

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**

Tese de Doutorado

**Comportamento espermatogonial em ratos após irradiação e
submetidos à supressão hormonal**

Amanda Vasconcelos de Albuquerque

Belo Horizonte
2013

AMANDA VASCONCELOS DE ALBUQUERQUE

Comportamento espermatogonial em ratos após irradiação e submetidos à supressão hormonal

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Dr. Hélio Chiarini-Garcia

Colaborador: Dr. Marvin L. Meistrich

Belo Horizonte
2013

Comportamento espermatogonial em ratos após irradiação e submetidos à supressão hormonal

Tese defendida em 30 de julho de 2013

Resultado: Aprovada

Banca examinadora:

Prof. Augusto Barbosa

UFMG

Prof(a). Elizete Rizzo

UFMG

Prof. Guilherme Mattos Jardim Costa

UFMG

Prof. Hélio Chiarini Garcia

UFMG

Prof. Hugo Pereira Godinho

UFMG

Dedico essa conquista à minha família,
especialmente ao meu filho Lucca A. Pereira.
Você é, sem dúvida alguma, o melhor
resultado que eu obtive
durante o meu doutorado, obrigada!

AGRADECIMENTOS:

- Primeiramente a **Deus**, que me deu o dom da vida;
- Ao meu filho **Lucca**, pedaço de paraíso que veio à Terra para me ensinar diariamente a conviver com os meus maiores defeitos e tentar aprender com eles;
- Ao meu marido **Bruno**, com quem divido uma vida de alegrias, companheirismo e amor;
- Aos meus pais (**João e Niedja**) pelo apoio e incentivo nessa empreitada que foi o doutorado;
- Aos meus irmãos (**Marcela, Bruno e Gabriel**) pelo companheirismo de sempre;
- Ao professor **Marvin L Meistrich**, que me recebeu nos EUA com muito carinho e me enriqueceu infinitamente como pesquisadora;
- À professora **Elizabeth Neves** que me introduziu na vida científica e da qual eu não desejo nunca mais sair;
- Ao professor **Hélio Chiarini**, por mais esses 4 anos de convivência maravilhosa no LABER e por contribuir imensamente para a minha formação intelectual;
- Às professoras **Fernanda e Gleydes** pela amizade, carinho e ensinamentos durante o desenrolar desse projeto;
- A todos os meus amigos de Recife, saibam que mesmo distante eu penso em cada um de vocês;
- Às maravilhosas amigadas de Belo Horizonte por terem se tornado minha família enquanto a minha estava distante;
- Aos companheiros de laboratório (**Ana Luiza, Paty loira, Paty preta, Luciana, Rayane, Gabriela, Tatiane, Camila, Augusto, Reginaldo, Mirna, André** e tantos outros) porque mesmo quando alguns experimentos deram errado, vocês me ajudaram a superar a frustração com bom humor e carinho;
- À **Maria Luiza**, técnica do laboratório, que tanto contribuiu para a realização desse trabalho;
- Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular;
- Aos demais funcionários do Departamento de Morfologia.

Essa tese foi desenvolvida parte nos Estados Unidos, no laboratório do Dr. Marvin L. Meistrich no MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, durante o período de novembro de 2009 a novembro de 2010. Posteriormente foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (LABER) do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do Prof. Hélio Chiarini Garcia e com o auxílio das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

“O estudo em geral, a busca da verdade e da beleza são domínios em que nos é consentido ficar crianças toda a vida.”

(Albert Einstein)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema do desenho experimental.....	30
Figura 2.	Análise de intensidade de fluorescência nas células de Sertoli.....	31
Figura 3.	Diâmetro tubular dos diferentes grupos.....	31
Figura 4.	Número absoluto de células de Sertoli e espermatogônias tipo A.....	32
Figura 5.	Avanço das células germinativas.....	32
Figura 6.	Índices apoptóticos.....	32
Figura 7.	Imunohistoquímica para o MCM7 e número de células MCM7 +.....	33
Figura 8.	Imunohistoquímica e quantificação da proteína GDNF.....	34
Figura 9.	Imunohistoquímica e quantificação da proteína KITLG.....	34
Figura 10.	Imunofluorescência para KIT, contagens das KIT+ e morfologia.....	35
Figura 11.	Cinética espermatogonial da diferenciação.....	36
Figura 12.	Micrografias de luz de alta resolução das espermatogônias.....	36
Figura 13.	Eletromicrografias de células de Sertoli e de espermatogônias.....	37
Figura sup.	Comparação entre controles negativos e positivos	38

LISTA DE ABREVIATURAS

1. A_1 – espermatogônia diferenciada do tipo A_1 ;
2. A_2 – espermatogônia diferenciada do tipo A_2 ;
3. A_3 – espermatogônia diferenciada do tipo A_3 ;
4. A_4 – espermatogônia diferenciada do tipo A_4 ;
5. A_{al} – espermatogônia do tipo A alinhada;
6. A_{ind} – espermatogônia do tipo A indiferenciada;
7. A_{pr} – espermatogônia do tipo A pareada;
8. B – espermatogônia diferenciada do tipo B.
9. EDS – sulfonato dimetano-etano
10. FSH – hormônio folículo estimulante
11. GDNF – fator neurotrófico derivado de células da glia
12. $Gfr\alpha 1$ – receptor alfa da família GDNF
13. GnRH – hormônio liberador de gonadotrofina
14. HRLM – microscopia de luz de alta resolução
15. I_n – espermatogônia diferenciada do tipo intermediária
16. KIT – receptor de tirosina quinase
17. KITLG – proteína ligante tirosina quinase
18. MCM7 - *minichromosome maintenance complex component 7*
19. Ret – receptor de GDNF

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUÇÃO.....	3
3.1. Efeitos de tratamento contra o câncer sobre a espermatogênese.....	3
3.2. Processo de auto renovação e diferenciação das espermatogônias-tronco.....	4
3.3. Bloqueio da diferenciação espermatogonial.....	6
3.4. Técnicas de prevenção dos efeitos adversos do tratamento contra o câncer.....	6
3.5. Estimulação da diferenciação espermatogonial através da supressão hormonal.....	7
3.6. Mecanismo de estimulação hormonal na proteção da espermatogênese.....	8
3.7. Interações entre bloqueio da diferenciação espermatogonial e células somáticas do testículo.....	9
3.7.1. KITLG e seu receptor (KIT) e o bloqueio da diferenciação espermatogonial.....	10
3.7.2. GDNF e seus receptores Ret e GFR α -1 e bloqueio da diferenciação espermatogonial.....	10
3.8. Potencial para aplicação clínica de tratamentos hormonais.....	10
3.9. O uso de ratos LBNF1 como modelo experimental.....	12
4. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	13
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
5.1. Animais.....	15
5.2. Irradiação.....	15
5.3. Supressão hormonal.....	15
5.3.1 <i>Análogo de GnRH</i>	15
5.3.2. <i>Flutamida</i>	16
5.3.3. <i>Tratamento com sulfonato dimetano-etano (EDS)</i>	16
5.4. Desenho Experimental.....	16

5.4.1. Experimento I – Análise dos eventos morfológicos, morfométricos e moleculares.....	16
I - Avaliações morfométricas sob a microscopia de luz.....	18
(1) Diâmetro tubular.....	18
(2) Número absoluto de células de Sertoli e de espermatogônias do tipo A após a irradiação	18
(3) Índice Apoptótico nos animais irradiados e tratados.....	20
(4) Número total de células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero.....	21
II – Avaliações imunohistoquímicas.....	21
5.4.2. Experimento II – Cinética Espermatogonial e ultraestrutura.....	23
(1) Microscopia de luz de alta resolução.....	23
(2) Microscopia Eletrônica.....	23
5.5 Análises Estatísticas.....	24
6. RESULTADOS.....	25
Experimento I.....	25
<u>6.1. Resultados Morfométricos</u>	25
6.1.1. Peso corporal e testicular.....	25
6.1.2. Diâmetro tubular.....	25
6.1.3. Número absoluto de células de Sertoli e espermatogônias tipo A após a irradiação.....	25
6.1.4. Número de células de Sertoli e avanço da espermatogênese.....	26
6.1.5. Índice apoptótico.....	26
<u>6.2. Resultados Moleculares</u>	26
6.2.1. Proliferação celular utilizando o marcador MCM7.....	26
6.2.2. Expressão das proteínas GDNF e KITLG nas células de Sertoli.....	27
6.2.3. Diferenciação espermatogonial mediante expressão de KIT.....	28
Experimento II.....	28

6.3. Cinética Espermatogonial.....	28
6.4. Microscopia Eletrônica.....	29
7. FIGURAS.....	30
8. TABELAS.....	39
9. DISCUSSÃO.....	40
10. CONCLUSÃO.....	46
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1. RESUMO

Utilizando-se ratos como modelo experimental sabe-se que, após a irradiação, as espermatogônias remanescentes ficam bloqueadas, não se diferenciam e que esse bloqueio pode ser revertido mediante a supressão da testosterona. No entanto, não se sabia ao certo como ocorre a cinética espermatogonial no momento do bloqueio pós-irradiação e ao longo da supressão hormonal, a participação das células de Sertoli e de Leydig nesse processo e principalmente quais eventos moleculares estão diretamente envolvidos durante o desbloqueio. Foram utilizados ratos LBNF1 irradiados com uma dose suficiente para destruir a espermatogênese e em seguida tratados com uma mistura de análogo de GnRH (comercialmente chamado *Acyline*) + flutamida, associada ou não ao EDS (sulfonato dimetano etano), droga que elimina especificamente as células de Leydig. O presente trabalho demonstrou, utilizando diferentes técnicas de microscopia e diferentes imunoenaios, que as espermatogônias indiferenciadas e remanescentes no epitélio seminífero após a irradiação são aparentemente saudáveis e ocasionalmente podem vencer o bloqueio e se diferenciar em A₁. Esse dado foi confirmado pela presença de células KIT positivas após irradiação em animais que não receberam supressão hormonal. Os níveis de GDNF (fator neurotrófico derivado de célula glial), proteína sintetizada pela célula de Sertoli, são alterados após 4 semanas de supressão da testosterona, coincidindo com o elevado número de espermatogônias indiferenciadas que se dividiram nesse mesmo período, possivelmente para repor o estoque perdido pós-irradiação. Entretanto, outra proteína também sintetizada pela célula de Sertoli, KITLG, não apresentou qualquer alteração durante a supressão hormonal. A morte das células de Leydig, no entanto, interferiu diretamente na taxa de diferenciação das espermatogônias, pois a adição de EDS antecipou em uma semana o aparecimento das espermatogônias que foram obtidas após supressão hormonal por duas semanas e sem o EDS. Assim, nós concluímos que as células de Leydig, muito mais do que as células de Sertoli, são influenciadoras diretas sobre o desbloqueio da diferenciação espermatogonial pós-irradiação.

2. ABSTRACT

Ionizing radiation has been shown to arrest spermatogenesis despite the presence of surviving stem spermatogonia, by blocking their differentiation. This block is a result of damage to the somatic environment and is reversed when gonadotropins and testosterone are suppressed, but the mechanisms are still unknown. We examined spermatogonial differentiation and Sertoli cell factors that regulate spermatogonia after irradiation, during hormone suppression, and after hormone suppression combined with Leydig cell elimination with EDS. The results showed that the numbers and cytoplasmic structure of Sertoli cells are unaffected by irradiation; that only a few Aund spermatogonia and even fewer A1 spermatogonia remained and that immunohistochemical analysis showed that Sertoli cells still produced KITG and GDNF. Some of these cells expressed KIT-receptor, demonstrating that the failure of differentiation was not a result of the absence of the KIT system. Hormone suppression resulted in an increase in Aund spermatogonia within 3 days, a gradual increase in KIT-positive spermatogonia, and differentiation mainly to A3 spermatogonia after 2-weeks. KITLG protein expression did not change after hormone suppression indicating that it is not a factor in the stimulation. However, GDNF increased steadily after hormone suppression, which was unexpected since GDNF is supposed to promote stem spermatogonial self-renewal and not differentiation. We conclude that the primary cause of block in spermatogonial development is not due to Sertoli cell factors such (KITLG\GDNF) or the KIT receptor. Since elimination of Leydig cells in addition to hormone suppression resulted in differentiation to the A3 stage within 1 week, Leydig cell factors were not necessary for spermatogonial differentiation.

3. INTRODUÇÃO

3.1. Efeitos de tratamento contra o câncer sobre a espermatogênese

Nos últimos trinta anos os avanços no diagnóstico e tratamento contra o câncer testicular resultou em uma melhoria considerável na evolução da doença. A taxa de sobrevivência nos últimos 5 anos, variou entre 90 a 95%, fazendo com o que o câncer testicular passasse a ser considerado uma forma de câncer com grande possibilidade de cura (Sabanegh & Ragheb, 2009). Entretanto, para crianças e adultos jovens que têm câncer, o sucesso do tratamento normalmente vem associado com problemas de infertilidade, uma vez que a grande maioria dos tratamentos desencadeia toxicidade gonadal. Quando o câncer está controlado, a preocupação seguinte passa a ser com a qualidade de vida. Para muitos dos jovens que receberam a quimioterapia ou radioterapia no tratamento contra o câncer, uma questão fundamental da qualidade de vida é a capacidade de gerar uma criança através de métodos normais, sem intervenções, ou seja manterem a sua fertilidade após o tratamento.

Muitos homens são tratados contra o câncer com doses de agentes alquilantes ou radiação as quais são suficientes para induzir prolongada azoospermia (Meistrich *et al*, 2001). Outros são tratados com doses de ciclofosfamida para doenças hepáticas auto-imunes e que também se tornam azoospermicos (Masala *et al*, 1997).

De todas as células presentes nos testículos, as células germinativas parecem ser as mais sensíveis aos agentes citotóxicos. Dentre as células germinativas, as espermatogônias diferenciadas (A_1 a B), que proliferam mais ativamente, são extremamente sensíveis a esses tratamentos. As células germinativas mais avançadas (espermatócitos e principalmente espermátides) são menos susceptíveis à morte e progridem na espermatogênese, fazendo com que a contagem de espermatozoides seja mantida por um ou dois meses após o tratamento citotóxico. Posteriormente, a contagem de espermatozoides no ejaculado diminui atingindo um valor mínimo quando as espermatogônias diferenciadas remanescentes formam os últimos espermatozoides viáveis (Meistrich *et al*, 2006). No entanto, apesar das células mais avançadas serem mais resistentes à morte após o tratamento, elas são mais sensíveis a danos mutagênicos do que as espermatogônias-tronco e podem transmiti-los através de seus DNAs para a próxima geração (Meistrich, 1993).

A eventual recuperação da espermatogênese depende da sobrevivência das espermatogônias-tronco ou indiferenciadas e de sua capacidade de se diferenciar.

Após várias seções de radioterapia ou quimioterapia, as espermatogônias-tronco sobreviventes podem recuperar a espermatogênese em questão de meses. No entanto, existem muitos casos de azoospermia prolongada nos quais o agente citotóxico parece matar as espermatogônias-tronco (van Thiel *et al*, 1972). Em outros casos, porém, as espermatogônias-tronco sobrevivem, progridem na espermatogênese, mas requerem um longo período de tempo para que possam novamente se diferenciar em espermatozóides, como observado pelo reinício espontâneo da espermatogênese em alguns pacientes após muitos anos de azoospermia (Meistrich *et al*, 1992). Nesse caso há evidências de bloqueio da diferenciação espermatogonial durante o período de azoospermia causado pelos agentes citotóxicos (Kreuser *et al*, 1989; Meistrich & van Beek, 1990).

Em contraste, as células somáticas testiculares, incluindo as células de Leydig e as células de Sertoli e as células peritubulares mióides vasculares, que proliferam lentamente, sobrevivem à maioria das terapias citotóxicas (Meistrich *et al*, 2003).

3.2 Processo de auto renovação e diferenciação a partir das espermatogônias-tronco

A espermatogênese começa com uma célula-tronco diplóide que inicia uma série de divisões mitóticas até chegar à meiose e termina com o processo de diferenciação das espermátides culminando com a formação de uma célula haplóide, o espermatozóide. A espermatogênese pode ser dividida em três fases: (1) fase proliferativa ou espermatogonial, (2) fase espermatocitária ou meiótica e (3) fase espermiogênica ou de diferenciação (Russell *et al* 1990).

Em roedores de laboratório, a célula-tronco diplóide mais primitiva de todas no processo espermatogênico de um animal adulto é a espermatogônia-tronco, também denominada de espermatogônia A isolada (A_{is}). As espermatogônias A_{is} apresentam características de uma célula-tronco clássica, isto é, ao se dividirem podem originar células semelhantes a ela mesma, através do processo de auto-renovação ou se diferenciar. Estas células são denominadas de espermatogônias isoladas devido ao fato de não estarem conectadas entre si através de pontes inter-citoplasmáticas. Após a mitose das espermatogônias A_{is} , as divisões espermatogoniais subseqüentes são comprometidas com a diferenciação e são interligadas por pontes inter-citoplasmáticas (Weber & Russell, 1987).

A divisão mitótica das espermatogônias A_{is} resulta na formação das espermatogônias A pareadas (A_{pr}). A divisão subseqüente da A_{pr} leva à formação de cadeias de 4, 8 e 16 células denominadas de espermatogônias A alinhadas (A_{al}). Estes tipos espermatogoniais, de A_{is} até A_{al} , são denominados de espermatogônias do

tipo A indiferenciadas, primitivas ou amplificadoras; devido ao fato de possuírem graus variáveis de indiferenciação. Após estes tipos espermatogoniais mais primitivos, os tipos celulares subseqüentes em roedores são as espermatogônias do tipo A diferenciadas ou maduras (A_1 , A_2 , A_3 , e A_4), as intermediárias (In) e as espermatogônias do tipo B (B). Atualmente estas células espermatogoniais mais diferenciadas (de A_1 até B) podem ser distintas morfológicamente através das microscopias de luz de alta resolução (Chiarini-Garcia & Russell, 2001, Chiarini-Garcia *et al*, 2003) e eletrônica de transmissão (Chiarini-Garcia & Russell, 2002). As espermatogônias do tipo B são as últimas células da linhagem espermatogonial e se dividem formando espermatócitos primários e iniciando, assim, a fase meiótica da espermatogênese.

Em roedores de laboratório, uma espermatogônia passa em média por 9 a 11 divisões mitóticas antes de se diferenciar em espermatócitos. Estes, por sua vez, sofrem duas divisões na meiose para formar as espermatídes (de Rooij & Russell, 2000). Desta forma, a fase espermatogonial funciona como um processo exponencial onde, teoricamente, em camundongos e ratos, cada espermatogônia-tronco pode formar cerca de 4.096 espermatozóides. Considerando as diferentes espécies de mamíferos, a produção de espermatozóides diária pode variar de 4 a 40 milhões por grama de testículo (de Rooij & Russell, 2000) e esta variabilidade para diferentes espécies está diretamente relacionada ao número de gerações espermatogoniais.

