

Fabiano Condé Araújo

Expressão e localização das proteínas  
c-Fos e receptor de estrogênio beta  
no testículo humano

Belo Horizonte  
Universidade Federal de Minas Gerais  
2006

Fabiano Condé Araújo

## Expressão e localização das proteínas c-Fos e receptor de estrogênio beta no testículo humano

Dissertação apresentada ao curso de Fisiologia e Farmacologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando M. Reis

Co-orientadora: Profa. Dra. Cleida A. Oliveira

Belo Horizonte  
Universidade Federal de Minas Gerais  
2006

043 Araújo, Fabiano Condé.  
A663e Expressão e localização das proteínas c-Fos e receptor de estrogênios beta no testículo humano [manuscrito] / Fabiano Condé Araújo. – 2006. XIII, 46 f.: il.; 29,5cm.

Orientador: Fernando M. Reis. Co-orientadora: Cleida A. Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Fisiologia e Biofísica.

1. Proteínas proto-oncogênicas c-Fos. 2. Estrogênios – receptores - Teses. 3. Testículos – Teses. I. Reis, Fernando M. II. Oliveira, Cleida A. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Fisiologia e Biofísica. IV. Título.

CDU: 612

# EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS C-FOS E RECEPTOR DE ESTROGÊNIO BETA NO TESTÍCULO HUMANO

FABIANO CONDÉ ARAUJO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 01 de setembro de 2006, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROFA. DRA. POLI MARA SPRITZER



PROF. DR. ANDERSON JOSÉ FERREIRA



PROFA. DRA. CLEIDA APARECIDA DE OLIVEIRA  
CO-ORIENTADORA



PROF. DR. FERNANDO MARCOS DOS REIS  
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 01 de SETEMBRO de 2006.

Este trabalho foi realizado no laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do Departamento de Fisiologia e Biofísica e no laboratório de Biologia da Reprodução do Departamento de Morfologia, ambos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio Financeiro: CAPES e CNPq

Dedico esta vitória a Deus,  
aos 12 voluntários,  
aos meus queridos pais e irmãos,  
à minha insubstituível Helen  
e aos meus grandes professores e orientadores:  
Fernando e Cleida.

## **AGRADECIMENTOS**

DEUS, obrigado por tudo o que o Senhor me concedeu nestes dois anos. Não poderia ser melhor.

FERNANDO E CLEIDA, esses nomes já estão marcados para sempre na minha memória. Como aprendi com estas duas pessoas maravilhosas, fontes inesgotáveis de conhecimento e sempre dispostas a ajudar. Não tenho como agradecer tamanho apoio e sim me desculpar se em algum momento não correspondi as vossas expectativas. OBRIGADO.

À uma pessoa muito especial que Deus colocou no meu caminho e que tornou a minha vida ainda mais bela: HELEN. Você é a testemunha que eu pedi ao Senhor e sou muito grato a tudo o que você trouxe para a minha vida. TE AMO.

Aos meus PAIS que sempre me ajudaram a enfrentar as dificuldades e desafios que o mestrado nos proporciona, MUITO OBRIGADO, vocês são TUDO para mim.

Aos meus IRMÃOS E CUNHADOS também sempre presentes nos bons e maus momentos, sempre dispostos a me distrair e ajudar.

Ao Dr. Augusto, o urologista responsável por toda a coleta e processamento inicial dos testículos humanos. MUITO OBRIGADO Augusto, sua colaboração foi essencial para a realização deste trabalho.

Aos professores Adelina, Cândido, Germán e Umeko pela acolhida, conselhos e amizade, tão importantes durante este período repleto de dúvidas e angústias.

Aos meus ETERNOS AMIGOS, tão valiosos que não sei por onde começar. Talvez por ordem alfabética...

Alécio...companheiro eterno na busca do elo perdido!!! E ele estava a uma porta...

Adaliene e Biru, excelentes companhias e sempre animados.

André, o amigo tecnológico! Sempre presente nos maiores entraves computacionais.

Marcinha, essa é muito especial pois me levou de volta ao maravilhoso mundo das bicicletas (como sou grato por isso, ela não imagina o tanto).

Ricardo, o cabra-macho do nordeste, também GRANDE amigo tanto cientificamente quanto socialmente.

Estes foram os amigos mais presentes, mas claro que eu não poderia deixar de citar aqueles que sempre estiveram em contato comigo e que de alguma forma também ajudaram: Alex, Ana Cristina, Ana Luiza, Daniel, Daniela, Éder, Gregório, Janine, João Vaz, Laura, Márcia, Marcivane, Najara, Patricia, Priscila, Renato e Virginia.

Aos amigos Anna Bolivar, André, Carolina, Fernanda, Mariana, Patrícia, Polyanna e Rubem, do Laboratório de Morfologia de Aves e Biologia da Reprodução, pela ajuda incondicional nos momentos necessários.

E finalmente, aos amigos da Escola de Educação Física que embora não tenham participado diretamente da elaboração desta dissertação, compartilharam da minha formação acadêmica.

*"É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

## SUMÁRIO

|   |      |
|---|------|
| RESUMO.....   | ix   |
| ABSTRACT .....  | x    |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....                                  | xi   |
| LISTA DE TABELAS .....                                      | xii  |
| LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS .....                         | xiii |
| 1 Introdução .....  | 1    |
| 2 Objetivos .....   | 5    |
| 3 Material e métodos.....                                   | 6    |
| 3.1 Delineamento experimental .....                         | 6    |
| 3.2 Considerações Éticas .....                              | 6    |
| 3.3 Pacientes .....   | 6    |
| 3.4 Orquiectomia bilateral .....                            | 7    |
| 3.5 Processamento das amostras após coleta do material..... | 8    |
| 3.6 Histologia e imuno-histoquímica.....                    | 8    |
| 3.6.1 Preparo das lâminas.....                              | 8    |
| 3.6.2 Inclusão e microtomia .....                           | 9    |
| 3.6.3 Imuno-histoquímica .....                              | 9    |
| 3.6.4 Coloração para c-Fos.....                             | 12   |
| 3.6.5 Coloração para ER-beta.....                           | 13   |
| 3.6.6 Leitura das lâminas.....                              | 13   |
| 3.7 Avaliação da Expressão Gênica por RT-PCR .....          | 16   |
| 3.7.1 Extração e quantificação do RNA.....                  | 16   |
| 3.7.2 Síntese do cDNA .....                                 | 17   |
| 3.7.3 Oligonucleotídeos Específicos .....                   | 18   |
| 3.7.4 Protocolo da PCR.....                                 | 19   |
| 3.7.5 Programação dos ciclos da PCR.....                    | 20   |
| 3.7.6 Controles de especificidade.....                      | 20   |
| 3.7.7 Eletroforese dos produtos da PCR .....                | 21   |

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 4   | Resultados .....   | 23 |
| 4.1 | Expressão do c-fos .....   | 23 |
| 4.2 | Imunolocalização da proteína c-Fos .....                           | 25 |
| 4.3 | Imunolocalização da proteína c-Fos fosforilada.....                | 27 |
| 4.4 | Imunolocalização do receptor de estrogênio beta.....               | 29 |
| 5   | Discussão.....   | 32 |
| 5.1 | Expressão do c-fos.....  | 32 |
| 5.2 | Imunolocalização da proteína c-Fos .....                           | 32 |
| 5.3 | Imunolocalização do receptor de estrogênio beta.....               | 35 |
| 5.4 | Proteína c-Fos e receptor de estrogênio beta.....                  | 36 |
| 6   | Conclusões .....   | 37 |
| 7   | Referências .....  | 38 |
|     | Anexo A – Parecer da Comissão de Ética.....                        | 43 |
|     | Apêndice A - Formulário de consentimento livre e esclarecido ..... | 45 |

## RESUMO

Os testículos são glândulas com função endócrina e exócrina, sendo que esta última se caracteriza pela formação de gametas masculinos, ou seja, a espermatogênese. Esta se encontra sob a influência de um complexo sistema de sinalização endócrina (sistêmica e parácrina). Considerando uma possível inter-relação entre as proteínas c-Fos e receptor de estrogênios beta (ER-beta), este trabalho verificou a expressão do proto-oncogene *c-fos* e a imunolocalização das proteínas c-Fos, c-Fos fosforilada e ER-beta no parênquima testicular humano. A amostra foi constituída por 12 homens férteis, portadores de adenocarcinoma prostático, com indicação terapêutica de bloqueio hormonal cirúrgico pela orquiectomia. Nenhum destes havia sido previamente submetido a tratamento hormonal, quimioterapia ou radioterapia. O material foi processado para o estudo imunohistoquímico com o método da avidina-biotina-peroxidase e avaliação da expressão gênica por transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). A expressão do proto-oncogene *c-fos* foi comprovada no testículo humano, e as proteínas c-Fos e c-Fos fosforilada foram localizadas principalmente no epitélio seminífero, tanto nas células germinativas (espermatogônias, espermátocitos e espermátides) quanto nas células de Sertoli. O ER-beta foi expresso principalmente em células somáticas (células de Leydig, Sertoli e mióides). A distribuição encontrada das proteínas c-Fos e ER-beta nos permite supor uma inter-relação entre estas; seja pela ação estrogênica na célula de Sertoli, induzindo a expressão local de *c-fos*, seja indiretamente, pelos efeitos que o estímulo estrogênico sobre as células somáticas poderia ter sobre a expressão de *c-fos* no epitélio germinativo.

## ABSTRACT

The testes are glands with endocrine and exocrine functions, the latter being characterized by sperm formation, or spermatogenesis. This is under the control of a complex system involving endocrine and paracrine signalization. In view of an interrelationship between the expression of c-Fos and estrogen receptor beta (ERbeta) proteins, this investigation evaluated the expression of the protooncogene *c-fos* and the immunolocalization of c-Fos, phosphorylated c-Fos and ERbeta proteins in the human testis. Testis tissue was obtained from 12 men undergoing orchiectomy as a treatment for prostate cancer. These patients had received no hormonal, chemo or radiation therapy before the operations. Tissues were stained by immunohistochemistry using the avidin-biotin-peroxidase method, and *c-fos* RNAm expression was assessed with reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The protooncogene *c-fos* was expressed in the human testis and both forms of c-Fos proteins were immunoreactive, mainly in germ cells (spermatogonia, spermatocytes and spermatids) and Sertoli cells. ERbeta was primarily present in somatic cells (Leydig, Sertoli and myofibrillar cells). Based on these results, we hypothesized two mechanisms for estrogen actions over spermatogenesis. The first would be mediated by Sertoli cells, where estrogens could alter either gene expression or the transcriptional activity of c-Fos protein. The other is an indirect mechanism, representing the interrelationship between somatic and germ cells. Somatic cells, under estrogen influence, could modify germ cell functions by paracrine/juxtacrine factors, which would change gene expression or the transcriptional activity of c-Fos protein.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 1 – Representação esquemática do princípio da imunohistoquímica pelo método da avidina-biotina-peroxidase.....    | 11 |
| FIGURA 2 – Composição celular e topografia das seis associações típicas encontradas nos túbulos seminíferos humanos..... | 15 |
| FIGURA 3 – RT-PCR do <i>c-fos</i> no testículo humano.....   | 23 |
| FIGURA 4 – Digestão por enzima de restrição do produto da RT-PCR para <i>c-fos</i> no testículo humano.....              | 24 |
| FIGURA 5 – Expressão imunohistoquímica da proteína c-Fos em tecido testicular humano.....                                | 26 |
| FIGURA 6 – Expressão imunohistoquímica da proteína c-Fos fosforilada em tecido testicular humano.....                    | 28 |
| FIGURA 7 – Expressão imunohistoquímica da proteína ER-beta em tecido testicular humano.....                              | 30 |
| QUADRO 1 – Características dos iniciadores sintetizados para a amplificação do proto-oncogene <i>c-fos</i> .....         | 18 |
| QUADRO 2 – Resumo do protocolo de PCR para amplificação de cDNA  | 19 |
| QUADRO 3 – Programação adotada para os ciclos de PCR.....  | 20 |
| QUADRO 4 – Volumes dos reagentes e substratos utilizados na digestão   | 21 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| TABELA 1 – Pacientes submetidos à orquiectomia.....  | 7  |
| TABELA 2 – Codificação dos tipos celulares analisados no túbulo seminífero e compartimento intertubular do testículo humano..... | 16 |
| TABELA 3 – Sumário da imunolocalização das proteínas c-Fos, c-Fos fosforilada e ER-beta no testículo humano.....                 | 31 |

