals. In. _____. **Methods in prenatal toxicology, evaluation of embryotoxic effects in experimental animals**. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1977. p. 79-91.

COLBORN, T.; VOM SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environ Health Perspect**, v. 101, n. 5, p. 378-384, 1993.

CULTY, M. Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. **Birth Defects Res C Embryo Today**, v. 87, n. 1, p. 1-26, 2009.

DALSENTER, P. R.; FAQI, A. S.; WEBB, J.; MERKER, H. J.; CHAHOUD, I. Reproductive toxicity and toxicokinetics of lindane in the male offspring of rats exposed during lactation. **Hum Exp Toxicol**, v. 16, n. 3, p. 146-153, 1997.

DASANU, C. A.; ALEXANDRESCU, D. T. Prophylactic antivirals may be helpful in prevention of varicella-zoster virus reactivation in myeloma, but are they safe? **J Oncol Pharm Practice**, v. 16, n. 4, p. 266-268, 2010.

ENRIGHT, A. M.; PROBER, C. G. Neonatal herpes infection: diagnosis, treatment and prevention. **Semin Neonatol**, v. 7, n. 4, p. 283-291, 2002.

FAQI, A. S.; KLUG, A.; MERKER, H. J.; CHAHOUD, I. Ganciclovir induces reproductive hazards in male rats after short-term exposure. **Hum Exp Toxicol**, v. 16, n. 9, p. 505-511, 1997.

FAULDS, D.; HEEL, R. C. Ganciclovir. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infections. **Drugs**, v. 39, n. 4, p. 597-638, 1990.

FISHER, J. S.; MACPHERSON, S.; MARCHETTI, N.; SHARPE, R. M. Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. **Human Reproduction**, v. 18, n. 7, p. 1383-1394, 2003.

FLEISCHER, R.; JOHNSON, M. Acyclovir nephrotoxicity: a case report highlighting the importance of prevention, detection, and treatment of acyclovir-induced nephropathy. **Case Report Med**, 2010.

Food and Drug Administration. Disponível em <<http://www.drugs.com/pregnancy-categories.html>>. Acesso em: 15/10/2010.

FOSTER, P. M. D. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. **Int J Androl**, v. 29, n. 1, p. 140-147, 2006.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Editora McGraw Hill, 2007.

GUNNESS, P.; ALEKSA, K.; BEND, J.; KOREN, G. Acyclovir-induced nephrotoxicity: the role of the acyclovir aldehyde metabolite. **Transl Res**, v. 158, n. 5, p. 290-301, 2011.

HARTMANN, J.; CHAHOUD, I.; BUERKLE, B.; NEUBERT, D. Testis hypoplasia in rat offspring prenatally exposed to ganciclovir. **European Teratology Abstracts**, 25A, 1991.

HEINDEL, J. J. Animal models for probing the developmental basis of disease and dysfunction paradigm. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 102, n. 2, p. 76-81, 2008.

HERMO, L.; PELLETIER, R. M.; CYR, D. G.; SMITH, C. E. Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by Testicular Germ Cells. Part 1: Background to Spermatogenesis, Spermatogonia, and Spermatocytes. **Microsc Res Tech**, v. 73, n. 4, p. 241-278, 2010.

IRVINE, S.; CAWOOD, E.; RICHARDSON, D.; MACDONALD, E.; AITKEN, J. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. **BMJ**, v. 312, n. 7029 p. 467-471, 1996.

JAHNUKAINEN, K.; CHRYSIS, D.; HOU, M.; PARVINEN, M.; EKSBORG, S.; SÖDER, O. Increase apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage-specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in the rat testis. **Biolreprod**, v. 70, n. 2, p. 290-296, 2004.

KLUG, S.; LEWANDOWSKI, C.; BLANKENBURG, G.; MERKER, H. J.; NEUBERT, D. Effect of acyclovir on mammalian embryonic development in culture. **Arch Toxicol**, v. 58, n. 2, p. 89-96, 1985.

KLUG, S.; LEWANDOWSKI, C.; MERKER, H. J.; STAHLMANN, R.; WILDI, L.; NEUBERT, D. In vitro and in vivo studies on the prenatal toxicity of five virustatic nucleoside analogues in comparison to aciclovir. **Arch Toxicol**, v. 65, n. 4, p. 283-291, 1991.