O grupo de espermatogônias indiferenciadas (A_{is} , A_{pr} e A_{al}) é aparentemente constante nas espécies até o momento estudadas (de Rooij, 2001), mas o número de gerações de espermatogônias diferenciadas (do tipo A, In e B) varia nas diversas espécies de mamíferos, o que resulta, como já foi dito, numa produção espermática variável (de Rooij & Grootegoed, 1998). Enquanto em camundongos e ratos existem seis gerações de espermatogônias diferenciadas, em hamsters (A_1 - A_3 , In, B, Nascimento *et al*, 2009) e jumentos (A_1 - A_3 , B_1 - B_2 , Chiarini-Garcia *et al*, 2009) cinco gerações estão presentes. Em algumas espécies de primatas, o número de gerações é de 4 espermatogônias do tipo B (B_1 - B_4 , Clermont & Antar, 1973) enquanto no homem são observadas em torno de duas gerações (A e B, Clermont, 1966). De fato, a presença de apenas uma geração espermatogonial diferenciada para o homem é um dos fatores que faz dele a espécie de mamífero com menor produção espermática conhecida até o presente momento.

No entanto, apesar da sequência exponencial de divisão das espermatogônias diferenciadas garantir o número adequado de espermatozóides de cada espécie, esta geração espermatogonial depende da preservação do estoque das espermatogônias A indiferenciadas, mais especificamente da espermatogônia A_{is} , a célula-tronco do

processo espermatogênico bem como sua capacidade de se diferenciar em tipos espermatogoniais mais avançados. Portanto, qualquer alteração que eventualmente interfira no estoque de espermatogônias-tronco ou ainda no seu processo de auto renovação e diferenciação, pode alterar a fase espermatogonial do processo espermatogênico e, por consequência, a produção espermática, afetando assim a fertilidade.

3.3. Bloqueio da diferenciação espermatogonial

Utilizando ratos como modelo experimental já foi observado que muitas das espermatogônias-tronco sobrevivem após o tratamento com certas doses de radiação (Kangasniemi *et al*,1996b) ou do quimioterápico procarbazina (Meistrich *et al*,1999), mas essas células não mais se diferenciam. O número de espermatogônias-tronco permanece relativamente constante por um longo período de tempo. As células proliferam ativamente, mas sofrem apoptose antes de se diferenciam em espermatogônias do tipo A₁ (Shuttlesworth *et al*, 2000). Exames hormonais desses animais revelam que a ausência de diferenciação das espermatogônias não é decorrente de uma estimulação insuficiente das gonadotrofinas ou testosterona, os dois principais hormônios envolvidos no processo espermatogênico.

O mecanismo de bloqueio da diferenciação espermatogonial através de agentes citotóxicos ainda não está devidamente esclarecido. Esse bloqueio é raramente observado em camundongos (van Beek *et al*, 1990; Kangasniemi *et al*, 1996a), tem uma extensão limitada em primatas não-humanos (Boekelheide *et al*, 2005), e pode ocorrer em seres humanos que se tornam azoospermicos após alguns tipos de tratamentos citotóxicos (Kreuser *et al*,1989; Meistrich & van Beek, 1990).

3.4. Técnicas de prevenção dos efeitos adversos do tratamento contra o câncer

Uma variedade de abordagens bioquímicas e biológicas vem sendo sugeridas e testadas em modelos experimentais de animais na tentativa de proteger o testículo contra os efeitos da radioterapia e quimioterapia. O composto conhecido como amifostina (fármaco citoprotetor), por exemplo, age protegendo os tecidos normais contra os efeitos da radiação e da quimioterapia (Meistrich *et al*,1984), ou análogos da prostaglandina, como o misoprostol, usado no tratamento e prevenção de úlcera de estômago (de Rooij *et al*,1998), ou ainda fatores de crescimento que também já demonstraram oferecer papel protetor (Yamamoto *et al*, 2002). Métodos físicos que reduzem o fluxo de sangue para os testículos através da ligadura ou do criptoquirdismo temporário ofereceram proteção aos testículos de carneiro contra os danos decorrentes do tratamento com adriamicina (van Vliet *et al*,1993). Entretanto

nenhum destes métodos citados mostrou-se promissor o suficiente para passarem por testes clínicos em humanos.

Em contrapartida, tem-se observado grande interesse em ensaios clínicos com modulação hormonal na tentativa de evitar danos às células germinativas após o tratamento radioterápico ou quimioterápico. Estudos têm demonstrado, de forma convincente, que a supressão das gonadotrofinas e testosterona protege os testículos de ratos e aumenta a capacidade de recuperação da espermatogênese após a quimioterapia ou irradiação (Delic *et al*, 1986; Jégou *et al*, 1991; Parchuri *et al*, 1993).

3.5. Estimulação da diferenciação espermatogonial através da supressão hormonal

Embora tenha sido observado um aumento na recuperação da espermatogênese após a supressão de gonadotrofinas e testosterona, antes e durante a terapia citotóxica, não há provas de que a supressão hormonal esteja protegendo diretamente as espermatogônias-tronco. O número e o tipo de espermatogônias sobreviventes após irradiação não foram afetados pela supressão hormonal (Meistrich *et al*, 2000). O pré-tratamento hormonal parece agir de forma ainda desconhecida, preservando a capacidade do testículo de suportar a diferenciação das espermatogônias-tronco sobreviventes. Como já foi mencionado anteriormente, após a radioterapia ou quimioterapia, ocorre um bloqueio na diferenciação espermatogonial e esse bloqueio resulta em esterilidade. A supressão hormonal aparentemente age impedindo esse bloqueio da diferenciação das espermatogônias sobreviventes possibilitando assim a recuperação da espermatogênese e da fertilidade (Kamischke *et al*, 2003). No entanto, até o momento não foi descrito quais fatores e/ou células estão diretamente envolvidos nesse processo.

Meistrich e colaboradores (2001) testaram se a supressão de gonadotrofinas e testosterona após o insulto citotóxico em ratos poderia restaurar a capacidade do ambiente testicular em oferecer suporte à diferenciação das espermatogônias sobreviventes ao tratamento tóxico. A administração de análogos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) impediu o bloqueio na diferenciação de espermatogônias quando aplicados imediatamente após irradiação ou após o tratamento com o quimioterápico procarbazina. Mesmo após o desenvolvimento do bloqueio de diferenciação das espermatogônias, cerca de 10 a 20 semanas após a irradiação, a administração de análogos de GnRH ainda assim superou este bloqueio e restaurou a espermatogênese (Shuttlesworth *et al*, 2000; Meistrich *et al*, 2001). Embora haja a diferenciação das espermatogônias, deve-se notar que elas não poderiam progredir além da fase de espermátides arredondadas, enquanto os níveis

de testosterona e FSH estivessem suprimidos. No entanto, quando o tratamento com análogo do GnRH foi interrompido, a espermatogênese se desenvolveu e tanto a produção de espermatozóides quanto a fertilidade foram restauradas (Meistrich *et al*, 2001). De acordo com esses resultados, o tratamento hormonal com análogos de GnRH de alguma forma supera o bloqueio da diferenciação espermatogonial após a irradiação, fazendo com que as espermatogônias remanescentes se diferenciem, garantindo a progressão da espermatogênese, restaurando assim a fertilidade.

3.6. Mecanismo de estimulação hormonal na proteção da espermatogênese

É surpreendente que a supressão dos hormônios testosterona e/ou FSH, seja capaz de estimular a diferenciação das espermatogônias após o tratamento citotóxico. Shetty e colaboradores (2000, 2002 e 2004) demonstraram que após irradiação, ratos tratados com análogos de GnRH e que também receberam testosterona exógena, ou qualquer outro composto androgênico, apresentaram uma redução na estimulação da diferenciação espermatogonial de uma forma dependente da dose deste composto androgênico. Nestas circunstâncias, até mesmo níveis fisiológicos de testosterona podem inibir a diferenciação espermatogonial. Esta redução na diferenciação espermatogonial induzida por andrógeno foi revertida através do tratamento simultâneo com o fármaco anti-andrógeno não esteróide, conhecido como flutamida (Shetty *et al*, 2000). A flutamida e seus metabólitos, principalmente a 2-hidróxi-flutamida, atuam inibindo a ligação da testosterona ou da diidrotestosterona aos receptores nucleares e citoplasmáticos nas células-alvo (Marona *et al*, 2003). Foi observado que a flutamida sutilmente estimulou a repopulação de células germinativas estimulada por análogos de GnRH culminando com o aumento da produção de espermatozóides. Esses experimentos em conjunto comprovam os efeitos inibitórios da testosterona sobre a diferenciação das espermatogônias em animais submetidos à irradiação. Shetty e colaboradores (2000) observaram que a testosterona é certamente o principal fator de inibição da diferenciação espermatogonial, principalmente através do aumento dos níveis de testosterona intratesticular (Porter *et al*, 2006). Ficou ainda demonstrado que além da testosterona, o FSH também tem um efeito inibitório, embora em menor proporção (Shetty *et al*, 2006).

Embora o declínio da espermatogênese pareça estar intimamente associado ao aumento da concentração de testosterona intratesticular, Porter e colaboradores (2006) observaram que esse aumento tem correlação com o aumento do edema intersticial testicular após o insulto citotóxico. Uma forma de diminuir os níveis de testosterona intratesticular e do edema intersticial é através da eliminação temporária das células de Leydig através do tratamento com sulfonato dimetano-etano ou EDS.

Como as células de Leydig são as principais produtoras de testosterona, a depleção das mesmas resulta em níveis baixos de testosterona intratesticular (Richburg *et al*, 2002).

3.7. Interações entre bloqueio da diferenciação espermatogonial e células somáticas do testículo

Já é sabido que a radiação e drogas quimioterápicas causam permanente esterilidade em ratos, não por matarem as células-tronco espermatogoniais, mas pelo bloqueio de sua diferenciação de uma maneira dependente de testosterona. Entretanto até pouco tempo atrás não se sabia se esse bloqueio devido à radiação alterava as células germinativas ou as células somáticas testiculares. Pesquisas utilizando a técnica de transplante de espermatogônias demonstraram que o bloqueio na diferenciação espermatogonial após radiação, pode estar muito mais relacionado a danos nas células somáticas testiculares do que nas células germinativas propriamente ditas (Zhang *et al*, 2007). Esse trabalho utilizou animais adultos irradiados como doadores de células-tronco espermatogoniais e como receptores utilizou camundongos irradiados e imunossuprimidos. Os animais receptores não apresentaram bloqueio da diferenciação de suas próprias espermatogônias e permitiram ainda a diferenciação das espermatogônias de ratos em espermatozóides. Entretanto o transplante de células-tronco provenientes de ratos pré-púberes normais para o testículo de ratos irradiados mostrou que as espermatogônias doadas foram capazes de colonizar a membrana basal dos túbulos seminíferos no testículo do animal receptor, mas não se diferenciaram. Finalmente a supressão de testosterona nos ratos receptores irradiados permitiu a diferenciação das espermatogônias transplantadas.

Dentre as células somáticas testiculares, as células de Leydig, as peritubulares mióides e as células de Sertoli estão diretamente envolvidas com o a regulação hormonal uma vez que possuem os receptores de andrógenos. Com atenção especial às células de Sertoli que além de possuírem receptores de andrógenos, também estão diretamente envolvidas com o processo de auto-renovação e diferenciação espermatogonial.

3.7.1. Fator de célula-tronco, também conhecido como KITLG e seu receptor (KIT) e o bloqueio da diferenciação espermatogonial

O receptor de tirosina quinase (KIT) é expresso nas espermatogônias diferenciadas (Manova *et al*, 1990), enquanto o seu ligante KITLG é expresso nas células de Sertoli (Manova *et al*, 1993), sendo ambos importantes para a diferenciação espermatogonial. Camundongos mutantes para o KIT ou KITLG contém apenas algumas espermatogônias, mas essas apresentam um bloqueio na diferenciação (de Rooij *et al*, 1990). Isso sugere que a sinalização KITLG-KIT pode estar envolvida no bloqueio da diferenciação espermatogonial. Outro dado importante é que a testosterona, que é o maior inibidor da diferenciação espermatogonial, não influencia e não apresenta qualquer efeito sobre os níveis de RNAm de KITLG (Yan *et al*, 1999).

3.7.2. GDNF e seus receptores Ret e GFR α -1 e bloqueio da diferenciação espermatogonial

O fator neurotrófico derivado de célula glial, também conhecido como GDNF, é uma proteína que, em humanos, é codificada pelo gene GDNF. O GDNF é uma proteína que promove a sobrevivência de vários tipos de neurônios (Lin *et al*, 1993).

Nos testículos, o GDNF é produzido pelas células de Sertoli e é importante para a auto-renovação das espermatogônias-tronco, as quais expressam o complexo de receptores para o GDNF que incluem os receptores Ret e GFR α -1 (Meng *et al*, 2000). Meng e colaboradores (2000) observaram que o GDNF regula positivamente a proliferação espermatogonial e negativamente a sua diferenciação. Camundongos GDNF \pm mostraram uma progressiva perda das células-tronco com o passar do tempo e camundongos superexpressando GDNF apresentaram acúmulo de espermatogônias que não se diferenciaram. Embora já tenha sido descrito que a testosterona não possui qualquer efeito sobre a expressão de GDNF (Meistrich *et al*, 2004), ainda não foi possível excluir completamente a participação do GDNF durante o bloqueio da diferenciação espermatogonial mediada por supressão hormonal.

3.8. Potencial para aplicação clínica de tratamentos hormonais no controle da recuperação espermatogênica em indivíduos submetidos a tratamentos contra o câncer.

Embora a recuperação da espermatogênese possa ser protegida ou até mesmo restaurada em modelos de ratos, a questão é saber se esses procedimentos irão funcionar em humanos. Existem muitas semelhanças entre a espermatogênese de roedores e primatas, e desta forma, seria de se esperar que os mesmos princípios fossem aplicáveis. Além disso, muitos aspectos da regulação hormonal da espermatogênese em roedores são semelhantes à primatas, com andrógenos e FSH dando suporte à diferenciação normal (Bhasin *et al*, 1994). É citado que, de todos os

agentes anticancerígenos, a radiação e os agentes alquilantes são geralmente os mais eficazes na produção de azoospermia prolongada em humanos e roedores, o que nos leva a acreditar que mecanismos semelhantes estejam envolvidos (Meistrich, 1984; Meistrich *et al*, 2005). Além disso, as doses necessárias para produzir prolongada ou permanente azoospermia são bastante semelhantes. Por exemplo, as doses que produzem azoospermia prolongada em humanos e ratos são, respectivamente, cerca de 3 e 3,5 Gy para irradiação (Meistrich & van Beek, 1990; Kangasniemi *et al*, 1996), 3 a 4 mg para procarbazina (Parchuri *et al*, 1993; da Cunha *et al*, 1984) e 600 e 200 mg para busulfan (Udagawa *et al*, 2001; Sanders *et al*, 1996).

No entanto, existem algumas diferenças no processo de proliferação e diferenciação espermatogonial e da ação de hormônios e agentes antineoplásicos em roedores e primatas. Enquanto em roedores, na ausência de andrógenos e FSH a espermatogênese evolui até a fase de espermatócitos ou espermatídes em fase inicial, em primatas a espermatogênese parece permanecer bloqueada ainda na fase de espermatogônias (Weinbauer *et al*, 1988). Outra diferença é que as espermatogônias estão sempre presentes nos testículos de ratos submetidos à doses de radiação e que tornaram-se azoospermicos, mas não necessariamente em humanos (Van Thiel *et al*, 1972; Kreuser *et al*, 1989).

Seis dos sete estudos com humanos, nos quais foram utilizados tratamentos com análogos de GnRH, antiandrogênicos e/ou esteróides administrados antes e durante a quimioterapia ou radioterapia, não ofereceram qualquer benefício na recuperação da espermatogênese (Johnson *et al*, 1985; Waxman *et al*, 1987; Redman & Bajorunas, 1987; Fossa *et al*, 1988; Kreuser *et al*, 1990; Brennemann *et al*, 1990). O fracasso de alguns desses testes em humanos pode ser devido à diversos fatores tais como: (a) doses muito elevadas de quimioterapia, matando todas as células-tronco; (b) doses muito baixas de terapia citotóxica que permitiram a recuperação em todos os pacientes; (c) controles inadequados; (d) uso de acetato de medroxiprogesterona que é ineficaz para estimular a recuperação da espermatogênese (Shetty *et al*, 2004); e (e) tratamento com análogos de GnRH suplementado por testosterona, que em ratos inibe os efeitos estimulantes do GnRH (Shetty *et al*, 2000). No entanto, outro estudo mostrou que doses baixas e sistêmicas de testosterona suprimiram os níveis de testosterona intratesticular e induziram a recuperação da espermatogênese em todos os homens tratados com ciclofosfamida (Masala *et al*, 1997). Embora este estudo não tenha sido repetido para confirmar os resultados, a possível razão para o sucesso pode estar no fato do agente quimioterápico não ter exterminado todas as células-tronco, mas ter sido suficiente para bloquear a sua diferenciação.

Houve apenas um ensaio clínico com o uso da supressão hormonal após o final da quimioterapia e, nesse caso, não foi observada qualquer recuperação da espermatogênese (Thomson *et al*, 2002). Entretanto este estudo usou o tratamento combinado de testosterona com medroxiprogesterona, uma combinação hormonal que não tem sido muito eficaz em restaurar a espermatogênese em ratos irradiados (Shetty *et al*, 2004). Além do fato de todos os pacientes terem sido tratados antes da puberdade com altas doses de procarbazina ou radiação o que provavelmente resultou na perda completa das espermatogônias-tronco.

3.9. O uso de ratos LBNF1 como modelo experimental

Agentes citotóxicos que fornecem efeitos diferentes sobre a espermatogênese em roedores e primatas são apropriadamente utilizados em estudos experimentais, na tentativa de se extrapolar para os humanos. Estudos experimentais, particularmente em roedores são de grande valia à medida que podem ser altamente controlados, com amostras maiores e que podem ser utilizados para aperfeiçoar os tratamentos e para elucidar mecanismos.

Os ratos híbridos LBNF1 são a geração F1 entre pais das linhagens Lewis e Brown-Norway. Diversos estudos vêm demonstrando que o testículo de ratos LBNF1 apresenta sensibilidade semelhante ao testículo humano, pois não recupera a espermatogênese imediatamente após baixas doses de radiação (Kurdoglu *et al*, 1994). Ao contrário dos ratos Sprague-Dawley, nos quais mais de 95% dos túbulos seminíferos mostraram repopulação da espermatogênese após doses de 3-4 Gy, em ratos LBNF1 apenas 13% dos túbulos se recuperaram após 3 Gy (Kangasniemi *et al*, 1996). Desta forma, os ratos LBNF1 podem ser um ótimo modelo de comparação aos humanos durante esse período de insulto citotóxico antes da recuperação da espermatogênese.

4. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Utilizando-se ratos como modelo experimental sabe-se que após a irradiação as espermatogônias remanescentes ficam bloqueadas, não se diferenciam e que esse bloqueio pode ser revertido mediante a supressão da testosterona. No entanto, não se sabe ao certo como ocorre a cinética espermatogonial no momento do bloqueio pós-irradiação e ao longo da supressão hormonal e principalmente quais eventos moleculares estão diretamente envolvidos nesse processo. Uma vez que o modelo experimental utilizado no presente trabalho muito se assemelha à sensibilidade das células germinativas humanas, os resultados aqui gerados podem auxiliar na compreensão do bloqueio da espermatogênese após irradiação e na formulação de tratamentos bem sucedidos em seres humanos, resgatando a fertilidade desses pacientes.

Objetivo Geral

Determinar em que fase do desenvolvimento espermatogonial ocorre o bloqueio da diferenciação das espermatogônias em ratos LBNF1 irradiados e quais células somáticas e eventos moleculares estão envolvidos quando o bloqueio é revertido mediante supressão hormonal.

Os objetivos específicos

- ❖ Determinar em que do desenvolvimento espermatogonial ocorre o bloqueio da diferenciação espermatogonial após irradiação através da técnica de microscopia de luz de alta resolução;
- ❖ Acompanhar a diferenciação espermatogonial e sua cinética ao longo da supressão hormonal através da técnica de microscopia de luz de alta resolução;
- ❖ Examinar através de análises morfométricas, sob microscopia de luz, o avanço da diferenciação espermatogonial ao longo dos diferentes tempos após a estimulação da espermatogênese com GnRH antagonista (*Acyline*) combinado com flutamida;
- ❖ Examinar o papel das células de Leydig no avanço da diferenciação espermatogonial através de análises morfométricas, sob microscopia de luz

de alta resolução, após tratamento com GnRH antagonista (*Acyline*), mais flutamida e associado ao tratamento com EDS;

- ❖ Através de reações de imunohistoquímica, acompanhar a evolução da diferenciação espermatogonial, após a irradiação e supressão hormonal, utilizando-se para isso o marcador de proliferação celular (MCM7) e de espermatogônias diferenciadas (KIT). Verificar se os eventos moleculares ocorrem simultaneamente aos eventos morfológicos;
- ❖ Detectar se houve alteração na expressão (através de reações de imunofluorescência) de GDNF e KITLG nas células de Sertoli, após a irradiação e durante a supressão hormonal;
- ❖ Analisar ultraestuturalmente o efeito da irradiação e da supressão hormonal sobre as células de Sertoli e espermatogônias.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais

As atividades descritas abaixo, tais como, obtenção dos animais, tratamento e sacrifício, foram desenvolvidas nos Estados Unidos, no laboratório do Dr. Marvin L. Meistrich no MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, durante o período de novembro de 2009 a novembro de 2010.

Foram utilizados 46 ratos machos adultos híbridos LBNF1 (provenientes da “Inc Harlan Sprague Dawley”, Indianópolis, IN), por apresentarem sensibilidade gonadal ao insulto citotóxico mais próximo ao testículo humano. Os animais foram aclimatados durante uma semana antes do início do experimento e permaneceram em biotério aprovado pela “American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care”, sob condições controladas de temperatura e umidade e com livre acesso à ração e água.

5.2. Irradiação

Os animais submetidos à irradiação foram inicialmente anestesiados com um coquetel intramuscular contendo 0,72mg de ketamina/Kg e 0,022mg de acepromazina/Kg. Uma única dose de 6-Gy de raio gama Co⁶⁰ foi aplicada na parte inferior do abdômen (Kangasniemi *et al*, 1996). O campo de radiação foi de 20 x 20 cm e 4 animais foram irradiados simultaneamente dentro desse campo. Uma malha gelatinosa foi colocada por cima dos animais para assegurar uma penetração homogênea da dose.

5.3. Supressão hormonal

5.3.1 GnRH antagonista

O GnRH antagonista comercialmente chamado de *Acyline* foi dissolvido em água estéril e administrado semanalmente ao longo de 6 semanas, em injeções subcutâneas de 1,5mg/Kg de peso corporal. Essa dosagem é o suficiente para suprimir a testosterona plasmática em níveis menores que 0,1 ng/ml e manter essa supressão por até 10 dias, uma vez que diversos trabalhos vêm demonstrando o efeito bloqueador da testosterona sobre a diferenciação espermatogonial (Porter *et al*, 2009; Shuttlesworth *et al*, 2000; Zhou *et al*, 2010).

5.3.2. Flutamida

A flutamida é um fármaco anti-androgênico não esteroide, implantado na forma de cápsulas subcutâneas e que atua inibindo a ligação da testosterona ou da diidrotestosterona aos receptores nucleares e citoplasmáticos nas células-alvo. Foram implantadas 4 cápsulas biodegradáveis de 5 cm cada por animal, provenientes da “Inovative Research of American”, perfazendo uma dose de 20mg/Kg de peso corporal/dia (Porter *et al*, 2009; Zhou *et al*, 2010).

5.3.3. Tratamento com sulfonato dimetano-etano ou EDS

Com o objetivo de se analisar o efeito da morte das células de Leydig sobre a recuperação espermatogonial após a irradiação, foi injetada por via intraperitoneal 75mg de EDS/Kg de peso corporal . (Bartlett *et al*, 1986), sintetizado no MD Anderson pelo Dr. William Bornmann.

5.4. Desenho Experimental

Dois experimentos independentes foram realizados, conforme ilustrado na **Figura 1**.

5.4.1. Experimento I – Análise dos eventos morfológicos, morfométricos e moleculares após a irradiação e durante a recuperação da espermatogênese.

Dez semanas após a irradiação (a partir de agora tratados como tempo zero), tempo suficiente para destruir completamente a espermatogênese, 20 animais foram semanalmente tratados com *Acyline* + flutamida (XAF) durante um intervalo de 3 dias a 6 semanas. Em cada tempo de tratamento, 4 animais foram sacrificados a fim de se acompanhar o progresso da espermatogênese e os parâmetros da diferenciação espermatogonial (moleculares e morfológicos) ao longo da supressão hormonal.

Para o grupo controle (C, n=5) foram utilizados animais não irradiados e sem nenhum tipo de supressão hormonal. Para o grupo dos irradiados (X, n=6), cujos animais não receberam nenhum tratamento hormonal, foram utilizados dois tempos de análise: 11 e 16 semanas após a irradiação, correspondendo respectivamente a 1 ou 6 semanas de tratamento do grupo XAF. Tempos intermediários não foram analisados porque estudos anteriores já demonstraram não haver modificações na histologia testicular, índice de repopulação ou nos níveis hormonais entre 1 e 30 semanas após a irradiação (Kangasniemi *et al*, 1996). Os resultados do presente estudo também demonstraram que não houve diferença significativa entre os animais apenas

irradiados entre 11 e 16 semanas e, por esse motivo, os resultados desses dois tempos foram somados e usados as suas médias para comparação com os demais tempos de tratamento.

Aproximadamente 15 minutos antes da fixação, os animais foram pesados e heparinizados via intraperitoneal na dosagem de 125 UI/Kg de peso corporal (Liquemine-Roche) para evitar a coagulação intravascular durante o processo de perfusão. Após esse período, os mesmos foram anestesiados com um coquetel intramuscular contendo 0.72 mg de ketamina/Kg e 0.022 mg de acepromazina/Kg. Procedeu-se então a abertura da cavidade torácica com o objetivo de expor o coração. Um cateter (18G) foi introduzido no ventrículo esquerdo, o átrio direito foi seccionado e, por perfusão, o leito vascular foi lavado com solução salina 0.9% a uma pressão de aproximadamente 80 mmHg.

Após a retirada do sangue com solução salina, procedimento que durou de 10-15 minutos, iniciou-se o processo de fixação por perfusão intravascular com o fixador de Davidson modificado (Latendresse, 2002), por um período de aproximadamente 40 minutos, sendo utilizado aproximadamente 400ml de fixador por animal. Em seguida o testículo direito foi orquiectomizado, pesado, recortado e re-fixados por imersão no mesmo tipo de fixador por 24 horas, a 4° C. Após as 24 horas de pós-fixação, os testículos foram recortados em fragmentos menores, de 1 a 2 mm de espessura, e mantidos em álcool 70% até o momento da inclusão. Para os estudos imunohistoquímicos, os fragmentos testiculares foram incluídos em parafina (Merck # 1.11609) através do método tradicional. Dos blocos foram obtidos cortes histológicos de 5µm de espessura, coletados em lâminas histológicas cobertas com silano (Sigma, # A3648), para evitar a perda do corte durante o processamento imunohistoquímico.

O fixador de Davidson modificado foi preparado 24 horas antes da fixação e mantido à temperatura ambiente. Esse fixador consiste em uma mistura de 30% de formaldeído (37-40%), 5% de ácido glacial acético, 15% etanol (100%) e 50% de água destilada (Latendresse, 2002).

Para os estudos em microscopia de luz de campo claro, os fragmentos testiculares foram incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato (Historesin, Leica). Os fragmentos testiculares foram então submetidos à microtomia, sendo as secções obtidas na espessura de 4µm. Posteriormente à microtomia, os fragmentos foram corados com azul de toluidina-borato de sódio e submetidos à análise microscópica (Chiarini-Garcia *et al*, 2011).

I - Avaliações morfométricas sob a microscopia de luz

Os estudos morfométricos consistiram em (1) medida do diâmetro tubular, (2) número absoluto de células de Sertoli e espermatogônias do tipo A após a irradiação, (3) índice apoptótico nos animais irradiados e submetidos à supressão hormonal e (4) número total de células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero. Para todas as análises morfométricas, foram utilizados cinco animais controle, seis animais apenas irradiados e quatro animais irradiados e tratados para cada tempo de supressão hormonal (**Fig. 1**).

(1) Diâmetro tubular

Uma forma inicial de se avaliar o que está ocorrendo com a espermatogênese após a irradiação e durante a supressão hormonal é através dessa análise morfométrica do diâmetro tubular. O diâmetro tubular foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 20 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentaram contorno o mais circular possível nos animais controle, irradiados e em cada tempo de tratamento durante a supressão hormonal.. Para isso, uma régua micrométrica foi acoplada à lente ocular do microscópio Olympus BX-41.

(2) Número absoluto de células de Sertoli e de espermatogônias do tipo A após a irradiação

Para se determinar o número absoluto das células de Sertoli e das espermatogônias tipo A presente nos testículos após irradiação, os seguintes parâmetros morfométricos foram obtidos:

- a) volume do parênquima testicular - V_T (μm^3)
- b) proporção volumétrica dos dois tipos celulares - Vv_c (%)
- c) volume nuclear/nucleolar médio de cada tipo celular - Vn (μm^3)
- d) número absoluto de cada tipo celular/testículo - NC (10^6 - milhões)

a. Volume do parênquima testicular - V_T (μm^3)

O peso testicular (P_T) obtido durante a coleta do material corresponde ao peso do parênquima testicular acrescido do peso da túnica albugínea (quando essa não tiver sido retirada). Sendo assim, o primeiro passo para se calcular o volume do parênquima testicular consiste em subtrair o correspondente ao peso da túnica albugínea, ou seja, ~3,5% do valor obtido para os animais controle (Sinha Hikim *et al.*, 1988) e 35,4% para os animais irradiados (Meistrich, dados não publicados). Utilizando como exemplo um animal controle adulto de $P_T = 100\text{mg}$, o peso do parênquima testicular desse animal seria:

$$100 (- 3,5\%) = 96,5 \text{ mg}$$

A partir do valor do peso do parênquima testicular é necessário realizar uma série de transformações de unidades de medidas com o objetivo de se obter o volume desse parênquima. Como o valor que temos está expresso em miligramas (mg) e desejamos que ele seja expresso em gramas (g), é necessário transformá-lo multiplicando o valor por 10^{-3} . O nosso exemplo ficaria:

$$96,5 \times 10^{-3} \text{ g} = 0,0965\text{g}$$

A partir da literatura temos que a densidade do testículo é muito próxima de 1g/mL (1,03 a 1,04; Sinha Hikim *et al.*, 1988), então para cada grama de testículo teremos o volume correspondente a $10^{12} \mu\text{m}^3$. Para o nosso exemplo o volume do parênquima testicular seria:

$$V_T = 0,0965 \times 10^{12} \mu\text{m}^3$$

b. Proporção volumétrica das células de Sertoli e espermatogônias tipo A - Vv_e (%)

A proporção volumétrica dos dois tipos celulares avaliados no testículo foi estimada utilizando-se retículo com 441 intersecções (pontos) acoplado à ocular de um microscópio Olympus BX-51. Para obtenção desta proporção volumétrica foram contados, com aumento final de 400X, os pontos coincidentes com os tipos celulares avaliados. Foram contados 10 campos por animal, escolhidos ao acaso, perfazendo-se um total de 4.410 pontos.

Em seguida, foi estimado o volume do nucléolo e do núcleo da célula de Sertoli e da espermatogônia tipo A, respectivamente (Vt_c) a partir do conhecimento do percentual ocupado pelo mesmo no volume total do testículo (V_T), conforme a fórmula:

$$Vt_c = \frac{V_T \cdot Vv_c}{100}$$

onde: Vt_c = volume dos tipos celulares (μm^3)

V_T = volume do parênquima testicular (μm^3)

Vv_c = proporção volumétrica dos tipos celulares no testículo (%)

c. Volume nuclear/nucleolar médio de cada tipo celular - V_n (μm^3)

Um dos parâmetros necessários para o cálculo do número das células é a mensuração do volume nuclear das espermatogônias tipo A e do volume nucleolar das células de Sertoli, que foi calculado aplicando a seguinte fórmula:

$$V_n = \frac{4}{3} \pi R^3$$

onde: V_n = volume nuclear/nucleolar (μm^3)

π = 3,1416

R = raio nuclear/nucleolar (diâmetro dividido por 2)

O diâmetro nuclear/nucleolar médio (razão entre a soma do diâmetro maior com o menor dividido por 2) representa a média das medidas dos diâmetros de 10 núcleos/nucléolos para cada tipo celular por animal, segundo o padrão de distribuição dos mesmos. Estes diâmetros foram medidos com o auxílio do programa Image Pro-Express de imagens capturadas com o auxílio de uma câmera fotográfica digital Q-Color 3 acoplada ao microscópio.

Tendo em vista que há pouca variação entre o diâmetro nuclear/nucleolar, optou-se por medir o diâmetro do menor número de células, isto é, 10 núcleos/nucléolos de espermatogônias tipo A e células de Sertoli, respectivamente.

d. Número absoluto de cada tipo celular/testículo – NC (10^6)

Com os dados obtidos anteriormente, foi possível calcular o número de células de Sertoli e de espermatogônias tipo A por testículo, dividindo o volume total ocupado pelos núcleos/nucléolos desses dois tipos celulares (V_{t_n}) presentes no parênquima testicular pelo volume nuclear/nucleolar do mesmo tipo celular (V_n), conforme a fórmula a seguir. O número obtido está expresso em milhões ($\times 10^6$).

$$NC = \frac{V_{t_n}}{V_n}$$

onde: NC = número de determinado tipo celular no testículo (milhões)

V_{t_n} = volume total do mesmo tipo celular no testículo (μm^3)

V_n = volume nuclear/nucleolar do mesmo tipo celular (μm^3)

(3) Índice Apoptótico nos animais irradiados e tratados

Para determinar se o aumento do número das células germinativas foi um resultado direto da diminuição da apoptose, o índice apoptótico foi calculado dividindo-se o número total de células apoptóticas pela soma das espermatogônias tipo A + as células em mitose + as células em apoptose.

(4) *Número total de células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero*

Com o objetivo de se estimar o progresso ou não da espermatogênese após a irradiação e mediante a supressão hormonal, foram calculadas a razão entre os números corrigidos de células germinativas por túbulo seminífero, bem como o número de células de Sertoli. A população celular obtida por secção transversal (100 túbulos seminíferos/animal para aqueles que foram irradiados e de 50 túbulos seminíferos/animal para os controles) foi corrigida pela espessura do corte histológico (4µm) e pelo diâmetro nuclear/nucleolar, utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946) abaixo:

$$CN = \frac{N \cdot E}{E + D}$$

onde:

CN = número corrigido;

N = número originalmente obtido;

E = espessura de corte (µm)

D = diâmetro nucleolar (Sertoli) ou nuclear (espermatogônia) (µm)

Os diâmetros nucleares/nucleolares foram obtidos pela média das mensurações de 10 núcleos/nucleólos dos tipos celulares estudados para cada animal com o auxílio do programa Image-Pro Express.

II – Avaliações imunohistoquímicas

Objetivando-se analisar alguns eventos moleculares presentes após a irradiação e mediante o tratamento hormonal, foram realizados ensaios imunohistoquímicos com o marcador de proliferação MCM7, duas proteínas sintetizadas pelas células de Sertoli e que possuem intrínseca relação com a regulação espermatogonial (GDNF e KITLG) e o receptor do KITLG, KIT, expresso nas espermatogônias do tipo diferenciadas. Após a fixação por perfusão com o fixador de Davidson, os fragmentos testiculares foram incluídos em parafina, reidratados e submetidos à recuperação antigênica. Em seguida, as secções foram incubadas com solução de bloqueio Tampão Tris 0,05M pH 6, acrescido de Tween-20 e caseína por 30 minutos. Após o bloqueio, as secções foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em 0.3% BSA/PBS a saber: 1) anti-GDNF (Santa Cruz, D-20, # sc: 328, 1:200), 2) anti-MCM7 (abcam # ab79802, 1:800) 3) anti-KITLG (desenvolvido pelo Dr. Shayu Deshpande, 1:200) e finalmente 4) anti-KIT (Santa Cruz, M-14, sc:1494, 1:50) em câmara úmida a 4°C por 24 horas. Após lavagens sucessivas em PBS, as lâminas

foram incubadas por 1 hora e 30 minutos com anticorpo secundário fluorescente goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (IgG, Invitrogen) para as análises do GDNF e do KITLG, com anticorpo secundário fluorescente donkey anti goat Alexa flúor 594 (IgG, Invitrogen) para o anticorpo KIT ou com o anticorpo secundário biotinilado anti-mouse (Vectastain ABC kit, PK-6102) para o MCM7. Para se visualizar os núcleos celulares nas imunofluorescências, as secções foram incubadas com DAPI (Sigma Aldrich # D9542, 1:1000 diluído em PBS). No caso das secções coradas com peroxidase, os núcleos foram contracorados com hematoxilina. Os controles negativos foram preparados sem a adição de anticorpo primário (**Figura suplementar**). Finalmente as lâminas foram analisadas com o microscópio Olympus, BX51 acoplado ou não ao sistema de fluorescência.