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

|           |  |
|-----------|--|
| ABC       | complexo avidina-biotina-peroxidase                                |
| ABP       | proteína ligadora a andrógenos                                     |
| Água DEPC | água tratada com dietilpirocarbonato                               |
| Água SF   | água estéril filtrada  |
| AP-1      | proteína ativadora   |
| AR        | receptor de androgênios  |
| DAB       | 3,3'-diaminobenzedina  |
| ER-beta   | receptor de estrogênio beta  |
| ERKs      | proteínas com atividade cinase sobre os resíduos serina / treonina |
| FSH       | hormônio folículo estimulante                                      |
| GnRH      | hormônio liberador de gonadotrofinas                               |
| IgG       | imunoglobulina G   |
| LH        | hormônio luteinizante  |
| RNAm      | ácido ribonucléico mensageiro                                      |
| NP        | não pesado   |
| PBS       | tampão fosfato-salina  |
| PCR       | reação em cadeia da polimerase                                     |
| PDGF      | fator de crescimento derivado de plaquetas                         |
| PVPI      | solução de polivinilpirrolidona iodo                               |
| RBF-1     | fator de ligação ao receptor esteróide                             |
| RNA       | ácido ribonucleico   |
| RT        | transcrição reversa  |
| SRE       | elemento responsivo aos esteróides                                 |
| TBE       | tampão de corrida (Tris; ácido bórico e EDTA)                      |
| Tm        | temperatura de fusão   |
| TEMED     | agente polimerizante (N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina)           |
| UFMG      | Universidade Federal de Minas Gerais                               |

## 1. Introdução

Os testículos são glândulas com função endócrina e exócrina, sendo que esta última se caracteriza pela formação de gametas masculinos, ou seja, a espermatogênese. Esta pode ser dividida em três fases (Russell *et al.*, 1990): 1) Fase proliferativa ou espermatogonial, quando as espermatogônias passam por rápidas e sucessivas divisões. Nesta etapa, grupos contíguos de espermatogônias começam o processo de diferenciação simultaneamente, resultando em certas associações típicas nos túbulos seminíferos (Clermont, 1963); 2) Fase meiótica ou espermatocitogênica, quando o material genético dos espermatócitos é recombinado e segregado após as duas divisões meióticas e 3) Fase de diferenciação ou espermiogênica. Esta etapa consiste na transformação de espermatídes arredondadas em espermatozóides maduros. Isso se dá pelo reposicionamento do núcleo da célula, que passa do centro para uma das extremidades, onde surgirá a cabeça do espermatozóide, e também pelo aparecimento do flagelo (Griffin e Ojeda, 2004).

A transformação celular desde o espermatócito até o espermatozóide móvel leva cerca de 70 dias no homem e é seguida pelo amadurecimento dos espermatozóides durante seu trajeto pelo epidídimo até os ductos ejaculatórios, ao longo de outros 14 dias. Nessa fase, o espermatozóide adquire o máximo de motilidade e torna-se capaz de fecundar (Griffin e Ojeda, 2004).

O controle da espermatogênese ocorre na dependência de uma completa harmonia dos fatores produzidos no eixo hipotálamo-hipófise-testículos. Esses fatores agem direta ou indiretamente sobre o testículo, por via endócrina (GnRH, LH, FSH, inibina, testosterona e outros esteróides sexuais) (Mclachlan *et al.*, 1996) e parácrina (fatores de crescimento, peptídeos regulatórios, esteróides sexuais) (Huleihel e Lunenfeld, 2004).

A testosterona e seus metabólitos (diidrotestosterona e estradiol) influenciam todas as etapas da função reprodutiva masculina (Holdcraft e Braun, 2004). A testosterona e a diidrotestosterona, por intermédio do receptor de androgênios (AR), são os principais responsáveis pelos processos de

diferenciação e maturação sexuais, desenvolvimento de caracteres sexuais masculinos secundários e promoção e manutenção da espermatogênese normal. Os estrogênios, por outro lado, estão envolvidos no desenvolvimento testicular embrionário, crescimento e atividade da próstata no adulto, e regulação da secreção de gonadotrofinas e hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (Griffin e Ojeda, 2004).

Os receptores estrogênicos (ER), ER-alfa e ER-beta, estão presentes nos testículos, ductos eferentes e epidídimo de muitas espécies (Hess, 2004), no entanto, o ER-alfa é descrito como ausente no parênquima testicular de algumas espécies, incluindo o homem (Saunders *et al.*, 2002). O ER-alfa é abundante no epitélio dos ductos eferentes e sua função primária é regular a expressão de proteínas envolvidas na reabsorção de fluidos e transporte de íons. Além disso, ele também é responsável por manter a morfologia epitelial diferenciada dos ductos eferentes (Hess, 2004). O ER-beta foi originalmente descoberto na próstata de ratos (Kuiper *et al.*, 1996), mas atualmente ele já foi descrito no tecido epitelial e estroma do sistema reprodutor masculino (Hess, 2004). A expressão do ER-beta no parênquima testicular humano ocorre praticamente em todos os tipos celulares do interstício e túbulo seminífero, com exceção das espermátides alongadas (Makinen *et al.*, 2001; Saunders *et al.*, 2002; Gaskell *et al.*, 2003; Aschim *et al.*, 2004; Shapiro *et al.*, 2005). Ainda não se sabe a função deste receptor no sistema reprodutor masculino, pois camundongos *knockout* para o ER-beta são férteis e parecem ter testículo e epidídimo normais (Krege *et al.*, 1998).

Enquanto o papel central exercido pelas gonadotrofinas e pela testosterona no controle da espermatogênese encontra-se bem definido, o conhecimento atual é muito mais limitado quanto ao papel dos estrogênios e de fatores celulares intrínsecos. Entre estes, destacam-se os proto-oncogenes de expressão imediata, envolvidos nos processos de diferenciação (Muller e Wagner, 1984) e proliferação celular (Holt *et al.*, 1986).

Os proto-oncogenes apresentam seqüência gênica homóloga aquela presente em alguns retrovírus. Estes retrovírus são capazes de induzir

transformação neoplásica em células de mamíferos, após a introdução de seqüência gênica mutante que guarda estreita semelhança com genes nativos do hospedeiro. Esses fragmentos virais são denominados oncogenes (*v-onc*) e seus homólogos celulares normais são chamados proto-oncogenes (*c-onc*). Rápidas induções do proto-oncogene *c-fos*, em variados tipos celulares após diferentes tipos de estímulos (Morgan e Curran, 1986; Hunt *et al.*, 1987; Morgan *et al.*, 1987), sugerem o envolvimento deste no processamento, a curto prazo, de informações celulares a nível nuclear. Além disso, foi observado que a expressão do proto-oncogene *c-fos* encontra-se aumentada em tumores malignos do colo do útero (Cheung *et al.*, 1997), da mama (Walker e Cowl, 1991) e dos ossos (Wu *et al.*, 1990).

O proto-oncogene nuclear *c-fos* demonstrou ser necessário para a espermatogênese. Johnson e colaboradores (1992) observaram espermatogênese atrasada ou nula em camundongos mutantes homozigóticos no locus do *c-fos*. No testículo de mamíferos, alguns proto-oncogenes, incluindo o *c-fos*, apresentam atividade estágio-específica durante a diferenciação de células germinativas (Kierszenbaum, 1994). Existe atividade *jun* e *fos* no interstício do parênquima testicular (Hall *et al.*, 1991), compartimentos germinativos (Norton e Skinner, 1992) e particularmente em células pré-meióticas (Kierszenbaum, 1994); mas produtos do *c-fos* também podem estar presentes em células germinativas, compreendendo desde espermatogônias até espermátides (Cohen *et al.*, 1993).

Em 1983, Spelsberg *et al.* (1983) propuseram um mecanismo de ação em cascata dos esteróides. Segundo este modelo, após a ligação do esteróide ao seu receptor nuclear específico, o complexo esteróide-receptor se liga aos elementos responsivos aos esteróides (SREs), presentes na região promotora dos genes alvos. Os proto-oncogenes ou genes regulatórios são alguns dos primeiros genes a terem sua expressão alterada. No caso do gene *c-fos* humano, existe um elemento responsivo ao estrogênio (ERE) inserido na sua região reguladora (Weisz e Rosales, 1990). O produto desta expressão irá então se ligar, com ou sem a presença do complexo esteróide-receptor (Gaub *et al.*, 1990; Weisz e Rosales, 1990), à região promotora de genes estruturais, alterando expressão

destes. Sabe-se que membros das famílias fos e jun formam uma proteína ativadora (AP-1), a qual irá se ligar ao DNA e agir como um fator de transcrição (Pfahl, 1993). Isso explicaria a resposta tardia da ação dos esteróides na regulação da atividade transcricional celular.

Kousteni e colaboradores (2003) descreveram que é possível ocorrer ativação, via interação estrogênio-receptor, de proteínas cinases com atividade sobre os resíduos de serina e/ou treonina (ERKs) que seriam responsáveis pela fosforilação da proteína c-Fos. Este mecanismo é independente das ações genômicas clássicas dos receptores esteróides (Kousteni *et al.*, 2003). A fosforilação da proteína c-Fos, via ERKs, é essencial para a ação mitogênica dos fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) em fibroblastos de camundongos. A fosforilação da proteína c-Fos no seu domínio de transativação resulta em aumento da atividade transcricional (Monje *et al.*, 2003). Informação sobre a localização da proteína c-Fos fosforilada no testículo humano não foi relatada na literatura.

Investigações dos proto-oncogenes com relação à atividade testicular e possíveis interações com hormônios esteróides têm sido restritas a ratos e camundongos (Schuchard *et al.*, 1993; Subramaniam *et al.*, 1993) ou a estudos *in vitro* que provavelmente não representam um ambiente fisiológico (Cobellis *et al.*, 1997). O estudo *in vivo* da expressão do proto-oncogene *c-fos*, e a presença e distribuição das proteínas c-Fos e ER-beta nos vários tipos celulares do parênquima testicular, poderá contribuir para o melhor entendimento da fisiologia testicular humana.

## **2. Objetivos**

São objetivos deste trabalho:

- 1 Verificar a expressão do proto-oncogene *c-fos* no testículo humano.
- 2 Descrever a imunorreatividade das proteínas c-Fos, c-Fos fosforilada e receptor de estrogênio beta (ER-beta) no parênquima testicular.

### **3. Material e métodos**

#### **3.1. Delineamento experimental**

Estudo descritivo (homens férteis).

Principal desfecho: Determinação da expressão e imunolocalização das proteínas c-Fos e c-Fos fosforilada e do receptor de estrogênio beta (ER-beta) no testículo humano.

#### **3.2. Considerações Éticas**

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (Parecer nº ETIC 032/04, Anexo A) e pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia da UFMG (25/05/04). Os pacientes foram informados sobre o objetivo do estudo e assinaram um termo de consentimento (Apêndice A).

#### **3.3. Pacientes**

Participaram da pesquisa 12 homens férteis com paternidade comprovada e portadores de adenocarcinoma prostático, com indicação terapêutica de bloqueio hormonal cirúrgico pela orquiectomia (TABELA 1). Nenhum paciente havia sido previamente submetido a tratamento hormonal, quimioterapia ou radioterapia.

**TABELA 1**

Pacientes submetidos à orquiectomia

| Pacientes      | Peso do testículo (g) |            | Idade (anos) |
|----------------|-----------------------|------------|--------------|
|                | Direito               | Esquerdo   |              |
| 1              | NP                    | NP         | 65           |
| 2              | NP                    | NP         | 64           |
| 3              | 9,8                   | NP         | 69           |
| 4              | 10,1                  | 9,3        | 74           |
| 5              | 6,9                   | 4,3        | 86           |
| 6              | 5,6                   | 3,4*       | -            |
| 7              | 12,1                  | 11,0       | 71           |
| 8              | 10,2                  | 5,1        | 89           |
| 9              | 10,4                  | 10,2       | 74           |
| 10             | NP                    | NP         | 77           |
| 11             | NP                    | NP         | 72           |
| 12             | 10,9                  | 8,0        | 91           |
| <b>mediana</b> | <b>10,15</b>          | <b>8,0</b> | <b>74</b>    |

NP: não pesado. \* Paciente 6 apresentou orquite por paromixovírus na adolescência.

