

LAURA TOLEDO VELLEZ

**AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DE TESTÍCULO HUMANO DE PACIENTES SUBMETIDOS
A TRATAMENTOS PARA O CÂNCER DE PRÓSTATA**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro/2016

LAURA TOLEDO VELLEZ

**AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DE TESTÍCULO HUMANO DE PACIENTES SUBMETIDOS
A TRATAMENTOS PARA O CÂNCER DE PRÓSTATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Dr. Prof. Hélio Chiarini-Garcia

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro/2016

“Então vc aprende que cada um oferece o que tem.
E vc para de revidar, de se preocupar, de se abalar, de tentar remar contra a correnteza.
Percebe que você atrai o que transmite
e passa a usar o seu tempo só com o que te faz bem.
E aí, fica em paz...”

Autor desconhecido

Dedico essa conquista à minha família e aos meus amigos.
Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, principalmente meus pais e meu irmão.

Ao meu pai, que mesmo longe, está sempre perto. Por me atender sempre que chamo, me escutar e aconselhar.

À minha mãe, que no dia-a-dia me deixa falar, falar... me escuta e me conforta.

Ao meu irmão, pelas conversas e por confabular comigo as ideias futuras e sonhos.

Aos meus amigos, por deixarem minha vida mais feliz e o caminho mais leve. Principalmente Aurinha, Jana, Jô, Naty e Aline.

Ao professor Dr. Hélio Chiarini Garcia pela orientação e paciência.

Ao Dr. Reginaldo Martello pela gentileza e por me permitir continuar seu trabalho.

Ao Dr. Reginaldo Martello e Dr. Augusto Reis por permitirem que as coletas de material fossem possíveis.

Aos meus colegas do Laber, por deixarem o dia-a-dia das análises menos difícil. A Lili, minha parceira de mestrado: "Porque nós somos mestres". A Nihi, por me atender sempre que chamo, pela disposição e ajuda com as técnicas. A Nihi e ao Marcos pela ajuda e direção com as análises.

Às meninas Andreia e Fabíola C. pela hora do almoço, a melhor hora do dia na UFMG. Pelo apoio e carinho.

À Fabiolous, porque ela é fabulosa. Pela ajuda, orientação, companheirismo, amizade, confiança, por ser meu braço direito dentro do Laber.

Obrigada a todos que fizeram parte e que contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO.....	.xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O testículo humano e a espermatogênese.....	1
1.2. Fatores envolvidos na proliferação espermatogonial.....	5
1.3. A espermatogênese do homem idoso.....	7
1.4. Espermatogênese após diferentes tratamentos para o câncer.....	10
1.5. Espermatogênese após hormonioterapia.....	12
GnRH-agonista.....	12
Estrogênios.....	13
Antiandrogênios.....	14
1.6. Espermatogênese após radioterapia.....	15
1.7. Espermatogênese após quimioterapia.....	16
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivo geral.....	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1. Considerações éticas.....	20
4.2. Pacientes.....	20
4.3. Grupos experimentais.....	20
4.4. Orquiectomia bilateral.....	22
4.5. Processamento histológico do parênquima testicular.....	23
4.6. Análises morfológicas.....	23
4.7 Análises morfométricas.....	24
4.8. Avaliação imunohistoquímica.....	25
4.9. Perfil Hormonal.....	27
4.10. Análises estatísticas.....	27
5. RESULTADOS.....	28
5.1. Morfologia testicular.....	28
5.2. Avaliação morfométrica e de diferentes componentes testiculares.....	31
5.2.1. Diâmetro tubular.....	31
5.2.2. Porcentagem de túbulos seminíferos e intertúbulo.....	33
5.2.3. Proporção volumétrica de túbulos seminíferos com células germinativas e fibrose testicular... ..	34
5.2.4. Proporção de túbulos seminíferos em relação às células germinativas mais avançadas.....	35

5.3. Proliferação espermatogonial.....	36
5.4. Perfil Hormonal.....	38
6. DISCUSSÃO.....	39
7. CONCLUSÕES.....	46
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	47
9. ANEXOS	
Anexo I – Aprovação nos Comitês de Ética.....	55
Anexo II – Aprovação no DEPE – Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão - Hospital das Clínicas da UFMG.....	56
Anexo III – CONEP – Comitê Nacional de Ética e Pesquisa.....	57
Anexo IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	58
Anexo V – Relação dos pacientes utilizados na pesquisa, informações demográficas e detalhes sobre os tratamentos dos quais foram submetidos, divididos em quatro grupos (ST, PR, TH e TR).....	60

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Diâmetros tubulares (μm) e proporções volumétricas (Vv%) de componentes tubulares e intertubulares do testículo de homens idosos após diferentes tratamentos para o câncer de próstata.

Tabela 2. Proporção de túbulos seminíferos em relação às células germinativas mais avançadas, considerando a evolução da espermatogênese, de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos para o câncer de próstata.

Tabela 3. Proliferação celular espermatogonial de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata.

Tabela 4. Dosagens hormonais séricas de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos para o câncer de próstata.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografias de túbulos seminíferos de testículos de homens idosos com câncer de próstata que não sofreram qualquer tipo de tratamento (ST) ou que foram prostatectomizados (PR) antes da orquiectomia bilateral.

Figura 2. Fotomicrografias de túbulos seminíferos de testículos de homens idosos com câncer de próstata que sofreram tratamentos hormonais (grupo TH).

Figura 3. Fotomicrografias de túbulos seminíferos de testículos de homens idosos com câncer de próstata que sofreram tratamento radioterápico (grupo TR).

Figura 4. Diâmetros dos túbulos seminíferos (μm) de homens idosos após diferentes tratamentos para o câncer de próstata.

Figura 5. Proporções volumétricas (Vv%) de componentes tubulares de homens idosos após diferentes tratamentos para o câncer de próstata.

Figura 6. Proporções volumétricas (Vv%) de componentes intertubulares do testículo de homens idosos após diferentes tratamentos para o câncer de próstata.

Figura 7. Proporções volumétricas (Vv%) de túbulos seminíferos e interstício com e sem fibrose no testículo de homens idosos após diferentes tratamentos para o câncer de próstata.

Figura 8. Proporções de túbulos seminíferos em relação às células mais avançadas, considerando a evolução da espermatogênese, de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos para o câncer de próstata.

Figura 9. Imunohistoquímica com MCM7 no testículo de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos para o câncer de próstata.

Figura 10. Dosagens hormonais séricas de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos para o câncer de próstata.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABP – Androgen Binding Protein

DAB – diaminobenzidina

DAEM – Declínio Androgênico do Envelhecimento Masculino

DES – dietilestilbestrol

DHT – Diidrotestosterona

FSH – Hormônios folículo estimulante

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofina

LH – Hormônio Luteinizante

LHRH – Hormônio Liberador do Hormônio luteinizante

MCM4 – Minichromosome Maintenance Proteins 4

MCM6 – Minichromosome Maintenance Proteins 6

MCM7 – Minichromosome Maintenance Proteins 7

MCM10 – Minichromosome Maintenance Proteins 10

PBS – phosphate buffered saline

PR – Sem tratamento e prostatectomizado

T – Testosterona

TH – Tratamento Hormonal

TR – Tratamento Radioterápico

ST – Sem Tratamento

Vv% - Proporção Volumétrica

µm – Micrômetro

RESUMO

Estudos morfológicos e morfométricos desenvolvidos por nosso grupo demonstraram que tratamentos para o câncer de próstata, utilizando hormônios e irradiação, provocam efeitos deletérios no processo espermatogênico do homem, com alterações drásticas de diversos parâmetros testiculares. Continuando nesta linha de pesquisa, o presente trabalho aumentou o número de pacientes e analisou com mais detalhes alguns parâmetros morfométricos da espermatogênese bem como a proliferação espermatogonial, procurando confirmar mais precisamente os efeitos indiretos da prostatectomia e de tratamentos hormonais e radioterápicos para o câncer de próstata sobre o testículo. Os resultados obtidos confirmam que a hormonioterapia e a radioterapia para o câncer de próstata avançado causam, de forma indireta, prejuízos ao processo espermatogênico. As análises morfológicas e morfométricas demonstraram que os pacientes que não sofreram nenhum tipo de tratamento para o câncer de próstata, apresentaram espermatogênese preservada, compatíveis com a faixa etária, e que a prostatectomia prévia à orquiectomia aparentemente não causou efeito deletério na espermatogênese. Os pacientes tratados com hormonioterapia tiveram a espermatogênese bloqueada, com rara produção de espermatozoides. Já aqueles que sofreram tratamento radioterápico foram os que mais apresentaram danos no parênquima testicular com predomínio de túbulos seminíferos sem células germinativas e presença de apenas células de Sertoli. A concentração sérica de FSH estava significativamente aumentada nos pacientes tratados com irradiação, possivelmente por afetar o funcionamento das células de Sertoli. Após hormonioterapia constatou-se que houve uma redução não significativa na proliferação espermatogonial sugerindo que a espermatogênese pode eventualmente se recuperar depois de cessado o tratamento. Ao contrário, na radioterapia o efeito deletério foi bastante expressivo sobre a proliferação espermatogonial, mostrando que, das espermatogônias presentes, raras estavam em divisão celular.

ABSTRACT

Histomorphometric studies developed by our group indicate that hormones and irradiation for prostate cancer treatment result in damage effects in men spermatogenic process as significant changes of the testicular parameters. Following the studies, we increase the number of the patients and analyzed with more details some morphometric parameters of the spermatogenesis as the spermatogonial proliferation trying to confirm more precisely the indirect effects of the prostatectomy as the hormonal and the radiotherapy treatments for the prostate cancer to the testicle. The obtained data confirm that the hormonal and radiotherapy treatments for advanced prostate cancer indirectly result the prejudice of the spermatogenic process. The morphological e morphometric analysis indicate that the group of patients that have not received any type of prostate cancer treatment kept a preserved spermatogenesis according to their age range, as the previous prostatectomy to the orchiectomy apparently did not resulted deleterious effect in the spermatogenesis. The group of patients treated with hormone therapy had a blocked spermatogenesis as a rare spermatozoa production. The group of patients treated with radiotherapy treatment were the ones that presented more damages in the testicular parenchyma prevailing seminiferous tubules without germ cells and the presence of Sertoli cells only. The serial concentration of FSH was increased significantly in the group of patients treated with radiation possible due to the action on Sertoli cells functioning. It was verified after the hormone therapy, a small reduction in the spermatogonial proliferation indicating that the spermatogenesis can eventually recover after the treatment ceasing. On the other hand, for the radiotherapy, the deleterious effect was significant on the spermatogonial proliferation showing that, according to the spermatogonia presence, rare of them were in cellular division.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O testículo humano e a espermatogênese

Os testículos são órgãos pares, localizados no escroto, responsáveis pela produção dos gametas masculinos, além de produzirem também os andrógenos, hormônios que levam a formação e manutenção dos caracteres sexuais secundários do homem (Weinbauer, 2009). São revestidos externamente por uma espessa cápsula, a túnica albugínea, de onde partem septos de tecido conjuntivo para o interior do mesmo. Estes septos se abrem numa região denominada mediastino e dividem os testículos em lóbulos. Os lóbulos testiculares dividem-se em dois compartimentos: (1) o endócrino ou intersticial onde se encontram as células de Leydig e ocorre a síntese de testosterona, além dos vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável, constituída principalmente por fibroblastos, macrófagos e mastócitos e (2) o espermatogênico ou tubular formado pelos túbulos seminíferos onde encontram-se as células germinativas e as células de Sertoli (Hales, 2002; Russell et al., 1990).

As células de Leydig localizam-se no espaço intersticial entre os túbulos seminíferos e, com frequência, encontram-se associadas a vasos sanguíneos. Normalmente possuem forma poliédrica e grande quantidade de mitocôndrias com cristas tubulares e retículo endoplasmático liso, que está relacionado com a sua capacidade de produzir hormônios esteroides, principalmente a testosterona, o mais importante hormônio sexual masculino. Entre as principais ações da testosterona estão: (1) ativação do eixo hipotálamo-hipófise-testículo, (2) masculinização do cérebro e comportamento sexual, (3) iniciação, processamento e manutenção da espermatogênese, (4) diferenciação dos órgãos genitais masculinos e (5) formação dos caracteres sexuais secundários do homem (Payne et al., 1996; Sharpe, 1994). Estudos imunohistoquímicos mostraram que em casos onde há um aumento no número de células de Leydig, a produção de testosterona acontece em apenas poucas delas (Holstein et al., 2003).

As células de Sertoli são células colunares altas que se associam extensivamente umas às outras através de junções de oclusão compartimentalizando o epitélio seminífero e constituindo a base morfológica e funcional da barreira de célula de Sertoli ou hematotesticular. Esta barreira forma dois compartimentos no epitélio seminífero, os quais são anatomicamente e funcionalmente diferentes, (a) o compartimento basal e (b) o

compartimento adluminal (França & Chiarini-Garcia, 2005). Essas células participam de toda diferenciação morfológica e fisiológica das células germinativas durante a espermatogênese, através de interações bastante complexas, tanto física quanto bioquimicamente, para que o processo transcorra de maneira normal e eficiente (França & Russell, 1998; Skinner, 1991). A integridade funcional da membrana basal elaborada pelas células de Sertoli e células mióides é também essencial para este fim (Dym, 1994). Pode-se atribuir às células de Sertoli, as seguintes funções: sustentação e nutrição das células germinativas, organização da liberação de espermátides maduras para o lúmen tubular (espermição), produção de substâncias endócrinas e parácrinas para a regulação da espermatogênese, secreção da proteína carreadora de andrógenos (ABP – *androgen binding protein*), interação intertubular endócrina com as células de Leydig, entre outras (Russell e Griswold, 1993).

As células tronco espermatogênicas, ou espermatogônias tronco, possuem a habilidade de se autorenovarem pelo processo de divisão celular e de suportarem a espermatogênese ao longo da vida. Embora estejam presentes no testículo em pequeno número (0,02-0,03% do total da população testicular), elas suportam a espermatogênese ao se dividirem para autorenovação mantendo seu estoque, ou se dividem para produzirem células progenitoras que vão culminar com a produção de espermatozoides. É importante citar que o padrão de divisão das espermatogônias tronco é influenciado pelo microambiente que as cercam (Tegelenbosch e de Rooij, 1993).

As células germinativas espermatogênicas se desenvolvem de forma organizada através de associações celulares, formando o que chamamos de “estádios do ciclo do epitélio seminífero”. No homem, são identificados até VI estádios. Para distinguir as mudanças sutis nas espermatogônias, espermátides ou em outro tipo de célula germinativa entre um estágio e outro, são necessárias informações precisas de onde cada tipo de célula é encontrada, como ocorre a transição das associações celulares, a frequência de estágio das células (%) ou a duração relativa de cada associação celular e a duração (dias) de um ciclo completo do epitélio seminífero (Clermont, 1963).

Os processos de mitoses espermatogoniais, meiose, apoptoses e diferenciações celulares os quais estas células passam constituem a *espermatogênese*. Esta ocorre no interior dos túbulos seminíferos, sendo que no homem o epitélio seminífero corresponde até a 80% do volume testicular (Turek, 2005; Russell et al., 1990). Na base do epitélio seminífero, no compartimento basal e em contato com a membrana basal, é onde encontram-se as

espermatogônias-tronco, as células germinativas mais jovens do epitélio seminífero que se dividem ou (1) para a produção de duas novas células-tronco, mantendo o estoque dessas células, ou (2) para produção de espermatogônias indiferenciadas, comprometidas com o processo de diferenciação e produção de espermatozoides. (Smith and Walker 2014; Turek, 2005).

A espermatogênese pode ser dividida em três fases: (1) *fase proliferativa ou espermatogonial*, na qual as espermatogônias passam por sucessivas e rápidas divisões mitóticas; (2) *fase meiótica ou espermatocitogênica*, onde o material genético é duplicado, recombinado e segregado, sendo esta fase muito importante para a diversidade genética entre membros da mesma espécie; (3) *fase espermiogênica ou de diferenciação*, na qual células haplóides, as espermatídes, se transformam em células altamente especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os ovócitos (Russell et al., 1990).

No homem existem três gerações de espermatogônias: (1) as *espermatogônias A_{escuras}* (consideradas as células-tronco de estoque), (2) as *espermatogônias A_{claras}* (consideradas as células-tronco em atividade) e (3) as *espermatogônias do tipo B* (Clermont, 1966). As espermatogônias do tipo A_{clara} passam por divisões mitóticas dando origem as espermatogônias do tipo B. O tamanho da população desta última é controlado através do equilíbrio entre proliferação e apoptoses (Vornberger et al., 1994). Quando atingem um estoque de 16 a 32 células, elas se diferenciam para se tornarem espermatogônias diferenciadas do tipo B, que iniciam o processo da meiose resultando na produção de espermatócitos primários em preleptóteno, leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno. Em seguida, com a divisão da meiose, espermatídes arredondadas são formadas e passam por diferenciações até espermatídes alongadas (Smith e Walker, 2014). Este evento é chamado de espermiogênese (Leblond e Clermont, 1952). A espermiação é a última etapa da espermatogênese, em que as espermatídes maduras são liberadas no lúmen do túbulo seminífero e passam a se chamar espermatozoides (Russell, 1993; Heller and Clermont, 1964). O critério mais comumente utilizado para separar as associações celulares utiliza a evolução do núcleo das espermatídes e de sua vesícula acrossômica desde a formação das células germinativas haplóides até a espermiação.

As duas funções testiculares, espermatogênese e esteroidogênese, dependem da estimulação de gonadotrofinas produzidas pela hipófise, ou seja, os hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), ambos glicoproteínas, são estimulados pelo Fator

Liberador de Gonadotrofina (GnRH) proveniente do hipotálamo. O hormônio sexual masculino, testosterona (T), é secretado pelas células de Leydig através da estimulação do LH e desempenha papel na virilização dos tecidos periféricos e promove a espermatogênese (McLachlan et al., 2002; Matsumoto et al., 1986). Os hormônios gonadais podem diminuir a liberação de gonadotrofinas tanto pela diminuição da liberação de GnRH do hipotálamo como ao afetar a capacidade do GnRH em estimular a secreção de gonadotrofinas pela pituitária (revisão em Amory e Bremner, 2001). A regulação endócrina da liberação das gonadotrofinas é feita por controle negativo da testosterona sobre o LH e FSH, além da inibina B, que regula seletivamente o FSH. O eixo FSH/inibina controla a produção de espermatozoides e o eixo LH/testosterona a androgenização do organismo (Schlatt e Ehmcke, 2014; McLachlan, 2000).

Em machos, a expressão do receptor de FSH (FSH-R) ocorre somente nas células de Sertoli (Rannikki et al., 1995), enquanto os receptores de LH (LH-R) podem ser encontrados em células de Leydig e células espermatogênicas (Eblen et al., 2001). A ligação de GnRH em seus receptores na hipófise provoca a liberação de FSH e LH. GnRH é liberado em pulsos que podem ocorrer com uma frequência a cada hora ou uma vez por dia (revisão em Amory e Bremner, 2001).

Uma função importante das células de Leydig é a produção de andrógenos, como a testosterona, através da via de ativação de receptores de LH (Schlatt et al., 1997). Além disso, essas células também secretam substâncias neuroendócrinas e fatores de crescimento, que são transmitidas para as próprias células de Leydig vizinhas, para os vasos sanguíneos, para a lâmina própria dos túbulos seminíferos e para as células de Sertoli. As células de Leydig estão envolvidas na manutenção das células de Sertoli e do tecido peritubular, influenciando na contratilidade dos miofibroblastos, que, por sua vez, regulam o movimento peristáltico dos túbulos seminíferos e o transporte dos espermatozoides (Schlatt et al., 1997).

A testosterona estimula a maturação das células germinativas nos túbulos seminíferos (Ruwanpura et al., 2010; McLachlan et al., 2002), desempenha um papel essencial como um regulador local da espermatogênese e é metabolizado em diidrotestosterona (DHT) pela ação da enzima 5α -redutase e em estradiol pela ação da aromatase. O papel desses metabólitos na espermatogênese ainda não está completamente esclarecido.

O FSH estimula as células de Sertoli a exercerem suas múltiplas funções (McLachlan et al., 2002). As células de Sertoli são consideradas coordenadoras e reguladoras do desenvolvimento e maturação das células germinativas. Atualmente acredita-se que as células

de Sertoli são influenciadas por produtos das próprias células germinativas em suas atividades secretoras (França e Chiarini-Garcia, 2005). No epitélio germinativo, somente as células de Sertoli possuem receptores de testosterona e FSH. Acredita-se que os efeitos de testosterona/FSH na espermatogênese são mediados pelas células de Sertoli (Ruwanpura et al., 2010). A testosterona inibe a secreção de GnRH e das gonadotrofinas (LH e FSH) por retroalimentação negativa. Inibina B e folistatina suprimem seletivamente a liberação de FSH pela hipófise, enquanto a ativina estimula esse processo. Além dos efeitos na espermatogênese, a testosterona desempenha um importante papel no crescimento dos pêlos, metabolismo ósseo, distribuição de massa muscular, caracteres sexuais secundários e funções dos órgãos reprodutores masculinos (Matsumoto e Bremner, 1987).

