

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**PRESERVAÇÃO DA FUNÇÃO TESTICULAR (ENDÓCRINA E REPRODUTIVA)  
EM RATOS WISTAR APÓS CRIOPRESERVAÇÃO E TRANSPLANTE**

**Ana Luiza Ferrari**

Orientador: Prof. Dr. Edison Capp

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do grau de Doutor.

**Porto Alegre, fevereiro de 2011**

*Dedicatória*

*Jamais poderei agradecer aos dois amores da minha vida por todo o apoio durante esta difícil jornada. Minha Tese de Doutorado é dedicada inteiramente ao meu marido Marco e meu filho João.*

*“O importante é mirar nossas metas na lua porque, se errarmos, elas ainda estarão entre as estrelas.”*

(Autor desconhecido)

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Edison Capp, meu amigo e orientador, por sua confiança e incentivo constante durante a realização deste trabalho. Serei eternamente grata por sua ajuda e por tudo que me proporcionou durante esta jornada.

À Profa. Helena von Eye Corleta, pelo seu apoio, atenção e sua incansável colaboração como professora.

À Profa. Ilma Simoni Brum da Silva, pelos seus ensinamentos e constante preocupação com o desenvolvimento desta pesquisa.

À Profa. Lúcia Kliemann, pelo seu apoio, colaboração, demonstração de carinho e amizade. Pelas oportunidades de aprendizado que me proporcionou e pela sua disponibilidade em todos os momentos.

Às colegas de laboratório Lolita Schneider e Vivian Giesel, pela ajuda e incentivo.

Ao Marcos Mendonça e a Luisa Perini, que colaboraram em muitos momentos demonstrando interesse e dedicação.

Aos funcionários da Unidade de Experimentação Animal, em especial a enfermeira Marta Cioato que através da sua dedicação e constante interesse, colaborou para a realização de todos procedimentos e para a aquisição do material utilizado nesta pesquisa.

À Fabíola Meyer, pela realização dos procedimentos cirúrgicos da pesquisa, de maneira exemplar, sempre demonstrando preocupação e interesse em todos aspectos relacionados a este estudo.

Aos funcionários do PPG em Medicina: Ciências Médicas, pela disponibilidade e eficiência na obtenção da documentação e material de laboratório sempre que necessário.

À Aline Lopes Amaral pelo apoio, carinho e amizade. Agradeço pela ajuda, dedicação e interesse demonstrado em todos os momentos. Sua colaboração foi essencial para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os meus amigos em especial as amigas que me acompanham desde a infância, Ane, Karin, Suzana, Alice, Martha, Kátia, Neca e Clarisse, pelo apoio e constante interesse que demonstraram desde o início deste projeto.

Às amigas Magda, Mylene, Cléo, Heloísa, Andréa e Carla pela demonstração de carinho e amizade.

À Maria Aparecida Araújo Santos pelos seus ensinamentos durante minha formação.

À minha tia Marisa, que apesar da distância, está sempre presente demonstrando interesse e enorme afeição.

À minha irmã, Maria Elisa, à minha afilhada Martina e ao Rodolfo, pelo incentivo e demonstração de carinho.

Ao meu pai Arnaldo, que ao *“lado de minha mãe”*, sempre me apoiou e serviu de modelo como pesquisador, médico e professor.

À minha mãe Maria Norma, pelo amor que demonstrou durante toda sua vida e que irá permanecer dentro de mim.

Ao meu marido Marco Antônio e ao meu filho João Pedro, pela demonstração de imenso amor e compreensão em todos os momentos.

A todos, muito obrigado.

## SUMÁRIO

1. LISTA DE FIGURAS .....	7
2. INTRODUÇÃO .....	8
2.1. Modelo Animal .....	11
2.2. Diferenciação Sexual em Mamíferos .....	12
2.3. Formação dos Testículos .....	14
2.4. Espermatogênese .....	16
2.5. Espermatogênese no Homem .....	18
2.6. Regulação Hormonal .....	20
2.7. Quimioterapia.....	22
2.8. Depleção da Célula-tronco Espermatogonial.....	24
2.9. Criopreservação.....	25
2.10. Criopreservação de Espermatogônias.....	27
2.11. Transplante de Espermatogônias .....	28
3. OBJETIVO.....	33
4. REFERÊNCIAS.....	34
5. ARTIGO EM PORTUGUÊS: Estabilidade do busulfano após a diluição: efeito na depleção da espermatogênese em ratos Wistar .....	41
6. ARTIGO EM INGLÊS: Busulfan stability after dilution: effects in spermatogenesis depletion in Wistar rats.....	72
7. ARTIGO EM PORTUGUÊS: Preservação da função testicular (endócrina e reprodutiva) em ratos Wistar após criopreservação e transplante .....	101
8. CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	149

