

REGINALDO MARTELLO

**EFEITOS DA RADIOTERAPIA E HORMONIOTERAPIA NA  
ESPERMATOGÊNESE DE PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

Tese de Doutorado

Faculdade de Medicina  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte – MG

2013

REGINALDO MARTELLO

**EFEITOS DA RADIOTERAPIA E HORMONIOTERAPIA NA  
ESPERMATOGÊNESE DE PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

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, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Medicina.

Área de Concentração: Cicatrização

Linha de Pesquisa: Estudo histofuncional da parede abdominal e distopia testicular

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Samesima Tatsuo

COORIENTADOR: Prof. Dr. Hélio Chiarini-Garcia

Belo Horizonte – MG

2013

Martello, Reginaldo.  
M376e Efeitos da radioterapia e hormonioterapia na espermatogênese de  
pacientes com câncer de próstata [manuscrito]. / Reginaldo Martello. - -  
Belo Horizonte: 2013.  
93f.: il.  
Orientador: Edson Samesima Tatsuo.  
Co-Orientador: Hélio Chiarini-Garcia.  
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de  
Medicina.

1. Neoplasias da Próstata/radioterapia. 2. Espermatogênese/efeitos de  
radiação. 3. Testosterona/antagonistas & inibidores. 4. Orquiectomia. 5.  
Dissertações Acadêmicas. I. Tatsuo, Edson Samesima. II. Chiarini-Garcia,  
Hélio. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.  
IV. Título.

NLM: WJ 834

Efeitos da radioterapia e hormonioterapia na espermatogênese de pacientes com câncer de próstata

REGINALDO MARTELLO

Nível: Doutorado

Data da defesa: 19/12/2013

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 de Qualificação formada pelos professores:

Prof. Dr. Edson Samesima Tatsuo (Orientador) – UFMG

Prof. Dr. Marcelo Eller Miranda – UFMG

Prof. Dr. Fernando Marcos Reis – UFMG

Prof. Dr. Fernando Lorenzini – UFPR

Prof. Dr. Sidney Glina – FMABC

Prof. Dr. Bruno Mello Rodrigues dos Santos – UFMG (suplente)

Prof. Dr. Denny Fabrício Magalhães Veloso – UFSJ (suplente)

## UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Reitor:** Prof. Dr. Clélio Campolina Diniz

**Vice-Reitora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rocksane de Carvalho Norton

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

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

FACULDADE DE MEDICINA

**Diretor:** Prof. Dr. Francisco José Penna

**Vice-Diretor:** Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

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

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia**

Coordenador: Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Subcoordenadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivana Duval de Araújo

**Colegiado Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia:**

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivana Duval de Araújo

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Renato Santiago Gomes

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

“O que importa na vida não é o ponto de partida,  
mas a caminhada.”

**Cora Coralina**

“A coisa mais indispensável a um homem  
é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento”

**Platão**

À minha tia Salete,  
que cuidou de mim e dos meus irmãos na nossa infância...  
...e o câncer a levou embora tão cedo.

Aos queridos avós Santo e Santina, meus pais Reynaldo e Olga,  
meus irmãos Junior, Rosâni e Kátia, tios, primos, sobrinhos e amigos:  
perdoem-me por tanto tempo distante.

“Podem os quilômetros separar-nos realmente dos amigos? Se você quer estar com alguém a quem ama, já não está lá?” Richard Bach em “Longe é um lugar que não existe”.

À dona Lourdes, seu Rubens e Lizandra,  
dona Magda, seu Alexandre, Marília e Bretas,  
Eliane, Silvio e Lucas:  
obrigado por terem me acolhido tão bem em suas famílias.

Às minhas muito amadas Cassandra, Rosâni, Laura, Luiza e Lena,  
mulheres fortes e boas, cada uma a seu modo.

Ao meu amado filho Henrique:  
que seu interesse por animais e ciências  
talvez o leve a trilhar alguns caminhos que eu trilhei.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho e para minha formação profissional. De modo especial:

Ao Prof. Dr. Edson Samesima Tatsuo, meu orientador, por ter me acolhido com tanto carinho e possibilitado a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Hélio Chiarini Garcia, pelo enorme empenho e dedicação na condução deste trabalho, além da amizade e da transmissão de seus conhecimentos em biologia da reprodução, sem os quais seria impossível realizá-lo.

Ao Prof. Dr. Augusto Barbosa Reis, que conheci como médico estagiário do setor Andrologia do Hospital das Clínicas de UFMG, mas que no decorrer desses mais de dez anos de trabalho, aprendi a admirá-lo e respeitá-lo como profissional, além de ter se tornado um grande amigo.

Aos queridos professores Apparicio Silva de Assis (*in memoriam*), Alcino Lázaro da Silva, Adelmo Simões Pereira, Francisco Viriato da Rocha Sobrinho, Eli Armando Siqueira Rabello (*in memoriam*), Francisco de Paula Câmara e Carlos Eduardo Corradi Fonseca, pela grande importância na minha formação profissional.

A todos os amigos e colegas preceptores, residentes e funcionários do Serviço de Urologia e Nefrologia Prof. Apparicio Silva de Assis (SENUR), do Hospital das Clínicas de UFMG, pelo apoio e ajuda.

Ao Prof. Dr. Aroldo Fernando Camargos, exemplo de força e superação diante de tantas adversidades, que sempre nos ensinou e incentivou a trabalhar com ensino e pesquisa dentro da universidade.

Ao Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis, pela preciosa colaboração na interpretação dos resultados finais e pela constante disponibilidade em nos auxiliar na parte científica.

Aos colegas do Centro de Reprodução Humana Prof. Aroldo Fernando Camargos: Dra. Claudia Navarro de Carvalho Lemos, Dra. Ines Katerina Damasceno Cavallo Cruzeiro, Dr. Francisco de Assis Nunes, Dra. Maria das Graças Camargos, Dr. Marco Aurélio do Reis, Dra. Simone França, secretária Juliana Alves Oliveira, médicos residentes e demais colaboradores, pelo constante apoio.

Ao Dr. Paulo Guilherme de Oliveira Salles, pela importante colaboração na parte de anatomia patológica, principalmente nas comparações entre técnicas histológicas clássicas e técnicas mais apuradas, as quais foram utilizadas neste trabalho.

À Profa. Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato Almeida, pela constante colaboração e importante ajuda na análise estatística dos resultados finais.

Aos colegas e amigos do LABER (Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, em especial os acadêmicos André Caldeira Brant e Daniel Alves Freitas e a técnica Maria Luiza (Malu), pela preciosa colaboração na parte laboratorial do trabalho.

Aos professores Vivian Resende, Marcelo Eller Miranda e Paulo Guilherme Salles de Oliveira, pelas preciosas contribuições dadas a este trabalho durante o exame de qualificação.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia da Faculdade de Medicina da UFMG, instituição que possibilitou a realização deste estudo.

À Mari Rocha, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Cirurgia e a Oftalmologia da Faculdade de Medicina – UFMG, pela constante disponibilidade, atenção e delicadeza em nos auxiliar na resolução dos problemas burocráticos relativos ao setor de pós-graduação, facilitando muito o nosso trabalho.

Aos pacientes e seus familiares, que efetivamente colaboraram, permitindo a utilização de seus dados clínicos e material biológico, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

A Enrico Sertoli, Franz Leydig, Yves Clermont, Larry Johnson, Ricardo Paniagua, Manoel Nistal, Svend Johnsen, Eberhard Nieschlag, Lonnie Russell, Marvin Meistrich e inúmeros outros pesquisadores que trazem grandes e pequenas contribuições para a edificação da ciência, permitindo assim a melhora da qualidade de vida das pessoas que sofrem de algum mal.

## ÍNDICE

1. RESUMO E ABSTRACT .....	XV
2. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....	1
3. REVISÃO DA LITERATURA	
3.1. Espermatogênese no envelhecimento masculino .....	3
3.1.1. Alterações do eixo hipotálamo-hipófise-testículo no envelhecimento .....	3
3.1.2. Alterações dos túbulos seminíferos no envelhecimento masculino .....	3
3.1.3. Compartimento intersticial (espaço intertubular) .....	6
3.1.4. Etiologias para alterações da espermatogênese relacionadas com o avanço da idade .....	6
3.2. Espermatogênese após tratamento contra o câncer .....	7
3.2.1. Espermatogênese após radioterapia .....	8
3.2.2. Espermatogênese após quimioterapia .....	10
3.2.3. Espermatogênese após hormonioterapia .....	11
3.2.4. Supressão hormonal para preservação e restauração da espermatogênese após tratamentos para o câncer .....	12
3.3. Formas de tratamento para o câncer de próstata .....	15
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	
4.1. Considerações Éticas .....	17
4.2. Pacientes .....	17
4.3. Grupos de estudo .....	17
4.4. Orquiectomia bilateral .....	19
4.5. Processamento histológico do parênquima testicular .....	19
4.6. Avaliação dos escores histopatológicos testiculares .....	20
4.6.1. Escore de cinco padrões .....	21
4.6.2. Escore de Johnsen .....	21
4.6.3. Escore de Bergmann .....	22
4.7. Avaliação hormonal .....	23
4.8. Avaliação morfológica .....	24
4.9. Análise morfométrica .....	24
4.10. Análises estatísticas .....	26
5. RESULTADOS	
5.1. Avaliação da espermatogênese pelos escores histopatológicos .....	27
5.1.1. Escore de cinco padrões .....	27
5.1.2. Escore de Johnsen .....	28
5.1.3. Escore de Bergmann .....	28
5.2. Avaliação hormonal .....	29
5.3. Avaliação morfológica sob microscopia de luz de alta resolução .....	30
5.4. Avaliação morfométrica sob microscopia de luz de alta resolução .....	35
5.4.1. Parâmetros tubulares .....	35
5.4.2. Número de células germinativas e de Sertoli .....	36
5.4.3. Índices da espermatogênese .....	37
5.4.4. Mitoses espermatogoniais e apoptoses de células germinativas .....	38

6. DISCUSSÃO .....	39
6.1. Avaliação dos escores histológicos testiculares .....	40
6.2. Avaliação hormonal .....	42
6.3. Avaliação morfológica da espermatogênese .....	43
6.4. Avaliação morfométrica da espermatogênese .....	43
7. CONCLUSÕES .....	46
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47
9. ANEXOS	
Anexo I. Revisão da Literatura: Espermatogênese do homem .....	57
Anexo II. Aprovação nos Comitês de Ética .....	67
Anexo III. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	72
Anexo IV. Protocolo de coleta de dados clínicos .....	74
Anexo V. Dados demográficos .....	77
Anexo VI. Planilha de coleta de resultados dos escores histopatológicos, com exemplo ...	78

**ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 1. Exposições cumulativas à irradiação e toxicidade reprodutiva nos tratamentos mais comuns contra o câncer (Retirado de Stahl et al., 2010).....	10
Tabela 2. Classificação histopatológica da espermatogênese segundo Bergmann e Kleisch (2011) .....	23
Tabela 3. Resultados do escore histológico testicular de Cinco Padrões de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata.....	27
Tabela 4 – Resultados do escore histológico testicular de Johnsen de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata.....	28
Tabela 5 – Resultados do escore histológico testicular de Bergmann de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata.....	29
Tabela 6 - Dosagens hormonais séricas de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata.....	30
Tabela 7 – Parâmetros dos túbulos seminíferos de homens idosos após diferentes tratamentos contra o câncer de próstata.....	35
Tabela 8. Contagem das células germinativas presentes no estágio III de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata.....	36
Tabela 9. Índices para determinação da eficiência do processo espermatogênico de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata.....	37
Tabela 10- Contagem mitoses e apoptoses no estágio III, equalizadas para 100 NCS, de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata.....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Danos à espermatogênese seguindo dose única de irradiação, o efeito da dose de irradiação nos estágios das células germinativas e o tempo de início de recuperação das células germinativas danificadas. (Adaptado dos dados de Rowley et al.,1974).....	9
Figura 2 – Escore histológico testicular de Cinco Padrões de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata.....	27
Figura 3 – Escore histológico testicular, segundo Johnsen, de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata.....	28
Figura 4 – Escore histológico do testículo de homens idosos, segundo Bergmann, submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata .....	29
Figura 5 - Dosagens hormonais séricas de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata .....	30
Figura 6. Fotomicrografias de túbulos seminíferos de testículos de homens idosos com câncer de próstata que não sofreram qualquer tipo de tratamento.....	31
Figura 7. Fotomicrografias do testículo de homens idosos com câncer de próstata que sofreram tratamento hormonal exclusivo .....	32
Figura 8. Fotomicrografias de túbulos seminíferos de testículos de homens idosos com câncer de próstata que sofreram tratamento radioterápico.....	33
Figura 9. Fotomicrografias de túbulos seminíferos de testículos de dois homens idosos com câncer de próstata.....	34
Figura 10 - Parâmetros dos túbulos seminíferos de homens idosos após diferentes tratamentos contra o câncer de próstata.....	35
Figura 11 – Número de células germinativas presentes no estágio III do ciclo do epitélio seminífero de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata.....	36
Figura 12 – Índices para determinação da eficiência do processo espermatogênico de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata.....	37
Figura 13 - Contagem mitoses e apoptoses no estágio III, equalizadas para 100 NCS, de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata .....	38

## 1. RESUMO

**Objetivos:** O presente estudo tem como objetivo avaliar parâmetros do processo espermatogênico de homens idosos, portadores de câncer avançado de próstata que foram submetidos a tratamentos radioterápicos e hormonais, comparativamente com aqueles que não sofreram nenhum desses tratamentos antes da realização da orquiectomia bilateral.

**Método:** Os parâmetros avaliados foram os escores histopatológicos testiculares sob microscopia de luz e a morfologia e morfometria da espermatogênese sob microscopia de luz de alta resolução, todos eles correlacionados com o perfil hormonal e com os dados clínicos. Foram incluídos 22 pacientes, com idades entre 59 e 90 anos, com média de 74,3 anos. Desse total, onze pacientes foram submetidos à orquiectomia bilateral, os quais não haviam se submetido a nenhum tratamento prévio ou tinham sido tratados anteriormente com prostatectomia radical (grupo controle). Seis pacientes foram submetidos à orquiectomia bilateral e se encontravam em tratamento hormonal exclusivo com bloqueadores de testosterona de ação central ou periférica. Outros cinco pacientes foram submetidos à orquiectomia bilateral e tinham sido tratados anteriormente com radioterapia externa, não recebendo mais nenhum tratamento ou então tendo sido tratados posteriormente com bloqueadores centrais ou periféricos de testosterona.

**Resultados:** O escore histopatológico testicular clássico de Cinco padrões mostrou uma redução significativa no valor do escore entre o grupo controle em comparação com o grupo tratado com radioterapia, mas não foi significativa em relação ao grupo tratado com hormonioterapia. Por outro lado, os escores de Johnsen e de Bergmann mostraram redução significativa do escore entre o grupo controle e os dois grupos tratados. A avaliação morfométrica dos parâmetros tubulares mostrou que houve redução significativa no diâmetro tubular e na altura do epitélio seminífero nos indivíduos que foram submetidos aos tratamentos hormonais e radioterápicos. Esta menor altura do epitélio seminífero foi devido a uma redução do número de células germinativas no estágio III do ciclo do epitélio seminífero, principalmente a partir do preleptóteno, quando inicia a fase meiótica. Os índices da eficiência da espermatogênese mostraram que não ocorreu efeito deletério significativo no processo de mitose espermatogonial, principalmente das espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$  e  $A_{\text{claras}}$ , que correspondem às espermatogônias-tronco do testículo humano. No entanto, quanto ao processo meiótico, ao suporte de células de Sertoli e à eficiência geral da espermatogênese, a hormonioterapia ou a radioterapia foram expressivamente lesivas. Especificamente após a hormonioterapia a espermiogênese foi completamente bloqueada, não havendo formação de espermátides alongadas.

**Conclusões:** Conclui-se que os tratamentos contra o câncer de próstata, utilizando hormônios e radioterapia, provocam efeitos deletérios no processo espermatogênico do homem, com alterações significativas de diversos parâmetros qualitativos e quantitativos da espermatogênese. Os escores histopatológicos testiculares de Johnsen e de Bergmann demonstraram com mais precisão, em comparação ao escore clássico de Cinco padrões, que os tratamentos radioterápicos e hormonais foram lesivos para a espermatogênese. Parâmetros morfométricos demonstraram que a radioterapia lesou mais acentuadamente a proliferação espermatogonial do que a hormonioterapia, porém apenas a hormonioterapia bloqueou a espermiogênese.

## 1. ABSTRACT

**Objectives:** This study aims to evaluate parameters of the spermatogenic process of elderly men with advanced prostate cancer who underwent radiotherapy and hormonal treatment, compared with those who did not suffer any of these treatments before performing bilateral orchiectomy.

**Method:** We evaluated testicular histopathological scores in spermatogenesis under high resolution light microscopy and light microscopy morphology and morphometry, all correlated with the hormonal profile and clinical data. It were included 22 patients with ages between 59 and 90 years and with mean of 74.3 years. Eleven patients from them underwent bilateral orchiectomy, which had not undergone any previous treatment or had been previously treated with radical prostatectomy (control group). Six patients underwent bilateral orchiectomy and were exclusively submitted to hormonal treatment with testosterone blockers of central or peripheral action. Five other patients underwent bilateral orchiectomy and had been previously treated with external beam radiotherapy, not getting any more treatment or they were treated subsequently with central or peripheral testosterone blockers.

**Results:** The Classic Five testicular histopathological patterns score showed a significant reduction in the value of the score between the control group compared with the group treated with radiotherapy, but it was not significant compared to the group treated with hormone therapy. On the other hand, scores of Johnsen and Bergmann showed significant reduction in scores between the control group and the two treatment groups. The morphometric analysis of tubular parameters showed that there was significant reduction in tubular diameter and height of the seminiferous epithelium in individuals who were subjected to hormonal and radiotherapy. This lower height of the seminiferous epithelium was due to a reduction in the number of germ cells in stage III of the seminiferous epithelium cycle, mainly from preleptotene, when meiotic phase started. The indices of the efficiency of spermatogenesis showed that no significant deleterious effect on the process of spermatogonial mitosis, mainly of  $A_{dark}$  and  $A_{pale}$ , spermatogonia which correspond to spermatogonial stem from human testis. However, regarding meiotic process, support capacity of Sertoli cells and the overall efficiency of spermatogenesis, the hormone therapy and radiotherapy were significantly detrimental. Specifically after hormone treatment, spermiogenesis was completely blocked, with no formation of elongated spermatids.

**Conclusions:** We conclude that treatments for prostate cancer, using hormones and radiotherapy, cause deleterious effects on human spermatogenesis process, with significant changes in several qualitative and quantitative parameters of spermatogenesis. Testicular histopathological scores of Johnsen and Bergmann demonstrated more accurately compared to the classic five-score patterns and the radiotherapy and hormonal treatments were harmful to spermatogenesis. Morphometric parameters showed that radiotherapy has been more damaged to spermatogonial proliferation than hormone therapy, but only hormone therapy blocked spermiogenesis.

## 2.1. Introdução e Objetivos

Nas últimas décadas foram grandes os avanços no tratamento de diversos tipos de câncer em pacientes pediátricos ou adultos em idade reprodutiva, sendo que a cura dessa doença está cada vez mais frequente nesses pacientes. Por outro lado, os vários tratamentos utilizados no combate à doença, principalmente a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia, podem levar a perda da fertilidade de maneira temporária ou definitiva (Puscheck et al., 2004; Howell and Shalet, 2005). Depois de determinados tratamentos oncológicos em homens, é frequente a depleção completa e permanente das células germinativas. A recuperação da espermatogênese após estes tratamentos depende da dose aplicada, da integridade das espermatogônias-tronco, bem como do estado funcional do microambiente (Meistrich, 1993; Meistrich, 2009).

Estudos no sentido de tentar entender os efeitos de tratamentos contra o câncer sobre a espermatogênese estão sendo desenvolvidos há décadas por Meistrich e colaboradores (revisão em Meistrich e Shetty, 2008). São estudos que procuraram entender principalmente o quanto a espermatogênese é afetada após diferentes tratamentos contra o câncer e como ela pode ser protegida através de tratamentos hormonais. Esses estudos, pela facilidade na montagem experimental, foram desenvolvidos principalmente em animais de laboratório. Em humanos, devido à dificuldade de se conseguir material biológico adequado, existem poucos estudos nesse sentido. Em relação à prática clínica, homens com câncer avançado de próstata, em determinadas situações, são submetidos à orquiectomia bilateral, com o intuito de provocar um bloqueio hormonal, com a retirada completa da testosterona testicular. Como esses testículos retirados são descartados, viu-se, nestas situações, a possibilidade de se obter material biológico para desenvolver o presente estudo. Normalmente esses indivíduos portadores de câncer de próstata são idosos e, na maioria das vezes, sofreram algum tipo de tratamento radioterápico ou hormonal, mas não deixaram de ser fonte abundante de material biológico para estudo da espermatogênese do homem idoso. Embora as alterações da espermatogênese nesses pacientes possam ser inerentes ao avanço da idade, acredita-se que esses estudos em homens idosos possam trazer informações novas para auxiliar no entendimento dos efeitos desses tratamentos no testículo de pacientes jovens, em idade reprodutiva, submetidos a terapias semelhantes.

Desta forma, avaliaram-se neste estudo, por meio das técnicas morfológicas e morfométricas, parâmetros da espermatogênese do homem idoso, visando melhor entender, nesses indivíduos, o comportamento da espermatogênese após diferentes tratamentos hormonais e radioterápicos contra o câncer de próstata, comparativamente com aqueles que não sofreram nenhum desses tratamentos antes da realização da orquiectomia.

## **Objetivos**

### **Objetivo Geral:**

Avaliar parâmetros qualitativos e quantitativos do processo espermatogênico de homens idosos com câncer de próstata, que foram submetidos a tratamentos radioterápicos e hormonais, comparativamente com aqueles que não sofreram nenhum desses tratamentos.

### **Objetivos específicos:**

- Avaliar a espermatogênese segundo os três diferentes escores de diagnóstico histopatológico testicular: de cinco padrões, de Johnsen e de Bergmann.
- Avaliar se o FSH (hormônio folículo estimulante), o LH (hormônio luteinizante) e testosterona total, relacionam-se com os parâmetros histológicos e clínicos.
- Avaliação morfológica do processo espermatogênico.
- Avaliar os índices espermatogênicos: parâmetros tubulares, mitoses espermatogoniais, apoptoses de células germinativas e índices mitótico e meiótico, índice de suporte de células de Sertoli e eficiência geral da espermatogênese.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 – A ESPERMATOGÊNESE NO ENVELHECIMENTO MASCULINO

##### 3.1.1 - Alterações do eixo hipotálamo-hipófise-testículo no envelhecimento

O declínio androgênico do envelhecimento masculino (DAEM) é caracterizado por progressiva desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-testículo, associado com a diminuição da testosterona total sérica e com o aumento da concentração sérica do LH e do FSH (Morley and Perry, 1999; Hermann and Berger, 1999). Numa revisão de 14 artigos baseados em 417 idosos e 384 adultos jovens, encontrou-se que a concentração sérica de testosterona foi 14% mais baixa nos homens idosos (Neaves et al., 1984). Níveis séricos da globulina carreadora de hormônios sexuais (SHBG) estão aumentados, acarretando uma diminuição dos níveis circulantes de testosterona livre (Vermeulen and Kaufman, 1995). Esse gradual declínio dos andrógenos no envelhecimento masculino é acompanhado pelo aparecimento de sintomas clínicos similares aos do hipogonadismo do homem jovem, ou seja, diminuição da massa muscular e óssea, diminuição da pilificação corpórea e aumento da obesidade abdominal. Outros sintomas inespecíficos podem incluir: nervosismo, irritabilidade, depressão, alterações da memória, fadiga, insônia, fogachos, além de sintomas sexuais como queda da libido e disfunção erétil. (Kaufman and Vermeulen, 2005; Sampson et al., 2007).

##### 3.1.2 – Alterações dos túbulos seminíferos no envelhecimento masculino

O peso do parênquima testicular, a porcentagem de epitélio seminífero e produção espermática diária estão significativamente reduzidas no homem idoso. (Johnson, 1986). A observação de diferentes tipos de túbulos seminíferos em homens idosos aponta para progressivos estágios da involução tubular no envelhecimento masculino. Túbulos com hipoespermato gênese, ou seja, com reduzido número de espermátides alongadas, mostram numerosas anomalias morfológicas nas células germinativas, incluindo células multinucleadas. Os vacúolos correspondem a dilatações dos espaços extracelulares resultantes da exfoliação prematura das células germinativas. Células degeneradas que são fagocitadas pelas células de Sertoli levam a um acúmulo de gotículas lipídicas (*lipid droplets*) no citoplasma das células de Sertoli. A perda das células germinativas começa com as espermátides, mas progressivamente afeta as células precedentes. Túbulos seminíferos com parada de maturação no nível de espermátócitos ou espermato gônias são observados. Simultaneamente um espessamento da túnica própria ocorre. Isso leva a formação de túbulos esclerosados, alguns dos quais exibem um epitélio seminífero baixo, constituídos por poucas células, incluindo espermato gônias  $A_{\text{escuras}}$  e  $A_{\text{claras}}$  além de células de Sertoli carregadas de lipídios. Outros túbulos seminíferos mostram completa esclerose, desprovidos de células germinativas e de Sertoli. O desenvolvimento de involução tubular do idoso é similar ao que é descrito após

isquemia testicular experimental, que causa efeitos inespecíficos nos testículos, como células multinucleadas, vacúolos e aumento de lipídeos nas células de Sertoli. (Paniagua et al., 1987)

#### *Alterações da túnica própria*

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

O estudo desenvolvido por Regadera et al. (1985) mostra que em idosos com hipoespermatogênese, a túnica própria pode estar normal ou discretamente espessada. Já na parada de maturação em espermatócitos ou espermatogônias, ela geralmente está mais marcadamente espessada. Na aplasia germinativa ou na esclerose tubular, a túnica própria está extremamente espessada, com abundantes fibras colágenas, onde poucas células peritubulares podem ser reconhecidas. As causas de esclerose tubular possivelmente são múltiplas. Entre essas causas, alterações vasculares, como a arteriosclerose, podem desempenhar um importante papel (Regadera et al., 1985). O enfraquecimento focal da parede tubular causada por alterações nas células mióides peritubulares e células de Sertoli podem levar a formação de divertículos nos túbulos seminíferos de indivíduos com idade avançada. (Nistal et al., 1988)

#### *Alterações das células de Sertoli*

Os túbulos seminíferos de homens idosos com espermatogênese normal geralmente apresentam células de Sertoli também normais. Naqueles com hipoespermatogênese, seja ela leve ou acentuada, o epitélio seminífero pode apresentar células de Sertoli com acúmulo excessivo de gotículas lipídicas e presença de vacúolos citoplasmáticos. A perda de células germinativas provavelmente determina o desenvolvimento de vacúolos nas células de Sertoli. O aumento do conteúdo lipídico das células de Sertoli é considerado ser produto da fagocitose de restos de células germinativas (Schulze, 1984)

Na parada de maturação em espermatócitos ou espermatogônias, existe também a presença mais abundante de lipídeos e vacúolos no citoplasma das células de Sertoli. Uma diminuição no número de células de Sertoli no testículo do idoso foi inicialmente reportada (Harbitz, 1973) e posteriormente confirmada, quando se comparou testículos de adultos jovens (20-48 anos) com os de homens idosos (50-85 anos). Em homens entre 20 a 85 anos de idade, produção espermática diária foi significativamente correlacionada com o número de células de Sertoli por testículo (Johnson et al., 1984d).

Na aplasia de células germinativas (*Sertoli Cell Only Syndrome*) as células de Sertoli são as únicas células presentes no epitélio seminífero, mostrando uma configuração de multicamadas. Na esclerose completa dos túbulos seminíferos essas células não são encontradas.