A espermatogênese pode ser afetada em diversos níveis. Distúrbios nos diferentes pontos de checagem (mitose e meiose) contribuem para os distúrbios na espermatogênese (Borgers et al., 2014). Isso pode ocorrer como resultado da influência ambiental ou devido a doenças que afetam diretamente a espermatogênese. Diferentes substâncias, drogas, hormônios, toxinas ou irradiação podem reduzir ou destruir a atividade espermatogênica dos testículos (Holstein, 2003).

1. 2. Fatores envolvidos na proliferação espermatogonial

A família MCM inclui oito proteínas: MCM2-MCM7 e MCM10 (Johnson et al., 2003). Elas podem ser consideradas componentes funcionais da fase-S do ciclo celular (Kearsey et al., 1996). A família MCM pode ser expressa, em proporções distintas, em diferentes fases do ciclo celular, e por isso pode ser usada como marcador do estado do ciclo celular (Stoeber et al., 2001). A presença dos genes MCM em células em proliferação tem conduzido seu potencial na aplicação clínica como marcador de câncer (Tachibana et al., 2005).

O processo de proliferação celular é dividido em intérfase (G1, S, G2) e a própria divisão celular e é altamente regulado durante todas as fases. A iniciação da replicação do DNA na fase G1/S é meticulosamente regulada para garantir a fidelidade do processo de duplicação do genoma. Antes da fase S, complexos de pré-replicação (pré- RC) são montados nas origens de replicação durante a fase G1. O complexo MCM forma uma helicase hexamérica, cuja atividade é essencial para iniciação e alongação da forquilha de replicação (Tye e Sawyer, 2000).

A proteína MCM7 (*minichromosome maintenance proteins 7*) é um componente essencial

do complexo de replicação do DNA (Chen et al., 2015). Estudos sugerem que o MCM4, MCM6 e o complexo MCM7 possuem atividade de DNA helicase (You et al., 1999; Ishimi, 1997). Além disso, sugere-se que o MCM7 é super expresso e amplificado em vários tipos de malignidade em humanos (Luo, 2011), como câncer de próstata e câncer de intestino (Kan et al., 2009; Ren et al., 2006). Também sugere-se que o MCM7 seria um co-fator de transcrição para o receptor de androgênio, porque sua transcrição é dependente de MCM7 (Shi et al., 2008; Ren et al., 2006). Chen e colaboradores (2015) demonstraram que o MCM7 é essencial para o *RNA splicing* durante o processo de transcrição, pois quando o complexo é removido do complexo de *splicing*, este não acontece.

Com e colaboradores (2006) identificou a expressão de MCM7 em espermatogônias e espermatócitos primários iniciais, sendo mais abundante nas espermatogônias. Este estudo demonstrou, através de ensaios imunohistoquímicos, que a intensidade da marcação com MCM7 diminui a medida que as células germinativas deixam de sofrer divisão celular e passam a diferenciar-se, sendo que em espermátides, essa proteína já não é mais encontrada. Nos testículos, MCM7 pode estar envolvido com o processo de separação das fitas de DNA durante a replicação dos cromossomos, pois esta proteína é parte do complexo essencial da replicação do DNA cromossômico (Pacek and Walter, 2004). Portanto, a proteína MCM7 é expressa nos testículos durante o período de atividade de proliferação espermatogonial (Com et al., 2006).

Albuquerque e colaboradores (2013) mostraram que a presença de espermatogônias *A*_{indiferenciadas} saudáveis após irradiação, podem ser fonte de provável recuperação da espermatogênese em camundongos, além de que a irradiação pode provocar danos no DNA espermatogonial. Por isso é essencial verificar se as espermatogônias remanescentes após o tratamento com irradiação, estão saudáveis e com atividade proliferativa. Este estudo verificou que a presença de MCM7 nos animais controle confirmou, de acordo com Com e colaboradores (2006), que a proteína MCM7 é expressa primeiramente em espermatogônias e espermatócitos iniciais. Já nos animais irradiados, o número de espermatogônias MCM7-positivas mostrou que todas as espermatogônias sobreviventes à irradiação expressaram MCM7 e não estavam com defeitos na proliferação. Porém, quando o tratamento radioterápico em camundongos era seguido de tratamento de supressão hormonal, o número de espermatogônias MCM7-positivo aumentava, assim como o número de espermatogônias remanescentes, confirmando que as espermatogônias *A*_{indiferenciadas} e espermatogônias diferenciadas estavam em proliferação.

1.3. A espermatogênese do homem idoso

O envelhecimento é um processo contínuo caracterizado pela degeneração progressiva dos órgãos, morfológica e funcionalmente (Eskenazi et al., 2003). O “Declínio Androgênico do Envelhecimento Masculino” (DAEM) é caracterizado por progressiva desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-testículo, associado com a diminuição da testosterona total sérica e com o aumento regulatório da concentração sanguínea do FSH, LH e estradiol (Auger et al., 2005; Morley e Perry, 1999; Hermann e Berger, 1999; Johnson, 1989). Em homens idosos níveis séricos da globulina carreadora de hormônios sexuais (SHBG) estão aumentados, acarretando uma diminuição dos níveis circulantes de testosterona livre (Auger et al., 2005; Vermeulen e Kaufman, 1995; Johnson, 1989). Esse gradual declínio dos andrógenos do idoso é acompanhado pelo aparecimento de sintomas clínicos similares aos do hipogonadismo do homem jovem, ou seja, diminuição da massa muscular e óssea, diminuição da pilificação corpórea e aumento da obesidade abdominal (Sampson et al., 2007). A DAEM é clinicamente mais evidente e é observado frequentemente em paciente que passaram por orquiectomia ou hormonioterapia, que visa diminuir os níveis de androgênio (Thompson et al., 2003).

O peso do parênquima testicular, a porcentagem de epitélio seminífero e a produção espermática diária estão significativamente reduzidas no homem idoso (Johnson, 1986). A média do diâmetro do túbulo seminífero também se encontra reduzida, e a espessura da membrana basal aumentada. Quando a espessura da membrana basal excede 10 μm nota-se parada na espermatogênese ou fibrose completa (Dakouane et al., 2005). É sabido que existe uma diminuição progressiva do número de capilares ao redor dos túbulos seminíferos a partir dos 30 anos (Takizawa et al., 1978).

O espessamento da túnica própria pode reduzir o fluxo de metabólitos para o epitélio seminífero, tendo como consequência a redução do potencial de produção de espermatozoides, devido à perda de células germinativas. No caso do envelhecimento, estudos mostram que o esse espessamento está relacionado com uma redução do comprimento dos túbulos seminíferos e não com o aumento da túnica própria, cujo volume é quase o mesmo em indivíduos jovens e idosos (Paniagua et al., 1987; Johnson et al., 1986).

As características morfológicas e funcionais das células espermatogênicas estão relacionadas com a interação da estrutura histológica do testículo (Well et al., 2007; Paniagua et al., 1987; Neaves et al., 1984). Existe uma regressão progressiva no número de células de

Sertoli, espermatogônias, espermatócitos e espermatozoides com o envelhecimento (Dakouane et al., 2005). A perda de células germinativas provavelmente leva ao desenvolvimento de vacúolos no citoplasma das células de Sertoli. Já o aumento do conteúdo lipídico no citoplasma das células de Sertoli pode ser considerado resultado da fagocitose de restos de células germinativas (Schulze, 1984). Na parada de maturação em espermatócitos ou espermatogônias, existe também presença mais abundante de lipídeos e vacúolos no citoplasma das células de Sertoli. Além disso, análises histológicas demonstraram que há uma diminuição no número de células de Sertoli por túbulo seminífero no testículo do homem idoso (Kimura et al., 2003), dados que posteriormente foram confirmados quando se comparou testículos de adultos jovens com os de homens idosos (Dakouane et al., 2005).

Em homens idosos com hipoespermatogênese, podem ser encontradas espermátides, espermatócitos e espermatogônias multinucleadas, com dois ou mais núcleos (Holstein e Eckermann, 1986). A ocorrência de vários núcleos em um único citoplasma pode ser devido à cariocinese (divisão do núcleo celular) sem citocinese ou a fusão celular (Nistal et al., 1986).

Duas principais características do testículo de homens idosos são a perda de células germinativas – por exemplo, como resultado da regressão ou atrofia testicular – e um aumento significativo dos túbulos com apenas células de Sertoli (Ryu et al, 2006; Wang et al, 1993). Alguns fatores, como por exemplo, alterações nas células mióides e na produção de testosterona, podem levar à diminuição do número de células de Sertoli e Leydig, o que contribui também para as alterações testiculares que ocorrem com o envelhecimento (revisão em Paul e Robaire, 2013; Paniagua et al, 1991; Johnson, 1986).

Nos idosos, são frequentes os túbulos seminíferos contendo numerosas células em degeneração, principalmente espermatócitos e espermátides (Kimura et al., 2003). A diminuição do número de espermatozoides está associada à diminuição de espermatogônias e espermatócitos e, nestes indivíduos, a parada da espermatogênese geralmente ocorre na fase de paquíteno (Dakouane et al., 2005). A redução da produção espermática diária relacionada com a idade, esta associada à perda de células de Sertoli no homem idoso. O número de espermatócitos primários ou espermátides por células de Sertoli, não é afetado pela idade. A descamação de células germinativas imaturas, principalmente multinucleadas e degeneradas, é frequentemente observada em túbulos seminíferos de idosos e ocasionalmente em adultos jovens (Dakouane et al., 2005).

Espermatogônias podem estar anormalmente localizadas no compartimento adluminal

em pacientes idosos, dispostas em multicamadas (Paniagua et al., 1987a). Enquanto o número de espermatogônias A_{escuras} não foi significativamente menor em homens idosos, o número de espermatogônias A_{claras} e espermatogônias tipo B foi significativamente menor em idosos. O número de espermatogônias A_{claras} diminui a partir da sexta década de vida, enquanto que o número de espermatogônias A_{escuras} diminui seu número a partir da oitava década de vida (Nistal e al., 1987).

Megaloespermatócitos estão usualmente presentes em 64% de homens idosos e só ocasionalmente são encontrados em biópsias de homens inférteis (Holstein e Eckmann, 1986). Diferenças significativas entre os grupos etários foram encontradas para espermatócitos primários tardios (paquíteno e diplóteno) e espermatídes jovens, sendo seu número mais baixo nos homens idosos, em relação aos jovens. Espermatídes multinucleadas originam-se de fusão de espermatídes, resultando em células gigantes, com dezenas de núcleos esféricos (Nistal et al., 1986). Na parada de maturação em espermatócitos ou espermatogônias, células germinativas em degeneração podem ser observadas. Espermatogônias A_{escuras} e A_{claras} estão presentes. Na aplasia germinativa e na esclerose tubular células germinativas estão completamente ausentes (Dakouane et al., 2005).

Há uma correlação entre a proporção de células de Leydig alteradas e a diminuição dos níveis de testosterona e aumento dos níveis séricos de LH (Paniagua et al., 1987b). A diminuição na população de células de Leydig com o avanço da idade foi relatada em alguns estudos. Entretanto não foi encontrada relação entre o número de células de Leydig e a produção espermiática diária em homens (Neaves et al., 1985; Neaves et al., 1984; Kaler e Neaves, 1978). Dakouane e colaboradores (2005) observaram um aumento no tamanho das células de Leydig com a idade, e uma alta variedade entre os indivíduos em relação à densidade dessas células.

Das alterações encontradas nessas células as mais frequentemente foram o aumento de grânulos de lipofucsina (produtos degenerativos) e de gotículas lipídicas. Essas características são típicas de células com função esteroidogênica diminuída. Células de Leydig multivacuoladas ou multinucleadas são prováveis formas de involução celular (Schulze, 1984). São consideradas alterações ultraestruturais das células de Leydig no homem idoso quando estas apresentam uma reduzida quantidade de retículo endoplasmático liso e de mitocôndrias. Nestas alterações a presença de múltiplos cristais citoplasmáticos ou intranucleares também pode ser observada (cristais de Reinke) (Paniagua et al., 1987b).

De acordo com Martello (2013) homens idosos com câncer de próstata e que não sofreram nenhum tipo de tratamento apresentavam os túbulos seminíferos semelhantes aos descritos na literatura para o homem normal, com todos os estádios do ciclo do epitélio seminífero com mais de um estágio por secção transversal. Normalmente possuíam uma redução da altura do epitélio seminífero caracterizando um processo de hipoespermatogênese. Constatou que o epitélio germinativo apresentava espaços extracelulares que estavam relacionados com a esfoliação ou descamação das células germinativas, principalmente das espermatídes e com menor frequência dos espermátócitos. Além disso, foram identificadas mitoses espermatogoniais e células germinativas em apoptose ao longo de todo processo espermatogênico, mas com maior frequência em espermatídes. As células de Sertoli de homens idosos apresentavam morfologia aparentemente normal, assim como as espermatogônias até as espermatídes. Observou que a túnica própria apresentava-se com diferentes espessuras entre os indivíduos.

1.4. Espermatogênese após diferentes tratamentos para o câncer

O câncer de próstata é a sexta neoplasia maligna mais comum no mundo em número de casos novos, o terceiro câncer mais comum em homens (Rhoden e Averbek, 2010; Gronberg, 2003). Comparado aos outros tipos de câncer, este é conhecido como o câncer da terceira idade, pois em média três quartos dos casos que ocorrem mundialmente acometem os homens a partir dos 65 anos (INCA, 2010). Entre 88% e 92% dos novos casos evidenciam neoplasia confinada à glândula e apenas 4% a 6% dos pacientes apresentam-se com tumor metastático (Srougi et al., 2008; Srougi, 1995). Quando a doença está localizada, ou seja, confinada ao tecido prostático, pode ser tratada através de cirurgia (prostatectomia radical), radioterapia externa e braquiterapia (implante de sementes radioativas no tecido prostático). Por outro lado, a doença avançada não é mais passível de cura, sendo tratada apenas por métodos paliativos e hormonioterapia, visando prolongar e melhorar a qualidade de vida do paciente (Martello, 2013).

A radiação é o tratamento mais efetivo para o câncer de próstata, pois age nas células cancerígenas que se dividem mais rapidamente. Entretanto as células germinativas se dividem tão rápido quanto as células cancerígenas, sendo assim, indiretamente, alvo dessas terapias (Puscheck et al., 2004). Observa-se uma redução drástica do número de células germinativas

após os tratamentos radioterápicos e hormonioterápicos em relação à fase meiótica e espermiogênica (Martello, 2013). A recuperação da espermatogênese após os diversos tipos de tratamentos para o câncer de próstata depende da dose aplicada assim como da integridade e sobrevivência das espermatogônias tronco e do estado funcional do seu microambiente (Meistrich, 2009), bem como das interações entre espermatogônias e células somáticas de Sertoli e Leydig (Zhang et al., 2007). A cinética da recuperação da espermatogênese é mais demorada após doses moderadas de radiação, que matam/eliminam algumas das espermatogônias tronco, do que após quimioterapia, que não mata/elimina as espermatogônias-tronco (Meistrich, 2013).

Martello (2013) observou que os tratamentos contra o câncer de próstata afetaram a capacidade mitótica das espermatogônias e a capacidade de suporte das células de Sertoli. Após o tratamento radioterápico houve uma redução do número de espermatogônias do tipo A_{escura} , o que não aconteceu após tratamento hormonal exclusivo. Já o número de espermatogônias A_{claras} não foi significativamente alterado após ambos os tratamentos. O número de células germinativas em apoptose foi maior no tratamento radioterápico, sendo assim mais nocivo para as células germinativas que o tratamento com os hormônios (Martello, 2013). Enquanto espermatogônias-tronco A_{escuras} são mitoticamente inativas em situações normais, as espermatogônias A_{claras} funcionam como células progenitoras, formando células germinativas mais maduras, como espermatogônias do tipo B, espermatócitos e espermátides, além de se auto-renovarem em cada ciclo da espermatogênese. Devido à baixa taxa de duplicação, as espermatogônias A_{escuras} são mais resistentes a insultos tóxicos, químicos ou radiológicos, servindo como células de reserva, ativando-se apenas após episódios de toxicidade, permitindo a restauração da população espermatogonial. Por outro lado, as espermatogônias A_{claras} , que se dividem ativamente, são mais susceptíveis a esses insultos (Meistrich, 1986).

Martello (2013) constatou que após diferentes tratamentos para o câncer de próstata houve redução significativa do diâmetro dos túbulos seminíferos e da altura do epitélio, em relação aos indivíduos que não sofreram tratamentos. Ele observou que a espessura da túnica própria não sofreu alterações nos indivíduos com câncer de próstata tratados e não tratados.

Foi observado (Shetty e Meistrich, 2005) que as células de Leydig e Sertoli, que não proliferam em adultos, sobrevivem a maioria das terapias citotóxicas. Entretanto essas células podem sofrer danos funcionais. Após as terapias citotóxicas frequentemente as células

germinativas encontram-se ausentes, e os túbulos seminíferos contém somente células de Sertoli, o que pode ser resultado da morte das espermatogônias tronco, da perda de habilidade das células somáticas em dar suporte à diferenciação das poucas espermatogônias tronco sobreviventes ou de ambos.

Terapias citotóxicas, recebidas por homens adultos ou durante a infância, podem levar a azoospermia prolongada e até a esterilidade. Como um método seguro, de baixo-custo e bem estabelecido, a criopreservação de semen deve ser rotineiramente e altamente recomendada para preservar a fertilidade antes do tratamento do câncer (Puscheck et al., 2004).

1.5. Espematogênese após hormonioterapia

Estudo desenvolvido por Martello (2013) mostra que após tratamento hormonal exclusivo para o câncer de próstata podem ser encontradas, no epitélio seminífero, células germinativas em quantidades variáveis dependendo do indivíduo, dentre elas as mais avançadas são os espermatócitos na fase de paquíteno. Após o tratamento hormonal, espermátides não são mais observadas. O epitélio germinativo apresenta-se mais baixo e com as células de Sertoli com citoplasma repleto de vacúolos e grânulos lipídicos. A túnica própria apresenta um maior número de invaginações em direção ao epitélio quando comparado àquela dos indivíduos tratados com radioterapia, apesar disso, a espessura da túnica e o diâmetro tubular são semelhantes. Podem-se observar alguns túbulos seminíferos com aspecto fibrótico (Martello, 2013).

Os hormônios mais utilizados para tratamento para o câncer de próstata são os seguintes:

GnRH-agonista

A terapia com GnRH-agonista está substituindo a orquiectomia como primeira opção para a privação de andrógeno no câncer de próstata. O uso de GnRH-agonistas tem sido demonstrado como benéfico em relação a morbidade do câncer em pacientes com estágio avançado da doença (Chodak et al., 2002; Crawford et al., 1989).

A ação inibitória paradoxal do GnRH-agonista na secreção de gonadotrofinas está bem estabelecida e tem numerosas aplicações clínicas com a inibição da função do eixo hipotálamo-hipófise-gônada, incluindo câncer de próstata e mama, endometriose, ovários policísticos,

puberdade precoce e contracepção. Especificamente no tratamento do câncer avançado de próstata, após duas semanas do início do uso do GnRH-agonista, existe um bloqueio quase total da produção das gonadotrofinas (FSH e LH) pela hipófise, devido a dessensibilização ou regulação-negativa dos receptores de GnRH da glândula, bloqueando a produção de testosterona e mantendo-a em nível de castração durante todo o tempo de uso do medicamento (Engel et al., 2007; Huhtaniemi et al., 1987a). Embora o tratamento suprima efetivamente a produção de testosterona, a esteroidogênese testicular não é totalmente bloqueada. Aproximadamente 10% dos pacientes tratados com GnRH-agonistas falham ao alcançar o nível de castração (Crawford et al., 2011; Huhtaniemi et al., 1987b). Essa produção residual de andrógenos não compromete a eficácia terapêutica contra o câncer de próstata, entretanto pode explicar uma variável supressão da espermatogênese, como revelam estudos histológicos realizados em pacientes com câncer avançado de próstata, tratados com GnRH-agonistas durante seis meses e depois submetidos a orquiectomia bilateral, comparados com pacientes que realizaram a orquiectomia como tratamento primário para o câncer de próstata (Huhtaniemi et al., 1987b). Em contraste, os GnRH-antagonistas se ligam diretamente nos receptores de GnRH na glândula pituitária, levando a uma rápida diminuição dos níveis de LH, FSH e testosterona, sem qualquer produção residual (Stangelberger et al., 2008).

Estrogênios

No tratamento do câncer de próstata, os estrogênios bloqueiam a liberação do hormônio luteinizante (LH) pela hipófise anterior, impedindo a estimulação da produção de testosterona pelos testículos. Um efeito dos estrogênios sobre o metabolismo androgênico é a inibição de diversos sistemas enzimáticos que participam da fisiologia prostática (inibição da DNA-polimerase, da 5alfa- redutase, entre outros). Demonstrou-se que os estrogênios também estimulam o sistema retículoendotelial, incrementando as defesas orgânicas e contribuindo com o efeito antitumoral (Cisneros et al., 2005). O dietilestilbestrol (DES) é o estrogênio mais comumente utilizado na terapia hormonal contra o câncer avançado de próstata. O DES é utilizado em vários estudos clínicos com dosagens variando de 0,2; 1,0; 3,0 e 5,0 mg/dia. Além disso, na prática clínica habitual de décadas passadas era comum utilizar doses muito maiores (Carrizo, 2001). O DES exerce controle na retroalimentação do hipotálamo diminuindo a produção do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH), do hormônio folículo estimulante (FSH) e de testosterona a níveis de castração. Os sais de fósforo do DES atuam

por um mecanismo de ação citotóxica direta. A fosfatase ácida desfosforila o composto dentro das células malignas, e o estilbestrol livre as destruiria (Trafford, 1965).