Para se avaliar os efeitos da irradiação e da supressão hormonal sobre as células de Sertoli, a expressão do GDNF e KITLG foi medida. A quantificação da expressão foi medida através da intensidade de fluorescência utilizando o software de análise de imagens ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, v1.45s) em todos os tempos de tratamento durante a supressão hormonal e nos dois tempos de análises após a irradiação. A quantidade de expressão dessas proteínas foi avaliada mediante fotomicrografias de 10 secções transversais de túbulos seminíferos, num aumento final de 400X, conforme ilustrado na **Figura 2**. Para isso, a intensidade de fluorescência total do túbulo (**FI**) foi medida como sendo o total de fluorescência das células de Sertoli (**SF**), excluindo-se as áreas de lúmen, vacúolos e áreas dos núcleos celulares, (**Fig. 2B**). O total de intensidade de fluorescência proveniente do background (**BG**, **Fig. 2C**) e das células peritubulares mióides (**PM**, **Fig. 2D**) também foi medido e aplicado à fórmula matemática abaixo:

$$FI = \frac{SF - PM}{BG}$$

A intensidade de fluorescência final das células de Sertoli para a expressão das proteínas GDNF e KITLG foram apresentadas como uma média de intensidade de pixels.

Finalmente, para se avaliar a taxa de proliferação e de diferenciação espermatogonial, foram contadas todas as células MCM7 e KIT positivas, respectivamente, em 50 perfis aleatoriamente escolhidos de túbulos seminíferos, por animal, tanto nos animais apenas irradiados (Grupo X) quanto naqueles hormonalmente suprimidos (Grupo XAF).

5.4.2. Experimento II – Cinética Espermatogonial e ultraestrutura ao longo de 1, 2 e 4 semanas de supressão hormonal.

(1) Microscopia de luz de alta resolução

Após os resultados do experimento I, no qual observou-se um aumento significativo no número das espermatogônias no início da supressão hormonal, um segundo experimento foi desenvolvido (Experimento II na Fig. 1) a fim de se acompanhar a cinética espermatogonial. Para isso a técnica de microscopia de luz de alta resolução foi utilizada.

Assim como ocorreu no experimento I, dez semanas após a irradiação (considerado tempo zero), 6 animais foram semanalmente tratados com *Acyline* + flutamida (XAF) durante um intervalo de 1, 2 e 4 semanas. Em cada tempo de tratamento, 3 animais foram sacrificados a fim de se acompanhar o progresso da diferenciação espermatogonial. Com o objetivo de se avaliar os efeitos da ausência de células de Leydig sobre a cinética espermatogonial, um grupo experimental recebeu a adição do EDS ao tratamento de *Acyline* + flutamida (grupo X(EDS)AF). Para o grupo controle e apenas irradiado foram utilizados um total de 3 animais por grupo.

Seguindo o protocolo rotineiramente utilizado em nosso laboratório (Chiarini-Garcia & Meistrich, 2008), os animais foram fixados por perfusão intravascular com 5% glutaraldeído em tampão fosfato 0.05M, pH 7.2 e tiveram seus fragmentos testiculares desidratados em séries crescentes de álcool etílico e incluídos na resina plástica Araldite. Dos blocos foram obtidos cortes semifinos de 1 μ m de espessura com alta preservação de detalhes morfológicos devido à combinação glutaraldeído + araldite. Esses cortes histológicos foram então corados com azul de toluidina-borato de sódio, e submetidos às análises de microscopia de luz de alta resolução.

O estudo morfométrico consistiu em calcular o número total de cada tipo espermatogonial, a saber: A_{ind} , A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , In e espermatogônia tipo B por 100 nucléolos de células de Sertoli. Foi feita uma média de cada tipo espermatogonial contadas em 50 secções transversais de túbulos seminíferos os mais circulares possíveis e escolhidos ao acaso. A média dos diâmetros nucleares e a espessura do corte foram utilizadas para se obter o número corrigido segundo Abercrombie (1946).

(2) Microscopia Eletrônica

Foram ainda desenvolvidos estudos de microscopia eletrônica para se avaliar o efeito da irradiação e da supressão hormonal sobre a ultraestrutura das células de Sertoli e espermatogônias. Para tal, os mesmo blocos utilizados para microscopia de luz de alta resolução foram cortados em cortes ultrafinos de 70nm. Essas secções

ultrafinas foram coletadas em telas de cobre, contrastadas com acetado de chumbo e uranila e levadas ao microscópio eletrônico para análise (Zeiss EM-10). A identificação das espermatogônias em nível ultraestrutural baseou-se em estudo anterior desenvolvido por Chiarini-Garcia e Russell (2002).

5.5 Análises Estatísticas

Todos os parâmetros medidos foram testados quanto à normalidade antes da análise, usando o procedimento univariado do programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute, Cary, NC, EUA). Os dados foram analisados como um delineamento inteiramente ao acaso e o modelo estatístico incluiu ratos como fatores fixos e a morfologia das células como fator aleatório. Os efeitos do tratamento sobre a morfometria, morfologia e eventos moleculares de diferenciação espermatogonial foram analisados utilizando o modelo linear geral (GLM) do SAS. Os eventos nos quais os tratamentos foram significativos, comparações múltiplas foram realizadas utilizando-se a probabilidade de diferenças (pdiff) entre médias de quadrados mínimos, ajustadas pelo teste Tukey-Kramer (SAS, 2001), com $P < 0,05$ sendo considerado significativo. Nas tabelas e gráficos, os dados são apresentados como médias de \pm erro padrão da média.

6. RESULTADOS

Experimento I

6.1. Resultados Morfométricos

6.1.1. Peso corporal e testicular

Não foram observadas quaisquer diferenças estatísticas significativas quanto ao peso corporal entre os grupos estudados. Entretanto, conforme esperado, os animais controle apresentaram os maiores valores no peso testicular, uma vez que não foram submetidos à irradiação. Foi observada ainda uma diminuição no peso, inversamente proporcional ao tempo de supressão hormonal, sendo o menor valor observado após o tempo mais longo de supressão (**Tab. 1**).

6.1.2. Diâmetro Tubular

Como esperado, a média do diâmetro tubular no grupo C foi maior ($p < 0,05$) do que a média no grupo X: $354,80 \pm 3,08\mu\text{m}$ e $192,46 \pm 2,11\mu\text{m}$, respectivamente. Entretanto, ao longo da supressão hormonal, o diâmetro tubular, foi progressivamente diminuindo após 3 dias, 1 e 2 semanas de tratamento com *Acyline* + flutamida e apresentando diferenças significativas após 4 e 6 semanas: $192,75 \pm 1,04 \mu\text{m}$; $188,38 \pm 2,96$; $182,75 \pm 1,5 \mu\text{m}$; $174,25 \pm 2,75 \mu\text{m}$ e $165,63 \pm 4,03 \mu\text{m}$; respectivamente (**Fig. 3**).

6.1.3. Número absoluto de células de Sertoli e espermatogônias tipo A após a irradiação

No presente estudo, o número absoluto de células de Sertoli por testículo não foi alterado após a irradiação (**Fig. 4**). Nos animais controle o número absoluto de células de Sertoli foi de $48,75 \pm 3,60 \times 10^6$ e nos animais irradiados (média dos animais nos tempos de 11 e 16 semanas pós-irradiação) foi de $40,41 \pm 2,09 \times 10^6$. Entretanto, de acordo com o esperado, o número de espermatogônias tipo A nos animais irradiados diminuiu drasticamente ($p < 0,05$) quando comparado ao número de espermatogônias tipo A nos animais controle ($20,03 \pm 2,64 \times 10^6$ vs $3,07 \pm 0,42 \times 10^6$)

6.1.4. Número de células de Sertoli e avanço da espermatogênese ao longo da supressão hormonal.

Como não foram observadas quaisquer alterações no número absoluto de células de Sertoli após a irradiação, uma análise mais simplificada - número de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero foi utilizada ao longo da supressão hormonal. De acordo com os resultados, não foram observadas alterações do número de células de Sertoli durante a supressão hormonal. O número de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero foi $10,34 \pm 0,38$; $10,84 \pm 0,6$; $11,05 \pm 0,48$; $12,04 \pm 0,5$ e $12,05 \pm 0,53$ nos animais tratados durante 3 dias, 1, 2, 4 e 6 semanas. Entretanto esse mesmo tratamento aumentou progressivamente o número de células germinativas, principalmente do número total de espermatogônias por corte transversal de túbulos seminíferos e demonstrou ausência de qualquer sinal de recuperação da espermatogênese em animais apenas irradiados (**Tab. 2**). Comparando-se o número de células germinativas para cada 100 nucléolos de células de Sertoli, método esse mais preciso, foi observado um aumento significativo do número de células germinativas, com a presença de espermatócitos em paquíteno como tipo celular mais avançado e raros diplótenos (**Fig. 5**).

6.1.5. Índice Apoptótico

Para determinar se o aumento do número das células germinativas foi um resultado direto da diminuição da apoptose, o índice apoptótico foi medido nos animais irradiados e ao longo da supressão hormonal. Durante o tratamento com *Acyline* + flutamida, a taxa de apoptose permaneceu inalterada, sem diferenças significativas entre os tempos de tratamento (**Fig. 6**). Entretanto, quando comparado o índice apoptótico dos animais tratados por 1 e 6 semanas com àquele dos animais apenas irradiados, foi observado um aumento significativo da apoptose no grupo tratado, provavelmente em decorrência da maior taxa de proliferação celular em resposta à supressão hormonal.

6.2. Resultados Moleculares

6.2.1. Proliferação celular utilizando o marcador MCM7

Uma vez que o aumento do número de células germinativas não foi resultado direto da diminuição do índice apoptótico, utilizamos o marcador de proliferação celular MCM7 para acompanhar o avanço da espermatogênese mediante ensaios imunohistoquímicos (**Fig. 7A-E**). Nos animais controle, em todos os túbulos analisados, independente do estágio do ciclo do epitélio seminífero, as células em

paquíteno foram os tipos celulares mais avançados e positivos para o marcador MCM7, com o sinal negativo para espermatócitos mais avançados, células de Sertoli e espermatídes arredondadas ou alongadas (**Fig. 7A**). Os túbulos seminíferos dos animais apenas irradiados apresentaram poucas ou nenhuma célula MCM7 positivas (**Fig. 7B**), entretanto clones de células foram observados após 2 semanas de tratamento (**Fig. 7C**) e a divisão desses clones, seguida de migração das células ao longo da membrana basal do túbulo seminífero após 4 semanas (**Fig. 7D**). De acordo com o esperado, o número de células positivas para o MCM7 foi aumentando progressivamente ao longo do tratamento, confirmando intensa proliferação das células germinativas dentro dos túbulos seminíferos (**Fig. 7E**). Como não foram encontradas diferenças estatísticas no número de células positivas MCM7 quando os dois tempos dos animais apenas irradiados foram comparados entre si, esses valores foram somados e sua média utilizada como comparação.

6.2.2. Expressão das proteínas GDNF e KITLG nas células de Sertoli

Para se avaliar o efeito da irradiação e da supressão hormonal com *Acyline* + flutamida sobre as células de Sertoli, foi calculado o nível de expressão das proteínas GDNF (**Fig. 8A-D**) e KITLG (**Fig. 9A-D**), vinculadas com a proliferação de espermatogônias indiferenciadas e diferenciadas, respectivamente. Foi observado que o nível de expressão de GDNF aumentou gradativamente ao longo da supressão hormonal, atingindo níveis significativos ($p < 0,05$) após 4 semanas de supressão quando comparados ao nível de expressão no grupo X (**Fig. 8D**). Quando a expressão de GDNF dos animais apenas irradiados (X) foi comparada entre 1 e 6 semanas, sem nenhuma supressão hormonal, não foram observadas quaisquer diferenças estatísticas, logo esses valores foram somados e sua média utilizada como comparação. Esse resultado sugere alteração dos níveis de GDNF após apenas 4 semanas da supressão da testosterona e com o retorno aos níveis pós-irradiação mesmo após 6 semanas de tratamento. Entretanto, quando os níveis de KITLG foram comparados entre os grupos X e XAF ou ao longo da supressão hormonal, nenhuma diferença significativa foi encontrada ($p > 0,05$). Esse resultado sugere que a proteína KITLG não possui influência direta sobre o bloqueio da diferenciação espermatogonial após supressão hormonal (**Fig. 9D**). Assim como observado nos níveis de GDNF, não foram observadas quaisquer diferenças entre os valores de KITLG após uma e seis semanas nos animais apenas irradiados.

6.2.3. Diferenciação espermatogonial mediante expressão de KIT

O marcador de espermatogônias diferenciadas KIT foi utilizado para verificar se a sua expressão iria ser alterada após a irradiação e ao longo do tratamento hormonal e para correlacionar os eventos moleculares e morfológicos durante o surgimento das espermatogônias diferenciadas sob microscopia de luz. Mesmo na ausência de supressão hormonal foi observada a presença de células KIT positivas ao longo do epitélio seminífero de ratos irradiados (**Fig. 10A-B**). A presença destas espermatogônias KIT positivas, em animais irradiados e sem supressão hormonal indicam a presença de espermatogônias diferenciadas, provavelmente do tipo A, mostrando que algumas células podem, de uma forma não esperada, transpor o bloqueio na diferenciação e avançarem para A₁. Observou-se que, após a supressão hormonal, a expressão do receptor KIT aumentou gradualmente a partir de 3 dias até 4 semanas de tratamento, quando comparado com a expressão de células KIT positivas em ratos apenas irradiados (**Fig. 10C**). Comparando-se o número de células KIT positivas com as espermatogônias diferenciadas identificadas morfolologicamente através da microscopia de luz, observou-se um aumento progressivo do número de células KIT positivas durante a supressão hormonal (**Fig. 10D**).

Experimento II

6.3. Cinética Espermatogonial

O número de cada tipo de espermatogônia por 100 nucléolos de células de Sertoli, utilizando a microscopia de luz de alta resolução, estão apresentados na **Tabela 3**. O número de espermatogônias A_{ind} foi drasticamente diminuído após a irradiação e aumentou progressivamente durante a supressão hormonal ($p < 0,05$). Foram observadas inclusive algumas espermatogônias tipo A₁ (**Tab. 3 e Fig. 12B**) em animais apenas irradiados, sem qualquer supressão hormonal, validando a presença de células KIT positivas em animais irradiados. Ao longo da supressão hormonal com *Acyline* + flutamida a diferenciação espermatogonial aumentou progressivamente no decorrer do tratamento. Surpreendentemente a adição de EDS ao tratamento, o qual é responsável pela morte das células de Leydig, antecipou a recuperação da espermatogênese em uma semana (**Fig. 11**), demonstrando a participação da célula de Leydig durante o bloqueio da diferenciação espermatogonial. Foi observado que durante a supressão hormonal por uma semana com *Acyline* + flutamida e com a adição de EDS, as espermatogônias mais avançadas encontradas foram as do tipo intermediárias (**Fig. 12C**) e que após duas semanas de supressão hormonal, mas sem EDS, o tipo espermatogonial mais avançado, embora em menor número foi a do tipo B (**Fig. 12D**). Curiosamente, após 4 semanas de supressão hormonal, o número de

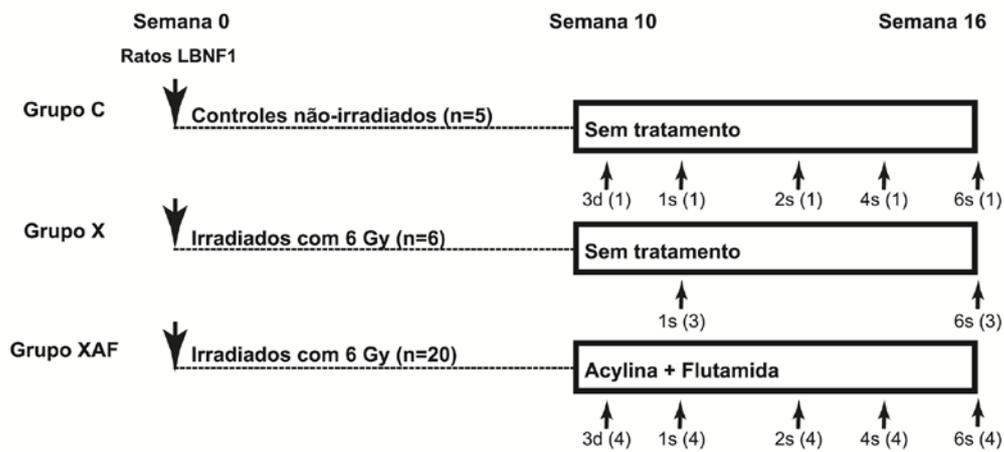
espermatogônias do tipo A_1 excedeu o valor do grupo controle, caracterizando uma maior diferenciação de A_{al} - A_1 . Clones de espermatogônias do tipo A_{al}/A_1 (**Fig. 12E**) foram frequentemente observados após 2 semanas de tratamento hormonal. Os subtipos espermatogoniais subseqüentes A_2 -B (**Fig. 12F-G**), aumentaram progressivamente durante a supressão hormonal, mas não alcançaram a mesma quantidade que os controles.

6.4. Microscopia Eletrônica.

Ultraestruturalmente, algumas alterações morfológicas foram observadas no epitélio seminífero após irradiação (**Fig. 13**). Os núcleos das células de Sertoli apresentaram-se mais alongados, com muitas reentrâncias e uma fina camada de heterocromatina envolvendo o envelope nuclear após irradiação (**Fig. 13C**), ou mesmo após 4 semanas de supressão hormonal (**Fig. 13E**), quando comparados com os núcleos de Sertoli dos animais controle (**Fig. 13A**). Não foi observada nenhuma alteração nas organelas das células de Sertoli ou das espermatogônias, ou ainda nas junções Sertoli-Sertoli após a irradiação ou durante a supressão hormonal. De forma curiosa, foi observado que, após a irradiação, e ao longo da supressão hormonal, a lâmina basal projetou-se para o interior do epitélio seminífero, empurrando a membrana celular para o interior da espermatogônia formando uma invaginação (**Fig. 13D**). Finalmente foi observado, também em nível ultraestrutural o aumento progressivo do número de espermatogônias avançadas no epitélio seminífero ao longo dos tratamentos, partindo das espermatogônias tipo A_{al} até as do tipo B.

