

PATRICIA MAGNAGO ALTOÉ

**EFEITOS DA GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NO
TECIDO TESTICULAR NORMAL DE RATOS.**

BELO HORIZONTE – MG

2014

PATRICIA MAGNAGO ALTOÉ

**EFEITOS DA GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NO
TECIDO TESTICULAR NORMAL DE RATOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Samesima Tatsuo

Co-orientador: Prof. Dr. Danilo Nagib Salomão Paulo

Linha de Pesquisa: Parede abdominal e Distopias Testiculares

BELO HORIZONTE

FOLHA DE APROVAÇÃO:
PATRICIA MAGNAGO ALTOÉ

Nível: Mestrado

Data da defesa: 03/02/2014

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Comissão examinadora formada pelos professores:

Prof. Dr. Edson Samesima Tatsuo (orientador)	UFMG
--	------

Prof. Dr. Marcelo Eller Miranda	UFMG
---------------------------------	------

Prof. Dr. Denny Fabricio Magalhães Veloso	UFSJ
---	------

Suplente

Prof. Dr. Clécio Piçarro	UFMG
--------------------------	------

AUTORIDADES DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora: Prof^a. Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Renato de Lima dos Santos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof^a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Chefe do Departamento de Cirurgia: Prof. Marcelo Eller Miranda

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia: Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia: Prof^a. Ivana Duval de Araújo

Colegiado do programa de Pós-graduação

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Prof^a. Dra Ivana Duval de Araújo

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Renato Santiago Gomes

Prof. Dr. Tarcizio Afonso Nunes

Representante Discente titular: Sumara Marques Barral

Representante Discente suplente: Hevila Tamar Rolim Lima

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora, pelas bênçãos e conquistas na minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Samesima Tatsuo, por sempre acreditar em mim e fazer de mim uma pessoa e profissional mais capacitada.

Ao Prof. Dr. Danilo Nagib Salomão Paulo, pela disponibilização do Centro de Pesquisas da EMESCAM.

Ao Dr. Robson Jarske, amigo de faculdade e patologista, pela colaboração na confecção e análise das lâminas de histologia, parte fundamental deste trabalho.

À Roberta, veterinária do Centro de Pesquisas da EMESCAM, pela ajuda durante o experimento e dedicação ao trabalho com animais de experimentação.

Ao Fabiano, pela análise estatística.

À Patricia Viana Santos, secretária do Serviço de Cirurgia Pediátrica do HC- UFMG, pela ajuda e eterna amizade.

Aos alunos da EMESCAM (Manoela e Taissa) e da Universidade de Vila Velha- UVV (Marcel e Igor), que me ajudaram durante o experimento e análise das lâminas de histologia.

A toda minha família, pelo apoio e participação.

Agradeço imensamente ao meu marido Jomar por seu amor, carinho, apoio e compreensão, sempre!

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A terapia hormonal é usada para induzir a descida dos testículos crípticos e/ou para localizar testículos impalpáveis. Ainda existem controvérsias a respeito da sua segurança e eficácia, com resultados que variam muito e dependem de muitos fatores. Estudos experimentais em ratos têm mostrado poucos benefícios e até mesmo efeitos deletérios, com alteração na histologia dos testículos crípticos ou contralaterais. Este estudo tem como objetivo investigar os efeitos da gonadotrofina coriônica humana (hCG) no tecido testicular de ratos machos imaturos normais, sem criptorquia, por meio da avaliação histológica dos testículos.

MÉTODO: 30 ratos machos da linhagem *Wistar* (30 a 45 dias) foram distribuídos em 3 grupos de 10 ratos. O Grupo Controle recebeu solução salina via subcutânea (SC), o Grupo 1 recebeu hCG na dose de 50UI/Kg/dose, e o Grupo 2, hCG na dose de 100UI/Kg/dose, todos diariamente durante 15 dias. Metade dos animais de cada grupo (5 animais) foi submetida a orquiectomia bilateral sob anestesia e, após, eutanásia, com 16 dias após início da aplicação do hormônio. A outra metade, 45 dias após início da aplicação do hormônio. Os testículos foram pesados, medidos e determinados seus volumes. Foram feitas análises histológicas qualitativas e quantitativas, com medidas do diâmetro dos túbulos seminíferos e espessura do epitélio seminífero. Utilizados testes paramétricos (ANOVA) e não paramétricos (Mann-Whitney e Kruskal-Wallis), sendo valor significativo $p \leq 0,05$.

RESULTADOS: Encontrada diferença estatisticamente significativa do peso e volume dos testículos entre os grupos nas duas operações. O grupo Controle apresentou maiores valores. Todos os ratos do Grupo Controle, independente da época da operação, apresentavam histologia testicular normal. Nos G1 e G2, na maioria dos ratos na primeira operação e em poucos ratos na segunda operação no G1, observou-se uma atrofia dos túbulos seminíferos com degeneração e diminuição do número de células germinativas (apoptose), descamação de células germinativas para o lúmen, presença anormal de células gigantes multinucleadas e vacuolização das células de Sertoli. Comparando-se os grupos, na primeira operação o grupo Controle teve maiores valores do diâmetro do que o G1 e G2, que foram semelhantes entre si. Na segunda operação, o grupo Controle diferiu e tinha maiores valores somente do G1. O G2 não diferia do Controle nem do G1. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos na espessura nas duas operações. O grupo Controle teve maiores valores que o G1 e G2, que eram semelhantes entre si. Comparando-se o momento da operação, para o diâmetro, foi encontrada diferença estatisticamente significativa nos grupos G1 e G2, onde na segunda operação os valores foram maiores. E para espessura, em todos os grupos, onde na segunda operação os valores foram maiores.

CONCLUSÃO: A gonadotrofina coriônica humana é gonadotóxica quando utilizada em ratos normais, podendo determinar uma degeneração testicular, induzindo a apoptose e formação de células gigantes multinucleadas, além da descamação do epitélio germinativo. Esse efeito foi pelo menos temporário e os animais submetidos a esse tratamento podem sofrer alterações do seu potencial reprodutivo. Com esse estudo pôde-se comprovar a recuperação parcial dos danos testiculares no intervalo estudado e os efeitos não foram dose dependentes. Mais estudos devem ser feitos com avaliações em longo prazo dos efeitos da hCG sobre o tecido testicular, para maior segurança em sua utilização clínica.

ABSTRACT

BACKGROUND: Hormone therapy is used to induce testicular descent cryptic and / or to locate impalpable testes. There is still controversy regarding its safety and efficacy, with results that vary widely and depend on many factors. Experimental studies in rats have shown little benefit and even deleterious effects, with changes in histology of contralateral testes or cryptic. This study aims to investigate the effects of human chorionic gonadotropin (hCG) in testicular tissue of normal immature male rats without cryptorchidism, by histological evaluation of the testes.

METHOD: 30 male Wistar rats (30-45 days) were divided into 3 groups of 10 rats. The control group received saline subcutaneously (SC), the Group received one dose of hCG in 50UI/Kg/dose, and Group 2, at a dose of hCG 100UI/Kg/dose, all daily for 15 days. Half of the animals in each group (5 animals) underwent bilateral orchiectomy under anesthesia and, after euthanasia, with 16 days after start of the hormone. The other half, beginning 45 days after the injection of the hormone. The testes were weighed, measured and determined their volumes. Histological analyzes were performed qualitative and quantitative measures with the seminiferous tubule diameter and thickness of the seminiferous epithelium. Used parametric tests (ANOVA) and nonparametric (Mann-Whitney and Kruskal-Wallis), with significant p value ≤ 0.05 .

RESULTS: Statistically significant difference in weight and testicular volume between the groups in both operations. The control group showed higher values. All mice in the control group, regardless of the time of the operation, had normal testicular histology. In G1 and G2 in the majority of mice in the first few mice operation and the second operation in G1 observed atrophy with degeneration of the seminiferous tubules and reduce the number of germ cells (apoptosis), germ cell shedding into the lumen , abnormal presence of giant cells and vacuolation of Sertoli cells. Comparing the groups, in the first operation the control group had higher values of the diameter of the G1 and G2, which were similar. In the second operation, the control group had higher values and differed only in G1. The G2 did not differ from the control or the G1. We observed a statistically significant difference between groups in thickness in both operations. The control group had higher values than the G1 and G2, which were similar to each other. Comparing the operation time for the diameter, was found statistically significant differences in the groups G1 and G2, where the second operation values were higher. And for thickness in all groups where the second operating values were higher.

CONCLUSION: Human chorionic gonadotropin is gonadotoxic when used in normal mice, may determine testicular degeneration, inducing apoptosis and formation of giant cells, and desquamation of the germinal epithelium. This effect was at least temporarily and animals undergoing this treatment may change their productive potential. This study could demonstrate partial recovery of testicular damage in the range studied and the effects were not dose dependent. More studies should be done with long-term assessments of the effects of hCG on testicular tissue for greater security in their clinical use.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrando uma porção de um corte de túbulo seminífero.	12
Figura 2. Desenho esquemático mostrando a natureza clonal das células germinativas.....	15
Figura 3. Gonadotrofina Coriônica Humana utilizada no experimento.	28
Figura 4. Marcação nas caudas dos ratos.....	29
Figura 5. Foto da operação de orquiectomia bilateral.....	30
Figura 6. Balança de precisão para pesagem dos testículos.....	30
Figura 7. Paquímetro utilizado para aferição das medidas dos testículos.	31
Figura 8. Fotomicrografia de secção transversal de túbulo seminífero. D: diâmetro do túbulo seminífero.....	32
Figura 9. Fotomicrografia de secção transversal de túbulo seminífero. E: espessura do epitélio seminífero.....	33
Figura 10. Fotomicrografia de Tecido Testicular. Ratos do grupo Controle (C).	39
Figura 11. Fotomicrografia de Túbulo Seminífero. Ratos do grupo Controle (C).	40
Figura 12. Fotomicrografia de Tecido Testicular. Ratos do Grupo 1 (G1).....	41
Figura 13. Fotomicrografia de Túbulo Seminífero. Presença de Células gigantes multinucleadas.....	432
Figura 14. Fotomicrografia de Tecido Testicular. Ratos do Grupo 2 (G2).....	423
Figura 15. Fotomicrografia de Túbulo Seminífero. Descamação de células germinativas do epitélio seminífero e vacuolização do epitélio.	43
Figura 16. Fotomicrografia de Tecido Testicular. Ratos do Grupo 1 (G1).....	44
Figura 17. Fotomicrografia de Tecido Testicular. Ratos do Grupo 2 (G2).....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ratos agrupados segundo grupos e operação.	35
Tabela 2 - Estatísticas descritivas do Peso Inicial do rato segundo grupo e operação e resultados da ANOVA.....	36
Tabela 3 - Estatísticas descritivas do Peso 15 dias segundo grupo e operação e resultados da ANOVA.....	36
Tabela 4 - Estatísticas descritivas do Peso do rato na operação segundo grupo e operação e resultados da ANOVA.....	37
Tabela 5 - Estatísticas descritivas do Peso dos testículos segundo grupo e operação.....	37
Tabela 6 - Estatísticas descritivas do Volume testicular segundo grupo e operação.	38
Tabela 7 - Estatísticas descritivas do Diâmetro do Túbulo Seminífero segundo grupo e operação.....	45
Tabela 8 - Estatísticas descritivas da Espessura do Epitélio Seminífero segundo grupo e operação.....	46
Tabela 9 - Estatísticas descritivas do Diâmetro segundo grupo e operação e resultado do teste de Kruskal-Wallis.	46
Tabela 10 - Estatísticas descritivas da Espessura segundo grupo e operação e resultado do teste de Kruskal-Wallis.	47
Tabela 11 - Estatísticas descritivas do Diâmetro segundo grupo e operação e resultado do teste de Mann-Whitney.....	47
Tabela 12 - Estatísticas descritivas da Espessura segundo grupo e operação e resultado do teste de Mann-Whitney.....	48
Tabela 13 - Resultados da correlação Peso do rato com Diâmetro do túbulo e Espessura do Epitélio e Volume do testículo.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

Ad: “adult dark” espermatogônias

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

C: Controle

DTS: Diâmetro do túbulo seminífero

EES: Espessura do epitélio seminífero

EMESCAM: Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória

FSH: Hormônio folículo estimulante

GnRH : Hormônio liberador de gonadotrofina

G1: Grupo 1

G2: Grupo 2

hCG: Gonadotrofina coriônica humana

HC-UFGM: Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

HE: Hematoxilina e eosina

HUCAM (UFES): Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes – Universidade Federal do Espírito Santo

LHRH: Hormônio liberador de hormônio luteinizante

SC: subcutânea

UVV: Universidade de Vila Velha

VT: Volume Testicular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 ESPERMATOGÊNESE	12
1.2 CRIPTORQUIA	17
2. OBJETIVO	27
3. MATERIAL E MÉTODO	28
4. RESULTADOS.....	35
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÃO	60
7. REFERÊNCIAS	61
8. ANEXOS.....	66

1. INTRODUÇÃO

1.1 Espermatogênese

O testículo é um órgão complexo constituído morfofuncionalmente de dois compartimentos: intersticial ou intertubular, contendo células e fibras do tecido conjuntivo, vasos linfáticos e células de Leydig (principal fonte de andrógenos) e tubular, contendo túbulos seminíferos, no interior dos quais há a formação do gameta masculino, processo denominado de espermatogênese (1,2) (Fig. 1).