O uso combinado de estrogênios mais orquiectomia, não é recomendado por não ser superior à terapia individual de cada um deles. Por isso, tem se proposto como segunda linha o bloqueio de andrógenos (ver abaixo), porque os derivados estrogênicos são úteis no tratamento do câncer de próstata resistentes à castração, diminuindo a síntese autônoma de andrógenos mediada por seus efeitos citotóxicos, provocando a diminuição dos níveis de antígeno prostático específico em 43% dos pacientes quando foi administrado em doses baixas (Shamash, 2011; Huguet et al., 2006). Estudos demonstraram que não há diferença no progresso tumoral entre o uso de DES e flutamida, porém o DES tem maior sobrevida e mais reações adversas (Lund et al., 1988, Jacobo et al., 1976).

Estudos em ratos e camundongos adultos demonstraram que estrogênios têm efeitos deletérios na espermatogênese. A redução do hormônio luteinizante (LH), bem como seu efeito direto na inibição no processo da esteroidogênese nas células de Leydig contribui para a redução dos níveis de testosterona nos testículos (Steinberger, 1971).

Antiandrogênios

O acetato de ciproterona é um esteroide sintético que compete com a testosterona e a dihidrotestosterona nos receptores de andrógenos da próstata e testículos, produzindo também supressão da liberação do hormônio luteinizante (LH) por ação no eixo hipotálamo-hipófise. Portanto ela apresenta efeito central e periférico. Devido a seu efeito progestacional e antiandrogênico, causa profunda supressão na espermatogênese. Quando utilizada em associação com testosterona exógena, a ciproterona leva a consistente supressão na produção espermática de homens adultos, tendo sido essa associação testada como um possível anticoncepcional masculino (Meriggiola et al., 1998).

Flutamida é um antiandrógeno de ação periférica, que parece inibir a absorção e ligação de testosterona e dihidrotestosterona aos receptores nucleares das células prostáticas. Nos testículos produz degeneração do epitélio seminífero e hiperplasia das células intersticiais. Estudos histológicos em camundongos tratados com flutamida apontam para anomalias, principalmente na formação do acrossoma, levando a altas porcentagens de espermátides anormais (Anahara et al., 2008).

Esses dois antiandrógenos são os mais utilizados para tratamento do câncer avançado de

próstata, como monoterapia ou, mais frequentemente, associados aos bloqueadores centrais, como o GnRH-agonista ou o estrógeno, para bloqueio androgênico total (Martello, 2013).

1.6. Espermatogênese após radioterapia

A radioterapia resulta em danos ao DNA de todos os tipos de células germinativas, células de Sertoli e de Leydig, cada uma com níveis variáveis de sensibilidade (González et al., 2012; Centola et al., 1994). A dose difundida para os testículos durante a raditerapia pélvica-abdominal é de 1-2% da dose total aplicada no tumor (Budgell et al., 2001). A radiação escrotal, a menos que a proteção testicular seja providenciada, é constantemente associada com azoospermia (Ash, 1980).

Além da dose total recebida, o fracionamento das aplicações e a maneira temporal da dose total recebida também tem impacto nos danos celulares e na extensão dos danos causados na espermatogênese. Doses mais altas liberadas em poucas frações são menos nocivas que doses mais baixas liberadas em maior número de aplicações. O parênquima testicular é um dos tecidos mais radiosensíveis. O dano testicular por irradiação ocorre através de exposição direta do testículo ou pela dispersão dos raios dirigidos em áreas adjacentes, principalmente na região abdominal e pélvica (González et al., 2012; Centola et al., 1994). A radiosensibilidade é definida como a susceptibilidade das células à radiação aplicada (revisão em Colpi et al., 2004).

Em seu estudo, Martello (2013) observou que pacientes tratados com radioterapia para câncer de próstata, apresentaram ausência de células germinativas. No epitélio seminífero observou-se apenas a presença de células de Sertoli com vacúolos citoplasmáticos e grande quantidade de gotículas lipídicas. O diâmetro dos túbulos seminíferos apresentava-se reduzidos e com túnica própria espessada com prolongamentos da membrana basal para o interior do epitélio seminífero. Também foi observada a presença de túbulos seminíferos com aspecto fibrótico. Em raras regiões encontraram-se pequenas ilhas de túbulos seminíferos com espermatogênese, com a presença, nestes locais, de células germinativas desde espermatogônias até as espermátides arredondadas, com mitoses espermatogoniais e células de Sertoli com morfologia de células em apoptose.

Meistrich (1993) e Ash (1980) observaram que a radioterapia induz a diminuição do epitélio germinativo de forma dose-dependente, e eventualmente pode causar ao paciente

esterilidade (Puscheck et al., 2004). As células germinativas demonstram maior sensibilidade à irradiação quando comparadas com as células somáticas do testículo, provavelmente devido ao seu alto índice mitótico. Pode-se especular que uma parte da população de espermatogônias que se encontra fora do ciclo de divisão celular, apresentam dano letal apenas quando são recrutadas para este ciclo. Além disso, verificou-se que a diferenciação de espermatogônia para espermatócitos é reduzida durante este tempo (Meistrich, 2013; Meistrich e van Beek, 1990).

As espermatogônias são as mais radiosensíveis, podendo sofrer lesões com doses abaixo de 0,1 Gy, enquanto que os espermatócitos sofrem lesões com dosagens a partir de 2 Gy e as espermatídes a partir de 4 Gy. Dose de 0,1 Gy mostra lesões temporárias com parada de espermatogênese, enquanto dose de 0,7 Gy resulta em azoospermia temporária e dose de 1,2 Gy em azoospermia permanente (Howell e Shalet, 1998). As respostas às doses acima são para doses únicas de radiação. Quando utilizado a radiação fracionado no tratamento de câncer (frequentemente administrada em doses ao longo de 3-4 semanas), provoca maiores atrasos na recuperação da espermatogênese, e doses totais mais baixas causam azoospermia permanente (Meistrich, 2013; Meistrich e van Beek, 1990). Esses dados são significantes porque muitos protocolos para câncer testicular utilizam doses de 16-18 Gy, embora o tratamento seja direcionado para linfonodos retroperitoneais e não diretamente aos testículos. Ao contrário do epitélio seminífero, as células de Leydig são relativamente radioresistentes, sendo doses de 20-30 Gy necessárias para causar hipogonadismo. Embora possa haver uma elevação dos níveis séricos de FSH e LH com baixas doses de irradiação, os níveis de testosterona sérica permanecem normais (Howell e Shalet, 2002).

1.7. Espermatogênese após quimioterapia

Quimioterapia citotóxica tem melhorado a taxa de sobrevivência de pacientes portadores de muitos tipos de câncer, incluindo câncer no testículo. Esses tratamentos são, entretanto, seguidos frequentemente de disfunção testicular devido a prejuízos na espermatogênese, causados pelas drogas utilizadas. Em casos mais graves, até mesmo as células de Leydig podem ser lesadas, levando a quadros de hipogonadismo. As chances de recuperação da espermatogênese estão relacionadas com os tipos de drogas utilizadas e suas dosagens (Meistrich et al., 1989; da Cunha et al., 1984).

Após tratamentos com agentes quimioterápicos, que podem matar células germinativas,

o mesmo fenômeno de azoospermia dos tratamentos radioterápicos, pode ser observado. Isso se deve as espermatogonias do tipo A que não iniciam a diferenciação enquanto sua população não é recuperada (Paulsen, 1973) e/ou ao fato de que, enquanto há, mesmo que poucos espermatozoides sendo produzidos no testículo, esses espermatozoides não sobrevivem ao transporte através do epidídimo e conseqüentemente não alcançam o ejaculado. Também existe a possibilidade de que haja algum dano ou alteração na sinalização das células somáticas que limitam a diferenciação espermatogonial (Silber et al., 1997).

As drogas mais associadas com gonadotoxicidade clinicamente significativa são os agentes alquilantes, como a ciclofosfamida, o chloranbucil, a mustina, o busulfan e a procarbazina, entre outras. Outros grupos de drogas como os antimetabólitos (cytarabina), alcaloides de vinca (vinblastina e vincristina) e o cisplatinun também estão associados a prejuízos na espermatogênese, porém em menor relevância, havendo recuperação da fertilidade em grande parte dos pacientes tratados. Como na maioria das vezes essas drogas são usadas em vários tipos de associações para tratamentos das doenças acima citadas, é mais difícil saber o exato efeito de cada uma delas sobre a espermatogênese. Outro fato que também dificulta essa avaliação é que muitas vezes o tratamento quimioterápico é associado à radioterapia, somando-se assim o efeito gonadotóxico dessa outra modalidade de terapia antineoplásica (Drumond et al., 2011; Howell e Shalet, 2001).

2. JUSTIFICATIVA

Os diversos tipos de tratamentos para o câncer de próstata provocam diferentes tipos de alterações testiculares. Conforme demonstrado em estudo anterior, realizado por nosso grupo (Martello, 2013), a hormonioterapia e radioterapia afetam drasticamente a espermatogênese de homens idosos submetidos a esses tratamentos para o câncer de próstata. Os escores histopatológicos testiculares de Johnsen e de Bergmann demonstraram com mais acuidade, em comparação ao escore clássico de cinco padrões, que os tratamentos radioterápicos e hormonais foram lesivos para a espermatogênese. Os pacientes idosos com câncer avançado de próstata, que não sofreram tratamento hormonal e/ou radioterápico, apresentaram espermatogênese normal, com parâmetros morfológicos e morfométricos compatíveis com a faixa etária. A radioterapia afetou mais acentuadamente a proliferação espermatogonial do que a hormonioterapia e, desta forma, após hormonioterapia há uma

maior probabilidade de recuperação da espermatogênese. Parâmetros morfométricos demonstraram que dentre os dois tratamentos, apenas a hormonioterapia bloqueia a espermiogênese.

Os estudos morfológicos e morfométricos desenvolvidos por Martello (2013) demonstraram que foram evidentes as alterações do processo espermatogênico principalmente após tratamentos com radioterapia (TR) e hormonioterapia (TH). O diferencial deste estudo foi ter utilizado um processamento para obtenção de cortes histológicos dos testículos com alta resolução, para análise sob a microscopia de luz (Chiarini-Garcia e Meistrich, 2008). Enquanto o epitélio seminífero dos indivíduos que não sofreram tratamentos para o câncer de próstata antes da orquiectomia (grupo ST) não apresentou mudanças significativas que não fossem compatíveis com a faixa etária dos indivíduos, os grupos tratados (TH e TR) apresentaram resultados em relação à espermatogênese drasticamente negativos, na grande maioria dos pacientes. Após TH exclusivo, o processo espermatogênico sofreu grande impacto, com redução significativa do diâmetro dos túbulos seminíferos e da altura do epitélio. Apesar disso, esses pacientes foram considerados com bom prognóstico para recuperação da espermatogênese, visto que os números de espermatogônias A_{escuras} e A_{claras} não foram afetados, quando comparados com o grupo ST. Nos pacientes TR exclusivo apesar dos túbulos e epitélio seminíferos se apresentarem com diâmetro e altura menor, respectivamente, neles foram observadas algumas ilhas de túbulos seminíferos com espermatogênese. Em alguns destes túbulos foram encontradas células germinativas que avançaram até espermátides alongadas. O número de espermatogônias A_{escuras} foi significativamente menor nos indivíduos irradiados. A irradiação foi mais deletéria sobre as células germinativas que o tratamento hormonal, uma vez que o número de apoptose dessas células foi significativamente maior após esse tipo de insulto, em relação aos indivíduos não tratados. Apesar dos danos apresentados, levou-se em consideração que a fase proliferativa espermatogonial foi menos afetada após a irradiação, então se supôs que esses indivíduos, quando tivessem os tratamentos interrompidos, poderiam ter seu processo espermatogênico recuperado (Martello, 2013).

O estudo desenvolvido por Martello (2013) mostrou claramente o quanto tratamentos para o câncer de próstata podem, de forma indireta, afetar o processo espermatogênico em homens, em algumas situações tornando-os inférteis. No entanto, algumas questões importantes não foram respondidas por este pesquisador. Dentre elas, o quanto os referidos tratamentos podem afetar a capacidade proliferativa das espermatogônias, células estas

responsáveis pela manutenção deste sistema autorenovável. Uma dificuldade do trabalho de Martello (2013) foi a de obter testículos de pacientes submetidos à irradiação, utilizando no seu estudo apenas três pacientes neste grupo experimental. Desta forma, em alguns dos parâmetros analisados, como por exemplo dosagens hormonais, os resultados obtidos não foram ainda conclusivos. Diante do exposto, o presente trabalho pretendeu, com o aumento do número de pacientes, avaliar os parâmetros citados acima, além de reexaminar outros já avaliados por Martello (2013), procurando confirmar mais precisamente os efeitos deletérios da prostatectomia e de tratamentos hormonais e radioterápicos para o câncer de próstata sobre o testículo humano.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a morfologia e alterações quantitativas de diversos componentes do parênquima testicular bem como a proliferação espermatogonial em homens com câncer de próstata que foram orquiectomizados e não sofreram nenhum tipo de tratamento prévio (ST) em comparação com aqueles que foram submetidos à prostatectomia radical (PR), tratamentos hormonais (TH) e tratamentos radioterápicos (TR).

3.2. Objetivos específicos

De forma comparativa entre os pacientes controle (ST) com aqueles que foram submetidos a diferentes tratamentos para o câncer de próstata (PR, TH e TR), os seguintes parâmetros foram avaliados:

- Diâmetro médio dos túbulos seminíferos;
- Proporção volumétrica (Vv%) de túbulo seminífero e interstício testicular;
- Proporção volumétrica (Vv%) de túbulo e interstício testiculares com e sem fibrose;
- Proliferação espermatogonial, empregando o marcador MCM-7;
- Dosagem sérica dos hormônios FSH, LH e testosterona.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP) sob no CAAE – 0117.0.203.000-07 (Anexo I), pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão (DEPE) do Hospital das Clínicas da UFMG (Processo nº 079/2007) (Anexo II) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde e Ministério da Saúde, sob o protocolo CONEP nº 14.250 e parecer nº 189/2008 (Anexo III). Os pacientes que doaram os testículos foram informados sobre os objetivos do presente estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo IV).

4.2. Pacientes

Os sujeitos dessa pesquisa foram pacientes portadores de câncer avançado de próstata submetidos à castração cirúrgica (orquiectomia total ou subcapsular bilateral) como forma de bloqueio definitivo de testosterona, para tratamento paliativo da doença localmente avançada ou metastática, conforme indicação da literatura médica (Fonseca et al., 2009; Gudziak e Smith, 1994). A coleta desse material biológico ocorreu no período de março de 2007 até junho de 2015, com um total de 29 pacientes. Oito pacientes foram excluídos no final do estudo, sendo um por ter feito tratamento hormonal com estrogênio durante três anos, porém interrompeu oito meses antes da orquiectomia, três por não apresentarem informações confiáveis sobre o seu tratamento radioterápico (dose e período de tratamento), um por ainda não ter terminado as sessões de radioterapia antes da orquiectomia e três por fazerem mais de um tipo de tratamento para o câncer de próstata. Cinco desses pacientes excluídos foram analisados em estudos anteriores do grupo por Martello (2013). Portanto, foram incluídos neste estudo 22 pacientes, com idades entre 59 e 90 anos, com média de 73,5 anos, conforme descrição abaixo.

4.3. Grupos experimentais

O parênquima testicular foi obtido de pacientes submetidos à orquiectomia no Hospital das Clínicas da UFMG, sob coordenação da equipe médica do Serviço de Urologia do Hospital

das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A indicação de orquiectomia subcapsular bilateral foi feita por médicos que trabalham na área de urologia, sem nenhuma influência do presente estudo na conduta médica para o tratamento do câncer de próstata. Os tecidos testiculares foram utilizados com a concordância dos pacientes e familiares em ceder esse material para pesquisa, após preenchimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO IV).

Sete pacientes foram submetidos à orquiectomia bilateral como forma primária de tratamento, por já apresentarem doença avançada desde o diagnóstico. Estes não sofreram qualquer tipo de tratamento. Quatro pacientes foram inicialmente tratados com prostatectomia radical, quando a doença ainda estava localizada apenas na próstata, mas posteriormente apresentaram recidiva da doença e receberam indicação de castração cirúrgica. Cinco pacientes foram inicialmente tratados com hormonioterapia, para bloqueio da ação da testosterona nas células prostáticas, sendo três tratados com estrógeno (bloqueador central) e dois com acetato de ciproterona (bloqueador central e periférico). Posteriormente todos esses cinco pacientes receberam indicação de orquiectomia subcapsular como tratamento definitivo. Seis pacientes foram tratados com radioterapia externa, por acelerador linear de partículas, quando a doença estava localizada apenas na próstata e posteriormente receberam indicação de orquiectomia subcapsular como tratamento definitivo. Informações mais detalhadas de cada paciente, obtidas através de protocolo clínico e colhidas do próprio paciente ou de seus familiares, são apresentadas no Anexo V.

Os grupos experimentais foram os seguintes:

Pacientes sem tratamento (ST, n=7)

Grupo composto por sete pacientes portadores de câncer avançado de próstata, submetidos à orquiectomia subcapsular bilateral como forma de bloqueio hormonal definitivo, que não se submeteram a nenhum tratamento prévio.

Pacientes sem tratamento e prostatectomizados (PR, n=4)

Grupo composto por quatro pacientes portadores de câncer avançado de próstata, submetidos à orquiectomia subcapsular bilateral como forma de bloqueio hormonal definitivo, que foram tratados somente com a prostatectomia radical, quando a doença ainda estava

localizada apenas na próstata.

Pacientes tratados com terapia hormonal (TH, n=5)

Grupo composto por cinco pacientes portadores de câncer avançado de próstata, submetidos à orquiectomia subcapsular bilateral como forma de bloqueio hormonal definitivo, que se encontravam sob tratamento hormonal exclusivo com bloqueadores da ação da testosterona, de ação central ou periférica.

Pacientes tratados com radioterapia externa (TR, n=6)

Grupo composto de seis pacientes portadores de câncer avançado de próstata, submetidos à orquiectomia subcapsular bilateral como forma de bloqueio hormonal definitivo, que haviam se submetido anteriormente a tratamento radioterápico externo, quando a doença estava localizada na próstata, não tendo recebido mais nenhum tratamento.

4.4. Orquiectomia bilateral

As orquiectomias foram do tipo total ou subcapsular. Para tal, foi realizado bloqueio anestésico local por punção percutânea do escroto, utilizando-se seringa estéril de 20 ml acoplada a uma agulha de 21-gauge, com infiltração de 7 mL de solução 1:1 de lidocaína 1% e bupivacaína 0,5% em cada cordão espermático e 1mL dessa solução sob a pele e subcutâneo da região incisada. Com o paciente na posição de decúbito dorsal, fez-se a degermação da pele de toda a região genital com solução PVPI degermante e anti-sepsia da mesma com tintura de PVPI. O procedimento cirúrgico iniciou-se com uma incisão da pele escrotal de aproximadamente 4,0 cm, na região da rafe escrotal, por onde foram expostas todas as camadas, desde a pele até a túnica vaginal. A hemostasia foi realizada com auxílio de um eletrocautério. O testículo foi exteriorizado e retirado, no caso de orquiectomia total, ou teve sua túnica albugínea aberta e o parênquima testicular exposto e completamente liberado da albugínea com auxílio de uma gaze. Nesse tempo cirúrgico foi feito novamente a hemostasia, com auxílio do eletrocautério e sutura com fio de catgut 2-0. O mesmo fio foi usado na rafia dos outros planos, separadamente até a pele. Foi feito o mesmo procedimento no testículo contralateral (Mayor and Zingg, 1975).

4.5. Processamento histológico do parênquima testicular

Imediatamente após a orquiectomia, o parênquima dos testículos direito e esquerdo foi separado e de cada um deles foram obtidos fragmentos que foram colocados em soluções fixadoras, conforme descrito abaixo.

Fixação em glutaraldeído e inclusão em glicol metacrilato

Após a orquiectomia, fragmentos dos testículos foram fixados por imersão em glutaraldeído a 5% em tampão fosfato 0,05M pH 7,3, por 24 horas. Estes fragmentos foram mantidos a 4°C até o momento da inclusão. No momento da inclusão, finos fragmentos de 2 a 3 mm de espessura foram recortados da superfície dos fragmentos testiculares. Estes fragmentos foram desidratados em série crescente de alcoóis e incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato (Historesina, Leica), conforme descrito por Chiarini-Garcia et al. (2011). Dos blocos foram obtidos cortes histológicos de 3 e 5 µm de espessura que foram corados com azul de toluidina-borato de sódio para as análises morfológicas e morfométricas.