#### *Alterações das células germinativas*

Em idosos com hipoespermatogênese, espermátides, espermátócitos e espermatogônias podem se apresentar com dois ou mais núcleos (multinucleadas) (Holstein and Eckermann, 1986). A ocorrência de vários núcleos em um simples citoplasma pode ser devido a cariocinese sem citocinese ou a fusão celular (Nistal et al., 1986)

Nos idosos, são frequentes os túbulos seminíferos contendo numerosas células em degeneração, principalmente espermátócitos e espermátides. Degeneração de uma porcentagem de células germinativas em desenvolvimento é um fenômeno normal na espermatogênese, estando associada com os seus três passos críticos, ou seja, durante as mitoses espermatogoniais, as divisões meióticas e a espermiogênese. A maior parte da degeneração das células germinativas detectadas durante a meiose ocorre durante a segunda divisão meiótica, subsequente a espermátócitos secundários. (Kimura et al., 2003). Em adultos jovens, há significativa perda de células germinativas por degeneração, durante a pós-prófase da meiose. Essa perda não foi correlacionada com a idade ou com as concentrações de FSH e LH. Não se sabe por que humanos tem uma maior taxa de degeneração tardia na meiose do que em outras espécies. Em homens adultos, há uma pequena degeneração de espermátides durante a espermiogênese (Johnson et al, 1983; Johnson et al. 1984]. Redução da produção espermática diária relacionada com a idade esta associada à perda de células de Sertoli no homem idoso. O número de espermátócitos primários ou espermátides por células de Sertoli, não é afetado pela idade (Johnson et al, 1984d). Descamação de células germinativas imaturas, principalmente multinucleadas e degeneradas, é freqüentemente observada em túbulos seminíferos de idosos e ocasionalmente em adultos jovens. Estudo em camundongo demonstrou que a degeneração celular controlada tem papel importante na regulação do número de células germinativas e que sem este processo o testículo entra em falência (Russell et al., 2002).

As espermatogônias podem estar anormalmente localizadas no espaço adluminal em pacientes idosos, dispostas em multicamadas (Paniagua et al., 1987). Enquanto o número de espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$  não foi significativamente menor em homens idosos, o número de espermatogônias  $A_{\text{claras}}$  e espermatogônias tipo B foi significativamente menor em idosos. O número de espermatogônias  $A_{\text{claras}}$  diminui a partir da sexta década de vida, enquanto que o número de espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$  diminui seu número a partir da oitava década de vida (Nistal e al., 1987).

Os megaloespermátócitos estão usualmente presentes em 64% de homens idosos e só ocasionalmente são encontrados em biopsias de homens inférteis (Holstein and Eckmann, 1986). Diferenças significativas entre os grupos etários foram encontradas para espermátócitos primários tardios (paquíteno e diplóteno) e espermátides jovens, sendo seu número mais baixo nos homens idosos que nos

jovens. Espermátides multinucleadas originam-se de fusão de espermátides, resultando em células gigantes, com dezenas de núcleos esféricos. (Nistal et al, 1986). Na parada de maturação em espermatócitos ou espermatogônias, células germinativas em degeneração podem ser observadas. Espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$  e  $A_{\text{claras}}$  estão presentes. Na aplasia germinativa e na esclerose tubular existe uma ausência completa das células germinativas (Dakouane et al., 2005).

### **3.1.3 – Compartimento intersticial (espaço intertubular)**

#### *Alterações das células de Leydig*

Há uma correlação entre a proporção de células de Leydig alteradas e a diminuição dos níveis de testosterona e aumento dos níveis séricos de LH (Paniagua et al, 1986). Diminuição na população de células de Leydig com o avanço da idade foi relatada em alguns estudos. Entretanto não foi encontrada relação entre o número de células de Leydig e a produção espermática diária em homens. (Kaler and Neaves, 1978; Neaves et al., 1984; Neaves and Johnson, 1985).

As alterações mais freqüentemente encontradas nessas células são o aumento de grânulos de lipofucsina (produtos degenerativos) e de gotículas lipídicas. Essas características são típicas de células com função esteroideogênica diminuída. Células de Leydig multivacuoladas ou multinucleadas são prováveis formas de involução celular (Schulze, 1984). São consideradas alterações ultraestruturais das células de Leydig no homem idoso quando estas apresentam uma reduzida quantidade de retículo endoplasmático liso e de mitocôndrias. Nestas alterações a presença de múltiplos cristais citoplasmáticos ou intranucleares também pode ser observada (cristais de Reinke) (Paniagua et al., 1986).

### **3.1.4 – Etiologias para alterações da espermatogênese relacionadas ao avanço da idade**

A degeneração vascular pode levar a diminuição do suprimento sanguíneo dos testículos, com conseqüente degeneração dos túbulos seminíferos ou células de Leydig. (Sasano e Ichijo, 1969; Suoranta, 1971). Estudos mostram que arterioesclerose está envolvida no declínio da função testicular do idoso. Homens idosos com aterosclerose grave apresentam parênquima testicular com túbulos seminíferos esclerosados. (Regadera et al. 1985).

Os fatores autoimunes podem causar degeneração tubular. Perda de células de Sertoli relacionadas com a idade poderia comprometer a barreira de células de Sertoli e contribuir para a liberação de antígenos seminais específicos. (Johnson et al., 1984d)

As alterações provocadas pela idade nos testículos podem ter início nos próprios túbulos seminíferos. Foi demonstrada redução da atividade das células de

Leydig em várias desordens testiculares, nas quais o epitélio seminífero estava primariamente envolvido (de Kretser et al., 1975).

A progressiva deteriorização das funções das células de Sertoli ou o reduzido número dessas células podem causar redução na produção espermática diária. A diminuição no número de espermatócitos primários ou de espermátides ocorre com o mesmo grau de perda que o número de células de Sertoli, com o envelhecimento masculino (Johnson et al., 1984d).

O reduzido número de células de Sertoli poderia causar redução no número de células germinativas e no comprimento dos túbulos seminíferos, o qual leva a um aumento na espessura da túnica própria (Johnson et al, 1986b). Esse espessamento poderia causar outros danos, por reduzir a troca de metabólitos ou hormônios entre o espaço intersticial e o epitélio seminífero, como já citado anteriormente.

É difícil separar causa e efeito no processo de envelhecimento. Entretanto, é importante que estudos etiológicos dos danos testiculares relacionados com a idade do homem continuem. Melhora no entendimento das alterações da espermatogênese relacionadas com a idade poderiam ajudar a entender algumas formas de infertilidade masculina (Johnson, 1986).

### **3.2 – A ESPERMATOGÊNESE APÓS TRATAMENTOS DE NEOPLASIAS MALIGNAS**

Enquanto espermatogônias-tronco  $A_{\text{escuras}}$  são predominantemente inativas mitoticamente, as espermatogônias  $A_{\text{claras}}$  funcionam como células progenitoras, formando células germinativas mais maduras, como espermatócitos e espermátides, além de se autorrenovarem em cada ciclo da espermatogênese. Devido à baixa taxa de duplicação, as espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$  são mais resistentes a insultos tóxicos, químicos ou radiológicos, servindo como células de reserva, ativando-se apenas após episódios de toxicidade, permitindo a restauração da população espermatogonial. Por outro lado, as espermatogônias  $A_{\text{claras}}$ , que se dividem ativamente, são as mais susceptíveis a esses insultos (Meistrich, 1986). As células de Leydig são mais resistentes a doses maiores de radio ou quimioterapia, com baixo risco de desenvolver hipogonadismo. Doses muito altas podem afetar significativamente as espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$ , resultando em azoospermia permanente, com destruição do epitélio seminífero, restando apenas células de Sertoli no interior dos túbulos (padrão *Sertoli-Cell-Only* ou aplasia germinativa) (de Rooij et al., 2002).

As alterações da fertilidade do homem nas neoplasias malignas podem ser devidas a várias etiologias, incluindo efeitos diretos ou indiretos da própria doença ou de suas várias modalidades de tratamento, como cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou hormonioterapia. Muitas vezes são realizadas combinações desses tratamentos, levando a efeitos multifatoriais. (Trost and Brannigan, 2012).

As doenças malignas podem levar a alterações da fertilidade por vários mecanismos. Efeitos inflamatórios sistêmicos da carcinogênese, elevação da temperatura corpórea que leva a descamação do epitélio seminífero e alterações hormonais do eixo hipotálamo-hipófise-testículo são os principais. Embora numerosas doenças malignas estejam associadas a alterações dos parâmetros seminais e infertilidade masculina, leucemias, linfomas e câncer testicular são as mais frequentemente identificadas e de maior importância clínica, por estarem presentes em homens em idade reprodutiva. Os tumores de células germinativas apresentam um alto risco para alterações na espermatogênese. (Ragheb and Sabanegh, 2010).

Diversos procedimentos cirúrgicos para tratamentos de alguns tipos de câncer podem também levar a distúrbios da fertilidade. Prostatectomia e cistectomia radical, exenteração pélvica, ressecção de cólon e linfadenectomia retroperitoneal, entre outras, podem levar a distúrbios graves da ejaculação ou da ereção, causando infertilidade, apesar de não influenciarem diretamente sobre o processo espermatogênico.

Usando esses conhecimentos, métodos podem ser desenvolvidos para preservar a fertilidade, alterando os tipos e as doses da radioterapia e da quimioterapia ou interferindo no controle hormonal da espermatogênese, sem comprometer o sucesso do tratamento do câncer. Quando essas opções não são possíveis, criopreservação de sêmem ou tecido testicular constitui um método efetivo para preservar a fertilidade antes do tratamento do câncer (Puscheck et al., 2004).

### **3.2.1. – A espermatogênese após radioterapia**

O parênquima testicular é um dos tecidos mais radiosensíveis. O dano testicular por irradiação ocorre através de exposição direta do testículo ou pela dispersão dos raios dirigidos em áreas adjacentes, principalmente na região abdominal e pélvica. Radioterapia resulta em danos ao DNA de todos os tipos de células germinativas, células de Sertoli e de Leydig, cada uma com níveis variáveis de sensibilidade. Além da dose total recebida, o fracionamento das aplicações também tem impacto nos danos celulares. Doses mais altas liberadas em poucas frações são menos nocivas que doses mais baixas liberadas em maior número de aplicações. (Centola et al., 1994).

Células germinativas demonstram maior sensibilidade à irradiação quando comparadas com outras células somáticas do testículo, provavelmente devido a seu alto índice mitótico. As espermatogônias são as mais radiosensíveis, podendo sofrer lesões com doses abaixo de 0,1 Gy, enquanto que os espermatócitos sofrem lesões com dosagens a partir de 2 Gy e as espermátides a partir de 4 Gy. Dose de 0,1 Gy mostra lesões temporárias com parada de espermatogênese, enquanto dose de 0,7 Gy resulta em azoospermia temporária e dose de 1,2 Gy em azoospermia permanente. (Howell and Shalet, 1998). Esses dados são significantes porque muitos protocolos para câncer testicular utilizam doses de 16-18 Gy, embora o tratamento seja direcionado para linfonodos retroperitoneais e não diretamente aos testículos.

A extensão dos danos causados na espermatogênese é também relacionada de maneira temporal com a dose total recebida. Depois de um longo período de azoospermia, espermatozoides reaparecem no ejaculado com 6 meses, 9-18 meses, 30 meses e 5 anos com doses de até 0,2 Gy, até 1,0 Gy, de 2,0-3,0 Gy e igual ou maior que 4,0 Gy, respectivamente (González et al., 2012) (Figura 1).

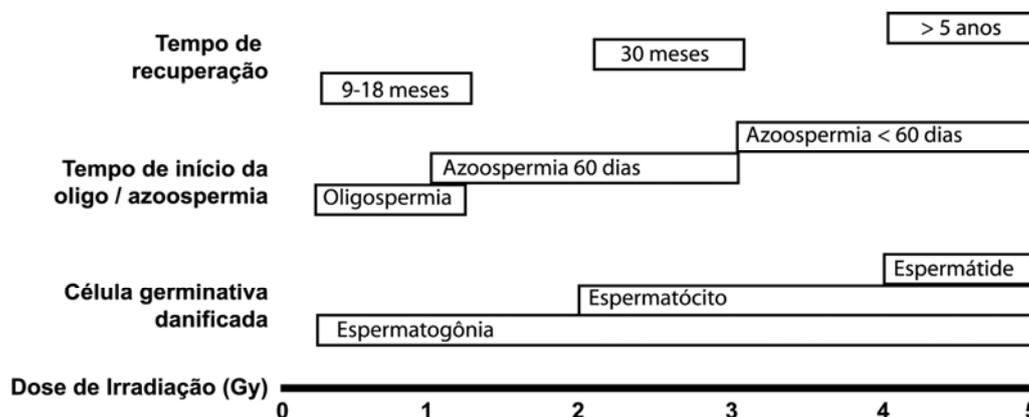


Figura 1. Danos à espermatogênese seguindo dose única de irradiação, o efeito da dose de irradiação nos estágios das células germinativas e o tempo de início de recuperação das células germinativas danificadas. Gy, Gray (Adaptado dos dados de Rowley et al. 1974).

Recuperação da espermatogênese depende da sobrevivência de espermatogônias-tronco e da sua capacidade de se diferenciar em células germinativas mais maduras, que está relacionada com a dose de irradiação aplicada. A preservação do microambiente espermatogonial, incluindo as interações das espermatogônias com as células somáticas de Sertoli e Leydig, também é fundamental para a recuperação da espermatogênese. (Zhang et al., 2007). Ao contrário do epitélio seminífero, as células de Leydig são relativamente radioresistentes, sendo doses de 20-30 Gy necessárias para causar hipogonadismo. Embora possa haver uma elevação dos níveis séricos de FSH e LH com baixas doses de irradiação, os níveis de testosterona sérica permanecem normais. (Howell and Shalet, 2002). Exposição testicular a irradiação durante tratamento de doenças malignas, em homens em idade reprodutiva, é negativamente significativa, mesmo com o uso de proteção gonadal. As indicações mais comuns de radioterapia nessa população são: tratamento de metástases linfáticas retroperitoneais nos seminomas testiculares, tratamento de linfomas Hodgkin e Não-Hodgkin e irradiação corpórea total antes de transplante de medula óssea ou de células-tronco utilizados no tratamento de doenças hematológicas graves. Menos comumente, homens em idade reprodutiva, portadores de carcinoma retal ou prostático, tratados com radioterapia pélvica, são expostos a irradiação testicular, a qual pode ser gonadotóxica (Daniell and Tam, 1998). Efeitos da radioterapia nos testículos e seu impacto na fertilidade são mostrados na Tabela 1 (Stahl et al., 2010).

Em geral, parece que o estado pré-puberal não confere proteção gonadal contra a irradiação. Meninos pré-puberes tratados com radioterapia na região abdominal, geralmente evoluem com oligozoospermia ou azoospermia, mantendo

normal a função das células de Leydig. Por outro lado, as células intersticiais de Leydig são mais sensíveis a altas doses de radioterapia em meninos pré- púberes do que em adultos. (Shalet, 1982).

Tabela 1. Exposições cumulativas à irradiação e toxicidade reprodutiva nos tratamentos mais comuns contra o câncer (Retirado de Stahl et al., 2010).

Indicação da Radioterapia	Exposição testicular à irradiação	Impacto na fertilidade
• Metástases de seminoma em linfonodos retroperitoniais	0,3-0,5 Gy	• Sem efeito ou oligozoospermia
• Linfoma de Hodking mediastinal ou abdominal	0,1-0,7Gy	• Sem efeito ou oligozoospermia
• Câncer de Reto	0.3-2,1Gy	• Sem efeito, oligozoospermia ou azoospermia transitória ou permanente
• Câncer de Próstata	RT externa: 0,1-0,6Gy RT modulada: 1,8-2,4Gy	• Sem efeito ou oligozoospermia Azoospermia transitória ou permanente
• Neoplasia de células germinativas intratubular (CIS)	16-20Gy	• Alto risco de azoospermia permanente
• Irradiação corpórea total antes de transplante de medula ou transplante de células tronco	>6Gy	• Alto risco de azoospermia permanente

### 3.2.2 – A espermatogênese após quimioterapia

Quimioterapia citotóxica tem melhorado a taxa de sobrevivência de pacientes portadores de muitos tipos de câncer, particularmente os hematológicos, como leucemias, linfomas Hodgkin e Não-Hodgkin, além do câncer de testículo. Esses tratamentos são, entretanto, seguidos frequentemente de disfunção testicular devida a prejuízos na espermatogênese, causados pelas drogas utilizadas. Os danos no epitélio germinativo podem levar a quadros de oligozoospermia ou azoospermia, com consequente infertilidade temporária ou permanente. Em casos mais graves, até mesmo as células de Leydig podem ser lesadas, levando a quadros de hipogonadismo. As chances de recuperação da espermatogênese estão relacionadas com os tipos de drogas utilizadas e suas dosagens. (da Cunha et al., 1984; Meistrich et al., 1989).

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

### 3.2.3 – A espermatogênese após hormonioterapia

#### *GnRH-agonista*

A ação inibitória paradoxal do GnRH-agonista na secreção de gonadotrofinas está bem estabelecida e tem numerosas aplicações clínicas com a inibição da função do eixo hipotálamo-hipófise-gonada, incluindo câncer de próstata e mama, endometriose, ovários policísticos, puberdade precoce e contracepção. Especificamente no tratamento do câncer avançado de próstata, após duas semanas do início do uso do GnRH-agonista, existe um bloqueio quase total da produção das gonadotrofinas (FSH e LH) pela hipófise, bloqueando-se a produção de testosterona, mantendo-a em nível de castração durante todo o tempo de uso do medicamento (Huhtaniemi et al., 1987a). Embora o tratamento suprima efetivamente a produção de testosterona, a esteroidogênese testicular não é totalmente bloqueada. Essa residual produção de andrógenos não compromete a eficácia terapêutica contra o câncer de próstata, entretanto pode explicar uma variável supressão da espermatogênese, como revelam estudos histológicos realizados em pacientes com câncer avançado de próstata, tratados com GnRH-agonistas durante seis meses e depois submetidos a orquiectomia bilateral, comparados com pacientes que realizaram a orquiectomia como tratamento primário para o câncer de próstata. (Huhtaniemi et al., 1987b).

Um estudo realizado em primatas não-humanos (macaco Rhesus), sobre os efeitos em longo prazo do tratamento com GnRH-agonista na histologia testicular desses animais e da subsequente recuperação após cessado o tratamento, mostrou total recuperação da espermatogênese, retornando aos mesmos resultados da fase pré tratamento, ou seja, espermatogênese normal. Durante o período de tratamento com GnRH-agonista houve progressiva involução dos túbulos seminíferos. Em dois animais a espermatogênese foi interrompida no nível de espermátides ou espermátócitos, enquanto que nos outros dois havia apenas a presença de espermatogônias e células de Sertoli nos túbulos seminíferos. (Weinbauer et al., 1987).

#### *Estrogênios*

Em ratos, receptores alfa de estrogênios são expressos nas células de Leydig, espermátides redondas e ductos eferentes, enquanto receptores beta são expressos nas células de Leydig, células de Sertoli, espermatogônias tipo A e estágios tardios das células germinativas (van Pelt et al., 1999). Estrogênios têm efeitos positivos e negativos na espermatogênese. Os efeitos deletérios do tratamento com estradiol (E2) na espermatogênese de ratos e camundongos adultos é bem conhecida. Em animais normais, estradiol atua no hipotálamo e na hipófise, diminuindo a secreção de gonadotrofinas. A redução do hormônio luteinizante (LH), bem como seu efeito direto na inibição no processo da esteroidogênese nas células de Leydig contribui para a redução dos níveis de testosterona nos testículos (Steinberger, 1971). Tratamento com estradiol também inibe a produção espermatogônica em camundongos jovens e a diferenciação espermatogonial em ratos neonatos. Por outro lado, tem efeitos benéficos na espermatogênese, mas seus mecanismos de ação são complexos e ainda não muito bem identificados. (O'Donnel et al., 2001; Carreau and Hess, 2010).

No tratamento do câncer de próstata, os estrogênios bloqueiam a liberação do hormônio luteinizante (LH) pela hipófise anterior, impedindo a estimulação da produção de testosterona pelos testículos. O dietilestilbestrol (DES) é o estrogênio mais comumente utilizado na terapia hormonal contra o câncer avançado de próstata.

#### *Antiandrogênios*

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

A flutamida é um antiandrógeno de ação periférica, que parece inibir a absorção e ligação de testosterona e dihidrotestosterona aos receptores nucleares das células prostáticas. Nos testículos produz degeneração do epitélio seminífero e hiperplasia das células intersticiais. Estudos histológicos em camundongos tratados com flutamida apontam para anomalias, principalmente na formação do acrossoma, levando a altas porcentagens de espermátides anormais. (Anahara et al., 2007).

Esses dois antiandrógenos são os mais utilizados para tratamento do câncer avançado de próstata, como monoterapia ou, mais frequentemente, associados aos bloqueadores centrais, como o GnRH-agonista ou o estrógeno, para bloqueio androgênico total.

#### **3.2.4 – Supressão hormonal para preservação e restauração da espermatogênese após tratamento para o câncer**

A utilização de supressão hormonal para proteger a função gonadal contra agentes citotóxicos usados no tratamento contra o câncer, como a radioterapia e a quimioterapia, é baseada no fato que as células em rápida proliferação, ou seja, em constantes divisões celulares, são muito mais susceptíveis aos efeitos deletérios desses agentes do que as células que pouco se dividem ou não se dividem. (Meistrich and Shetty, 2008).

O mecanismo proposto inicialmente foi que o bloqueio do eixo hipotálamo-hipófise-testículo reduziria as divisões celulares da espermatogênese, não expondo as células germinativas aos efeitos da quimioterapia. Essa teoria baseou-se num estudo no qual foi utilizado um análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) antes do uso de ciclofosfamida em camundongos, protegendo a espermatogênese desses animais (Glode et al., 1981). Entretanto, nova tentativa de reproduzir esses resultados, utilizando-se novos parâmetros quantitativos, revelou que não houve

proteção da espermatogênese (da Cunha et al., 1987). Apesar da supressão hormonal não ter mostrado proteção na espermatogênese em camundongos, mostrou-se de maneira convincente que a supressão dos níveis de gonadotrofinas e de testosterona intratesticular, antes ou durante a exposição de ratos a quimioterapia e radioterapia, melhora a subsequente recuperação da espermatogênese (Delic et al., 1986; Meistrich and Kangasniemi, 1997).

### *Estudos experimentais*

As espermatogônias diferenciadas são mais sensíveis aos agentes citotóxicos. Essa redução pode ser temporária, desde que espermatogônias-tronco sobrevivam. Entretanto, alguns desses agentes matam as células-tronco em graus variados de toxicidade, levando a prolongados períodos de redução de produção espermática (Meistrich et al., 1982). Em ratos, após exposição a vários agentes antineoplásicos, as espermatogônias que sobrevivem perdem a capacidade de se diferenciar (Kangasniemi et al., 1996a; Meistrich and Shetty, 2003). Demonstrou-se que esse bloqueio é resultado de danos ao meio ambiente somático espermatogonial e não diretamente às espermatogônias (Zhang et al., 2007).

Alguns estudos mostram que a supressão de gonadotrofinas não protege a espermatogênese de danos citotóxicos em camundongos (Kangasniemi e al., 1996b; Nonomura et al., 1991). Por outro lado, inúmeros estudos relatam que a supressão hormonal em ratos, protege a espermatogênese de danos causados por irradiação e vários agentes quimioterápicos (Delic et al., 1986; Morris and Shalet, 1990; Jègou et al., 1991; Parchuri et al., 1993; Kangasniemi et al., 1995) Além da supressão direta de gonadotrofinas com agonistas e antagonistas do GnRH, que resulta na supressão da testosterona intratesticular, esses estudos também utilizaram combinações de análogos de GnRH com antiandrógenos, com doses fisiológicas sistêmicas de testosterona, que também suprimem as gonadotrofinas e reduzem a testosterona intratesticular e com estrogênios, que suprimem as gonadotrofinas e inibem a síntese de testosterona. Na verdade, esses estudos não avaliaram a proteção espermatogonial no momento da exposição citotóxica, mas sim na capacidade de recuperação da espermatogênese através da sobrevivência das células-tronco, que é o desfecho mais relevante para a futura fertilidade (Meistrich et al., 2000).

As tentativas de proteger a espermatogênese com supressão hormonal em outras espécies animais (cães, macacos) não obtiveram resultados positivos. Estudos maiores não mostraram proteção ou estimulação da espermatogênese em macacos contra irradiação, com tratamentos utilizando antagonistas do GnRH. (Boekelheide et al., 2005; Kamischke et al., 2003).

Em muitos estudos realizados em ratos, a proteção hormonal da espermatogênese foi realizada após exposição inicial ao agente citotóxico e, em alguns casos, prolongou-se além da última exposição. Além disso, quando a supressão hormonal foi administrada imediatamente após o insulto citotóxico, ou mesmo algum tempo depois de seu término, o número de células germinativas diferenciadas aumentou dramaticamente. (Meistrich and Kangasniemi, 1997; Meistrich et al., 1999). Tratamentos com agonistas ou antagonistas GnRH, com ou sem

antiandrógenos, testosterona sistêmica ou o estradiol, são eficazes na recuperação da espermatogênese em ratos, seguindo tratamentos citotóxicos antineoplásicos como irradiação, procabazina, bussulfan ou outros agentes quimioterápicos. O hormônio endógeno primariamente responsável pela diferenciação espermatogonial nesses casos foi a testosterona, apesar de que o FSH também teve um efeito inibidor menor (Shetty et al., 2002; Shetty et al., 2006). O mecanismo pelo qual as células somáticas dos testículos de ratos são protegidas contra danos citotóxicos, quando a testosterona é suprimida, não é conhecido. Também não se sabe por que a supressão de testosterona, após exposição citotóxica, aumenta a capacidade dos elementos somáticos dos testículos em manter a diferenciação das espermatogônias (Meistrich et al., 1994) Mostrou-se também que o bloqueio da diferenciação espermatogonial em ratos tratados com agentes citotóxicos está associado com o aumento dos níveis de edema intersticial nos testículos. (Porter et al., 2006).

A melhora da recuperação da diferenciação espermatogonial em ratos irradiados, com a eliminação das células de Leydig por ethano dimethano sulfonado (EDS), traz a hipótese do papel das células de Leydig como alvo para indução de inibição da testosterona na diferenciação espermatogonial em ratos tratados com citotóxicos. (Albuquerque et al., 2013).

#### *Estudos clínicos*

Sete ensaios clínicos foram realizados na tentativa de demonstrar proteção da espermatogênese em seres humanos, por meio de tratamento de supressão hormonal antes e durante terapia citotóxica, sendo que seis não indicaram qualquer proteção. Três desses estudos envolveram pacientes tratados para linfoma de Hodgkin e três com câncer de testículo. Apenas um estudo realizado em pacientes portadores de síndrome nefrótica, tratados com ciclofosfamida, apresentou proteção da espermatogênese com a supressão hormonal, conforme mostram as descrições abaixo. (Meistrich and Shetty, 2008).

O tratamento com GnRH-agonista resultou na recuperação da espermatogênese em apenas 20% de pacientes tratados, após a interrupção da quimioterapia para linfoma de Hodgkin. Entretanto não havia grupo controle para comparar os resultados (Johnson et al., 1985). Em outro estudo, a supressão hormonal com testosterona mais GnRH-agonista, antes e durante a quimioterapia para linfoma de Hodgkin, nem o grupo tratado e nem o controle apresentaram evidências de recuperação da espermatogênese em um período de um a três anos após a conclusão do tratamento (Waxman et al., 1987). Supressão de gonadotrofinas e dos níveis de testosterona intratesticular, com injeções de testosterona durante tratamento quimioterápico para linfoma de Hodgkin, também não ofereceu proteção gonadal, pois 70% dos indivíduos do grupo tratado e também do grupo controle apresentaram recuperação num período de três anos (Redman and Bajorunas, 1987).