## 1. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Divisão das células germinativas .....	13
Figura 2. Testículo.....	16
Figura 3. Túbulo seminífero com as células envolvidas na espermatogênese e tecido adjacente.....	18
Figura 4. Tipos de lesão que podem ocorrer durante a criopreservação celular.....	28
Figura 5. Evolução das espermatogônias desde As até espermatogônia B .....	29
Figura 6. duas possibilidades de divisão das células tronco.....	30
Figura 7. Divisão simétrica X divisão assimétrica das células tronco.....	31

## 2. INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos a fertilidade foi muito valorizada. O homem da pré-história já demonstrava preocupação em garantir a continuidade de sua espécie através de figuras femininas que esculpiam em pedra ou marfim com formas avantajadas como seios e quadris enormes, e também através de desenhos rudimentares em cavernas cujas figuras representavam famílias, o que evidencia a importância da fertilidade naquela época (1).

Na Grécia antiga, a mitologia era utilizada para explicar fenômenos naturais e episódios que ocorriam sem a interferência do homem. Assim, surgiu Afrodite, a deusa grega da beleza, do amor e da procriação que gerou muitos filhos, entre eles, Príapo, deus da fertilidade (2, 3).

A capacidade de procriar sempre foi um fator de grande importância para humanidade. Historicamente a fertilidade sempre foi fundamental para a sobrevivência das populações e, por isso, socialmente aceita e encorajada. A esterilidade era, por outro lado, considerada uma doença vergonhosa, uma maldição dos deuses, a qual era necessária conjurar com rituais religiosos e mágicos, sendo sobretudo a mulher quem, em regra, era culpada e muitas vezes desprezada e maltratada pelo fato de não ter filhos (4).

Sendo assim, é importante considerar que a fertilidade é um fator propulsor da humanidade. O interesse por seu estudo deve continuar com a finalidade de manter e preservar a capacidade reprodutiva porque envolve questões físicas, emocionais e até mesmo sociais.



Os tratamentos realizados em crianças e adolescentes com câncer vêm melhorando a cada ano. A maioria dos pacientes submetidos a tratamentos oncológicos, atualmente está sobrevivendo pelo menos 5 anos após o diagnóstico e muitos estão alcançando a vida adulta (5). Estes índices de sobrevivência começaram a aumentar na década de 60, quando 3 em 10 pacientes sobreviviam aos tratamentos quimioterápicos. Nos últimos 40 anos, estes números aumentaram consideravelmente, demonstrando que 8 em cada 10 pacientes sobrevivem 5 ou mais anos após o diagnóstico. Os avanços alcançados em relação aos tratamentos oncológicos vêm colaborando para o aumento destes índices (6, 7).

Os tratamentos quimioterápicos são extremamente tóxicos e afetam diretamente as funções gonadais, causando danos irreversíveis aos testículos e, indiretamente, às funções do eixo hipotálamo-hipófise (8, 9). Pode ocorrer declínio abrupto de androgênios, causando sintomas de função sexual reduzida, perda de energia e efeito negativo sobre a massa óssea (10). Logo, a sobrevivência destes indivíduos acarreta, a longo prazo, preocupações relacionadas ao potencial de fertilidade na vida adulta (11, 12).

A capacidade reprodutiva dos pacientes que sobrevivem aos tratamentos quimioterápicos torna-se diminuída, principalmente em indivíduos com idade entre 15 e 44 anos. Pacientes diagnosticados entre zero e quatro anos de idade são mais aptos a procriar do que os indivíduos que são diagnosticados na adolescência (5, 13, 14). Estas informações são extremamente relevantes e devem ser ressaltadas no início dos tratamentos oncológicos quando realizados na infância (5), devido ao futuro reprodutivo, que acaba ficando entre os parâmetros menos

considerados. Após a cura do tumor maligno, a infertilidade pode se tornar um problema (15) devido à diminuição da capacidade reprodutiva. Existe a possibilidade de ocorrer um forte impacto psicológico que poderá interferir no bem-estar do paciente quando este alcançar a vida adulta (15-17).