LAMBRIGHT, C.; OSTBY, J.; BOBSEINE, K; WILSON, V.; HOTCHKISS, A. K.; MANN, P. C.; GRAY, L. E. Cellular and molecular mechanisms of action of linuron: an antiandrogenic herbicide that produces reproductive malformations in male rats. **Toxicol Sci**, v. 56, n. 2, p. 389-399, 2000.

LOOKER, K. J.; GARNETT, G. P.; SCHMID, G. P. An estimate of the global prevalence and incidence of herpes simplex virus type 2 infection. **Bull World Health Organ**, v. 86, n. 10, p. 805-812, 2008.

MAMEDE, J. A. V.; SIMÕES, M. D. J.; NOVO, N. F.; JULIANO, Y.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; KULAY, L. J. *et al.* (1995). Chronic Effects of Azidothymidine and Acyclovir on Pregnant Rats. **Gen Pharmac**, v. 26, n. 3, p. 523-526, 1995.

MARTINO-ANDRADE, A. J.; MORAIS, R. N.; BOTELHO, G. G. K.; MULLER, G.; GRANDE, S. W.; CARPENTIERI, G. B.; LEÃO, G. M. C.; DALSENTER, P. R. Coadministration of active phthalates results in disruption of foetal testicular function in rats. **Int J Androl**, v. 32, n. 6, p. 704-712, 2009.

MONEY, D. M. Antiviral and antiretroviral use in pregnancy. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v. 30, n. 4, p. 731-749, 2003.

MUNRO, C. J.; STABENFELDT, G. H.; CRAGUN, J. R.; ADDIEGO, L. A.; OVERSTREET, J. W.; LASLEY, B. I. The relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme-immunoassay and radioimmunoassay. **Clin Chem**, v. 37, n. 6, p. 838-844, 1991.

MYLCHREEST, E.; SAR, M.; CATTLEY, R. C.; FOSTER, P. M. D. Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(*n*-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 156, n. 2, p. 81-95, 1999.

MYLCHREEST, E.; SAR, M.; WALLACE, D. G.; FOSTER, P. M. D. Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(*n*-butyl) phthalate. **Reprod Toxicol**, v. 16, n. 1, p. 19-28, 2002.

NEYTS, J.; JÄHNE, G.; ANDREI, G.; SNOECK, R.; WINKLER, I.; CLERCQ, E. D. In vivo antiherpesvirus activity of N-7-substituted acyclic nucleoside analog 2-Amino-7-[(1,3-Dihydroxy-2-Propoxy)Methyl]Purine. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 1, p. 56-60, 1995.

OLASO, R.; HABERT, R. Genetic and cellular analysis of male germ cell development. **J Androl**, v. 21, n. 4, p. 497-511, 2000.

PULIYANDA, D. P.; SILVERMAN, N. S.; LEHMAN, D.; VO, A.; BUNNAPRADIST, S.; RADHA, R. K.; TOYODA, M.; JORDAN, S. C. Successful use of oral ganciclovir for

the treatment of intrauterine cytomegalovirus infection in a renal allograft recipient. **Transpl Infect Dis**, v. 7, n. 2, p. 71-74, 2005.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Rang & Dale Farmacologia**. 6.ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2007. p. 679-691.

RIECKE, K.; STAHLMANN, R. Test systems to identify reproductive toxicants. **Andrologia**, v. 32, p. 209-218, 2000.

ROSS, A. J., CAPEL, B. Signaling at the crossroads of gonad development. **Trends Endocrinol Metab**, v. 16, n. 1, p. 19-25, 2005.

SAFRIN, S. Fármacos Antivirais. In: KATZUNG, B. G. (ed.), **Farmacologia**, 9a ed. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2006. p. 670-691.

SHARPE, R. M.; FRASER, H. M.; BROUGHAM, M. F.; MCKINNELL, C.; MORRIS, K. D.; KELNAR, C. J.; WALLACE, W. H.; WALKER, M. Role of the neonatal period of pituitary-testicular activity in germ cell proliferation and differentiation in the primate testis. **Hum Reprod**, v. 18, n. 10, p. 2110-2117, 2003.

SHARPE, R. M. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinisation. **Best Practice & Research**, v. 20, n. 1, p. 91-110, 2006.

SKAKKEBAEK, N. E.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; MAIN, K. M. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. **Human Reproduction**, v. 16, n. 5, p. 972-978, 2001.