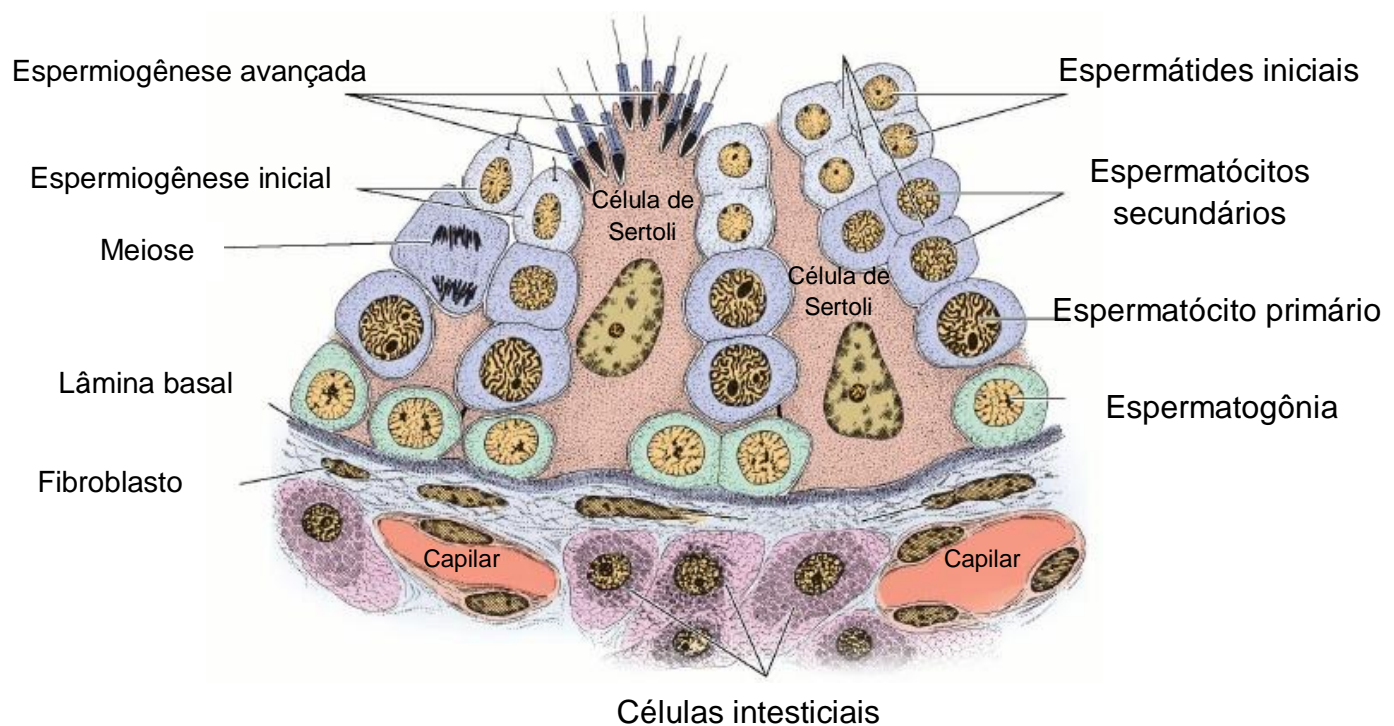


Figura 1. Esquema ilustrando uma porção de um corte de túbulo seminífero. O epitélio seminífero é formado de duas populações celulares: as células da linhagem espermatogênica e as células de Sertoli. Em torno do túbulo há uma camada de células mióides além de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e células intersticiais. Fonte: Junqueira- Histologia Básica – 10ª ed, 2004

A subdivisão dos testículos em dois compartimentos baseia-se em suas características morfológicas e funcionais. A distribuição das proporções volumétricas dos componentes testiculares é variável, o que pode refletir em diferenças na eficiência da espermatogênese nos mamíferos (2)

O compartimento tubular representa de 70% a 90% do parênquima testicular dos mamíferos eutéricos* sexualmente maduros e apresenta grande influência sobre a produção espermática e o peso testicular. Este compartimento é formado por cordões testiculares ou túbulos seminíferos e encontra-se envolto pela túnica própria, que é composta por matriz extracelular e células mióides. Em seu interior, o epitélio seminífero possui células de suporte e células da linhagem germinativa em vários estágios de desenvolvimento (2).

O número e as dimensões dos túbulos seminíferos diferem entre os mamíferos. Normalmente o diâmetro tubular é considerado um indicador da atividade espermatogênica, sendo constante em animais sexualmente maduros e não sazonais. No entanto, há diferenças entre as espécies e entre linhagens ou raças em uma mesma espécie, variando entre 180 μm a 300 μm nos mamíferos eutéricos adultos (2).

O peso dos testículos está relacionado, sobretudo, com o comprimento total dos túbulos seminíferos que, conseqüentemente, depende do volume tubular, do diâmetro tubular e da proporção volumétrica dos túbulos seminíferos. A altura ou espessura do epitélio revela o grau de funcionalidade do túbulo seminífero e seu valor varia entre 60 μm a 100 μm , para a maioria dos animais domésticos (2).

Embora ocorram variações entre as espécies, observa-se que no espaço intertubular há predominância das células de Leydig em relação aos outros tipos

* Animais eutéricos: são seres vivíparos que pertencem à Subclasse Eutheria, um grupo que abrange cerca de 95% dos mamíferos em todo o planeta, reunindo os animais com desenvolvimento embrionário essencialmente na cavidade abdominal, alojados no interior do útero materno, com suporte aos anexos: placenta, saco vitelínico, âmnio, cavidade amniótica e cordão umbilical. Incluem os primatas e roedores, dentre outros.

celulares ou estruturas como vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células e fibras de tecido conjuntivo, macrófagos e mastócitos (2).

A espermatogênese não é um processo aleatório, sendo regulada por secreções parácrinas de células adjacentes ao epitélio seminífero e pelo complexo eixo hipotálamo- hipófise – testículo. Dentre a regulação intrínseca, destacam-se as células de Sertoli, portadoras de dobras complexas em seu plasmalema e junções de oclusão em suas membranas laterais, subdividindo o epitélio seminífero em dois compartimentos: basal, contendo espermatogônias e espermatócitos primários e adluminal, contendo espermatócitos primários tardios, espermatócitos secundários, espermatídes e espermatozóides (1).

Percebe-se, no epitélio seminífero, uma organização fixa e bem definida, de tipos celulares. O conjunto completo de estágios, organizados em sequência progressiva do desenvolvimento das células germinativas em um dado segmento do túbulo seminífero, é denominado ciclo do epitélio seminífero. O padrão cíclico é marcado por evolução progressiva e sincronizada de células espermatogênicas individuais e translocação concomitante das mesmas do compartimento basal para o adluminal do túbulo (3,4).

A espermatogênese é um processo sincrônico e regular de diferenciação celular, pelo qual uma espermatogônia tronco é gradativamente diferenciada numa célula haplóide altamente especializada, o espermatozóide. Este processo que ocorre nos túbulos seminíferos dura em torno de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos estudados (5) (Fig. 2).

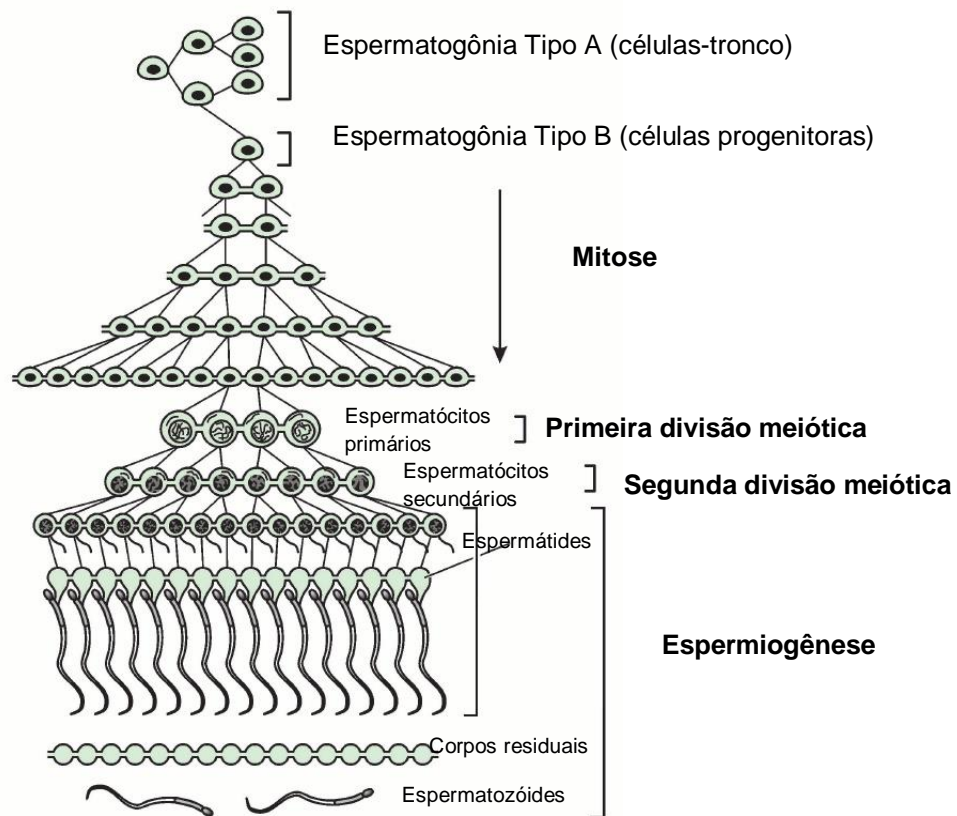


Figura 2. Desenho esquemático mostrando a natureza clonal das células germinativas.

Inicialmente, só as espermatogônias tipo A se dividem, produzindo células-filhas que continuam a se dividir. Algumas de suas células-filhas ficam comprometidas com a diferenciação em espermatogônias tipo B e não se separam nas divisões sucessivas, permanecendo presas por pontes citoplasmáticas. Estas células voltam a ser individualizadas após a perda dos corpos residuais e a maturação completa dos espermatozóides. Fonte: Junqueira- Histologia Básica – 10ª ed, 2004

Esta diferenciação envolve três classes de células germinativas: as espermatogônias, os espermatócitos e as espermátides. Nos homens adultos a espermatogênese é um processo contínuo que pode ser dividido em três fases distintas: a mitótica, a meiótica e a espermiogênese, cada uma caracterizada por mudanças morfológicas e bioquímicas dos componentes do citoplasma e núcleo celular (5).

O rendimento da espermatogênese não é de 100%, ou seja, durante o processo vão ocorrer várias perdas celulares, de forma que uma espermatogônia tipo A não vai gerar 16 espermatócitos primários e 64 espermatozóides, como teoricamente seria esperado, em se tratando de animais com quatro gerações de espermatogônias. Isso se deve ao fato de ocorrerem apoptose e degeneração das células germinativas e tais alterações são observadas normalmente nos túbulos seminíferos com a mesma regularidade que são encontradas as divisões e as diferenciações celulares (5).

O controle do processo espermatogênico está sob a ação conjunta de hormônios gonadotróficos, testosterona e diversos fatores de sinalização intratesticular. Entretanto, o FSH (hormônio folículo estimulante) e a testosterona assumem o papel principal na regulação deste processo, através da ação sobre receptores presentes nas células de Sertoli (6).

Durante a espermatogênese, as células germinativas e de Sertoli interagem de maneira complexa. Estudos mostram que o número de células de Sertoli por testículo é o principal fator de determinação da produção espermática e do tamanho deste órgão, baseado no fato de que as células de Sertoli têm capacidade de suporte de células germinativas relativamente fixas para cada espécie (3). Desta forma, o número de células germinativas (principalmente espermátides) suportadas por uma única célula de Sertoli é o melhor indicativo de eficiência funcional destas. Considerando que a população de células de Sertoli é estável ao longo dos estágios do ciclo, elas têm sido utilizadas numericamente como ponto de referência para a quantificação e correção de contagens de células

germinativas, propiciando a base de estudos de alterações no processo espermatogênico (1).

As células de Sertoli apresentam papel importante na regulação da espermatogênese, já que promovem a sustentação das células espermáticas. A população de células de Sertoli, estabelecida antes da instalação da puberdade, está diretamente relacionada com a capacidade de produção espermática na maioria dos mamíferos devido à sua correlação positiva com alguns parâmetros como: peso testicular, comprimento total dos túbulos seminíferos, volume de túbulo e epitélio seminífero e produção espermática. Portanto, durante esta fase, qualquer alteração hormonal pode modificar os níveis proliferativos desta célula, podendo acarretar aumento ou diminuição da capacidade produtiva espermatogênica no homem adulto (7).

1.2 Criptorquia

A criptorquia se caracteriza pela incompleta migração embriológica do testículo através do seu trajeto normal de descida até a bolsa escrotal. É uma das anomalias congênitas mais comuns no sexo masculino. Afeta cerca de um terço dos prematuros e 3-4% dos nascidos vivos a termo, cuja prevalência diminui para 0,8% com um ano de idade. É um importante fator de risco para tumor de testículo e uma importante causa de infertilidade. Mais da metade dos casos unilaterais e 75% dos casos bilaterais estão associados a eventuais problemas de fertilidade. Esforços para melhorar as taxas de fertilidade objetivam a intervenção cirúrgica precoce e, mais recentemente, a terapia hormonal (8,9).

O mecanismo que regula a descida testicular pré-natal é ainda obscuro, mas existem evidências de que fatores endócrinos, genéticos e ambientais estejam envolvidos. O tratamento da criptorquia deve ser realizado preferencialmente entre seis meses e um ano de idade, isso porque após os seis meses raramente há descida espontânea. O tratamento envolve terapia hormonal e/ou cirúrgica (10).

A terapia hormonal foi introduzida em 1930 e o primeiro hormônio a ser utilizado foi a gonadotrofina coriônica humana (hCG) (11-13). O tratamento intranasal com hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) foi usado pela primeira vez em 1975 (13). A terapia hormonal é usada para induzir a descida dos testículos e/ou para localizar testículos impalpáveis. É baseada na premissa de que a criptorquia é causada pela deficiência do eixo hipotálamo- hipófise- gonadal e que o tratamento pós-natal pode induzir a migração do gubernáculo (14). A terapia tem sido tentada com testosterona, hCG, hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH) ou de gonadotrofina (GnRH). A terapia direta com andrógenos foi abandonada há muitos anos porque doses altas causavam puberdade precoce (14).

O uso da hCG estimula as células de Leydig dos testículos a produzirem testosterona. O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) estimula a hipófise a secretar LH que estimula as células de Leydig a produzirem testosterona e iniciar a descida do testículo (8,10). Atualmente, a terapia hormonal também é utilizada para estimular a proliferação e maturação das células germinativas contribuindo para melhorar a fertilidade (10). *Hadziselimovic et al.* sugerem que a hCG induz o desenvolvimento e transformação dos gonócitos em “adult dark” (Ad) espermatogônias e que, mesmo após uma orquiopexia bem sucedida, a fertilidade só é atingida na vida adulta se houver a presença de Ad espermatogônia na época

da operação (15). Outros estudos, porém, reportam que a hCG pode causar danos às células germinativas (12,16,17).