Apesar de não serem todos os tratamentos oncológicos que afetam a fertilidade, um número significativo de crianças que sobrevivem à ação destes agentes estão sob o risco de se tornarem inférteis. Após os tratamentos quimioterápicos, a maioria das células germinativas responsáveis pelo processo reprodutivo são eliminadas. Isto ocorre especialmente em meninos na fase da pré-puberdade quando são submetidos a altas doses de quimioterápicos ou irradiações (15, 18, 19).

A viabilidade de transplantes gonadais foi previamente demonstrada em ovários, nos quais o transplante subcutâneo sem anastomose vascular em ratas foi capaz de preservar as funções endócrinas. Esta técnica não apresenta dificuldades, e pode ser usada para preservar a fertilidade ou minimizar os efeitos indesejáveis da ovariectomia perimenopáusicas (20). Semelhante ao que foi feito com tecido ovariano, bancos testiculares oferecem uma possibilidade de conservar a capacidade reprodutiva, se o material biológico for transplantado com sucesso (21).

Portanto, para garantir a qualidade de vida destes pacientes na fase em que desejarem procriar, é necessário focar estas questões antes, durante e após os tratamentos oncológicos. Assim novas possibilidades irão surgir com a

finalidade de restaurar e preservar a capacidade reprodutiva destes pacientes tão jovens.

## **2.1. Modelo Animal**

Os ratos da raça Wistar (*Rattus norvegicus*) vêm sendo utilizados na área das ciências médicas e na biologia experimental, e têm demonstrado serem sensíveis aos agentes tóxicos (medicamentos). Estudos que utilizam mamíferos nos experimentos têm a intenção de reproduzir situações onde o ser humano é quem estaria exposto a estes agentes. Contudo, ao avaliar os resultados destes estudos é necessário observar vários fatores como: aspectos anatômicos, fisiológicos, reprodutivos e comportamentais. Assim, os dados que irão extrapolar para os seres humanos deverão ser interpretados com muita cautela (22).

Os ratos Wistar como modelos animais são frequentemente utilizados para estudos de fisiologia da reprodução, sendo que sua maior vantagem é o fato de desenvolver um ciclo reprodutivo extremamente curto quando comparado a outros animais como o macaco, ovelha e outros. O mesmo ocorre nos estágios da puberdade, do ciclo estral, na gestação e na lactação. Também é importante considerar que os testículos de mamíferos em geral, assim como nos seres humanos, são órgãos complexos que se caracterizam por realizarem duas funções: síntese de hormônios esteróides e o desenvolvimento do processo da espermatogênese (23). Portanto, o rato é um modelo animal que certamente tem sua posição garantida nas pesquisas que desenvolvem técnicas que buscam

aprimorar as questões reprodutivas e conseqüentemente preservar a fertilidade em seres humanos (22).

## **2.2. Diferenciação Sexual em Mamíferos**

Assim como nas outras espécies de mamíferos, o gene SR<sub>Y</sub>, localizado no braço curto do cromossomo Y, é o gene responsável pela formação dos testículos nos ratos e nos humanos (24, 25). As gônadas iniciam seu desenvolvimento quando surgem as células germinativas primordiais em ambos os sexos (26). O tecido torna-se oogônia nas fêmeas ou pró-espermatogônia nos machos e então finalmente formam os ovários e os testículos (27). A diferenciação sexual em mamíferos está dividida em 4 estágios: determinação genética do sexo; formação de gônadas bipotenciais ou estruturas neurais; determinação das gônadas; e diferenciação dos ductos sexuais acessórios com genitálias externas (28).

A determinação gênica do sexo, isto é, se o embrião possui cariótipo XX ou XY, não é o suficiente para determinar o desenvolvimento de testículos ou ovários. Para tanto ocorre um processo de divisão celular conhecido como meiose. Uma célula diplóide (2n) dá origem a quatro células haplóides (n). Porém, para formar estas quatro células, é necessário que ocorra duas etapas consecutivas denominadas meiose I e meiose II. Desta forma o número de cromossomos das células de linhagem germinativa irá reduzir pela metade nos gametas, permitindo a formação de um zigoto após a fecundação que mantém o número característico da espécie (figura 1) (29).