Fixação em paraformaldeído e inclusão em paraplast

Fragmentos testiculares foram fixados por imersão em paraformaldeído a 4% (tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,2, 24h) e posteriormente armazenados, à 4°C, em tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,2, até o momento da inclusão. No momento da inclusão, finos fragmentos de 5 mm de espessura foram recortados da superfície dos fragmentos testiculares. Estes fragmentos foram desidratados em série crescente de etanol e incluídos em paraplast (Merck). Dos blocos foram obtidos cortes histológicos de 5 µm de espessura para análise imunohistoquímica.

4.6. Análises morfológicas

As avaliações morfológicas foram realizadas em fragmentos de testículo processados em glutaraldeído e incluídas em resina plástica à base de glicol metacrilato. Foram consideradas algumas características tais como organização do epitélio, presença de célula germinativa, presença de fibrose, presença de padrão de túbulos seminíferos que apresentavam apenas células de Sertoli (*Sertoli only*). Tais características foram observadas e registradas em

fotomicrografias digitais obtidas no fotomicroscópio BX-51 da Olympus acoplado a câmera fotográfica digital Q-Color 3, também Olympus, para avaliação e divulgação dos resultados. As imagens digitais foram tratadas com o programa Adobe Photoshop e montadas e legendadas em pranchas utilizando o programa Adobe Illustrator.

4.7. Análises morfométricas

As seguintes avaliações morfométricas foram realizadas em fragmentos de testículo processados em glutaraldeído e incluídos em resina plástica à base de glicol metacrílico, a saber:

Diâmetro tubular

Os diâmetros dos túbulos seminíferos foram determinados nos cortes histológicos transversais, utilizando-se régua graduada acoplada à ocular de um microscópio Olympus BX-41, régua esta aferida em micrômetros com o auxílio de uma lâmina micrométrica de Leitz. Mensurou-se 50 secções transversais de túbulo seminífero por indivíduo (25 em cada testículo), de contorno o mais circular possível, selecionados aleatoriamente em varredura horizontal do tecido. As mensurações, em micrômetros, foram realizadas em aumento final de 200X.

Proporção volumétrica (V/v%)

A proporção volumétrica de túbulo seminífero (epitélio seminífero, fibrose tubular, túnica própria, lúmen e células no lúmen) e interterstício testicular (vasos sanguíneos, célula de Leydig, mastócito, células de tecido conjuntivo, interstício e fibrose intertubular) foram determinada a partir da contagem de 4410 pontos. Para isto, utilizou-se retículo com 441 intersecções acoplado à ocular de um microscópio Olympus BX-41 onde foram analisados 10 campos aleatórios dos fragmentos testiculares de ambos os testículos de cada paciente. Para obtenção da proporção volumétrica (Vv%) foram contados, em aumento final de 400X, os pontos coincidentes com os componentes tubulares e intertubulares citados acima.

Para o cálculo do volume destes componentes testiculares a seguinte fórmula foi aplicada, onde:

$$V_{cc} = \frac{P_c \cdot 100}{P_T}$$

V_{cc} = proporção volumétrica do componente avaliado (%)

P_c = pontos do componente avaliado (μm³)

P_T = pontos do parênquima testicular (μm³)

A proporção volumétrica de túbulo seminífero sem e com fibrose bem como de interstício sem e com fibrose, foi determinada a partir da contagem de 1800 pontos utilizando-se retículo com 36 intersecções (pontos) acoplados à ocular de um microscópio Olympus BX-41 onde foram analisados 50 campos aleatórios no fragmento testicular de cada paciente. Para obtenção desta proporção volumétrica (Vv%) foram contados, em aumento final de 200X os pontos coincidentes com túbulo e interstício testicular, conforme descrito acima. Para calcular o volume destes componentes foi aplicada a mesma fórmula citada acima.

Proporção de túbulos seminíferos em relação às células germinativas mais avançadas

Determinou-se a porcentagem de túbulos seminíferos nos quais as células germinativas mais avançadas foram as (1) espermatogônias, (2) espermatócitos, (3) espermátides arredondadas, (4) espermátides em alongamento e (5) espermátides alongadas. Determinou-se também a porcentagem de (6) túbulos apenas com células de Sertoli e (7) túbulos seminíferos fibrosados, nos quatro grupos de pacientes avaliados. Esta avaliação foi realizada em microscópio Olympus BX-41, onde, em aumento final de 100X, contou-se 50 túbulos seminíferos (25 em cada testículo) por paciente.

4.8. Avaliação imunohistoquímica

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (LABER - ICB/UFMG), que possui estrutura básica para este fim. Para a leitura das lâminas utilizou-se o microscópio Olympus BX-51.

Para avaliação imunohistoquímica, fragmentos testiculares fixados em paraformaldeído e incluídos em paraplast foram submetidos à avaliação com objetivo de determinar a expressão do marcador de proliferação celular MCM7 (Abcam anti-MCM7 antibody – cat. #ab2360). Os

cortes foram rehidratados e incubados com peróxido de hidrogênio à 3% em metanol, por 30 minutos, com o objetivo de bloquear a peroxidase endógena.

Para a recuperação antigênica as lâminas, imersas em tampão citrato pH 6,0, foram aquecidas em microondas por 7 minutos, sem levantar fervura, e deixadas esfriar até a temperatura ambiente. Em seguida, foram realizados bloqueios para avidina/biotina e de ligações inespecíficas. Primeiramente, realizou-se o bloqueio da avidina e biotina utilizando-se kit da Vector Laboratories (avidin/biotin blocking kit, Vector Laboratories), sendo cada um por 10 minutos. Posteriormente, realizou-se bloqueio de ligações inespecíficas utilizando-se soro de cabra a 10%, por 30 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados, durante uma noite à 4°C e em câmara úmida, com o anticorpo primário MCM7 diluído em BSA à 0,5%.

Posteriormente, as secções foram lavadas em PBS (tampão fosfato salino, 0,2mol/L, pH 7,4) e incubadas com o anticorpo secundário *anti-mouse* biotinilado (Vector Laboratories) por 1h a temperatura ambiente, para posterior amplificação com kit Vectastain ABC Elite (Vector Laboratories) por 30 min. A reação foi revelada com 3,3'-diaminobenzidina, 1:300 (DAB, Vector Laboratories) que foi usada como substrato para a peroxidase. Os cortes foram lavados 5 vezes em PBS 0,2 mol/L entre todos os passos descritos acima, exceto antes do anticorpo primário.

Para análise da reação imunohistoquímica sobre as espermatogônias, empregou-se um microscópio Olympus BX51 acoplado a uma câmera fotográfica digital QColor 3. Imagens fotográficas digitais foram obtidas de todos os túbulos seminíferos contidos no corte para cada paciente analisado, utilizando o programa ImagePro Express (Media Cybernetics). Posteriormente, das imagens digitais dos túbulos seminíferos foram determinados (1) o número de espermatogônias que expressam o marcador de proliferação celular (MCM7+) e (2) o número daquelas que não o expressavam (MCM7-). Destes mesmos túbulos, e utilizando o programa ImagePro Express, foram medidos os comprimentos de suas bases, ao nível da membrana basal, valor este expresso em milímetros. Com estes valores (número de espermatogônias (+) e (-) para MCM7 e o comprimento do compartimento basal) determinou-se, para cada grupo experimental, o número de espermatogônias por milímetro de compartimento basal e o índice de proliferação espermatogonial. Este índice foi determinado dividindo o número de espermatogônias MCM7+ pelo total de espermatogônias (soma das células MCM7+ e MCM7-).

Contou-se também o número de espermatogônias em mitose e em apoptose, e o seu número também foi equalizado por milímetro de compartimento basal.

4.9. Perfil Hormonal

No mesmo dia da realização da orquiectomia, antes de iniciar a cirurgia, foi colhido sangue periférico de cada paciente, com posterior centrifugação para separação do soro e congelamento. Esse material ficou armazenado em freezer a -20°C , sendo posteriormente enviado para laboratório de análises clínicas (Laboratório São Paulo), para realização das dosagens séricas de hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH) e testosterona total.

Dosagem do Hormônio Folículo Estimulante (FSH)

A concentração de FSH no soro foi determinada utilizando o método de imunoensaio imunométrico, que usa a tecnologia de quimioluminescência. O valor de referência para homens adultos varia entre 1,27 a 19,26 mUI/mL.

Dosagem do Hormônio Luteinizante (LH)

A concentração de LH no soro foi determinada utilizando o método de imunoensaio imunométrico, que usa a tecnologia de quimioluminescência. O valor de referência para homens adultos varia entre 1,24 a 8,62 mUI/mL.

Dosagem da Testosterona Total (T)

Foi utilizado o método de dosagem da testosterona total sérica, calculado através de imunoensaio do tipo competitivo, que usa a tecnologia de quimioluminescência. O valor de referência para homens adultos desse método varia entre 175 a 781 ng/dL.

4.10. Análises estatísticas

Todos os parâmetros avaliados foram testados quanto à normalidade antes da análise, usando o programa de estatística GraphPad Prism 5.0 (Graph-Pad Software Inc., La Jolla, California, USA). Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA), ou pelo teste de Kruskal–Wallis quando não paramétricos. As diferenças entre os grupos foram testadas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (dados paramétricos) ou pelo teste de Dunn (dados não paramétricos). Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Morfologia testicular

A estrutura morfológica do epitélio seminífero de homens idosos com câncer de próstata do grupo que não sofreu nenhum tipo de tratamento (ST) e do grupo prostatectomizado e que não sofreu nenhum outro tipo de tratamento (PR) foi semelhante àquela descrita na literatura para o homem normal idoso.

A altura do epitélio seminífero foi bastante variável entre diferentes túbulos de um mesmo paciente. Foram observados desde túbulos seminíferos com epitélio íntegro até aqueles com altura reduzida devido à ausência de diferentes gerações de células germinativas, demonstrando aspecto de descamação epitelial (**Figura 1A**). Esta descamação está associada à perda de espermátócitos em paquíteno e principalmente de espermátides arredondadas e alongadas, mesmo nos estádios onde eram esperadas. Nestes túbulos era evidente um desarranjo das células germinativas associado a um aumento dos espaços extracelulares. Apesar do desarranjo epitelial, quanto ao aspecto morfológico as células germinativas apresentavam morfologia aparentemente normal em todas as fases do processo espermatogênico: espermatogonial, espermátocitária e espermiogênica (**Figura 1B,C**).

Em relação às células de Sertoli, se apresentavam com morfologia aparentemente normal. Estas foram identificadas pela forma irregular do núcleo, com nucléolo proeminente e inclusões na região basal do citoplasma, onde foram observados vacúolos citoplasmáticos em pequena ou moderada quantidade. Em alguns túbulos seminíferos a membrana basal apresentava-se mais espessada e emitindo invaginações em direção ao epitélio seminífero. A túnica própria apresentou-se, entre os indivíduos, com número variável de células mióides, demonstrando assim diferentes espessuras. No interstício foram observados células de Leydig, vasos sanguíneos, mastócitos, leucócitos e células e fibras do tecido conjuntivo (**Figura 1D**).

No grupo de pacientes com câncer de próstata e submetidos à hormonioterapia (grupo TH) foi observado que o epitélio seminífero é bastante heterogêneo em altura e organização (**Figura 2A**) e a espermatogênese se desenvolve alcançando apenas a fase de espermátócito (**Figura 2D**). Desta forma, o epitélio seminífero destes pacientes é baixo e apresenta, com frequência, túbulos seminíferos fibróticos (**Figura 2B**). A túnica própria e a membrana basal encontram-se mais espessadas e apresentam membrana basal com maior número de invaginações em direção ao epitélio, quando comparado aos indivíduos dos outros grupos (ST,

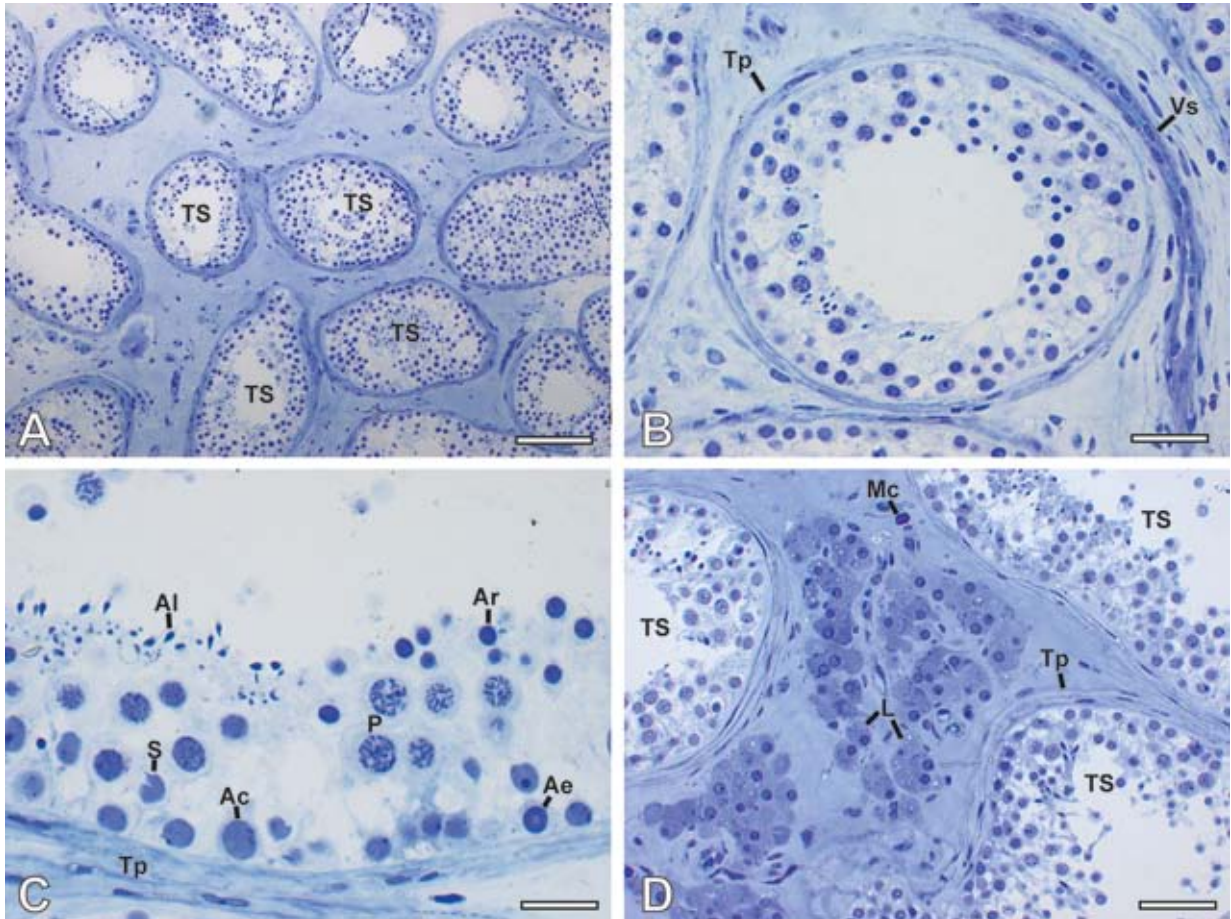


Figura 1. Fotomicrografias de túbulos seminíferos de testículos de homens idosos com câncer de próstata que não sofreram qualquer tipo de tratamento (ST) ou que foram prostatectomizados (PR) antes da orquiectomia bilateral. Em A, observe o arranjo regular dos túbulos seminíferos (TS), mostrando epitélio seminífero com altura variável. Em B, observa-se corte transversal de túbulo seminífero com aparência normal e em C, detalhe do epitélio seminífero mostrando espermatogônias *A*_{escuras} (Ae), *A*_{claras} (Ac), espermatócito primário em paquíteno (P), espermatídes arredondadas (Ar) e espermatídes alongadas (Al), além de células de Sertoli (S) e túnica própria (Tp). Em D, note detalhe do interstício com agrupamento de células de Leydig (L) e mastócito (Mc). Vs, vaso sanguíneo. Barras: A, 145 μ m; B, 45 μ m; C, 22 μ m; D, 58 μ m.

PR e TR). As células de Sertoli apresentam citoplasma com maior quantidade de vacúolos citoplasmáticos (**Figura 2C**). Nestes pacientes, o interstício é reduzido, provavelmente devido ao aumento da formação de focos fibróticos. As células de Leydig foram encontradas com menor frequência enquanto os mastócitos encontravam-se frequentemente associados à túnica própria, próximos às células mióides dos túbulos seminíferos que, por sua vez, apresentavam membrana basal espessada, com aspecto fibrótico.

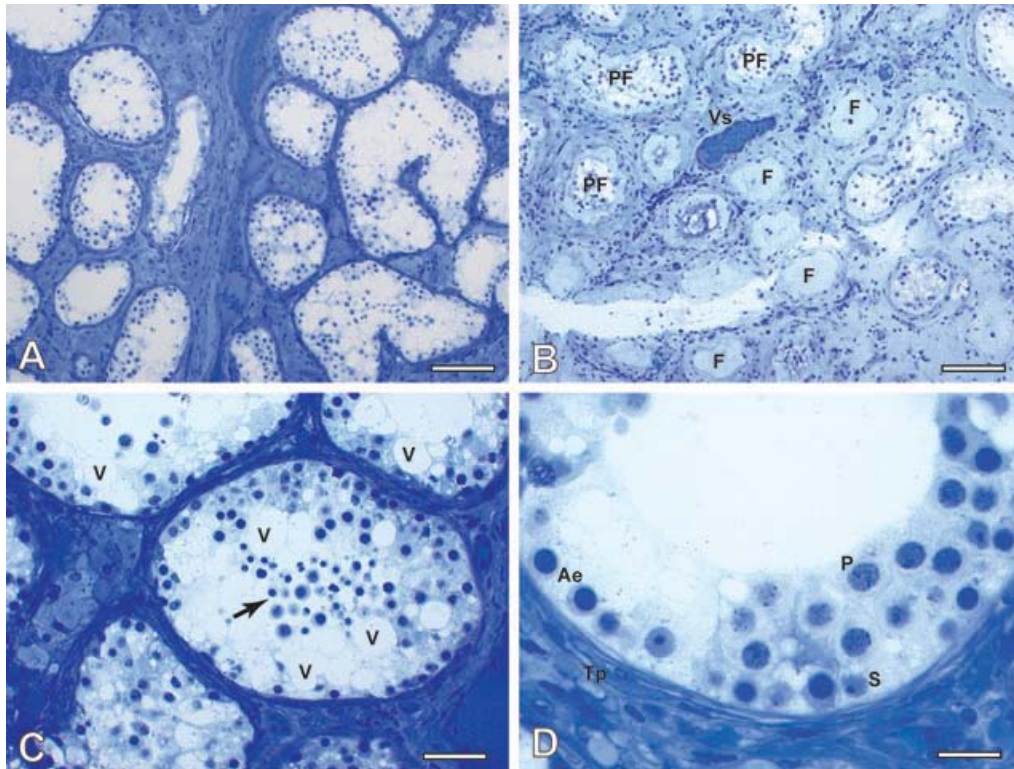


Figura 2. Fotomicrografias de túbulos seminíferos de testículos de homens idosos com câncer de próstata que sofreram tratamentos hormonais (grupo TH). Em A, observe túbulos seminíferos com epitélio apresentando diferentes alturas e desorganizado. Em B, observam-se alguns túbulos seminíferos fibrosados (F) enquanto outros com poucas células germinativas e em processo de fibrose (PF), além de apresentar túnica própria espessa. Em C, corte transversal de túbulo seminífero com epitélio bastante vacuolado (V), poucas células germinativas e muitas células desprendidas no lúmen (seta). Em D, observar detalhe do epitélio seminífero com espermatogônias *A_{escuras}* (Ae) mas que avançam apenas até espermatócitos em paquíteno (P). S, célula de Sertoli; Tp, túnica própria; Vs, vaso sanguíneo. Barras: A-B, 145 μ m; C, 58 μ m; D, 22 μ m.

Nos pacientes com câncer de próstata e tratados com radioterapia (grupo TR) observou-se predomínio de túbulos seminíferos apenas com células de Sertoli (*Sertoli-only*) (**Figura 3A**) e, além destes, foram frequentes os túbulos fibrosados. Neste pacientes também foram encontrados túbulos seminíferos com espermatogênese, desde espermatogônias até as espermatídes arredondadas (**Figura 3B**), mas estes foram raros e encontrados na forma de ilhas dispersas no parênquima testicular. Assim como nos pacientes tratados com hormonioterapia, a túnica própria encontrava-se mais espessa e apresentava maior quantidade de invaginações em direção ao epitélio, quando comparado com os pacientes dos grupos ST e PR. No interstício foram encontrados agrupamentos de células de Leydig e o mastócitos foram frequentes e associados à túnica própria. Foram frequentes túbulos seminíferos em processo de fibrose.