### 3.4. Orquiectomia bilateral

A técnica adotada foi a de orquiectomia subcapsular. Inicialmente, fez-se o bloqueio anestésico regional por punção raquimedular da espinha dorsal na altura da crista ilíaca (L3), com infiltração de 3 ml de solução de bupivacaína 0,5%. Com o paciente na posição de decúbito dorsal, foram realizadas a degermação da pele de toda a região genital com solução PVPI (polivinilpirrolidona iodo) degermante e anti-sepsia da mesma com tintura de PVPI. Iniciou-se o procedimento cirúrgico por uma incisão escrotal de aproximadamente 4,0 cm na região da rafe, 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 albugínea aberta da extremidade cranial à caudal. Todo o parênquima testicular exposto foi completamente liberado da albugínea com auxílio de uma gaze,

sendo seccionado com bisturi na altura da rede testicular (nesse tempo cirúrgico novamente foi realizada hemostasia com auxílio do eletrocautério). A albugínea foi suturada com fio *cat gut* 2-0 provendo a sua hemostasia; o mesmo fio foi usado na rafia dos outros planos separadamente até a pele. O mesmo procedimento foi adotado no testículo contralateral.

### **3.5. Processamento das amostras após coleta do material**

Imediatamente após a orquiectomia, uma pequena parte do parênquima de cada testículo foi fixada durante 15 minutos em solução de Bouin e, a seguir, estocados em etanol a 70% em frascos separados e identificados individualmente como testículo esquerdo e direito do mesmo paciente. Uma parte desse material foi separada para a realização do estudo e a outra foi enviada ao laboratório de Anatomia Patológica da UFMG para diagnóstico histológico feito por um único patologista. Após o processamento e inclusão do material em blocos de parafina, lâminas histológicas com cortes de cada testículo foram preparadas, identificadas e coradas com hematoxilina-eosina para avaliação do patologista.

Uma outra parte do material foi utilizada para extração de RNA total visando avaliar a expressão gênica do *c-fos*, por meio da técnica de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). A coleta do tecido foi realizada seguindo os cuidados básicos recomendados para ensaios de biologia molecular, como uso de material estéril, luvas e rápido congelamento das amostras em nitrogênio líquido. Os tecidos foram conservados a -80 °C até o momento da extração do RNA.

### **3.6. Histologia e imuno-histoquímica**

#### **3.6.1. Preparo das lâminas**

As lâminas de vidro foram inicialmente lavadas com detergente, enxaguadas em água corrente e secadas na estufa a 60°C. Depois foram imersas

em uma série de acetona absoluta, solução de 3-aminopropiltriétoxissilano (Sigma Chem. Co., St. Louis MO, USA) diluído a 2% em acetona e, novamente, duas acetonas absolutas. Após cada imersão esperava-se a secagem total da lâmina. Estas eram guardadas em uma caixa para lâminas na estufa a 45°C até o momento de uso dos cortes.

### **3.6.2. Inclusão e microtomia**

As amostras fixadas em solução de Bouin foram desidratadas em etanol a concentrações crescentes, variando de 70 a 99,3% (60 minutos cada), depois imersas em xilol (2 x 60 minutos) e em parafina a 60°C (2 banhos). A seguir, os fragmentos foram incluídos em blocos de parafina e deixados por pelo menos 24 horas para solidificar. Os blocos foram resfriados até aproximadamente -10°C e seccionados num micrótomo em cortes de 4µm de espessura que, após serem dispostos num banho aquecido, foram cuidadosamente transferidos para as lâminas de vidro silanizadas. A seguir, essas lâminas foram aquecidas em estufa de 37°C por 24 horas para secagem e melhor fixação dos cortes histológicos.

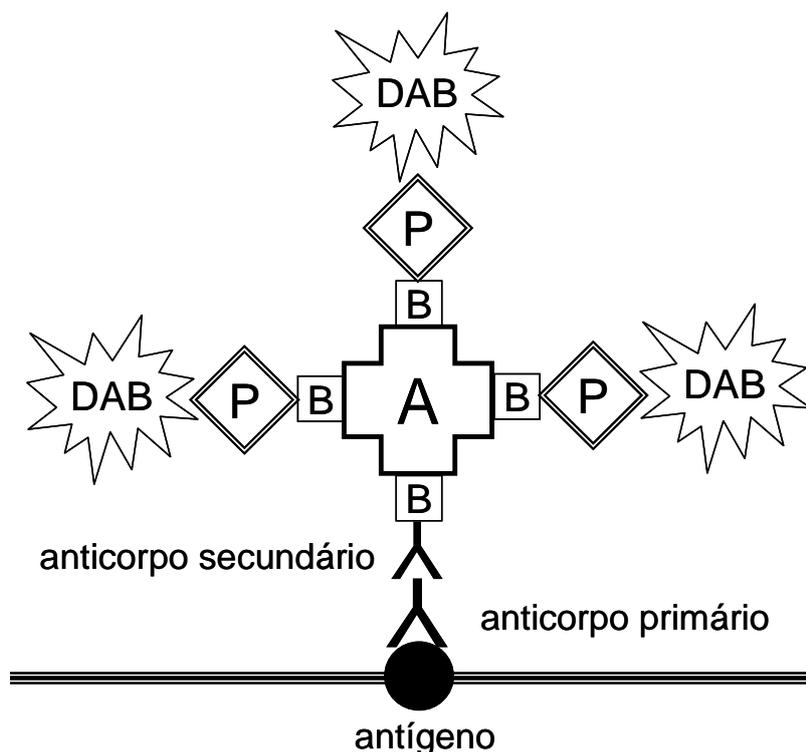
### **3.6.3. Imuno-histoquímica**

O método imuno-histoquímico utilizado foi o da avidina-biotina-peroxidase. Essa técnica é fundamentada na grande afinidade da avidina (glicoprotéina de alto peso molecular) pela biotina (vitamina que pode ser conjugada a enzimas, anticorpos e substâncias fluorescentes). O tecido é incubado com um anticorpo primário (mono ou policlonal) específico para a proteína ou peptídeo em estudo. Em seguida, aplica-se o anticorpo secundário (que tem o anticorpo primário como alvo) previamente ligado a uma molécula de biotina. Ao final, o tecido é incubado em uma solução contendo o complexo macromolecular formado por avidina e biotina complexada com peroxidase (complexo avidina-biotina-peroxidase ou ABC). A avidina presente neste complexo atua como amplificador de efeito, pois cada uma de suas moléculas que se acopla à biotina do anticorpo secundário liga-se simultaneamente a três

outras moléculas de biotina conjugadas à peroxidase do complexo ABC. A peroxidase age sobre um substrato, o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma Chem. Co., St. Louis MO, USA), catalizando a reação deste com o peróxido de hidrogênio, formando um produto insolúvel, corado em tonalidade amarronzada, que pode ser visualizado ao microscópio de luz. Desta forma, os sítios antigênicos presentes nos tecidos são localizados indiretamente pela visualização deste produto de reação do anticorpo primário-anticorpo secundário-complexo peroxidase que se precipita no local onde se encontra o antígeno.

A seguir serão descritas as etapas básicas da técnica da avidina-biotina-peroxidase padronizada por Hsu *et al* (1981) e modificada por Oliveira *et al* (2002), as quais foram seguidas no presente estudo.

Os cortes foram desparafinizados em xilol (3 incubações de 10 minutos) e re-hidratados em concentrações decrescentes de etanol que variaram de 99,3% a 70%, sendo finalmente imersos por 5 minutos em água corrente. A etapa seguinte foi a inibição da peroxidase endógena a fim de evitar sua reação com o substrato fora dos sítios antigênicos específicos. Para isso, os cortes foram incubados por 30 min em uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,6% em metanol e depois lavados em tampão fosfato-salina (PBS) por 10 minutos. A terceira etapa foi a recuperação antigênica, onde os cortes, mergulhados em solução de tampão citrato 0,01M e pH 6,0, foram aquecidos em microondas (Eletrolux ME27F) durante 4 intervalos de 5 minutos a 70% da potência máxima. Após resfriamento e lavagem em PBS, fez-se pré-tratamento dos tecidos com avidina seguida de biotina (Vector Blocking kit, Vector, Burlingame, CA), para evitar ligação inespecífica dos componentes do complexo ABC. Seguiu-se a incubação dos cortes durante 60 minutos com soro normal de cabra (conforme a origem do anticorpo secundário) com o objetivo de ocupar os sítios antigênicos inespecíficos e favorecer a ligação do anticorpo secundário biotilado ao seu antígeno alvo, que é o anticorpo primário (FIG. 1).



**FIGURA 1** - Representação esquemática do princípio da imuno-histoquímica pelo método da avidina-biotina-peroxidase. Observa-se o efeito amplificador da avidina (A) que se liga à biotina (B) do anticorpo secundário e a outras três moléculas de biotina do complexo ABC. A peroxidase (P) reage com a 3,3'-diaminobenzidina (DAB) corando os sítios antigênicos.

Fonte: REIS, 1998, p. 38.

A etapa seguinte foi a incubação dos cortes com o anticorpo primário, específico para o antígeno pesquisado. O anticorpo foi diluído em PBS numa proporção variável, ajustada para cada protocolo. Nesta etapa os cortes foram cobertos com aproximadamente 50  $\mu$ l da solução do anticorpo. Para que não houvesse evaporação e ressecamento dos cortes, esta incubação - cuja duração e temperatura também exigiram ajuste prévio - foi feita com as lâminas dispostas numa câmara úmida. A câmara que utilizamos consistiu em uma caixa plástica retangular rasa, forrada com papel umedecido em água destilada.

Findo o tempo de incubação com o anticorpo primário, removia-se o excedente mergulhando as lâminas em dois banhos de PBS de 30 min cada e passava-se a incubação com o anticorpo secundário biotinizado. Diluiu-se o anticorpo secundário em PBS na proporção de 1:50 e aplicaram-se 50  $\mu$ l da

solução sobre os cortes, que foram incubados à temperatura ambiente por 60 minutos .

Terminada a incubação e removido o excedente de anticorpo secundário ao longo de 10 minutos em PBS, passamos à próxima etapa que foi a incubação dos cortes por 60 minutos com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain<sup>®</sup> ABC kit, Vector, Burlingame, CA, USA). As soluções de estoque de avidina (solução A) e biotina + peroxidase (solução B) foram associadas e diluídas em PBS (1:200 cada) cerca de 30 minutos antes da incubação.

Finalmente, após nova incubação de 10 minutos em PBS, os cortes foram corados por uma solução de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma Chem. Co., St. Louis MO, USA) e peróxido de hidrogênio (0,01%) em tampão Tris-HCl, 0,05M, pH 7.6, preparada momentos antes e mantida ao abrigo da luz. Os cortes foram mergulhados nesta solução durante o tempo necessário para desenvolver a imunocoloração e a seguir eles foram imersos em água destilada para interromper a reação.

Concluída a imunocoloração, os cortes foram submetidos a uma discreta contra-coloração com hematoxilina de Mayer (Sigma Chem. Co., St. Louis MO, USA), e desidratados em concentrações crescentes de etanol, variando de 70 a 99,3%, sendo finalmente imersos em xilol e montados com lamínula e Entellan<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt, Germany).

#### **3.6.4. Coloração para c-Fos**

Por se tratar de uma proteína nuclear, a exposição dos sítios antigênicos de c-Fos exigiu aquecimento dos cortes durante 4 intervalos de 5 minutos a 70% da potência máxima do aparelho de microondas. Foram utilizados dois anticorpos: o anticorpo policlonal anti-proteína c-Fos humana produzido em coelho pela Calbiochem (Darmstadt, Germany) e o anticorpo policlonal anti-proteína c-Fos humana fosforilada na treonina da posição 232, sendo esse último produzido em coelho pela Abcam (Cambridge, UK). Com base em uma curva de diluição prévia, as amostras foram incubadas com o anticorpo primário na concentração

de 1:80 durante 48 horas a 4°C. Como controle negativo, cortes de testículo foram simultaneamente incubados com soro normal de cabra a 1:10. A imunoglobulina biotinizada anti-IgG de coelho, produzida em cabra (Dako Corporation, Carpinteria, CA), foi utilizada a 1:50 durante 60 minutos à temperatura ambiente.