## ESPERMATOGÊNESE

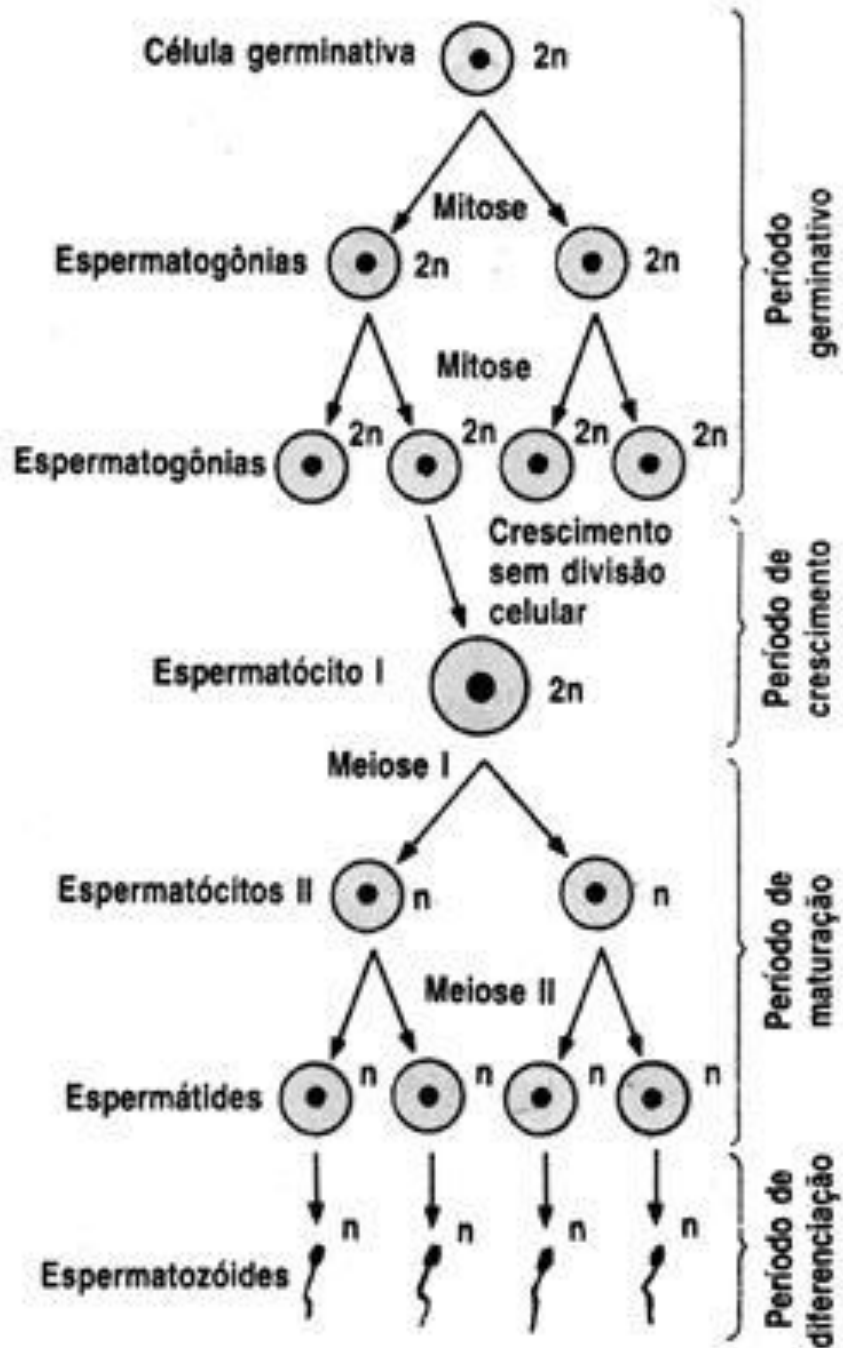


Figura 1. Divisão das células germinativas

Uma vez que os órgãos sexuais são constituídos de gônadas primordiais indiferenciadas e bipotenciais, outros fatores irão conduzir o processo de diferenciação. Estruturas acessórias deverão ser ativadas para que ocorra a diferenciação sexual. Os ductos de Wolff e de Müller irão dar origem aos sistemas genitais internos dos machos e das fêmeas respectivamente. Para que ocorra a diferenciação para testículos, as células de Sertoli secretam o hormônio anti-mülleriano (AMH). Este hormônio irá promover a regressão dos ductos de Müller que originariam o sistema interno feminino. A secreção de testosterona pelas células de Leydig resulta na proliferação dos ductos masculinos, com posterior masculinização da genitália externa. Mas se durante o processo de diferenciação ocorrer ausência do AMH, esta se encaminhará para formação da genitália feminina (30). Portanto, em mamíferos, pode-se considerar que o sexo feminino é o sexo estabelecido, enquanto o sexo masculino é o sexo induzido geneticamente (24).

### **2.3. Formação dos Testículos**

Os testículos são estruturas que possuem forma ovóide, localizados na bolsa escrotal e suspensos por um cordão espermático (figura 2). O testículo é envolto por uma cápsula de natureza conjuntiva, que se chama *túnica albugínea*. A túnica