SONG, C.; XIANG, J.; TANG, J.; HIRST, D. G.; ZHOU, J.; CHAN, K. M.; LI, G. Thymidine kinase gene modified bone marrow mesenchymal stem cell as vehicles for antitumor therapy. **Hum Gene Ther**, v. 22, v. 4, p. 439-449, 2011.

STAHLMANN, R.; KLUG, S.; LEWANDOWSKI, C.; BOCHERT, G.; CHAHOUD, I.; RAHM, U.; MERKER, H. J.; NEUBERT, D. Prenatal toxicity of acyclovir in rats. **Arch Toxicol**, v. 61, p. 468-479, 1988.

STAHLMANN, R.; KLUG, S.; LEWANDOWSKI, C.; CHAHOUD, L.; BOCHERT, G.; MERKER, H. J.; NEUBERT, D. Teratogenicity of acyclovir in rats. **Infection**, v. 15, n. 4, p. 261-262, 1987.

STAUB, C.; HARDY, V. B.; CHAPIN, R. E; HARRIS, M. W.; JOHNSON, L. The hidden effect of estrogenic/antiandrogenic methoxychlor on spermatogenesis. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 180, n. 2, p. 129-135, 2002.

STONE, K. M.; REIFF-ELDRIDGE, R.; WHITE, A. D.; CORDERO, J. F.; BROWN, Z.; ALEXANDER, E. R.; ANDREWS, E. B. Pregnancy Outcomes following Systemic Prenatal Acyclovir Exposure: Conclusions from the International Acyclovir Pregnancy Registry, 1984–1999. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 70, n. 4, p. 201-207, 2004.

TOMICIC, M. T.; THUST, R.; KAINA, B. Ganciclovir-induced apoptosis in HSV-1 thymidina kinase expressing cells: critical role of DNA breaks, Bcl-2 decline and caspase-9 activation. **Oncogene**, v. 21, p. 2141-2153, 2002

TOPPARI, J.; LARSEN, J. C.; CHRISTIANSEN, P.; GIWERCMAN, A.; GRANDJEAN, P.; GUILLETTE, L. J. JR.; JEGOU, B.; JENSEN, T. K.; JOUANNET, P.; KEIDING, N.; LEFFERS, H.; MCLACHLAN, J. A.; MEYER, O.; MULLER, J.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; SCHEIKE, T.; SHARPE, R.; SUMPTER, J.; SKAKKEBAEK, N. E. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. **Environ Health Perspect**, v. 104, n. 4, p. 741-803, 1996.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **EPA/630/R-96/009**: Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. Washington, 1996.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **EPA/630/R-96/012**: Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. Washington, 1997.

VETTER-O'HAGEN, C. S.; SPEAR, L. P. Hormonal and physical markers of puberty and their relationship to adolescent-typical novelty-directed behavior. **Dev Psychobiol**, v. 54, n. 5, p. 523-535, 2012.

WALLEN, K.; BAUM, M. J. Masculinization and defeminization in altricial and precocial mammals: comparative aspects of steroid hormone action. **Hormones, Brain and Behavior**, v. 4, p. 385-423, 2002.

WELSH, M.; SAUNDERS, P. T. K.; FISKEN, M.; SCOTT, H. M.; HUTCHISON, G. R.; SMITH, L. B.; SHARPE, R. M. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. **J Clin Invest**, v. 118, n. 4, p. 1479-1490, 2008.

WOLF, C. J.; LAMBRIGHT, C.; MANN, P.; PRICE, M.; COOPER, R. L.; OSTBY, J.; GRAY, L. E. J. Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexylphthalate, PCB 169, and ethane dimethanesulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. **Toxicolnd Health**, v. 15, n. 1-2, p. 94-118, 1999.

ANEXO

ANEXO – CERTIFICADO DO CEEA.....	70
----------------------------------	----



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 522

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.067042/2011-13

APROVADO: 05/04/2011 – R.O. 03/2011

TÍTULO: Investigação dos efeitos dos antivirais aciclovir e ganciclovir sobre o desenvolvimento reprodutivo de ratos machos expostos *in utero*

AUTORES: Anderson Joel Martino Andrade, Rosana Nogueira de, Paulo Roberto Dalsenter, Fabíola Nihi

DEPARTAMENTO: Fisiologia


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador do CEEA