A supressão de gonadotrofinas com acetato de medroxiprogesterona durante quimioterapia associada à radioterapia para tratamento de tumor testicular, não melhorou a contagem de espermatozoides e nem normalizou os níveis de FSH no grupo tratado, ficando abaixo do grupo controle (Fossa et al., 1988). Outro estudo que

utilizou GnRH-agonista para pacientes com tumor de testículo antes e durante tratamento quimioterápico (cisplatina) também não apresentou vantagens sobre o grupo controle, pois ambos recuperaram espontaneamente a espermatogênese dentro de dois anos (Kreuser et al., 1990). Da mesma maneira, em pacientes portadores de seminomas testiculares, tratados com GnRH-agonista mais antiandrogênio (acetato de Ciproterona), antes e durante radioterapia (0,2 Gy), ambos os grupos apresentaram recuperação espontânea da espermatogênese em dois anos (Brennemann et al., 1994).

Um estudo realizado em pacientes portadores de síndrome nefrótica, tratados com ciclofosfamida, receberam tratamento de supressão hormonal com testosterona. Todos os cinco pacientes recuperaram a espermatogênese após tratamento, ao contrário do grupo controle, onde apenas um de cinco pacientes recuperou, com os outros quatro permanecendo azoospermicos. (Masala et al., 1997).

A única tentativa de restaurar a espermatogênese por supressão hormonal após terapia citotóxica também não foi bem sucedida. Sete homens com azoospermia, após uma elevada dose de quimioterapia ou radioterapia para tratamento de leucemia ou linfoma na infância, foram tratados com medroxiprogesterona combinada com testosterona, para suprimir os níveis de gonadotrofinas e testosterona intratesticular, muitos anos após o tratamento antineoplásico. Nenhum dos homens recuperou qualquer produção de espermatozoides durante 24 semanas após o fim do tratamento hormonal. Biópsias testiculares foram realizadas no pré e no pós-tratamento e mostraram completa ausência de células germinativas, demonstrado por estudo imunohistoquímico (Thomson et al., 2002).

Podem existir diversas razões para o insucesso dos ensaios clínicos acima mencionados. Humanos têm níveis de andrógenos testiculares mais elevados, podendo não haver supressão hormonal suficiente como ocorre em ratos. O número de pacientes e controles estudados foi pequeno e os tipos de tratamentos utilizados para o câncer foi muito heterogêneo. Assim, a aplicação desses procedimentos para seres humanos, no momento atual, ainda permanece incerta.

### **3.3 – FORMAS DE TRATAMENTO PARA O CÂNCER DE PRÓSTATA**

O câncer de próstata é a segunda neoplasia maligna mais frequente no sexo masculino, levando a milhares de mortes anualmente em todo o mundo. No Brasil, é o câncer mais freqüente, excluindo-se os tumores de pele não melanomas. Estima-se mais de 60.000 casos novos no ano de 2012, em nosso país. Quando a doença está localizada, ou seja, confinada ao tecido prostático, ela é potencialmente curável, através de tratamento cirúrgico (prostatectomia radical), radioterapia externa, ou braquiterapia (implante de sementes radioativas no tecido prostático). Por outro lado, a doença avançada não é mais passível de cura, sendo tratada apenas por métodos paliativos, visando prolongar e melhorar a qualidade de vida do paciente. A doença localmente avançada, que atinge os tecidos extraprostáticos, vesículas seminais, bexiga ou reto, pode ser tratada também com cirurgia radical, radioterapia externa ou

hormonioterapia, mas sem pretensões curativas. Por outro lado, a doença metastática, que mais frequentemente atinge os ossos, só deve ser tratada através de hormonioterapia, por supressão de testosterona, hormônio que acelera o crescimento do câncer prostático. O bloqueio de testosterona pode ser feito através de castração cirúrgica, com a retirada completa do parênquima testicular, que é considerada o método padrão-ouro de bloqueio hormonal, ou por bloqueio medicamentoso central ou periférico. O bloqueio central é feito através de drogas que suprimem a ação das gonadotrofinas (FSH E LH) na glândula hipófise ou do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no hipotálamo, bloqueando, por sua vez, a produção de testosterona pelas células intersticiais de Leydig nos testículos. As drogas mais frequentemente utilizadas, na prática clínica, para bloqueio central são os estrógenos (dietilestilbestrol), os agonistas do GnRH (Leuprolida e Goserilina) e o acetato de ciproterona, que tem ação central e periférica. Os bloqueadores periféricos, por sua vez, atuam bloqueando os receptores de testosterona no tecido prostático, impedindo sua ação local sobre as células malignas. Os mais utilizados são a flutamida, a bicalutamida e o acetado de ciproterona. (Corradi et al., 2009; Gudziak and Smith, 1994).

## **4. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **4.1. Considerações éticas**

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

### **4.2. Pacientes**

Os sujeitos dessa pesquisa foram pacientes portadores de câncer avançado de próstata, submetidos à castração cirúrgica (orquiectomia subcapsular bilateral) como forma de bloqueio definitivo de testosterona, para tratamento paliativo da doença localmente avançada ou metastática, conforme indicação da literatura médica. (Fonseca et al, 2009; Gudziak and Smith, 1994). A coleta desse material biológico ocorreu no período de março de 2007 até março de 2011 (quatro anos), de um total inicial de 24 pacientes. Dois pacientes foram excluídos no final do estudo, por não preencherem os critérios de inclusão nos grupos estudados. O primeiro por ter feito tratamento hormonal com estrogênio durante três anos, porém interrompeu oito meses antes da orquiectomia e o segundo por não apresentar dados confiáveis sobre o seu tratamento radioterápico (dose e período de tratamento). Mesmo assim, esses casos foram incluídos no capítulo de discussão, como casos isolados, por apresentarem dados relevantes, que poderiam ser utilizados em estudos futuros, apesar de não terem sido incluídos na análise estatística do presente estudo. Portanto, foram incluídos 22 pacientes, com idades entre 59 e 90 anos, com média de 74,3 anos, conforme descrição abaixo.

### **4.3. Grupos de estudo**

Sete pacientes foram submetidos à orquiectomia bilateral como forma primária de tratamento, por já apresentarem doença avançada desde o diagnóstico. Quatro pacientes foram inicialmente tratados com prostatectomia radical, quando a doença ainda estava localizada na próstata, mas posteriormente apresentaram recidiva da doença e receberam indicação de castração cirúrgica. Seis outros pacientes foram inicialmente tratados com hormonioterapia, para bloqueio de testosterona na doença avançada, sendo três tratados com estrógeno (bloqueador central), dois com acetato de ciproterona (bloqueador central e periférico) e um com análogo do GnRH (bloqueador central), sendo que esse último paciente já havia sido submetido à prostatectomia radical quando a doença estava localizada. Posteriormente todos

esses seis pacientes receberam indicação de orquiectomia subcapsular como tratamento definitivo. Outros cinco pacientes foram tratados com radioterapia externa, por acelerador linear de partículas, quando a doença estava localizada. Desses, três deles tiveram indicação da orquiectomia bilateral com o avanço da doença, um usou análogo do GnRH e depois foi indicada a orquiectomia bilateral e um último usou análogo GnRH para bloqueio central e depois flutamida e bicalutamida para bloqueio periférico de testosterona, anteriormente à indicação de orquiectomia bilateral. Obtiveram-se os dados detalhados de cada um desses pacientes através de protocolo clínico preenchido por informações coletadas do próprio paciente ou de seus familiares, ou ainda de dados contidos em documentos em seu prontuário hospitalar. (Anexo IV).

O parênquima testicular foi obtido de pacientes submetidos à orquiectomia no Hospital das Clínicas da UFMG, sob coordenação de equipe médica do Serviço de Urologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A indicação de orquiectomia subcapsular bilateral foi feita por médicos que trabalham na área de uro-oncologia, sem nenhuma influência do presente estudo na conduta médica para o tratamento do câncer de próstata. Os tecidos testiculares foram utilizados com a concordância dos pacientes e familiares em ceder esse material para pesquisa, após preenchimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. (ANEXO III).

Os grupos de estudo ficaram compostos, portanto, da seguinte maneira:

#### *Grupo tratado com castração cirúrgica (CC)*

Composto por pacientes portadores de câncer avançado de próstata, submetidos à orquiectomia subcapsular bilateral como forma de bloqueio hormonal definitivo, que não haviam se submetido a nenhum tratamento prévio ou que foram tratados somente com a prostatectomia radical, quando a doença ainda estava localizada na próstata. Incluíram-se nesse grupo, 11 pacientes, com média de idade de 74,8 anos.

#### *Grupo tratado com terapia hormonal antes da castração cirúrgica (TH+CC)*

Composto por pacientes portadores de câncer avançado de próstata, submetidos à orquiectomia subcapsular bilateral como forma de bloqueio hormonal definitivo, que se encontravam em tratamento hormonal exclusivo com bloqueadores de testosterona, de ação central ou periférica. Incluíram-se nesse grupo, seis pacientes, com média de idade de 74,2 anos.

#### *Grupo tratado com radioterapia externa exclusiva ou associada à hormonioterapia antes da castração cirúrgica (TR+CC)*

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

tratamento ou então tendo sido tratado posteriormente com bloqueadores centrais ou periféricos de testosterona. Incluíram-se nesse grupo, cinco pacientes, com média de idade de 73,4 anos.

Os dados completos e detalhados do tratamento de cada um desses 22 pacientes estão resumidos no Anexo V, na ordem cronológica de acontecimentos, até a realização da orquiectomia bilateral.

#### **4.4. Orquiectomia bilateral**

Realizou-se a orquiectomia subcapsular, com bloqueio anestésico local por punção percutânea do escroto, utilizando-se seringa estéril de 20 ml acoplada a uma agulha de 21-gauge, com infiltração de 7 mL de solução 1:1 de lidocaína 1% e bupivacaína 0,5% em cada cordão espermático e 1mL dessa solução sob a pele e subcutâneo da região a ser incisada. Com o paciente na posição de decúbito dorsal, fez-se a degermação da pele de toda a região genital com solução PVPI degermante e anti-sepsia da mesma com tintura de PVPI. Iniciou-se o procedimento cirúrgico com uma incisão da pele escrotal de aproximadamente 4,0 cm, na região da rafe escrotal, por onde foram expostas todas as camadas, desde a pele até a túnica vaginal. A hemostasia foi realizada com auxílio de um eletrocautério. O testículo foi exteriorizado e teve toda sua túnica albugínea aberta da extremidade cranial a caudal, todo o parênquima testicular exposto, completamente liberado da albugínea com auxílio de uma gaze, seccionando-se com um bisturi no nível da rede testicular. Nesse tempo cirúrgico novamente realizou-se hemostasia, com auxílio do eletrocautério e suturou-se com fio de catgut 2-0. O mesmo fio foi usado na rafia dos outros planos, separadamente até a pele. Realizou-se o mesmo procedimento no testículo contralateral.

#### **4.5. Processamento histológico do parênquima testicular**

Imediatamente após a orquiectomia, o parênquima dos testículos direito e esquerdo foi separado e de cada um deles obteve-se fragmentos que foram colocados em solução de glutaraldeído que teve como objetivo preservar os tecidos para estudos sob microscopia de luz em resina glicol metacrilato e microscopia de luz de alta resolução em araldite.

##### *Fixação em glutaraldeído e inclusão em glicol metacrilato*

Após a orquiectomia, fragmentos dos testículos foram fixados por imersão em glutaraldeído a 5% em tampão fosfato 0,05M pH 7,3, por 24 horas. Estes fragmentos foram mantidos a 4°C até o momento da inclusão. No momento da inclusão, finos fragmentos de 1 a 2 mm de espessura foram recortados da superfície dos fragmentos testiculares. Estes fragmentos foram desidratados em série crescente de alcoóis e incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato (Historesina, Leica), conforme descrito por Chiarini-Garcia et al. (2011). Dos blocos foram obtidos cortes histológicos de 3 e 5 µm de espessura que foram corados com azul de toluidina-borato de sódio. Os fragmentos testiculares submetidos a este processamento foram utilizados para a

obtenção de diferentes escores da espermatogênese, levando em consideração três métodos: de cinco padrões, de Johnsen e de Bergmann.

#### *Fixação em glutaraldeído e inclusão em araldite*

Fragmentos testiculares foram fixados por imersão em glutaraldeído a 5% em tampão fosfato 0,05M pH 7,3, por 10 a 15 minutos. Após ter adquirido certa consistência, estes fragmentos foram recortados em pedaços menores e adicionalmente fixados por mais 12 a 24 horas a 4°C, com solução renovada de glutaraldeído. Após esse período, da superfície desses fragmentos foram recortadas finas fatias, de aproximadamente 1 mm de espessura, que foram armazenadas em tampão fosfato 0,05M pH 7,3 a 4°C, até o momento da inclusão. Imediatamente antes da inclusão, estes finos fragmentos testiculares foram recortados em fragmentos ainda menores com aproximadamente 2 mm<sup>2</sup> de superfície e pós-fixados em ósmio reduzido (tetróxido de ósmio a 1%, ferrocianeto de potássio a 1,5% em água destilada) à temperatura ambiente por 90 minutos. Após desidratação em série crescente de alcoóis e banhos de acetona, estes fragmentos de testículo foram incluídos em resina araldite (EMS), conforme protocolo já padronizado e em uso rotineiro no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (Laber) do ICB/UFMG (Chiarini-Garcia & Meistrich, 2008).

Dos blocos de araldite foram obtidos cortes semifinos (1µm de espessura) que foram utilizados para os estudos morfométricos dos testículos sob a microscopia de luz de alta resolução. Os cortes histológicos semifinos foram obtidos com navalha de vidro (preparadas em *knife maker* da LKB, modelo 7880B), no micrótomo rotativo automático Reichert Jung (mod. 1140/autocut). Estes estudos foram desenvolvidos no Laber – Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução do ICB/UFMG.

#### **4.6. Avaliação dos escores histopatológicos testiculares**

Utilizaram-se três diferentes padrões de avaliação da espermatogênese. Um deles, classicamente utilizado na anatomia patológica, é o escore de cinco padrões de alterações da espermatogênese, baseado em Levin (1979) e revisado por McLachlan et al. (2007). Os outros dois foram os escores de Johnsen (Johnsen, 1970), que divide as alterações da espermatogênese em 10 escores e detalha com mais informações o padrão de cinco escores, citado anteriormente, separando os diferentes tipos de hipoespermatogênese e parada de maturação. Por último, o escore de Bergmann (Bergmann et al., 1994; revisão em Bergmann e Kliesch, 2010), que avalia as alterações da espermatogênese em relação à presença de espermátides alongadas no parênquima testicular. Os resultados das avaliações dos escores foram transcritos para planilha específica (Anexo VI). Avaliou-se aproximadamente 100 túbulos seminíferos de cada testículo em cada um dos indivíduos estudados. Abaixo a descrição dos detalhes que caracterizam os diferentes escores, para cada um dos métodos utilizados.

#### 4.6.1. Escore de cinco padrões

A classificação dos cinco padrões, rotineiramente utilizada nos laboratórios de anatomia patológica e pelos andrologistas na avaliação das alterações testiculares, baseou-se na descrição dos seguintes padrões:

*Padrão 5* - Espermatogênese normal: quando o epitélio germinativo está completo em toda a área avaliada na biópsia, associado a um tecido intertubular normal.

*Padrão 4* - Hipoespermatogênese: quando todos os estágios da linhagem do epitélio germinativo são identificados, mas na maioria dos túbulos seminíferos ele encontra-se reduzido em vários graus. Esta classificação inclui os padrões mistos, com túbulos com padrão de parada de maturação, aplasia de células germinativas e fibrose testicular, quando esses estão associados ao encontro de túbulos seminíferos com o epitélio germinativo completo.

*Padrão 3* - Parada de maturação: esse padrão descreve a parada total do epitélio germinativo em algum estágio particular da espermatogênese, sem a formação de espermátides alongadas.

*Padrão 2* - Aplasia de células germinativas: esse termo é usado exclusivamente para descrever o padrão de túbulos seminíferos com ausência de qualquer célula germinativa e apenas revestidos por células de Sertoli.

*Padrão 1* - Fibrose testicular: esse padrão descreve estruturas com aparência de túbulos seminíferos, mas que não possuem nenhuma célula em seu interior (células germinativas ou de Sertoli), usualmente apresentam fibrose peritubular e o acúmulo de um depósito amorfo no seu interior (hialinização).

Todos os cortes dos túbulos seminíferos das biópsias testiculares foram avaliados, inicialmente, com aumento de 200x, para avaliação geral do tecido testicular e, posteriormente, com aumento de 400x, para estudo mais detalhado das células do epitélio germinativo. Esses testículos receberam, então, um escore segundo a classificação descrita anteriormente para os cinco padrões histopatológicos da espermatogênese.

#### 4.6.2. Escore de Johnsen

Esse padrão de avaliação da espermatogênese avalia com mais detalhes as alterações do epitélio seminífero, por determinar com mais exatidão onde ocorrem as aplasias ou paradas de maturação das células germinativas. Todas as secções tubulares de um corte foram examinadas sistematicamente e cada uma delas recebeu um escore de 1 a 10, de acordo com os critérios abaixo.

*Escore 10* - Espermatogênese completa, com muitas espermátides alongadas. Epitélio germinativo organizado, com espessura preservada e a luz do túbulo livre.

- Escore 9* - Muitas espermátides alongadas estão presentes, mas, o epitélio germinativo está desorganizado, com evidente descamação ou obliteração da luz do túbulo.
- Escore 8* - Apenas algumas espermátides alongadas (menos de cinco) presentes no corte transversal do túbulo seminífero.
- Escore 7* - Ausência de espermátides alongadas e presença de muitas espermátides em alongamento e arredondadas.
- Escore 6* - Ausência de espermátides alongadas e presença de poucas espermátides em alongamento e arredondadas (menos de cinco).
- Escore 5* - Ausência de espermátides e presença de muitos espermatócitos.
- Escore 4* - Ausência de espermátides e presença de poucos espermatócitos (menos de cinco)
- Escore 3* - Espermatogônias são as únicas células germinativas presentes.
- Escore 2* - Ausência de células germinativas e presença apenas de células de Sertoli.
- Escore 1* – Ausência de células germinativas ou somáticas no corte transversal do túbulo seminífero.

Apenas os cortes transversais de túbulos seminíferos foram contados, em aumento final de 200x, seguindo as recomendações de Johnsen (1970). Os túbulos danificados não foram considerados na contagem, enquanto aqueles túbulos completamente hialinizados, sempre eram contados quando devidamente identificados. Quando foi necessário identificar o tipo celular mais detalhadamente, foram utilizados aumentos finais de 400x e 1000x. O cálculo do escore médio de um testículo foi obtido multiplicando o número de túbulos contados em cada um dos escores, de um a dez, pelo valor do seu escore. Os valores obtidos de todos os escores foram somados e divididos pelo número total de túbulos seminíferos contatos (ver exemplo no Anexo IV).

#### 4.6.3. Escore de Bergmann

A avaliação do critério de Bergman foi feita baseando-se na percentagem de túbulos seminíferos mostrando espermátides alongadas (Sd1 e Sd2; ver Fig. 4). Todos os túbulos seminíferos presentes nos cortes histológicos foram analisados e no final, o número total de túbulos contendo espermátides alongadas (escores 8, 9 e 10 de Johnsen) foi dividido pelo número total de túbulos contados (ver exemplo no Anexo IV).

$$Escore = \frac{NE}{NT} \times 10$$

NE – nº total de túbulos seminíferos com espermátides alongadas  
 NT – nº total de túbulos seminíferos contados

Obeve-se então, a porcentagem de túbulos com espermatídes alongadas, ou seja, a nota 10 significa 100% de túbulos contendo espermatídes alongadas e a nota 1 significa 10% de túbulos contendo espermatídes alongadas. Quando menos de 10% (9% a 1%) dos túbulos seminíferos apresentaram espermatídes alongadas utilizou-se subclassificação com escore de 0,9 a 0,1 (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação histopatológica da espermatogênese segundo Bergmann e Kleisch (2011).

%*	Escore	Descrição histopatológica
100 - 95	10	Espermatogênese normal
94 - 85	9	
84 - 75	8	
74 - 65	7	Túbulos seminíferos com espermatogênese e áreas de atrofia
64 - 55	6	
54 - 45	5	
44 - 35	4	
34 - 25	3	
24 - 15	2	
14 - 10	1	
9 - 1	0,9 - 0,1	Raros túbulos com espermatídes alongadas, predomínio de atrofia do epitélio seminífero.
0	0	Aplasia de células germinativas, parada de maturação, atrofia testicular, túbulos hialinizados

\* Porcentagem de túbulos seminíferos com espermatídes alongadas

#### 4.7. Avaliação hormonal

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

##### *Dosagem de Testosterona total*

Foi utilizado o método de dosagem da testosterona total sérica, calculado através de imunoensaio do tipo competitivo, que usa a tecnologia de

quimioluminescência. O valor de referência para homens adultos desse método varia entre 175 a 781 ng/dL.

#### *Dosagem do Hormônio Folículo Estimulante (FSH)*

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

#### *Dosagem do Hormônio Luteinizante (LH)*

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

### **4.8. Avaliação morfológica**

As avaliações morfológicas da espermatogênese foram realizadas nos fragmentos de testículo processados para análise sob microscopia de luz de alta resolução onde os tecidos foram fixados com glutaraldeído a 5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, incluídos em araldite, cortados em cortes histológicos de 1 µm de espessura e corados com azul de toluidina em borato de sódio. Fotomicrografias foram obtidas no fotomicroscópio BX-51 da Olympus acoplando a câmera fotográfica digital Q-Color 3, também da Olympus. As imagens digitais foram tratadas no programa Adobe Photoshop 6 e montadas em pranchas no Adobe Illustrator 9.

### **4.9. Análises morfométricas.**

#### *Parâmetros tubulares*

O diâmetro médio dos túbulos e a altura do seu epitélio, foram determinados nos cortes histológicos, utilizando-se régua graduada acoplada à ocular de um microscópio Olympus BX-41, régua esta aferida em micrômetros com o auxílio de uma lâmina micrométrica de Leitz. Mensuraram-se dez secções transversais de túbulo seminífero por indivíduo (cinco em cada testículo), de contorno o mais circular possível, selecionados aleatoriamente em varredura horizontal do tecido, bem como a altura do seu respectivo epitélio seminífero. Quando o corte era levemente oval, mediu-se o menor diâmetro e a altura do epitélio equivalente a esta mesma região, com aumento total de 200x.

#### *Eficiência da espermatogênese*

A avaliação de parâmetros relacionados à eficiência do processo espermatogênico foi obtida através do cálculo de diferentes razões entre o número dos diferentes tipos de células germinativas, em relação ao número de 100 nucléolos de células de Sertoli, presentes no estágio III do ciclo do epitélio seminífero do homem, classificado de acordo com Heller e Clermont (1964). Os tipos celulares presentes e

contados nesse estágio foram células de Sertoli (quando o nucléolo era visível) e as seguintes células germinativas: espermatogônia  $A_{\text{escura}}$ , espermatogônia  $A_{\text{clara}}$ , espermatócito primário em preleptoteno, espermatócito primário em paquíteno e espermátide arredondada Sb1. Devido à forma irregular do núcleo da célula de Sertoli, o seu nucléolo foi a estrutura escolhida para sua contagem por secção transversal de túbulo seminífero. A contagem dos nucléolos (célula de Sertoli) e núcleos (células germinativas) destes tipos celulares foi realizada em 10 secções transversais de túbulo seminífero (cinco por testículo), de contorno o mais circular possível. Como no homem podem ser encontrados mais de um estágio em um mesmo corte transversal de túbulo seminífero, partes dos túbulos seminíferos que continham os estádios III só foram utilizadas quando eles ocupavam desde a base, junto à membrana basal, até o lúmen.

As contagens do número de células obtidas foram corrigidas pela espessura do corte histológico (1  $\mu\text{m}$ ) e pelo diâmetro nucleolar/nuclear, utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann e Almquist (1962), conforme descrita a seguir:

$$NC = NO \frac{EC}{EC + \left(\frac{DM}{2}\right)^2 - \left(\frac{DM}{4}\right)^2}$$

Onde: NC: número corrigido de um determinado tipo celular  
 NO: número obtido deste mesmo tipo celular  
 EC: espessura do corte histológico  
 DM: diâmetro médio do núcleo ou nucléolo

O diâmetro nucleolar/nuclear médio (DM), para cada tipo celular estudado, foi obtido pela média das medidas do diâmetro de 10 nucléolos/núcleos por paciente, sendo cinco por testículo. Devido à sua forma normalmente oval, o diâmetro do núcleo das espermatogônias foi calculado pela média entre o diâmetro maior e o menor. Estas medidas dos diâmetros nucleolares e nucleares foram realizadas em aumento final de 1000X e utilizando-se régua graduada acoplada à ocular de um microscópio Olympus BX-41. Em seguida, equalizou-se o número de cada tipo celular em relação a 100 nucléolos de células de Sertoli.

A partir dos valores corrigidos e equalizados, em relação às células presentes no estágio III do ciclo do epitélio do seminífero humano, as seguintes razões celulares foram obtidas:

- *Índice mitótico*: número de espermatócitos em preleptóteno dividido pelo número de espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$
- *Índice meiótico*: número de espermátides arredondadas Sb1 dividido pelo número de espermatócitos primário em paquíteno
- *Eficiência da célula de Sertoli*: número de espermátides arredondadas Sb1 dividido pelo número de nucléolos das células de Sertoli
- *Rendimento geral da espermatogênese*: número de espermátides arredondadas Sb1 dividido pelo número de espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$ .

### *Número de mitoses espermatogoniais e de apoptoses de células germinativas*

Os números de mitoses espermatogoniais e apoptoses de células germinativas foram determinados pela razão entre o número de mitoses e apoptoses presentes no epitélio seminífero, em relação a 100 nucléolos de células de Sertoli. As contagens foram realizadas em pelo menos 10 túbulos seminíferos escolhidos aleatoriamente, para cada indivíduo. As células em divisão celular contadas foram apenas aquelas que estavam presentes em posição justaposta à membrana basal dos túbulos seminíferos, correspondente ao compartimento basal dos túbulos seminíferos, onde estão localizadas as espermatogônias.

#### **4.10. Análises estatísticas**

Todos os parâmetros avaliados 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 paciente como fator fixo e a morfologia das células como fator aleatório. Os efeitos dos tratamentos sobre a morfometria e morfologia foram analisados utilizando o modelo linear geral (GLM) do SAS. Os eventos nos quais os tratamentos foram significativos, comparações múltiplas foram realizadas utilizando-se as diferenças de probabilidade (pdiff) ente médias, ajustadas pelo teste Tukey-Kramer (SAS, 2001), com  $p < 0,05$  considerado significativo. Nas tabelas e gráficos, os dados foram apresentados como médias  $\pm$  erro padrão da média.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. - Avaliação da espermatogênese pelos escores histopatológicos.

#### 5.1.1 – Escore de Cinco Padrões

Conforme mostra a Tabela 3 e a Figura 2, que representam os resultados do escore histológico testicular de Cinco Padrões, o grupo que não passou por nenhum tipo de tratamento, nem hormonal e nem radioterápico, antes da orquiectomia bilateral (grupo CC), não apresentou resultados estatisticamente diferentes em relação ao grupo que passou por tratamento hormonal exclusivo anterior a orquiectomia (grupo TH+CC). Porém teve resultado significativamente diferente do grupo que passou por tratamento radioterápico prévio (grupo TR+CC), associado ou não ao tratamento hormonal. Por outro lado, o grupo tratado com hormonioterapia exclusiva (TH+CC) e o grupo tratado com radioterapia (TR+CC) antes da realização da orquiectomia bilateral, não apresentaram resultados estatisticamente diferentes entre si.

Tabela 3. Resultados do escore histológico testicular de Cinco Padrões de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata.