albugínea envia para o interior do testículo delgado septos conhecidos como séptulos dos testículos, os quais se subdividem em lóbulos. Nos lóbulos dos testículos encontramos grande quantidade de finos ductos, de calibre quase capilar, que são denominados túbulos seminíferos contorcidos. Nesses túbulos se formam os espermatozóides. Os túbulos seminíferos convergem para o mediastino dos

testículos e vão se formando túbulos seminíferos retos, os quais se entrecruzam formando uma verdadeira rede testicular (*rete testis*) ao nível do mediastino. Os túbulos seminíferos retos desembocam em dez a quinze ductos eferentes, que são destinados ao transporte dos espermatozóides até o epidídimo. O processo de maturação iniciado no epidídimo poderá se completar nos canais deferentes, que funcionam como uma bomba transportadora (31).

No epidídimo ocorre a maturação dos espermatozóides. A integridade funcional do epidídimo e o amadurecimento dos gametas dependem diretamente da ação de androgênios produzidos pelas células de Leydig. O processo de maturação iniciado no epidídimo poderá se completar nos canais deferentes, que funcionam como uma bomba transportadora de espermatozóides da cauda do epidídimo até sua porção apolar. Após este processo, o produto final da ejaculação é um sêmen composto além de espermatozóides maduros, de outras substâncias fornecidas por glândulas acessórias (32).