Os resultados da terapia hormonal variam muito e dependem de muitos fatores, entre eles: doses, intervalos de tratamento e idade dos meninos estudados (9,10). Taxas de sucesso com a descida testicular variam de 10% a 99%, sendo que a maioria atinge cerca de 20% de sucesso (10,12,18, 19). Crianças maiores de 4 anos e aquelas com criptorquia bilateral na entrada da bolsa escrotal ou com testículos retráteis respondem melhor à hCG (13,14,18). Em criptorquia unilateral, que mais provavelmente é causada por defeito congênito anatômico, somente 14% dos meninos têm sucesso com a terapia hormonal (14).

Os testículos pré-púberes eram considerados tradicionalmente quiescentes. Evidências recentes refutam esse conceito tradicional e sugerem que duas etapas principais envolvendo o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal ocorrem durante o período pré-púbere: a primeira aos 2-3 meses e a segunda aos 4-5 anos de idade. Aos 2-3 meses o reservatório adulto de células germinativas (Ad espermatogônias) é estabelecido em substituição ao reservatório fetal (gonócitos) e aos 4-5 anos inicia-se a meiose (20).

A contagem total de células germinativas e a maturação normal dessas células são importantes na avaliação de biópsias de testículos crípticos e tópicos contralaterais. A maturação se inicia com a transformação de gonócitos em espermatogônia adulta, o que geralmente se completa até seis meses de idade. Na idade de 3 meses a Ad espermatogônia começa a aparecer e imediatamente aumenta em número. Um outro passo na maturação das células germinativas é a transformação de Ad espermatogônia em espermátócitos primários, que

normalmente começa aos quatro anos de idade (21). Os cinco marcos na maturação das células germinativas são: (i) gonócitos aparecem na oitava semana de gestação; (ii) espermatogônias estão presentes com quinze semanas de gestação; (iii) Ad espermatogônias aparecem com três meses de idade e permanecem pelo resto da vida (são o reservatório adulto de células germinativas); (iv) espermatócitos primários, a primeira forma da meiose, aparecem aos quatro anos de idade ; e (v) a espermatogênese inicia-se na puberdade (20,22).

Estudos mostram que esses passos na maturação são anormais em testículos crípticos e menos severamente nos testículos contralaterais (20). A redução no número de células germinativas nos testículos crípticos inicia-se ainda no primeiro ano de vida, sendo uma das causas de baixa fertilidade na criptorquia (22). Aos 2-3 meses de idade os gonócitos falham em desaparecer e as Ad espermatogônias falham em surgir, sugerindo que essa transformação é atrasada e defeituosa. O número total de células germinativas por túbulo permanece alto até os dois anos de idade e, após, cai abaixo do normal. Esse número total alto de células germinativas no primeiro ano de vida é a base para o conceito tradicional de que o testículo críptico é histologicamente normal até o segundo ano de vida. Aos 4-5 anos, os espermatócitos primários falham em aparecer nos testículos crípticos indicando que o início da meiose é defeituoso e o número total de células germinativas permanece abaixo do normal. A falha em estabelecer um reservatório adulto normal de células germinativas aos 2-3 meses e a falha em iniciar a meiose aos 4-5 anos podem contribuir para o número reduzido de células germinativas, característico da criptorquia (20).

Hormonalmente, em meninos normais, o eixo hipotalâmico-hipófise-gonadal é ativado durante os primeiros meses de vida e aos três meses de idade

FSH, LH, testosterona e inibina B atingem seu pico. Por volta dos nove meses as gonadotrofinas e a testosterona são suprimidas, a testosterona é indetectável e FSH e LH são baixos. A inibina B permanece elevada até quinze meses de vida. Os ritmos diurnos de FSH, LH e testosterona existem até os 4-5 anos de vida e até três anos antes do início da puberdade. Os níveis séricos desses hormônios continuam aumentando durante a infância. Com o início da puberdade, os níveis séricos de FSH, LH, testosterona, inibina B e estradiol aumentam significativamente (16).

As fases de maturação das células germinativas são acompanhadas das alterações hormonais com aumento do nível sérico de LH e testosterona aos 2-3 meses de idade. Como esse aumento hormonal não é encontrado em meninos com criptorquia por possuírem um eixo hipotálamo-hipófise-gonadal defeituoso, associado à hipoplasia das células de Leydig, se justificam as falhas na maturação das células germinativas (20).

O parâmetro mais importante para a fertilidade em homens adultos é a contagem de células germinativas (número de espermatogônia por túbulo seminífero) (16,23). Comparado com testículos normais, nos quais espermatogônias adultas emergem dos gonócitos maduros, em testículos crípticos a transformação de gonócitos é diminuída. Não somente o número de espermatogônias permanece severamente diminuído, mas também seu desenvolvimento é profundamente alterado (23). Em condições fisiológicas, os gonócitos primários, sobre efeito do aumento temporário na concentração de gonadotrofinas e testosterona, transformam-se em Ad espermatogônia entre dois e três meses de idade. Se essa transformação não ocorre, o risco de infertilidade futura chega a mais de 90% (16,24).

A infertilidade é causada pelo defeito na transformação de células germinativas em Ad espermatogônia, que é progenitora do espermatozóide. Um aumento temporário na concentração de gonadotrofinas e testosterona ocorre na idade de um a seis meses em lactentes normais. Em pacientes com criptorquia esse aumento é mais discreto. Além disso, sabe-se que o testículo contralateral em pacientes com criptorquia unilateral não é normal, justificando-se a endocrinopatia como uma das causas da doença. Por isso, a terapia hormonal com hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH) e/ou gonadotrofina coriônica humana (hCG), que eleva as taxas de testosterona plasmática e mimetiza o pico de gonadotrofina pós-natal, seria justificada como tratamento adjuvante na criptorquidia (25).

Ainda existem controvérsias a respeito da segurança e eficácia da terapia hormonal. Vários estudos justificam o uso da terapia hormonal, antes e/ou após a operação ou até mesmo como terapia única, com efeitos benéficos nas taxas de fertilidade (aumento no número e maturação das espermatogônias) (8,15,21,23,25). Outros trabalhos, porém, demonstram efeitos deletérios após a utilização dos hormônios, com alteração na histologia dos testículos crípticos ou contralaterais, como aumento na taxa de apoptose e menor número de células germinativas (12,16,26). Ou também com degeneração e hipocelularidade do epitélio germinativo, marginação da cromatina das espermátides redondas e formação de células gigantes multinucleadas (17,27).

O hormônio mais utilizado no tratamento de criptorquia é hCG, sozinha ou em combinação com outros hormônios (LHRH/ GnRH). Alguns autores também recomendam seu uso em pré-operatório de hipospádia severa, além do uso em hipogonadismo hipogonadotrófico (26). As doses de hCG variam de acordo com os

trabalhos. Em trabalhos clínicos alguns recomendam 500 ou 1000UI 2 vezes por semana durante 5 semanas (11,12,28). Outros, 100UI/ Kg (máximo de 1500UI) uma, 2 ou 3 vezes por semana durante 3 semanas (14,16,21,41); ou 500UI por semana durante 3 semanas (10) ou 3 vezes na semana durante 3 semanas (29); ou 50UI/Kg 1 vez ao dia, 5 dias (18). Ou ainda 1500 a 2000UI /m² 2 vezes na semana durante 5 semanas (19) Em trabalhos experimentais, doses de 100, 200 ou 400UI em dose única (17); 10, 30 ou 50UI/Kg/ dia durante 15 dias (8); ou 100UI/dia durante 15 ou 30 dias (31).

Efeitos adversos reportados após a terapia hormonal incluem dor no local de injeção, crescimento do pênis, pelos pubianos, dor na região inguinal e à ereção, problemas comportamentais, alterações inflamatórias temporárias nos testículos, apoptose de células germinativas e importante redução no número das células germinativas e tamanho do testículo adulto (13,30).

Sinais de androgenização podem ocorrer com o tratamento hormonal, especialmente com o uso de hCG. Apesar desses sinais parecerem ser reversíveis, não se pode excluir que a exposição não fisiológica de FSH, LH e testosterona pode causar danos aos meninos de um a três anos com criptorquia, nos quais as gonadotrofinas e a testosterona normalmente estão suprimidas (16).

Existem, ainda, dúvidas sobre os efeitos em longo prazo da hCG sobre os testículos (26). Histologicamente, uma reação inflamatória e alterações vasculares têm sido reportadas em biópsias testiculares após injeção de hCG em seres humanos e animais. Há a preocupação de que algumas dessas mudanças sejam irreversíveis e seu efeito em longo prazo na função testicular ainda não é totalmente conhecido (26,31,33). Estudos também mostram que essas alterações são dose e

duração dependentes, o que justifica estudos com doses de hCG e duração diferentes (26, 31).

O efeito adverso da hCG sobre as células germinativas seria provavelmente devido ao efeito de retirada dos androgênios. A administração de hCG (aguda e em altas doses) estimula a produção de androgênios pelas células de Leydig, o que é normalmente ausente em testículos pré-púberes. Mais tarde, com o fim das injeções de hCG, não havendo mais estímulo às células de Leydig, a produção de androgênios pára e resulta em queda brusca dos níveis de androgênios, o que previamente já foi comprovado que resulta num aumento da apoptose de células germinativas (12,26,32,33).

Além disso, as mudanças induzidas pela hCG também afetariam os testículos normais tópicos em humanos. Esse aspecto deve ser considerado quando se utiliza hCG no tratamento de criptorquia unilateral e em outras condições, porque pode afetar adversamente a fertilidade em crianças que, de outra forma, teriam um bom potencial de fertilidade (26). Apesar de outros trabalhos demonstrarem efeitos benéficos no testículo contralateral, que não é considerado normal por outros autores (21).

De acordo com um consenso alemão de 2009 recomenda-se que o tratamento da criptorquia seja programado (10). Pode-se esperar e observar até os seis meses de idade, pois pode ocorrer a descida espontânea do testículo. Caso não ocorra, utiliza-se a terapia hormonal combinada (LHRH seguido de hCG) pré-operatória visando principalmente melhora nas taxas de fertilidade futura. Se a terapia hormonal não for bem sucedida, indica-se o tratamento cirúrgico. O tratamento, incluindo a correção cirúrgica, deve ser completado até um ano de

idade. Como a reascensão do testículo pode ocorrer em 24% dos meninos após a terapia hormonal, é necessário monitorar esses meninos por pelo menos seis meses. E se a criptorquia for diagnosticada após um ano de idade, o tratamento cirúrgico deve ser a primeira escolha.

Alguns estudos experimentais em ratos têm mostrado poucos benefícios no tratamento hormonal da criptorquia e até mesmo efeitos deletérios (34,35). A criptorquia experimental em ratos afeta significativamente a capacidade reprodutiva, sendo restabelecida parcialmente com a orquiopexia. No entanto, o tratamento adicional com LHRH não mostrou melhoras na espermatogênese ou fertilidade. O tratamento com hCG e LHRH sozinhos ou combinados adicionou pouco ou nenhum benefício à orquiopexia em restabelecer a função gonadal em ratos com criptorquia. Nesses experimentos, doses fisiológicas de hormônios foram utilizadas para compensar a escassez de hormônio.

O testículo humano é um órgão suscetível a agentes tóxicos ambientais ou terapêuticos que comprometem a espermatogênese por diferentes mecanismos, como alterações na espermiogênese, indução de apoptose nas células germinativas, azoospermia e até infertilidade. Na avaliação de possíveis efeitos tóxicos de diferentes substâncias ou das disfunções na espermatogênese, a análise histopatológica do testículo é considerada uma das estratégias mais tradicionais para analisar os parâmetros morfológicos (aspecto qualitativo do epitélio seminífero) e morfométricos (aspecto quantitativo do epitélio seminífero) dos túbulos seminíferos em condições patológicas ou de diferentes tratamentos em comparação com os indivíduos normais (36).

Este estudo utiliza um modelo experimental, em ratos, para estudar a histologia testicular, pois o desenvolvimento testicular é semelhante em ratos e humanos. Em vários estudos o rato mostrou-se um modelo confiável, podendo ser utilizado em estudos para avaliação dos eventos celulares, bioquímicos e moleculares que ocorrem nos testículos.

2. OBJETIVO

Investigar os efeitos da gonadotrofina coriônica humana (hCG) no tecido testicular de ratos machos imaturos normais, sem criptorquia, por meio da avaliação das repercussões histológicas nos testículos.

3. MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG (protocolo nº 297/2012) e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória/ ES – EMESCAM (protocolo nº 005/2012).

Foram utilizados 30 ratos machos da linhagem *Wistar* com idade de 30 a 45 dias, fornecidos pelo biotério da EMESCAM. Os ratos foram distribuídos em 3 grupos de 10 ratos cada, de forma randomizada. O Grupo Controle recebeu solução salina via subcutânea (SC) durante 15 dias; o Grupo 1 recebeu hCG (Chorulon® 5000UI) diariamente na dose de 50UI/Kg/dose SC durante 15 dias; e o Grupo 2 recebeu hCG diariamente na dose de 100UI/Kg/dose SC durante 15 dias (Fig. 3). Metade dos animais de cada grupo (5 animais) foi submetida a orquiectomia bilateral sob anestesia e, após, eutanásia com 16 dias após início da aplicação do hormônio. A outra metade, com 45 dias após início da aplicação do hormônio.



Figura 3. Gonadotrofina Coriônica Humana utilizada no experimento.

Os ratos foram marcados em suas caudas com canetas marcadores e permaneceram em gaiolas de até 4 animais, separados de acordo com cada grupo. Foram mantidos em ambiente com temperatura e luz controlados. Receberam água e ração apropriada para a espécie, sem restrição (Fig. 4).



Figura 4. Marcação nas caudas dos ratos.

Os animais foram pesados no início da pesquisa, depois de 1 semana de aplicações do hormônio e no dia da respectiva operação.

Depois de anestesiados com pentobarbital sódico 3% (Hypnol 3%) na dose de 60mg/Kg, seus testículos foram coletados, separados do epidídimo, medidos com auxílio de um paquímetro (comprimento, largura e espessura) e pesados em uma balança digital de precisão (balança Adventure OHAUS, modelo AR 3130). Após, os testículos foram fixados em formol tamponado a 10% para posterior avaliação histológica. Os animais foram eutanasiados com pentobarbital

sódico 3% na dose de 150mg/Kg e cloreto de potássio intracardíaco (100mg/Kg) (Fig. 5 -7).