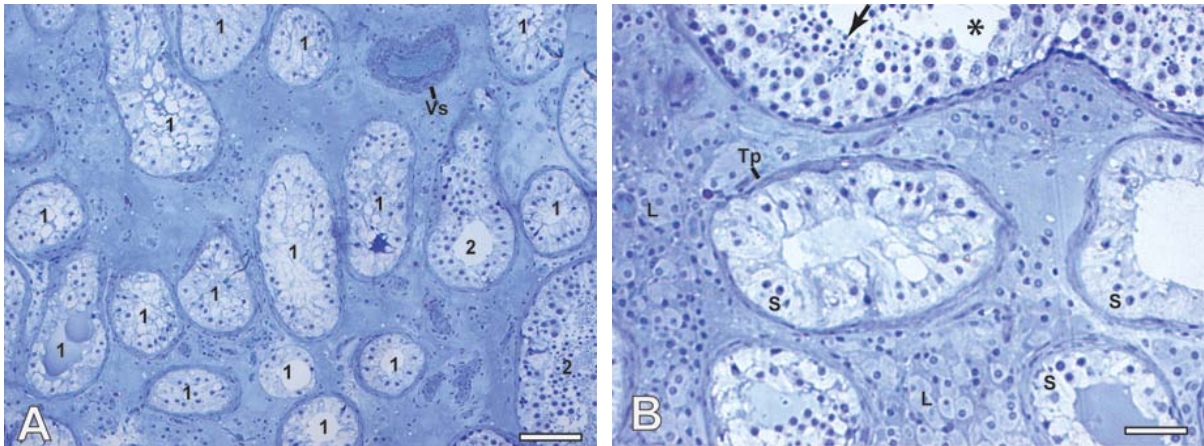


Figura 3. Fotomicrografias de túbulos seminíferos de testículos de homens idosos com câncer de próstata que sofreram tratamento radioterápico (grupo TR). Em A, observe que a maioria dos túbulos seminíferos não possui células germinativas no epitélio (1), contendo apenas células de Sertoli enquanto alguns possuem células germinativas (2). Em B, observe corte transversal de túbulo seminífero com apenas células de Sertoli (S) e túbulo seminífero (asterisco) com células germinativas, alcançando até a fase de espermatídes (seta). L, célula de Leydig (L) e Tp, Túnica prória; Vs, vaso sanguíneo. Barras: A, 120 μm ; B, 60 μm .

5.2. Avaliação morfométrica e de diferentes componentes testiculares

5.2.1. Diâmetro tubular

Os diâmetros dos túbulos seminíferos de homens idosos com câncer de próstata que foram submetidos a tratamento hormonal (TH) e radioterápico (TR), foram significativamente menores quando comparados com aqueles que não sofreram nenhum tipo de tratamento (ST), sugerindo efeito deletério destes tratamentos nos componentes tubulares (**Figura 4 e Tabela 1**). Dentre eles, o mais deletério, e que provocou a maior redução do diâmetro tubular, foi o tratamento hormonal.

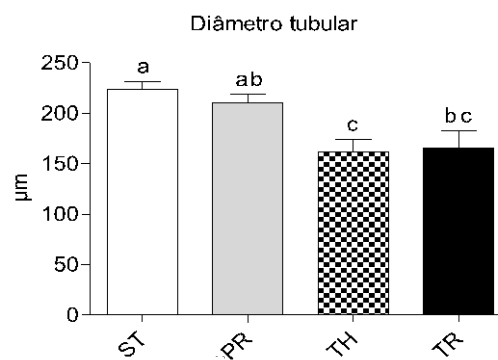


Figura 4 – Diâmetros dos túbulos seminíferos (μm) de homens idosos após diferentes tratamentos para o câncer de próstata. ST, sem tratamento; PR, sem tratamento e prostatectomizados; TH, tratamento hormonal; TR, tratamento radioterápico.

Tabela 1 – Diâmetros tubulares (μm) e proporções volumétricas (Vv%) de componentes tubulares e intertubulares do testículo de homens idosos após diferentes tratamentos para o câncer de próstata. ST, sem tratamento; PR, sem tratamento e prostatectomizados; TH, tratamento hormonal; TR, tratamento radioterápico.

	ST (n=7)	PR (n=4)	TH (n=5)	TR (n=6)
Diâmetro Tubular (μm)	223 \pm 7 ^a	210 \pm 8 ^{ab}	165 \pm 16 ^c	162 \pm 12 ^{bc}
Total Túbulos seminíferos (%)	60.4 \pm 3.0 ^a	58.9 \pm 0.5 ^a	49.9 \pm 3.0 ^a	44.4 \pm 2.9 ^a
Total Intertúbulo (%)	39.6 \pm 3.0 ^a	41.1 \pm 0.5 ^a	50.1 \pm 3.0 ^a	55.6 \pm 2.9 ^a
Túbulos seminíferos (%)				
Epitélio seminífero	49 \pm 4 ^a	58 \pm 1 ^a	35 \pm 8 ^a	40 \pm 7 ^a
Fibrose tubular	3.63 \pm 2.79 ^a	0.89 \pm 0.51 ^a	26.84 \pm 15.93 ^a	19.29 \pm 12.33 ^a
Túnica própria	16.5 \pm 1.17 ^a	13.9 \pm 0.4 ^a	24.4 \pm 7.6 ^a	25.4 \pm 3.9 ^a
Lúmen	27 \pm 4 ^a	25 \pm 1 ^a	14 \pm 5 ^a	15 \pm 3 ^a
Células no lúmen	3.67 \pm 1.12 ^a	1.48 \pm 0.16 ^a	0.27 \pm 0.11 ^{ab}	0.06 \pm 0.04 ^b
Intertúbulo (%)				
Vaso sanguíneo	3.59 \pm 0.67 ^{ab}	0.97 \pm 0.29 ^a	3.61 \pm 0.67 ^b	1.44 \pm 0.42 ^{ab}
Célula de Leydig	0.42 \pm 0.18 ^a	0.08 \pm 0.03 ^{ab}	0.07 \pm 0.05 ^{ab}	0.02 \pm 0.01 ^b
Mastócito	0.07 \pm 0.03 ^a	0.01 \pm 0.01 ^a	0.07 \pm 0.01 ^a	0.08 \pm 0.03 ^a
Células de tecido conjuntivo	1.39 \pm 0.37 ^a	0.46 \pm 0.04 ^{ab}	0.56 \pm 0.08 ^{ab}	0.29 \pm 0.07 ^b
Interstício	84.9 \pm 8.0 ^{ab}	98.5 \pm 0.3 ^a	72.9 \pm 14.8 ^b	85.8 \pm 10.7 ^{ab}
Fibrose Intertubular	4.6 \pm 3.7 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	12.8 \pm 8.3 ^a	6.9 \pm 5.8 ^a
Fibrose testicular (%)				
Túbulos seminíferos celularizados	68 \pm 3 ^a	67 \pm 2 ^a	42 \pm 10 ^a	44 \pm 9 ^a
Túbulos seminíferos com fibrose	2.57 \pm 1.78 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	12.09 \pm 7.98 ^a	9.16 \pm 7.32 ^a
Interstício	27 \pm 2 ^a	24 \pm 8 ^a	30 \pm 7 ^a	31 \pm 10 ^a
Interstício com fibrose	2.66 \pm 2.08 ^a	8.74 \pm 8.74 ^a	15.10 \pm 7.68 ^a	16.53 \pm 9.28 ^a

n, número de pacientes por grupo

5.2.2. Porcentagem de túbulos seminíferos e intertúbulo

Após a análise quantitativa da proporção volumétrica (Vv%) de diversos dos componentes tubulares (epitélio seminífero, túnica própria, lúmen, presença de células livres no lúmen e fibrose tubular) e intertubulares (vasos sanguíneos, células de Leydig, mastócitos, células do tecido conjuntivo, interstício e fibrose intertubular) constatou-se que a maioria deles não

sofreu alteração significativa após os tratamentos. No entanto, apesar de não terem apresentado significância estatística, mostraram variações numéricas expressivas entre pacientes de diferentes grupos e com desvio padrão muito elevado. Estes achados refletem a grande heterogeneidade morfológica entre os testículos dos pacientes, principalmente daqueles dos grupos TH e TR.

Em relação aos componentes tubulares apenas a quantidade de células germinativas livres no lúmen tubular de pacientes tratados com radiação foi expressivamente reduzida ($P < 0,05$) em relação ao encontrado naqueles pacientes dos grupos ST e PR (**Tab. 1 e Fig. 5**), que provavelmente estaria associado ao reduzido número de células germinativas nestes pacientes. Apesar de não significativo ($P > 0,05$), e como dito anteriormente possivelmente devido à grande variabilidade entre os pacientes de um mesmo grupo experimental, a proporção de epitélio seminífero e de lúmen foi reduzida enquanto a proporção de fibrose tubular e de túnica própria foi aumentada nos pacientes dos grupos TH e TR.

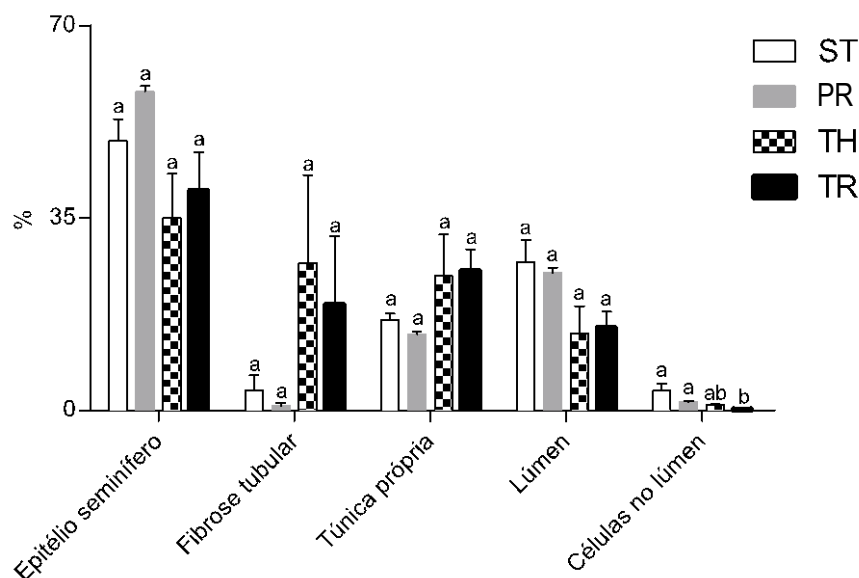


Figura 5 – Proporções volumétricas (Vv%) de componentes tubulares de homens idosos após diferentes tratamentos para o câncer de próstata. ST, sem tratamento; PR, sem tratamento e prostatectomizados; TH, tratamento hormonal; TR, tratamento radioterápico.

Em relação aos parâmetros intertubulares (**Figura 6**) foram analisados vaso sanguíneo, célula de Leydig, mastócito, células de tecido conjuntivo, interstício e fibrose intertubular. Nota-se que os mastócitos e a fibrose intertubular não apresentaram significância estatística, apesar da fibrose intertubular mostrar valores bastante elevados nos grupos TH e TR, em relação aos pacientes dos grupos ST e PR. Pode-se observar que a proporção de vasos sanguíneos e interstício apresentam diferença estatística somente entre os grupos PR e TH.

Apesar da proporção de célula de Leydig se apresentar reduzida nos pacientes dos grupos PR, TH e TR, em relação àqueles que não sofreram nenhuma intervenção cirurgica ou tratamento, apenas aqueles pacientes submetidos à irradiação apresentaram efeito deletério expressivo ($P < 0,05$) na proporção de células de Leydig (**Tab. 1 e Figura 6**).

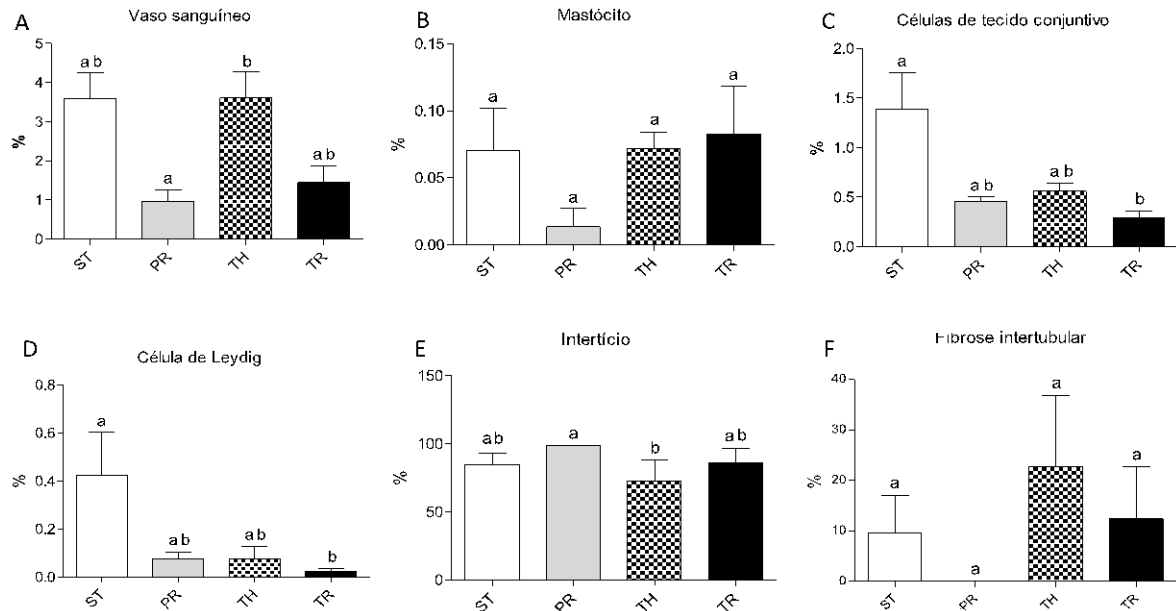


Figura 6 – Proporções volumétricas (Vv%) de componentes intertubulares do testículo de homens idosos após diferentes tratamentos para o câncer de próstata. A, vaso sanguíneo; B, mastócito; C, células de tecido conjuntivo; D, célula de Leydig; E, interstício; F, fibrose intertubular. ST, sem tratamento; PR, sem tratamento e prostatectomizados; TH, tratamento hormonal; TR, tratamento radioterápico.

5.2.3. Proporção volumétrica de túbulos seminíferos com células germinativas e fibrose testicular

As proporções de túbulos seminíferos celularizados e interstício normal foram determinados em relação aos túbulos seminíferos fibrótico e de fibrose intersticial, sendo separados da seguinte forma: (1) túbulos seminíferos celularizados em relação àqueles (2) fibróticos e (3) interstício normal em relação ao (4) interstício com fibrose (**Tab. 1 e Figura 7**). Apesar de não apresentar significância ($P > 0,05$), a proporção de túbulos seminíferos e interstício com fibrose foi maior naqueles pacientes que sofreram tratamentos hormonais e radioterápicos quando comparado com aqueles que não sofreram tratamentos, sem (ST) ou com (PR) prostatectomia.

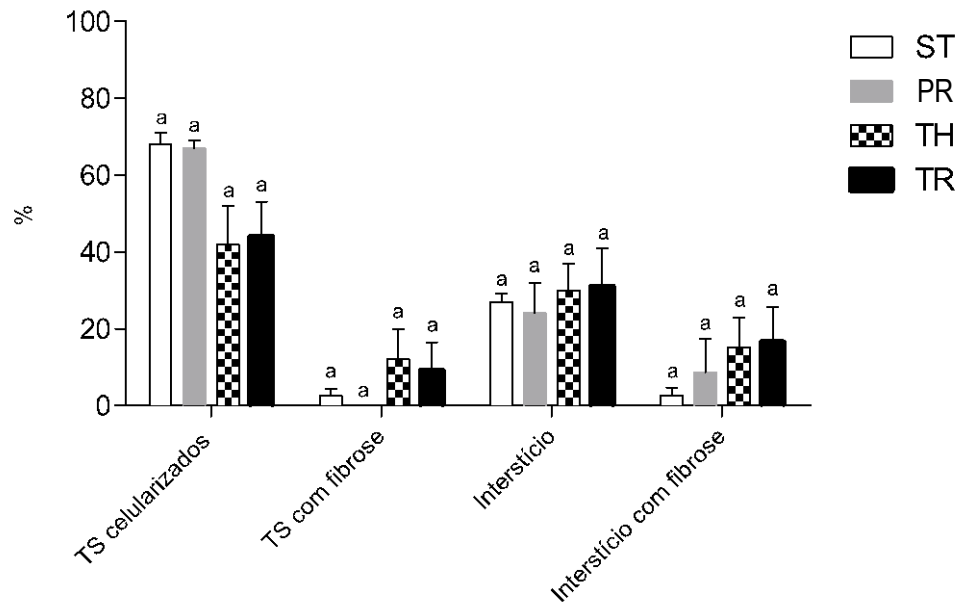


Figura 7 – Proporções volumétricas (Vv%) de túbulos seminíferos e interstício com e sem fibrose no testículo de homens idosos após diferentes tratamentos para o câncer de próstata. ST, sem tratamento; PR, sem tratamento e prostatectomizados; TH, tratamento hormonal; TR, tratamento radioterápico. TS, túbulo seminífero.

5.2.4. Proporção de túbulos seminíferos em relação às células germinativas mais avançadas

A presença de um maior número de túbulos seminíferos com células mais avançadas em espermatídes alongadas nos pacientes dos grupos ST e PR indica que estes paciente idosos com câncer avançado de próstata são, na sua grande maioria, férteis (**Tabela 2 e Figura 8**). Considerando a idade, foram também observados túbulos com células mais avançadas em espermatogônias, espermatócitos e espermatídes arredondadas e em alongamento, mas em pequeno número, caracterizando hipoespermatoogênese.

Nos pacientes submetidos a tratamentos hormonais o número de túbulos seminíferos com espermatogônias como células mais avançada foi bem elevado e o número continuou mais alto, quando comparado aos outros grupos também para espermatócitos e espermatídes arredondadas (**Tabela 2 e Figura 8**). O número de túbulos com espermatídes alongadas foi muito reduzido ($P < 0,05$), mostrando um aspecto morfológico que sugere azoospermia. Túbulos seminíferos fibróticos foram também frequentes nestes pacientes.

Nos pacientes irradiados, ~85% dos túbulos seminíferos não possuíam células germinativas e se caracterizam morfológicamente apenas com a presença de células de Sertoli ($P < 0,05$). Em um pequeno número de túbulos foram observadas células germinativas, que alcançavam até a fase de espermatídes. No restante (14%) os túbulos seminíferos eram fibrosados (**Tabela 2 e Figura 8**).

Tabela 2 – Proporção de túbulos seminíferos em relação às células mais avançadas, considerando a evolução da espermatogênese, de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos para o câncer de próstata. ST, sem tratamento; PR, sem tratamento e prostatectomizados; TH, tratamento hormonal; TR, tratamento radioterápico

	Espermatogonia	Espermatócito	Arredondada	Em alongamento	Alongada	Apenas Sertoli	Fibrose
ST	2.86 ± 0.89 ^{ab}	14.29 ± 7.14 ^a	11.14 ± 3.96 ^a	2.29 ± 0.63 ^a	58.00 ± 9.79 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^a	11.43 ± 6.47 ^a
PR	2.00 ± 1.22 ^{ab}	3.00 ± 1.50 ^a	12.00 ± 3.24 ^a	1.00 ± 0.87 ^a	80.00 ± 5.24 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	2.00 ± 1.73 ^a
TH	40.00 ± 16.56 ^a	14.40 ± 7.58 ^a	10.80 ± 7.62 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.80 ± 0.72 ^{bc}	2.00 ± 0.57 ^a	22.00 ± 14.90 ^a
TR	0.00 ± 0.00 ^b	0.33 ± 0.30 ^a	0.67 ± 0.38 ^a	0.83 ± 0.60 ^a	1.50 ± 0.37 ^c	80.50 ± 11.71 ^b	7.83 ± 2.73 ^a

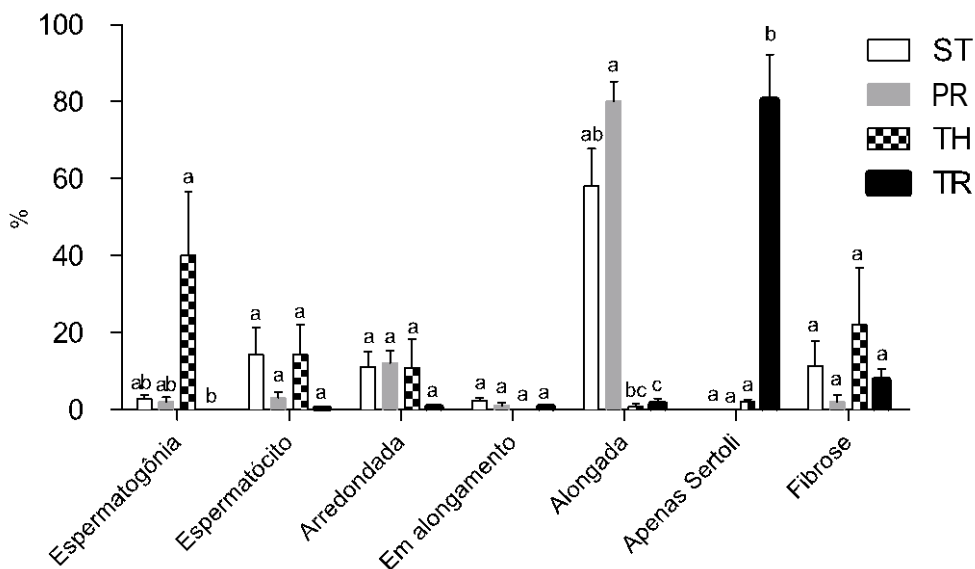


Figura 8 – Proporções de túbulos seminíferos em relação às células mais avançadas, considerando a evolução da espermatogênese, de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos para o câncer de próstata. ST, sem tratamento; PR, sem tratamento e prostatectomizados; TH, tratamento hormonal; TR, tratamento radioterápico.