### **3.6.5. Coloração para ER-beta**

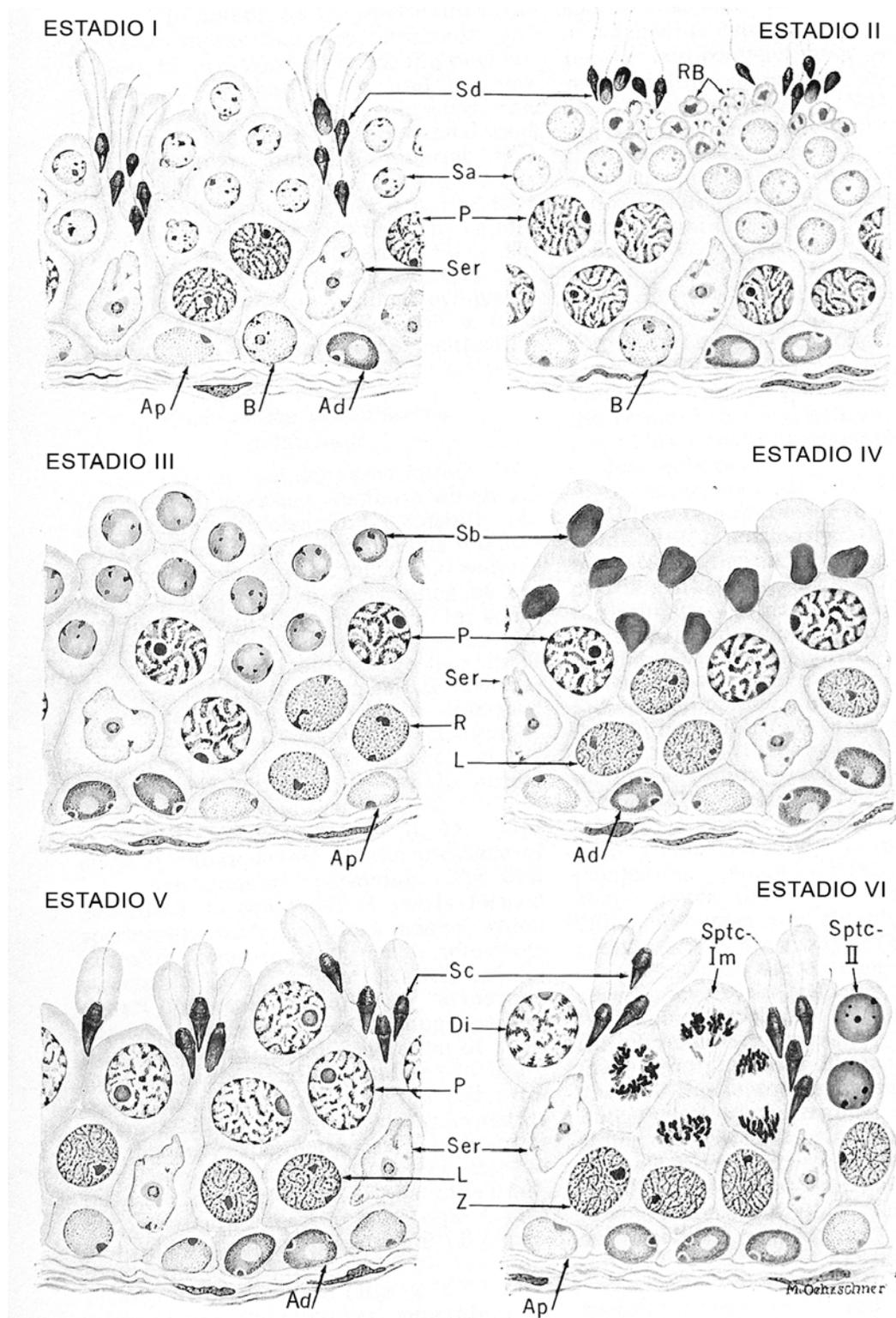
Como o ER-beta também é uma proteína nuclear, a exposição antigênica foi realizada nos mesmos parâmetros descritos para a coloração do c-Fos. Foi utilizado o anticorpo policlonal anti-proteína ER-beta humana (*wild type*) produzido em camundongo pela Novocastra Laboratories (Newcastle, UK). Com base na curva de diluição prévia, as amostras foram incubadas com o anticorpo primário na concentração 1:25 durante 48 horas, à temperatura de 4°C. O controle negativo consistiu em cortes de testículo incubados com soro de cabra não imunizada. O anticorpo secundário biotinizado anti-IgG de camundongo produzido em cabra (Dako Corporation, Carpinteria, CA), foi diluído a 1:50 e incubado durante 60 minutos à temperatura ambiente.

### **3.6.6. Leitura das lâminas**

As lâminas foram examinadas sempre ao mesmo microscópio e com a mesma intensidade de luz, utilizando-se objetiva de 40x. A coloração nuclear para c-Fos e ER-beta permitiu distinguir células positivas e negativas. A intensidade da imunocoloração foi classificada como ausente, predominantemente negativa, predominantemente positiva ou sempre positiva. Os controles negativos foram utilizados para, comparativamente, detectar se houve coloração inespecífica. Para aumentar a confiabilidade, a leitura das lâminas foi feita por dois pesquisadores independentes com posterior confrontação dos resultados.

A identificação das células dos túbulos seminíferos foi feita de acordo com a classificação proposta por Clermont (1963; FIG. 2). Devido ao fato dos

métodos de fixação e inclusão adotados neste trabalho não serem os ideais para uma classificação morfológica, houve limitações que impediram um detalhamento maior dos tipos celulares presentes na espermatogênese. Desta forma, adotou-se uma categorização mais simplificada em relação a original. A TABELA 2 apresenta a codificação adotada para a análise dos tipos celulares analisados.



**FIGURA 2** – Composição celular e topografia das seis associações típicas encontradas nos túbulos seminíferos humanos. Ser = célula de Sertoli; Ap, Ad e B = espermatogônias; L, R, P, Z, Di, Sptc Im e Sptc II = espermatócitos; Sa = espermátide tipo A; Sb = espermátide tipo B; Sc = espermátide tipo C; Sd = espermátide tipo D e RB = corpos residuais.

Fonte: CLERMONT, 1963, p. 3.

**TABELA 2**

Codificação dos tipos celulares analisados no túbulo seminífero e compartimento intertubular do testículo humano

| <b>Código</b> | <b>Tipo celular</b>                              |
|---------------|--|
| 1             | Célula de Leydig                                 |
| 2             | Célula mióide                                    |
| 3             | Célula de Sertoli                                |
| 4             | Espermatogônias tipo A e B                       |
| 5             | Espermatócitos 1 <sup>os</sup> e 2 <sup>os</sup> |
| 6             | Espermátides tipo A                              |
| 7             | Espermátides tipo B                              |
| 8             | Espermátides tipo C                              |
| 9             | Espermátides tipo D                              |

### **3.7. Avaliação da Expressão Gênica por RT-PCR**

A expressão do RNAm do *c-fos* foi pesquisada, pela técnica da reação em cadeia da polimerase a partir de transcrição reversa (RT-PCR). O princípio desta técnica é a síntese de um DNA complementar (cDNA) ao RNAm, através do anelamento de um iniciador inespecífico dentro da região alvo do RNAm do *c-fos*, e amplificação do mesmo pela PCR (Rappolee *et al.*, 1988).

#### **3.7.1. Extração e quantificação do RNA**

As amostras de testículo estocadas a -80°C foram trituradas por um homogeneizador elétrico Modelo MA-102/Mini (Marconi Equipamentos, Piracicaba, SP) em um tubo plástico estéril contendo 1 ml de solução de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol<sup>®</sup>, Invitrogen, São Paulo). A adição de clorofórmio seguida de centrifugação (10.000 rpm, 4°C, 15 min) permitiu a separação da solução em uma fase aquosa e outra orgânica. A fase aquosa, que continha o RNA, era transferida para outro tubo e o RNA era precipitado com

álcool isopropílico (isopropanol) em nova centrifugação. O precipitado era então lavado com 1 ml de etanol 75% seguido de centrifugação curta (7.500 rpm, 4°C, 5 min) (Chomczynski e Sacchi, 1987; Sambrook e Russel, 2001).

O precipitado de RNA era diluído em 20-100µl de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e aquecido a 64°C por 10 min para desnaturação. Para a quantificação, alíquotas de 2µl da solução de RNA foram diluídas em 98µl de água tratada com DEPC e a solução resultante foi submetida a espectrofotometria nas faixas de 260 e 280 nm (GeneQuant<sup>®</sup>, Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorvâncias a 260 e 280 nm era superior a 1,6. Considerando que uma unidade de absorvância a 260 nm corresponde a 40 µg de RNA por ml de solução, a concentração de RNA na solução original era calculada pela fórmula:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times D \times 40 \text{ µg/ml}$$

onde A = absorvância e D = diluição da alíquota usada para a quantificação. Por exemplo, para 2 µl da solução de RNA em 98 µl de água,  $D = 100/2 = 50$ .

### 3.7.2. Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi feita a partir de 2 µg de RNA total, utilizando oligonucleotídeos complementares à cauda poli-A do RNAm, que produzem um cDNA mais puro, exclusivamente a partir do RNAm. O RNA foi inicialmente desnaturado a 70°C por 10 minutos juntamente com o iniciador anti-senso. Em seguida foi incubado com a transcriptase reversa na presença de tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,4 + KCl 50 mM, cloreto de magnésio 2,5 mM, mistura de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs) 0,5 mM e ditioneitol 10 mM a 42°C durante 55 min. A reação de síntese do cDNA totalizou um volume de 20 µl que foi armazenado a -20°C até a amplificação por PCR. Todos os reagentes foram provenientes da Invitrogen<sup>™</sup> (SuperScript<sup>™</sup> First-Strand Synthesis System for RT-PCR).

### 3.7.3. Oligonucleotídeos Específicos

Os oligonucleotídeos (iniciadores) utilizados para amplificação do fragmento de cDNA específico do RNAm do *c-fos* foram desenhados a partir da seqüência publicada do gene (Van Straaten *et al.*, 1983), obedecendo aos seguintes critérios:

- 18 a 27 nucleotídeos;
- como o gene possuía mais de um exon, os iniciadores foram posicionados preferencialmente nas áreas de transição intron-exon para inviabilizar a amplificação acidental de DNA genômico;
- a proporção de guanina-citosina foi mantida entre 50 e 60% e equilibrada no par de iniciadores;
- a extremidade 3' foi preferencialmente ocupada por C ou G, para fortalecer a hibridização neste ponto crítico.
- a temperatura de fusão (T<sub>m</sub>) calculada para o iniciador foi semelhante à do seu par.
- evitaram-se seqüências que resultassem em complementaridade dos iniciadores senso e anti-senso, para inibir a formação de dímeros.

Não foram elaborados oligonucleotídeos para o RNAm do ER-beta, pois a sua expressão no testículo humano já está bem documentada na literatura (Makinen *et al.*, 2001; Saunders *et al.*, 2002).

A localização e seqüência dos oligonucleotídeos sintetizados para o *c-fos* estão apresentados no QUADRO 1.

#### QUADRO 1

Características dos iniciadores sintetizados para a amplificação do proto-oncogene *c-fos*

| <i>c-fos</i> | Nucleotídeos | Seqüência sintetizada      |
|--------------|--------------|----------------------------|
| senso        | 220-237      | 5' AGCTCTGCTTCACAGCGC 3'   |
| anti-senso   | 1378-1396    | 5' GGCCTCCTGTGCATGGTCTT 3' |

O iniciador senso foi situado numa região não traduzida do *c-fos* humano, que precede o primeiro exon, enquanto o iniciador anti-senso foi localizado no segundo exon. O fragmento de cDNA amplificado possui 424 pb e inclui três áreas de transição intron-exon.

#### 3.7.4. Protocolo da PCR

As reações de PCR foram feitas num volume final de 50  $\mu$ l seguindo uma adaptação do protocolo sugerido pela Invitrogen™. Os volumes e as concentrações finais dos reagentes utilizados na PCR estão relacionados na QUADRO 2. Com exceção do cDNA, todos os reagentes foram reunidos inicialmente num mix, que foi agitado suavemente e pipetado nos tubos. Cada tubo recebeu 48  $\mu$ l do mix inicial e 2  $\mu$ l de cDNA.

#### QUADRO 2

Resumo do protocolo de PCR para amplificação de cDNA.

|                                   | <i>Mix</i>                    | Concentração Final |
|-----------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| Água estéril filtrada (SF)        | 38,1 $\mu$ l                  | -                  |
| Tampão 10x sem Mg                 | 5,0 $\mu$ l                   | 1x                 |
| MgCl <sub>2</sub> 50 mM           | 1,5 $\mu$ l                   | 1,5 mM             |
| dNTP <i>mix</i> (10mM cada)       | 1,0 $\mu$ l                   | 0,2 mM             |
| Iniciador senso (10 $\mu$ M)      | 1,0 $\mu$ l                   | 0,2 $\mu$ M        |
| Iniciador anti-senso (10 $\mu$ M) | 1,0 $\mu$ l                   | 0,2 $\mu$ M        |
| cDNA                              | 2,0 $\mu$ l                   | 1:25               |
| Taq Polimerase (5 UI/ $\mu$ l)    | 0,4 $\mu$ l                   | 40 mUI/ $\mu$ l    |
| <b>Volume final</b>               | <b>50,0 <math>\mu</math>l</b> | -                  |

Os volumes se referem a cada reação de 50  $\mu$ l.

### 3.7.5. Programação dos ciclos da PCR

As reações de PCR foram conduzidas numa máquina de ciclos térmicos modelo PTC-100 (MJ Research Inc., Watertown MA, USA). O protocolo utilizado neste trabalho encontra-se resumido no QUADRO 3..