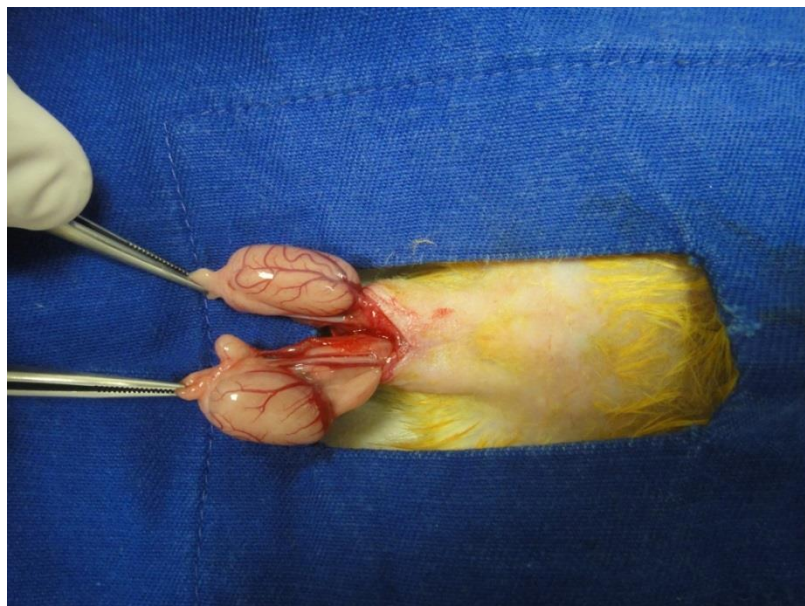


Figura 5. Foto da operação de orquiectomia bilateral.



Figura 6. Balança de precisão para pesagem dos testículos.



Figura 7. Paquímetro utilizado para aferição das medidas dos testículos.

Os fragmentos testiculares obtidos nas extremidades e centrais foram utilizados para a confecção das lâminas de histologia. Foram fixados em formol a 10%. Após, desidratados em série alcóolica crescente, diafanizados em xilol e feita inclusão em parafina. Foram obtidas secções de 5 μ m. As secções foram coradas em hematoxilina e eosina (HE) segundo técnicas usuais do Laboratório de Morfologia do Departamento de Patologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes – HUCAM (UFES) e analisadas em microscópio de luz (Olympus BX-50).

As análises histológicas quantitativas foram feitas da seguinte forma. Para a estimativa do Diâmetro dos túbulos seminíferos (DTS), foram mensuradas 30 secções transversais de túbulos, em cada testículo, escolhidos ao acaso e com o contorno mais circular possível, perfazendo um total de 60 túbulos/animal. Para tanto, as medidas foram feitas sob microscopia de luz, com ocular micrométrica

Olympus 10x, acoplada em objetiva de 4x. Para análise, utilizou-se o programa para análise de imagens Motic Images Plus 2.0 ML. Foram tomadas 2 medidas diametralmente opostas e feita a média entre elas.

As mesmas secções utilizadas para medir o diâmetro dos túbulos seminíferos foram utilizadas para a mensuração da Espessura do epitélio seminífero (EES), a qual foi tomada da túnica própria até o lúmen tubular. O valor encontrado para a espessura do epitélio seminífero, em cada túbulo, representou a média de quatro medidas tomadas nos quatro quadrantes do túbulo (90° , 180° , 270° e 360°).

Os métodos das medidas são demonstrados nas Figuras 8 e 9.

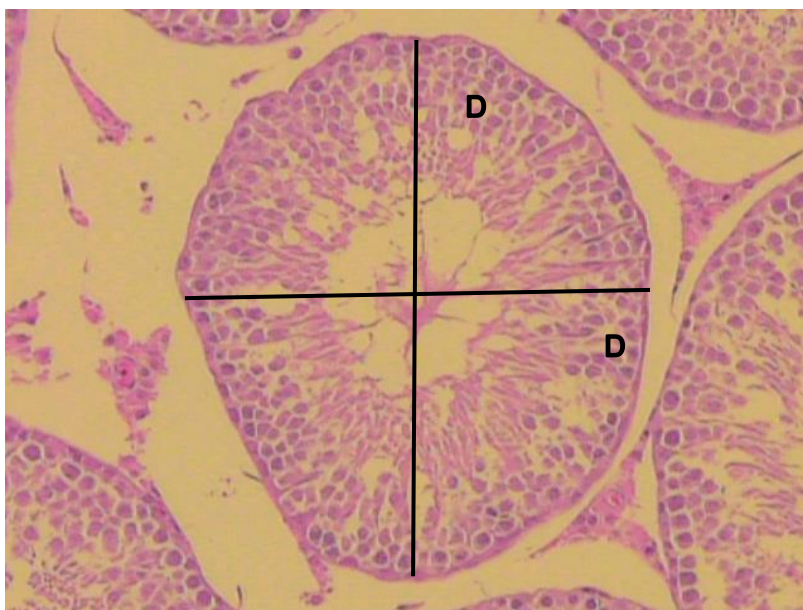


Figura 8. Fotomicrografia de secção transversal de túbulo seminífero. D: diâmetro do túbulo seminífero. Rato do grupo Controle (C). HE. Aumento de 100X.

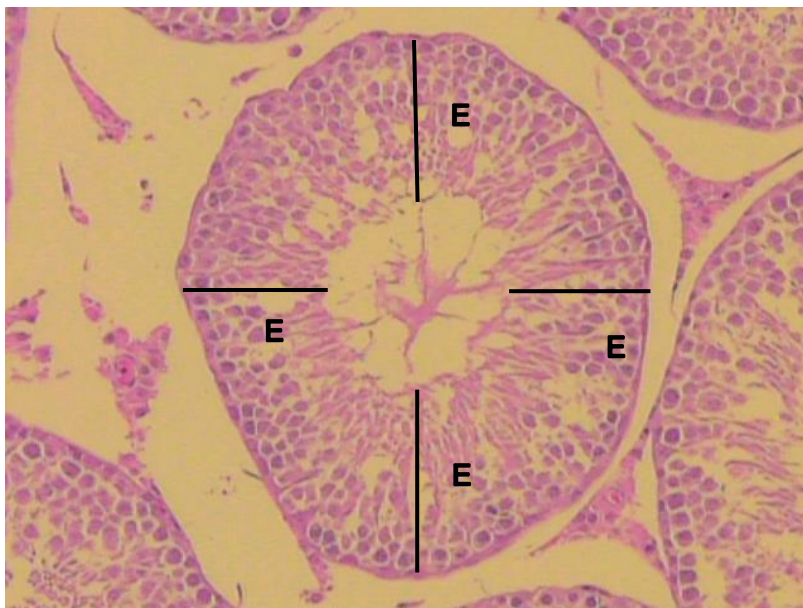


Figura 9. Fotomicrografia de secção transversal de túbulo seminífero. E: espessura do epitélio seminífero. Rato do grupo Controle (C). HE. Aumento de 100X.

Foram utilizados testes paramétricos (ANOVA) e não paramétricos (Mann-Whitney e Kruskal-Wallis), sendo valor significativo $p \leq 0,05$.

Para as variáveis Peso dos ratos foi utilizado o teste ANOVA, pois os valores tinham uma distribuição normal.

Para as variáveis Diâmetro dos túbulos seminíferos e Espessura do epitélio seminífero foram aplicados testes de estatística descritivos e feita construção de gráficos “Box-Plot” para a exploração dos dados, a fim de se saber sobre a sua distribuição (assimetria, presença ou não de outliers), e testada a normalidade dos mesmos. Observou-se pelos gráficos que as distribuições eram assimétricas e havia a presença de muitos outliers. Sustentando a hipótese de que os dados não tinham uma distribuição normal, não se puderam utilizar testes paramétricos para compará-los. Aplicou-se, então, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Para comparar os momentos das operações em cada um dos grupos, aplicou-se um teste não paramétrico, o teste de Mann-Whitney. A hipótese a ser testada era a de que o diâmetro ou espessura não diferiam entre operações. Quando o p-valor foi menor que 0,050, rejeitou-se esta hipótese, ou seja, havia diferença entre as operações.

Todos os resultados serão apresentados como mediana, média e desvio padrão.

4. RESULTADOS

Os ratos dos grupos 1 e 2 foram tratados com hCG, sendo que cada grupo recebeu doses diferentes. Os testículos foram avaliados em dois momentos diferentes para estudar os possíveis efeitos histológicos do hormônio e sua relação com a dose e momento da operação. Os grupos foram comparados entre si e com um grupo controle.

Tabela 1 - Ratos agrupados segundo grupos e operação.

Operação	Grupo	Ratos
Primeira (16 dias)	Controle	1,2,3,7 e 8
	G1(50UI/Kg)	1,2,3,7 e 8
	G2(100UI/Kg)	1,2,3,7 e 8
Segunda (45 dias)	Controle	4,5,6,9 e 10
	G1(50UI/Kg)	4,5,6,9 e 10
	G2(100UI/Kg)	4,5,6,9 e 10

As tabelas 2 a 4 apresentam os pesos dos animais no início da pesquisa, depois de 1 semana de aplicações do hormônio e no dia da respectiva operação. Foi utilizado o teste ANOVA para comparação da variável Peso dos ratos entre os grupos, pois tinha uma distribuição normal.

Tabela 2 - Estatísticas descritivas do Peso Inicial do rato segundo grupo e operação e resultados da ANOVA.

Operação	Grupo	Peso inicial (gramas)					p-valor
		Menor Valor	Maior Valor	Mediana	Média	Desvio-padrão	
Primeira	Controle	173,00	225,00	218,00	205,00	23,48	0,067
	G1	128,00	222,00	193,00	177,60	46,59	
	G2	146,00	165,00	150,00	154,60	9,15	
Segunda	Controle	133,00	179,00	139,00	152,60	22,01	0,600
	G1	102,00	196,00	166,00	154,60	39,13	
	G2	139,00	193,00	178,00	170,00	23,09	

Para a variável Peso Inicial do rato não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nas duas operações.

Tabela 3 - Estatísticas descritivas do Peso 1 semana segundo grupo e operação e resultados da ANOVA.

Operação	Grupo	Peso 1 semana (gramas)					p-valor
		Menor Valor	Maior Valor	Mediana	Média	Desvio-padrão	
Primeira	Controle	200,00	272,00	267,00	246,80	31,92	0,058
	G1	165,00	264,00	233,00	220,20	47,21	
	G2	177,00	199,00	192,00	190,00	8,28	
Segunda	Controle	171,00	213,00	194,00	193,00	17,31	0,669
	G1	150,00	233,00	212,00	198,60	33,63	
	G2	178,00	223,00	214,00	207,00	19,05	

Para a variável Peso 1 Semana não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nas duas operações.

Tabela 4 - Estatísticas descritivas do Peso do rato na operação segundo grupo e operação e resultados da ANOVA.

Operação	Grupo	Peso na Operação (gramas)					p-valor
		Menor Valor	Maior Valor	Mediana	Média	Desvio-padrão	
Primeira*	Controle	249,00	327,00	320,00	298,20 _b	34,42	0,017
	G1	200,00	312,00	262,00	256,60 _{a,b}	47,76	
	G2	197,00	246,00	216,00	221,20 _a	19,38	
Segunda	Controle	342,00	381,00	374,00	368,60	15,39	0,694
	G1	317,00	409,00	379,00	372,80	34,40	
	G2	346,00	380,00	350,00	360,00	16,55	

* Letras diferentes denotam $p < 0,050$ pelo teste de Duncan.

Para a variável Peso na operação foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos na primeira operação. O grupo Controle tinha maiores valores do que o grupo G2. O grupo G1 era semelhante aos grupos Controle e G2.

Com relação ao Peso dos testículos, foram encontrados os seguintes resultados (Tab. 5).

Tabela 5 - Estatísticas descritivas do Peso dos testículos segundo grupo e operação.

Operação	Grupo	Peso Testículos (gramas)					p-valor
		Menor Valor	Maior Valor	Mediana	Média	Desvio-padrão	
Primeira**	Controle	1,094	1,765	1,67	1,57 _b	0,24	0,000
	G1	0,863	1,302	1,03	1,05 _a	0,16	
	G2	0,559	1,244	0,84	0,88 _a	0,26	
Segunda*	Controle	1,641	2,021	1,91	1,89 _b	0,11	0,010
	G1	0,804	2,009	1,62	1,51 _a	0,42	
	G2	1,507	1,801	1,67	1,66 _{a,b}	0,09	

* ANOVA, letras diferentes mostram $p\text{-valor} < 0,050$ através do teste de Duncan

** Teste de Kruskal-Wallis, letras diferentes mostram $p\text{-valor} < 0,050$ através do teste de Dunn

Encontrada diferença estatisticamente significativa do peso dos testículos entre os grupos nas duas operações. O grupo Controle apresentou maiores valores de peso dos testículos.

Para a determinação do Volume Testicular (VT) utilizou-se a seguinte fórmula (46) (Tab. 6):

$$VT = 0,52 \times \text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{espessura (cm}^3\text{)}$$

Tabela 6 - Estatísticas descritivas do Volume testicular segundo grupo e operação.

Operação	Grupo	Volume (cm ³)				Desvio-padrão	p-valor
		Menor Valor	Maior Valor	Mediana	Média		
Primeira*	Controle	0,50	1,72	1,35	1,27 _b	0,39	0,000
	G1	0,71	1,26	0,89	0,90 _a	0,19	
	G2	0,44	1,08	0,60	0,66 _a	0,22	
Segunda**	Controle	1,19	1,70	1,51	1,49 _b	0,14	0,023
	G1	0,74	1,70	1,30	1,23 _{a,b}	0,30	
	G2	1,25	1,49	1,37	1,37 _a	0,08	

* ANOVA, letras diferentes mostram p-valor < 0,050 através do teste de Duncan

** Teste de Kruska-Wallis, letras diferentes mostram p-valor < 0,050 através do teste de Dunn

Encontrada diferença estatisticamente significativa do Volume entre os grupos nas duas operações. O grupo Controle apresentou maiores valores de volume.

Analisando-se as lâminas, observou-se que todos os ratos do Grupo Controle, independente da época da operação, apresentavam histologia testicular normal: túbulos seminíferos com tamanhos adequados e epitélio seminífero repleto de células germinativas, com arquitetura preservada (Fig. 10 e 11).