7. FIGURAS

Experimento I
 Fixados em Davidson, incluídos em glicol de metacrilato para análises morfológicas e morfométricas ou incluídos em parafina para análises imunohistoquímicas



Experimento II
 Fixados com glutaraldeído, incluídos em resina Araldite para análises de microscopia de luz de alta resolução e eletrônica

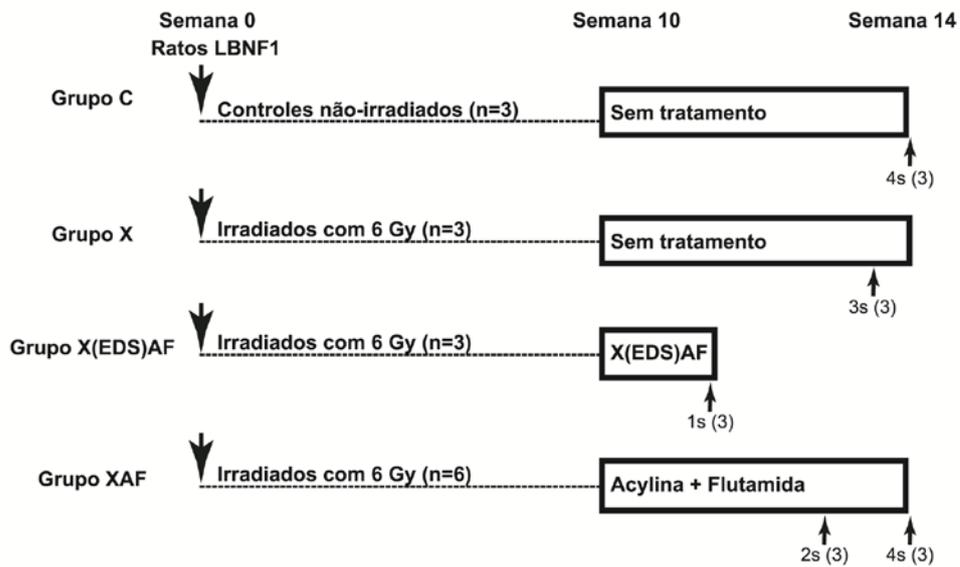


Figura 1. Esquema do desenho experimental

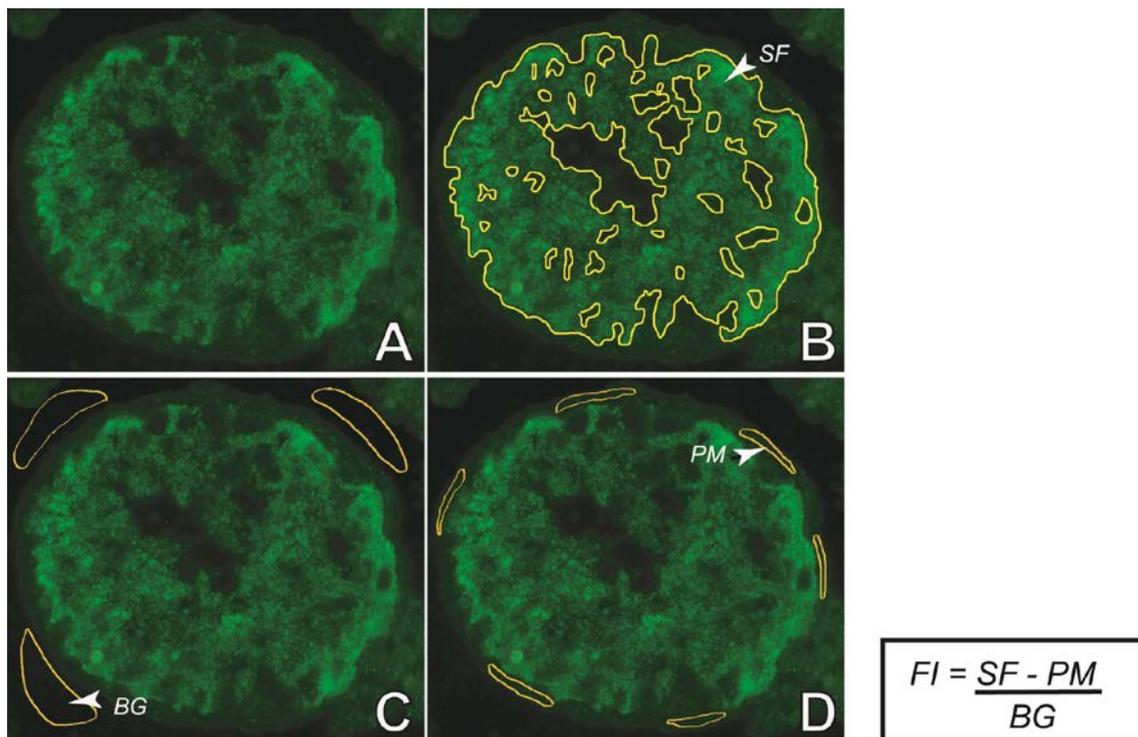


Figura 2. Análise de intensidade de fluorescência para as proteínas GDNF e KITLG expressas no citoplasma das células de Sertoli. **A**, foto original da fluorescência; **B**, secção transversal de túbulo seminífero excluindo-se áreas de núcleos de Sertoli e de células germinativas, citoplasma de células germinativas e áreas de vacúolos ou de lume; **C**, total de background e **D**, fluorescência das células peritubulares mióides.

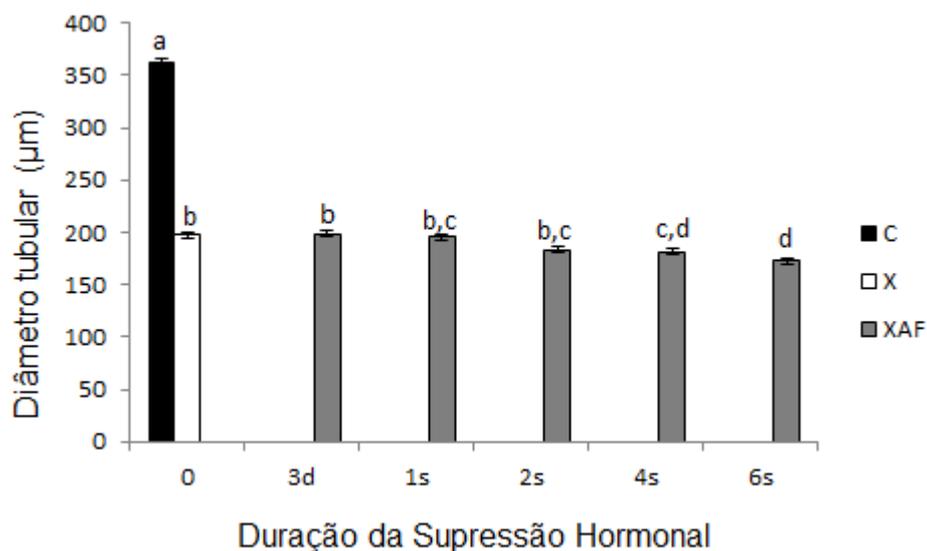


Figura 3. Diâmetro tubular dos grupos controle (C), irradiados (X) e tratados com *Acyline* + flutamida (XAF) durante 3 dias, 1, 2, 4 e 6 semanas. Os valores estão representados como média \pm erro padrão da média. Letras diferentes significam $p < 0,05$.

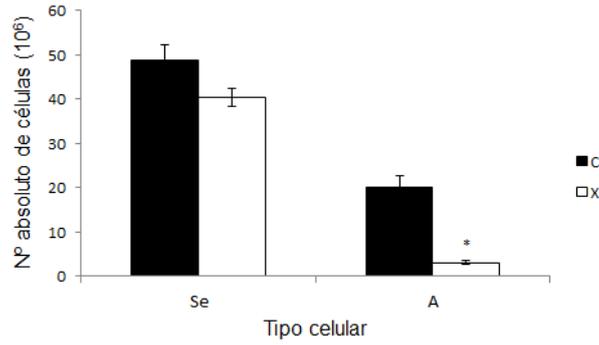


Figura 4. Número absoluto de células de Sertoli (Se) e espermatogônias tipo A (A) em animais controle (C) e irradiados (X). Os valores estão representados como média ± erro padrão da média. Asterisco significa $p < 0,05$.

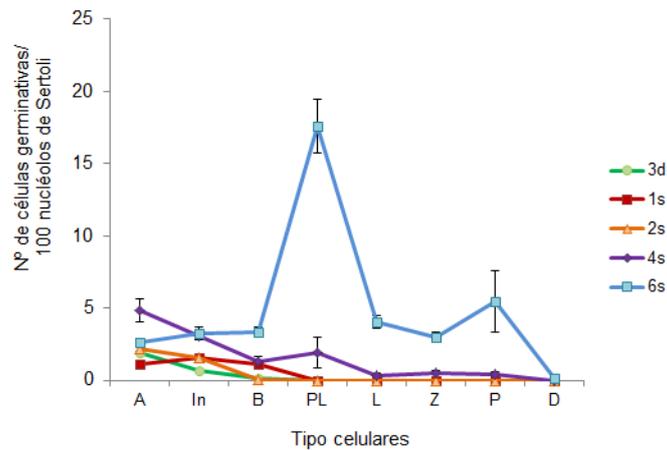


Figura 5. Comparação do número de células germinativas por 100 nucléolos de células de Sertoli nos animais tratados com *Acyline* + flutamida durante 3 dias, 1, 2, 4 e 6 semanas. Os valores estão representados como média ± erro padrão da media. A, espermatogônia tipo A; In, espermatogônia tipo intermediária; B, espermatogônia tipo B; PL, espermatócito em pré-leptóteno; L, leptóteno; Z, zigóteno; P, paquíteno e D, diplóteno.

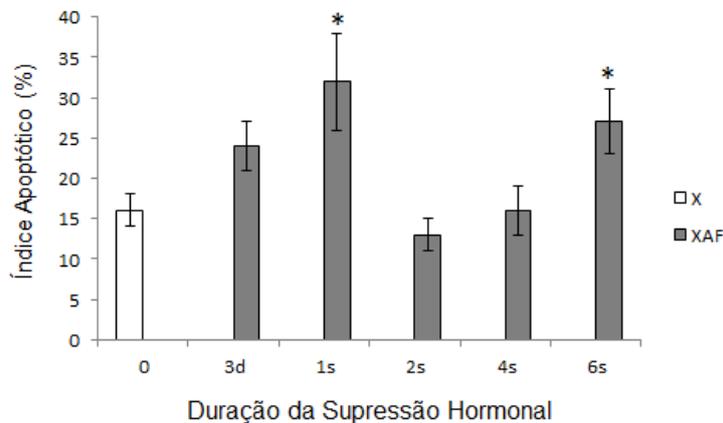


Figura 6. Índice apoptótico nos animais irradiados (X) e tratados com *Acyline* + flutamida (XAF). Os valores estão representados como média ± erro padrão da média. Asterisco significa $p < 0,05$, comparando-se X e XAF.

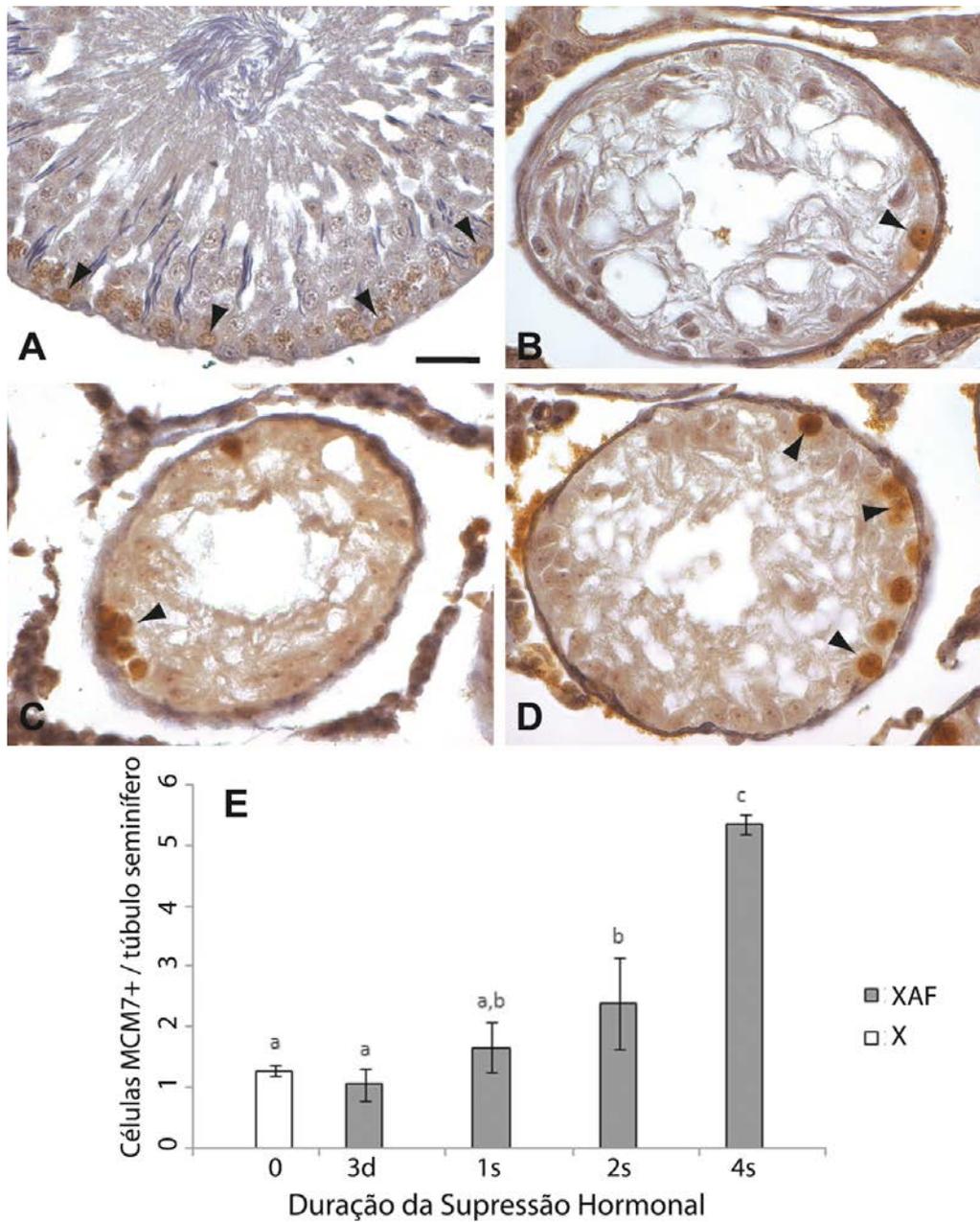


Figura 7. A-D: Imunohistoquímica para o marcador de proliferação celular MCM7 em corte transversal de túbulos seminíferos em animais controle (A), irradiados (B) e tratados com *Acylone* + flutamida durante 2 e 4 semanas (C,D). Cabeças de setas = células MCM7 positivas. Barra = 26 μ m, **E:** Número de células MCM7 positivas por corte transversal de túbulo seminífero nos animais irradiados (X) e após tratamento com *Acylone* + flutamida (XAF). Os valores estão representados como média \pm erro padrão da média. Letras diferentes significam $p < 0,05$.

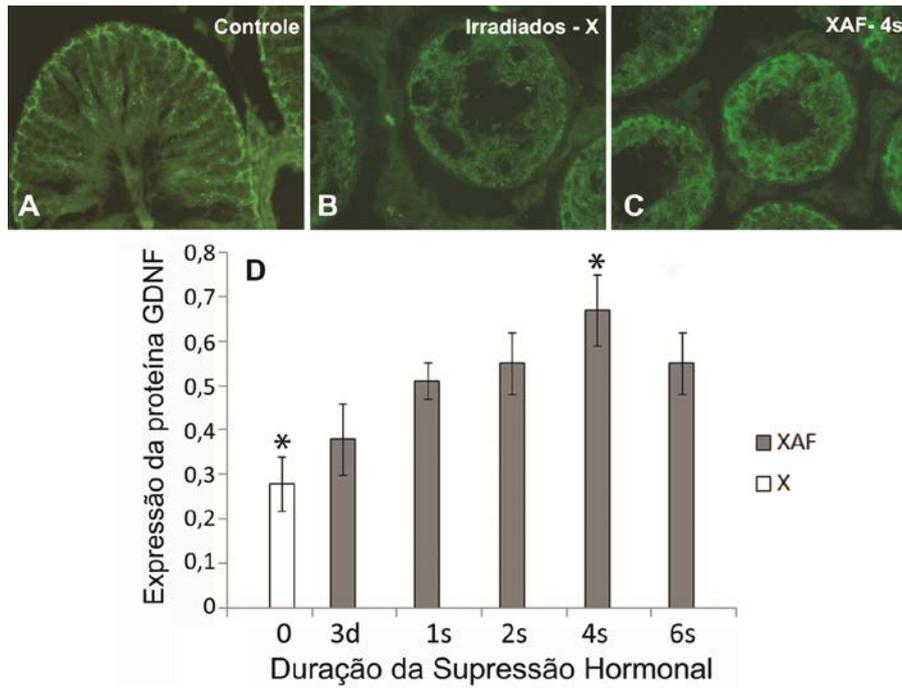


Figura 8. A-C: Imunofluorescência para a proteína GDNF em corte transversal de túbulos seminíferos em animais controle (A), irradiados (B) e tratados com *Acyline* + flutamida (C), **D:** Quantificação da expressão da proteína GDNF por secção transversal de túbulo seminífero em animais irradiados (X) e durante a supressão hormonal com *Acyline* + flutamida (XAF). Os valores estão representados como média de intensidade de pixels \pm erro padrão da média. Asterisco significa $p < 0,05$ entre X e XAF.

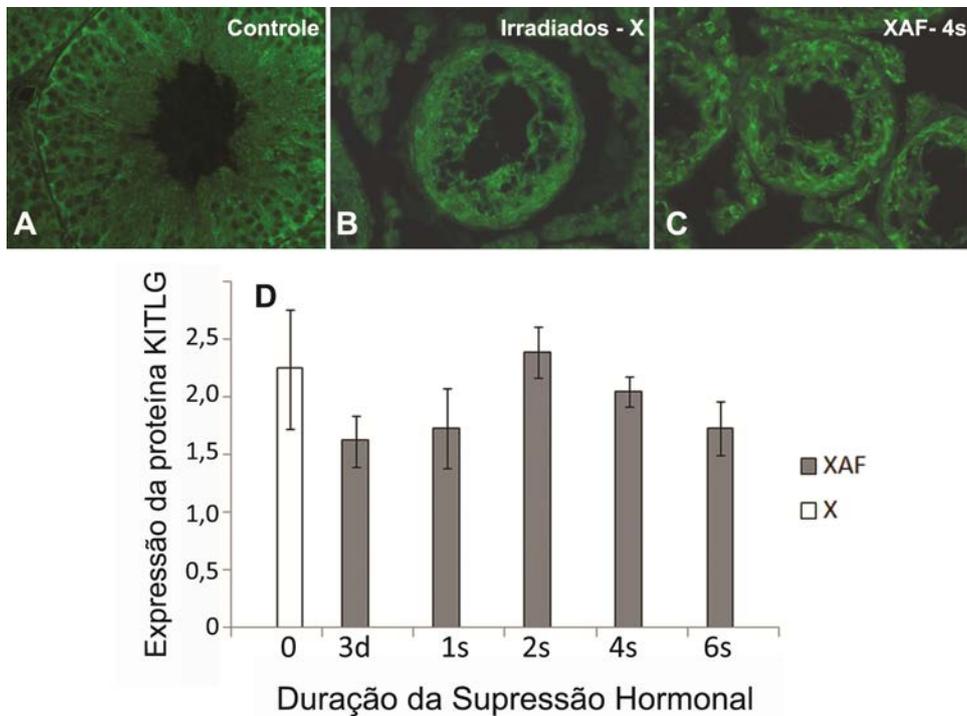


Figura 9. A-C: Imunofluorescência para a proteína KITLG em corte transversal de túbulos seminíferos em animais controle (A), irradiados (B) e tratados com *Acyline* + flutamida (C), **D:** Quantificação da expressão da proteína KITLG por secção transversal de túbulo seminífero em animais irradiados (X) e durante a supressão hormonal com *Acyline* + flutamida (XAF). Os valores estão representados como média de intensidade de pixels \pm erro padrão da média.