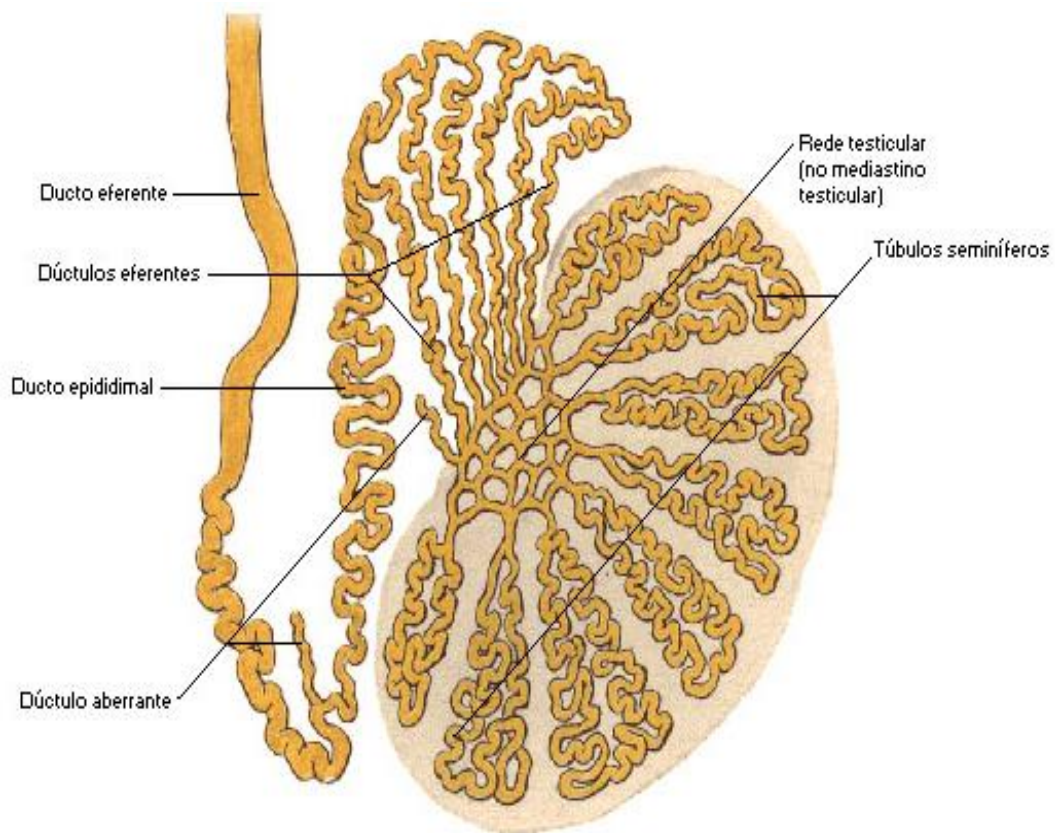


Figura 2. Testículo

Fonte: NETTER, F H. (2000). Atlas de Anatomia Humana, 2ed. Porto Alegre: Artmed.

## 2.4. Espermatogênese

Nos mamíferos a espermatogênese é um processo contínuo de diferenciação celular no qual é possível perceber 3 fases distintas que envolvem: a auto-renovação espermatogonial e proliferação, a meiose e a espermiogênese (processo de diferenciação da espermátide em espermatozóide). A fase inicial da proliferação espermatogonial ocorre no compartimento basal do epitélio seminífero



(33) e consiste na proliferação mitótica das células-tronco que formam em sequência a espermatogônia do tipo A, a espermatogônia intermediária e a espermatogônia do tipo B (34). A espermatogônia do tipo B se divide para formar os espermatócitos primários que irão sofrer uma replicação do DNA nuclear antes do início da fase meiótica.

A fase meiótica termina com a primeira redução celular onde ocorre a formação dos espermatócitos secundários. Logo após, as células sofrem uma segunda redução, se tornam células haplóides e passam a se chamar espermatídes. A última fase da espermatogênese consiste em uma transformação morfológica complexa das células germinativas haplóides. Estas células se transformam em espermatídes tardias conhecidas como espermatozóides, que por fim são liberados no lúmen dos túbulos seminíferos (figura 3) (35).