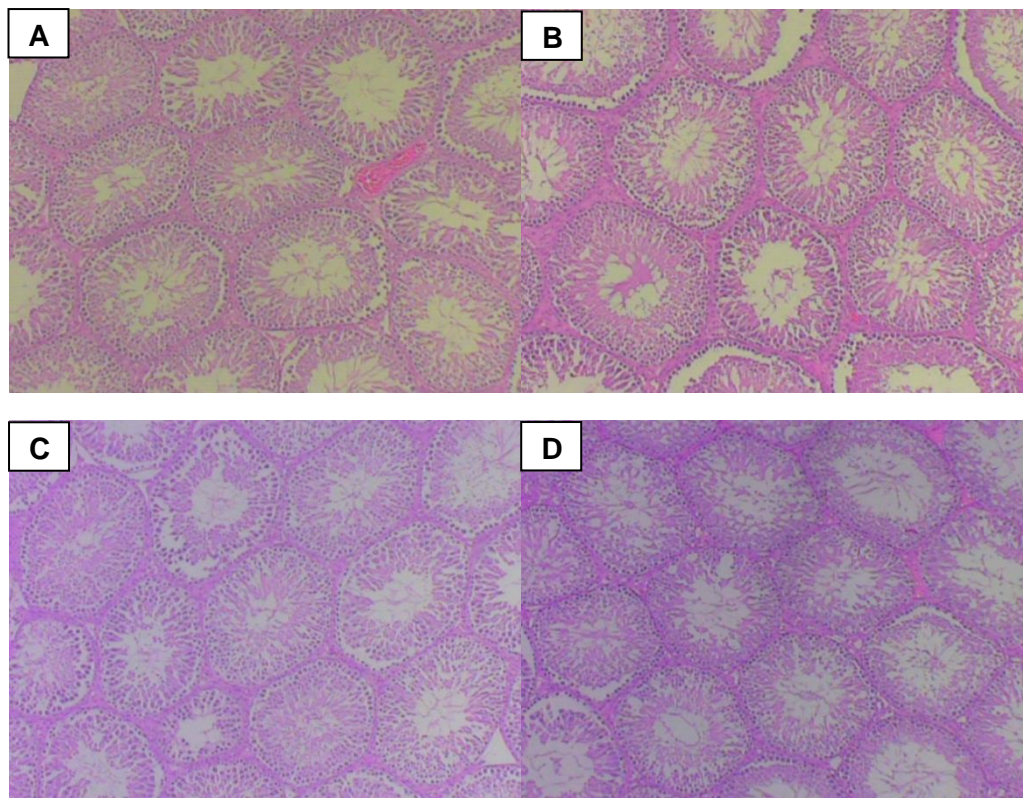


Figura 10. Fotomicrografia de Tecido Testicular. Ratos do grupo Controle (C).

Histologia testicular normal: túbulos seminíferos com tamanhos adequados e epitélio seminífero repleto de células germinativas, com arquitetura preservada. Legendas: (A) Rato 2, (B) Rato 8, (C) Rato 4, (D) Rato 10. HE. Aumento de 40X.

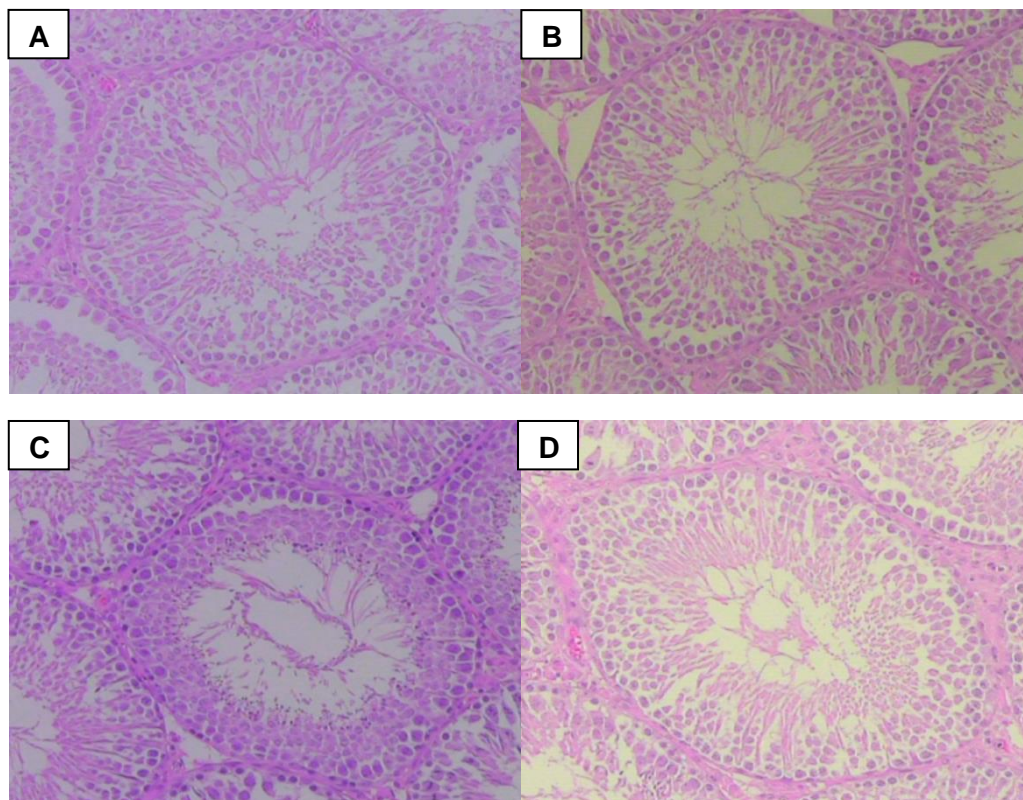


Figura 11. Fotomicrografia de Túbulo Seminífero. Ratos do grupo Controle (C). Epitélio seminífero repleto de células germinativas. Legendas: (A) Rato 1, (B) Rato 7, (C) Rato 10, (D) Rato 3. HE. Aumento de 100X.

Nos Grupos 1 e 2, observou-se, em alguns animais, uma atrofia dos túbulos seminíferos com degeneração e diminuição do número de células germinativas (apoptose). Também se observou a perda da arquitetura do epitélio com descamação de células germinativas para o lúmen, presença anormal de células gigantes multinucleadas no epitélio e vacuolização das células de Sertoli. Essas alterações foram observadas na maioria dos ratos na primeira operação, tanto no Grupo 1 quanto no Grupo 2 e em poucos ratos na segunda operação no Grupo 1 (Fig. 12-15).

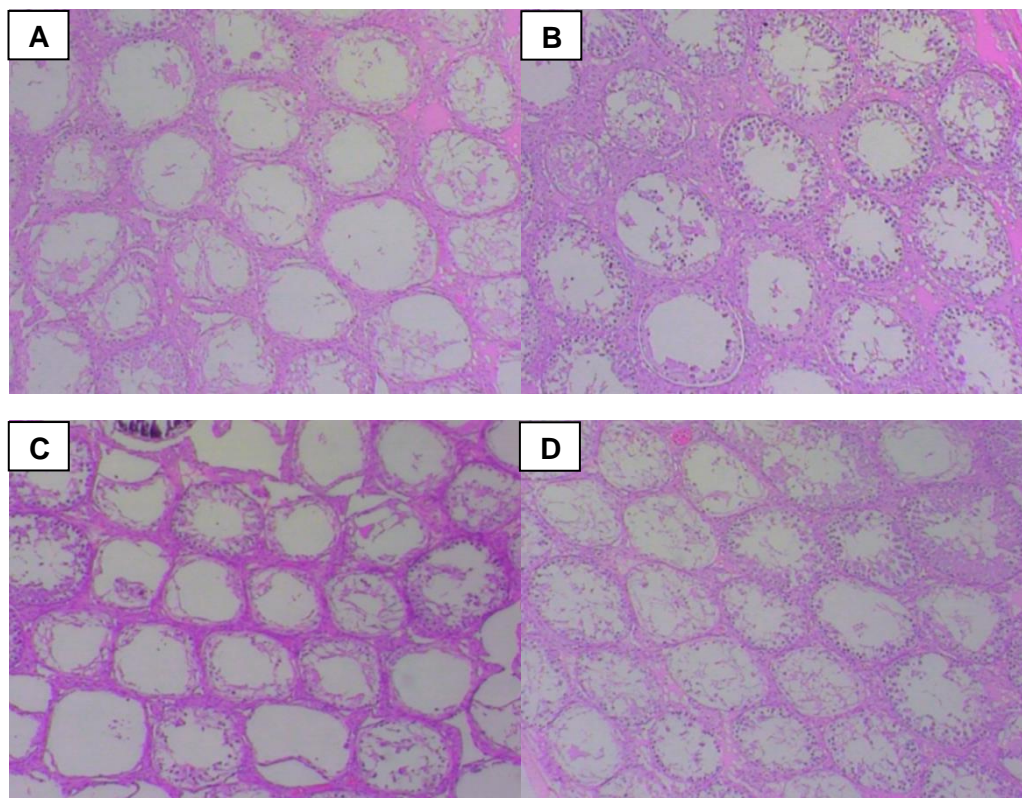


Figura 12. Fotomicrografia de Tecido Testicular. Ratos do Grupo 1 (G1). Atrofia dos túbulos seminíferos com degeneração e diminuição do número de células germinativas, descamação de células germinativas para o lúmen, presença anormal de células gigantes multinucleadas no epitélio e vacuolização das células de Sertoli. Legendas: (A) Rato 2, (B) Rato 1, (C) Rato 6 , (D) Rato 5. HE. Aumento de 40X.

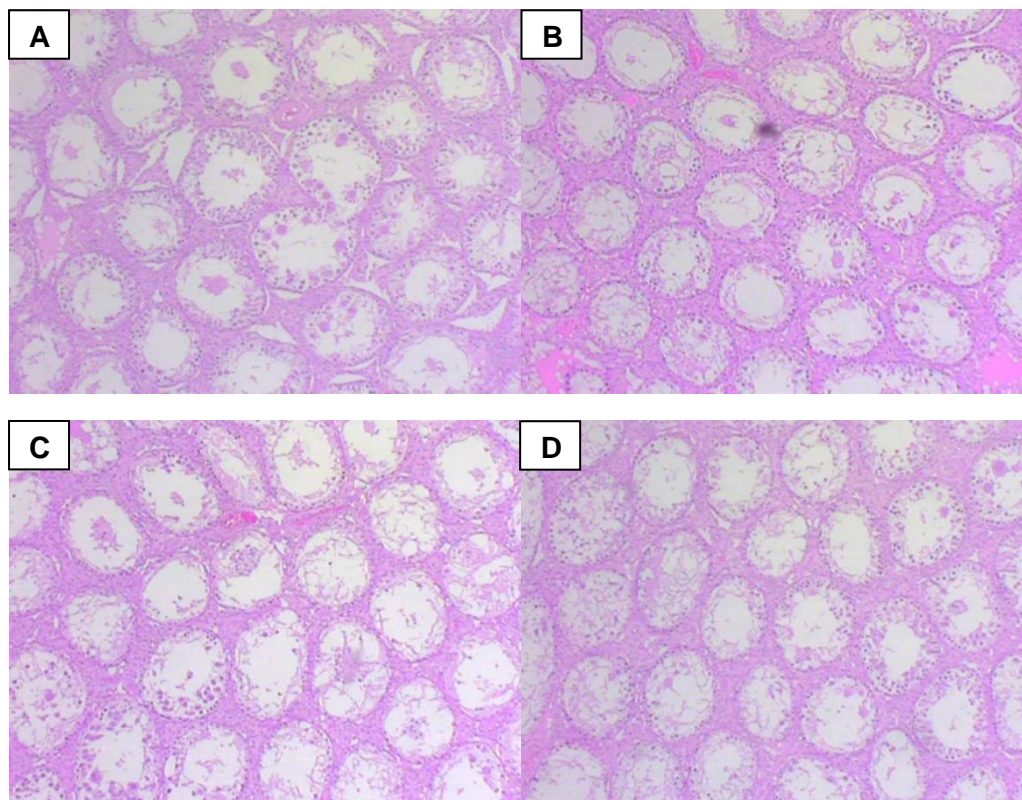


Figura 13. Fotomicrografia de Tecido Testicular. Ratos do Grupo 2 (G2). Atrofia dos túbulos seminíferos com degeneração e diminuição do número de células germinativas, descamação de células germinativas para o lúmen, presença anormal de células gigantes multinucleadas no epitélio e vacuolização das células de Sertoli. Legendas: (A) Rato 1, (B) Rato 2, (C) Rato 3 , (D) Rato 2 . HE. Aumento de 40X.

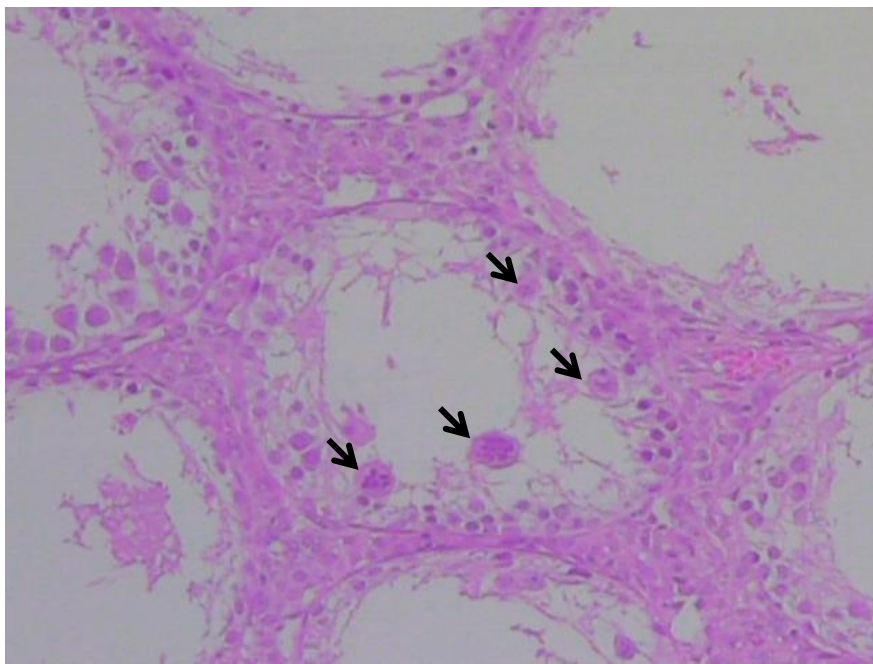


Figura 14. Fotomicrografia de Túbulo Seminífero. Presença de células gigantes multinucleadas (setas). Rato do Grupo 1 (G1). HE. Aumento de 100X.