Grupo	Testículo Direito	Testículo Esquerdo	Média
CC	4,73 ± 0,14	4,45 ± 0,25	4,59 ± 0,20
TH+CC	3,00 ± 0,45	3,17 ± 0,17	3,09 ± 0,31
TR+CC	2,20 ± 0,49	2,60 ± 0,40	2,40 ± 0,45

CC=castração cirúrgica; TH+CC= tratamento hormonal + castração cirúrgica,  
TR+CC= tratamento radioterápico + castração cirúrgica

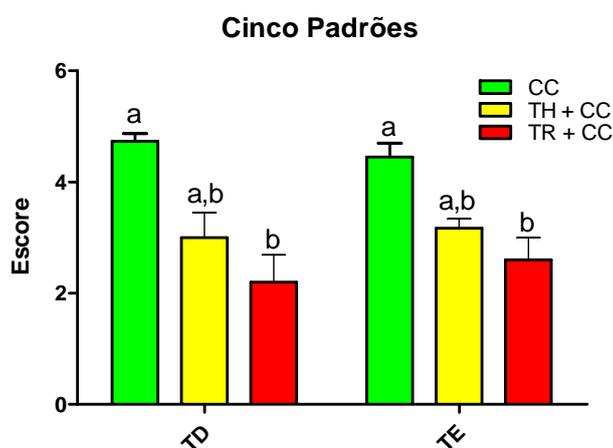


Figura 2 – Escore histológico testicular de Cinco Padrões de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata. CC, castração cirúrgica; TH+CC, tratamento hormonal mais castração cirúrgica; TR+CC, tratamento radioterápico mais castração cirúrgica; TD, testículo direito; TE, testículo esquerdo.

### 5.1.2 – Escore de Johnsen

Conforme mostra a Tabela 4 e a Figura 3, que representam os resultados do escore histológico testicular de Johnsen, o grupo que não passou por nenhum tratamento, nem hormonal e nem radioterápico, antes da orquiectomia (grupo CC), apresentou resultados estatisticamente diferentes em relação a ambos os grupos previamente tratados, tanto com hormonioterapia exclusiva (grupo TH+CC) quanto com radioterapia (grupo TR+CC). Por outro lado, os grupos tratados com hormonioterapia exclusiva (grupo TH+CC) e com radioterapia (grupo TR+CC), não apresentaram resultados significativamente diferentes entre si.

Tabela 4 – Resultados do escore histológico testicular de Johnsen de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata.

Grupo	Testículo Direito	Testículo Esquerdo	Média
CC	7,53 ± 0,30	7,16 ± 0,47	7,34 ± 0,39
TH+CC	3,65 ± 0,68	3,49 ± 0,51	3,57 ± 0,60
TR+CC	1,75 ± 0,24	2,11 ± 0,21	1,92 ± 0,23

CC=castração cirúrgica; TH+CC= tratamento hormonal + castração cirúrgica,  
TR+CC= tratamento radioterápico + castração cirúrgica

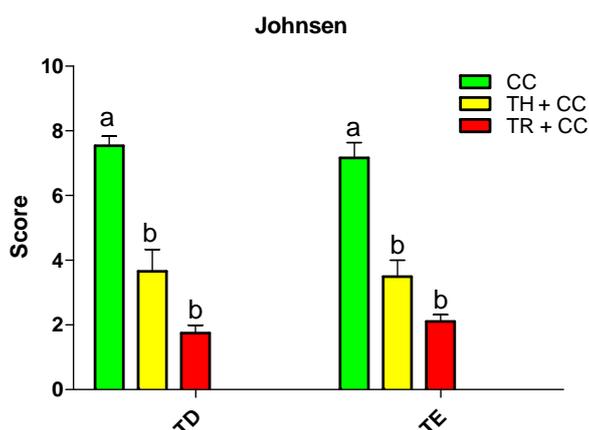


Figura 3 – Escore histológico testicular, segundo Johnsen, de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata. CC, castração cirúrgica; TH+CC, tratamento hormonal mais castração cirúrgica; TR+CC, tratamento radioterápico mais castração cirúrgica; TD, testículo direito; TE, testículo esquerdo.

### 5.1.3 – Escore de Bergmann

Conforme mostra a Tabela 5 e a Figura 4, que representam os resultados do escore histológico testicular de Bergmann, o grupo que não passou por nenhum tratamento, nem hormonal e nem radioterápico, antes da orquiectomia (grupo CC), apresentou resultados estatisticamente diferentes em relação a ambos os grupos previamente tratados, tanto com hormonioterapia exclusiva (grupo TH+CC) quanto com radioterapia (grupo TR+CC). Tal como observado na avaliação pelos outros dois escores, também no escore de Bergmann, os grupos tratados com hormonioterapia exclusiva (grupo TH+CC) e com radioterapia (grupo TR+CC) não apresentaram resultados significativamente diferentes entre si.

Tabela 5 – Resultados do escore histológico testicular de Bergmann de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata.

Grupo	Testículo Direito	Testículo Esquerdo	Média
CC	5,93 ± 0,85	5,10 ± 1,09	5,52 ± 0,97
TH+CC	0,40 ± 0,30	0,07 ± 0,07	0,24 ± 0,19
TR+CC	0,06 ± 0,06	0,10 ± 0,08	0,08 ± 0,07

CC=castração cirúrgica; TH+CC= tratamento hormonal + castração cirúrgica,  
TR+CC= tratamento radioterápico + castração cirúrgica

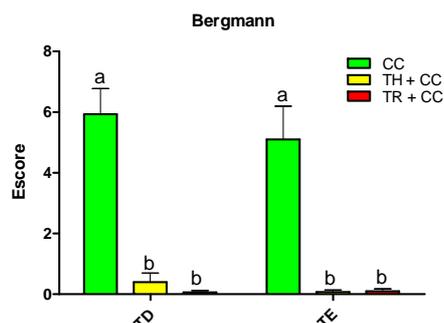


Figura 4 – Escore histológico do testículo de homens idosos, segundo Bergmann, submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata. . CC, castração cirúrgica; TH+CC, tratamento hormonal mais castração cirúrgica; TR+CC, tratamento radioterápico mais castração cirúrgica; TD, testículo direito; TE, testículo esquerdo.

## 5.2. - Avaliação hormonal

A Tabela 6 e a Figura 5, que representam os resultados das dosagens séricas dos hormônios folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH) e testosterona (T), nos grupos de pacientes idosos tratados para câncer avançado de próstata, mostram que o FSH estava dentro dos padrões da normalidade no grupo que não foi submetido a nenhum tratamento, nem hormonal e nem radioterápico, antes da realização da orquiectomia (grupo CC). Entretanto, esse hormônio estava moderadamente elevado nos pacientes que se submeteram a tratamento hormonal exclusivo antes da orquiectomia bilateral (grupo TH+CC) e muito elevado nos pacientes submetidos a tratamento radioterápico prévio à orquiectomia bilateral (grupo TR+CC). Porém não houve diferença significativa entre esses três grupos. As dosagens séricas de LH apresentaram pouca variação entre os três grupos, também sem significância estatística e, finalmente, a testosterona apresentou níveis mais elevados no grupo submetido a orquiectomia bilateral exclusiva (grupo CC), porém também sem significância estatística em relação aos outros grupos.

Tabela 6 - Dosagens hormonais séricas (ng/dL) de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata.

Grupo	FSH	LH	T
CC	8,2 ± 1,8	6,2 ± 0,7	299 ± 57
TH+CC	15,6 ± 4,9	7,0 ± 1,1	178 ± 68
TR+CC	22,1 ± 10,4	7,6 ± 5,0	200 ± 109

CC=castração cirúrgica; TH+CC= tratamento hormonal + castração cirúrgica,  
TR+CC= tratamento radioterápico + castração cirúrgica

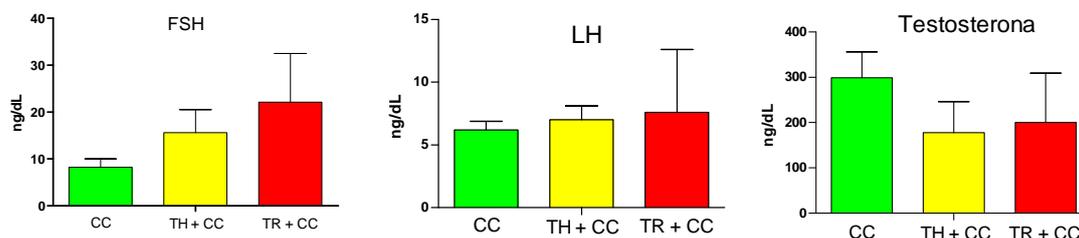


Figura 5 - Dosagens hormonais séricas de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata. CC, castração cirúrgica; TH+CC, tratamento hormonal mais castração cirúrgica; TR+CC, tratamento radioterápico mais castração cirúrgica.

### 5.3. Avaliação morfológica sob microscopia de luz de alta resolução

Os túbulos seminíferos dos testículos de homens idosos com câncer de próstata e que não sofreram nenhum tipo de tratamento antes da orquiectomia (grupo CC), foram semelhantes aos descritos na literatura para o homem normal (Fig. 6A). Identificaram-se os VI estádios do ciclo do epitélio germinativo que apresentavam túbulos seminíferos, na sua grande maioria, com mais de um estágio por secção transversal. A ausência de células germinativas em determinados estádios, onde eram previstas, bem como o posicionamento de células em estádios onde não deveriam estar presentes, foram frequentes.

O epitélio germinativo apresentou, no seu ápice, evidentes espaços extracelulares que estavam relacionados com a esfoliação ou descamação das células germinativas, principalmente das espermatídes (Fig. 6B) e com menor frequência dos espermatócitos. As células de Sertoli de homens idosos apresentavam morfologia aparentemente normal. No citoplasma, observaram-se vacúolos citoplasmáticos em pequena ou moderada quantidade, dependendo do indivíduo (Figs. 6B-C,E) e as gotículas lipídicas foram frequentes na maioria deles (Fig. 6D,E). Em alguns túbulos seminíferos as espermatídes arredondadas e alongadas estavam ausentes, mesmo naqueles estádios onde eram esperadas. As células germinativas, desde as espermatogônias até as espermatídes, apresentavam morfologia aparentemente normal. No epitélio seminífero foram observadas mitoses espermatogoniais e células germinativas em apoptose em todas as fases da espermatogênese, mas com maior frequência em espermatídes. A túnica própria apresentava-se, entre os indivíduos, com número variável de células mióides, demonstrando assim diferentes espessuras.

Em relação ao interstício, observaram-se células de Leydig, sendo algumas delas com citoplasma repleto de gotículas lipídicas. Além delas, foram vistos vasos sanguíneos, mastócitos, leucócitos e células e fibras do tecido conjuntivo (Fig 6F).

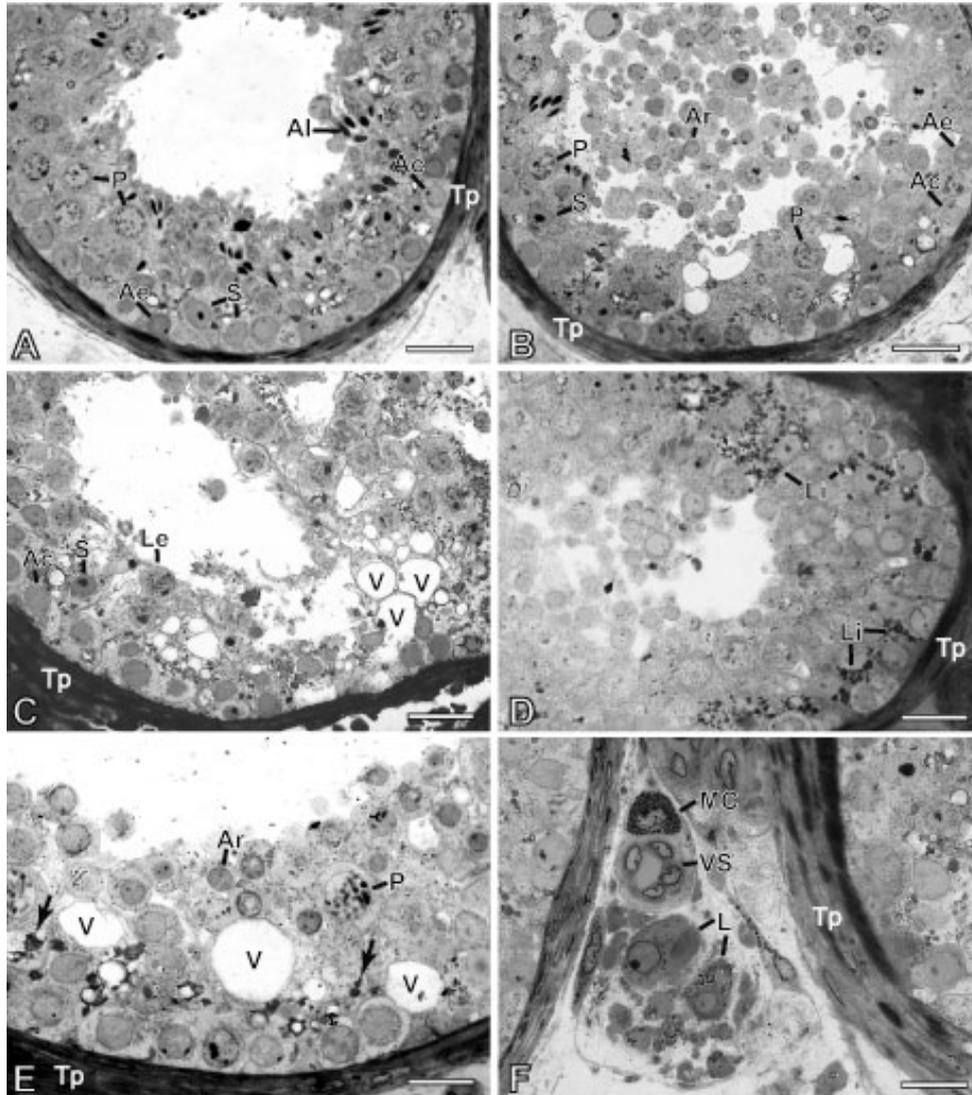


Figura 6. Fotomicrografias de túbulos seminíferos de testículos de homens idosos com câncer de próstata que não sofreram qualquer tipo de tratamento antes da orquiectomia bilateral (grupo CC). Em A, observe corte transversal de túbulo seminífero com aparência normal enquanto em B note despreendimento das espermatídes arredondadas (Ar) que estão livres no lúmen tubular. Observa-se em C presença de vacúolos (V) e em D e E de gotículas lipídicas (Li) no epitélio seminífero. Em F, imagem da região intersticial evidenciando células de Leydig (L), mastócito (MC) e vaso sanguíneo (VS). Ae, espermatogônia A escura; Ac, espermatogônia A clara; P, espermatócito primário em paquíteno; Le, espermatócito primário em leptóteno; Ar, espermatíde arredondada; Al, espermatíde alongada; S, célula de Sertoli, Tp, túnica própria. Barras: A,B,D,F: 25µm; C: 40µm; E, 15µm.

Naqueles indivíduos que receberam tratamento hormonal antes da orquiectomia bilateral (grupo TH+CC) contra o câncer de próstata, encontraram-se células germinativas, em quantidade variável entre os indivíduos, mas que tiveram como semelhança a evolução do processo espermatogênico apenas até espermatócitos na fase intermediária (Figura 7A). O epitélio germinativo foi mais baixo e apresentou as células de Sertoli com citoplasma repleto de vacúolos e grânulos lipídicos (Fig. 7B-C). A túnica própria apresentou maior número de invaginações em direção ao epitélio, quando comparado à dos indivíduos irradiados, mas a espessura da túnica própria foi semelhante entre os indivíduos submetidos aos dois tratamentos (Fig. 7A-C). Encontraram-se alguns túbulos seminíferos com aspecto fibrótico.

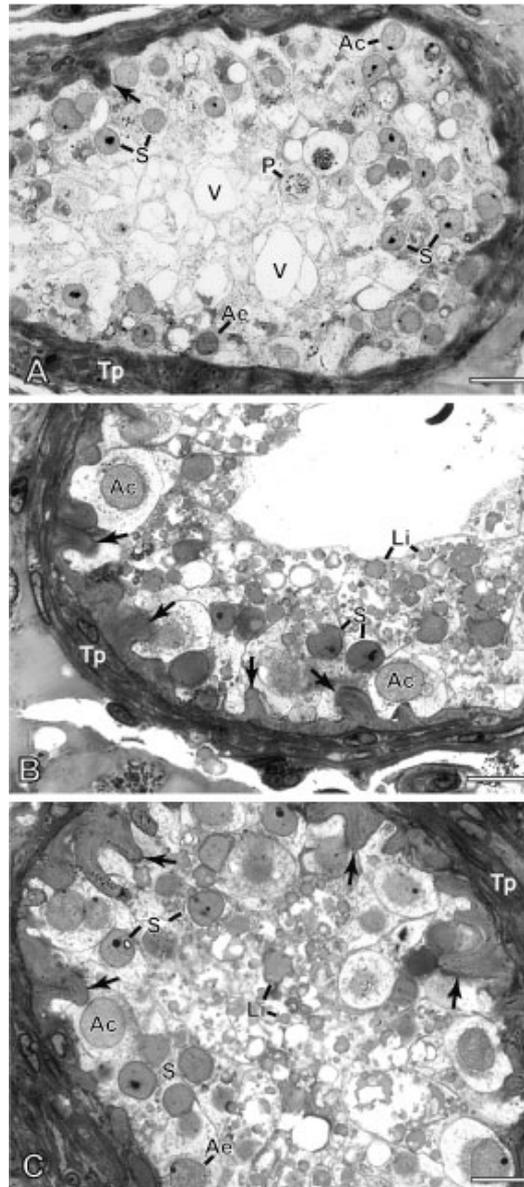


Figura 7. Fotomicrografias do testículo de homens idosos com câncer de próstata que sofreram tratamento hormonal exclusivo antes da orquiectomia bilateral (grupo TH+CC). Em A, corte transversal de túbulo seminífero com epitélio bastante vacuolado e poucas células germinativas, sendo a mais avançada na fase de espermatócito em paquíteno (P). Em B e C, note grande quantidade de gotículas de lipídeos (Li) no epitélio seminífero que tem aparência vacuolada e projeções da membrana basal (setas) para o interior do epitélio seminífero. Note que a túnica própria (Tp) é espessa. Ae, espermatogônia A escura; Ac, espermatogônia A clara; P, espermatócito primário em paquíteno; S, célula de Sertoli. Barras: A: 25 $\mu$ m; B,C: 15 $\mu$ m.

A maioria dos pacientes que recebeu radioterapia como tratamento contra o câncer de próstata antes da orquiectomia bilateral (grupo TR+CC), apresentou o testículo com

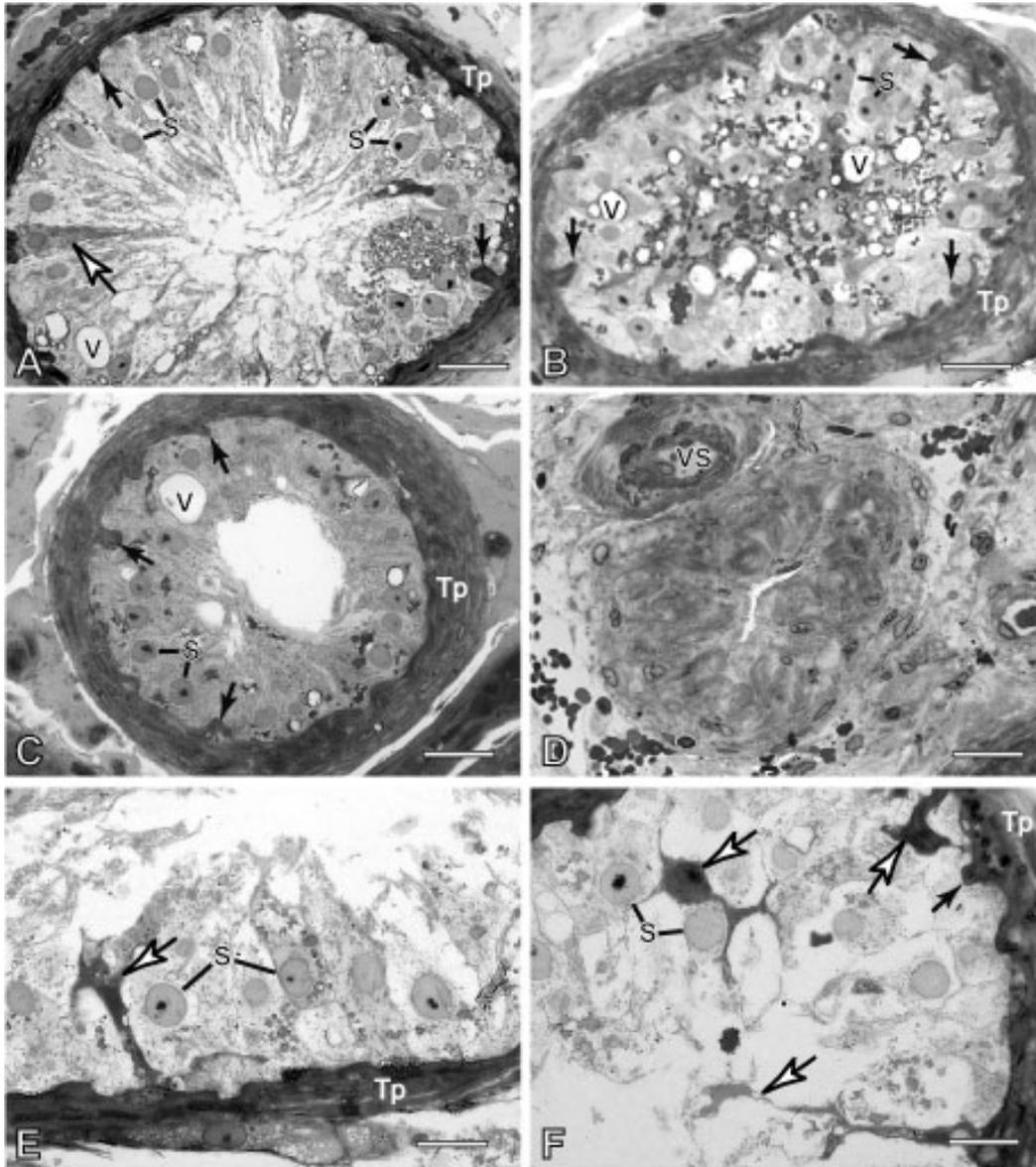


Figura 8. Fotomicrografias de túbulos seminíferos de testículos de homens idosos com câncer de próstata que sofreram tratamento radioterápico antes da orquiectomia bilateral (grupo TR+CC). Em A, corte transversal de túbulo seminífero com epitélio bastante vacuolado e poucas células germinativas alcançando apenas até a fase de espermatócito em paquíteno (P). Em B e C note grande quantidade de gotículas de lipídeos (Li) no epitélio seminífero que tem aparência vacuolada (V) e projeções da membrana basal (setas pretas) para o interior do epitélio seminífero. Note que a túnica própria (Tp) é espessa. D, túbulo seminífero em fibrose e E e F mostram núcleo e citoplasma das células de Sertoli em apoptoses (setas brancas) Ae, espermatogônia A escura; Ac, espermatogônia A clara; P, espermatócito primário em paquíteno; S, célula de Sertoli; VS. Vaso sanguíneo. Barras: A-D: 25 $\mu$ m; E-F: 15 $\mu$ m.

ausência de células germinativas, inclusive das espermatogônias (Fig. 8A). Observou-se, no epitélio seminífero, apenas a presença de células de Sertoli que possuíam quantidade moderada de vacúolos citoplasmáticos e grande quantidade de gotículas lipídicas (Fig. 8B). Foram frequentes os túbulos seminíferos com diâmetro reduzido e túnica própria espessada (Fig. 8C) além de túbulos seminíferos com aspecto fibrótico (Fig. 8D). Da túnica própria espessada observaram-se prolongamentos da membrana basal para o interior do epitélio seminífero (Figs. 8A-C, F). Em raras regiões encontraram-se túbulos seminíferos em ilhas de espermatogênese, com a presença, nestes locais, de células germinativas desde espermatogônias até as espermátides

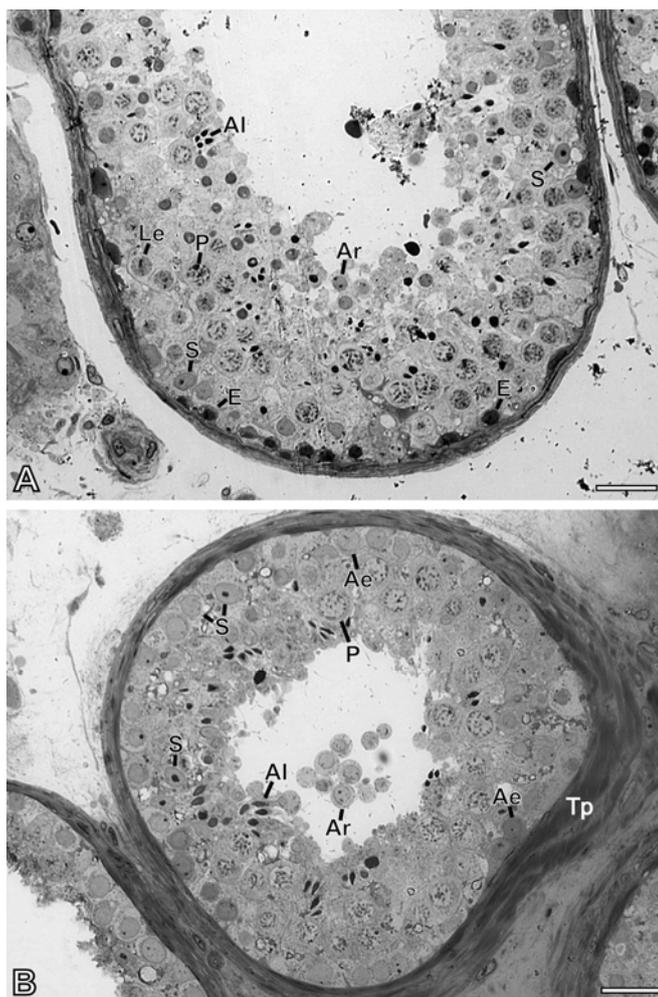


Figura 9. Fotomicrografias de túbulos seminíferos de testículos de dois homens idosos com câncer de próstata. Em A, o indivíduo fez tratamento hormonal (estrógeno) por três anos e interrompeu oito meses antes da orquiectomia. Em B, o indivíduo fez tratamento radioterápico, depois usou terapia hormonal (análogo do GnRH e estrógeno), mas também interrompeu antes da orquiectomia. Note que no testículo dos dois indivíduos – A e B – o processo espermatogênico foi completo, com a espermatogênese alcançando a formação de espermátides alongadas. E, espermatogônia; Ae, espermatogônia A escura; Ac, espermatogônia A clara; P, espermátocito primário em paquíteno; Le, espermátocito primário em leptóteno; Ar, espermátide arredondada; Al, espermátide alongada; S, célula de Sertoli. Barras: A-B: 40 $\mu$ m.

arredondadas. Nestas regiões observaram-se mitoses espermatogoniais. Foram frequentes as células de Sertoli com morfologia de células em apoptose, com citoplasma e núcleo bastante corados e com aspecto de morte celular (Figs. 8E-F).

Os dois pacientes que foram excluídos da análise estatística por não preencherem critérios para inclusão nos grupos estudados, mas que são descritos como relatos de casos, apresentam-se com espermatogênese preservada, com toda linhagem germinativa presente, desde espermatogônias até espermátides alongadas, conforme mostra a Figura 9. O primeiro, que foi tratado com estrógeno por três anos, mas interrompeu o tratamento oito meses antes da orquiectomia (Fig. 9A) apresentava-se com espermatogênese completa na maioria dos túbulos seminíferos. O segundo paciente, que primeiro foi irradiado e depois tratado com hormônios (análogo-GnRH e estrógeno), mas também interrompeu a medicação antes da orquiectomia (Fig. 9B), também apresentou espermatogênese completa em grande parte dos túbulos

seminíferos, mas aproximadamente 40% deles apresentavam um quadro histológico de aplasia germinativa, com presença de apenas células de Sertoli.