#### QUADRO 3

Programação adotada para os ciclos da PCR.

| Gene         | Desnaturação | Anelamento | Extensão  | Ciclos | Extensão final |
|--------------|--------------|------------|-----------|--------|----------------|
| <i>c-fos</i> | 94°C 30''    | 54°C 45''  | 72°C 90'' | 30     | 72°C 5 min     |

### 3.7.6. Controles de especificidade

A especificidade dos fragmentos amplificados é atestada pela estrutura dos iniciadores, cuja seqüência de “n” nucleotídeos tem uma probabilidade insignificante ( $1/4^n$ ) de se repetir em qualquer outro ponto do genoma, e pelo peso molecular, estimado pela posição dos marcadores na eletroforese. Na fase de síntese do cDNA, foram preparadas reações com RNA de testículo em que se omitiu a transcriptase reversa. O produto dessas reações foi usado em lugar do cDNA para servir de controle negativo.

A identidade do fragmento amplificado foi confirmada por digestão com enzima de restrição do produto da RT-PCR. A enzima AVA-I (Invitrogen™) foi selecionada com o auxílio do software para análise de DNA PC/GENE (Intellgenetics Inc.). Os volumes dos reagentes e substratos utilizados na digestão estão relacionados no QUADRO 4.

#### QUADRO 4

Volumes dos reagentes e substratos utilizados na digestão enzimática

| Reagentes e substratos               | Volume                      |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| Enzima AVA-I (2-8 U/ $\mu$ l)        | 2 $\mu$ l                   |
| Tampão 1x                            | 4 $\mu$ l                   |
| Água SF                              | 4 $\mu$ l                   |
| cDNA ( $\cong$ 0,1 $\mu$ g/ $\mu$ l) | 30 $\mu$ l                  |
| <b>Volume final</b>                  | <b>40 <math>\mu</math>l</b> |

A não interferência de DNA genômico foi também assegurada pelo posicionamento dos iniciadores, delimitando áreas de transição intron-exon.

#### 3.7.7. Eletroforese dos produtos da PCR

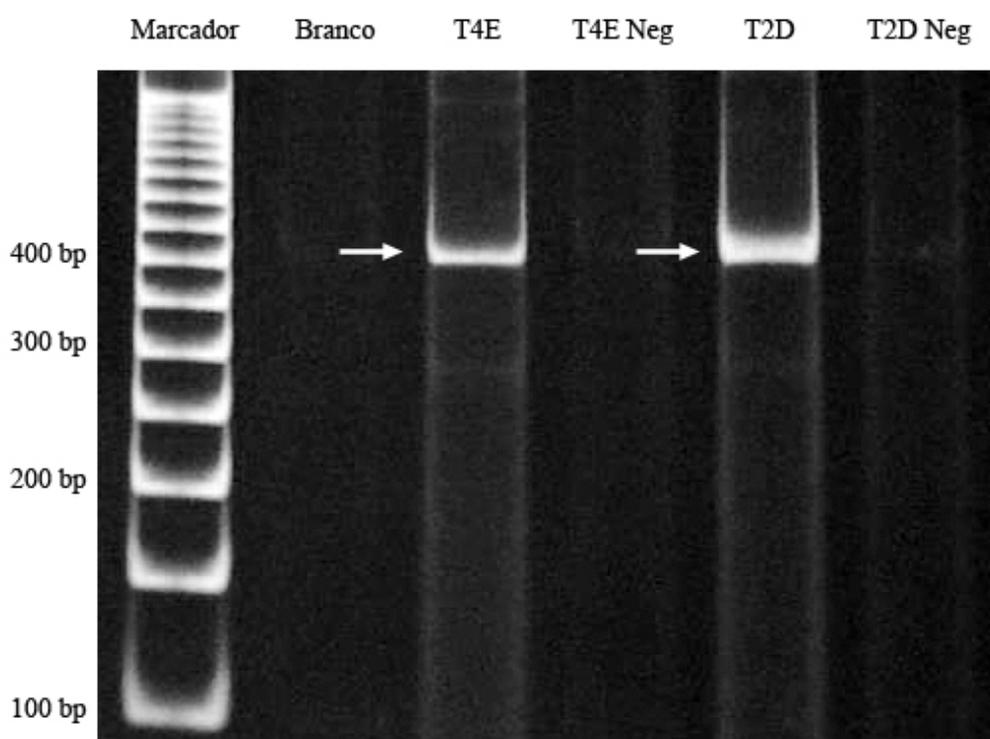
Os produtos de PCR foram fracionados por eletroforese em gel de acrilamida para permitir a identificação dos fragmentos amplificados (Sambrook e Russel, 2001). O gel foi preparado a 8% para observação de fragmentos de 400-600 pb. Utilizaram-se 4 ml de solução estoque de acrilamida 30%; 3 ml de tampão de corrida (TBE 5X); 110  $\mu$ l de persulfato de amônio 10%; 10  $\mu$ l de TEMED (agente polimerizante) e água destilada (q.s.p). Foram utilizados 2  $\mu$ l (100 ng) de marcador 50 pb DNA ladder, ou 2  $\mu$ l (100 ng) de marcador 100 pb DNA ladder e 3  $\mu$ l de amostras para os produtos de PCR. Após corrida de eletroforese em 1X tampão TBE / 50 minutos / 100 volts, o gel foi fixado por 10 minutos em etanol (10%), ácido acético (0,5%) e q.s.p. 100 ml de água destilada. Em seguida, foi realizada a impregnação por 10 minutos em nitrato de prata (0,1%). Lavou-se o gel em água destilada por 3 a 5 minutos e revelou-se o mesmo por 10 minutos em solução contendo hidróxido de sódio (3,6%), formol (0,3%) e q.s.p. 100 ml de água destilada (Herring *et al.*, 1982).

O gel foi visualizado e fotografado através de transiluminação por luz branca, no sistema de fotografia Alpha Digi Doc (Alpha Innotech Corp.) utilizando-se o software Alpha Digi Doc 1201 - Ease FC (Alpha Innotech Corp.).

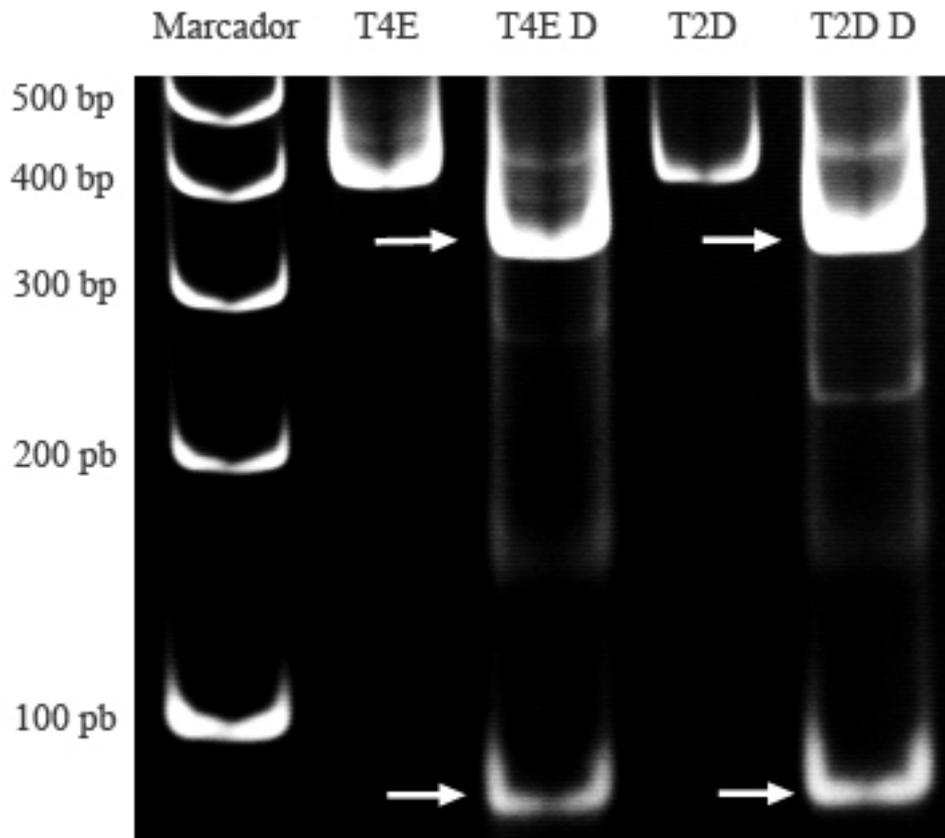
## 4. Resultados

### 4.1. Expressão do *c-fos*

A expressão do *c-fos* foi confirmada no testículo humano por RT-PCR (FIG. 3) e digestão com enzima de restrição (FIG.4). A enzima AVA-I clivou o fragmento de 424 pb na posição 78, gerando dois novos fragmentos de 78 e 346 pb cada (FIG. 4).



**FIGURA 3** – RT-PCR do *c-fos* no testículo humano. O fragmento de 424 pb, analisado em gel de acrilamida, corresponde ao RNAm do *c-fos*. T4E = testículo esquerdo do paciente 4 e T2D = testículo direito do paciente 2.



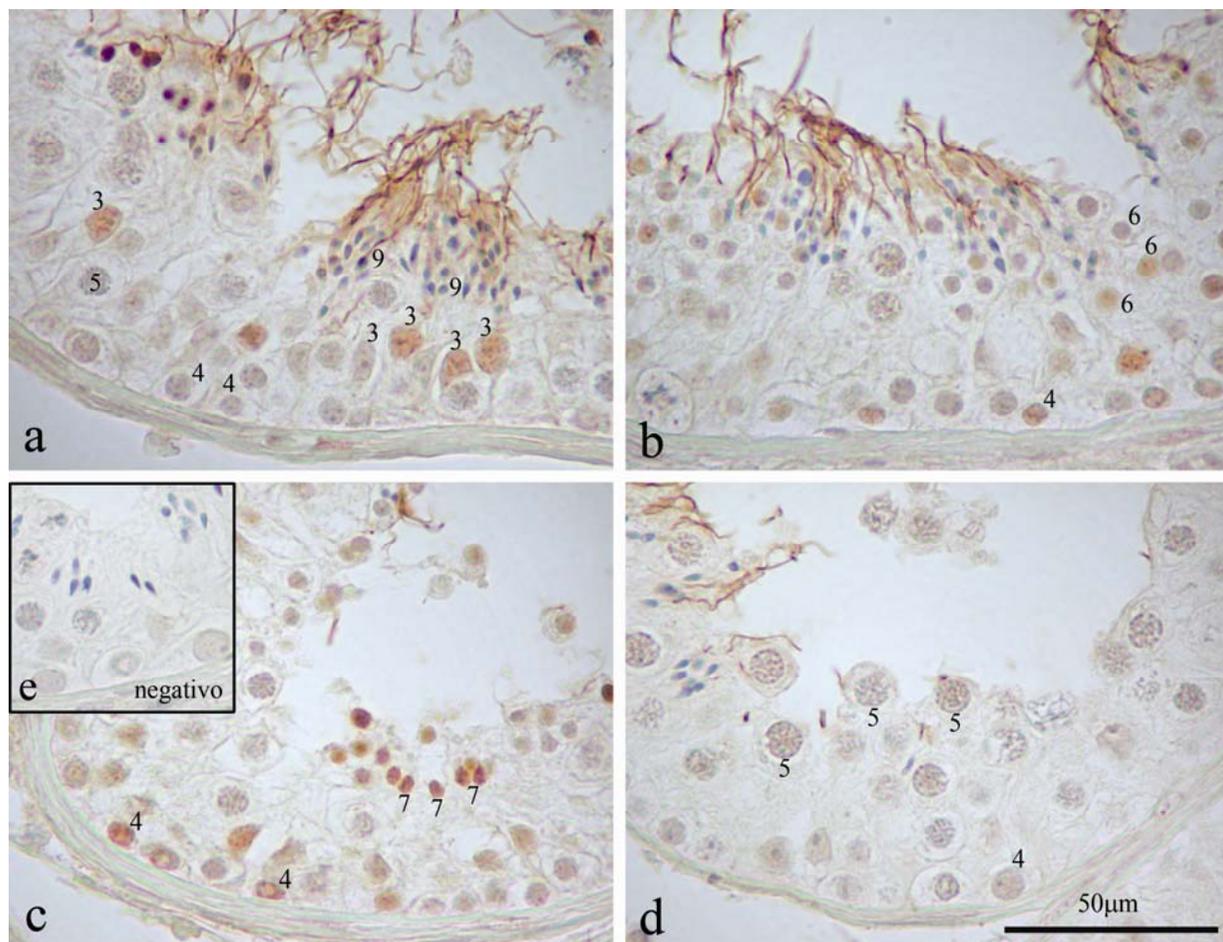
**FIGURA 4** – Digestão por enzima de restrição do produto da RT-PCR para *c-fos* no testículo humano. Os fragmentos de 78 pb e 346 pb correspondem aos sub-produtos do amplificado original. T4E = testículo esquerdo do paciente 4 e T2D = testículo direito do paciente 2. T4E D e T2D D = produto da digestão enzimática.