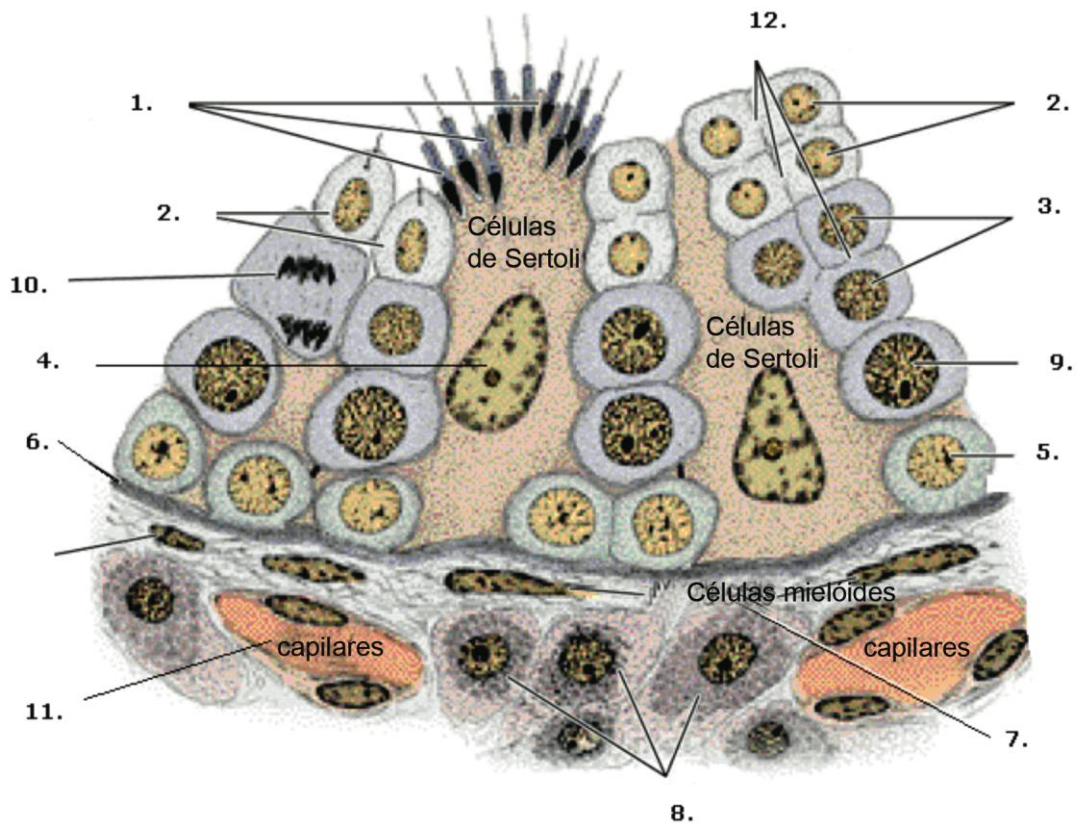


Figura 3. Túbulo seminífero com as células envolvidas na espermatogênese e tecido adjacente.

**FONTE:** Junqueira, L. C. U., J. Carneiro, et al. (1975). Basic histology. A Concise medical library for practitioner and student. Los Altos, Calif., Lange Medical Publications.

Legenda: 1. espermatozóide; 2. espermátide; 3. espermatócito secundário; 4. célula de Sertoli; 5. espermatogônia; 6. lâmina basal; 7. fibroblasto; 8. células intersticiais do testículo (células de Leydig); 9. espermatócito primário; 10. célula em divisão; 11. vaso; 12. pontes citoplasmáticas.

## 2.5. Espermatogênese no Homem

A reprodução torna-se viável a partir da puberdade, embora o termo seja utilizado muitas vezes para descrever eventos pré-puberais, como crescimento

de pêlos axilares, pubianos e crescimento genital. Durante os anos que precedem a adolescência, as quantidades de FSH e LH são baixas. Entretanto, na adolescência, a glândula adrenal secreta quantidades aumentadas de andrógenos, que induzem ao crescimento de pêlos axilares e pubianos, distribuição de gordura, crescimento linear e maturação óssea (36).

A espermatogênese ocorre nos testículos, que são estruturas constituídas por túbulos seminíferos e pelas células de Leydig. Os túbulos seminíferos são avasculares e possuem dois tipos de células: as de Sertoli e as germinativas. Na puberdade, as células germinativas (espermatogônias), que são as células-tronco do epitélio germinativo masculino, diferenciam-se em espermatócito, espermatíde e espermatozóide. A espermatogênese no homem requer aproximadamente 70 dias e durante todo o processo as células de Sertoli irão participar da regulação e diferenciação das espermatogônias (37).

No adulto as espermatogônias proliferam rapidamente, o que as torna muito sensíveis às drogas citotóxicas. As células de Leydig e de Sertoli que não proliferam no adulto são menos sensíveis, entretanto no período pré-puberal podem ser afetadas por agentes gonadotóxicos, muitas vezes impedindo a completa puberdade. O componente endócrino testicular é mais sensível em crianças do que em adultos. O epitélio germinativo das crianças apesar de não estar em proliferação constante, não é mais resistente que o do adulto, quando se está avaliando doses de radioterapia e quimioterapia (38).

## 2.6. Regulação Hormonal

A regulação hormonal da espermatogênese se inicia no hipotálamo com a secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) estimulando a hipófise a secretar LH e FSH, que regulam de forma complexa a espermatogênese e a produção de testosterona pelos testículos. O LH estimula a conversão do colesterol em testosterona nos testículos (nas células Leydig), e o FSH atua nas células de Sertoli e é responsável pela diferenciação das células germinativas. Os níveis séricos de FSH são utilizados clinicamente para estimar o número de espermatozoides (14).