#### 5.4. Avaliação morfométrica sob microscopia de luz de alta resolução.

##### 5.4.1. Parâmetros tubulares

Após os diferentes tratamentos para o câncer de próstata, constatou-se que houve redução significativa do diâmetro dos túbulos seminíferos em relação ao diâmetro tubular daqueles indivíduos que não sofreram tratamentos anteriores a orquiectomia bilateral. O tratamento hormonal exclusivo e o radioterápico reduziram significativamente a altura do epitélio, quando comparada com a dos indivíduos que não sofreram esses tratamentos. Quanto ao diâmetro do lúmen, o grupo tratado somente com orquiectomia apresentou resultados sem significância estatística em relação ao grupo de tratamento hormonal exclusivo, mas diferentes em relação ao grupo irradiado. Por outro lado, os dois grupos que sofreram tratamentos não apresentaram diferenças significantes entre si. A espessura da túnica própria foi semelhante entre todos os grupos avaliados ( $P < 0,05$ ). (Tabela 7 e Figura 10).

Tabela 7 – Parâmetros dos túbulos seminíferos ( $\mu\text{m}$ ) de homens idosos após diferentes tratamentos contra o câncer de próstata.

Grupo	Diâmetro Tubular	Altura do Epitélio	Lúmen	Túnica Própria
CC	217 $\pm$ 8,58	53,26 $\pm$ 2,25	90,37 $\pm$ 8,24	10,55 $\pm$ 1,05
TH+CC	164 $\pm$ 8,63	32,83 $\pm$ 4,15	70,07 $\pm$ 8,13	15,02 $\pm$ 3,09
TR+CC	155 $\pm$ 10,11	35,38 $\pm$ 5,11	43,87 $\pm$ 8,79	20,25 $\pm$ 4,43

CC=castração cirúrgica; TH+CC= tratamento hormonal + castração cirúrgica; TR+CC= tratamento radioterápico + castração cirúrgica

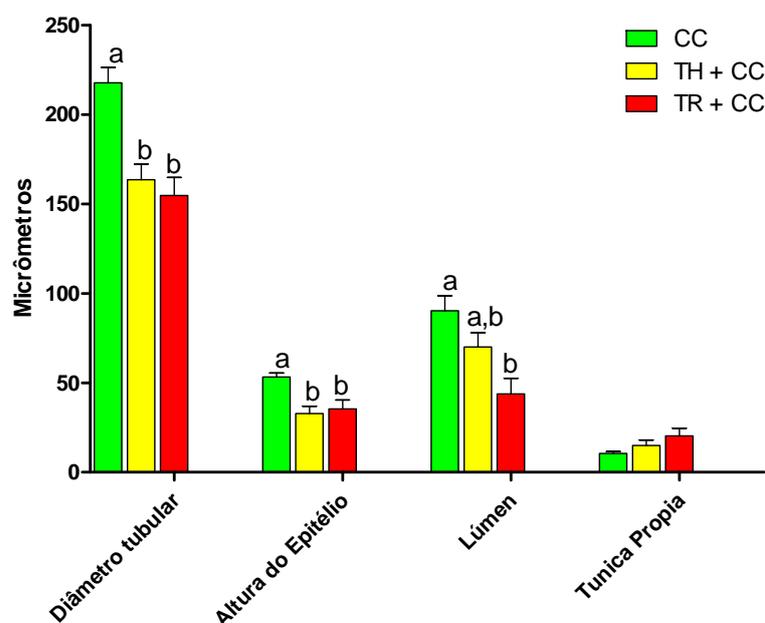


Figura 10 - Parâmetros dos túbulos seminíferos de homens idosos após diferentes tratamentos contra o câncer de próstata. CC, castração cirúrgica; TH+CC, tratamento hormonal mais castração cirúrgica; TR+CC, tratamento radioterápico mais castração cirúrgica.

#### 5.4.2. Número de células germinativas e de Sertoli

A contagem do número de células presentes no estágio III do ciclo do epitélio seminífero do testículo de homens idosos mostrou que o número de espermatogônias do tipo A escura foi significativamente reduzido após tratamento radioterápico, o que não aconteceu após tratamento hormonal exclusivo. Já o número de espermatogônias A clara não foi significativamente alterado após os dois tratamentos. Em relação à fase meiótica e espermiogênica, constatou-se que houve redução drástica do número de células germinativas após os dois tratamentos. Após o tratamento hormonal, espermátides não foram mais observadas. (Tabela 8 e Figura 11).

Tabela 8. Contagem do número de células germinativas (por 100 nucléolos de célula de Sertoli) presentes no estágio III de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata.

Grupo	Espermatogônia	Espermatogônia	Espermatócito	Espermatócito	Espermátide
	A escura	A clara	Preleptóteno	Paquíteno	Sb1
CC	28,99 ± 2,95	27,83 ± 2,49	70,75 ± 5,63	95,95 ± 5,52	170,67 ± 26,11
TH	18,21 ± 5,35	18,06 ± 6,26	27,44 ± 8,04	28,49 ± 11,26	0
TR	6,87 ± 4,50	8,11 ± 4,97	15,89 ± 9,78	16,81 ± 10,55	11,01 ± 8,61

CC=castração cirúrgica; TH+CC= tratamento hormonal + castração cirúrgica; TR+CC= tratamento radioterápico + castração cirúrgica

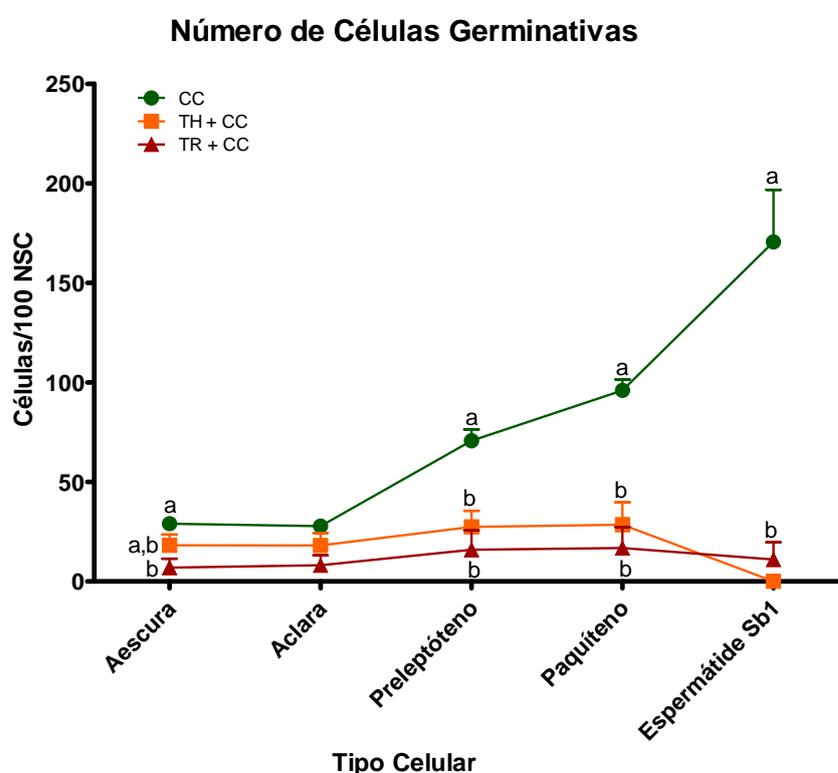


Figura 11 – Número de células germinativas presentes no estágio III do ciclo do epitélio seminífero de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata. CC, castração cirúrgica; TH+CC, tratamento hormonal mais castração cirúrgica; TR+CC, tratamento radioterápico mais castração cirúrgica. SCN, nucléolo de célula de Sertoli.

#### 4.4.3. Índices da espermatogênese

Os tratamentos contra o câncer de próstata afetaram a capacidade mitótica das espermatogônias, uma vez que houve redução das mitoses de aproximadamente 47% em relação àqueles indivíduos que não sofreram tratamentos (Tabela 9 e Figura 12). O índice meiótico, que deve ser de quatro, considerando que de cada espermatócito esperasse um número de quatro espermátides, foi de 1,7 nos homens idosos sem tratamento, enquanto naqueles tratados houve drástica redução de 82%, sendo que nos indivíduos que sofreram tratamentos hormonais, espermátides não foram encontradas (Tabela 9 e Figura 12). A capacidade de suporte das células de Sertoli no homem sem tratamento foi de 1,6 espermátides, enquanto após os tratamentos esta capacidade reduziu para aproximadamente 0,12 espermátides por célula de Sertoli. Quanto à eficiência da espermatogênese verificou-se que enquanto o número de espermátides para cada espermatogônia  $A_{\text{escura}}$  foi de seis nos homens sem tratamento, naqueles que sofreram tratamentos hormonais e radioterápicos foi de zero e 1,2, respectivamente.

Tabela 9. Índices para determinação da eficiência do processo espermatogênico de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata.

Grupos	Índice Mitótico	Índice Meiótico	Eficiência da célula de Sertoli	Eficiência da espermatogênese
CC	2,48 ± 0,19	1,84 ± 0,37	1,71 ± 0,26	6,40 ± 1,69
TH+CC	1,30 ± 0,41	0	0	0
TR+CC	1,03 ± 0,70	0,28 ± 0,18	0,11 ± 0,09	0,83 ± 0,72

CC=castração cirúrgica; TH+CC= tratamento hormonal + castração cirúrgica; TR+CC= tratamento radioterápico + castração cirúrgica

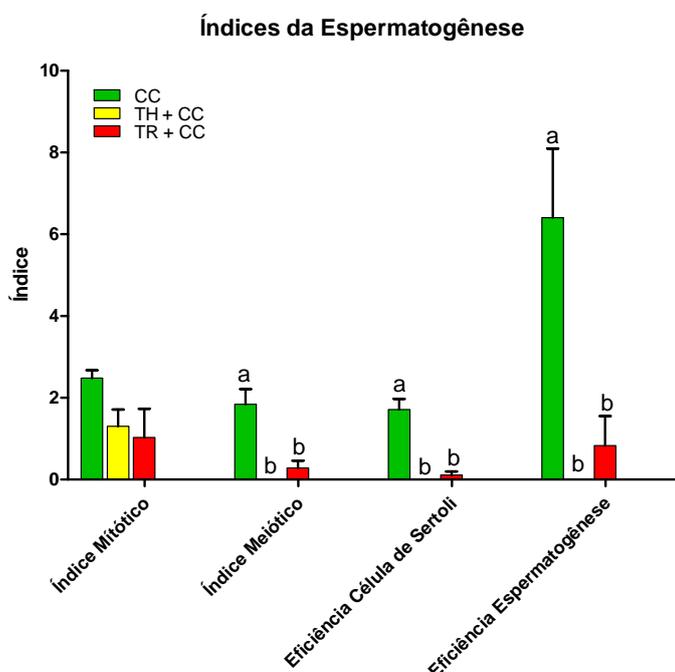


Figura 12 – Índices para determinação da eficiência do processo espermatogênico de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata. CC, castração cirúrgica; TH+CC, tratamento hormonal mais castração cirúrgica; TR+CC, tratamento radioterápico mais castração cirúrgica.

#### 4.4.5. Mitoses espermatogoniais e apoptoses de células germinativas

Independentemente do tratamento após o câncer de próstata, mitoses espermatogoniais foram encontradas no epitélio seminífero. No entanto, apesar de uma tendência de redução após os tratamentos (Tabela 10, Figura 13), não foram encontradas diferenças significativas em comparação com aquelas dos indivíduos que não receberam tratamento antes da orquiectomia. Quanto às apoptoses das células germinativas, constatou-se que o tratamento radioterápico foi mais nocivo para as células germinativas que aqueles que foram tratados com os hormônios (Tabela 10, Figura 13).

Tabela 10- Contagem mitoses e apoptoses no estágio III, equalizadas para 100 NCS, de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata. CC=castração cirúrgica; TH+CC= tratamento hormonal + castração cirúrgica; TR+CC= tratamento radioterápico + castração cirúrgica

Grupos	Mitose espermatogonial	Apoptose de células germinativas
CC	5,96 ± 0,92	15,07 ± 2,48
TH+CC	3,07 ± 1,91	30,52 ± 11,01
TR+CC	2,69 ± 1,81	32,96 ± 20,36

CC=castração cirúrgica; TH+CC= tratamento hormonal + castração cirúrgica;  
TR+CC= tratamento radioterápico + castração cirúrgica

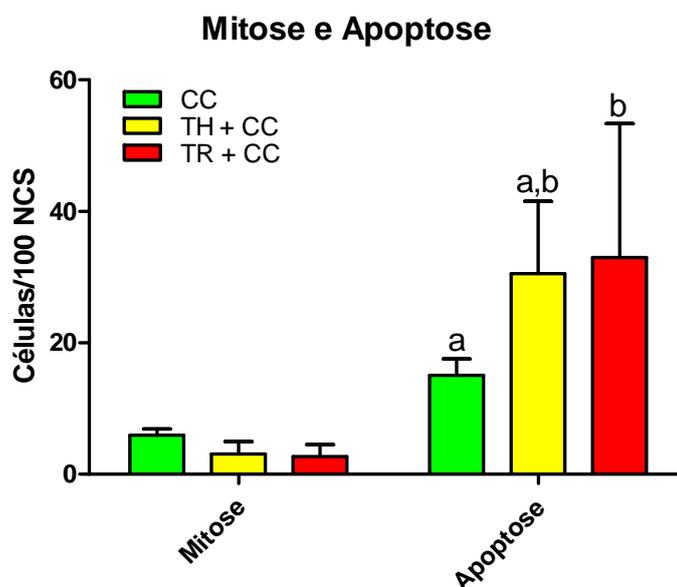


Figura 13 – Contagem de mitoses e apoptoses no estágio III, equalizadas para 100 NCS, de homens idosos submetidos a diferentes tratamentos contra o câncer de próstata. CC, castração cirúrgica; TH+CC, tratamento hormonal mais castração cirúrgica; TR+CC, tratamento radioterápico mais castração cirúrgica. SCN, nucléolo de célula de Sertoli.

## 6. DISCUSSÃO

Ao contrário do que ocorre com as mulheres, as funções reprodutivas masculinas não cessam abruptamente, continuando com a produção de andrógenos e espermatozoides por toda a vida do homem. Alterações dos parâmetros seminais como volume, concentração, motilidade e morfologia espermática são ainda controversas e inconclusivas, quando se compara sêmem de homens mais jovens com de homens idosos (Hermann et al., 2000). Estudos quantitativos revelaram que a produção espermática diária é significativamente mais baixa em homens idosos (50-80 anos) que em homens mais jovens (20-48 anos), com similar peso testicular (Johnson et al., 1984b)

Entender o processo espermatogênico do homem normal torna-se o primeiro passo para compreender como a radioterapia, a hormonioterapia ou a quimioterapia afetam a fertilidade de homens submetidos a esses tratamentos, utilizados com muita frequência no combate ao câncer. Indivíduos que passam por algum desses tratamentos, ou combinação deles, podem ficar curados da doença, porém perder a capacidade reprodutiva, às vezes, de maneira definitiva. (Puscheck et al, 2004; Howell and Shalet, 2005). Tentar preservar a fertilidade de homens jovens, em idade reprodutiva, que se submetem a tratamentos contra o câncer, torna-se cada vez mais imperativo.

No presente estudo, utilizaram-se como sujeitos da pesquisa, pacientes idosos portadores de câncer localmente avançado ou metastático de próstata, que tiveram como indicação de tratamento a supressão definitiva de testosterona, através da castração cirúrgica por orquiectomia subcapsular bilateral. Esse procedimento ainda é muito utilizado em nosso país, por se tratar de uma terapia muito eficiente e de baixo custo, sendo aprovado e coberto financeiramente pelo sistema público de saúde. O material biológico extraído, ou seja, o parênquima testicular, geralmente é descartado, não sendo utilizado para nenhum outro fim. (Gudziak and Smith, 1994; Fonseca et al, 2009). Alguns estudos, realizados por diversos autores, utilizaram o parênquima testicular extraído de pacientes com câncer avançado de próstata, com a finalidade principal de avaliar alterações da espermatogênese de indivíduos idosos, comparando-as com a espermatogênese normal de indivíduos jovens. (Schulze and Schulze, 1981; Nistal and Paniagua, 1986; Paniagua et al., 1987a; Paniagua et al., 1987b; Kimura et al., 2003; Bhartiya et al., 2010; Pop et al., 2011;). Para esses estudos, os autores utilizaram apenas testículos de pacientes que não haviam se submetido a nenhum tratamento anterior à orquiectomia, como radioterapia ou hormonioterapia. Poucos pesquisadores utilizaram esse material para avaliar a ação de bloqueadores de testosterona sobre a espermatogênese (Huhtaniemi et al, 1987a; Huhtaniemi, 1987b; Woolveridge et al., 1998) ou para avaliar os danos causados pela radioterapia externa, no tratamento do câncer de próstata, sobre o parênquima testicular. (Daniell and Tam, 1998). Entretanto nenhum desses estudos comparou os resultados dos parâmetros da espermatogênese em pacientes que sofreram esses dois tipos de tratamentos, principalmente no que diz respeito a aspectos morfométricos das células germinativas e somáticas do epitélio seminífero, além de

não terem avaliado aspectos específicos da cinética espermatogonial e de outras células germinativas mais avançadas, conforme foi realizado no presente estudo. Os resultados dos efeitos desses tratamentos sobre a espermatogênese desses pacientes são discutidos abaixo, comparando-os com os dados disponíveis na literatura médica.

### **6.1 – Avaliação dos escores histológicos testiculares**

Neste estudo, quando avaliou-se os resultados do escore histológico testicular de Cinco Padrões (Levin, 1979; McLachlan et al., 2007), que é o mais utilizado pelos patologistas clínicos para avaliação de biópsias testiculares, notamos claramente que o grupo controle (CC), apresentou resultados médios próximos ao da espermatogênese normal, apesar de ser constituído apenas por pacientes idosos, concordando com dados da literatura, que mostra que a espermatogênese do homem idoso é um pouco menos eficiente do que de homens mais jovens, porém próxima da normalidade. (Johnson et al., 1884b; Johnson, 1986). Entretanto, nos dois grupos tratados (TH+CC e TR+CC), houve alteração significativa da espermatogênese. O grupo tratado com radioterapia externa (TR+CC), isolada ou associada à terapia hormonal, apresentou os piores resultados na espermatogênese. O grupo irradiado (TR+CC) apresentou valores do escore de cinco padrões significativamente menores em relação ao grupo não tratado (CC), mas não houve diferença estatística em relação ao grupo de tratamento hormonal exclusivo (TH+CC). Quando analisamos os resultados do escore histológico testicular de Johnsen (Johnsen, 1970), tem-se uma noção mais exata do que realmente está ocorrendo com a espermatogênese de cada indivíduo. Os resultados obtidos mostram mais claramente pelo escore de Johnsen, do que pelo escore de cinco padrões, as diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de pacientes não tratados antes da orquiectomia (CC) e os grupos tratados com terapia hormonal exclusiva (TH+CC) ou com radioterapia (TR+CC), com as médias desses dois últimos grupos bem abaixo do grupo controle. Apesar de que o grupo tratado com terapia hormonal exclusiva apresentou um resultado médio mais alto do que o grupo tratado com radioterapia, não houve diferença estatisticamente significativa entre esses dois grupos. Finalmente, quando analisamos os resultados referentes ao escore de Bergmann (Bergmann et al, 1994), que baseia-se na porcentagem de túbulos seminíferos mostrando a presença de espermátides alongadas, fica evidente a diferença entre o grupo controle (CC) e os grupos tratados (TH+CC e TR+CC).

Estes resultados dos escores histológicos testiculares corroboram dados apresentados pela literatura médica. Estudo desenvolvido por Daniell and Tam, 1998 utilizou 78 homens com câncer avançado de próstata, tratados com orquiectomia bilateral, sendo que 43 não haviam se submetido à radioterapia e outros 35 tinham sido irradiados para tratamento do câncer de próstata, quando a doença ainda estava localizada. Todos os pacientes irradiados receberam aproximadamente 7000 cGy no leito prostático, dose semelhante às aplicadas nos pacientes do presente estudo, utilizando-se uma proteção testicular. Nenhum dos dois grupos havia recebido qualquer tratamento hormonal. Os resultados mostraram que mesmo com uma proteção dos testículos à irradiação, houve atrofia testicular estatisticamente significativa no grupo previamente irradiado, em comparação com o grupo que não foi tratado com radioterapia.

Quanto ao tratamento hormonal com GnRH-agonista, existe, nesse caso, um bloqueio efetivo dos efeitos da testosterona, comparativamente a uma castração, durante todo o tempo do uso do medicamento. Porém, a produção testicular de andrógenos não é totalmente bloqueada, como revelaram estudos histológicos testiculares realizados em pacientes com câncer avançado de próstata, tratados por seis meses com GnRH-agonista e depois submetidos a orquiectomia, comparados com pacientes que realizaram a orquiectomia como tratamento primário (Huhtaniemi et al, 1987b). A espermatogênese foi altamente suprimida em quase todo o grupo tratado com agonista do GnRH. Nesse experimento, o número de células de Sertoli não foi afetado, mas os diâmetros tubulares ficaram reduzidos no grupo de tratamento. As células de Leydig estavam indiferenciadas, embora seu número não tenha sido alterado. Não houve nenhum efeito sobre os receptores de LH, mas houve clara supressão dos receptores de FSH. A produção testicular de testosterona diminuiu em 94%. Houve uma variável supressão da espermatogênese, com resultados heterogêneos.

Em estudos experimentais com ratos e camundongos, os estrogênios inibem a produção espermática, por ação no hipotálamo e hipófise, diminuindo a secreção de gonadotrofinas. Por outro lado, tem efeitos benéficos na espermatogênese, mas por mecanismos ainda não bem identificados (O'Donnel et al., 2001; Carreau and Hess, 2010). O acetato de ciproterona, um esteróide sintético, devido a sua ação central e periférica, causa profunda supressão da espermatogênese, já tendo sido testado, em associação com testosterona exógena, como um possível anticoncepcional masculino (Meriggiola et al., 1998). A flutamida, um antiandrógeno de ação periférica, produz degeneração do epitélio seminífero e hiperplasia das células intersticiais (Anahara et al., 2007).

Dois pacientes inicialmente avaliados no presente estudo foram excluídos das análises em grupo, mas decidimos apresentar seus dados por se tratarem de situações peculiares que merecem discussão e levantam questões importantes no homem, que são bem conhecidas em animais de laboratório. Um deles foi excluído pelo fato de ter usado bloqueio hormonal com estrógeno (dietilestilbestrol) por três anos, mas interrompeu esse tratamento oito meses antes da orquiectomia. Esse paciente apresentava-se com espermatogênese normal, segundo os três escores e a morfologia testicular, fato que concorda com a literatura, que mostra que após a interrupção do bloqueio hormonal, a espermatogênese volta aos padrões de normalidade, como mostra um estudo experimental realizado em primatas não-humanos (macacos Rhesus) (Weinbauer et al., 1987). O segundo paciente foi excluído devido ao fato de não terem sido documentados a dose e o tempo de irradiação a que ele foi submetido e também porque seu perfil hormonal mostrava claramente que esse paciente não estava bloqueado hormonalmente, sendo que ele afirmava que havia usado agonista-GnRH e estava em uso de estrógeno (dietilestilbestrol). Também esse paciente apresentava-se com espermatogênese bastante satisfatória, segundo os três escores, a morfologia testicular, testosterona normal e gonadotrofinas (FSH e LH) muito elevadas, provavelmente devido ao tratamento radioterápico anterior. Este resultado poderia ser interpretado como uma recuperação da espermatogênese pós-radioterapia, através de bloqueio hormonal por agonista-GnRH ou estrógeno, como mostram diversos trabalhos experimentais em ratos (Meistrich and Kangasniemi, 1997;

Meistrich et al., 1999). Como se trata de um caso isolado e não bem documentado, ele não pode ser interpretado adequadamente, mas pode servir como alerta para futuros estudos em pacientes com câncer avançado de próstata, que inicialmente foram submetidos a tratamento radioterápico, posteriormente usaram bloqueio hormonal de testosterona e o interromperam por determinado tempo. Estudos com maior número de pacientes fazem-se necessários para confirmar se os resultados obtidos em ratos poderiam ser reproduzidos em humanos, recuperando-se a espermatogênese de pacientes submetidos a tratamentos contra o câncer.

## 6.2 – Avaliação hormonal

Analisando-se os resultados do perfil hormonal obtidos dos três grupos estudados, observa-se que o valor médio do FSH no grupo sem tratamento anterior (CC) está dentro dos níveis da normalidade, aceito para homens adultos, com resultados homogêneos entre os indivíduos. No grupo de tratamento hormonal exclusivo (TH+CC) esse hormônio está moderadamente elevado, com resultados heterogêneos. Por fim, o grupo de tratamento radioterápico (TR+CC), está com níveis séricos bastante elevados, compatível com danos mais graves na espermatogênese e com os resultados dos três escores histológicos testiculares. A heterogeneidade dos resultados do FSH no grupo irradiado é devido ao fato que aqueles indivíduos que foram somente irradiados apresentaram FSH próximo de 40,0 ng/dL (muito alto), enquanto que aqueles que foram irradiados e posteriormente tratados com bloqueio hormonal estavam com FSH normal (média de 4,76 ng/dL) devido, provavelmente, ao próprio bloqueio hormonal. Apesar disso, não houve diferença significativa entre os três grupos. Quanto ao LH, os resultados médios foram normais e semelhantes entre os três grupos. A heterogeneidade no grupo irradiado também se deve ao fato de que dois indivíduos do grupo estavam com bloqueio hormonal ativo, com níveis de LH muito baixos. Também não houve diferença estatística entre os grupos. A média da dosagem sérica de testosterona total estava normal no grupo sem tratamento anterior e em limites inferiores nos outros dois grupos. O bloqueio hormonal irregular também deve ser o responsável por esses resultados. Também não houve diferença estatística entre os grupos. Daniell et al. (2001) avaliaram o perfil hormonal e presença de hipogonadismo em 33 pacientes que haviam recebido radioterapia externa, comparados com 55 pacientes que tinham sido tratados com prostatectomia radical. Nenhum dos dois grupos recebeu tratamento hormonal. No grupo tratado com radioterapia externa o nível sérico de testosterona total foi 27,3% menor, o de LH 52,5% maior e o de FSH 100% maior que os níveis séricos desses hormônios no grupo tratado com prostatectomia radical. Essas diferenças sugerem um forte e permanente dano testicular causado pela radioterapia. Os resultados do presente estudo, no grupo de pacientes irradiados, foram semelhantes, mostrando um efeito deletério drástico nos testículos dos indivíduos que receberam radiação contra o câncer de próstata. Outro estudo (Huhtaniemi et al, 1987a), onde oito pacientes com carcinoma avançado de próstata (idades entre 59-78 anos) foram tratados com GnRH-agonista e orquiectomizados após seis meses de tratamento, foram comparados com um grupo controle de seis pacientes (entre 65-86 anos) com câncer avançado de próstata, que submeteram-se a orquiectomia bilateral como forma primária de

tratamento. As gonadotrofinas, LH e FSH, no grupo tratado, diminuíram de 70 a 80% num prazo de uma a três semanas. A testosterona total sérica diminuiu para níveis de castração após três a quatro semanas, após um aumento inicial de cinco dias. No atual estudo, os níveis séricos de gonadotrofinas e testosterona do grupo tratado com terapia hormonal, que deveriam estar muito baixos, devido ao bloqueio hipofisário e testicular, aparecem bem diferentes do que se deveria esperar. Provavelmente esses achados inesperados possam ser devidos às variações nos tipos de drogas utilizados, bem como em alguma incongruência nas informações fornecidas pelos pacientes, quanto ao uso regular dos medicamentos prescritos.

### **6.3 – Avaliação morfológica da espermatogênese**

Os pacientes idosos avaliados no presente estudo, que não foram submetidos a hormonioterapia ou radioterapia antes da realização da orquiectomia, mostraram histologia testicular semelhante àquela descrita por outros pesquisadores quando estudaram indivíduos na mesma faixa etária (Johnson, 1986). Enquanto alguns pacientes apresentaram epitélio seminífero com as células de Sertoli e germinativas com distribuição e número aparentemente normais para o homem, outros apresentavam reduções variáveis, indicando processo de hipoespermatogênese. O diferencial do presente estudo foi ter utilizado um processamento para obtenção de cortes histológicos dos testículos com alta resolução, para análise sob a microscopia de luz (Chiarini-Garcia e Meistrich, 2008). Este método, conhecido como microscopia de luz de alta resolução, tem sido utilizado com bastante sucesso para o estudo de diferentes parâmetros da biologia testicular, principalmente das células espermatogoniais, de diferentes espécies de animais de laboratório e domésticos sob condições normais (Chiarini-Garcia e Russell, 2001; Chiarini-Garcia et al., 2001; Chiarini-Garcia et al., 2003, Chiarini-Garcia et al., 2009; Drumond et al., 2011a), experimentais (Nascimento et al., 2008; Drumond et al., 2011b; Albuquerque et al., 2013) e patológicas (Russell et al., 2002; Bolden-Tiller et al., 2007).