## **4.2. Imunolocalização da proteína c-Fos**

A imunoreatividade para c-Fos ocorreu principalmente nas espermatídes tipo B (pequeno destaque do acrossoma) e células de Sertoli. A intensidade de coloração das células de Sertoli variou de intensa a moderada e algumas vezes essas células eram negativas (FIG. 5a e 5c).

As espermatogônias, espermatócitos e espermatídes tipo A foram predominantemente negativas. Quando positivas, as espermatogônias apresentaram intensa imunocoloração. Por outro lado, os espermatócitos e as espermatídes tipo A apresentaram uma imunocoloração mais discreta em relação às outras células (FIG. 5b e 5d). Espermatídes tipo C e D apresentaram coloração apenas na região da cauda (FIG. 5a-b).

As células de Leydig apresentaram marcação inespecífica em grânulos citoplasmáticos, o que foi confirmado por marcação similar também presente no controle negativo. As células mióides não apresentaram qualquer tipo de marcação para c-Fos.



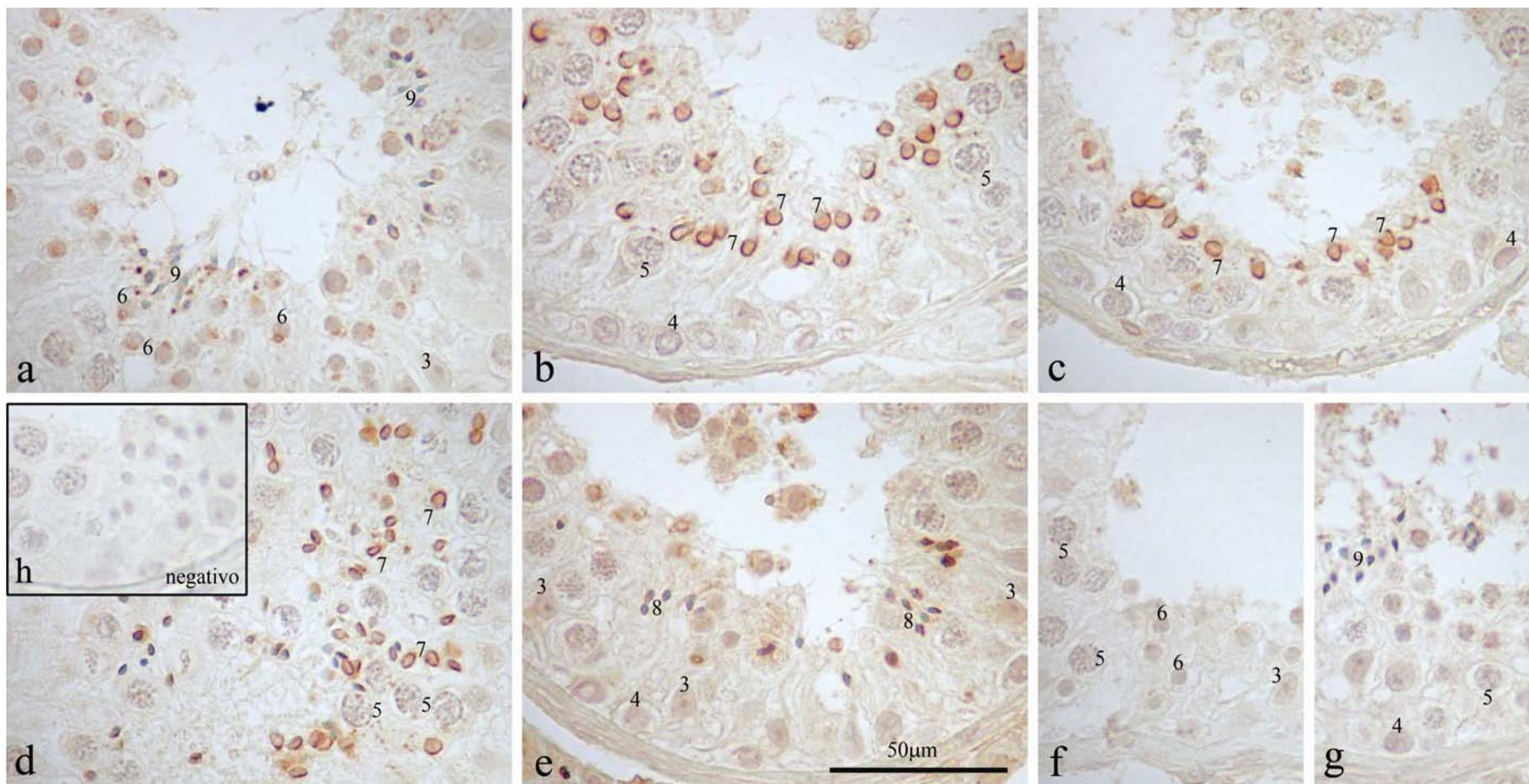
**FIGURA 5** - Expressão imuno-histoquímica da proteína c-Fos em tecido testicular humano. 3 = célula de Sertoli; 4 = espermatogônia; 5 = espermatócito; 6 = espermatíde tipo A; 7 = espermatíde tipo B e 9 = espermatíde tipo D. A coloração castanha nuclear indica a presença da proteína c-Fos.

### **4.3. Imunolocalização da proteína c-Fos fosforilada**

Após a fosforilação da treonina presente na posição 232 da proteína c-Fos, observaram-se importantes variações na localização desta proteína no testículo humano, quando comparada com a proteína não fosforilada. A imunoreatividade passou a ocorrer principalmente nas espermatídes tipo A, B e C, acompanhando todo o processo de diferenciação celular e com destaque para a concentração da proteína no acrossoma celular. Observou-se negatividade destas mesmas células em alguns túbulos seminíferos. As espermatídes tipo D apresentaram-se sempre negativas para c-Fos fosforilada. Foi possível identificar em alguns túbulos seminíferos a transição de espermatíde tipo C positiva para espermatíde tipo D negativa para c-Fos (FIG. 6).

A célula de Sertoli, que antes era predominantemente positiva, passou a ser predominantemente negativa, com raras células positivas para a proteína fosforilada (FIG. 6e-g)

Todos os outros tipos celulares não apresentaram qualquer tipo de marcação específica para a proteína c-Fos fosforilada (FIG. 6).



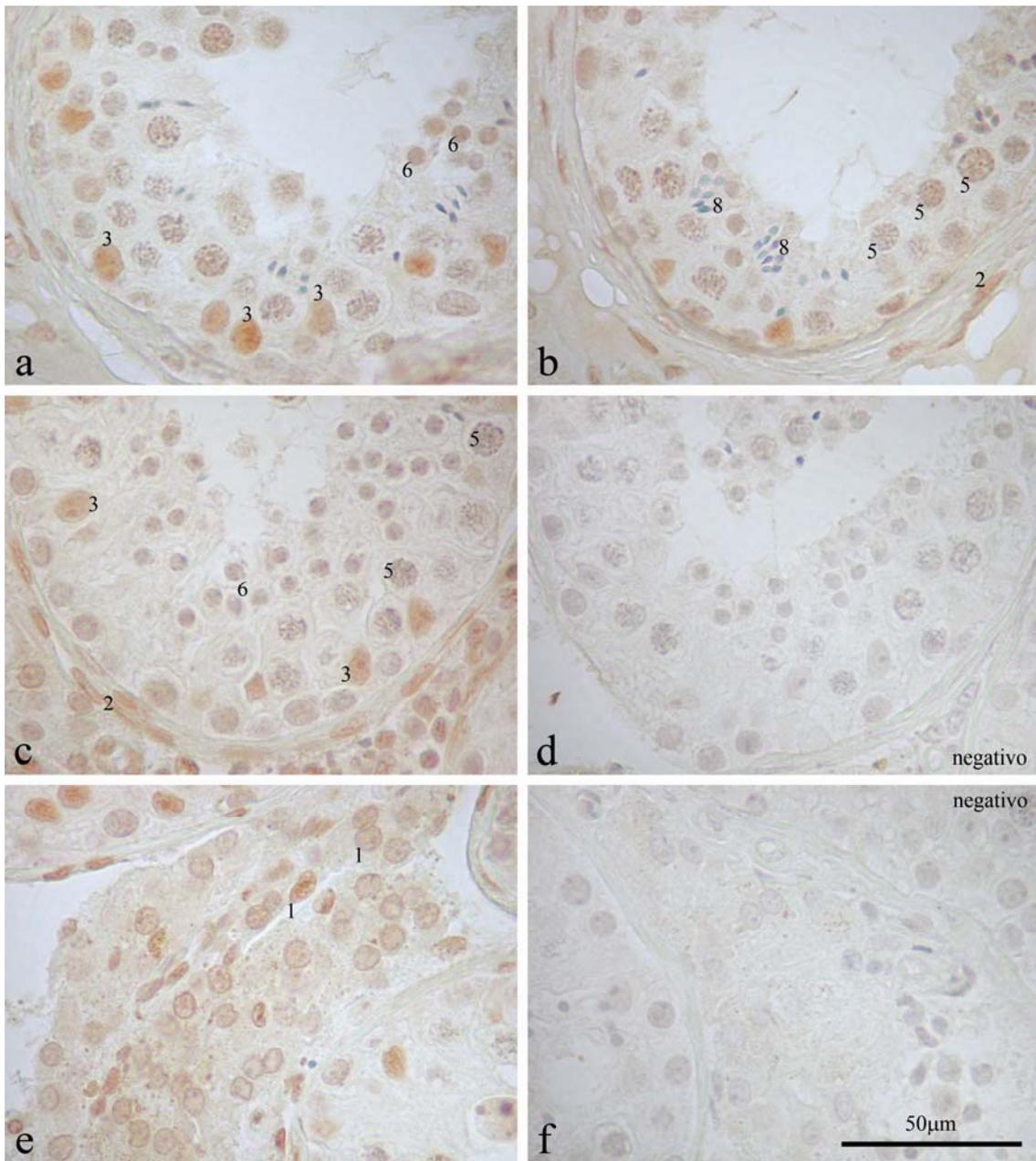
**FIGURA 6** – Expressão imuno-histoquímica da proteína c-Fos fosforilada em tecido testicular humano. 3 = célula de Sertoli; 4 = espermatogônia; 5 = espermatócito; 6 = espermátide tipo A; 7 = espermátide tipo B; 8 = espermátide tipo C e 9 = espermátide tipo D. A coloração castanha nuclear indica a presença da proteína c-Fos fosforilada.

#### **4.4. Imunolocalização do receptor de estrogênio beta**

A imunomarcção para receptor de estrogênio beta ocorreu tanto no compartimento intersticial quanto no compartimento tubular (FIG. 7). As células mióides e células de Sertoli foram francamente coradas para ER-beta, no entanto houve heterogeneidade na marcação das células de Sertoli que apresentaram-se fortemente coradas na maioria dos túbulos, mas fracamente coradas em outros (FIG. 7a-c).

Alguns espermatócitos e espermátides tipo A também apresentaram discreta marcação, porém o padrão para estes tipos celulares foi a negatividade para ER-beta. Não se detectou nenhuma marcação nos outros tipos celulares analisados (FIG. 7a-c).

As células de Leydig apresentaram fraca positividade na maioria dos cortes, sendo que algumas foram mais fortemente coradas (FIG. 7e).



**FIGURA 7** – Expressão imuno-histoquímica da proteína ER-beta em tecido testicular humano. 1 = células de Leydig; 2 = célula mióide; 3 = célula de Sertoli; 5 = espermatócito; 6 = espermátide tipo A e 8 = espermátide tipo C. A coloração castanha nuclear indica a presença do ER-beta.

A TABELA 3 apresenta um sumário dos principais achados da localização imuno-histoquímica das proteínas investigadas neste estudo.