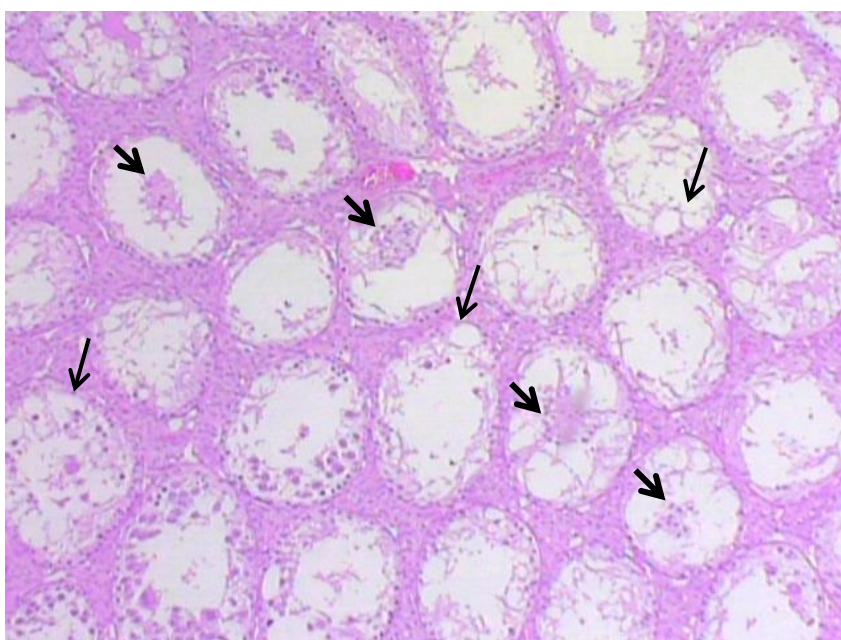


Figura 13. Fotomicrografia de Túbulo Seminífero. Descamação de células germinativas do epitélio seminífero (seta grossa) e vacuolização do epitélio (seta fina). Rato do Grupo 2 (G2). HE. Aumento de 40X.

Porém, alguns animais dos Grupos 1 e 2 apresentaram, na histologia, tecido testicular normal, incluindo ratos da primeira e da segunda operações (Fig. 16 e 17).

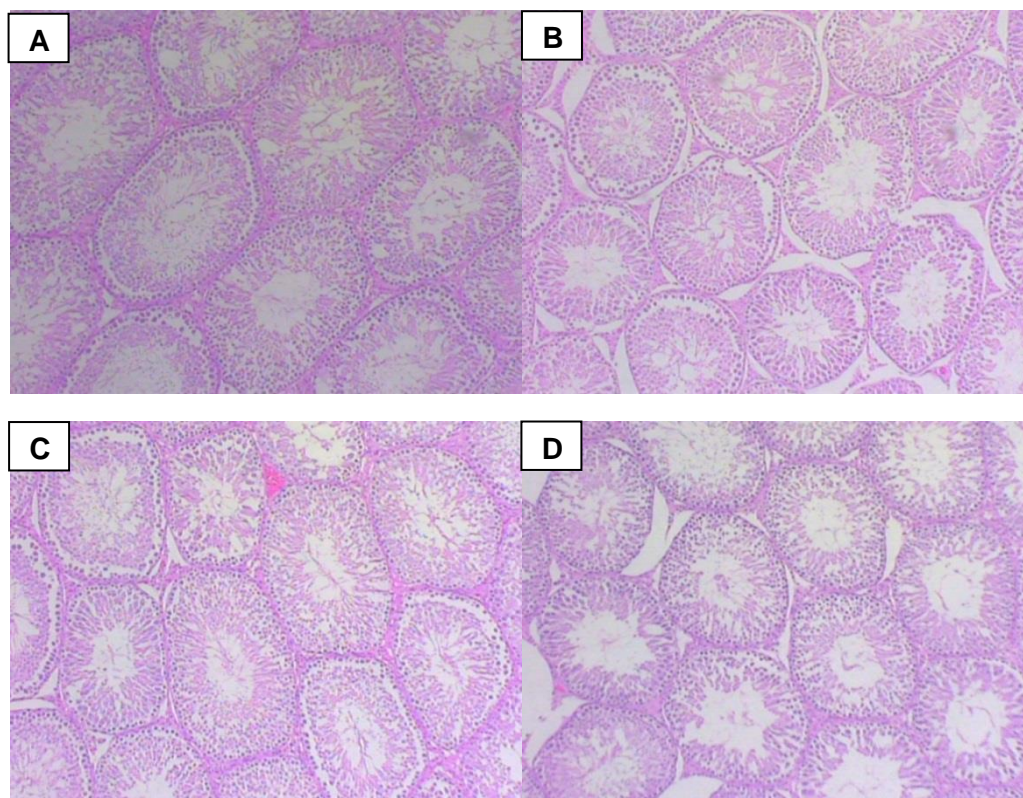


Figura 14. Fotomicrografia de Tecido Testicular. Ratos do Grupo 1 (G1). Arquitetura testicular preservada. Legendas: (A) Rato 4, (B) Rato 7, (C) Rato 9 , (D) Rato 10 . HE. Aumento de 40X.

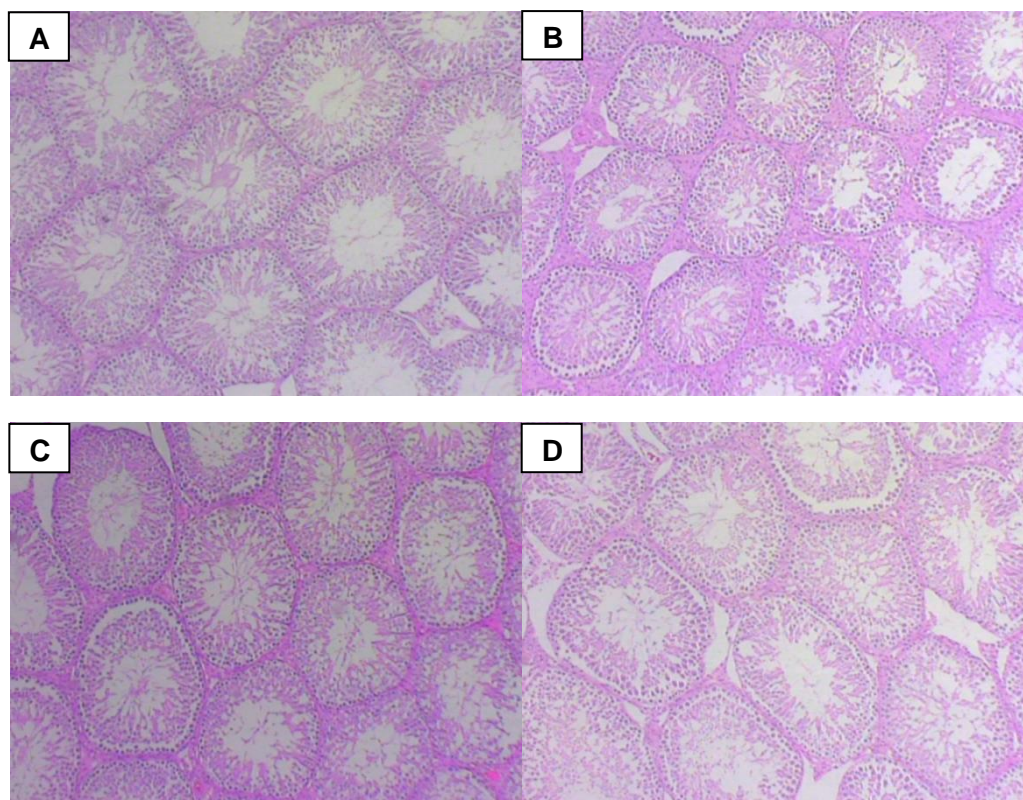


Figura 15. Fotomicrografia de Tecido Testicular. Ratos do Grupo 2 (G2). Arquitetura testicular preservada. Legendas: (A) Rato 5, (B) Rato 8, (C) Rato 10 , (D) Rato 6 . HE. Aumento de 40X.

Os valores médios do Diâmetro tubular e da Espessura do epitélio seminífero foram analisados estatisticamente (Tab. 7-10) .

Tabela 7- Estatísticas descritivas do Diâmetro do Túbulo Seminífero segundo grupo e operação.

Operação	Grupo	Diâmetro do Túbulo Seminífero (μm)				
		Menor Valor	Maior Valor	Mediana	Média	Desvio-padrão
Primeira	Controle	151,25	398,95	303,00	293,93	46,93
	G1	106,10	366,60	238,13	235,87	54,54
	G2	140,50	323,15	230,13	233,47	38,27
Segunda	Controle	161,50	382,40	306,75	299,57	42,33
	G1	114,20	410,45	299,53	285,54	57,23
	G2	146,45	391,35	302,38	297,19	41,55

Tabela 8 - Estatísticas descritivas da Espessura do Epitélio Seminífero segundo grupo e operação.

Operação	Grupo	Espessura do Epitélio Seminífero (μm)				
		Menor Valor	Maior Valor	Mediana	Média	Desvio-padrão
Primeira	Controle	32,80	117,10	76,65	73,34	18,62
	G1	11,80	95,20	41,40	46,87	23,23
	G2	12,30	93,40	48,20	49,74	17,17
Segunda	Controle	37,30	120,00	81,00	79,12	17,38
	G1	11,20	118,20	78,70	71,36	25,65
	G2	34,00	121,50	78,10	77,15	14,35

Tabela 9 - Estatísticas descritivas do Diâmetro segundo grupo e operação e resultado do teste de Kruskal-Wallis.

Operação	Grupo	Diâmetro(μm)			Resultados do teste de Kruskal-Wallis	
		Mediana	Média	Desvio-padrão	Postos Médios	p-valor
Primeira*	Controle	303,00	293,93	46,93	651,61 _a	0,000
	G1	238,13	235,87	54,54	366,93 _b	
	G2	230,13	233,47	38,27	332,97 _b	
Segunda*	Controle	306,75	299,57	42,33	480,73 _a	0,012
	G1	299,53	285,54	57,23	417,83 _b	
	G2	302,38	297,19	41,55	452,95 _{a,b}	

* Letras diferentes denotam $p < 0,050$ pelo teste de Dunn.

Observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos no diâmetro nas duas operações, sendo observado que:

1) Primeira operação: o grupo Controle tinha maiores valores do diâmetro do que o G1 e G2, que eram semelhantes entre si;

2) Segunda operação: o grupo Controle diferia e teve maiores valores somente do G1. O G2 não diferia do Controle nem do G1.

Tabela 10 - Estatísticas descritivas da Espessura segundo grupo e operação e resultado do teste de Kruskal-Wallis.

Operação	Grupo	Espessura do epitélio (μm)			Resultados do teste de Kruskal-Wallis	
		Mediana	Média	Desvio-padrão	Postos Médios	p-valor
Primeira*	Controle	76,65	73,34	18,62	640,61 _a	0,000
	G1	41,40	46,87	23,23	341,91 _b	
	G2	48,20	49,74	17,17	368,98 _b	
Segunda*	Controle	81,00	79,12	17,38	485,11 _a	0,013
	G1	78,70	71,36	25,65	424,38 _b	
	G2	78,10	77,15	14,35	442,01 _b	

* Letras diferentes denotam $p < 0,050$ pelo teste de Dunn.

Observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos na espessura nas duas operações, sendo que o grupo Controle teve maiores valores que o G1 e G2, que eram semelhantes entre si.

Para comparar os momentos das operações em cada um dos grupos, aplicou-se um teste não paramétrico, o teste de Mann-Whitney (Tab. 11-12).

Tabela 11 - Estatísticas descritivas do Diâmetro segundo grupo e operação e resultado do teste de Mann-Whitney.

Grupos	Operação	Diâmetro (μm)			Resultados do teste de Mann-Whitney	
		Mediana	Média	Desvio-Padrão	Postos Médios	p-valor
Controle	Primeira	303,00	293,93	46,93	288,13	0,081
	Segunda	306,75	299,57	42,33	312,87	
G1	Primeira	238,13	235,87	54,54	230,43	0,000
	Segunda	299,53	285,54	57,23	370,57	
G2	Primeira	230,13	233,47	38,27	186,16	0,000
	Segunda	302,38	297,19	41,55	414,85	

Foi encontrada diferença estatisticamente significativa nos grupos G1 e G2, onde na segunda operação os valores do diâmetro foram maiores.

Tabela 12 - Estatísticas descritivas da Espessura segundo grupo e operação e resultado do teste de Mann-Whitney.

Grupos	Operação	Espessura (μm)			Resultados do teste de Mann-Whitney	
		Mediana	Média	Desvio-Padrão	Postos Médios	p-valor
Controle	Primeira	76,65	73,34	18,62	273,22	0,000
	Segunda	81,00	79,12	17,38	327,78	
G1	Primeira	41,40	46,87	23,23	221,36	0,000
	Segunda	78,70	71,36	25,65	379,64	
G2	Primeira	48,20	49,74	17,17	185,27	0,000
	Segunda	78,10	77,15	14,35	415,73	

Foi encontrada diferença estatisticamente significativa em todos os grupos, onde na segunda operação os valores da espessura foram maiores.

Com relação à comparação do Peso do rato com as variáveis Diâmetro dos túbulos seminíferos, Espessura do epitélio seminífero e Volume do testículo, foram encontrados os seguintes resultados. Utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman, teste não-paramétrico (Tab 13).

Tabela 13 - Resultados da correlação Peso do rato com Diâmetro do túbulo e Espessura do Epitélio e Volume do testículo.

Variáveis testículos	Coeficiente de correlação (p-valor)		
	Peso Inicial do Rato	Peso do rato 1 Semana	Peso na operação
Diâmetro do Túbulo Seminífero	0,066 (0,729)	0,063 (0,743)	0,573* (0,001)
Espessura do Epitélio	0,184 (0,331)	0,072 (0,706)	0,509* (0,004)
Volume do Testículo	0,076 (0,691)	0,190 (0,314)	0,669* (0,000)

*Estatisticamente significativo.