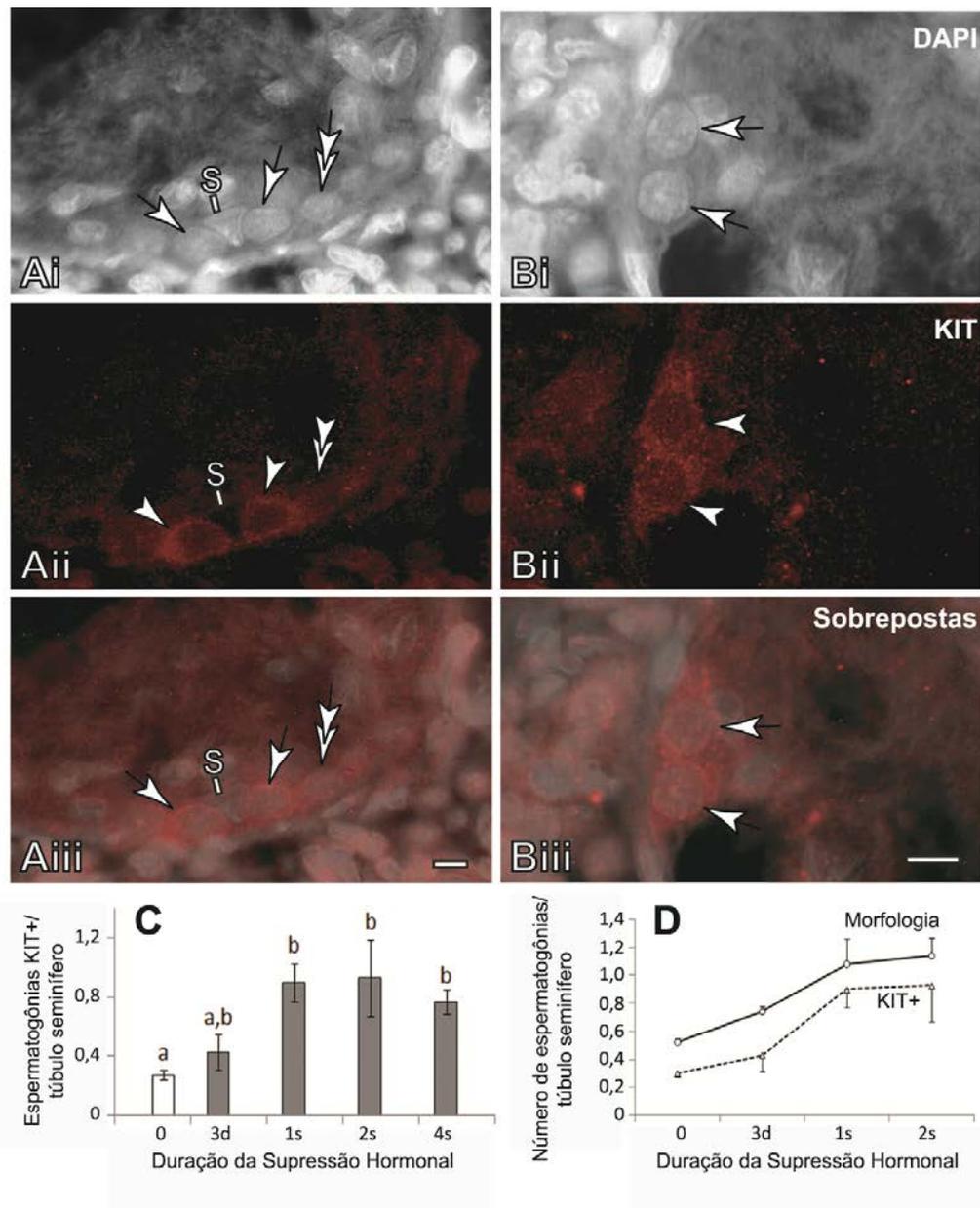


Figura 10. A e B, Imunofluorescência de túbulos seminíferos de animais apenas irradiados, evidenciando espermatogônias KIT positivas (setas), negativas (setas duplas) e células de Sertoli (S). Barra = 10 μ m, **C**: Número de células KIT positivas em corte transversal de túbulos seminíferos de animais, irradiados (barra branca) e ao longo da supressão hormonal com *Acyline* + flutamida (barra cinza). Os valores estão representados como média \pm erro padrão da média. Letras diferentes significam $p < 0,05$, **D**: Comparação entre o número total de espermatogônias KIT positivas por corte transversal de túbulos seminíferos e o total de espermatogônias identificadas morfologicamente.

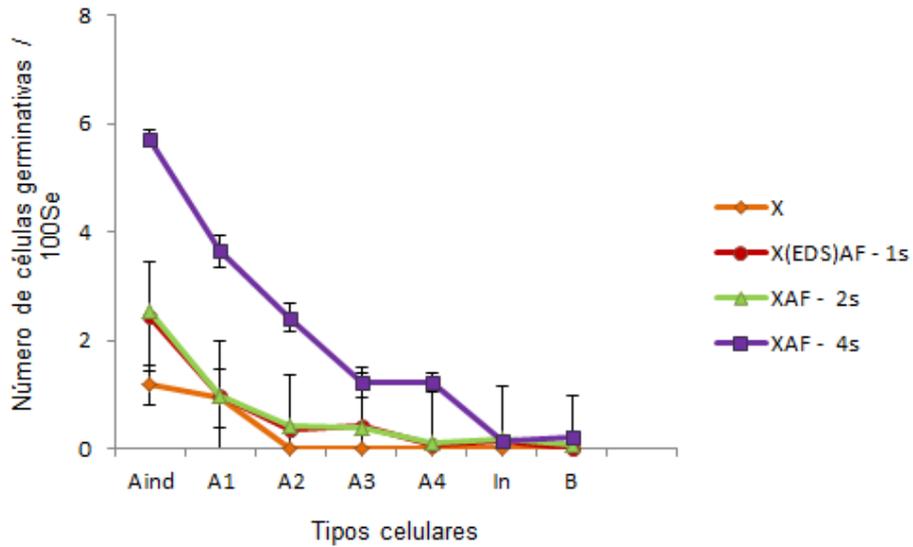


Figura 11. Número de espermatogônias por 100 núcleos de células de Sertoli em ratos irradiados (X) e mediante supressão hormonal com *Acyline* + flutamida (XAF) ou combinado com EDS (X(EDS)AF). Os valores estão representados como média \pm erro padrão da média. Aind, espermatogônia do tipo indiferenciada; A1-A4, espermatogônias diferenciadas do tipo A; In, espermatogônias do tipo intermediárias; B, espermatogônias do tipo B.

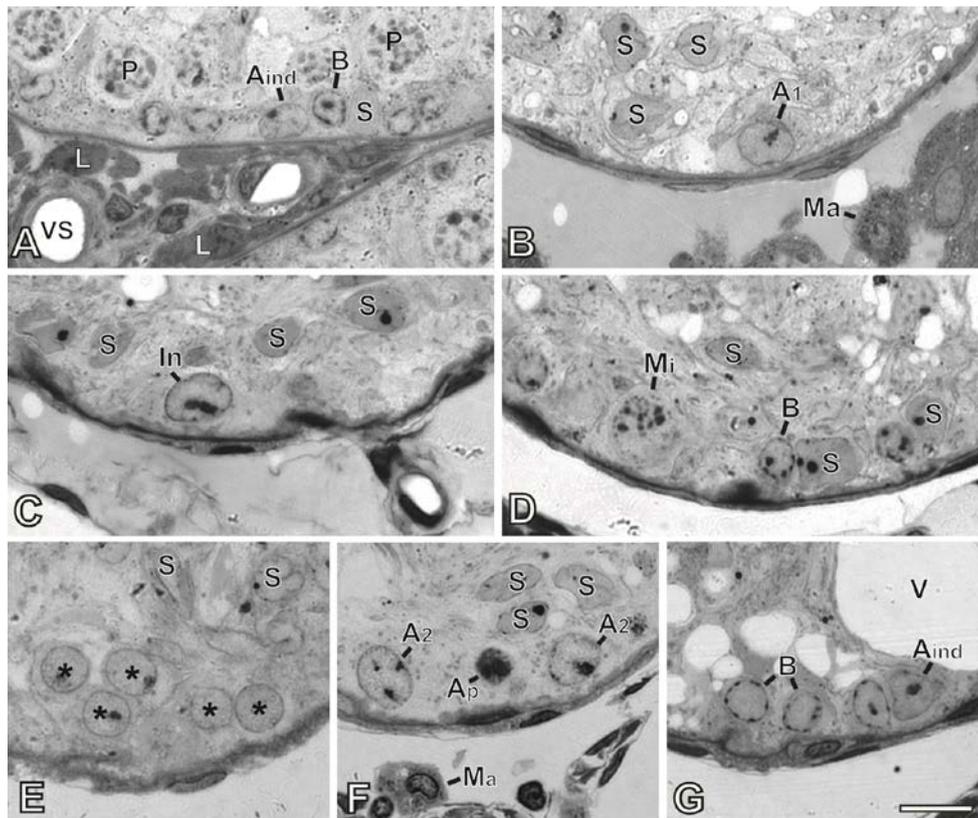


Figura 12. Micrografias de luz de alta resolução de espermatogônias em animais controle (A) e após a irradiação (B), na qual a célula mais avançada é a espermatogônia do tipo A₁. Após a irradiação seguida de supressão hormonal, com EDS (C, 1s) ou sem EDS (D, 2s), as células germinativas mais avançadas foram as espermatogônias do tipo intermediárias e B, respectivamente. Depois de 4 semanas, clones de espermatogônias do tipo A_{ai} foram frequentes (E, asteriscos) e todos os tipos subsequentes de espermatogônias foram vistos até a mais avançada tipo B (F, G). Aind, espermatogônia indiferenciada;

A₁, A₂, espermatogônias do tipo diferenciadas; In, espermatogônias do tipo intermediária; Ap, apoptose, B, espermatogônias do tipo B, P, espermatócito primário em paquíteno; S, células de Sertoli, L, células de Leydig; Ma, macrófagos; VS, vaso sanguíneo, V, vacúolo. Barra: 13µm.

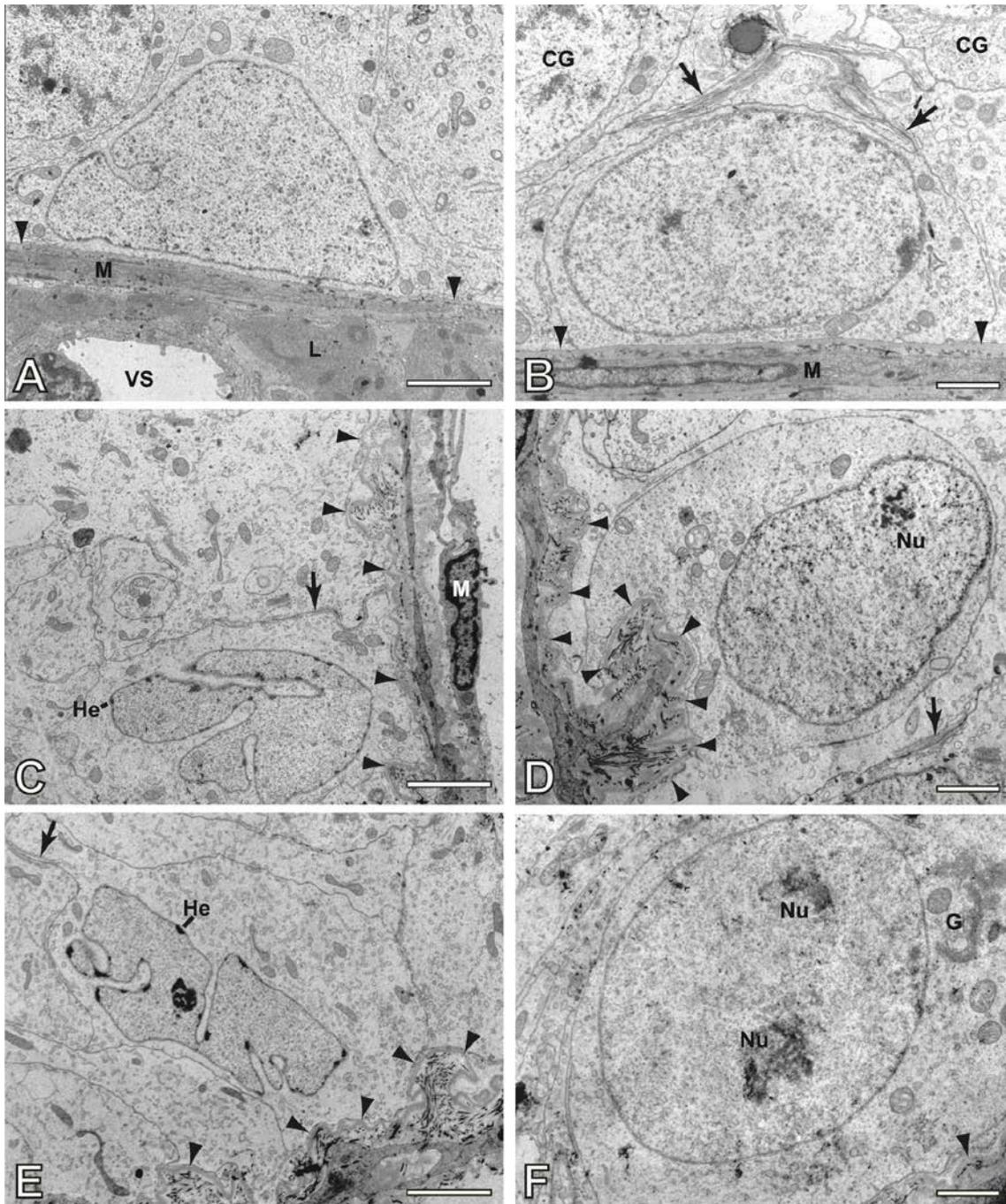


Figura 13. Eletromicrografias de células de Sertoli (A, C, E) e espermatogônias (B, D, F), em animais controle (A, B) e, após 1 (C, D) e 4 semanas de supressão hormonal com *Acylone* + flutamida (E, F). Após irradiação os núcleos de células de Sertoli apresentaram-se muito irregulares e com pequenas manchas de heterocromatina aderidas ao envelope nuclear (He). Espermatogônias mais diferenciadas foram vistas com o avanço da supressão hormonal. Em B, espermatogônias do tipo Aa1, em D, espermatogônias do tipo A1 e em F, espermatogônias do tipo A2. Após a irradiação, observou-se uma dobra da lâmina basal para o interior do epitélio seminífero, resultando em uma depressão no citoplasma das espermatogônias (D). CG, células germinativas; M, célula peritubular mióide; VS, vaso sanguíneo; L, célula de Leydig; Nu, nucléolo; G, aparelho de Golgi; seta, barreira Sertoli-Sertoli e cabeças de seta, membrana basal. Barras: A, C, E: 3µm, B, D, F: 1,5µm

FIGURA SUPLEMENTAR

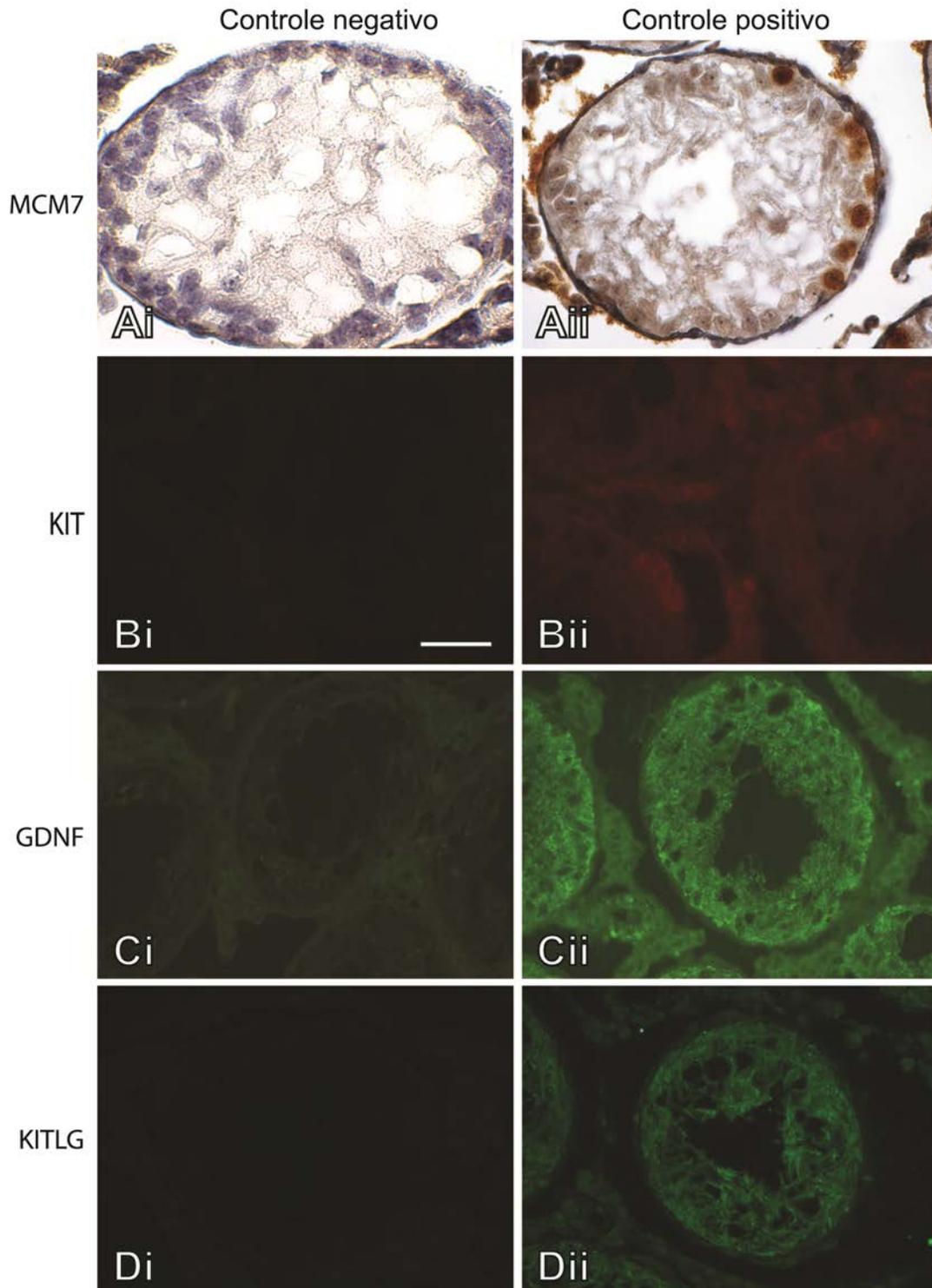


Figura Suplementar - Comparação entre controle negativos (Ai-Di), sem adição de anticorpos primários e positivos (Aii-Dii) para as reações de imunohistoquímica e imunofluorescência em animais apenas irradiados, utilizando diferentes anticorpos. Todos os pares de imagens foram obtidas em paralelo de seções controle e imunomarcadas e fotografadas sob as mesmas condições de intensidade de exposição. A: imunohistoquímica para anti-MCM7 e contracoloração com hematoxilina; B: anti-KIT + anticorpo secundário alexa fluor 594; C: anti-GDNF e D: anti- KITLG + anticorpo secundário alexa fluor 488.