5.4. Proliferação espermatogonial

Após análise imunohistoquímica da expressão do marcador MCM7 de proliferação celular, observou-se que a radiação visando o tratamento para o câncer de próstata avançado (TR) reduziu expressivamente ($P < 0,05$) o número de espermatogonias MCM7(+), quando comparado com os pacientes dos outros grupos (ST, PR e TH) (Tab. 3 e Figura 9).

Tabela 3 – Proliferação celular espermatogonial de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata. ST, sem tratamento; PR,sem tratamento tratados com prostatectomia; TH,tratamento hormonal exclusivo; TR,tratamento radioterápico exclusivo.

	ST	PR	TH	TR
Espermatogônias MCM7(+)/mm	3.03 ± 0.51 ^a	3.63 ± 0.32 ^a	2.25 ± 0.94 ^a	0.17 ± 0.14 ^b
Índice de proliferação	0.46 ± 0.03 ^a	0.50 ± 0.02 ^a	0.38 ± 0.07 ^{ab}	0.13 ± 0.09 ^b
Mitose / mm	0.42 ± 0.09 ^a	0.62 ± 0.24 ^a	0.12 ± 0.07 ^a	0 ± 0.03 ^a
Apoptose / mm	0.11 ± 0.04 ^a	0.17 ± 0.06 ^a	0.12 ± 0.05 ^a	0 ± 0.03 ^a

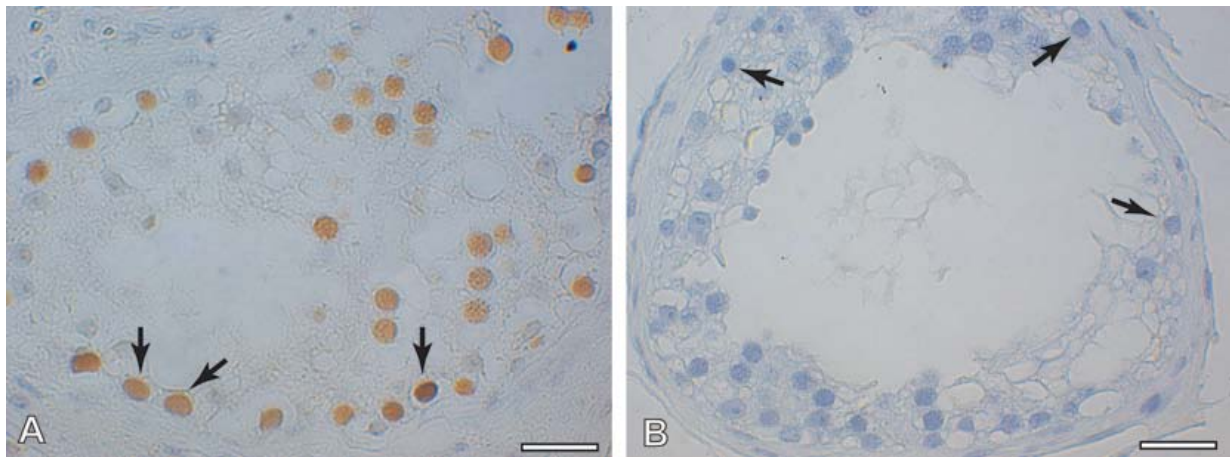


Figura 9. Imunohistoquímica com marcador de proliferação celular (MCM7) no testículo de homens idosos que não foram submetidos a tratamentos, antes da orquiectomia mostrando, em A espermatogônias MCM7(+) (setas) e em B lâminas controle mostrando espermatogônias não coradas (setas). Barras: A-B, 28 μm.

O índice de proliferação, que mostra o quanto as espermatogônias estão em divisão celular em relação ao total de espermatogônias (MCM7(+) + (MCM7(-))), demonstrou que praticamente 50% das espermatogônias-tronco estão em divisão celular nos grupos ST e PR. O grupo que sofreu tratamento hormonal (TH), apesar de não apresentar significância estatística ($P > 0,05$), mostrou diminuição no índice de proliferação em relação aos grupos ST e PR, demonstrando que os tratamentos hormonais afetam o número de divisões e a proporção de células que divide em relação ao estoque existente. Já no grupo TR, este índice de proliferação, como dito acima, confirma o impacto deletério da irradiação sobre a proliferação espermatogonial já que das espermatogônias presentes, que eram em número reduzido ($P < 0,05$), apenas ~13% estavam em divisão celular (**Tabela 3**).

Mitoses espermatogoniais foram encontradas nos grupos ST, PR e TH, no entanto foram raras nos pacientes do grupo TR. Os grupos que sofreram tratamento para o câncer de próstata (TH e TR) apresentam uma tendência à diminuição de mitoses espermatogoniais em relação

aos grupos que não sofreram tratamento para o câncer (ST) ou que foram prostatectomizados (PR), porém não foram encontradas diferenças significativas. As apoptoses espermatogoniais, apesar de também não apresentarem diferenças significativas entre os grupos, apresentaram número mais elevado nos pacientes dos grupos ST, PR e TH em relação àqueles do grupo TR. Esta redução provavelmente está relacionado ao aumento no número de túbulos seminíferos com fibrose nos pacientes do grupo TR (**Tabela 3**).

5.5. Perfil Hormonal

Os resultados das dosagens séricas dos hormônios folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH) e testosterona (T), nos grupos de pacientes idosos tratados para câncer avançado de próstata, estão representados na **Tabela 4** e na **Figura 10**. Demonstrou-se que o FSH estava dentro dos padrões de normalidade nos grupos que não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento (ST) e naqueles que foram prostatectomizados (PR). No entanto, nos pacientes que se submeteram ao tratamento radioterápico a dosagem de FSH estava significativamente elevada ($P < 0,05$) equanto naqueles que foram submetidos a tratamento hormonal, apesar da concentração elevada, não diferiram dos outros grupos avaliados ($P > 0,05$). As dosagens séricas de LH apresentaram pouca variação entre os quatro grupos avaliados e sem significância estatística. Quanto à testosterona apesar das concentrações variáveis entre os diferentes grupos avaliados, não foram detectadas diferenças estatísticas, possivelmente devido ao elevado desvio padrão que reflete a alta variabilidade entre os pacientes de um mesmo grupo.

Tabela 4 – Dosagens hormonais séricas de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos para o câncer de próstata. ST, sem tratamento; PR, sem tratamento e prostatectomizados; TH, tratamento hormonal; TR, tratamento radioterápico; FSH, hormônio folículo estimulante; LH, hormônio luteinizante; T, testosterona.

Grupos	FSH	LH	T
ST	8.6 ± 2.9 ^a	5.7 ± 1.2 ^a	257 ± 51 ^a
PR	7.7 ± 2.2 ^a	6.9 ± 0.8 ^a	352 ± 118 ^a
TH	17.7 ± 6.2 ^{a,b}	7.9 ± 1.0 ^a	213 ± 83 ^a
TR	39.4 ± 4.3 ^b	14.9 ± 4.1 ^a	411 ± 39 ^a

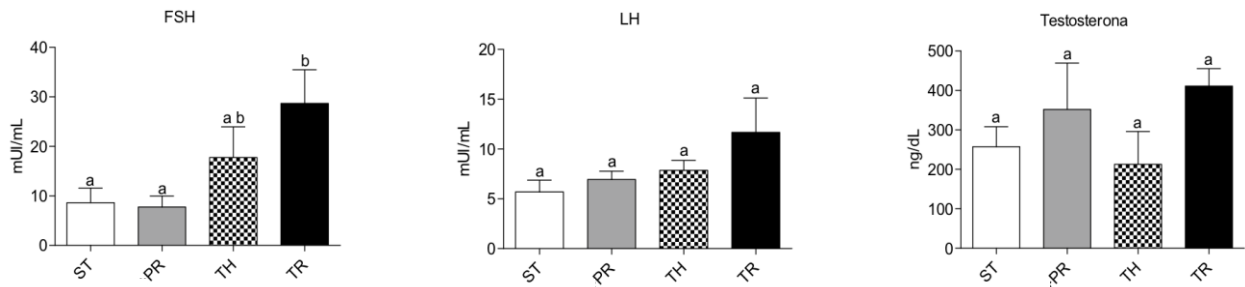


Figura 10 – Dosagens hormonais séricas de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos para o câncer de próstata. ST, sem tratamento; PR, sem tratamento e prostatectomizados; TH, tratamento hormonal; TR, tratamento radioterápico; FSH, hormônio folículo estimulante; LH, hormônio luteinizante; T, testosterona.

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram, em conjunto, que a hormonioterapia e radioterapia tem efeitos deletérios significativos na espermatogênese de homens idosos submetidos a esses tratamentos para o câncer de próstata avançado. As análises morfológicas e morfométricas demonstraram que os pacientes que não sofreram nenhum tipo de tratamento para o câncer de próstata, apresentaram espermatogênese preservada compatíveis com a faixa etária. Os pacientes tratados com hormonioterapia tiveram a espermatogênese bloqueada. Já os pacientes que sofreram tratamento radioterápico foram aqueles que mais apresentaram danos no parênquima testicular e, conseqüentemente, tiveram a espermatogênese mais lesada. Este trabalho, em continuação a estudo realizado anteriormente por nosso grupo (Martello, 2013), visou analisar com mais detalhes parâmetros morfofuncionais da espermatogênese, com foco na depleção de componentes testiculares após tratamento para câncer de próstata que, de forma indireta, afetaram o processo espermatogênico. Dentre eles a proliferação espermatogonial e alterações nas concentrações séricas de hormônios relacionados à manutenção da espermatogênese.

Os aspectos morfológicos do testículo de homens com idade mais avançada foram apresentados em outros estudos realizados até o momento, que mostraram os efeitos deletérios na espermatogênese em relação a efeitos experimentais e patológicos sobre o testículo (Nistal et al., 1988; Tenover, 2003). No presente estudo, os pacientes idosos que não sofreram nenhum tipo de tratamento para o câncer avançado de próstata, apresentaram epitélio seminífero com células germinativas e células de Sertoli com organização e histologia aparentemente normal, de acordo com a idade, semelhante com estudos prévios de outros

pesquisadores (Johnson, 1986). A altura do epitélio seminífero desses indivíduos apresentou-se de forma variável entre diferentes túbulos de um mesmo paciente, com epitélio íntegro até aqueles demonstrando aspecto de descamação epitelial, com presença de vacúolos. Todas as células geminativas apresentaram morfologia aparentemente normal enquanto nas células de Sertoli foram observados vacúolos citoplasmáticos em quantidades variáveis. A túnica própria demonstrou diferentes espessuras (Jiang et al., 2013; Martello, 2013; Paniagua et al., 1987a).

Os pacientes que sofreram tratamentos hormonais e radioterápicos apresentaram danos relevantes em relação à espermatogênese. Nos indivíduos com câncer de próstata e submetidos à hormonioterapia foi observado, no presente estudo, parada de maturação até a fase de espermatócito, portanto apresentaram epitélio seminífero baixo. A túnica própria e a membrana basal encontravam-se mais espessas e apresentavam membrana basal com grande número de invaginações em direção ao epitélio. Foram frequentes túbulos seminíferos com fibrose. Os pacientes com câncer de próstata e tratados com radioterapia apresentaram a maioria dos túbulos seminíferos com apenas células de Sertoli (*Sertoli-only*). Os túbulos fibrosados também foram observados com frequência. Estes dados corroboram com os obtidos por Martello (2013) e Shetty e Meistrich (2005) demonstrando que esses pacientes foram aqueles que mais sofreram danos significativos no parênquima testicular.

A involução tubular, que acontece nos processos patológicos (Santamaria et al., 1992) e no envelhecimento (Paniagua et al., 1987b), o diâmetro tubular diminui enquanto a túnica própria passa por um processo progressivo de espessamento que termina na completa esclerose tubular (Söderström, 1986). Além disso, modificações da túnica própria dos túbulos seminíferos que ocorrem com o envelhecimento também estão associados com a depleção das células germinativas e a esclerose tubular (Paniagua et al., 1987a; Johnson, 1986). Nos pacientes com túbulos em processo de fibrose fica evidente o espessamento da membrana basal, ou seja, há depósito anormal de substâncias como elastina (Gotoh et al., 1987), colágeno tipo IV e laminina (Santamaria et al., 1990). Essas substâncias são componentes da membrana basal de mamíferos. Esse espessamento diminui a capacidade da troca de substâncias essenciais para o bom funcionamento dos túbulos seminíferos (revisão em Mayerhofer, 2013). Gulkesen et al. (2002) demonstraram que as células peritubulares de testículos normais não sintetizam laminina mas que sob efeitos deletérios estas células passam a sintetizá-la. Já nos túbulos seminíferos com fibrose podemos afirmar que há depósito de matriz extracelular, o que caracteriza o espessamento fibroso da túnica própria dos túbulos seminíferos e a própria

fibrose (Haider et al., 1999). Nota-se, principalmente, nos pacientes que sofreram hormonioterapia, mas também naqueles que sofreram radioterapia e até mesmo nos pacientes que não sofreram nenhum tipo de tratamento, porém em proporções menores, que há associação entre mastócitos e os túbulos seminíferos com membrana basal espessada. Estudos prévios demonstraram que interações entre células do sistema imune e células peritubulares podem resultar em mudança fenotípica das células peritubulares (hialinização) e consequente fibrose da parede tubular (Duchesne et al., 2011; Levi-Schaffer e Piliponsky, 2003). Estudos para caracterizar alterações da túnica própria e membrana basal dos túbulos seminíferos de pacientes idosos com câncer de próstata e que sofreram tratamentos estão em desenvolvimento.

Os dados morfométricos obtidos no presente trabalho demonstraram que os tratamentos hormonal e radioterápico para o câncer avançado de próstata são bastante lesivos para a espermatogênese no homem. Estes achados confirmam estudos realizados em camundongos e humanos (Meistrich, 2013; Albuquerque et al., 2013; Meistrich e Samuels, 1985; Meistrich e Brown, 1983), em que demonstraram a redução da fertilidade com os tratamentos hormonais e radioterápicos e, quanto maior a dose aplicada, mais as células germinativas são danificadas e menores as chances de recuperação da fertilidade após os tratamentos.

Diversos dos parâmetros testiculares avaliados demonstraram diferenças numéricas nitidamente evidentes em relação aos quatro grupos avaliados. No entanto, quando os valores foram comparados por análises estatísticas estas diferenças, na maioria das vezes, não alcançaram significância estatística ($P > 0,05$). Ao confrontar os achados morfométricos com a morfologia testicular, observou-se variabilidade numérica muito grande entre parâmetros testiculares dos pacientes de um mesmo grupo, principalmente daqueles que foram submetidos aos tratamentos hormonais e radioterápicos. Desta forma, o desvio padrão se torna muito elevado, o que explica o fato de alguns parâmetros, apesar de numericamente bem diferentes, não alcançarem níveis de significância. Ainda associamos a este alto desvio padrão um número pequeno de pacientes por grupo, considerando a grande variabilidade histopatológica, principalmente associada aos pacientes que sofreram tratamentos com hormônio e irradiação.

O grupo tratado com hormonioterapia foi o que teve maior redução do diâmetro tubular. Esses pacientes também apresentaram redução expressiva do epitélio seminífero e aumento da fibrose tubular. Estes dados estão de acordo com o estudo de Huhtaniemi et al. (1988) e

Martello (2013), que mostraram que pacientes idosos tratados com GnRH-agonista apresentavam grave atrofia dos túbulos seminíferos, com presença de túbulos com apenas células de Sertoli e parada de maturação das células germinativas em espermátides arredondadas. Uma das possibilidades da atrofia tubular pode estar relacionada com o aumento da fibrose nesses pacientes. Houve aumento na espessura da túnica própria não só nos pacientes que sofreram tratamento hormonal, mas também naqueles que sofreram tratamento radioterápico, sendo mais expressiva no primeiro grupo, conforme descrito por Daniell e Tam (1998). De acordo com o que foi exposto anteriormente, sugere-se que o aumento da espessura da túnica dificulta ou até mesmo impede a troca de substâncias e nutrientes essenciais para o processo espermatogênico (Weinbauer et al., 2009), o que resultaria em atrofia testicular. Diversos componentes tubulares, tais como: epitélio seminífero, túnica própria, lúmen, presença de células livres no lúmen e fibrose tubular; e intertubulares: vasos sanguíneos, células de Leydig, mastócitos, células do tecido conjuntivo, interstício e fibrose intertubular, não apresentaram significância estatística após análise quantitativa da proporção volumétrica (Vv%) nos pacientes submetidos à hormonioterapia. No entanto, mostraram variações numéricas evidentes e com desvio padrão muito elevado quando comparado com o achados dos pacientes dos outros grupos estudados. Desta forma, estes achados refletem a grande heterogeneidade morfológica entre os testículos dos pacientes tratados com hormônios.

Os pacientes que sofreram tratamento radioterápico para o câncer avançado de próstata apresentaram graves efeitos sobre o processo espermatogênico, como já descrito por Daniell e Tam (1998). Nos pacientes deste estudo tratados com radiação, apenas a quantidade de células germinativas livres no lúmen tubular foi expressivamente reduzida, o que poderia ser explicado tanto pelo número reduzido de células germinativas (apesar deste grupo apresentar pequenas ilhas de túbulos com espermatogênese) como pelo predomínio de túbulos com ausência de células germinativas e presença apenas de células de Sertoli. Apesar dessas ilhas, o número muito reduzido de espermatogônias indica que as chances de recuperação da espermatogênese após o tratamento radioterápico são quase nulas. De acordo com estudos prévios (Meistrich e van Beek, 1990), a recuperação e os danos na espermatogênese estão relacionadas com a dose da radiação, sendo doses fracionadas mais prejudiciais causando azoospermia, do que uma única dose maior. A proporção de epitélio seminífero e de lúmen também apresentou redução enquanto a proporção de fibrose tubular e de túnica própria

apresentou aumento. Como discutido anteriormente, apesar de não significativo, também existe grande variabilidade histomorfométrica entre os testículos dos pacientes irradiados.

A redução da proliferação espermatogonial, detectada através da identificação da expressão da proteína MCM7, demonstra o quanto os efeitos indiretos dos tratamentos com hormônio e irradiação para o câncer de próstata são deletérios para a espermatogênese. Os pacientes que não sofreram nenhum tipo de tratamento possuem alta taxa de proliferação e mitose espermatogoniais, aproximadamente 50%, e baixa taxa de apoptose, mostrando que o processo espermatogênico encontra-se normal em relação à faixa etária estudada. Já nos pacientes que sofreram tratamentos hormonal e radioterápico, o índice de proliferação espermatogonial apresentou redução, assim como o número de mitoses. Estudos prévios demonstraram que a proteína MCM7 é expressa nos testículos durante o período de atividade de proliferação celular (Com et al., 2006).

Albuquerque et al. (2013) demonstraram em testículo de ratos que espermatogônias MCM7+ encontravam-se agrupadas e após tratamento radioterápico encontravam-se espalhadas, provavelmente na tentativa de “repovoar” o testículo danificado. Já em humanos, os pacientes do presente estudo demonstraram que a irradiação aplicada reduziu substancialmente o número de espermatogônias e foram raras aquelas que estavam em proliferação. Este achado sugere que seria reduzida a capacidade de recuperação da espermatogênese após o tratamento radioterápico. Meistrich (2013) demonstrou que tratamentos para o câncer com quimioterapia ou radioterapia provocam redução na contagem de espermatozoides (azoospermia) que pode persistir por muitos anos ou ser permanente. A radioterapia é um dos agentes terapêuticos citotóxicos mais potentes em causar azoospermia.

No presente estudo, os pacientes tratados com hormonioterapia o número de espermatogônias também diminuiu, porém menos drasticamente em comparação com os pacientes tratados com radioterapia, pois aproximadamente 40% das espermatogônias presentes estavam em proliferação. Crawford et al., (2011) demonstrou que após o tratamento hormonal a produção de testosterona não é completamente bloqueada e poucos pacientes falham ao alcançar o nível de castração. Steinberger (1971) realizou estudos em ratos e camundongos adultos demonstraram redução nos níveis de testosterona no tratamento hormonal com estrogênios e efeitos deletérios para espermatogênese. Segundo Shetty e Meistrich (2005) a espermatogênese e fertilidade podem ser recuperadas em ratos quando a irradiação é seguida de tratamento hormonal ao suprimir a testosterona. Os pacientes do

presente estudo não foram submetidos a estes dois tratamentos de forma concomitante, mas quando a hormonioterapia foi indicada, a proliferação espermatogonial não foi expressivamente afetada o que indica a possibilidade de sua recuperação.