Observou-se correlação estatisticamente significativa entre as variáveis do testículo com o peso do rato na operação sendo estas correlações de força moderada e positivas, ou seja, à medida que o peso do rato aumentou o Diâmetro do túbulo, a Espessura do epitélio e o Volume do testículo também aumentaram. O inverso também é verdadeiro, à medida que essas variáveis aumentam o Peso do rato também aumenta.

5. DISCUSSÃO

O testículo de mamíferos é um órgão suscetível a agentes tóxicos ambientais ou terapêuticos que comprometem a espermatogênese. A análise dos túbulos seminíferos (parâmetros morfológicos e morfométricos) é uma estratégia simples para avaliar alterações nesse processo (36).

Segundo Russell et al. (1990), o processo espermatogênico pode ser reduzido por interrupção do padrão de divisões das células tronco, degeneração e fagocitose das células germinativas, retardo na espermatogênese e descamação das células germinativas, que podem ocorrer isoladamente ou em associação no parênquima testicular por privação hormonal ou efeito tóxico de substâncias químicas (4). No presente estudo, os achados histopatológicos qualitativos e quantitativos encontrados estão de acordo com os dados da literatura.

O compartimento tubular é o principal componente do testículo na grande maioria dos mamíferos, exercendo grande influência sobre o peso testicular e sobre a produção espermática. A produção espermática é altamente correlacionada com o peso testicular, de modo que esta pode induzir a alterações no tamanho e peso testiculares, sendo potencialmente uma forma de acessar a produção de espermatozóides (3).

Com relação ao peso e ao volume testicular, os ratos do grupo Controle tiveram os maiores valores, não havendo diferença entre G1 e G2. Isso sugere que o hormônio pode afetar, de forma negativa, o tamanho e peso testicular, e, conseqüentemente, a produção espermática. Nesse estudo, a dose não foi determinante.

De maneira geral, não existe correlação significativa entre tamanho do testículo e peso corporal do animal. Para cada espécie seu tamanho é determinado por vários fatores além da influência primária do tamanho corporal, sendo o número de células de Sertoli, estabelecido no período de desenvolvimento testicular o principal responsável pelas dimensões e produção espermática (1).

O número das células de Sertoli é estabelecido durante o período pré-puberal e determina o tamanho final do testículo e o número de espermatozoides produzidos em animais adultos. Isto ocorre devido ao fato de que as divisões das células de Sertoli terminam antes da puberdade, tornando-se uma população estável, além de terem capacidade de suporte de células germinativas limitado, sendo esta característica espécie específica (1). Então, se ocorrer um dano a estas células, induzido pela terapia hormonal, esse poderia ser prejudicial à fertilidade futura. Isso é sugerido por este presente estudo, através da análise qualitativa das lâminas. Porém, não foi feita uma análise quantitativa específica com contagem de células de Sertoli e células germinativas, como em outros trabalhos.

Neste estudo, observou-se correlação entre as variáveis do testículo com o peso do rato na operação sendo estas correlações de força moderada e positivas, ou seja, à medida que o Peso do rato aumentou o Diâmetro do túbulo, a Espessura do Epitélio e o Volume do testículo também aumentaram. Sendo o inverso também verdadeiro.

A medida do diâmetro tubular é uma abordagem classicamente utilizada como indicador da atividade espermatogênica em investigações envolvendo a função testicular. A espessura do epitélio seminífero também é uma característica

efetiva para a avaliação da produção espermática, uma vez que acompanha as variações do ciclo do epitélio seminífero e de células mióides (37).

No presente estudo, comparando-se os grupos, observou-se que na primeira operação o Diâmetro dos túbulos seminíferos foi maior no grupo Controle em relação a G1 e G2, sendo G1 e G2 semelhantes entre si. Isso mostra que os grupos tratados com hormônio tiveram mudanças significativas em seus testículos apresentando médias abaixo do grupo Controle, mas que a dose do hormônio não provocou uma diferença estatística entre G1 e G2 nesse parâmetro.

Na segunda operação, os valores do grupo Controle foram maiores do que os do G1 e o G2 não diferia do Controle nem do G1.

Porém, apesar de valores de diâmetro menores nos G1 e G2, ainda se encontravam dentro dos padrões para os mamíferos eutéricos adultos, variando entre 180 μm a 300 μm (2).

Em relação à Espessura do epitélio seminífero, tanto na primeira quanto na segunda operação os valores do grupo Controle foram maiores que o G1 e G2, que são semelhantes entre si. Isso sugere novamente que houve um efeito prejudicial do hormônio, mas que a dose também não influenciou nesses resultados. E neste caso, a maioria dos valores encontrados em G1 e G2 foi menor que os valores padrões, que variam entre 60 μm a 100 μm , para a maioria dos animais domésticos (2).

Dentro de cada grupo, com relação à época da realização da operação, foi encontrada diferença estatisticamente significante nos grupos G1 e G2, onde na segunda operação tanto os valores do Diâmetro quanto os da Espessura foram maiores, podendo-se sugerir que houve uma recuperação desses parâmetros na

segunda operação, que foi realizada 30 dias após o término das aplicações do hormônio, 45 dias após o início do trabalho. Isso pode ser justificado pela duração do ciclo do epitélio seminífero, que é de 40 a 60 dias nos ratos, já se tendo iniciado um novo ciclo na época da segunda operação (5).

As alterações qualitativas observadas na histologia dos testículos em alguns animais dos Grupos 1 e 2, como atrofia dos túbulos seminíferos com degeneração e diminuição do número de células germinativas (apoptose), perda da arquitetura do epitélio com descamação de células germinativas para o lúmen, presença anormal de células gigantes multinucleadas no epitélio e vacuolização das células de Sertoli, são também descritas em outros estudos envolvendo efeitos de drogas em testículos de ratos (27). Essas alterações foram observadas na maioria dos ratos na primeira operação, tanto no Grupo 1 quanto no Grupo 2 e em poucos ratos na segunda operação no Grupo 1. Isto sugere também uma recuperação, pelo menos parcial, da histologia testicular normal com o passar do tempo, sem exposição ao hormônio, como ocorreu na segunda operação.

Em mamíferos, a apoptose de células germinativas é parte integral da espermatogênese, ocorrendo normalmente em várias fases do desenvolvimento (38). O equilíbrio entre proliferação e apoptose desempenha papel fundamental na regulação da população de células germinativas no epitélio seminífero, mantendo a homeostasia do processo espermatogênico, refletindo diretamente na produção espermática diária, característica de cada espécie (4,39). A apoptose também elimina células com possíveis defeitos ou contendo mutações no DNA. As degenerações espontâneas resultam em perdas de cerca de 75% do potencial teórico esperado de espermatozóides maduros de roedores (33,39, 40).

No atual estudo foram observadas células apoptóticas em alguns túbulos seminíferos, porém para melhor avaliação seria necessário usar um kit especial específico para detectar apoptose *in situ*, como os utilizados em outros trabalhos (32). Os efeitos encontrados neste trabalho se assemelham aos efeitos observados em trabalhos experimentais que induzem criptorquia em ratos, como apoptose de células germinativas e formação de células gigantes multinucleadas (32,33). Provavelmente causados pelo efeito de retirada hormonal, com baixas doses de testosterona intratesticular sendo a principal causa. Porém, neste estudo não foram feitas as dosagens de testosterona sérica, o que poderia comprovar essa teoria.

Em geral, a morte celular programada pode ser ativada por duas vias diferentes, ou pela presença de um indutor tecidual específico ou pela queda dos níveis de um fator trófico tecido específico, por exemplo, um hormônio. Além disso, por serem responsáveis pela iniciação e manutenção da espermatogênese, tem sido demonstrado que esses hormônios agem como fatores de sobrevivência para as células testiculares (33).

Já foi observado que tanto as gonadotrofinas, como a testosterona, desempenham papel essencial em prevenir a apoptose de células testiculares. Como as flutuações nos níveis de gonadotrofinas são desprezíveis, a queda nas taxas de testosterona intratesticular parece ser a principal responsável pelo desencadeamento da morte celular tanto em forma de necrose como de apoptose em testículos crípticos (32).

Assim, sugere-se que a taxa aumentada de apoptose encontrada nos testículos 0-1mês após o tratamento com hCG (ou androgênio) é causada pela retirada hormonal e não pelo efeito direto do hormônio (33). O tratamento

intramuscular com hCG aumenta as taxas de testosterona sérica em até 100 vezes e esse aumento é seguido de uma fase de queda gradual do efeito hormonal. Nesse estudo clínico finlandês, observou-se que o efeito da hCG na indução de apoptose não é permanente, revertendo-se aos 1-3 meses e 3-14 meses após o término do uso da hCG, com taxas de apoptose semelhante ao grupo controle.

A formação de células gigantes multinucleadas é observada como sendo uma das características típicas no epitélio seminífero dos testículos crípticos. São responsáveis pela remoção de células danificadas. A ocorrência dessas células é uma resposta não específica contra o estresse induzido como resultado de várias condições que rompem a espermatogênese como aumento da temperatura local, estresse oxidativo e queda dos níveis intratesticulares de testosterona (32).

O aparecimento de células multinucleadas também é conhecido como sendo associado à via final comum de degeneração de células germinativas em animais tratados com diferentes agentes químicos. O mecanismo de formação dessas células gigantes é desconhecido, porém a fusão celular de espermatídes danificadas é especulada como sendo a razão provável. Também é pensado que essas células gigantes possam ser formadas devido à cariocinese (divisão do núcleo celular), que não seria seguida de citocinese (divisão do citoplasma e da célula toda). A ausência de figuras de mitose e a presença de resíduos de membranas nessas células suportam a hipótese de serem resultantes da fusão celular (27).

A descamação do epitélio geralmente ocorre devido ao dano às células de Sertoli e interrupção das pontes intercelulares, normalmente presentes no epitélio seminífero. O exato mecanismo envolvendo a citotoxicidade da hCG não é conhecido porém efeitos similares são reportados em outros estudos. A formação de

substâncias endógenas pode afetar tanto as células de Sertoli como as pontes entre as células germinativas e resultar em destruição da associação celular com posterior descamação do epitélio (27).

Um grande número de investigadores tem usado modelos experimentais animais para estudar a criptorquia buscando entender melhor a sua etiologia, fisiopatologia e tratamentos (35).

O tratamento da criptorquia baseia-se nas seguintes questões: facilidade na palpação de tumores se o testículo encontra-se na bolsa escrotal, potencial melhora da fertilidade, diminuição do risco de torção do testículo e tratamento de hérnia inguinal associada (41).

A criptorquia é associada à subfertilidade (20). A infertilidade deve ser a primeira preocupação no tratamento da criptorquia uni ou bilateral (30,42). A análise do testículo contralateral demonstra que a criptorquia é uma doença bilateral e a infertilidade é uma endocrinopatia.

As alterações histomorfométricas dos testículos crípticos suportam a hipótese de que algum grau de deficiência de gonadotrofina e androgênio ocorre durante a gestação e no período pós-natal em meninos com criptorquia (29). A maioria dos testículos crípticos tem malformações congênicas do epidídimo, cujo crescimento e desenvolvimento dependem da gonadotrofina coriônica e androgênios durante a gestação. Além disso, muitos testículos crípticos têm um número reduzido de células de Leydig e alguns têm número reduzido de células germinativas ao nascimento. O aumento pós-natal dos níveis de gonadotrofinas e testosterona, que ocorre normalmente em meninos aos 2-3 meses de idade, não ocorre em meninos com criptorquia (29). Um total severamente reduzido na contagem de células

germinativas é encontrado em biópsias de testículos crípticos pré-púberes e está associado a uma espermiograma pobre em adultos (20).

Estudos mostram que essas alterações histológicas podem ocorrer até 1 ano de idade. Essa observação sugere que o tratamento cirúrgico precoce para a colocação do testículo na bolsa escrotal pode prevenir que mudanças histológicas ocorram, o que poderia melhorar a fertilidade em adultos (28,43).

Uma subestimulação dos testículos por falta de gonadotrofinas durante a gestação e período pós-natal podem ser considerados a maior causa de insuficiência de células germinativas em meninos com criptorquia, levando a subfertilidade nos adultos (29). O que justificaria o uso da terapia hormonal.

O objetivo do tratamento atual da criptorquia, incluindo orquidopexia e tratamento hormonal, é melhorar o potencial de fertilidade melhorando a maturação e o número de células germinativas em meninos pré-púberes. O momento do tratamento tem sido baseado no conhecimento de que o atraso e o defeito na maturação pré-puberal das células germinativas é associado à redução no número de células germinativas na criptorquia (20). O tratamento pré-puberal com hormônios poderia teoricamente alcançar uma maturação e proliferação normal das células germinativas aumentando o número total dessas células e melhorando as taxas de fertilidade (44).

A orquiopexia precoce e aparentemente bem sucedida, sozinha, não melhora a fertilidade em um número grande de meninos porque não aborda a fisiopatologia da criptorquia, que é o defeito na transformação de gonócitos em Ad espermatogônias (42). Estudos mostram aumento no número das células germinativas em meninos tratados cirurgicamente com sucesso e que receberam

LHRH no pós-operatório, com contagem normal no espermograma quando adultos (45). Para eles, a biópsia testicular seria a única maneira de identificar aqueles meninos que necessitariam de tratamento hormonal após o tratamento cirúrgico, sendo, portanto, feita rotineiramente durante a orquiopexia (45). Reconhecendo que a endocrinopatia é a responsável pela infertilidade, a terapia hormonal deveria ser implementada em meninos que foram tratados cirurgicamente com sucesso, mas que ainda têm risco de infertilidade futura, identificados pela biópsia (42).

A terapia hormonal com hCG com ou sem análogos do GnRH é utilizada em alguns centros para induzir a descida dos testículos, anteriormente ao tratamento cirúrgico. Mas há estudos que sugerem uma indicação adicional para a terapia hormonal utilizando análogos do GnRH após a orquiopexia para estimular a maturação e proliferação de células germinativas e aumentar as taxas de fertilidade, com resultados positivos (8,15,21,23,25,44).

Porém, efeitos adversos da hCG sobre a histologia testicular têm sido estudados e demonstrados em muitos outros trabalhos clínicos e experimentais, alguns mostrando poucos benefícios no tratamento hormonal da criptorquia e até mesmo efeitos deletérios (12,16,17,26,30, 33- 35, 47).