8. TABELAS

Tabela 1. Peso corporal e testicular durante a supressão hormonal.

Grupos	Peso Corporal (g)	Peso Testicular (g)
C	408 ± 10 ^a	1,88 ± 0,03 ^a
X	424 ± 08 ^a	0,56 ± 0,02 ^b
XAF- 3d	400 ± 09 ^a	0,53 ± 0,03 ^b
XAF – 1s	376 ± 12 ^a	0,46 ± 0,01 ^b
XAF – 2s	375 ± 20 ^a	0,41 ± 0,02 ^c
XAF – 4s	385 ± 07 ^a	0,37 ± 0,01 ^c
XAF – 6s	415 ± 14 ^a	0,34 ± 0,01 ^c

Peso corporal e testicular nos animais controle (C, n=5); irradiados (X, n=6) e tratados com *Acyline* + flutamida, n=4 para cada tempo de tratamento. Os valores estão representados como média ± erro padrão da media. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Tabela 2. Número de células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero

Grupos	Total gônias	PL	L	Z	P	D
C	2.98 ± 0.01 ^a	2.06 ± 0.01 ^a	2.41 ± 0.01 ^a	2.08 ± 0.35 ^a	11.72 ± 0.51 ^a	1.81 ± 0.84 ^a
X	0.16 ± 0.02 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
XAF- 3d	0.23 ± 0.01 ^{b,c}	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
XAF- 1s	0.33 ± 0.05 ^{b,c}	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
XAF- 2s	0.35 ± 0.04 ^c	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
XAF- 4s	0.93 ± 0.13 ^d	0.20 ± 0.10 ^b	0.03 ± 0.02 ^b	0.05 ± 0.01 ^b	0.04 ± 0.02 ^b	0 ^b
XAF- 6s	0.95 ± 0.09 ^d	1.78 ± 0.16 ^c	0.41 ± 0.03 ^c	0.31 ± 0.04 ^b	0.53 ± 0.19 ^b	0.01 ± 0.01 ^b

Animais controle (C, n=5); irradiados (X, n=6) e tratados com *Acyline* + flutamida, n=4 para cada tempo de tratamento. Os valores estão representados como média ± erro padrão da media. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Total de gônias = espermatogônias tipo A + espermatogônias tipo intermediária + espermatogônias tipo B + mitose espermatogonial; PL, espermatócito em pré-leptóteno; L, leptóteno; Z, zigóteno; P, paquíteno; D, diplóteno.

Tabela 3. Cinética espermatogonial após irradiação e mediante supressão hormonal

Grupos	A _{ind}	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	In	B
C	10,19 ± 0,15 ^a	1,60 ± 0,45 ^a	3,38 ± 0,61 ^a	3,65 ± 0,56 ^a	4,65 ± 0,51 ^a	8,28 ± 0,86 ^a	20,12 ± 2,67 ^a
X	0,92 ± 0,32 ^b	0,24 ± 0,07 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
X(EDS)AF – 1s	1,91 ± 0,34 ^b	0,77 ± 0,06 ^{a,b}	0,27 ± 0,03 ^{b,c}	0,35 ± 0,16 ^b	0,11 ± 0,06 ^b	0,14 ± 0,12 ^b	0 ^b
XAF – 2s	2,02 ± 0,32 ^b	0,75 ± 0,01 ^{a,b}	0,32 ± 0,08 ^{b,c}	0,26 ± 0,05 ^b	0,08 ± 0,06 ^b	0,27 ± 0,22 ^b	0,09 ± 0,08 ^b
XAF – 4s	4,50 ± 0,11 ^c	2,87 ± 0,25 ^c	1,74 ± 0,12 ^c	0,99 ± 0,23 ^b	0,92 ± 0,16 ^b	0,07 ± 0,03 ^b	0,22 ± 0,09 ^b

Número de espermatogônias por 100 nucléolos de células de Sertoli em animais controle (C), irradiados (X), após diferentes tempos de supressão hormonal com *Acyline* + flutamida (XAF) e com adição de EDS (X(EDS)AF). Os valores estão representados como média ± erro padrão da média. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). A_{und}, espermatogônia do tipo A indiferenciada; A₁-A₄, espermatogônias do tipo A diferenciadas; In, espermatogônias do tipo intermediária e B, espermatogônia do tipo B.

9. DISCUSSÃO

Diversos estudos foram desenvolvidos ao longo dos anos para se investigar os mecanismos envolvidos no bloqueio da espermatogênese após irradiação ou quimioterapia e de que forma os tratamentos com análogos da GnRH podem restaurar a fertilidade, reativando a espermatogênese. Dentre os diferentes estudos utilizando ratos como modelo experimental, o conceito mais amplamente difundido é que após a irradiação ou outros tratamentos citotóxicos, a testosterona e o FSH (hormônio folículo estimulante) possuem um papel inibitório na diferenciação espermatogonial (revisão em Meistrich & Shetty, 2003; Shetty *et al*, 2006). Recentemente, Zhou e colaboradores (2010) utilizando ratos irradiados e seguidos de tratamento hormonal, demonstraram que, embora estes hormônios sejam responsáveis pelo bloqueio da diferenciação espermatogonial, eles na verdade produzem grandes modificações na expressão gênica das células somáticas, possivelmente as responsáveis por oferecer o suporte necessário para o reestabelecimento da espermatogênese normal. Embora este assunto venha sendo exaustivamente estudado, algumas questões sobre a cinética espermatogonial após irradiação seguida por supressão hormonal, e sua correlação com eventos moleculares não foram totalmente respondidas até agora. Devido ao fato dos ratos LBNF1 possuírem sensibilidade à irradiação semelhante ao homem e serem incapazes de recuperar a espermatogênese após insultos citotóxicos, eles são considerados um bom modelo experimental para se estudar a regulação da diferenciação espermatogonial (Kanasmiemi *et al*, 1996a).

Estudo anterior, utilizando ratos LBNF1 demonstrou que após a irradiação a proliferação espermatogonial só avançou até as espermatogônias indiferenciadas do tipo A_{al} e que o processo de diferenciação de A_{al} para A_1 encontrava-se bloqueado (Kangasniemi *et al*, 1996b). Entretanto, em nosso estudo, utilizando a técnica de microscopia de luz de alta resolução, que possibilita a identificação de cada subtipo espermatogonial através de sua morfologia, foi possível reconhecer algumas espermatogônias do tipo A_1 , confirmadas molecularmente pela presença de células KIT positivas em túbulos seminíferos de animais irradiados e sem qualquer supressão hormonal. Esta descoberta demonstra que o bloqueio na diferenciação espermatogonial na verdade não ocorre exclusivamente durante a diferenciação de A_{al} para A_1 , e que algumas espermatogônias conseguem transpor esse bloqueio e se

diferenciar. Entretanto as espermatogônias do tipo A₁ foram as mais avançadas encontradas em animais apenas irradiados, mesmo 16 semanas após a irradiação, confirmando a permanência do bloqueio.

Conforme mencionado anteriormente, a testosterona parece ser o principal hormônio responsável pelo bloqueio da diferenciação espermatogonial, embora o hormônio FSH também possua efeito inibitório, mas em menor proporção (Shetty *et al*, 2006). Além disso, sabe-se que outros andrógenos administrados exogenamente foram também inibidores da diferenciação (Shetty *et al*, 2002) e que o efeito da testosterona foi quase completamente invertido ao se administrar o antiandrógeno não esteróide flutamida (Shetty *et al*, 2000). Além da flutamida, no presente estudo, foi utilizada a droga EDS (sulfonato dimetano-etano) que reduz principalmente qualquer resquício de testosterona intratesticular para níveis não detectáveis por eliminar especificamente as células de Leydig. Utilizando o método de microscopia de luz de alta resolução para acompanhar a cinética espermatogonial, observou-se que a adição de EDS ao tratamento *Acyline* + flutamida antecipou em uma semana a diferenciação espermatogonial quando comparada ao tratamento sem EDS. Entretanto, outro estudo utilizando a mesma dose de EDS demonstrou que a morte das células de Leydig inibiu a diferenciação espermatogonial, mesmo após estimulação da mesma com tratamento semelhante à *Acyline* (Richburg *et al*, 2002). Embora esses resultados pareçam contraditórios, os resultados aqui apresentados demonstram claramente que as células de Leydig não são necessárias para a diferenciação espermatogonial após a irradiação e mediante supressão hormonal. Talvez as células de Leydig produzam fatores que são eliminados após tratamento com EDS, mas que não são eliminados após tratamento com GnRH antagonista, entretanto futuros estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

As células de Sertoli são células somáticas que fazem parte do epitélio seminífero e são tidas como possíveis candidatas a participar diretamente do bloqueio da diferenciação das espermatogônias devido principalmente às interações autócrinas e parácrinas entre essas células. Por esse motivo, a expressão de duas proteínas sintetizadas pelas células de Sertoli e que estão intimamente relacionadas com a proliferação das espermatogônias indiferenciadas e diferenciadas, GDNF (fator neurotrófico derivado de células da glia) e KITLG (proteína ligante tirosina quinase) respectivamente, foram analisadas no presente estudo. Baseada na intensidade de fluorescência emitida pelo citoplasma das células de Sertoli foi possível quantificar o nível de expressão dessas proteínas. De acordo com nossos resultados, os níveis da proteína KITLG não foram alterados ao longo da supressão hormonal, confirmando

estudos anteriores que demonstraram que nem a irradiação (J. Lee & Boekelheide, dados não publicados) e nem a testosterona (Yan *et al*, 1990) exerceram influência sobre os níveis da isoforma solúvel de RNAm do KITLG. A expressão de KITLG pelas células de Sertoli (Manova *et al*, 1993) é um pré-requisito para manutenção de espermatogônias diferenciadas, ou seja, que expressam o receptor de KITLG, chamado KIT (Manova *et al*, 1990) e pode ser expresso sob a isoforma solúvel ou sob a isoforma ligada à membrana (Majumdar *et al.*, 1994). De acordo com nossos dados, os níveis da porção solúvel (sintetizada no citoplasma da célula de Sertoli) não foram alterados durante a supressão hormonal. Em contraste com os nossos resultados, Blanchard e colaboradores (1998), demonstraram que os ratos submetidos à atrofia testicular após tratamento com hexanodiona e posteriormente tratados com GnRH antagonista resultou num aumento da expressão da isoforma ligada à membrana do KITLG. Por outro lado, utilizando-se ratos mutantes e que não expressam a isoforma ligada à membrana de KITLG, mas que receberam transplante de espermatogônias KIT negativas, tiveram a proliferação e sobrevivências dessas espermatogônias estimuladas pelo tratamento com análogo de GnRH (Ohmura *et al*, 2003). No entanto, esta última observação não exclui a possibilidade de que a supressão de testosterona, como acontece no nosso modelo experimental de supressão hormonal, também possa agir sobre as espermatogônias mais avançadas, ou seja KIT positivas. De fato, o número de células KIT positivas foi aumentando progressivamente após uma semana de supressão hormonal, mas devido ao fato dos níveis de KITLG não terem sido alterados, nós podemos presumir que o KITLG não participa efetivamente do bloqueio na diferenciação espermatogonial após irradiação, através da sinalização KITLG-KIT.

De acordo com nossos resultados, os níveis de GDNF permaneceram constantes quando os dois tempos dos animais apenas irradiados foram comparados entre si. Entretanto, Tadokoro e colaboradores em 2002, utilizando camundongo como modelo experimental, afirmam um aumento no nível de expressão de GDNF nas células de Sertoli após completa destruição das células germinativas. Em nosso modelo experimental, utilizamos uma linhagem específica de ratos (LBNF1), devido à semelhança de sua sensibilidade à irradiação com a sensibilidade humana. Talvez essa diferença na sensibilidade seja também um reflexo de como as células de Sertoli dos ratos LBNF1 respondem de formas diferentes após insultos citotóxicos daquelas células de Sertoli em camundongos.

Embora os níveis de GDNF tenham permanecidos inalterados nos animais apenas irradiados, foi observado um aumento significativo dos níveis de GDNF após 4 semanas de supressão hormonal. Esse aumento na expressão coincide com os dados

morfológicos de aumento no número de espermatogônias indiferenciadas (A_{ind}) (**Tab. 2**). O GDNF regula positivamente a proliferação das A_{ind} e negativamente as diferenciadas (Meng *et al*, 2000; Tadokoro *et al*, 2002). Após 4 semanas de supressão hormonal, a expressão do GDNF é aumentada, resultando num *pool* de A_{ind} , provavelmente para restaurar o número de espermatogônias tronco que foi perdido após a irradiação, embora esse aumento não tenha sido suficiente para alcançar os valores dos animais controle. Conforme esperado, o número de espermatogônias A_1 - A_4 , In e B foi drasticamente diminuído após a irradiação e mesmo 2 semanas após a supressão hormonal, seus números não se recuperaram o suficiente para se equiparar aos valores controle. Nossos resultados vão de acordo com estudos anteriores que afirmam que as espermatogônias diferenciadas por proliferarem mais ativamente são os tipos celulares mais susceptíveis à irradiação (Dym & Clermont, 1970; Lu & Meistrich, 1979; Kangasniemi *et al*, 1990). Surpreendentemente o número de espermatogônia A_1 excedeu o número controle após 4 semanas de supressão hormonal, indicando alta taxa de diferenciação, provavelmente em detrimento do alto estoque de A_{ind} nesse mesmo tempo de tratamento. Uma vez que o GDNF regula negativamente a diferenciação espermatogonial, mas foi observado que a sua expressão foi elevada justamente após 4 semanas de supressão podemos presumir que a sinalização GDNF não foi a responsável direta pelo desbloqueio da diferenciação.

A presença de espermatogônias A_{ind} saudáveis é a fonte da recuperação da espermatogênese após irradiação. Em células de mamíferos, a proteína MCM7 (*Minichromosome Maintenance Protein 7*) é uma das seis subunidades do complexo de proteínas MCM que exerce um papel chave durante a replicação do DNA cromossomal (Pacek & Walter, 2004). De acordo com o padrão de expressão da proteína MCM7 nas espermatogônias, alguns autores acreditam que a mesma contribua para a integridade do genoma (revisão em Kleene, 2001; Pacek & Walter, 2004; Bailis & Forsburg, 2004), evitando assim transcrições inapropriadas. Durante a irradiação, o DNA das espermatogônias está muito vulnerável a danos, por isso tornou-se essencial se certificar de que a recuperação da espermatogênese após a irradiação estaria ocorrendo de forma saudável. Nos animais controle, encontramos o mesmo padrão de coloração para a proteína MCM7 em cortes transversais de túbulos seminíferos descrito por Com e colaboradores (2006). Os animais que foram apenas irradiados nos dois tempos analisados não apresentaram quaisquer diferenças no número total de células MCM7+, coincidindo com os resultados de microscopia de luz do presente estudo e de estudo anterior (Meistrich & Shetty, 2003), comprovando

ausência de recuperação da espermatogênese sem supressão hormonal. Após irradiação seguida por supressão hormonal nossos resultados também confirmam que as espermatogônias A_{ind} e remanescentes são aparentemente saudáveis e capazes de se diferenciar após a supressão hormonal uma vez que todas as células germinativas foram MCM7+. Esses dados juntos coincidem com estudo anterior que demonstraram que o bloqueio na diferenciação espermatogonial após a irradiação é devido a um dano causado ao compartimento somático (células de Sertoli, Leydig e células peritubulares mióides) e não diretamente sobre as células germinativas (Zang *et al*, 2007).

Para se assegurar que o número de células de Sertoli não foi modificado após a irradiação ou durante o tratamento, determinou-se o número absoluto dessas células nos testículos dos animais controle e apenas irradiados ou o número de células de Sertoli por corte transversal de túbulo seminífero nos animais tratados. Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores que demonstraram um número constante de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminíferos entre 10-30 semanas após a radiação (Kangasniniemi *et al.*, 1996b) ou após tratamento com *Acyline* (Sinha & Swerdloff, 1993 e Meistrich & Kangasniemi, 1997). Ultraestruturalmente, os núcleos das células de Sertoli apresentaram algumas alterações morfológicas após a irradiação. Apresentaram-se altamente lobulados e com estruturas vacuolares, também descrito em estudos anteriores após raios-X (Hussein *et al*, 2006), ou radiação gama (Topcu-Tarladacalis, 2009). Embora este último estudo também afirme algumas anormalidades nas organelas das células de Sertoli como dilatação das cisternas do retículo endoplasmático liso, inchaço das mitocôndrias e aumento no número e tamanho das gotículas lipídicas, no presente estudo não foram observadas qualquer alteração nas organelas de Sertoli ou das espermatogônias. Embora o tipo de radiação utilizado tenha sido o mesmo que o nosso modelo (irradiação com raios gama), o trabalho de Topcu-Tarladacalis (2009) utilizou uma dose mais elevada e uma linhagem diferente de rato. Entretanto foi observado que após a irradiação e ao longo do tratamento, a lâmina basal projetou-se para o interior do epitélio seminífero empurrando a membrana celular espermatogonial para o seu interior, formando uma invaginação. Embora estudo anterior não tenha observado qualquer alteração ultraestrutural nas espermatogônias após a irradiação seguida de supressão hormonal (Shuttlesworth *et al*, 2000), o efeito desta invaginação da lâmina basal nas espermatogônias não foi até o momento descrito.

Em relação ao peso dos testículos, observou-se uma redução significativa após o tratamento, mesmo com a recuperação progressiva da espermatogênese. Esse

resultado condiz com estudos anteriores que afirmam que as injeções semanais de *Acyline* em ratos irradiados induziram uma redução significativa no peso testicular (Porter *et al*, 2006; Shuttlesworth *et al*, 2000). Essa diminuição no peso dos testículos pode ser atribuída tanto à diminuição de edema do compartimento tubular quanto do compartimento intersticial (Meistrich *et al*, 2001). Estes resultados também coincidem com os dados de diâmetro tubular que demonstraram uma diminuição progressiva do diâmetro, mesmo após 6 semanas de supressão hormonal e com intensa proliferação de células germinativas.