Em relação aos resultados do perfil hormonal, o FSH foi o único que apresentou diferença estatística entre os hormônios analisados: FSH, LH e testosterona. Os pacientes tratados com hormonioterapia e radioterapia apresentaram valores de FSH maiores. Porém, no grupo que sofreu tratamento radioterápico, os valores de FSH foram consideravelmente altos, aproximadamente 10 vezes mais elevado (40 ng/dL), quando comparado com a normalidade (média de 4,76 ng/dL). O eixo hipotálamo-hipófise-testículo controla a espermatogênese. A produção de inibina pelas células de Sertoli e de testosterona pelas células de Leydig são responsáveis pela regulação negativa (*feedback* negativo) que resulta na redução da produção de GnRH pelo hipotálamo e consequente redução na produção de FSH e LH pela hipófise. E assim é matido a homeostase de FSH, LH, testosterona e inibina (Alves et al., 2012). O presente trabalho indica que o aumento significativo de FSH provavelmente aconteceu devido a falta de *feedback* negativo do controle FSH/inibina. Isto é, a irradiação provocaria alterações funcionais nas células de Sertoli que deixariam de produzir de forma adequada a inibina que, por sua vez, não mais inibiriam a produção de FSH pela adenohipófise. Dessa forma, o FSH, sem a regulação negativa, teria sua concentração sérica aumentada. No trabalho realizado por Martello (2013), apesar do FSH também exibir valores altos, o número de pacientes foi pequeno ($n=3$) e com um desvio padrão alto não foi possível demonstrar significância estatística. No presente trabalho, como houve aumento do número de pacientes ($n=6$), os valores de FSH foram estatisticamente significantes ($P<0,05$). Para determinar as possíveis alterações funcionais das células de Sertoli, estudos mais pormenorizados fazem-se necessários.

O LH apresentou valores médios normais entre todos os grupos. Nenhum paciente do grupo tratado com hormonioterapia foi tratado com análogo de LHRH. Também não houve diferença significativa entre os quatro grupos na dosagem de testosterona. Os grupos dos pacientes tratados com hormonioterapia e sem tratamento e prostatectomizados apresentaram valores um pouco abaixo da normalidade (350-1200 ng/dL). A revisão de Daniell (2001) demonstrou que ao comparar o perfil hormonal de pacientes tratados com radioterapia e sem tratamento e prostatectomizados (PR), o nível de FSH foi 100% maior nos pacientes tratados com radioterapia, o de LH foi 52,5% maior e de testosterona 27,3 menor, dados que estão de acordo com este trabalho. Huhtaniemi et al. (1987) analisou pacientes tratados com

hormonioterapia (GnRH-agonista) e sem tratamento, ambos com câncer de próstata avançado, e encontrou, após até 3 semanas, valores de FSH e LH do grupo tratado com hormonioterapia aproximadamente 80% menor. A testosterona, após um aumento inicial de cinco dias, diminuiu para níveis de castração

A preservação do parênquima testicular tem se tornado um importante alvo de estudos para a manutenção da fertilidade em pacientes com câncer. Entender os efeitos que ocorrem com as terapias prescritas pode ajudar a minimizar os danos provocados. O presente trabalho demonstrou que tanto a hormonioterapia quanto a radioterapia para o câncer de próstata avançado causam, de forma indireta, prejuízos ao processo espermatogênico. Porém a radioterapia ainda causa danos maiores e com menor prognóstico de recuperação da espermatogênese uma vez que apresenta reduções drásticas no número de espermatogônias e na proliferação espermatogonial, maior redução na proporção dos parâmetros testiculares e aumento de fibrose. Já aqueles pacientes tratados com hormônios provavelmente têm um melhor prognóstico uma vez que as espermatogônias estão em maior número e em proliferação, sugerindo que eventualmente podem recuperar a espermatogênese depois de cessado o tratamento. Estes achados são importantes para direcionar a conduta médica no caso de pacientes em idade reprodutiva que se submetem a tratamentos para o câncer de próstata, ou mesmo de outros tipos de cânceres pélvicos, visando manter a fertilidade dos mesmos.

7. CONCLUSÕES

A hormonioterapia e a radioterapia para o tratamento do câncer de próstata causam prejuízos ao processo espermatogênico;

A prostatectomia prévia à orquiectomia aparentemente não causa efeito deletério na espermatogênese;

A radioterapia afeta diretamente a proliferação espermatogonial, tendo um prognóstico negativo na recuperação da espermatogênese após o tratamento;

A hormonioterapia bloqueia a espermiogênese reduzindo expressivamente a formação de espermatozoides, mas tem um bom prognóstico para a recuperação da espermatogênese após o tratamento uma vez que não bloqueia por completo a proliferação espermatogonial;

A concentração sérica de FSH aumenta significativamente nos pacientes tratados com radioterapia, possivelmente por afetar negativamente a atividade das células de Sertoli, alterando a produção de inibina e prejudicando o funcionamento do mecanismo de *feedback* FSH/inibina.

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Albuquerque AV, Almeida FR, Weng CC, Shetty G, Meistrich ML, Chiarini-Garcia H. Spermatogonial behavior in rats during radiation-induced arrest and recovery after hormone suppression. *Reproduction*. 2013 Aug 21;146(4):363-76.

Alves MG, Rato L, Carvalho RA, Moreira PI, Socorro S, Oliveira PF. Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2013 Mar;70(5):777-93.

Amory JK, Bremner W. Endocrine regulation of testicular function in men: implications for contraceptive development. *Mol Cell Endocrinol*. 2001 Sep;182(2):175-9. Review.

Anahara R, Toyama Y, Mori C. Review of the histological effects of the anti-androgen, flutamide, on mouse testis. *Reprod Toxicol*. 2008 Feb;25(2):139-43.

Ash P. The influence of radiation on fertility in man. *Br J Radiol* 1980;53(628):271–8).

Auger J, Jouannet P: Age and male fertility: biological factors. *Rev Epidemiol Sante Publique* 53 Spec No 2:2S25-35, 2005.

Borgers M, Wolter M, Hentrich A, Bergmann M, Stammler A, Konrad L. Role of compensatory meiosis mechanisms in human spermatogenesis. *Reproduction* 2014.

Budgell GJ, Cowan RA, Hounsell AR. Prediction of scattered dose to the testes in abdominopelvic radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2001;13(2) :120–5).

Carrizo F. Hormonoterapia del cáncer de próstata. *Farmacología clínica. Rev Med Uruguay* 2001; 17: 10-16.

Centola GM, Keller JW, Henzler M, Rubin P. Effect of low-dose testicular irradiation on sperm count and fertility in patients with testicular seminoma. *J Androl*. 1994 Nov-Dec;15(6):608-13.

Chiarini-Garcia H1, Parreira GG, Almeida FR. Glycol methacrylate embedding for improved morphological, morphometrical, and immunohistochemical investigations under light microscopy: testes as a model. *Methods Mol Biol*. 2011;689:3-18.

Chen ZH, Yu YP, Michalopoulos G, Nelson J, Luo JH. The DNA replication licensing factor miniature chromosome maintenance 7 is essential for RNA splicing of epidermal growth factor receptor, c-Met, and platelet-derived growth factor receptor. *J Biol Chem*. 2015 Jan 16;290(3):1404-11.

Chodak GW, Keane T, Klotz L and The Hormone Therapy Study Group. Critical evaluation of hormonal therapy for carcinoma of the prostate. *Urology*. 2002;60:201–208

Cisneros EM, Valtier MC, Alvarez G, Barrios SA. Cancer avanzado de prostata: analisis de la supervivencia. *Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina* - n° 145 – mayo 2005 pág. 13-18

Clermont, Y. The cycle of seminiferous epithelium in man. *Am. J. Anat.*, 112, 35–51, 1963

Clermont, Y. Renewal of spermatogenesis in man. *Am. J. Anat.*, 118, 509–524, 1966

Colpi GM, Contalbi GF, Nerva F, Sagone P, Piediferro G. Testicular function following chemo-radiotherapy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004 Apr 5;113 Suppl 1:S2-6. Review.

Com E, Rolland AD, Guerrois M, Aubry F, Jégou B, Vallet-Erdtmann V, Pineau C. Identification, molecular cloning, and cellular distribution of the rat homolog of minichromosome maintenance protein 7 (MCM7) in the rat testis. *Mol Reprod Dev.* 2006 Jul;73(7):866-77.

Crawford ED, Eisenberger MA, McLeod DG, et al. A controlled trial of leuprolide with and without flutamide in prostatic carcinoma. *N Engl J Med.* 1989;321:419-424

Crawford ED, Tombal B, Miller K, Boccon-Gibod L, Schroder F, Shore N, et al. A phase III extension trial with a 1-arm crossover from leuprolide to degarelix: comparison of gonadotropin-releasing hormone agonist and antagonist effect on prostate cancer. *J Urol* 2011; 186:889-97.

da Cunha MF, Meistrich ML, Fuller LM, Cundiff JH, Hagemester FB, Velasquez WS, McLaughlin P, Riggs SA, Cabanillas FF, Salvador PG. Recovery of spermatogenesis after treatment for Hodgkin's disease: limiting dose of MOPP chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1984 Jun;2(6):571-7.

Dakouane M, Albert M, Bergère M, Sabbagh C, Brayot F, Vialard F, Lombroso R, Bicchieray L, Selva J. Aging and spermatogenesis: an histologic, cytogenetic and apoptosis study. *Gynecol Obstet Fertil.* 2005 Sep;33(9):659-64. French.

Daniell HW, Tam EW. Testicular atrophy in therapeutic orchiectomy specimens from men with prostate carcinoma: association with prior prostate bed radiation and older age. *Cancer.* 1998 Sep 15;83(6):1174-9.

Daniell HW. Osteoporosis due to androgen deprivation therapy in men with prostate cancer. *Urology.* 2001 Aug;58(2 Suppl 1):101-7. Review.

Drumond AL, Meistrich ML, Chiarini-Garcia H. Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: a high-resolution light microscopy approach. *Reproduction.* 2011 Jul;142(1):145-55.

Duchesne G. Localised prostate cancer - current treatment options. *Aust Fam Physician.* 2011 Oct;40(10):768-71.

Dym, M. Basement membrane regulation of Sertoli cells. *Endoc. Rev.*, 15:102-115, 1994.

Eblen A, Bao S, Lei ZM, Nakajima ST, Rao CV. The presence of functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human sperm. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jun;86(6):2643-8.

Engel JB, Schally AV. Drug insight: clinical use of agonists and antagonists of luteinizing-hormone-releasing hormone. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007;3:157-67.

Eskenazi B, Wyrobek AJ, Slotter E, Kidd SA, Moore L, Young S, Moore D (2003) The association of age and semen quality in healthy men. *Hum Reprod* 18:447-454.

Fonseca M, Araújo GT, Saad ED. Cost-effectiveness of anastrozole, in comparison with tamoxifen, in the adjuvant treatment of early breast cancer in Brazil. *Rev Assoc Med Bras.* 2009 Jul-Aug;55(4):410-5.

França. L.R., Russell, L.D. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia, F. and Regadera, J., (eds). *Male reproduction - a multidisciplinary overview.* Madrid: Churchill Communications, cap 16, p.197-219, 1998.

França LR, Chiarini-Garcia H. Célula de Sertoli. In: *Células. Uma abordagem multidisciplinar.* Carvalho HF, Collares-Buzato CB (eds), Barueri, SP: Manole, Cap. 24, p. 302-324, 2005.

González C, Boada M, Devesa M, Veiga A. Concise review: fertility preservation: an update. *Stem Cells Transl Med.* 2012 Sep;1(9):668-72. doi: 10.5966/sctm.2012-0076.

Gotoh M, Miyake K, Mitsuya H. Elastic fibers in tunica propria of undescended and contralateral scrotal testes from cryptorchid patients. *Urology.* 1987 Oct;30(4):359-63.

Gronberg H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet* 2003; 361:859- 64.

Gudziak MR, Smith AY. Hormonal therapy for stage D cancer of the prostate. *West J Med.* 1994 Apr;160(4):351-9.

Gülkesen KH, Erdoğru T, Sargin CF, Karpuzoğlu G. Expression of extracellular matrix proteins and vimentin in testes of azoospermic man: an immunohistochemical and morphometric study. *Asian J Androl.* 2002 Mar;4(1):55-60.

Haider SG, Talati J, Servos G. Ultrastructure of peritubular tissue in association with tubular hyalinization in human testis. *Tissue Cell.* 1999 Feb;31(1):90-8.

Hales DB. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J Reprod Immunol.* 2002 Oct Nov;57(1-2):3-18.

Heller CH, Clermont Y. Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent Prog Horm Res.* 1964;20:545-75.

Hermann M, Berger P. Aging of the male endocrine system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1999; 139:89-122.

Holstein AF, Eckermann C. Multinucleated spermatocytes and spermatids in human seminiferous tubules. *Andrologia* 1986; 18:5-16.

Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:107.

Howell S, Shalet S. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1998 Dec;27(4):927-43.

Howell SJ, Shalet SM. Testicular function following chemotherapy. *Hum Reprod Update.* 2001 Jul-Aug;7(4):363-9.

Howell SJ, Shalet SM. Effect of cancer therapy on pituitary-testicular axis. *Int J Androl.* 2002 Oct;25(5):269-76.

aHuhtaniemi I, Nikula H, Rannikko S. Pituitary-testicular function of prostatic cancer patients during treatment with a gonadotropin-releasing hormone agonist analog. I. Circulating hormone levels. *J Androl.* 1987 Nov-Dec;8(6):355-62.

bHuhtaniemi I, Nikula H, Parvinen M, Rannikko S. Pituitary-testicular function of prostatic cancer patients during treatment with a gonadotropin-releasing hormone agonist analog. II. Endocrinology and histology of the testis. *J Androl.* 1987 Nov-Dec;8(6):363-73.

Huhtaniemi I, Nikula H, Parvinen M, Rannikko S. Histological and functional changes of the testis tissue during GnRH agonist treatment of prostatic cancer. *Am J Clin Oncol.* 1988;11 Suppl 1:S11-5.

Huguet J, Maroto P, Palou J, et al. Cáncer de Próstata Hormonoresistente. Cambios en las Estrategias Terapéuticas Desde la Demostración de la Utilidad de la Quimioterapia. *Actas Urol Esp* 2006;30(2):123-133.

Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil: Introdução. Rio de Janeiro: INCA, 2010.

Ishimi, Y. A DNA helicase activity is associated with an MCM4,-6, and -7 protein complex. *J. Biol. Chem.* 1997 Sep; 272, 24508–24513

Jacobo E, Schmidt JD, Weinstein SH, et al. Comparison of Flutamide (SCH-13521) and Diethylstilbestrol in Untreated Advanced Prostatic Cancer. *Urology* 1976; 8(3):231-233.

Johnson L, Perry CS, Neaves WB. Age-related variation in seminiferous tubules in men. A stereologic evaluation. *J Androl* 1986; 7:316-22.

Johnson L. Spermatogenesis and aging in the human. *J Androl* 1986; 7:331-54.

Johnson L: Evaluation of the human testis and its age-related dysfunction. *Prog Clin Biol Res* 302:35-60; discussion 61-37, 1989.

Johnson EM, Kinoshita Y, Daniel DC: A new member of the MCM protein family encoded by the human MCM8 gene, located contrapodal to GCD10 at chromosome band 20p12.3-13. *Nucleic Acids Res* 2003, 31(11):2915–2925.

Jiang X, Skibba M, Zhang C, Tan Y, Xin Y, Qu Y. The roles of fibroblast growth factors in the testicular development and tumor. *J Diabetes Res.* 2013;2013:489095.

Kaler LW, Neaves WB. Attrition of the human Leydig cell population with advancing age. *Anat Rec.* 1978 Dec;192(4):513-8.

Kan, T., Sato, F., Ito, T., Matsumura, N., David, S., Cheng, Y., Agarwal, R., Paun, B. C., Jin, Z., Olaru, A. V., Selaru, F. M., Hamilton, J. P., Yang, J., Abraham, J. M., Mori, Y., and Meltzer, S. J. (2009) The miR-106b-25 polycistron, activated by genomic amplification, functions as an oncogene by suppressing p21 and Bim. *Gastroenterology* 136, 1689–1700).

Kearsey SE, Maiorano D, Holmes EC, Todorov IT: The role of MCM proteins in the cell cycle control of genome duplication. *Bioessays* 1996, 18(3):183–190.

Kimura M, Itoh N, Takagi S, Sasao T, Takahashi A, Masumori N, Tsukamoto T. Balance of apoptosis and proliferation of germ cells related to spermatogenesis in aged men. *J Androl.* 2003 Mar-Apr;24(2):185-91.

Leblond CP, Clermont Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci* 1952:548–73.

Levi-Schaffer F, Piliponsky AM. Tryptase, a novel link between allergic inflammation and fibrosis. *Trends Immunol.* 2003 Apr;24(4):158-61.

Luo, J. H. (2011) Oncogenic activity of MCM7 transforming cluster. *World J. Clin. Oncol.* 2, 120–124.

Lund F, Rasmussen F. Flutamide Versus Stilboestrol in the Management of Advanced Prostatic Cancer. A Controlled Prospective Study. *Br J Urol* 1988;61(2):140-142.

Martello R. Efeitos da radioterapia e hormonioterapia na espermatogênese de pacientes com câncer de próstata, 2013. Tese de doutorado. Departamento de Cirurgia: Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia. Faculdade de Medicina da UFMG. 96p.

Matsumoto AM, Bremner WJ. Endocrinology of the hypothalamic-pituitary-testicular axis with particular reference to the hormonal control of spermatogenesis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1987; 1:71-87.

Mayerhofer A. Human testicular peritubular cells: more than meets the eye. *Reproduction*. 2013 Apr 29;145(5):R107-16. doi: 10.1530/REP-12-0497. Print 2013 May. Review.

Mayor G, Zingg EJ. Ureteroureteral anastomosis: In *Urologic Surgery Diagnosis, Techniques and Postoperative Treatment*. Stuttgart: Georg Thieme Publishers; 1976. p 284-289

McLachlan RI. The endocrine control of spermatogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2000 Sep;14(3):345-62. Review.

McLachlan Rt I. et al. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Progress in Hormone Research*, 2002: 57 (1):,149-179.

Meistrich ML, Brown CC. Estimation of the increased risk of human infertility from alterations in semen characteristics. *Fertil Steril*. 1983 Aug;40(2):220-30.

Meistrich ML, Samuels RC. Reduction in sperm levels after testicular irradiation of the mouse: a comparison with man. *Radiat Res*. 1985 Apr;102(1):138-47.

Meistrich ML. Critical components of testicular function and sensitivity to disruption. *Biol Reprod*. 1986 Feb;34(1):17-28.

Meistrich ML, Chawla SP, Da Cunha MF, Johnson SL, Plager C, Papadopoulos NE, Lipshultz LI, Benjamin RS. Recovery of sperm production after chemotherapy for osteosarcoma. *Cancer*. 1989 Jun 1;63(11):2115-23.

Meistrich ML, van Beek Meab. Radiation sensitivity of the human testis. *Adv Radiat Biol* 1990;14:227-68.

Meistrich ML. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis. *Eur Urol* 1993;23(1):136-41.

Meistrich ML. Male gonadal toxicity. *Pediatr Blood Cancer*. 2009 Aug;53(2):261-6.

Meistrich ML. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. *Fertil Steril*. 2013 Nov;100(5):1180-6.

Meriggiola MC, Bremner WJ, Costantino A, Di Cintio G, Flamigni C. Low dose of cyproterone acetate and testosterone enanthate for contraception in men. *Hum Reprod*. 1998 May;13(5):1225-9.

Morley JE, Perry HM 3rd. Androgen deficiency in aging men. *Med Clin North Am* 1999; 83:1279-89.

Neaves WB, Johnson L, Porter JC, Parker CR Jr, Petty CS. Leydig cell numbers, daily sperm production, and serum gonadotropin levels in aging men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1984 Oct;59(4):756-63.

Neaves WB, Johnson L, Petty CS. Age-related change in numbers of other interstitial cells in testes of adult men: evidence bearing on the fate of Leydig cells lost with increasing age. *Biol Reprod*. 1985

Aug;33(1):259-69.

Nistal M, Codesal J, Paniagua R. Multinucleate spermatids in aging human testes. *Arch Androl* 1986; 16:125-9.

Nistal M, Codesal J, Paniagua R, Santamaria L. Decrease in the number of human Ap and Ad spermatogonia and in the Ap/ Ad ratio with advancing age. New data on the spermatogonial stem cell. *J Androl*. 1987 Mar-Apr;8(2):64-8.

Pacek M, Walter JC. A requirement for MCM7 and Cdc45 in chromosome unwinding during eukaryotic DNA replication. *EMBO J*. 2004 Sep 15;23(18):3667-76. Epub 2004 Aug 26.

aPaniagua R, Nistal M, Rodriguez MC, Martin A. Seminiferous tubule involution in elderly men. *Biol Reprod* 1987; 36:939-47.

bPaniagua R, Nistal M, Amat P. Testicular involution in elderly men: comparison of histologic quantitative studies with hormone patterns. *Fertil Steril* 1987; 47:671-9.