A avaliação quanto à segurança do tratamento hormonal fica prejudicada porque os estudos divergem bastante quanto à metodologia utilizada. Diferem quanto ao tipo e dose de hormônio utilizado, além da duração do tratamento e o tempo para avaliação histológica dos testículos após a terapia hormonal (aguda ou crônica). Mais estudos, clínicos e experimentais, são necessários para embasar o uso da terapia hormonal no tratamento da criptorquia, visando resultados mais seguros e satisfatórios principalmente quanto à fertilidade na vida adulta. Por isso, e

pelo demonstrado neste estudo, não indicamos o uso da terapia hormonal em criptorquia em nosso serviço.

6. CONCLUSÃO

Considerando os objetivos e a metodologia utilizada conclui-se que:

1. A gonadotrofina coriônica humana é gonadotóxica em ratos normais, e pode determinar degeneração testicular, com indução de apoptose, formação de células gigantes multinucleadas e descamação do epitélio germinativo.
2. O efeito gonadotóxico foi temporário e não atingiu 100% dos ratos tratados. Alguns ratos tanto do G1 quanto do G2 tinham histologia normal na primeira operação. Observou-se recuperação, pelo menos parcial, da histologia testicular normal com o passar do tempo, sem exposição ao hormônio, como ocorreu na segunda operação.
3. Nesse estudo não se pôde comprovar a recuperação total dos danos testiculares no intervalo estudado, não se podendo concluir que essas mudanças sejam prejudiciais à espermatogênese e à fertilidade futura.
4. Os efeitos da hCG no testículo não foram dose dependentes.
5. O rato mostrou-se um modelo confiável, podendo ser utilizado em outros estudos para avaliação dos eventos celulares, bioquímicos e moleculares que ocorrem nos testículos.

7. REFERÊNCIAS

1. Takashiba KS, Segatelli TM, de Moraes SMF, Natali MRM. Morfologia testicular de ratos Wistar obesos sedentários e submetidos a treinamento físico. *Acta Scientiarum*. 2011; 33(1): 25-33.
2. Murta DVF, Gomes VCL, Martinez LCR. A organização celular dos testículos de mamíferos. *Revista científica Eletrônica de medicina veterinária* – ISSN: 1679-7353. Ano XI – Número 20 – Jan 2013.
3. França, LR; Russell, LD The testis of domestic mammals. In: Regadera J, Martinez- Garcia F (Eds). *Male reproduction- A multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Livingstone. 1998, p.197-219.
4. Russell LD, Sinhá- Hikim AP, Ettlin RA, Clegg ED. *Evaluation of the testis: histological and histopathological*. 1ª ed. Cache River Press, 1990. p 286.
5. Costa DS, de Paula TAR. Espermatogênese em mamíferos. *Scientia Vila Velha*. 2003; 4: 53-72.
6. Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil. E, Neill, J.D. (Eds). *The physiology of reproduction*, ed. 2, New York: Raven Press., v. 1, cap. 22, p. 1363-1434, 1994.
7. Silva Júnior VA, Vieira ACS, Pinto CF et al. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. *Reproduction Nutrition. Development*. 2006; 45: 1-10.
8. Karaman IM, Kaya C, Ozturk M, Pirincci N, Yimazgumrukcu G, Tuken M. The effects of human chorionic gonadotrophin on normal testicular tissue of rats: dose-dependence and reversibility. *BJU Int*. 2006; 97:1116-18.
9. Lanna JCBD, Sobrinho JMDL. Distopias Testiculares. In: Maksoud JG. *Cirurgia Pediátrica*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. P. 689-705.
10. Mathers MJ, Sperling H, Rübber H, Roth S. The undescended testis: Diagnosis, treatment and long-term consequences. *Dtsch Arztebl Int*. 2009; 106(33):527-32.
11. Hjertkvist M, Lackgren G, Ploen L, Bergh A. Does HCG treatment induce inflammation-like changes in undescend testes in boys? *J Pediatr Surg*. 1993 Feb; 28(2):254-8.


12. Dunkel L, Taskinen S, Hovatta O, Tilly JL, Wikstrom S. Germ cell apoptosis after treatment of cryptorchidism with human chorionic gonadotropin is associated with impaired reproductive function in the adult. *J Clin Invest.* 1997 Nov; 100(9):2341-46.
13. Thorsson AV, Christiansen P, Ritzén M. Efficacy and safety of hormonal treatment of cryptorchidism: current state of the art. *Acta Paediatr.* 2007; 96: 628-30.
14. Hutson, JM. Undescended Testis, Torsion, and Varicocele. In: Coran AG, Adzick NS, Krummel TM, Laberge JM, Shamberger R, Caldamone A. *Pediatric Surgery.* ed. 7, Philadelphia: Elsevier; 2012, v. 2, cap. 77, p.1003-19.
15. Hadziselimovic F. Hormonal treatment of undescended testis. *J Ped Endocrinol.* 1987; 2:1-5.
16. Cortes D, Thorup J, Visfeldt J. Hormonal treatment may harm the germ cells in 1 to 3 year-old boys with cryptorchidism. *J Urol.* 2000 Apr; 163:1290-92.
17. Léon MD, Chiauzzi VA, Calvo JC, Charreau EH, Chemes HE. Acute hCG administration induces seminiferous tubule damage in the adult rat. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam.* 1987; 37(2): 277-88.
18. Miller OF, Stock JA, Cilento BG, McAleer IM, Kaplan GW. Prospective evaluation of human chorionic gonadotropin in the differentiation of undescended testes from retractile testes. *J Urol.* 2003 Jun; 169:2328-31.
19. Chagas AJ, Silva IN, Oliveira Junior DF. Gonadotrofina coriônica humana: uma opção para o tratamento de criptorquia. *J Pediatría.* 1994; 70(6): 326-330.
20. Huff DS, Fenig DM, Canning DA, Carr MC, Zderic SA, Snyder III HM. Abnormal germ cell development in cryptorchidism. *Horm Res.* 2001; 55: 11-17.
21. Zivkovic D, Bica DG, Hadziselimovic F. Effects of hormonal treatment on the contralateral descended testis in unilateral cryptorchidism. *J Ped Urol.* 2006; 2:468-72.
22. Hadziselimovic F, Herzog B. Importance of early postnatal germ cell maturation for fertility of cryptorchid males. *Horm Res.* 2001; 55: 6-10.
23. Schwentner C, Oswald J, Kreczy A, Lunadek A, Bartsch G, Deibl M, Radmayr C. Neoadjuvant gonadotropin-releasing hormone therapy before surgery may

- improve the fertility index in undescended testes: a prospective randomized trial. *J Urol*. 2005 May; 173: 974-7.
24. Hadziselimovic F, Herzog B. The importance of both an early orchidopexy and germ cell maturation for fertility. *Lancet*. 2001 Oct; 358: 1156-7.
 25. Jallouli M, Rebai T, Abid N, Bendhaou M, Kassis M, Mhiri R. Neoadjuvant gonadotropin-releasing hormone therapy before surgery end effect on fertility index in unilateral undescend testes: a prospective randomized trial. *Pediatr Urol*. 2009; 73:1251-54.
 26. Chandrasekharam VVSS, Srinivas M, Das SN, Jha P, Bajpai M, Chaki SP, Misro MM. Prepubertal human chorionic gonadotropin injection affects postpubertal germ cell maturation and androgen production in rat testis. *Urol*. 2003; 62: 571-4.
 27. Urban JA. Tamoxifen induced multinucleated cells (symplasts) and distortion of seminiferous tubules in rat testis. *Asian J Androl*. 2003; 5:217-20.
 28. Taskinen S, Wikström S. Effect of age at operation, location of testis and preoperative hormonal treatment on testicular growth after cryptorchidism. *J Urol*. 1997 Aug; 158: 471-3.
 29. Lala R, Matarazo P, Chiabotto P, Gennari F, Cortese MG, Canavese F, Sanctis C. Early hormonal and surgical treatment of cryptorchidism. *J Urol*. 1997 May; 157: 1898-901.
 30. Ritzén ME, Bergh A, Bjerknes R, Christiansen P, Cortes D, Haugen SE, et al. Nordic consensus on treatment of undescend testes. *Acta Paediatr*. 2007; 96:638-43.
 31. Gautam DK, Misro MM, Chaki SP, Chandra M, Sehgal N. hCG treatment raises H₂O₂ levels and induces germ cell apoptosis in rat testis. *Apoptosis*. 2007; 12:1173-82.
 32. Chaki SP, Misro MM, Ghosh D, Gautam DK, Srinivas M. Apoptosis and cell removal in the cryptorchid rat testis. *Apostosis*. 2005; 10: 395-405.
 33. Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, Arsalo A, Rapola J, Dunkel L. Apoptotic cell death in the normal and cryptorchid human testis: the effect of human chorionic gonadotropin on testicular cell survival. *Pediatr Res*. 1996; 40: 351-6.
 34. Udagawa K, Takeda M, Hosaka M, Kubota Y, Ogawa T. Recovery of spermatogenesis by high dose gonadotropin-releasing hormone analogue

- treatment in rat cryptorchid testis after orchiopexy. *J Urol.* 2002 Sep; 168: 1279-83.
35. Bergh A, Söder O. Studies of cryptorchidism in experimental animal models. *Acta Paediatr.* 2007; 96: 617-21.
 36. Pannocchia MA, Borella MI, de Camargo ACM, Gilio JM, da Silva CA. Estratégia efetiva de fixação do testículo de ratos Wistar para avaliar os parâmetros morfológicos e morfométricos do epitélio seminífero. *ConScientiae Saúde.* 2008; 7(2): 227-233.
 37. De Paula, TAR. Análise histométrica e funcional do testículo de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adulta. 1999. 84 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, 1999.
 38. Blanco RJ, Martínez GC. Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif.* 1996; 29: 13-31.
 39. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev.* 1972; 52: 198-236.
 40. De Rooij DG. Stem cells in the testis. *Int J Exp Pathol.* 1998; 79(2): 67-80.
 41. Bukowski TP, Sedberry S, Richardson B. Is human chorionic gonadotropin useful for identifying and treating nonpalpable testis? *J Urol.* 2001 Jan; 165: 221-3.
 42. Hadziselimovic F, Zivkovic D. Is the prohibition of hormonal treatment for cryptorchidism, as suggested by the Nordic consensus group, justifiable? *Acta Paediatr.* 2007; 96:1368-79.
 43. Penson DF, Lugg JA, Christopher C, Sadeghi F, Freedman AL, Gonzales-Cadavid NF, Rajfer J. Effect of cryptorchidism on testicular histology in a naturally cryptorchid animal model. *J Urol.* 1997 Nov; 158: 1978-82.
 44. Huff DS, Snyder HM, Rusnack SL, Zderic SA, Carr MC, Canning DA. Hormonal therapy for the subfertility of cryptorchidism. *Horm Res.* 2001; 55:38-40.
 45. Hadziselimovic F. Successful treatment of unilateral cryptorchid boys risking infertility with LHRH analogue. *Ped Urol.* 2008; 34(3): 319-28.
 46. Cimador M, Dipace MR, Castagnetti M, Degrazia E. Predictors of testicular viability in testicular torsion. *J Pediatr Urol.* 2007; 3(5): 387-90.

47. Henna MR. Terapia Hormonal para Criptorquidia com Hormônio Gonadotrofina Coriônica Humana (HCG). Ensaio Clínico Randomizado duplo cego placebo controlado. 2006. 71f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina / UNIFESP, São Paulo/ SP.

8. ANEXOS

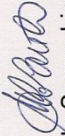


EMESCAM
Tradição e Conhecimento em Saúde


CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 005/2012, relativo ao projeto intitulado “Efeitos da Gonadotrofina Coriônica Humana no Tecido Testicular Normal de Ratos”, que tem como responsável **Danilo Nagib Salomão Paulo** está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, Adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-EMESCAM), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 06/10/2012. Este certificado expira-se em 06/10/2016.

We hereby certify that the Protocol nº 005/2012, related to the project entitled **Effects of Human Chorionic Gonadotropin on Normal Testicular Tissue of Rats**, under the supervision of **Danilo Nagib Salomão Paulo**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA-EMESCAM), and was approved in 06/10/2012.



Marcela Souza Lima Paulo
Coordenadora Adjunta do CEUA-EMESCAM





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UFMG

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 297 / 2012, relativo ao projeto intitulado "EFEITOS DA GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NO TECIDO TESTICULAR NORMAL DE RATOS. ", que tem como responsável Edson Samesima Tatsuo, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 25/10/2012. Este certificado expira-se em 25/10/2017.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 297 / 2012, related to the Project entitled "Effects of Human Chorionic Gonadotropin on normal testicular tissue of rats. ", under the supervision of Edson Samesima Tatsuo, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 25/10/2012. This certificate expires in 25/10/2017.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 25/10/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil

Telephone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À
OFTALMOLOGIA

UFMG

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA PATRICIA MAGNAGO ALTOÉ

Realizou-se, no dia 03 de fevereiro de 2014, às 14:00 horas, Faculdade de Medicina - UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *EFEITOS DA GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NO TECIDO TESTICULAR NORMAL DE RATOS.*, apresentada por PATRICIA MAGNAGO ALTOÉ, número de registro 2012655461, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Edson Samesima Tatsuo - Orientador (UFMG), Prof(a). Denny Fabrício Magalhães Veloso (UFSJ). Prof(a). Marcelo Eller Miranda (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

☒ Aprovada

☐ Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 03 de fevereiro de 2014.


Prof(a). Edson Samesima Tatsuo (Doutor)


Prof(a). Denny Fabrício Magalhães Veloso (Doutor)


Prof(a). Marcelo Eller Miranda (Doutor)

CONFERE COM ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À
OFTALMOLOGIA

UFMG


FOLHA DE APROVAÇÃO

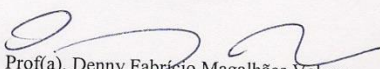
EFEITOS DA GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NO TECIDO
TESTICULAR NORMAL DE RATOS.

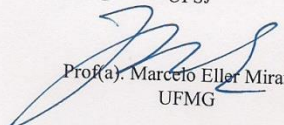
PATRICIA MAGNAGO ALTOÉ

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, área de concentração ANATOMOFISIOPATOGENIA CIRÚRGICA,

Aprovada em 03 de fevereiro de 2014, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Edson Samesima Tatsuo - Orientador
UFMG


Prof(a). Denny Fabrício Magalhães Veloso
UFSJ


Prof(a). Marcelo Eller Miranda
UFMG

Belo Horizonte, 3 de fevereiro de 2014.