Análise minuciosa do epitélio seminífero desses indivíduos que não sofreram tratamentos contra o câncer de próstata antes da orquiectomia (CC), demonstrou descamação desse epitélio, principalmente de espermátides, presença de vacúolos e de gotículas lipídicas no citoplasma das células de Sertoli, em quantidades variáveis, dependendo do paciente. Essas características histológicas foram também demonstradas em indivíduos jovens, mas foram mais evidentes nos idosos (Paniagua et al., 1987a; Paniagua et al., 1987b). Já após os dois tratamentos avaliados neste estudo, o hormonal e o radioterápico, os resultados em relação à espermatogênese foram drasticamente negativos, na grande maioria dos casos.

### **6.4 – Avaliação morfométrica da espermatogênese**

No presente estudo, após tratamentos hormonais exclusivos, a processo espermatogênico sofreu grande impacto, dependendo do paciente, com redução significativa do diâmetro dos túbulos seminíferos e da altura do epitélio. Apesar disso,

em alguns deles, foi possível observar que a espermatogênese alcançou espermatócitos na fase intermediária, apesar do número ser significativamente reduzido em relação ao normal para a idade. Estes achados concordam com a literatura (Huhtaniemi et al., 1988), que mostra que pacientes idosos com câncer de próstata, tratados por seis meses com agonista do GnRH (buserilina) e depois orquiectomizados, apresentaram grave atrofia dos túbulos seminíferos, observados por microscopia de luz. Muitos túbulos mostravam presença apenas de células de Sertoli, com células germinativas ausentes, porém sem alterações nas células de Leydig.

Os pacientes do atual estudo, tratados com hormonioterapia exclusiva, tiveram como principal alvo do tratamento, a fase espermiogênica, uma vez que praticamente não foram encontradas espermátides nesses indivíduos. No entanto, consideramos que eles possuem um bom prognóstico para recuperação da espermatogênese, visto que os números de espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$  e  $A_{\text{claras}}$  não foram afetados, quando comparados com os dos idosos que não sofreram qualquer tipo de tratamento. Além disso, demonstrou-se que o índice mitótico dessas células não foi afetado e o número de apoptoses estava dentro do esperado, sugerindo um processo de proliferação e morte celulares normais, mesmo após esse insulto. Estudos complementares ao presente estudo, no sentido de fazer uma avaliação molecular da capacidade de proliferação das espermatogônias, estão em desenvolvimento. Essas avaliações pretendem confirmar, através de métodos imunohistoquímicos de identificação das proteínas MCM7 e Ki67, que são expressas na fase de mitose celular, se mesmo após esses insultos, as espermatogônias continuam em atividade mitótica. As espermatogônias, pelo fato de serem as células-tronco desse sistema e assim constituírem a fase proliferativa do processo espermatogênico, representam, quando funcionando adequadamente, o grupo de células germinativas que garante o sucesso do processo espermatogênico durante toda a vida de um homem (Meistrich and Shetty, 2003; Zhang et al., 2007).

Quando os pacientes foram submetidos à radioterapia para o câncer de próstata, mesmo com proteção para os órgãos vizinhos, pudemos observar que os efeitos sobre o processo espermatogênico foram muito graves, tal como já descrito por Daniell and Tam, 1998. Isso demonstra que pela proximidade, mesmo com proteção, os efeitos da radiação extrapolam o órgão alvo e interferem negativamente no testículo e na espermatogênese. Nesses pacientes, apesar dos túbulos e epitélio seminíferos se apresentarem com diâmetro e altura menor, respectivamente, neles foram observadas algumas ilhas de espermatogênese, uma vez que foram encontrados, mesmo em pequeno número, células germinativas até espermátides alongadas. Mas, mesmo tendo encontrado regiões com espermatogênese, os índices mitótico, de eficiência das células de Sertoli e eficiência geral da espermatogênese foram todos significativamente reduzidos em relação aos testículos dos idosos sem tratamento. O número de espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$  foi significativamente menor nos indivíduos irradiados, embora o número de mitoses dessas células não tenha sido afetado, sugerindo que a proliferação espermatogonial continua acontecendo. No entanto, a irradiação foi mais deletéria sobre as células germinativas que o tratamento hormonal, uma vez que o número de apoptose dessas células foi significativamente maior após esse tipo de insulto, em relação aos indivíduos não tratados.

Apesar de não apresentar significância estatística, nos indivíduos tratados houve aumento da espessura da túnica própria, o que é uma característica já descrita na literatura (Daniell and Tam, 1998). O método de análise com microscopia de luz de alta resolução, utilizado neste trabalho, possibilitou determinar que da túnica própria saem projeções que penetram no interior do epitélio seminífero, e que essas são projeções da membrana basal e não das células mióides. Nos indivíduos irradiados essas projeções foram mais evidentes que naqueles tratados por hormônios. Tem sido sugerido (Weinbauer et al., 2009) que o aumento dessa túnica impede a passagem de suporte nutricional para o processo espermatogênico. De fato, nos indivíduos irradiados, constatou-se, no presente estudo, que o número de túbulos seminíferos fibróticos foi maior. Avaliações dos detalhes ultraestruturais das alterações provocadas por estes insultos no processo espermatogênico estão em desenvolvimento e deverão ser apresentadas em futuros estudos.

Em conjunto, os achados do presente estudo mostram que os tratamentos contra o câncer de próstata, utilizando hormônios e radioterapia externa, provocam efeitos deletérios graves no processo espermatogênico. Os efeitos causam redução drástica de diversos parâmetros qualitativos e quantitativos da espermatogênese. No entanto, levando em consideração que a fase proliferativa espermatogonial foi menos afetada pelos insultos, supomos que esses indivíduos, quando tivessem os tratamentos interrompidos, poderiam ter seu processo espermatogênico recuperado. De fato, em dois casos isolados que relatamos neste estudo, nos quais os tratamentos hormonais e/ou radioterápicos foram interrompidos anteriormente à orquiectomia, a espermatogênese encontrava-se recuperada. Estudos futuros, procurando avaliar maior número de pacientes que tenham se submetido a tratamentos semelhantes, estão em planejamento.

Conforme demonstrado em estudo anterior, realizado por nosso grupo (Reis, 2012), o papel da histopatologia testicular nunca se limitará apenas em responder sobre a existência ou não de espermatozoides para uso em técnicas de reprodução assistida. Estudos morfofuncionais da espermatogênese humana, incluindo técnicas mais apuradas de microscopia de luz ou eletrônica, além de recursos da biologia molecular, podem contribuir para esclarecer possíveis causas de infertilidade masculina, que na grande maioria dos pacientes são desconhecidas, possibilitando a realização de tratamentos específicos para alguns casos, tornando realidade o sonho de concepção de alguns casais inférteis. Além disso, o presente estudo pode abrir uma linha de pesquisa que ajude jovens pacientes, em idade reprodutiva, portadores de algum tipo de câncer e submetidos a tratamentos deletérios à espermatogênese, a preservar sua futura fertilidade.

## 7. CONCLUSÕES

- A hormonioterapia e a radioterapia prejudicam significativamente a espermatogênese de homens idosos submetidos a esses tratamentos para o câncer de próstata
- Os escores histopatológicos testiculares de Johnsen e de Bergmann demonstraram com maior precisão, em comparação ao escore clássico de cinco padrões, que os tratamentos radioterápicos e hormonais foram lesivos para a espermatogênese.
- Os pacientes idosos com câncer avançado de próstata, que não sofreram tratamento hormonal e/ou radioterápico, apresentaram espermatogênese preservada, com parâmetros morfológicos e morfométricos compatíveis com a faixa etária.
- A radioterapia lesou mais acentuadamente a proliferação espermatogonial do que a hormonioterapia
- Parâmetros morfométricos demonstraram que entre a radioterapia e a hormonioterapia, apenas a hormonioterapia bloqueia a espermiogênese.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec* 1946; 94:239-47.
- Albuquerque AV, Almeida FR, Weng CC, Shetty G, Meistrich ML, Chiarini-Garcia H. Spermatogonial behavior in rats during radiation-induced arrest and recovery after hormone suppression. *Reproduction* 2013; 146:363-76.
- Amann RP, Almquist JO. Reproductive capacity of dairy bulls. Effect of unilateral vasectomy and ejaculation frequency on sperm reserves; aspects of epididymal physiology. *J Reprod Fertil* 1962; 3:260-8.
- Amann RP. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J Androl* 2008; 29:469-87.
- Anahara R, Toyama Y, Mori C. Review of the histological effects of the anti-androgen, flutamide, on mouse testis. *Reprod Toxicol* 2008; 25:139-43.
- Bhartiya D, Kasiviswanathan S, Unni SK, Pethe P, Dhabalia JV, Patwardhan S, Tongaonkar HB. Newer insights into premeiotic development of germ cells in adult human testis using Oct-4 as a stem cell marker. *J Histochem Cytochem* 2010; 58:1093-106
- Bergmann M, Behre HM, Nieschlag E. Serum FSH and testicular morphology in male infertility. *Clin Endocrinol* 1994; 40:133-6.
- Bergmann M, Kliesch S. Testicular biopsy and histology. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (Eds). *Andrology – Male Reproductive Health and Dysfunction*. Berlin: Springer; 2010:155-72.
- Boekelheide K, Schoenfeld HA, Hall SJ, Weng CC, 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. *J Androl* 2005; 26:222-34.
- Bolden-tiller OU; Chiarini-Garcia H.; Poirier C; Alves-Freitas D; Weng CC.; Shetty G; Meistrich ML. Genetic factors contributing to defective spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion (utp14bjsd) mice. *Biol Reprod* 2007; 77:237-46.
- Brennemann W, Brensing KA, Leipner N, Boldt I, Klingmüller D. Attempted protection of spermatogenesis from irradiation in patients with seminoma by D-Tryptophan-6 luteinizing hormone releasing hormone. *Clin Investig* 1994; 72:838-42.
- Carreau S, Hess RA. Oestrogens and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010; 365:1517-35.
- Centola GM, Keller JW, Henzler M, Rubin P. Effect of low-dose testicular irradiation on sperm count and fertility in patients with testicular seminoma. *J Androl* 1994;15:608-13.
- Chiarini-Garcia H, Russell LD. High-resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biol Reprod* 2001; 65:1170-8.
- Chiarini-Garcia H; Russell LD. Characterization of mouse spermatogonial types by electron microscopy. *Reproduction* 2002; 123:567-577.

- Chiarini-Garcia H; Raymer AM; Russell LD. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction* 2003; 126:669-80.
- Chiarini-Garcia H, Meistrich ML. High-resolution light microscopic characterization of spermatogonia. *Methods Mol Biol* 2008; 450:95-107.
- Chiarini-garcia H; Alves-Freitas D; Barbosa IS; Almeida FRCL. Evaluation of the seminiferous epithelial cycle, spermatogonial kinetics and niche in donkeys (*equus asinus*). *Anim Reprod Sci* 2009; 116:139-54.
- 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 Mol Biol* 2011; 689:3-18.
- Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 1963; 112:35-51.
- Clermont Y. Spermatogenesis in man. A study of the spermatogonial population. *Fertil Steril* 1966; 17:705-21.
- Corradi CE, Campos F, Carvalhal G, Nogueira L, Bendhack M, Dall'Oglio M, Tobias-Machado M, Santos Jr. MW, Scaletsky R, Matheus WE. Câncer de Próstata. In: *Diretriz do tratamento do câncer urológico da Sociedade Brasileira de Urologia*. São Paulo/Rio de Janeiro: Editora DOC, 2009:45-67.
- da Cunha MF, Meistrich ML, Fuller LM, Cundiff JH, Hagemester FB, Velasquez WS, McLaughlin P, Riggs SA, Cabanillas FF, Salvador PG. Recovery of spermatogenesis after treatment for Hodgkin's disease: limiting dose of MOPP chemotherapy. *J Clin Oncol* 1984; 2:571-7.
- da Cunha MF, Meistrich ML, Nader S. Absence of testicular protection by a gonadotropin-releasing hormone analogue against cyclophosphamide-induced testicular cytotoxicity in the mouse. *Cancer Res* 1987; 47:1093-7.
- Dakouane M, Bicchieray L, Bergere M, Albert M, Vialard F, Selva J. A histomorphometric and cytogenetic study of testis from men 29-102 years old. *Fertil Steril* 2005; 83:923-8
- Daniell HW, Tam EW. Testicular atrophy in therapeutic orchiectomy specimens from men with prostate carcinoma: association with prior prostate bed radiation and older age. *Cancer* 1998; 83:1174-9.
- Daniell HW, Clark JC, Pereira SE, Niazi ZA, Ferguson DW, Dunn SR, Figueroa ML, Stratte PT. Hypogonadism following prostate-bed radiation therapy for prostate carcinoma. *Cancer* 2001; 91:1889-95.
- de Kretser DM, Kerr JB, Paulsen CA. The peritubular tissue in the normal and pathological human testis. An ultrastructural study. *Biol Reprod* 1975; 12:317-24.
- Delic JI, Bush C, Peckham MJ. Protection from procarbazine-induced damage of spermatogenesis in the rat by androgen. *Cancer Res* 1986; 46:1909-14.
- de Rooij DG. Stem cells in the testis. *Int J Exp Pathol* 1998; 79:67-80.
- de Rooij DG, van de Kant HJ, Dol R, Wagemaker G, van Buul PP, van Duijn-Goedhart A, de Jong FH, Broerse JJ. Long-term effects of irradiation before adulthood on reproductive function in the male rhesus monkey. *Biol Reprod* 2002; 66:486-94.

- Drumond AL, Weng CC, Wang G, Chiarini-Garcia H, Eras-Garcia L, Meistrich ML. Effects of multiple doses of cyclophosphamide on mouse testes: accessing the germ cells lost, and the functional damage of stem cells. *Reprod Toxicol* 2011; 32:395-406.
- Drumond AL; Weng CC; Wang G; Chiarini-Garcia H. Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: a high-resolution light microscopy approach. *Reproduction* 2011; 142:145-155.
- Ehmcke J, Schlatt S. A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates. *Reproduction* 2006; 132:673-80.
- Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S. Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Hum Reprod Update* 2006; 12:275-82.
- Ehmcke J, Luetjens CM, Schlatt S. Clonal organization of proliferating spermatogonial stem cells in adult males of two species of non-human primates, *Macaca mulatta* and *Callithrix jacchus*. *Biol Reprod* 2005; 72:293-300.
- Fosså SD, Klepp O, Norman N. Lack of gonadal protection by medroxyprogesterone acetate-induced transient medical castration during chemotherapy for testicular cancer. *Br J Urol* 1988; 62:449-53.
- França LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol Reprod* 1998; 59:1371-7.
- Glode LM, Robinson J, Gould SF. Protection from cyclophosphamide-induced testicular damage with an analogue of gonadotropin-releasing hormone. *Lancet* 1981; 1:1132-4.
- González C, Boada M, Devesa M, Veiga A. Concise review: fertility preservation: an update. *Stem Cells Transl Med* 2012; 1:668-72.
- Gudziak MR, Smith AY. Hormonal therapy for stage D cancer of the prostate. *West J Med*. 1994; 160:351-9.
- Harbitz TB. Morphometric studies of the Sertoli cells in elderly men with special reference to the histology of the prostate. An analysis in an autopsy series. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1973; 81:703-14.
- Heller CH, Clermont Y. Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent Prog Horm Res* 1964; 20:545-75.
- Hermann M, Berger P. Aging of the male endocrine system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1999; 139:89-122.
- Hermann M, Untergasser G, Rumpold H, Berger P. Aging of the male reproductive system. *Exp Gerontol* 2000; 35:1267-79.
- Holstein AF, Eckmann C. Multinucleated spermatocytes and spermatids in human seminiferous tubules. *Andrologia* 1986; 18:5-16.
- Holstein AF, Eckmann C. Megalospermatocytes: indicators of disturbed meiosis in man. *Andrologia* 1986; 18:601-9.
- Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:107.

- Howell S and Shalet S. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinol Metab Clin N Am* 1998; 27:927.
- Howell SJ, Shalet SM. Testicular function following chemotherapy. *Hum Reprod Update* 2001; 7:363-9.
- Howell SJ, Shalet SM. Effect of cancer therapy on pituitary-testicular axis. *Int J Androl* 2002; 25:269-76.
- Howell SJ, Shalet SM. Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005; 34:12-7.
- Huhtaniemi I, Nikula H, Rannikko S. Pituitary-testicular function of prostatic cancer patients during treatment with a gonadotropin-releasing hormone agonist analog. I. Circulating hormone levels. *J Androl* 1987; 8:355-62.
- Huhtaniemi I, Nikula H, Parvinen M, Rannikko S. Pituitary-testicular function of prostatic cancer patients during treatment with a gonadotropin-releasing hormone agonist analog. II. Endocrinology and histology of the testis. *J Androl* 1987; 8:363-73.
- Huhtaniemi I, Nikula H, Parvinen M, Rannikko S. Histological and functional changes of the testis tissue during GnRH agonist treatment of prostatic cancer. *Am J Clin Oncol* 1988; 11 Suppl 1:S11-5.
- Jégou B, Velez de la Calle JF, Bauché F. Protective effect of medroxyprogesterone acetate plus testosterone against radiation-induced damage to the reproductive function of male rats and their offspring. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:8710-4.
- Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1970; 1:2-25.
- Johnson DH, Linde R, Hainsworth JD, Vale W, Rivier J, Stein R, Flexner J, Van Welch R, 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* 1985; 65:832-6.
- Johnson L, Petty CS, Neaves WB. Further quantification of human spermatogenesis: germ cell loss during postprophase of meiosis and its relationship to daily sperm production. *Biol Reprod* 1983; 29:207-15.
- Johnson L, Petty CS, Porter JC, Neaves WB. Germ cell degeneration during postprophase of meiosis and serum concentrations of gonadotropins in young adult and older adult men. *Biol Reprod* 1984; 31:779-84.
- Johnson L, Petty CS, Neaves WB. Influence of age on sperm production and testicular weights in men. *J Reprod Fertil* 1984; 70:211-8.
- Johnson L, Zane RS, Petty CS, Neaves WB. Quantification of the human Sertoli cell population: its distribution, relation to germ cell numbers, and age-related decline. *Biol Reprod* 1984; 31:785-95.
- Johnson L. Spermatogenesis and aging in the human. *J Androl* 1986; 7:331-54.
- Johnson L, Petty CS, Neaves WB. Age-related variation in seminiferous tubules in men. A stereologic evaluation. *J Androl* 1986; 7:316-22.

- Johnson L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Scrutchfield WL. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61:471-80.
- Kaler LW, Neaves WB. Attrition of the human Leydig cell population with advancing age. *Anat Rec* 1978; 192:513-8.
- 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*). *J Endocrinol* 2003; 179:183-94.
- Kangasniemi M, Wilson G, Parchuri N, Huhtaniemi I, Meistrich ML. Rapid protection of rat spermatogenic stem cells against procarbazine by treatment with a gonadotropin-releasing hormone antagonist (Nal-Glu) and an antiandrogen (flutamide). *Endocrinology* 1995; 136:2881-8.
- Kangasniemi M, Huhtaniemi I, Meistrich ML. Failure of spermatogenesis to recover despite the presence of a spermatogonia in the irradiated LBNF1 rat. *Biol Reprod* 1996a; 54:1200-8.
- Kangasniemi M, Dodge K, Pemberton AE, Huhtaniemi I, Meistrich ML. Suppression of mouse spermatogenesis by a gonadotropin-releasing hormone antagonist and antiandrogen: failure to protect against radiation-induced gonadal damage. *Endocrinology* 1996b; 137:949-55.
- Kaufman JM, Vermeulen A. The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. *Endocr Rev* 2005; 26:833-76.
- Kimura M, Itoh N, Takagi S, Sasao T, Takahashi A, Masumori N, Tsukamoto T. Balance of apoptosis and proliferation of germ cells related to spermatogenesis in aged men. *J Androl* 2003; 24:185-91.
- Kreuser ED, Hetzel WD, Hautmann R, Pfeiffer EF. Reproductive toxicity with and without LHRHA administration during adjuvant chemotherapy in patients with germ cell tumors. *Horm Metab Res* 1990; 22:494-8.
- Kühnert B, Nieschlag E. Reproductive functions of the ageing male. *Hum Reprod Update* 2004; 10:327-39.
- Levin HS. Testicular biopsy in the study of male infertility: its current usefulness, histologic techniques, and prospects for the future. *Hum Pathol* 1979; 10:569-84.
- 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. *Ann Intern Med* 1997; 126:292-5.
- Mayor G, Zingg EJ. *Atlas de Operaciones Urológicas, Indicaciones, técnicas y tratamiento postoperatorio*. Barcelona:Ediciones Toray S.A. 1975:490-1.
- McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, Pratis K, Robertson DM. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57:149-79.
- McLachlan RI, Rajpert-De Meyts E, Høie-Hansen CE, de Kretser DM, Skakkebaek NE. Histological evaluation of the human testis--approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review. *Hum Reprod* 2007; 22:2-16.

- Matsumoto AM, Bremner WJ. Endocrinology of the hypothalamic-pituitary-testicular axis with particular reference to the hormonal control of spermatogenesis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1987; 1:71-87.
- Mauduit C, Hamamah S, Benahmed M. Stem cell factor/c-kit system in spermatogenesis. *Hum Reprod Update* 1999; 5:535-45.
- Meistrich ML. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis. *Eur Urol* 1993; 23:136-41; discussion 142.
- Meistrich ML, Finch M, da Cunha MF, Hacker U, Au WW. Damaging effects of fourteen chemotherapeutic drugs on mouse testis cells. *Cancer Res* 1982; 42:122-31.
- Meistrich ML, 1986 – Critical components of testicular function and sensitivity to disruption. *Biol. Reprod* 1986, 34:17-28.
- Meistrich ML, Chawla SP, Da Cunha MF, Johnson SL, Plager C, Papadopoulos NE, Lipshultz LI, Benjamin RS. Recovery of sperm production after chemotherapy for osteosarcoma. *Cancer* 1989; 63:2115-23.
- Meistrich ML, Wilson G, Ye WS, Kurdoglu B, Parchuri N, Terry NH. Hormonal protection from procarbazine-induced testicular damage is selective for survival and recovery of stem spermatogonia. *Cancer Res* 1994; 54:1027-34.
- Meistrich ML, Kangasniemi M. Hormone treatment after irradiation stimulates recovery of rat spermatogenesis from surviving spermatogonia. *J Androl* 1997; 18:80-7.
- Meistrich ML, Wilson G, Huhtaniemi I. Hormonal treatment after cytotoxic therapy stimulates recovery of spermatogenesis. *Cancer Res* 1999; 59:3557-60.
- Meistrich ML, Wilson G, Kangasniemi M, Huhtaniemi I. Mechanism of protection of rat spermatogenesis by hormonal pretreatment: stimulation of spermatogonial differentiation after irradiation. *J Androl* 2000; 21:464-9.
- Meistrich ML, Shetty G. Suppression of testosterone stimulates recovery of spermatogenesis after cancer treatment. *Int J Androl* 2003; 26:141-6.
- Meistrich ML, Shetty G. Inhibition of spermatogonial differentiation by testosterone. *J Androl* 2003; 24:135-48.
- Meistrich ML, Shetty G. Hormonal suppression for fertility preservation in males and females. *Reproduction* 2008; 136:691-701
- Meistrich ML. Male gonadal toxicity. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 53:261-6.
- Meriggiola MC, Bremner WJ, Costantino A, Di Cintio G, Flamigni C. Low dose of cyproterone acetate and testosterone enanthate for contraception in men. *Hum Reprod* 1998; 13:1225-9.
- Morley JE, Perry HM 3rd. Androgen deficiency in aging men. *Med Clin North Am* 1999; 83:1279-89.
- Morris ID, Shalet SM. Protection of gonadal function from cytotoxic chemotherapy and irradiation. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1990; 4:97-118.

- Nascimento HF; Drumond AL; França LR.; Chiarini-Garcia H. Spermatogonial morphology, kinetics and niches in hamsters exposed to short- and long-photoperiod. *Int J Androl* 2008; 32:486-497.
- Neaves WB, Johnson L, Porter JC, Parker CR Jr, Petty CS. Leydig cell numbers, daily sperm production, and serum gonadotropin levels in aging men. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59:756-63.
- Neaves WB, Johnson L, Petty CS. Age-related change in numbers of other interstitial cells in testes of adult men: evidence bearing on the fate of Leydig cells lost with increasing age. *Biol Reprod* 1985; 33:259-69.
- Nistal M, Codesal J, Paniagua R. Multinucleate spermatids in aging human testes. *Arch Androl* 1986; 16:125-9.
- Nistal M, Codesal J, Paniagua R, Santamaria L. Decrease in the number of human Ap and Ad spermatogonia and in the Ap/ Ad ratio with advancing age. New data on the spermatogonial stem cell. *J Androl* 1987; 8:64-8.
- Nistal M, Santamaria L, Regadera J, Paniagua R. Diverticula of human seminiferous tubules in the normal and pathologic testis. *J Androl* 1988; 9:55-61.
- Nonomura M, Okada K, Hida S, Yoshida O. Does a gonadotropin-releasing hormone analogue prevent cisplatin-induced spermatogenic impairment? An experimental study in the mouse. *Urol Res* 1991; 19:135-40.
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 2001; 22:289-318.
- Paniagua R, Amat P, Nistal M, Martín A. Ultrastructure of Leydig cells in human ageing testes. *J Anat* 1986; 146:173-83.
- Paniagua R, Nistal M, Amat P, Rodríguez MC, Martín A. Seminiferous tubule involution in elderly men. *Biol Reprod* 1987b; 36:939-47.
- Paniagua R, Martín A, Nistal M, Amat P. Testicular involution in elderly men: comparison of histologic quantitative studies with hormone patterns. *Fertil Steril* 1987a; 47:671-9.
- Parchuri N, Wilson G, Meistrich ML. Protection by gonadal steroid hormones against procarbazine-induced damage to spermatogenic function in LBNF1 hybrid rats. *J Androl* 1993; 14:257-66.
- Payne AH, Hardy MP, Russell LD: *The Leydig cell*. Vienna IL: Cache River Press; 1996.
- Pérez CV, Theas MS, Jacobo PV, Jarazo-Dietrich S, Guazzone VA, Lustig L. Dual role of immune cells in the testis: Protective or pathogenic for germ cells? *Spermatogenesis* 2013; 3:e23870.
- Plas E, Berger P, Hermann M, Pflüger H. Effects of aging on male fertility? *Exp Gerontol* 2000; 35:543-51.
- Porter KL, Shetty G, Meistrich ML. Testicular edema is associated with spermatogonial arrest in irradiated rats. *Endocrinology* 2006; 147:1297-305.