**TABELA 3**

Sumário da imunolocalização das proteínas  
c-Fos, c-Fos fosforilada e ER-beta no testículo humano

| Localização                                      | c-Fos | c-Fos fosforilada | ER-beta |
|--|-------|-------------------|---------|
| Célula de Leydig                                 | -     | -                 | +++     |
| Célula mióide                                    | -     | -                 | +++     |
| Célula de Sertoli                                | ++/-  | +/--              | +++     |
| Espermatogônias A e B                            | +/--  | -                 | -       |
| Espermatócitos 1 <sup>os</sup> e 2 <sup>os</sup> | +/--  | -                 | +/--    |
| Espermátides tipo A                              | +/--  | ++/-              | +/--    |
| Espermátides tipo B                              | +++   | ++/-              | -       |
| Espermátides tipo C                              | -     | ++/-              | -       |
| Espermátides tipo D                              | -     | -                 | -       |

A intensidade da imunocoloração foi classificada como ausente (-), predominantemente negativa (+/--), predominantemente positiva (++/-) ou sempre positiva (+++).

## **5. Discussão**

### **5.1. Expressão do *c-fos***

O crescimento e diferenciação de uma célula normal são controlados por eventos complexos que, quando coordenados, suprem as necessidades dos tecidos e, por conseguinte do organismo como um todo. À medida que os mecanismos envolvidos no controle do crescimento celular são decifrados, torna-se evidente que os proto-oncogenes são peças fundamentais na modulação dos eventos que levam à proliferação e diferenciação das células normais (Schuchard *et al.*, 1993).

A expressão do RNAm do proto-oncogene *c-fos* já foi relatada no parênquima testicular de alguns vertebrados (Wolfes *et al.*, 1989; Hall *et al.*, 1991; Schultz *et al.*, 1995; Cobellis *et al.*, 1997). No testículo humano, a presença do RNAm foi comprovada pela primeira vez neste estudo, confirmando assim a transcrição e expressão gênica do *c-fos* no testículo humano.

### **5.2. Imunolocalização da proteína c-Fos**

A distribuição da proteína c-Fos foi descrita em estudos imunohistoquímicos do parênquima testicular de vários vertebrados (Cohen *et al.*, 1993; Schultz *et al.*, 1995; Chieffi *et al.*, 1997; Cobellis *et al.*, 2002). Dentre estes, o estudo de Schultz e colaboradores (1995) é um dos mais importantes, pois correlacionou a expressão do RNAm com a expressão da proteína. Estes apresentaram os resultados de acordo com a classificação celular morfológica estabelecida por Leblond (1952) para o estadiamento da espermatogênese em ratos. A imunorreatividade nuclear para c-Fos foi observada em todos os estádios celulares, porém com diferenças nos tipos celulares e na intensidade da marcação. Dentre as células coradas, os espermatócitos primários e as células de Sertoli (exceto estágio VII) foram aquelas que se apresentaram positivas praticamente durante todos os estádios. Em compensação, os outros tipos

celulares apresentaram imunoreatividade nuclear intermitente. O estudo do RNAm mostrou que nem sempre a imunoreatividade acompanhava a intensidade da transcrição gênica. Sabe-se que algum RNAm pode ser estocado durante o início do ciclo espermatogênico e traduzido durante fases tardias da espermiogênese (Geremia *et al.*, 1978), o que poderia explicar estas diferenças.

Até o presente momento, somente o estudo *in vitro* de Suomalainen e colaboradores (2004), da apoptose de células germinativas relacionadas a proteína de ativação 1 (AP-1), proporcionou resultados da localização celular da proteína c-Fos no parênquima testicular humano. Este não avaliou a localização da proteína após ser fosforilada. Os autores descreveram uma imunocoloração citoplasmática em algumas espermatogônias e espermátócitos jovens antes do início da cultura de tecido em condições livres de soro. Nestas mesmas condições, as células de Sertoli eram c-Fos-negativas. Após 5 horas de cultura livre de soro, as células de Sertoli passaram a apresentar positividade nuclear para a proteína c-Fos. Os autores não mencionam se as espermatogônias e espermátócitos jovens passaram a apresentar negatividade para a proteína.

Os resultados deste trabalho corroboram parte dos achados do estudo *in vitro* de Suomalainen *et al* (2004), visto que as células de Sertoli, espermatogônias e espermátócitos apresentaram uma coloração intermitente, possivelmente refletindo uma ativação estágio-específica. A imunocoloração citoplasmática foi a principal diferença encontrada, sendo que os nossos achados apoiam aqueles obtidos do rato (Schultz *et al.*, 1995), em que a coloração para a proteína c-Fos foi exclusivamente nuclear e/ou perinuclear (Schultz *et al.*, 1995; Chieffi *et al.*, 1997). Por outro lado, Cobellis e colaboradores (2002) relataram que a mudança de uma forma citoplasmática da proteína para duas formas nucleares diversas, uma fosforilada e outra não fosforilada, seriam responsáveis pela reativação da espermatogênese na *Rana esculenta*. Esta alteração poderia explicar a mudança na localização sub-celular da proteína vista no estudo de Suomalainen, apesar do seu anticorpo primário ter sido somente contra a proteína c-Fos não fosforilada.

No presente estudo, a proteína c-Fos também apresentou imunoreatividade em espermátides tipo A (intermitente) e tipo B (constante). Este resultado reflete uma atividade gênica em células haplóides, o que não foi observado por Suomalainen em seu estudo. Geremia (1978) e Dadoune (Dadoune, 1994) descreveram que, durante a espermatogênese, células haplóides (espermátides arredondadas tipo A) são capazes de sintetizar RNAm e proteínas. Isto explicaria o aparecimento tão intenso da proteína c-Fos em espermátides tipo B (alongadas). A partir deste estágio (espermátides tipo B), estas não são mais capazes de sintetizar RNAm e proteínas.

Foi observada pela primeira vez no parênquima testicular humano a presença da proteína c-Fos fosforilada. Kousteni e colaboradores (2003) descreveram que é possível ocorrer ativação, via interação estrogênio-receptor, de proteínas cinases com atividade sobre os resíduos de serina e/ou treonina (ERKs) que seriam responsáveis pela fosforilação da proteína c-Fos. Este mecanismo é independente das ações genômicas clássicas dos receptores esteróides. (Kousteni *et al.*, 2003). A fosforilação da proteína c-Fos, via ERKs, é essencial para a ação mitogênica dos fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) em fibroblastos de camundongos. A fosforilação da proteína c-Fos no seu domínio de transativação resulta em aumento da atividade transcricional (Monje *et al.*, 2003).

A imunoreatividade da proteína c-Fos fosforilada foi diferente da não fosforilada, sendo encontrada principalmente no núcleo das espermátides tipo A, B e C (predominantemente positivas) e células de Sertoli (predominantemente negativas). A presença da proteína fosforilada em células mais diferenciadas da espermiogênese indica uma possível ativação desta por fatores de transcrição autócrinos e/ou parácrinos que estariam regulando a diferenciação celular até a formação dos espermatozóides. A marcação intensa da proteína c-Fos não fosforilada nas espermátides tipo B justificaria a presença da homóloga fosforilada em espermátides tipo B e C. Notou-se também que a proteína c-Fos fosforilada foi muito concentrada no acrossoma em formação das espermátides. A função desta proteína no acrossoma espermático é desconhecida. Após a

passagem para o estágio D, esta não apresentou imunoreatividade alguma, ilustrando a sua inativação e possível eliminação.

As células de Sertoli, que eram predominantemente positivas para a proteína c-Fos, passaram a ter uma expressão diminuída desta após a sua fosforilação, o que pode representar uma inibição da função desta proteína neste tipo celular.

### **5.3. Imunolocalização do receptor de estrogênio beta**

A imunoexpressão da proteína ER-beta já foi descrita no testículo humano (Makinen *et al.*, 2001; Saunders *et al.*, 2002; Gaskell *et al.*, 2003; Aschim *et al.*, 2004; Shapiro *et al.*, 2005) porém não foi encontrado nenhum estudo onde este receptor esteja relacionado com o proto-oncogene *c-fos*.

Shapiro e colaboradores (2005) analisaram a expressão do ER-beta no testículo humano fetal. A imunoreatividade com 12 semanas de gestação ocorreu principalmente em células germinativas, células mióides e células de Leydig. Por outro lado, Gaskell e colaboradores (2003), também em testículos de 12 semanas de gestação, observaram imunocoloração muito fraca ou negativa em células germinativas e intermitente nas células de Sertoli, células mióides e células de Leydig. Estes dois estudos são importantes para ressaltar a presença do ER-beta durante a formação e desenvolvimento testicular humano.

Saunders e colaboradores (2002) descreveram intensa imunoexpressão do ER-beta em espermátocitos paquítenos e espermátides arredondadas. Células de Sertoli, espermátogônias e espermátocitos pré-leptótenos, leptótenos, zigótenos e diplótenos apresentaram marcação menos intensa. Espermátides alongadas não apresentaram marcação. Aschim e colaboradores (2004) encontraram imunoreatividade no núcleo de espermátogônias, espermátocitos e espermátides jovens. Espermátides alongadas, espermatozóides, células de Sertoli e Leydig foram todas negativas para o ER-beta.

O presente estudo encontrou imunopositividade constante para células de Leydig, mióides e de Sertoli, sendo que as células de Leydig apresentaram

coloração mais fraca quando comparadas às células de Sertoli. Espermatócitos e espermatídes tipo A foram predominantemente negativos. As diferenças entre os três estudos podem ser devidas a diferentes protocolos e/ou anticorpo utilizado.

#### **5.4. Proteína c-Fos e receptor de estrogênio beta**

Embora estudos complementares sejam necessários para se confirmar que estrogênios e proto-oncogenes sejam capazes de alterar o ciclo espermatogênico, a presença do proto-oncogene *c-fos* em células somáticas e principalmente células germinativas, além do ER-beta em células somáticas, nos permite supor duas possíveis vias de regulação entre estes: a primeira seria a via clássica direta, pela qual o estrogênio se ligaria ao seu receptor nuclear e alteraria a expressão gênica. Sabe-se que o proto-oncogene *c-fos* (Gaub *et al.*, 1990; Cobellis *et al.*, 1999; Cobellis *et al.*, 2002) participa desta via como um dos genes de expressão imediata, que posteriormente afeta a expressão de genes estruturais. Estes mesmos esteróides poderiam alterar a atividade transcricional da proteína c-Fos, por exemplo, por fosforilação/desfosforilação do resíduo de treonina na posição 232. As células de Sertoli exibiram positividade para o ER-beta e para a proteína c-Fos nas formas não-fosforilada e fosforilada, o que representa a via completa. A segunda via seria a indireta. A ação dos estrogênios nas células somáticas, poderia levá-las a secretar proteínas (fatores de crescimento e/ou diferenciação) com ação parácrina e/ou justácrina que atuariam no controle do processo espermiogênico. Estes regulariam tanto a expressão gênica quanto a atividade transcricional da proteína c-Fos.

## 6. Conclusões

1. Comprovou-se, por meio de RT-PCR, a expressão do proto-oncogene *c-fos* no parênquima testicular humano.
2. As proteínas c-Fos, c-Fos fosforilada e ER-beta são expressas no testículo humano, sendo que as duas primeiras estão localizadas principalmente nas células germinativas e célula de Sertoli e a última principalmente nas células somáticas (células de Leydig, Sertoli e mióides).
3. A distribuição encontrada das proteínas c-Fos e ER-beta nos permite supor uma inter-relação entre estas; seja pela ação estrogênica na célula de Sertoli, alterando a expressão local de *c-fos*, seja indiretamente, pelos efeitos que o estímulo estrogênico sobre as células somáticas poderia ter sobre a expressão de *c-fos* no epitélio germinativo.

## 7. Referências

- ASCHIM, E. L., SAETHER, T., WIGER, R., et al. Differential distribution of splice variants of estrogen receptor beta in human testicular cells suggests specific functions in spermatogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v.92, n.1-2, Sep, p.97-106. 2004.
- CHEUNG, T. H., LEUNG, J. O., CHUNG, T. K., et al. c-fos overexpression is associated with the pathoneogenesis of invasive cervical cancer. *Gynecol Obstet Invest*, v.43, n.3, p.200-3. 1997.
- CHIEFFI, P., ANGELINI, F. e PIERANTONI, R. Proto-oncogene activity in the testis of the lizard, *Podarcis s. sicula*, during the annual reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol*, v.108, n.2, Nov, p.173-81. 1997.
- CHOMCZYNSKI, P. e SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, v.162, n.1, Apr, p.156-9. 1987.
- CLERMONT, Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat*, v.112, Jan, p.35-51. 1963.
- COBELLIS, G., PIERANTONI, R. e FASANO, S. c-fos- and c-jun-like mRNA expression in frog (*Rana esculenta*) testis during the annual reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol*, v.106, n.1, Apr, p.23-9. 1997.
- COBELLIS, G., PIERANTONI, R., MINUCCI, S., et al. c-fos activity in *Rana esculenta* testis: seasonal and estradiol-induced changes. *Endocrinology*, v.140, n.7, Jul, p.3238-44. 1999.
- COBELLIS, G., MECCARIELLO, R., FIENGA, G., et al. Cytoplasmic and nuclear Fos protein forms regulate resumption of spermatogenesis in the frog, *Rana esculenta*. *Endocrinology*, v.143, n.1, Jan, p.163-70. 2002.
- COHEN, D. R., VANDERMARK, S. E., MCGOVERN, J. D., et al. Transcriptional regulation in the testis: a role for transcription factor AP-1 complexes at various stages of spermatogenesis. *Oncogene*, v.8, n.2, Feb, p.443-55. 1993.
- DADOUNE, J. P. The cellular biology of mammalian spermatids: a review. *Bull Assoc Anat (Nancy)*, v.78, n.243, Dec, p.33-40. 1994.
- GASKELL, T. L., ROBINSON, L. L., GROOME, N. P., et al. Differential expression of two estrogen receptor beta isoforms in the human fetal testis during

the second trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, v.88, n.1, Jan, p.424-32. 2003.