10. CONCLUSÃO

Utilizando a técnica de microscopia de luz de alta resolução, os resultados demonstraram que surpreendentemente algumas espermatogônias indiferenciadas do tipo A_{al} após a irradiação, podem sim transpor o bloqueio e se diferenciar em A_1 , mesmo na ausência de supressão hormonal;

Os níveis de da proteína GDNF aumentam consideravelmente após 4 semanas de supressão hormonal, aumentando conseqüentemente a taxa de proliferação de espermatogônias A_{ind} , repondo o estoque de células-tronco que foi perdido após a irradiação;

A morte das células de Leydig pelo EDS antecipou em uma semana a diferenciação espermatogonial, demonstrando a interferência direta dessas células somáticas sobre o bloqueio das células germinativas, provavelmente através de um mecanismo ainda desconhecido;

Ainda durante as 4 semanas de supressão hormonal a taxa de diferenciação de A_{ind} para A_1 atingiu o seu ápice, excluindo a influência do GDNF sobre o bloqueio da diferenciação espermatogonial após irradiação;

As espermatogônias remanescentes após a irradiação são aparentemente saudáveis, ativas por expressarem a proteína MCM7 e capazes de recuperar a espermatogênese, logo o dano da irradiação não é diretamente sobre as células germinativas;

O número das células de Sertoli e os níveis de expressão da proteína KITLG permanecem completamente durante a supressão da testosterona, excluindo a participação direta dessa proteína na diferenciação espermatogonial;

A presença de espermatogônias KIT positivas e do seu ligante, a proteína KITLG em animais apenas irradiados sem supressão hormonal, sugere que deficiências no sistema KIT-KITLG não estão envolvidas diretamente do bloqueio da diferenciação espermatogonial após a irradiação.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anatomical Record* 94 39-47, 1946.

Bailis JM, Forsburg SL. MCM proteins: DNA damage, mutagenesis and repair. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14(1), 17-21, 2004.

Bartlett JMS, Kerr JB & Sharpe RM. The effect of selective destruction and regeneration of rat Leydig cells on the intratesticular distribution of testosterone and morphology of the seminiferous epithelium. *Journal of Andrology* 7(4) 240-253, 1986.

Bhasin S, Berman N, Swerdloff RS. Follicle-stimulating hormone (FSH) escape during chronic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist and testosterone treatment. *Journal of Andrology* 15(5): 386–391, 1994.

Blanchard KT, Lee J, Boekelheide K. Leuprolide, a gonadotropin-releasing hormone agonist, reestablishes spermatogenesis after 2,5-hexanedione-induced irreversible testicular injury in the rat, resulting in normalized stem cell factor expression. *Endocrinology* 139(1): 236-244, 1998.

Boekelheide K, Schoenfeld H, Hall SJ, Weng CCY, Shetty G, Leith J, Harper J, Sigman M, Hess DL, Meistrich ML. Gonadotropin-releasing hormone antagonist (Cetrorelix) therapy fails to protect nonhuman primates (*Macaca arctoides*) from radiation-induced spermatogenic failure. *Journal of Andrology* 26(2): 222-34, 2005.

Brennemann W, Brensing KA, Leipner N, Boldt I, Klingmuller D. Attempted protection of spermatogenesis from irradiation in patients with seminoma by D-Tryptophan-6 luteinizing hormone releasing hormone. *Clinical Investigation* 72(11): 838-42, 1994.

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

Chiarini-Garcia H, Freitas DA, Barbosa IS, Almeida FRLC. Evaluation of the seminiferous epithelial cycle, spermatogonial kinetics and niche in donkeys (*Equus asinus*). *Animal Reproduction Science* 116(1-2): 139-54, 2009.

Chiarini-Garcia H, Meistrich ML. High-resolution light microscopic characterization of spermatogonia. *Methods in Molecular Biology* 450: 95-107, 2008.

Chiarini-Garcia H, Raymer AM, Russel LD. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction*, 126(5): 669-80, 2003.

Chiarini-Garcia H, Russel LD. Characterization of mouse spermatogonia by transmission electron microscopy. *Reproduction*, 123(4): 567-577, 2002.

Chiarini-Garcia H, Russell LD. High-resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biology of Reproduction* 65(4): 1170-8, 2001.

Clermont Y, Antar M. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and the spermatogonial renewal in the monkey *Macaca arctoides*. *American Journal of Anatomy* 136(2):153-65, 1973.

Clermont Y. Spermatogenesis in man. A study of the spermatogonial population. *Fertility and Sterility* 17(6):705-21, 1966.

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. *Molecular Reproduction and Development* 73(7): 866-77, 2006.

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

Delic JI, Bush C, Peckham MJ. Protection from procarbazine-induced damage of spermatogenesis in the rat by androgen. *Cancer Research* 46(4 Pt 2): 1909-14, 1986.

de Rooij DG. Stem cells in the testis. *International Journal of Experimental Pathology* 79(2): 67-80, 1998.

de Rooij DG, Grootegoed JA. Spermatogonial stem cells. *Current Opinion in Cell Biology* 10(6):694-701, 1998.

de Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of Andrology* 21(6):776-98, 2000.

de Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 121(3):347-54, 2001.

Dym M, Clermont Y. Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following x-irradiation of the rat testis. *American Journal of Anatomy* 128(3): 265–82, 1970.

Fossa SD, Klepp O, Norman N. Lack of gonadal protection by medroxyprogesterone acetate-induced transient medical castration during chemotherapy for testicular cancer. *British Journal of Urology* 62(5): 449-53, 1988.

Hussein M, Abu-Dief EE, Abou El-Ghait AT, Adly MA, Abdelraheem MH. Morphological evaluation of the radioprotective effects of melatonin against X-ray-induced early and acute testis damage in Albino rats: an animal model. *International Journal of Experimental Pathology* 87(3): 237–50, 2006.

Jégou B, Velez de la Calle JF, Bauche F. Protective effect of medroxyprogesterone acetate plus testosterone against radiation-induced damage to the reproductive function of male rats and their offspring. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(19): 8710-4, 1991.

Johnson DH, Linde R, Hainsworth JD, Vale W, Rivier J, Stein R, Flexner J, Welch RV, Greco FA. Effect of a luteinizing hormone releasing hormone agonist given

during combination chemotherapy on posttherapy fertility in male patients with lymphoma: preliminary observations. *Blood* 65(4): 832-6, 1985.

Kamischke A, Kuhlmann M, Weinbauer GF, Luetjens M, Yeung CH, Kronholz HL, Nieschlag E. Gonadal protection from radiation by GnRH antagonist or recombinant human FSH: a controlled trial in a male nonhuman primate (*Macaca fascicularis*). *Journal of Endocrinology* 179(2): 183-94, 2003.

Kangasniemi M, Veromaa TI, Kulmala J, Kaipia A, Parvonen M, Toppari I. DNA-flow cytometry of defined stages of rat seminiferous epithelium: effects of 3 Gv of high-energy X-irradiation. *Journal of Andrology* 11(3): 312-7, 1990.

Kangasniemi M, Dodge K, Pemberton AE, Huhtaniemi M, Meistrich ML. Suppression of mouse spermatogenesis by a gonadotropin-releasing hormone antagonist and antiandrogen: failure to protect against radiation-induced gonadal damage. *Endocrinology* 37(3): 949-55, 1996a.

Kangasniemi M, Huhtaniemi M, Meistrich ML. Failure of spermatogenesis to recover despite the presence of a spermatogonia in the irradiated LBNF1 rat. *Biology of Reproduction* 54(6): 1200-8, 1996b.

Kleene KC. A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells. *Mechanisms of Development* 106(1-2): 3-23, 2001.

Kreuser ED, Hetzel WD, Hautmann R, Pfeiffer EF. Reproductive toxicity with and without LHRHA administration during adjuvant chemotherapy in patients with germ cell tumors. *Hormone and Metabolic Research* 22(9): 494-8, 1990.

Kreuser ED, Kurrle E, Hetzel WD, Heymer B, Porzolt F, Hautmann R, Gaus W, Schlipf U, Pfeiffer EF, Heimpel H. Reversible germ cell toxicity following aggressive chemotherapy in patients with testicular tumors: results of a prospective study. *Wien Klin Wochenschr* 67(7): 367-78, 1989.

Kurdoglu B, Wilson G, Ye WS, Parchuri N, Meistrich ML. Protection from radiation-induced damage to spermatogenesis by hormone treatment. *Radiation Research* 139(1): 97-102, 1994.

Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicologic Pathology* 30(4): 524-33, 2002.

Lu CC, Meistrich ML. Cytotoxic effects of chemotherapeutic drugs on mouse testis cell. *Cancer Research* 39(9): 3575-82, 1979.

Majumdar MK, Fen L, Medlock E, Toksoz D, Williams DA. Identification and mutation of primary and secondary proteolytic cleavage sites in murine stem cell factor cDNA yields biologically active, cell-associated protein. *The Journal of Biological Chemistry* 269(2): 1237-42, 1994.

Manova K, Nocka K, Besmer P, Bachvarova RF. Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development* 110(4):1057-69, 1990.

Manova K, Huang EJ, Angeles M, De Leon V, Sanchez S, Pronovost SM, Besmer P, Bachvarova RF. The expression pattern of the c-kit ligand in gonads of mice supports a role for the c-kit receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia. *Developmental Biology* 157(1):85-99, 1993.

Masala A, Faedda R, Alagna S, Satta A, Chiarelli G, Rovasio PP, Ivaldi R, Taras MS, Lai E, Bartoli E. Use of testosterone to prevent cyclophosphamide-induced azoospermia. *Annals of Internal Medicine* 126(4): 292-5, 1997.

Meistrich ML, Wilson G, Shuttlesworth G, Huhtaniemi, Reissmann T. GnRH agonist and antagonists stimulate recovery of fertility in irradiated LBNF1 rats. *Journal of Andrology* 22(5): 809-17, 2001.

Meistrich ML, Shetty G. Hormonal suppression for fertility preservation in males and females. *Reproduction* 136(6): 691-701, 2008.

Meistrich ML, Vassilopoulou-Sellin R, Lipshultz LI, *em Cancer: Principles and Practice of Oncology*, V.T. DeVita, S. Hellman and S.A. Rosenberg (eds), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2560, 2005.

Meistrich ML, Shetty G, Porter KL em: *Hormones and Spermatogonial Development*, chapter 23, 437-48, 2004.

Meistrich ML, Wilson G, Brown BW, da Cunha MF, Lipshultz LI. Prevention of Adverse Effects of Cancer Treatment on the Germline, em: *Cancer*, chapter 10, 114-24, 2003

Meistrich ML, Shetty G. Inhibition of spermatogonial differentiation by testosterone. *Journal of Andrology* 24(2): 135-48, 2003.

Meistrich ML, Wilson G, Kangasniemi M, Huhtaniemi I. Mechanism of protection of rat spermatogenesis by hormonal pretreatment: stimulation of spermatogonial differentiation after irradiation. *Journal of Andrology* 21(3): 464-9, 2000.

Meistrich ML, Wilson G, Huhtaniemi I. Hormonal treatment after cytotoxic therapy stimulates recovery of spermatogenesis. *Cancer Research* 59(15): 3557-60, 1999.

Meistrich ML, Kangasniemi M. Hormone treatment after irradiation stimulates recovery of rat spermatogenesis from surviving spermatogonia. *Journal of Andrology* 18(1): 80-7, 1997.

Meistrich ML. Potential genetic risks of using semen collected during chemotherapy. *Human Reproduction*.8(1): 8-10, 1993.

Meistrich ML, van Beek ME, Liang JC, Johnson SL, Lu J. Low levels of chromosomal mutations in germ cells derived from doxorubicin-treated stem spermatogonia in the mouse. *Cancer Research* 50(2): 370-4, 1990.

Meistrich ML, Finch MV, Hunter N, Milas L. Protection of spermatogonial survival and testicular function by WR-2721 against high and low doses of radiation. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 10(11): 2099-107, 1984.

Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M, Pichel JG, Westphal H, Saarma M, Sariola H. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 287(5457): 1489-93, 2000.

Nascimento HF, Drumond AL, França LR, Chiarini-Garcia H. Spermatogonial morphology, kinetics and niches in hamsters exposed to short- and long-photoperiod. *Int. Journal of Andrology* 32(5): 486-97, 2009.

Ohmura M, Ogawa T, Ono M, Dezawa M, Hosaka M, Kubota Y, Sawada H. Increment of murine spermatogonial cell number by gonadotropin-releasing hormone analogue is dependent of stem cell factor c-kit signal. *Biology of Reproduction* 68(6): 2304-13, 2003.

Pacek M, Walter JC. A requirement for MCM7 and Cdc45 in chromosome unwinding during eukaryotic DNA replication. *EMBO Journal* 23(18): 3667-76, 2004.

Parchuri N, Wilson G, Meistrich ML. Protection by gonadal steroid hormones against procarbazine-induced damage to spermatogenic function in LBNF1 hybrid rats. *Journal of Andrology* 14(4): 257-66, 1993.

Porter KL, Shetty G, Shuttlesworth GA, Weng CC, Huhtaniemi I, Pakarinen P, Meistrich ML. Estrogen enhances recovery from radiation-induced spermatogonial arrest in rat testes. *Journal of Andrology* 30(4):440-51, 2009.

Porter KL, Shetty G, Meistrich ML. Testicular edema is associated with spermatogonial arrest in irradiated rats. *Endocrinology* 147(3): 1297-305, 2006.

Redman JR, Bajorunas DR, em: *Workshop on Psychosexual and Reproductive Issues Affecting Patients with Cancer*, American Cancer Society, v.90, 1987.

Richburg JH, Johnson KJ, Schoenfeld HA, Meistrich ML, Dix DJ. Defining the cellular and molecular mechanisms of toxicant action in the testis. *Toxicology Letters* 135(3): 167-83, 2002.

Russell LD, Chiarini-Garcia H, Korsmeyer SJ, Knudson CM.. Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *Biology of Reproduction* 66(4): 950-8, 2002.

Russell LD, Ren HP, Sinha Hikim I, Schulze W, Sinha Hikim AP. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical

densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *American Journal of Anatomy* 188(1): 21-30, 1990.

Sabanegh ES Jr, Ragheb AM. Male fertility after cancer. *Urology* 73(2):225-31, 2009.

Sanders JE, Hawley J, Levy W, Gooley T, Buckner CD, Deeg HJ, Doney K, Storb R, Sullivan K, Witherspoon R, Appelbaum FR. Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation. *Blood* 87(7): 3045-52, 1996.

Shetty G, Weng CCY, Meachem SJ, Bolden-Tiller OU, Zhang Z, Pakarinen P, Huhtaniemi I, Meistrich ML. Both testosterone and follicle-stimulating hormone independently inhibit spermatogonial differentiation in irradiated rats. *Endocrinology*, 147(1): 472-82, 2006.

Shetty G, Weng CCY, Bolden-Tiller OU, Huhtaniemi I, Handelsman DJ, Meistrich ML. Effects of medroxyprogesterone and estradiol on the recovery of spermatogenesis in irradiated rats. *Endocrinology* 145(10): 4461-9, 2004.

Shetty G, Wilson G, Hardy MP, Niu E, Huhtaniemi I, Meistrich ML. Inhibition of recovery of spermatogenesis in irradiated rats by different androgens. *Endocrinology*, 143(9): 3385-96, 2002.

Shetty G, Wilson G, Huhtaniemi I, Shuttlesworth GA, Reissmann T, Meistrich ML. Gonadotropin-releasing hormone analogs stimulate and testosterone inhibits the recovery of spermatogenesis in irradiated rats. *Endocrinology* 141(5): 1735-45, 2000.

Shuttlesworth GA, de Rooij DG, Huhtaniemi I, Reissmann T, Russell LD, Shetty G, Wilson G, Meistrich ML. Enhancement of A spermatogonial proliferation and differentiation in irradiated rats by gonadotropin-releasing hormone antagonist administration. *Endocrinology* 141(1): 37-49, 2000.

Tadokoro Y, Yomogida K, Ohta H, Tohda A, Nishimune Y. Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mechanisms of Development* 113(1): 29-39, 2002.

Thomson AB, Anderson RA, Irvine DS, Kelnar CJH, Sharpe RM, Wallace WHB. Investigation of suppression of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis to restore spermatogenesis in azoospermic men treated for childhood cancer. *Human Reproduction* 17(7): 1715-23, 2002.

Topcu-Tarladacalis Y, Kanter M. Role of L-carnitine in the prevention of seminiferous tubules damage induced by gamma radiation: a light and electron microscopic study. *Archives of Toxicology* 83(8): 735-46, 2009.

Udagawa K, Ogawa T, Watanabe T, Yumura Y, Takeda M, Hosaka M. GnRH analog, leuprorelin acetate, promotes regeneration of rat spermatogenesis after severe chemical damage. *International Journal of Urology* 8(11): 615-22, 2001.

van Beek ME, Meistrich ML, de Rooij DG. Probability of self-renewing divisions of spermatogonial stem cells in colonies, formed after fission neutron irradiation. *Cell and tissue kinetics* 23(1): 1-16, 1990.

Van Thiel DH, Sherins RJ, Myers GH Jr, De Vita VT Jr. Evidence for a specific seminiferous tubular factor affecting follicle-stimulating hormone secretion in man. *Journal of Clinical Investigation* 51(4): 1009-19, 1972.

Van Vliet J, de Rooij DG, Wensing CJ, Bootsma AL. Protection of spermatogenesis against cytotoxic effects of two chemotherapeutic drugs by temporary testicular blood flow interruption in the ram. *Andrologia*. 25(5): 251-6, 1993.

Waxman JH, Ahmed R, Smith D, Wrigley PFM, Gregory W, Shalet S, Crowther D, Rees LH, Besser GM, Malpas JS, Lister TA. Failure to preserve fertility in patients with Hodgkin's disease. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 19(2): 159-62, 1987.

Weber JE, Russell LD. A study of intercellular bridges during spermatogenesis in the rat. *American Journal of Anatomy* 180(1):1-24, 1987.

Weinbauer GF, Gockeler E, Nieschlag E. Testosterone prevents complete suppression of spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone antagonist-treated nonhuman primate (*Macaca fascicularis*). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 67(2): 284-90, 1988.

Yamamoto H, Ochiya T, Tamamushi S, Toriyama-Baba H, Takahama Y, Hirai K, Sasaki H, Sakamoto H, Saito I, Iwamoto T, Kakizoe T, Terada M. HST-1/FGF-4 gene activation induces spermatogenesis and prevents adriamycin-induced testicular toxicity. *Oncogene* 21(6): 899-908, 2002.

Yan W, Lindeborg J, Suominen J, Toppari J. Stage specific regulation of stem cell factor gene expression in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology* 140(3): 1499-04, 1999.

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. *Journal of Cellular Physiology* 211(1): 149-58, 2007.

Zhou W, Bolden-Tiller OU, Shetty G, Shao SH, Weng CC, Pakarinen P, Liu Z, Stivers DN, Meistrich ML. Changes in gene expression in somatic cells of rat testes resulting from hormonal modulation and radiation-induced germ cell depletion. *Biology of Reproduction* 82(1): 54-65, 2010.