- Pop OT, Cotoi CG, Pleşea IE, Gherghiceanu M, Enache SD, Mandache E, Hortopan G, Pleşea RM. Histological and ultrastructural analysis of the seminiferous tubule wall in ageing testis. *Rom J Morphol Embryol* 2011; 52(1 Suppl):241-8.
- Puscheck E, Philip PA, Jeyendran RS. Male fertility preservation and cancer treatment. *Cancer Treat Rev* 2004; 30:173-80.
- Ragheb AM, Sabanegh ES Jr. Male fertility-implications of anticancer treatment and strategies to mitigate gonadotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* 2010; 10:92-102.
- Redman JR, Bajorunas DR, Goldstein MC, Evenson DP, Gralla RJ, Lacher MJ, Koziner B, Lee BJ, Straus DJ, Clarkson BD, et al. Semen cryopreservation and artificial insemination for Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 1987; 5:233-8.
- Regadera J, Nistal M, Paniagua R. Testis, epididymis, and spermatic cord in elderly men. Correlation of angiographic and histologic studies with systemic arteriosclerosis. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109:663-7.
- Reis AB. Estudo comparativo entre diferentes processamentos histológicos na interpretação de biópsias testiculares. Tese de Doutorado em Ciências Aplicadas a Cirurgia e Oftalmologia, Faculdade de Medicina da UFMG, 2012.
- Romano F, Tripiciano A, Muciaccia B, De Cesaris P, Ziparo E, Palombi F, Filippini A. The contractile phenotype of peritubular smooth muscle cells is locally controlled: possible implications in male fertility. *Contraception* 2005; 72:294-7.
- Russell LD.; Chiarini-Garcia H.; Korsmeyer SJ; Knudson CM. Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *Biol Reprod* 2002; 66:950-958.
- Ruwanpura SM, McLachlan RI, Meachem SJ. Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol* 2010; 205:117-31
- Russell LD, Griswold MD: *The Sertoli cell*. Cache River Press, Clearwater FL; 1993.
- Sampson N, Untergasser G, Plas E, Berger P. The ageing male reproductive tract. *J Pathol* 2007; 211:206-18.
- Sasano N, Ichijo S. Vascular patterns of the human testis with special reference to its senile changes. *Tohoku J Exp Med* 1969; 99:269-80.
- Schlatt S, Meinhardt A, Nieschlag E. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *Eur J Endocrinol* 1997; 137:107-17.
- Schlatt S, Arslan M, Weinbauer GF, Behre HM, Nieschlag E. Endocrine control of testicular somatic and premeiotic germ cell development in the immature testis of the primate *Macaca mulatta*. *Eur J Endocrinol* 1995; 133:235-47.
- Schulze W, Schulze C. Multinucleate Sertoli cells in aged human testis. *Cell Tissue Res* 1981; 217:259-66
- Schulze C. Sertoli cells and Leydig cells in man. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1984; 88:1-104.
- Shetty G, Wilson G, Hardy MP, Niu E, Huhtaniemi I, Meistrich ML. Inhibition of recovery of spermatogenesis in irradiated rats by different androgens. *Endocrinology* 2002; 143:3385-96.

- Shetty G, Weng CC, 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* 2006; 147:472-82.
- Shalet SM. Abnormalities of growth and gonadal function in children treated for malignant disease: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine* 1982; 5:641-647.
- Söderström KO. Tubular hyalinization in human testis. *Andrologia* 1986; 18:97-103.
- Stahl PJ, Stember DS, Hsiao W, Schlegel PN. Indications and strategies for fertility preservation in men. *Clin Obstet Gynecol* 2010; 53:815-27.
- Steinberger E. Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiol Ver* 1971; 51:1-22.
- Suoranta H. Changes in the small blood vessels of the adult human testis in relation to age and to some pathological conditions. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat* 1971; 352:165-81.
- Thomson AB, Anderson RA, Irvine DS, Kelnar CJ, Sharpe RM, Wallace WH. Investigation of suppression of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis to restore spermatogenesis in azoospermic men treated for childhood cancer. *Hum Reprod* 2002; 17:1715-23.
- Trost LW, Brannigan RE. Oncofertility and the male cancer patient. *Curr Treat Options Oncol* 2012; 13:146-60.
- van Pelt AM, de Rooij DG, van der Burg B, van der Saag PT, Gustafsson JA, Kuiper GG. Ontogeny of estrogen receptor-beta expression in rat testis. *Endocrinology* 1999; 140:478-83.
- Vermeulen A, Kaufman JM. Ageing of the hypothalamo-pituitary-testicular axis in men. *Horm Res* 1995; 43:25-8.
- Waxman JH, Ahmed R, Smith D, Wrigley PF, Gregory W, Shalet S, Crowther D, Rees LH, Besser GM, Malpas JS, et al. Failure to preserve fertility in patients with Hodgkin's disease. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987; 19:159-62.
- Weinbauer GF, Respondek M, Themann H, Nieschlag E. Reversibility of long-term effects of GnRH agonist administration on testicular histology and sperm production in the nonhuman primate. *J Androl* 1987; 8:319-29.
- Weinbauer GF, Wessels J. 'Paracrine' control of spermatogenesis. *Andrologia* 1999; 31:249-62.
- Weinbauer GF, Schlatt S, Walter V, Nieschlag E. Testosterone-induced inhibition of spermatogenesis is more closely related to suppression of FSH than to testicular androgen levels in the cynomolgus monkey model (*Macaca fascicularis*). *J Endocrinol* 2001; 168:25-38.
- Weinbauer GF, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E. Physiology of Testicular Function In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S. *Andrology: Male Reproductive Health And Dysfunction 3rd Edition*. Berlin: Springer; 2009:11-59.

- Woolveridge I, Bryden AA, Taylor MF, George NJ, Wu FC, Morris ID. Apoptosis and expression of apoptotic regulators in the human testis following short- and long-term anti-androgen treatment. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:701-7.
- Zhang Z, Shao S, Meistrich ML. The radiation-induced block in spermatogonial differentiation is due to damage to the somatic environment, not the germ cells. *J Cell Physiol* 2007; 211:149-58.
- Zhengwei Y, Wreford NG, Royce P, de Kretser DM, McLachlan RI. Stereological evaluation of human spermatogenesis after suppression by testosterone treatment: heterogeneous pattern of spermatogenic impairment. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:1284-91.

## ANEXO I. REVISÃO DA LITERATURA

### A ESPERMATOGÊNESE DO HOMEM

Os testículos são os órgãos responsáveis pela produção dos gametas masculinos, além de produzirem também os andrógenos, hormônios que levam a formação e manutenção dos caracteres sexuais secundários do homem. São órgãos pares que, no adulto normal, estão localizados no escroto. O parênquima testicular é envolvido por uma espessa túnica de tecido conjuntivo denso, a albugínea, que emite finos septos de tecido conjuntivo frouxo que o dividem em aproximadamente 250-300 lóbulos (Figura 1). Cada lóbulo é constituído por um a três túbulos seminíferos cujos fluídos secretados são coletados pela rede testes, a qual é formada por 10 a 12 túbulos retos e depois liberados no sistema de ductos dos epidídimos, onde os espermatozoides são armazenados e passam por um processo de amadurecimento, para depois serem liberados para o meio externo, no momento da ejaculação

Nos túbulos seminíferos ocorre o processo denominado espermatogênese, onde células-tronco diplóides são transformadas em células altamente especializadas, os espermatozóides (gametas haplóides), capazes de fecundar os óvulos no trato genital feminino. No compartimento intersticial, localizado entre os túbulos seminíferos, ocorre o processo da esteroidogênese, responsável pela formação dos hormônios sexuais masculinos, cujo mais importante é a testosterona. A testosterona, ou seus metabólitos, são responsáveis pela espermatogênese e pelo desenvolvimento dos caracteres sexuais masculinos. Embora anatomicamente separados, os túbulos seminíferos e o compartimento intersticial são conectados entre si. Para uma produção normal de gametas, a integração entre ambos os compartimentos é necessária (Figura 1). Os processos da espermatogênese e da esteroidogênese iniciam-se na puberdade e são controlados por hormônios produzidos no hipotálamo e na glândula hipófise. Os efeitos endócrinos são mediados no próprio testículo, por mecanismos de controle local, através de efeitos parácrinos e autócrinos. (Weinbauer, 2009).

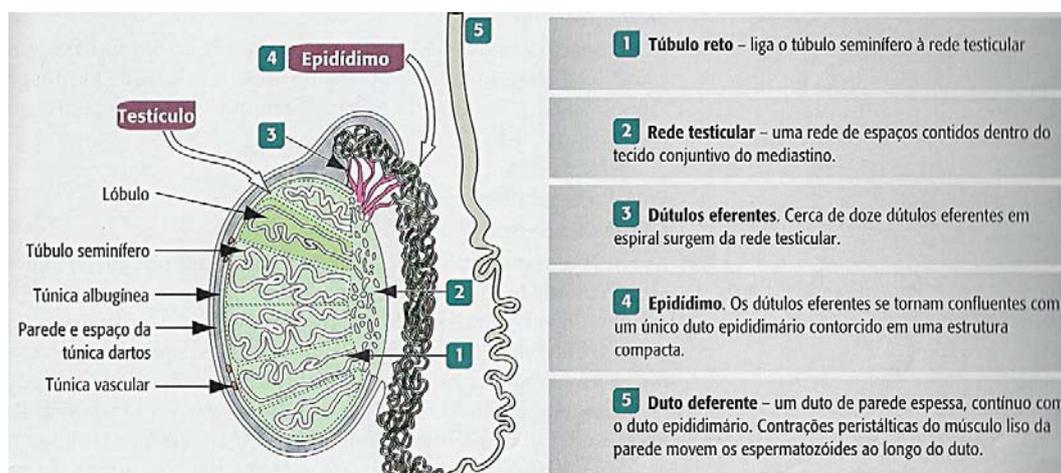


Figura 1. Testículo, epidídimo e ducto deferente (retirado de Kierszenbaum, 2004).

## 1 – Os túbulos seminíferos

A espermatogênese ocorre no interior dos túbulos seminíferos. Eles são constituídos pelo epitélio germinativo e pela túnica própria. O epitélio germinativo é constituído pelas células germinativas em todas as suas fases de evolução, ou seja, pelas espermatogônias, espermatócitos primários e secundários, espermatídes imaturas e maduras, além de células somáticas, denominadas células de Sertoli (Figuras 2 e 3). O testículo humano contém cerca de 600 túbulos seminíferos, com um comprimento médio de 60 cm de cada túbulo, perfazendo um total de 360 metros por testículo ou 720 metros por cada homem. Seu diâmetro médio é de cerca de 180  $\mu\text{m}$ . (Holstein et al., 2003)

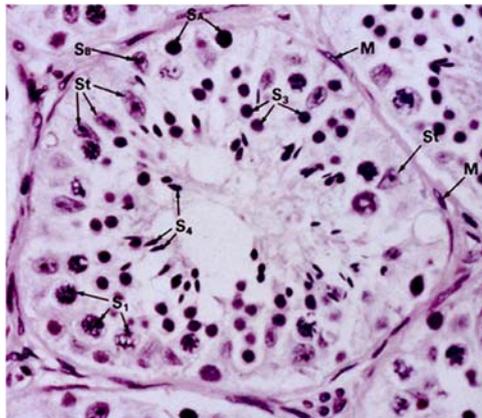


Figura 2. Corte transversal de túbulo seminífero mostrando no epitélio a presença de células germinativas (AS, espermatogônia tipo A; SB, espermatogonia do tipo B; S1, espermatócitos primários; S2, espermatídes arredondadas; S3, espermatídes alongadas) e células somáticas (St, células de Sertoli; M, células mióides). (retirado de Wheater et al., 1982).

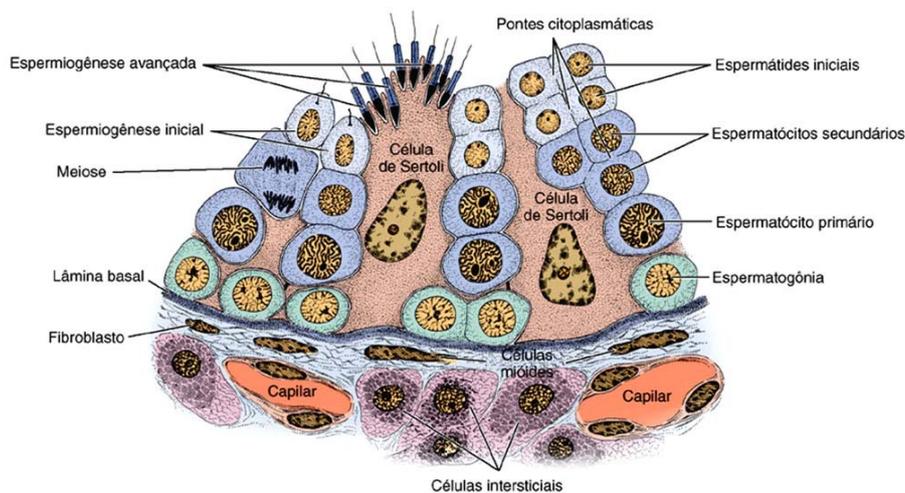


Figura 3. Desenho de uma porção do epitélio seminífero mostrando as diferentes células germinativas do processo espermatogênico e seus posicionamentos em relação às células de Sertoli. Fora do túbulo seminífero, o interstício com as células intersticiais ou de Leydig, bem como capilares sanguíneos. (retirado de Junqueira e Carneiro, 2008)

O tecido peritubular consiste de cerca de cinco camadas de miofibroblastos interligados por tecido conjuntivo (colágeno). Os miofibroblastos causam contrações peristálticas, transportando espermatozóides imóveis para a *rede testis*, processo esse regulado por substâncias como a ocitocina, prostaglandinas e endotelinas (Romano et al. 2005). Distúrbios da função testicular e diminuição ou ausência da atividade espermatogênica podem estar associados ao espessamento do tecido peritubular, ficando sua parede fibrótica ou hialinizada. (Weinbauer et al., 2009).

As células de Sertoli são células somáticas localizadas no epitélio germinativo. No homem adulto, são mitoticamente inativas. Foram primeiramente descritas por Enrico Sertoli, cientista italiano, em 1865. Estão localizadas junto à membrana basal e possuem proeminentes projeções citoplasmáticas e ramificações que se estendem para a luz dos túbulos seminíferos, consideradas como o suporte estrutural do epitélio germinal. Participam de toda diferenciação morfológica e fisiológica das células germinativas. Cerca de 40% do volume do epitélio germinativo é representado pelas células de Sertoli. Elas sintetizam e secretam grande variedade de substâncias, como proteínas, citocinas, fatores de crescimento, opióides, esteróides, prostaglandinas, moduladores de divisão celular, entre outras. Sua morfologia está estritamente relacionada com suas várias funções fisiológicas. Cada célula de Sertoli é responsável morfológica e funcionalmente por um número definido de células germinativas. Esse número é espécie-dependente. No homem, observa-se cerca de 10 células germinativas e 1,5 espermatozóides por cada célula de Sertoli. (Zhengwei et al., 1998a). Investigações sugerem que o número de células de Sertoli no homem aumenta até os 15 anos de idade. Sua proliferação é marcadamente ativada quando expostas a atividade das gonadotrofinas. (Schlatt et al., 1995). As divisões das células de Sertoli cessam quando a primeira célula germinativa sofre divisão meiótica, coincidindo também com o fechamento da chamada barreira de célula de Sertoli ou hematotesticular, por meio de junções intercelulares especializadas. Essas estruturas são especializações da membrana celular das células de Sertoli, que dividem o epitélio germinativo nos compartimentos basal e adluminal. Portanto, através da barreira de células de Sertoli o epitélio seminífero é dividido nessas duas regiões, as quais são anatomicamente e funcionalmente diferentes. As células germinativas mais iniciais do processo espermatogênico, as espermatogônias, estão localizadas no compartimento basal e as células mais avançadas, espermatócitos e espermátides, estão no compartimento adluminal. Durante seu desenvolvimento, as células germinativas são transportadas do compartimento basal para o adluminal mediante aberturas e fechamentos sincronizados das junções intercelulares. Duas importantes funções são postuladas para a barreira de células de Sertoli: isolamento das células germinativas haplóides, para prevenir o reconhecimento pelo sistema imunológico e preparação para o processo meiótico e desenvolvimento espermático. (Weinbauer, 2009).

Pode-se atribuir as células de Sertoli, as seguintes funções: (1) sustentação e nutrição das células germinativas, (2) organização da liberação de espermátides maduras para o lúmen tubular (espermiação), (3) produção de substâncias endócrinas e parácrinas para a regulação da espermatogênese, (4) secreção da proteína carreadora de andrógenos (ABP – *androgen binding protein*), (5) interação intertubular endócrina com as células de Leydig, entre outras (Russell and Griswold, 1993).

## 2 – Cinética da espermatogênese

A espermatogênese do homem inicia-se na puberdade e continua até o envelhecimento. Esse processo é altamente organizado. Espermatogônias se dividem continuamente, em parte formando novas espermatogônias de reserva e outra parte dando início ao processo de diferenciação, formando células germinativas mais avançadas, que gradativamente vão se transformando em células germinativas maduras. Grupos de células em diferentes fases de desenvolvimento são repetidamente encontradas juntas em secções dos túbulos seminíferos. No homem, seis desses grupos foram descritos, sendo chamados de “estágios da espermatogênese”. Em uma determinada região do epitélio germinativo, a cada 16 dias, o mesmo típico grupo de células aparece. Esse espaço de tempo é denominado “ciclo do epitélio seminífero”. (Clermont, 1963). O desenvolvimento de uma espermatogônia tipo A até a formação de espermátides maduras requer 4,6 ciclos, ou seja, 74 dias. Após a liberação das espermátides para a luz dos túbulos seminíferos, agora como espermatozóides, são transportados para os ductos dos epidídimos por mais 12 dias. Portanto, um total de 86 dias é necessário para que uma espermatogônia se transforme em espermatozóides maduros. (Amann, 2008).

Espermatogênese inicia-se com a divisão das células-tronco dos testículos (espermatogônias) e termina com a formação de espermatozóides maduros (Figura 4a). Estas células germinativas se arranjam em típicas associações celulares no interior dos túbulos seminíferos, formando os estádios do ciclo do epitélio seminífero. (Figura 4b) (Heller and Clermont, 1964).

O processo completo da espermatogênese pode ser dividido em três fases;

- (1) Espermatogonial ou proliferativa, que consiste na proliferação e diferenciação das espermatogônias (diplóides) por mitoses.
- (2) Espermatocitária ou meiótica, que consiste na divisão dos espermatócitos (tetraplóides) em espermátides jovens (haplóides)
- (3) Espermiogênica ou diferenciação, que são alterações morfológicas das espermátides jovens (arredondadas), transformando-se em espermátides maduras (alongadas).

### *Fase espermatogonial ou proliferativa*

Espermatogônias estão localizadas na base do epitélio seminífero e são classificadas, no homem, em tipo A e tipo B, de acordo com sua morfologia e coloração de seu núcleo. (Clermont, 1966). Podem-se distinguir dois tipos de espermatogônias A, tanto do ponto de vista citológico quanto fisiológico. As espermatogônias tipo A<sub>escuras</sub> (A<sub>dark</sub>) não proliferam em condições normais e raramente se dividem. São consideradas como células-tronco testiculares. (Ehmcke et al, 2006). Essas células se dividem por mitoses quando ocorre uma queda muito drástica na população espermatogonial, em casos de irradiação, por exemplo (de Rooij, 1998). As espermatogônias A<sub>claras</sub> (A<sub>pale</sub>) se dividem por mitoses para autorenovação, formando novas espermatogônias A<sub>claras</sub>.

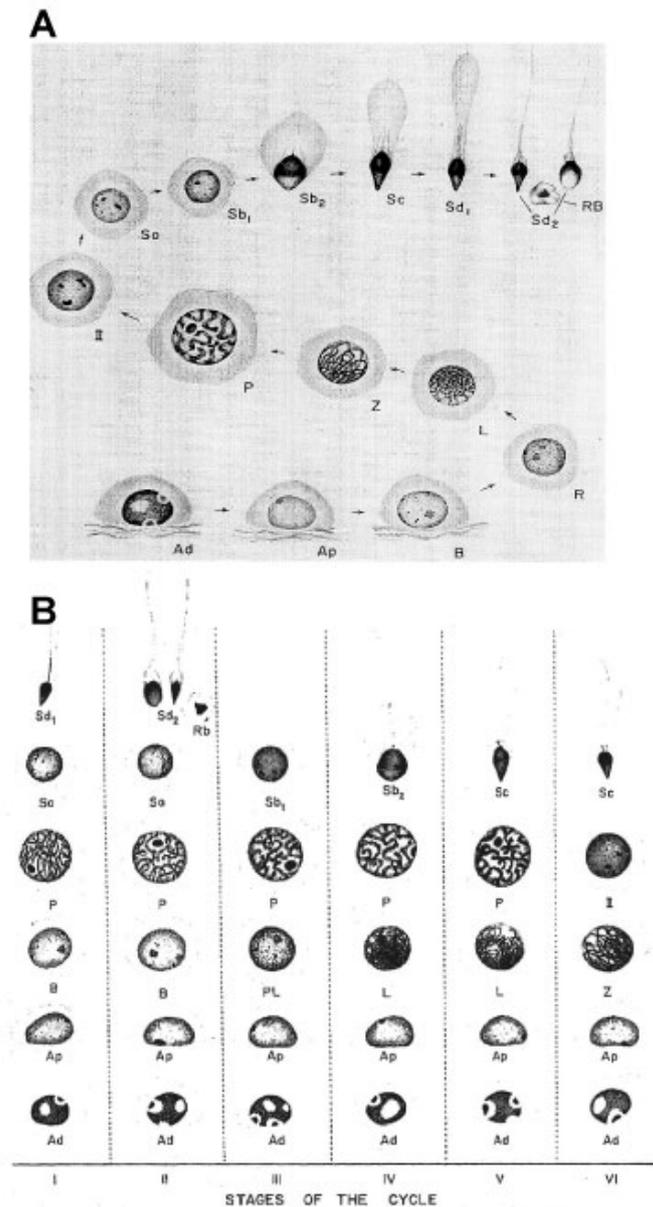


Figura 4. (A) células da linhagem germinativa no homem: Ad, espermatogônia Aescura (Adark); Ap, espermatogônia Aclara (Apale; B, espermatogonia B; R, preleptóteno; L, leptóteno; Z, zigóteno; P, paquíteno; II espermatócito secundário; As, Sb<sub>1</sub>, Sb<sub>2</sub>, Sc, Sd<sub>1</sub> e Sd<sub>2</sub>, fases da espermiogênese; RB, corpo residual. (B) As células germinativas agrupadas nos VI estádios do ciclo do epitélio seminífero, descritos para o homem (retirados de (A) Clermont, 1966 e (B) Heller e Clermont, 1964).

mas ao mesmo tempo se diferenciam em espermatogônias tipo B, as quais posteriormente irão se dividir formando os espermatócitos primários. Ao contrário do que foi inicialmente postulado pelo modelo de Clermont, as espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$  não formam as  $A_{\text{claras}}$  durante o ciclo espermatogênico regular do homem. (Ehmcke and Schlatt, 2006). Da divisão das espermatogônias tipo B origina-se espermatócitos primários em preleptóteno, a primeira célula da fase meiótica. Espermatogônias podem estar ausentes no nascimento ou podem ser destruídas por diferentes agentes, como irradiação, por exemplo.

### *Fase espermatocitária ou meiótica*

As células germinativas em meiose são chamadas de espermatócitos. O processo de meiose compreende duas divisões. As células antes da primeira divisão são chamadas de espermatócitos primários e antes da segunda divisão, espermatócitos secundários. Os espermatócitos primários são as maiores células germinativas do epitélio seminífero. O aspecto de sua cromatina nuclear representa os estágios da meiose. A divisão meiótica dos espermatócitos inicia-se com o estágio de preleptóteno e depois leptóteno da prófase I, sempre no compartimento basal do epitélio germinativo. Após passar pela barreira das células de Sertoli, eles passam para o compartimento adluminal e continuam com os outros estágios da prófase I, chamados de zigóteno, paquíteno e diplóteno. Durante a prófase I, ocorre a reduplicação do DNA, a condensação dos cromossomas, o pareamento dos cromossomas homólogos e o *crossing over*. Das duas divisões de cada espermatócito, resultam quatro células haplóides denominadas espermátides. Muitos defeitos da meiose indicam a vulnerabilidade desse complicado processo. Apoptoses em espermatócitos são frequentes. (Holstein et al. 2003).

### *Fase espermiogênica ou de diferenciação*

Espermátides são derivadas da segunda divisão meiótica. O processo de espermiogênese, que se constitui das modificações citológicas que transformam espermátides arredondadas em espermátides alongadas, ocorre em quatro fases principais: (1) condensação da cromatina nuclear, (2) formação do acrossoma a partir do complexo de Golgi, formando um capuz enzimático sobre o núcleo da célula, com função de penetração no óvulo durante o processo de fertilização, (3) desenvolvimento das estruturas do flagelo e sua implantação no núcleo e (4) fagocitose dos restos citoplasmáticos, denominados corpos residuais, pelas células de Sertoli. Espermátides alongadas e seus corpos residuais influenciam a função secretora das células de Sertoli (Weinbauer, 2009).

No final desta fase ocorre a espermição, que é o processo de liberação de espermátides maduras do epitélio germinativo para a luz tubular. Esse processo é coordenado pelas células de Sertoli. As espermátides maduras fecham suas pontes intercelulares, desconectando seu contato com o epitélio germinativo e transformando-se em células livres, agora chamadas espermatozóides. Espermátides que não são liberadas são fagocitadas pelas células de Sertoli. (Russell and Griswold, 1993).

## **3 – Compartimento intersticial**

O componente mais importante do espaço intertubular são as células de Leydig, produtoras de testosterona. Além dessas células, o espaço intersticial também contém vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, mastócitos, fibroblastos e tecido conjuntivo. Células do sistema imunológico, como macrófagos e linfócitos também estão presentes.

As células de Leydig foram primeiramente descritas em 1850 pelo alemão Franz Leydig. Elas produzem e secretam, entre outros andrógenos, a testosterona, o mais importante hormônio sexual masculino. Entre as principais ações da testosterona estão: (1) ativação do eixo hipotálamo-hipófise-testículo, (2) masculinização do cérebro e comportamento sexual, (3) iniciação, processamento e manutenção da espermatogênese, (4) diferenciação dos órgãos genitais masculinos e (5) formação dos caracteres sexuais secundários do homem. (Payne et al, 1996).

Células de Leydig são ricas em retículo endoplasmático liso e mitocôndrias com cristas tubulares, características fisiológicas típicas de células produtoras de esteróides, como nas glândulas adrenais e nos ovários. Outros componentes citoplasmáticos importantes são os grânulos de lipofucsina e as gotículas de lipídios (*lipid droplets*), importantes para a síntese de testosterona. No testículo adulto, a diferenciação das células de Leydig é induzida pelo hormônio luteinizante (LH), por fatores de crescimento e fatores de diferenciação derivados das células de Sertoli. O número de células de Leydig não está necessariamente correlacionado com a produção hormonal. Estudos imunohistoquímicos mostraram que num número aumentado de células de Leydig, apenas poucas delas produziram testosterona. (Holstein et al. 2003).

Macrófagos são componentes normais no espaço intertubular. Sob condições de inflamação ou câncer testicular, seu número está aumentado. Eles podem entrar nos túbulos seminíferos e fagocitar espermatozóides. Estudos mostram que eles secretam estimuladores e inibidores da esteroidogênese.

Os mastócitos são distribuídos em diferentes zonas dos testículos, dependendo da espécie. Nos testículos humanos estão localizados no interstício e áreas peritubulares. Além do seu papel na inflamação e auto-imunidade, induz a proliferação de fibroblastos e é relevante para o processo de fibrose testicular. (Pérez et al., 2013).

Linfócitos normalmente não estão presentes no interstício dos túbulos seminíferos, mas em condições especiais como degeneração dos túbulos, infecções, reações alérgicas ou tumores, linfócitos livres podem estar presentes.

Vasos sanguíneos estão dispostos entre as células de Leydig e os túbulos seminíferos, permitindo a distribuição de substâncias endócrinas e parácrinas (Holstein et al. 2003).