Paniagua, R., Nistal, M., Saez, F. J. & Fraile, B. Ultrastructure of the aging human testis. *J. Electron Microsc. Tech.* 19, 241–260 (1991).

Paul C, Robaire B. Ageing of the male germ line. *Nat Rev Urol*. 2013 Apr;10(4):227-34. Review.

Paulsen CA. The Testes. In: *Textbook of endocrinology*, 12th ed; ed RH Williams. Philadelphia: Saunders CO., 1973; 1981:333.

Payne, A. H., Hardy, M. P., Russel, I. D., 1996, *The Leydig cell*. Vienna, Cache River Press, 802p.

Puscheck E, Philipp PA and Jeyendran RS (2004) Male fertility preservation and cancer treatment. *Cancer Treat Rev* 30,173–180.

Rannikki AS1, Zhang FP, Huhtaniemi IT. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in the rat testis and ovary. *Mol Cell Endocrinol*. 1995 Feb;107(2):199-208.

Ren, B., Yu, G., Tseng, G. C., Cieply, K., Gavel, T., Nelson, J., Michalopoulos, G., Yu, Y. P., and Luo, J. H. (2006) MCM7 amplification and overexpression are associated with prostate cancer progression. *Oncogene* 25, 1090–1098.

Rhoden, E.L.; Averbek M. A. Câncer de próstata localizado; *Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul*. Vol. 54, n. 1, p. 92-99, 2010.

Russell, L.D., Ettlín, R.A., Sinha Hikim, A.P., Clegg, E.D. Mammalian spermatogenesis. In: Russell, L.D., Ettlín, R.A., Sinha Hikim, A.P., Clegg, E.D., (eds). *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Clearwater: Cache River Press, 1990. cap. 1, pp. 1-40.

Russell, L.D., Griswold, MD. *The Sertoli Cell*. Clearwater: Cache River Press, 1993. 801p.

Russell LD. Form, dimensions and cytology of mammalian Sertoli cells. In: Russell LD, Griswold MD, editors. *The Sertoli cell*. Clearwater, FL: Cache River Press; 1993. p. 1–38.)

Russell LD. Role in spermiation. In: Russell LD, Griswold MD, editors. *The Sertoli cell*. Clearwater, FL: Cache River Press; 1993. p. 269–302.,

- Ruwanpura SM1, McLachlan RI, Meachem SJ. Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol.* 2010 May; 205(2):117-31.
- Ryu, B. Y., Orwig, K. E., Oatley, J. M., Avarbock, M. R., Brinster, R. L. Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cells* 24, 1505–1511 (2006).
- Sampson N, Utergasser G, Plas E, Berger P. The ageing male reproductive tract. *J Pathol* 2007; 211:206-18.
- Santamaria L, Martinez-Onsurbe P, Paniagua R, Nistal M. Laminin, type IV collagen, and fibronectin in normal and cryptorchid human testes. An immunohistochemical study. *Int J Androl.* 1990 Apr;13(2):135-46.
- Santamaría L, Martín R, Nistal M, Paniagua R. The peritubular myoid cells in the testes from men with varicocele: an ultrastructural, immunohistochemical and quantitative study. *Histopathology.* 1992 Nov;21(5):423-33.
- Schlatt S, Meinhardt A, Nieschlag E. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *Eur J Endocrinol.* 1997 Aug;137(2):107-17.
- Schlatt S, Ehmcke J. Regulation of spermatogenesis: an evolutionary biologist's perspective. *Semin Cell Dev Biol.* 2014 May;29:2-16.
- Schulze C. Sertolli cells and Leydig cells in man. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1984; 88:1-104.
- Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill JD, eds. *The Physiology of Reproduction.* 2nd ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 1994:1363-1436.
- Shamash J. A Multi-Centre Randomised Phase III Trial of Dexamethasone vs Dexamethasone and Diethylstilbestrol in Castration-Resistant Prostate Cancer: Immediate vs Deferred Diethylstilbestrol. *Br J Cancer* 2011;104(4):620-628.
- Shetty G, Meistrich ML. Hormonal approaches to preservation and restoration of male fertility after cancer treatment. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2005;(34):36-9. Review.
- Shi, Y.K., Yu, Y.P., Zhu, Z.H., Han, Y.C., Ren, B., Nelson, J.B., and Luo, J. H. (2008) MCM7 interacts with androgen receptor. *Am. J. Pathol.* 173, 1758–1767).
- Silber SJ, Nagy Z, Devroey P, Tournaye H, Van Steirteghem AC. Distribution of spermatogenesis in the testicles of azoospermic men: the presence or absence of spermatids in the testes of men with germinal failure. *Hum Reprod.* 1997;12:2422-2428
- Skinner, M. Cell-cell interactions in the testis. *Endoc. Rev.*, 12:45-77, 1991.
- Smith LB, Walker WH. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin Cell Dev Biol.* 2014 Jun;30:2-13.
- Söderström KO. Tubular hyalinization in human testis. *Andrologia.* 1986 Jan-Feb;18(1):97-103.
- Srougi, M. *Câncer urológico.* 2. ed. São Paulo: Platina. 1995. P. 281-359.
- Srougi M, Ribeiro LA, Piovesan AC, Colombo JR, Nesrallah A. Doenças da próstata. *Rev Med (São Paulo).* 2008 jul.-set.;87(3):166-77.

Stangelberger A, Schally AV, Djavan B. New treatment approaches for prostate cancer based on peptide analogues. *Eur Urol* 2008;53: 890–900

Steinberger E. Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiol Rev.* 1971 Jan;51(1):1-22.

Stoeber K, Tlsty TD, Happerfield L, Thomas GA, Romanov S, Bobrow L, Williams ED, Williams GH: DNA replication licensing and human cell proliferation. *J Cell Sci* 2001, 114(Pt 11):2027–2041.

Tachibana KE, Gonzalez MA, Coleman N: Cell-cycle-dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology. *J Pathol* 2005, 205(2):123–129.

Takizawa T, Hatakeyama S. Age-associated changes in microvasculature of human adult testis. *Acta Pathol Jpn* 1978; 28: 541-54.

Tegelenbosch RA, de Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res.* 1993 Dec; 290(2):193-200.

Thompson CA, Shanafelt TD, Loprinzi CL: Andropause: Symptom management for prostate cancer patients treated with hormonal ablation. *Oncologist* 8:474-487, 2003

Trafford HS. The place of Honvan (Diethylstilbestrol diphosphate) in the treatment of prostatic cancer. *Br J Urol* 1965; 37: 317

Turek PJ. Practical approaches to the diagnosis and management of male infertility. *Nat Clin Pract Urol.* 2005; 2(5):226-38.

Tye BK, Sawyer S. The hexameric eukaryotic MCM helicase: building symmetry from nonidentical parts. *J Biol Chem.* 2000 Nov 10;275(45):34833-6.

Vermeulen A, Kaufman JM. Aging of the hypothalamo-pituitary-testicular axis in man. *Horm Res* 1995.

Vornberger W, Prins G, Musto NA, Suarez-Quian CA. Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology* 1994;134:2307–16.

Wang, C., Leung, A., Sinha-Hikim, A. P. Reproductive aging in the male brown-Norway rat: a model for the human. *Endocrinology* 133, 2773–2781 (1993).

Weinbauer GF, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E. Physiology of testicular function. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S, editors. *Andrology: Male reproductive health and dysfunction*. 3rd edition Springer-Verlag Berlin Heidelberg; Springer: 2009. pp. 11–61.


Well D, Yang H, Houseni M, Iruvuri S, Alzeair S, Sansovini M, Wintering N, Alavi A, Torigian DA (2007) Age-related structural and metabolic changes in the pelvic reproductive end organs. *Semin Nucl Med* 37:173–184.

You, Z., Komamura, Y., and Ishimi, Y. (1999) Biochemical analysis of the intrinsic Mcm4-Mcm6-mcm7 DNA helicase activity. *Mol. Cell. Biol.* 19, 8003– 8015).

Zhang Z, Shao S, Meistrich ML. The radiation-induced block in spermatogonial differentiation is due to damage to the somatic environment, not the germ cells. *J Cell Physiol.* 2007 Apr;211(1):149-58.

9. ANEXOS

ANEXO I

	<p style="text-align: center;">Universidade Federal de Minas Gerais Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP</p>
-----------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Parecer nº. ETIC 117/07

Interessado(a): Prof. Hélio Chiarini-Garcia
Departamento de Morfologia
Instituto de Ciências Biológicas-UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 22 de maio de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliações morfofuncionais e moleculares da linhagem espermatogonial humana antes e após tratamento contra o câncer de próstata"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Por se tratar de pesquisa classificada em Área Temática Especial, a mesma será encaminhada à CONEP/MS para apreciação, devendo o pesquisador aguardar sua aprovação final para que se inicie a execução.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Maria Eléna de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP-UFMG



ANEXO II**Anexo II - Aprovação no DEPE – Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão
Hospital das Clínicas da UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais
Hospital das Clínicas
Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão - DEPE

UFMG

Belo Horizonte, 19 de outubro de 2007.

PROCESSO Nº 079/2007**TÍTULO: “Avaliações morfofuncionais e moleculares da linhagem espermatogonial humana antes e após tratamento contra o câncer de próstata.”**

Sr(a) Pesquisador(a):

Reportando-nos ao projeto de pesquisa acima referenciado, considerando sua concordância com o parecer da Comissão de Avaliação Econômico-financeira de Projetos de Pesquisa do HC e a aprovação pelo COEP/UFMG em 22/maio/2007, esta Diretoria aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional.
Solicitamos enviar à DEPE relatório parcial ou final, após um ano.

Atenciosamente,



PROF. HENRIQUE VITOR LEITE
Diretor da DEPE/HC-UFMG

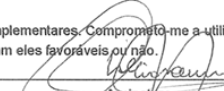
Ao Sr.
Prof. Hélio Chiarini-Garcia
Depto. Morfologia
I. C. B./UFMG

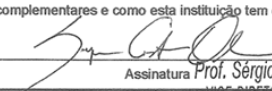
Anexo III

Planos de Saúde - Servidor



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS				FR - 127499	
Projeto de Pesquisa AVALIAÇÕES MORFOFUNCIONAIS E MOLECULARES DA LINHAGEM ESPERMATOGONIAL HUMANA ANTES E APÓS TRATAMENTOS CONTRA O CANCER DE PRÓSTATA					
Área de Conhecimento 4.00 - Ciências da Saúde - 4.01 - Medicina - Nenhum				Grupo Grupo I	Nível Não se aplica
Área(s) Temática(s) Especial(s) Reprodução Humana, Pesquisa com Cooperação Estrangeira,				Fase Não se Aplica	
Unitermos espermato gênese, célula tronco, nicho, cinética, espermato gênese, reprodução, infertilidade, testículo, homem					
Sujeitos na Pesquisa					
Nº de Sujeitos no Centro 60	Total Brasil 60	Nº de Sujeitos Total 60	Grupos Especiais		
Placebo NAO	Medicamentos HIV / AIDS NÃO	Wash-out NÃO	Sem Tratamento Específico NÃO	Banco de Materiais Biológicos NÃO	
Pesquisador Responsável					
Pesquisador Responsável Hélio Chiarini Garcia			CPF 402.915.376-34	Identidade 9.147.869 SSP-SP	
Área de Especialização BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO			Maiores Titulação PÓS-DOUTOR	Nacionalidade BRASILEIRA	
Endereço RUA BOLÍVIA, 559 APTO 102			Bairro SION	Cidade BELO HORIZONTE - MG	
Código Postal	Telefone 31.3499.2807 / 31.9186.1848	Fax 31.3499.2771	Email chiarini@jcb.ufmg.br		
Termo de Compromisso					
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não.					
Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.					
Data: 26/03/2007					
 Assinatura					

Instituição Onde Será Realizado			
Nome Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG		CNPJ 17.217.985/0046-06	Nacional/Internacional Nacional
Unidade/Órgão Instituto de Ciências Biológicas / Depto Morfologia		Participação Estrangeira SIM	Projeto Multicêntrico NÃO
Endereço Av. Presidente Antônio Carlos, 6.627		Bairro Pampulha	Cidade Belo Horizonte - MG
Código Postal 31270	Telefone (0xx31)3499- 4592	Fax	Email coep@prpq.ufmg.br
Termo de Compromisso			
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.			
Nome: _____			
Data: ____/____/____			
 Assinatura Prof. Sérgio Costa Oliveira VICE-DIRETOR DO ICB/UFMG PORTARIA Nº 1275 DE 09/05/2006			

O Projeto deverá ser entregue no CEP em até 30 dias a partir de 20/03/2007. Não ocorrendo a entrega nesse prazo esta Folha de Rosto será INVALIDADA.

Anexo IV - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Hospital das Clínicas
Laboratório de Biologia Estrutural e
Reprodução**

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS E MOLECULARES DA LINHAGEM ESPERMATOGONIAL HUMANA

ANTES E APÓS TRATAMENTOS CONTRA O CANCER DE PRÓSTATA

I. INTRODUÇÃO:

Esse termo de consentimento pode conter palavras que você não entenda. Favor solicitar ao médico ou equipe do estudo que explique quaisquer palavras ou informações que você não entenda claramente. Você está convidado a participar voluntariamente de um estudo sobre células tronco dos testículos. Antes de concordar em participar desse estudo, é importante que você leia e entenda este documento. Ele descreve as finalidades, procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e precauções do estudo. Você tem direito de se retirar do estudo a qualquer momento. Se você participar, receberá uma cópia deste documento para manter em seu arquivo.

II. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

A pesquisa visa o estudo das células tronco dos testículos. Como estas células são as responsáveis por manter o indivíduo fértil por toda a sua vida adulta, alterações e doenças relacionadas com estas células tronco podem levar o indivíduo à sub-fertilidade ou mesmo à infertilidade. Apesar dos grandes avanços na área médica, ainda sabe-se muito pouco como estas células funcionam em um indivíduo normal e, muito menos ainda, como elas são afetadas em diferentes doenças. Diante disto, pretendemos neste projeto de pesquisa, estudá-las em homens portadores de câncer avançado de próstata, nos quais a indicação médica foi a retirada dos testículos. Estes homens serão divididos em grupos levando-se em consideração àqueles que não sofreram nenhum tratamento prévio contra o câncer de próstata e aqueles que se submeteram a diferentes tratamentos. Pequenos pedaços dos testículos que seriam desprezados, serão preservados em formol e estudados em laboratórios de pesquisa. Estes estudos serão desenvolvidos principalmente no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG.

III. SIGILO DOS DADOS

Todos os seus dados serão confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a estas informações que serão utilizadas somente para fins de pesquisa. Os dados obtidos nesse estudo podem ser revisados pelo Comitê de Ética em Pesquisa e pelas autoridades reguladoras do Brasil, com fins de verificar procedimentos e/ou dados do estudo. Os resultados dessa pesquisa deverão ser publicados em revistas científicas nacionais ou internacionais.

IV. BENEFÍCIOS DA PESQUISA

Os resultados obtidos possivelmente trarão inúmeros conhecimentos importantes para o melhor entendimento da infertilidade masculina. Estes novos conhecimentos podem ser aplicados na melhor compreensão dos casos clínicos, refletindo diretamente em tratamentos mais adequados.

V. RISCOS

Pelo fato de estarmos utilizando testículos retirados para auxiliar no tratamento do câncer prostático, e que seria totalmente descartado, isso não acarreta nenhum risco adicional a esses pacientes além daquele já esperado para a cirurgia. A coleta da amostra de sangue periférico, que será utilizada para dosagens hormonais, com uma seringa acoplada a agulha para punção venosa, pode ocasionalmente causar dor, hematoma (mancha roxa abaixo da pele) e irritação (mancha avermelhada que pode coçar) no local da retirada do sangue do seu braço. A quantidade de sangue retirada não trará nenhuma alteração ao seu sistema circulatório, sendo que em 24 horas seu organismo, por si só, recompõem esta pequena quantidade de sangue coletada.

VI. RESSARCIMENTO DAS DESPESAS

Não está prevista qualquer forma de remuneração para os pacientes voluntários. As despesas específicas relacionadas com o desenvolvimento do presente estudo são de responsabilidade do Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG.

DEMAIS ESCLARECIMENTOS

Você dispõe de liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante a pesquisa. Você poderá recusar-se a participar deste estudo e/ou abandoná-lo a qualquer momento, sem precisar justificar. A aceitação ou não da participação neste estudo não influenciará no seu tratamento. Nesta pesquisa utilizaremos o testículo retirado cirurgicamente, conforme indicação médica e que seria, depois, desprezado. No momento da retirada do testículo será coletada também amostra de sangue da veia braquial de um dos braços do paciente. O consentimento em participar deste projeto não acarretará coleta de nenhum outro material adicional nem mudanças no tratamento indicado. Não serão utilizados outros tecidos e não serão realizados quaisquer outras manipulações, experimentos ou intervenções diretas com o paciente.

VII. TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____ voluntariamente, concordo que o material biológico (tecido testicular e sangue periférico) proveniente da minha cirurgia de orquiectomia, seja utilizado para fins de pesquisa científica no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução do ICB/UFMG. Estou ciente do exposto acima e ainda de que esta pesquisa não trará qualquer prejuízo à minha saúde.

Nome completo do paciente: _____ Nº Registro do paciente: _____

Assinatura do paciente ou representante legal: _____

Local e data: _____

Nome da pessoa que obteve o Consentimento Livre e Esclarecido: _____

Assinatura da Pessoa que obteve o consentimento Livre e esclarecido: _____

Local e data: _____

Se você tem quaisquer perguntas sobre esse estudo ou sobre seus direitos, favor contatar com:

TELEFONES PARA CONTATO:

Pesquisadores:

Prof. Hélio Chiarini-Garcia - Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução, UFMG – (31) 3409.2807 ou 9186.1848
 Profª Fernanda RCL Almeida - Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução, UFMG – (31) 3409.2992
 Laura Toledo Vellez – Pesquisadora, Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução, UFMG – (31) 3409.2994 ou 9362.2263
 Dr. Reginaldo Martello - Setor de Urologia do Hospital das Clínicas da UFMG – (31) 3248.9488 ou 9974-9590
 Dr. Augusto Reis - Setor de Urologia do Hospital das Clínicas da UFMG – (31) 3248.9488 ou 9164.8173

Se você tiver alguma pergunta sobre os seus direitos como participante de um estudo, favor contatar:

Endereço do Comitê de Ética:

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – UFMG
 Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
 31.270-901 – Belo Horizonte – MG
 Telefone: (31) 3409.4592

Anexo V – Relação dos pacientes utilizados na pesquisa, informações demográficas e detalhes sobre os tratamentos dos quais foram submetidos, divididos em quatro grupos ST (sem tratamento), PR (prostatectomizados), TH (tratamentos hormonais), TR (tratamento radioterápico) e TR +PR (tratamento radioterápico e prostatectomia). PR, prostatectomia; LA, câncer avançado localizado apenas na próstata; M, câncer de próstata com metástases; DES, dietilestilbestrol; cGy, centigray.

PACIENTE	IDADE	FIHOS	ESTÁDIO	TRATAMENTO	DATA PR	TR TIPO	TR DOSE	TR TEMPO (DIAS)	TH DROGA	TH DOSE	TH TEMPO (MESES)	ORQUIECTOMIA
04.1	82	5	LA	ST								5/4/2007
04.4	84	3	M	ST								25/6/2008
04.5	83	10	M	ST								4/6/2008
04.7	71	0	M	ST								7/10/2010
04.8	72	2	M	ST								14/10/2010
04.9	90	14	LA	ST								2/12/2010
04.10	59	1	LA	ST								16/7/2008
10.1	61	6	LA	PR	12/12/2005							26/5/2008
10.2	77	-	LA	PR	11/7/2006							23/10/2008
10.3	77	8	LA	PR	15/9/2009							28/10/2010
10.4	67	2	M	PR	17/12/2003							2/12/2010
12.2	72	-	M	TH					DES (estrógeno)	-	-	21/5/2007
12.3	72	7	M	TH					Ciproterona	150mg/dia	60 (2002-MAR/2007)	29/3/2007
12.4	84	4	LA	TH					DES (estrógeno)	1mg/dia	7 (JUL/2010-JAN/2011)	20/1/2011
12.5	76	10	M	TH					DES (estrógeno)	2mg/dia	4 (DEZ/2010-MAR/2011)	31/3/2011
13.5	76	4	LA	TH					Ciproterona	150mg/dia	2 (AGO/SET/2006)	28/9/2006
11.1	66	5	LA	TR		externa	7200cGy (40 x 180 cGy)	40 (MAR-MAI/2006)				29/5/2008
11.3	77	0	LA	TR		externa	7000cGy (35 x 200 cGy)	35 (AGO-SET/2002)				24/7/2008
11.4	73	-	LA	TR		externa	7200cGy (36 x 200 cGy)	36 (JUL-AGO/2005)				8/5/2007
121.2	64	5	LA	TR + PR	22/05/2007	externa	6400 cGy (32 x 200 cGy)					9/4/2015
121.4	66	2	LA	TR + PR	19/03/2013	externa	6660 cGy (37 x 180 cGy)					23/4/2015
121.5	77	2	LA	TR + PR	18/04/2011	externa	6800 cGy (34 x 200 cGy)	34 (MAI-JUL/2013)				11/6/2015