GAUB, M. P., BELLARD, M., SCHEUER, I., et al. Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. *Cell*, v.63, n.6, Dec 21, p.1267-76. 1990.

GEREMIA, R., D'AGOSTINO, A. e MONESI, V. Biochemical evidence of haploid gene activity in spermatogenesis of the mouse. *Exp Cell Res*, v.111, n.1, Jan, p.23-30. 1978.

GRIFFIN, J. E. e OJEDA, S. R. *Textbook of Endocrine Physiology*. New York: Oxford University Press, Inc. 2004

HALL, S. H., BERTHELON, M. C., AVALLET, O., et al. Regulation of c-fos, c-jun, jun-B, and c-myc messenger ribonucleic acids by gonadotropin and growth factors in cultured pig Leydig cell. *Endocrinology*, v.129, n.3, Sep, p.1243-9. 1991.

HERRING, A. J., INGLIS, N. F., OJEH, C. K., et al. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol*, v.16, n.3, Sep, p.473-7. 1982.

HESS, R. A., CARNES, K. The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and species comparison. *Animal Reproduction*, v.1, n.1, p.5-30. 2004.

HOLDCRAFT, R. W. e BRAUN, R. E. Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int J Androl*, v.27, n.6, Dec, p.335-42. 2004.

HOLT, J. T., GOPAL, T. V., MOULTON, A. D., et al. Inducible production of c-fos antisense RNA inhibits 3T3 cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.83, n.13, Jul, p.4794-8. 1986.

HSU, S. M., RAINE, L. e FANGER, H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol*, v.75, n.5, May, p.734-8. 1981.

HULEIHEL, M. e LUNENFELD, E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian J Androl*, v.6, n.3, Sep, p.259-68. 2004.

HUNT, S. P., PINI, A. e EVAN, G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, v.328, n.6131, Aug 13-19, p.632-4. 1987.

JOHNSON, R. S., SPIEGELMAN, B. M. e PAPAIOANNOU, V. Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene. *Cell*, v.71, n.4, Nov 13, p.577-86. 1992.

KIERSZENBAUM, A. L. Mammalian spermatogenesis in vivo and in vitro: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. *Endocr Rev*, v.15, n.1, Feb, p.116-34. 1994.

KOUSTENI, S., HAN, L., CHEN, J. R., et al. Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. *J Clin Invest*, v.111, n.11, Jun, p.1651-64. 2003.

KREGE, J. H., HODGIN, J. B., COUSE, J. F., et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.95, n.26, Dec 22, p.15677-82. 1998.

KUIPER, G. G., ENMARK, E., PELTO-HUIKKO, M., et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.93, n.12, Jun 11, p.5925-30. 1996.

LEBLOND, C. P. e CLERMONT, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci*, v.55, n.4, Nov 20, p.548-73. 1952.

MAKINEN, S., MAKELA, S., WEIHUA, Z., et al. Localization of oestrogen receptors alpha and beta in human testis. *Mol Hum Reprod*, v.7, n.6, Jun, p.497-503. 2001.

MCLACHLAN, R. I., WREFORD, N. G., O'DONNELL, L., et al. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *J Endocrinol*, v.148, n.1, Jan, p.1-9. 1996.

MONJE, P., MARINISSEN, M. J. e GUTKIND, J. S. Phosphorylation of the carboxyl-terminal transactivation domain of c-Fos by extracellular signal-regulated kinase mediates the transcriptional activation of AP-1 and cellular transformation induced by platelet-derived growth factor. *Mol Cell Biol*, v.23, n.19, Oct, p.7030-43. 2003.

MORGAN, J. I. e CURRAN, T. Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature*, v.322, n.6079, Aug 7-13, p.552-5. 1986.

MORGAN, J. I., COHEN, D. R., HEMPSTEAD, J. L., et al. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*, v.237, n.4811, Jul 10, p.192-7. 1987.

MULLER, R. e WAGNER, E. F. Differentiation of F9 teratocarcinoma stem cells after transfer of c-fos proto-oncogenes. *Nature*, v.311, n.5985, Oct 4-10, p.438-42. 1984.

NORTON, J. N. e SKINNER, M. K. Regulation of Sertoli cell differentiation by the testicular paracrine factor PModS: potential role of immediate-early genes. *Mol Endocrinol*, v.6, n.12, Dec, p.2018-26. 1992.

OLIVEIRA, C. A., ZHOU, Q., CARNES, K., et al. ER function in the adult male rat: short- and long-term effects of the antiestrogen ICI 182,780 on the testis and efferent ductules, without changes in testosterone. *Endocrinology*, v.143, n.6, Jun, p.2399-409. 2002.

PFAHL, M. Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocr Rev*, v.14, n.5, Oct, p.651-8. 1993.

RAPPOLEE, D. A., BRENNER, C. A., SCHULTZ, R., et al. Developmental expression of PDGF, TGF-alpha, and TGF-beta genes in preimplantation mouse embryos. *Science*, v.241, n.4874, Sep 30, p.1823-5. 1988.

REIS, F. M. Expressão de prolactina, c-fos e TGF-beta no endométrio humano: influência do ciclo menstrual e efeitos do acetato de medroxiprogesterona. (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

RUSSELL, L. D., SINHA, A. P., ETTLIN, R. A., et al. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*: Cache River Press, v.1. 1990. 286 p.

SAMBROOK, J. e RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. 2344 p.

SAUNDERS, P. T., MILLAR, M. R., MACPHERSON, S., et al. ERbeta1 and the ERbeta2 splice variant (ERbetacx/beta2) are expressed in distinct cell populations in the adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab*, v.87, n.6, Jun, p.2706-15. 2002.

SCHUCHARD, M., LANDERS, J. P., SANDHU, N. P., et al. Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocr Rev*, v.14, n.6, Dec, p.659-69. 1993.

SCHULTZ, R., PENTTILA, T. L., PARVINEN, M., et al. Expression of immediate early genes in tubular cells of rat testis. *Biol Reprod*, v.52, n.6, Jun, p.1215-26. 1995.

SHAPIRO, E., HUANG, H., MASCH, R. J., et al. Immunolocalization of androgen receptor and estrogen receptors alpha and beta in human fetal testis and epididymis. *J Urol*, v.174, n.4 Pt 2, Oct, p.1695-8; discussion 1698. 2005.

SPELSBERG, T. C., LITTLEFIELD, B. A., SEELKE, R., et al. Role of specific chromosomal proteins and DNA sequences in the nuclear binding sites for steroid receptors. *Recent Prog Horm Res*, v.39, p.463-517. 1983.

SUBRAMANIAM, M., HARRIS, S. A., RASMUSSEN, K., et al. Rapid down-regulation of c-jun protooncogene transcription by progesterone in the avian oviduct. *Endocrinology*, v.133, n.5, Nov, p.2049-54. 1993.

SUOMALAINEN, L., DUNKEL, L., KETOLA, I., et al. Activator protein-1 in human male germ cell apoptosis. *Mol Hum Reprod*, v.10, n.10, Oct, p.743-53. 2004.

VAN STRAATEN, F., MULLER, R., CURRAN, T., et al. Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.80, n.11, Jun, p.3183-7. 1983.

WALKER, R. A. e COWL, J. The expression of c-fos protein in human breast. *J Pathol*, v.163, n.4, Apr, p.323-7. 1991.

WEISZ, A. e ROSALES, R. Identification of an estrogen response element upstream of the human c-fos gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Nucleic Acids Res*, v.18, n.17, Sep 11, p.5097-106. 1990.

WOLFES, H., KOGAWA, K., MILLETTE, C. F., et al. Specific expression of nuclear proto-oncogenes before entry into meiotic prophase of spermatogenesis. *Science*, v.245, n.4919, Aug 18, p.740-3. 1989.

WU, J. X., CARPENTER, P. M., GRESENS, C., et al. The proto-oncogene c-fos is over-expressed in the majority of human osteosarcomas. *Oncogene*, v.5, n.7, Jul, p.989-1000. 1990.

## Anexo A – Parecer da Comissão de Ética



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

UFMG

Belo Horizonte, 17 de maio de 2005.

PROCESSO Nº 035/05

**TÍTULO: "Estudo endócrino-molecular de testículo em homens orquiectomizados e em homens azoospérmicos."**

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 sobre o mesmo e a aprovação do COEP/UFMG em 15/junho/2004, esta Diretoria aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional. Solicitamos enviar à DEPE relatório parcial ou final, após um ano.

Atenciosamente,

  
PROF. JUAREZ OLIVEIRA CASTRO  
Diretor da DEPE/HC-UFMG

Ao  
Prof. Fernando Marcos Reis  
Depto. Ginecologia e Obstetrícia  
Faculdade de Medicina/UFMG

4



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

**Parecer nº. ETIC 032/04**

**Interessado: Prof. Dr. Fernando Marcos Reis**  
**Faculdade de Medicina - UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou após cumprida as solicitações à diligência no dia 15 de junho de 2004 o projeto de pesquisa intitulado « **Estudo Endócrino Molecular do Testículo em Homens Orquiectomizados e em Homens Azoospermicos.** » e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

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

  
**Profa. Dra. Maria Elena Lima Perez Garcia**  
**Presidente do COEP/UFMG**

## **Apêndice A - Formulário de consentimento livre e esclarecido**

### **I. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA**

A pesquisa visa ao estudo da fisiologia do tecido testicular de pacientes orquiectomizados (pacientes que têm seus testículos retirados por meio cirúrgico) e terá o objetivo de melhor compreender as alterações fisiológicas do tecido de testículos com e sem produção de espermatozóides em pacientes orquiectomizados. Uma melhor compreensão da fisiologia desse tecido ajudará no entendimento da espermatogênese (formação de espermatozóides), bem como na melhora do tratamento da infertilidade masculina. Nesta pesquisa será utilizada somente uma parte do fragmento de tecido testicular retirado no momento do procedimento cirúrgico para fins de tratamento oncológico.

### **II. 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 essas informações, que serão utilizadas somente para fins de pesquisa.

### **III. BENEFÍCIOS DA PESQUISA**

Este estudo trará inúmeros benefícios importantes que poderão ter aplicação direta na terapêutica. O conhecimento das alterações fisiológicas e das respostas do tecido testicular poderá ajudar no tratamento da infertilidade masculina.

### **IV. RISCOS**

Não existe risco para os pacientes, uma vez que será utilizada somente parte do tecido testicular já retirado quando do procedimento cirúrgico (orquiectomia: retirada do testículo) para fins de tratamento oncológico.

### **V. RESSARCIMENTO DAS DESPESAS**

Não está prevista qualquer forma de remuneração para os voluntários. Todas as despesas específicas relacionadas ao estudo são de responsabilidade do laboratório de Endocrinologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

## DEMAIS ESCLARECIMENTOS

Você dispõe de tal liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante a pesquisa e poderá recusar-se a participar deste estudo e/ou abandoná-lo a qualquer momento, sem precisar justificar. A aceitação ou não da participação não influenciará no seu tratamento. Nesta pesquisa utilizaremos somente parte do tecido testicular retirado durante a orquiectomia (retirada do testículo); não serão utilizados outros tecidos, não sendo realizado qualquer tipo de manipulação, experimento ou intervenção direta com o paciente.

## VI. TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_  
voluntariamente, concordo que o material biológico (tecido testicular) proveniente da minha cirurgia de orquiectomia seja utilizado para fins de pesquisa científica no laboratório de Endocrinologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Estou ciente do exposto acima e, ainda, de que esta pesquisa não trará qualquer prejuízo a minha saúde.

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário

**Telefone para contato:** 3248-9487 (Urologia Hospital das Clínicas da UFMG)