#### **4 – Eficiência da espermatogênese**

Espermatogênese, no homem, é um processo de pouca eficiência em termos de qualidade e quantidade. O número de células germinativas perdidas durante a espermatogênese e o número de espermatozóides malformados no ejaculado é extremamente alto. Em torno de 75% das células germinativas são perdidas por apoptose ou degeneração. Somente 25% dessas células chegam até o ejaculado, sendo mais da metade delas malformadas. Portanto somente 12% do potencial espermatogênico são utilizados na reprodução humana. (Holstein 2003). A longa duração da espermatogênese em humanos (74 dias) e o baixo número de células

germinativas por unidade de volume de parênquima testicular, comparada com outras espécies mais eficientes, contribuem para a baixa eficiência da espermatogênese em humanos. Não está claro por que o testículo humano difere dos de outras espécies na composição e duração da espermatogênese. (Johnson, 1986; Johnson et al., 2000)

## 5 – Regulação da espermatogênese

### *Regulação endócrina*

As funções primárias dos testículos, ou seja, a espermatogênese e a esteroidogênese, são reguladas pelo eixo hipotálamo-hipófise. As gonadotrofinas hipofisárias, que são o hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), são produzidas e secretadas mediante controle hipotalâmico pelo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). As células de Leydig, localizadas no espaço intersticial entre os túbulos seminíferos, sintetizam e secretam testosterona sob o controle do LH. Testosterona estimula a maturação das células germinativas nos túbulos seminíferos. No epitélio germinativo, somente as células de Sertoli possuem receptores de testosterona e FSH. Acredita-se que os efeitos de testosterona/FSH na espermatogênese são mediados pelas células de Sertoli. (Ruwanpura et al, 2010). Testosterona inibe a secreção de GnRH e das gonadotrofinas (LH e FSH) por retroalimentação negativa. Inibina B e folistatina suprimem seletivamente a liberação de FSH pela hipófise, enquanto a ativina estimula esse processo. Além dos efeitos na espermatogênese, testosterona desempenha um importante papel no crescimento dos pelos, metabolismo ósseo, distribuição de massa muscular, caracteres sexuais secundários e funções dos órgãos reprodutores masculinos. (Matsumoto and Bremner, 1987) (Figura 5).

Estudos foram realizados para avaliar a importância do LH/testosterona e FSH para a iniciação e manutenção da espermatogênese. Admite-se que somente testosterona e FSH são suficientes para iniciar e manter a espermatogênese de maneira apenas qualitativa. (Weinbauer et al. 2001). Para obter-se efeito quantitativo na produção de células germinativas, em condições fisiológicas, LH e FSH são necessários. Aplicação exógena de altas doses de testosterona suprime a secreção de gonadotrofinas através de mecanismo de retroalimentação negativa e causa uma drástica diminuição no número de espermatozoides do ejaculado. (McLachlan et al, 2002).

### *Regulação parácrina*

As interações locais entre as células germinativas do testículo podem ser classificadas em: (1) parácrinas, quando se referem a fatores que atuam entre células vizinhas, (2) autócrinas, quando fatores são liberados da célula e atuam na própria célula e (3) intrácrinas, quando fatores que nunca saem da célula, atuam na mesma célula.

As células de Leydig, no espaço intertubular, secretam testosterona, substâncias neuroendócrinas e fatores de crescimento. Essas substâncias são transmitidas para as próprias células de Leydig vizinhas, para os vasos sanguíneos,

para a lâmina própria dos túbulos seminíferos e para as células de Sertoli. Elas estão envolvidas na manutenção das células de Sertoli e do tecido peritubular, influenciando na contratilidade dos miofibroblastos, que, por sua vez, regulam o movimento peristáltico dos túbulos seminíferos e o transporte dos espermatozoides. (Schatt et al, 1997).

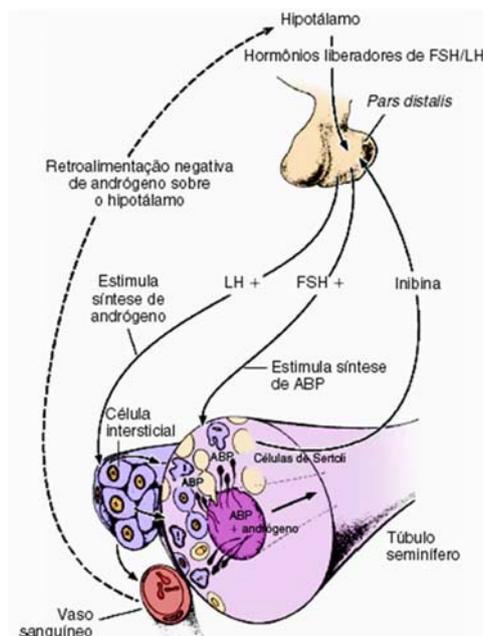


Figura 5. Eixo hipotálamo-hipófise-gonada que controla o processo espermatogênico (retirado de Junqueira e Carneiro, 2008).

A testosterona desempenha um papel essencial como um regulador local da espermatogênese. Estudos em roedores demonstram que a eliminação seletiva das células de Leydig, a interrupção do transporte testicular de testosterona e o bloqueio de receptores de andrógenos nas células de Sertoli provocam profundas alterações na maturação das células germinativas. Embora esteja estabelecido que a testosterona seja essencial para a regulação local da espermatogênese, tem sido difícil demonstrar uma clara relação entre concentração testicular de testosterona e a produção de células germinativas. (Weinbauer and Wessels, 1999). Testosterona é metabolizada em diidrotestosterona [DHT] pela ação da enzima 5alfa-redutase e em estradiol pela ação da aromatase. O papel desses metabólitos na espermatogênese ainda não está claro.

As células de Sertoli são consideradas coordenadoras e reguladoras do desenvolvimento e maturação das células germinativas. Atualmente acredita-se que as células de Sertoli são influenciadas por produtos das próprias células germinativas em suas atividades secretoras (França et al. 1998). Os fatores de células-tronco (stem cell factor – SCF) e seus receptores c-kit são essenciais para orientar a migração de células germinativas durante a ontogênese e a diferenciação espermatogonial no testículo adulto. SCF é sintetizado e secretado pelas células de Sertoli, enquanto seu

receptor é expresso na superfície espermatogonial. O sistema SFC/c-kit é importante para a diferenciação e desenvolvimento das espermatogônias. (Mauduit et al, 1999).

Todos esses dados e outros de inúmeras pesquisas, demonstram a importância das interações locais entre células de Sertoli, de Leydig, peritubulares e germinativas, em conexão com as ações de andrógenos e gonadotrofinas, na iniciação e manutenção da espermatogênese.

## **6 – Distúrbios da espermatogênese**

Proliferação e diferenciação das células germinativas do homem e os mecanismos intratesticular e extratesticular de regulação da espermatogênese podem ser afetados em diversos níveis. Isso pode ocorrer como resultado de influência ambiental ou devido a doenças que afetam diretamente a espermatogênese. Diferentes substâncias, drogas, hormônios, toxinas ou irradiação podem reduzir ou destruir a atividade espermatogênica dos testículos. Isso pode ser expresso por um reduzido número de espermátides maduras, malformação das espermátides, distúrbios da meiose, parada da espermatogênese em diversos estágios, reduzida multiplicação ou apoptose de espermatogônias. Caso as espermatogônias sobrevivam, então a espermatogênese pode ser recuperada. (Holstein 2003).

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

**Parecer nº. ETIC 117/07**

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

**DECISÃO**

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

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

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

  
**Prof. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
**Presidente do COEP-UFMG**





Belo Horizonte, 19 de outubro de 2007.

**PROCESSO Nº 079/2007**

**TÍTULO: “Avaliações morfofuncionais e moleculares da linhagem espermatogonial humana antes e após tratamento contra o câncer de próstata.”**

Sr(a) Pesquisador(a):

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

Atenciosamente,

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

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



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

**PARECER Nº 189/2008**

Registro CONEP: 14250 (Este n° deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0117.0.203.000-07

Processo nº. 25000.147585/2007-36

Projeto de Pesquisa: "Avaliações Morfofuncionais e Moleculares da linhagem espermatogonial humana antes e após tratamentos contra o câncer de próstata."

Pesquisador Responsável: Dr. Hélio Chiarini Garcia

Instituição: Instituto de Ciências Biológicas /Universidade Federal de Minas Gerais – (Centro Único)

CEP de origem: COEP/UFMG

Área Temática Especial: Reprodução Humana; Cooperação Estrangeira

Patrocinador: A ser definido (Instituição/Agências Financiadoras/ Próprios)

**Sumário Geral do Protocolo**

É um trabalho de nível acadêmico a ser realizado pelo Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB / UFMG), visando estudar a biologia das células espermatogoniais humanas com a intenção de esclarecer a biologia espermatogonial desde o ciclo do epitélio seminífero quanto à morfologia, cinética e descrição dos nichos espermatogoniais (até agora pouco estudados). Pretende ainda determinar a presença e/ou ausência de mRNAs que poderiam estar relacionados com a diferenciação espermatogonial e sua localização específica no parênquima testicular. Determinar a presença/ausência e os níveis relativos de proteínas sintetizadas a partir destes genes, bem como sua localização no parênquima testicular, bem como determinar as concentrações hormonais. Todos esses parâmetros serão analisados em testículos obtidos de pacientes tratados no Hospital das Clínicas da UFMG–HC/UFMG ou em Hospitais e Unidades de Oncologia ligados à Instituição, para os quais tenha sido recomendado a orquiectomia subcapsular bilateral como tratamento para câncer avançado de próstata.

Os pacientes, em número de 30 a 40, mas que podem chegar a 60 (como está previsto na Folha de Rosto) que comporão os vários grupos experimentais, serão avaliados pelos médicos do Setor de Andrologia do HC/UFMG e a coleta se fará com a participação de membros da equipe proponente, do Setor de Urologia e Uro-Oncologia do HC/UFMG, presentes no momento da cirurgia de orquiectomia. Anteriormente à coleta será feito o levantamento dos dados clínicos dos pacientes e o esclarecimento para a obtenção do TCLE.

Os grupos experimentais serão compostos de testículos de pacientes com câncer de próstata sem nenhum tratamento prévio (grupo A); submetidos a prostatectomia radical (Grupo B); submetidos a radioterapia (grupo C); submetidos a bloqueio antiandrógeno (Grupo D) e submetidos a radioterapia e bloqueio antiandrógeno (Grupo E).

Imediatamente após a orquiectomia os parênquimas testiculares direito e esquerdo serão preparados para os fins específicos da pesquisa. Trata-se de material que seria normalmente descartado.

As análises morfológicas e morfométricas serão realizadas no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução - LABER/ICB/UFMG.

diferenciação espermatogonial serão feitas na Universidade do Texas, Huston, USA, em colaboração com missões dos pesquisadores brasileiros da UFMG.

#### **Apresentação do Protocolo**

O protocolo está devidamente instruído.

A Folha de Rosto está devidamente preenchida e assinada, especialmente no que se refere aos compromissos do Investigador e da Instituição.

As Declarações dos diversos departamentos e as licenças para a realização da pesquisa estão presentes, inclusive o esclarecimento sobre o grau de relação dos profissionais da equipe de Urologia (3 pesquisadores) e os pacientes submetidos à orquiectomia.

O protocolo está devidamente classificado como sendo de cooperação estrangeira devido ao Contrato de colaboração entre a UFMG e a UT/M.D. Anderson Cancer Center de Huston, Texas, USA, que também consta do protocolo e está devidamente traduzido.

Constam os Currículo Vitae- CV do Pesquisador Principal e de seus colaboradores, bem com os CV dos pesquisadores colaboradores da Universidade do Texas.

Não existe propriamente um Orçamento financeiro, mas um detalhamento e uma explicação dos diversos custos e da perspectiva de onde deverão vir esses recursos para cobrir os custos. Consta, inclusive, uma explicação sobre a participação do próprio SUS no processo, visto que os pacientes orquiectomizados pertencem ao SUS e a cirurgia é coberta pelo Sistema Único de Saúde.

#### **Local de Realização do Estudo**

É projeto nascido e a ser executado na Universidade Federal de Minas Gerais, como Centro Único, que contará com a parceria da Universidade do Texas na Análise dos dados. O país de origem do projeto é, portanto, o Brasil.

#### **Comentários**

O projeto está sendo reapresentado com documentos solicitados pela CONEP que estavam ausentes na sua apresentação anterior (Reg. CONEP 14033), estando o protocolo também com páginas incompletas.

O presente protocolo está, em geral, de acordo com o que vem preconizado pela Resolução CNS 196/96 e suas complementares, oferecendo aos sujeitos de pesquisa todas as garantias e seus direitos.

É um trabalho inédito e a equipe da UFMG, de acordo com seus currículos, está capacitada para a sua realização.

O material utilizado no estudo (retirado na orquiectomia – e proveniente do tratamento de câncer de próstata avançado) seria normalmente descartado após o procedimento cirúrgico, portanto é informado que não haverá riscos adicionais aos sujeitos da pesquisa nesse sentido.

Certamente os resultados da pesquisa poderão trazer compreensão da espermatogênese humana, no conhecimento das causas da infertilidade, mostrar como os diversos tratamentos de câncer podem prejudicar o processo espermatogênico e sugerir modos de minorar tais efeitos danosos.

A metodologia é adequada aos fins desejados.

O pesquisador esclarece que os médicos pesquisadores não têm nenhuma influência na indicação e realização da ablação cirúrgica (orquiectomia bilateral) em pacientes portadores de câncer avançado de próstata e que esses procedimentos são sempre indicados pelos médicos do Setor de Uro-Oncologia, visando apenas o tratamento da doença em questão.

Cont. Parecer CONEP 188/2006

Haverá envio de material biológico para o exterior (Universidade do Texas) que deverá ser utilizado apenas para os fins propostos no estudo.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE garante o sigilo dos dados, apresenta os principais benefícios esperados da pesquisa, mostra a ausência prática de maiores riscos destacando os desconfortos de determinados procedimentos. Não prevê nem ressarcimentos, nem indenizações.

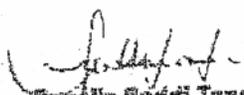
**Considerações sobre a análise das respostas ao Parecer CONEP Nº 013/2007, relativo ao projeto de pesquisa em questão:**

1. Foi informado pelo pesquisador a orquiectomia contínua sendo o tratamento padrão ouro.
2. A incidência dessa prática na instituição em pauta foi de 21 procedimentos em 2005 e 37 em 2006.
3. O TCLE foi revisto conforme solicitado:
  - a. O TCLE (Anexo 4) foi incorporado ao protocolo;
  - b. Quanto à orientação para o direito de reabilitação (possibilidade de colocação de prótese) foi esclarecido que é feita apenas a orquiectomia bilateral subcasular (e não a total), onde é retirado apenas o parênquima testicular e cujo resultado final é melhor do que a colocação de uma prótese.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta - se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado

Brasília 07 de abril de 2006.

  
Sybilie Sadi Tannous  
Coordenadora da CONEP/CNS/MS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Hospital das Clínicas  
Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS E MOLECULARES DA LINHAGEM ESPERMATOGONIAL HUMANA ANTES E APÓS TRATAMENTOS CONTRA O CANCER DE PRÓSTATA

#### I. INTRODUÇÃO:

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

#### II. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

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

#### III. SIGILO DOS DADOS

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

#### IV. BENEFÍCIOS DA PESQUISA

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

#### V. RISCOS

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

#### VI. RESSARCIMENTO DAS DESPESAS

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

## **DEMAIS ESCLARECIMENTOS**

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

## **VII. TERMO DE CONSENTIMENTO**

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

Nome completo do paciente:

Nº Registro do paciente:

Assinatura do paciente ou representante legal:

Local e data:

Nome da pessoa que obteve o Consentimento Livre e Esclarecido:

Assinatura da Pessoa que obteve o consentimento Livre e esclarecido:

Local e data:

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

**TELEFONES PARA CONTATO:**

### **Pesquisadores:**

Prof. Hélio Chiarini-Garcia - Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução – (31) 3499.2807

Profª Gleydes Gambogi Parreira - Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução – (31) 3499.2994

Profª Fernanda RCL Almeida - Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução – (31) 3499.2992

Prof. Carlos Eduardo Corradi Fonseca – Chefe Setor de Urologia - Hospital das Clínicas, UFMG (31)3248-9488

Dr. Reginaldo Martello - Setor de Urologia do Hospital das Clínicas da UFMG – (31) 3248.9488 ou 9974-9590

Dr. Augusto Reis - Setor de Urologia do Hospital das Clínicas da UFMG – (31) 3248.9488 ou 9164.8173

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

### **Endereço do Comitê de Ética:**

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – UFMG

Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005

Av. Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha

31.270-901 – Belo Horizonte – MG

Telefone: (31) 3409.4592



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Hospital das Clínicas  
ICB - Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução

## Projeto

### **AVALIAÇÕES MORFOFUNCIONAIS E MOLECULARES DA LINHAGEM ESPERMATOGONIAL HUMANA ANTES E APÓS TRATAMENTOS CONTRA O CANCER DE PRÓSTATA**

Hospital: \_\_\_\_\_

Registro: \_\_\_\_\_

Responsável pela coleta de dados: \_\_\_\_\_ Cirurgião: \_\_\_\_\_

Data da Cirurgia (Orquiectomia) e Coleta de Dados Clínicos: \_\_\_\_\_

### **IDENTIFICAÇÃO:**

Nome: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Estado civil: ( ) solteiro ( ) casado ( ) amasiado ( ) separado ( ) viuvo ( ) outros \_\_\_\_\_

Cor da pele: ( ) branco ( ) negro ( ) pardo ( ) outros \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefones: \_\_\_\_\_

### **ANAMNESE:**

QP: \_\_\_\_\_

HMA: \_\_\_\_\_

Queixas urinárias (LUTS): ( ) não sim ( ) Quais? \_\_\_\_\_

Doenças genitais anteriores: ( ) não ( ) sim Quais? \_\_\_\_\_

Doenças sistêmicas: ( ) HAS ( ) Diabetes ( ) Tabagismo ( ) Etilismo ( ) Outras: \_\_\_\_\_

Uso de medicamentos: ( ) não ( ) sim Quais? \_\_\_\_\_

Cirurgias anteriores: ( ) não ( ) sim Quais? \_\_\_\_\_

Filhos: ( ) não ( ) sim Quantos? \_\_\_\_\_

Data do diagnóstico do câncer de próstata (biópsia): \_\_\_\_\_

Toque retal no diagnóstico: ( ) normal ( ) alterado \_\_\_\_\_

PSA no diagnóstico: ( ) normal ( ) alterado Resultado: \_\_\_\_\_

USTR no diagnóstico: Nódulo ( ) não ( ) sim Peso da Próstata: \_\_\_\_\_ Bexiga: \_\_\_\_\_

Histologia da próstata (biópsia ou peça cirúrgica): Gleason: \_\_\_\_\_

Cintilografia óssea: ( ) negativa ( ) positiva \_\_\_\_\_

Vasectomia: ( ) não ( ) sim Data de realização: \_\_\_\_\_

**EXAME FÍSICO:**

**Geral:** ( ) normal ( ) alterado \_\_\_\_\_

**Abdome:** ( ) normal ( ) alterado \_\_\_\_\_

**Genitais:** Pênis: ( ) normal ( ) alterado \_\_\_\_\_

Testículos: Direito: Tamanho: ( ) normal \_\_\_\_\_ ( ) alterado \_\_\_\_\_

Consistência: ( ) normal ( ) alterada \_\_\_\_\_

Esquerdo: Tamanho: ( ) normal \_\_\_\_\_ ( ) alterado \_\_\_\_\_

Consistência: ( ) normal ( ) alterada \_\_\_\_\_

Anexos: ( ) normais ( ) alterados \_\_\_\_\_

**Outros dados:** \_\_\_\_\_

**EXAMES COMPLEMENTARES:****Hormônios (colhidos no dia da Orquiectomia):**

FSH: ( ) normal \_\_\_\_\_ ( ) alterado \_\_\_\_\_ LH: ( ) normal \_\_\_\_\_ ( ) alterado \_\_\_\_\_

Testosterona: ( ) normal \_\_\_\_\_ ( ) alterada \_\_\_\_\_ PRL: ( ) normal \_\_\_\_\_ ( ) alterada \_\_\_\_\_

**Outros (pegar dados de prontuário, se tiver):**

PSA: \_\_\_\_\_ Urina Rotina: \_\_\_\_\_

Hemograma: \_\_\_\_\_

Creatinina: \_\_\_\_\_ Glicose: \_\_\_\_\_

Outros: \_\_\_\_\_

**DIAGNÓSTICOS:**

Câncer de próstata: Estadiamento (TMN): \_\_\_\_\_

Histologia (Gleason): \_\_\_\_\_

Fertilidade (número de filhos): \_\_\_\_\_

Perfil hormonal: \_\_\_\_\_

Histologia testicular: ( ) Espermatogênese normal \_\_\_\_\_

( ) Hipoespermatogênese \_\_\_\_\_

( ) Parada de Maturação \_\_\_\_\_

( ) Aplasia Germinativa (Sertoly Only) \_\_\_\_\_

( ) Esclerose Tubular \_\_\_\_\_

Outros: \_\_\_\_\_

**TRATAMENTOS:**

**Nenhum tratamento** ( ) \_\_\_\_\_

**Prostatectomia radical:** ( ) não ( ) sim

- data da realização: \_\_\_\_\_

- hospital: \_\_\_\_\_

- cirurgião: \_\_\_\_\_

- complicações: \_\_\_\_\_

- controle pós operatório: \_\_\_\_\_

**Radioterapia (RT) externa de próstata:** ( ) não ( ) sim:

- tipo de radiação: \_\_\_\_\_

- radioterapeuta: \_\_\_\_\_

- hospital: \_\_\_\_\_

- dosagens: \_\_\_\_\_

- tempo: \_\_\_\_\_

- intervalos ou frequência: \_\_\_\_\_

- outros: \_\_\_\_\_

**Tratamento hormonal (análogo, antiandrógenos):** ( ) não ( ) sim:

- tipo de medicamento: \_\_\_\_\_

- quando iniciou: \_\_\_\_\_

- dosagem: \_\_\_\_\_

- tempo de tratamento: \_\_\_\_\_

**Outros tratamentos:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Observações:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Anexo V. Relação dos pacientes utilizados na pesquisa, informações demográficas e detalhes sobre os tratamentos os quais foram submetidos, divididos em três grupos (CC, TH+CC e TR+CC) e dois relatos de caso (pacientes 12.1 e 14.4).

PACIENTE	IDADE	FILHOS	ESTADIO	TRATAMENTO.	Data PR	TR Tipo <sup>1</sup>	TR Dose	TR tempo(dias)	TH droga	TH dose	TH tempo(meses)	Orquiectomia
04.1	82	5	LA	CC								05/04/2007
04.4	84	3	M	CC								25/06/2008
04.5	83	10	M	CC								04/06/2008
04.7	71	0	M	CC								07/10/2010
04.8	72	2	M	CC								14/10/2010
04.9	90	14	LA	CC								02/12/2010
04.10	59	1	LA	CC								16/07/2008
10.1	61	6	LA	CC (PR)	12/12/2005							26/05/2008
10.2	77	-	LA	CC (PR)	11/07/2006							23/10/2008
10.3	77	8	LA	CC (PR)	15/09/2009							28/10/2010
10.4	67	2	M	CC (PR)	17/12/2003							02/12/2010
12.2	72	-	M	TH+CC					DES (estrógeno)	-	-	21/05/2007
12.3	72	7	M	TH+CC					Ciproterona	150mg/dia	60 (2002-MAR/2007)	29/03/2007
12.4	84	4	LA	TH+CC					DES (estrógeno)	1mg/dia	7 (JUL/2010-JAN/2011)	20/01/2011
12.5	76	10	M	TH+CC					DES (estrógeno)	2mg/dia	4 (DEZ/2010-MAR/2011)	31/03/2011
13.5	76	-	LA	TH+CC					Ciproterona	150 mg/dia	2 (AGO/SET/2006)	28/09/2006
14.3	65	4	M	TH+CC (PR)	fev/10				Análogo LHRH	-	72(2004-2010)	25/11/2010
11.1	66	5	LA	TR+CC		externa	7200 cGy (40 x 180 cGy)	40(MAR-MAI/2006)				29/05/2008
11.3	77	0	LA	TR+CC		externa	7000 cGy (35 x 200 cGy)	35(AGO-SET/2002)				24/07/2008
11.4	73	-	LA	TR+CC		externa	7200 cGy (36 x 200 cGy)	36(JUL-AGO/2005)				08/05/2007
13.4	85	11	M	(TR+TH)+CC		externa	7200 cGy (36 x 200 cGy)	36 (JAN/FEV/2005)	Análogo LHRH <sup>2</sup> [leuprolida]	-	11 (MAI/08 - ABR/09)	29/04/2009
14.5*	66	0	M	(TR+TH)+CC - (PR)	jan/03	externa	6000 cGy (40 x 150 cGy)	40	Análogo LHRH [leuprolida] + Flutamida + Bicalutamida	-	24 (2007 - 2009)	22/04/2009
12.1	65	-	M	TH+CC					DES (estrógeno)	1 mg/dia	36 (2003-SET 2006)	14/05/2007
14.4	73	5	M	(TR+TH+CC -) (PR)	2000	Externa	-	-	Análogo LHRH + DES	-	48 (2004-2008)	10/07/2008

LA= câncer de próstata localmente avançado; M= câncer de próstata metastático; CC=castração cirúrgica; PR= prostatectomia radical; TH+CC= tratamento hormonal mais castração cirúrgica; TR+CC= tratamento radioterápico mais castração cirúrgica; cGy= centigrays; DES= dietilestilbestrol (estrógeno); LHRH= hormônio liberador de hormônio luteinizante; \* paciente submetido à quimioterapia, (-), não tem informação.

**Anexo VI****Classificação histopatológica do testículo nos diferentes escores.**

Paciente:

Testículo: TD

Técnica de processamento: GMA

Examinador: Reginaldo

**1) Critério de 5 escores:**

<b>5</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
	X			

**2) Critério de Johnsen**

<b>Escores</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>Totais</b>
Nº de túbulos por escore	0	16	7	6	15	13	18	14	16	0	105
NºT x escore	0	144	56	42	90	65	72	42	32	0	Escore médio <b>5,2</b>

Observações:  $543 / 105 = 5,2$ 

**3) Critério de Bergmann** Somatório do nº de túbulos com escores de Johnsen de 8 a 10 / Nº total de túbulos seminíferos contados:  $23 / 105 = 0,21$



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

UFMG

## ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO REGINALDO MARTELLO

Realizou-se, no dia 19 de dezembro de 2013, às 14:00 horas, Faculdade de Medicina - sala 526, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *Efeitos da radioterapia e hormonioterapia na espermatogênese de pacientes com câncer de próstata*, apresentada por REGINALDO MARTELLO, número de registro 2009656231, graduado no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Edson Samesima Tatsuo - Orientador (UFMG), Prof(a). Helio Chiarini Garcia (UFMG), Prof(a). Marcelo Eller Miranda (UFMG), Prof(a). Sidney Glina (FMABC), Prof(a). Fernando Marcos dos Reis (UFMG), Prof(a). Fernando Lorenzini(UFPR).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

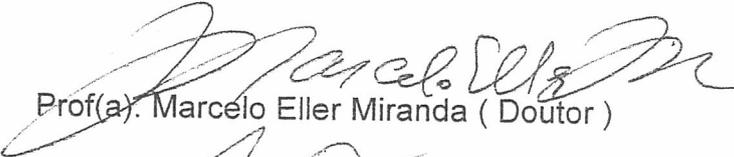
Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2013.

  
Prof(a). Edson Samesima Tatsuo (Doutor)

  
Prof(a). Helio Chiarini Garcia (Doutor)

  
Prof(a). Marcelo Eller Miranda (Doutor)

  
Prof(a). Sidney Glina (Doutor)

  
Prof(a). Fernando Marcos dos Reis (Doutor)

  
Prof(a). Fernando Lorenzini (Doutor)

  
CONFERÊNCIA DE DEFESA DE TESE  
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 radioterapia e hormonioterapia na espermatogênese de pacientes com câncer de próstata

### REGINALDO MARTELLO

Tese 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 Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, área de concentração CICATRIZAÇÃO, linha de pesquisa Estudo

Aprovada em 19 de dezembro de 2013, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Edson Samesima Tatsuo - Orientador

UFMG

Prof(a). Helio Chiarini Garcia

UFMG

Prof(a). Marcelo Eller Miranda

UFMG

Prof(a). Sidney Glina

FMABC

Prof(a). Fernando Marcos dos Reis

UFMG

Prof(a). Fernando Lorenzini

UFPR

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2013.