Durante a espermatogênese, um hormônio inibidor do FSH, a inibina, é produzida pelos testículos em sistema de *feedback* negativo. Sob a ação da testosterona e do FSH, as células de Sertoli secretam a inibina. O *feedback* negativo da inibina ocorre na hipófise anterior, inibindo o FSH e quando a espermatogênese está alterada, a inibina deixa de ser produzida, ocorrendo assim elevação dos níveis séricos de FSH. Portanto, elevações dos níveis séricos de FSH podem servir como marcadores de danos testiculares (39-41). A testosterona é sintetizada a partir do colesterol pelas células de Leydig e está sob o controle do LH secretado pela hipófise. A secreção de LH diminui com o aumento dos níveis de testosterona no sangue através de *feedback* negativo. Portanto, de forma semelhante à inibina, a testosterona atua regulando negativamente a liberação de LH (42, 43).

Alterações da espermatogênese estão presentes em pacientes com vários tipos de neoplasias mesmo antes do início do tratamento. A doença de

Hodgkin compromete a qualidade do sêmen: 16 a 50% dos pacientes têm oligospermia e 2 a 8% azoospermia (44).

Rivkees e colaboradores, em 1988, realizaram um estudo (14) compreendendo 456 pacientes tratados com ciclofosfamida para doença renal, doença de Hodgkin e leucemia. O grupo consistia de 318 pacientes do sexo masculino e 137 pacientes do grupo feminino. Os pacientes foram classificados em fase de pré-puberal, puberal e sexualmente maduro, conforme os critérios de Tanner (45). As doses de quimioterapia não foram quantificadas devido aos diferentes regimes de tratamentos. Os resultados demonstraram que os danos gonadais induzidos pela quimioterapia, afetaram mais os pacientes sexualmente maduros do que os pacientes tratados na fase pré-puberal. Também foi possível verificar que os pacientes do sexo masculino foram significativamente mais afetados que os pacientes do sexo feminino, quando tratados por doença renal ou doença de Hodgkin. Este estudo ainda demonstrou que pacientes tratados para doença de Hodgkin foram mais lesados na função gonadal em relação àqueles tratados para leucemia devido a altas doses de ciclofosfamida utilizadas, a qual não faz parte do regime de tratamento para leucemia. Portanto todos os pacientes devem ser avaliados quanto a história reprodutiva e sexual antes dos tratamentos citotóxicos, porque o comprometimento no desenvolvimento puberal, da libido, da ejaculação e criptorquidia, já podem estar presentes (46).

## 2.7. Quimioterapia

As primeiras observações sobre ações deletérias de agentes tóxicos foram observados durante a primeira guerra mundial, quando mostardas nitrogenadas e sulfonadas foram utilizadas na guerra química, em virtude de sua ação vesicante na pele e mucosa. Este agente foi desenvolvido em 1822 e utilizado pelo exército alemão contra os ingleses. A quimioterapia que conhecemos hoje foi desenvolvida na década de 40 à 50 do século XX, após a segunda guerra mundial, através do uso da arma química conhecida como gás mostarda. O gás disperso na forma de aerossol tem como propriedades promover lesões na pele, irritação nos olhos, e na época da guerra tinha como objetivo deixar os soldados incapacitados para o combate. Este agente também agia rapidamente na destruição dos linfócitos (linfonodos, baço e timo), reduzia os granulócitos e lesava células epiteliais da mucosa intestinal.

Louis S Goodman e Alfred Gilman eram farmacologistas e ao investigarem pessoas expostas à mostarda nitrogenada notaram diminuição na contagem de leucócitos, como também em autópsias de pessoas expostas ao gás mostarda notaram importante diminuição das células da medula óssea e dos órgãos linfóides. Como a medula óssea é um tecido que apresenta alta taxa de proliferação celular, formularam a hipótese de que o gás mostarda poderia ser utilizado para o tratamento de câncer. Assim elaboraram o experimento com modelo animal, camundongos de laboratórios, injetando mostarda nitrogenada nos animais com linfoma. Então, constataram reduções dos tumores (47).

Mais tarde estudos foram realizados em pacientes com Linfoma não-Hodgkin, demonstrando redução na dimensão dos tumores. Assim, a quimioterapia iniciou através da observação de um de seus efeitos colaterais mais importantes, ou seja, a diminuição da produção da medula óssea (48).

Em 1965 houve grande avanço no tratamento oncológico, porque James Holland, Emil Freireich e Emil Frei elaboraram a hipótese de que a quimioterapia deveria seguir a estratégia de tratamento antibiótico para tuberculose com combinações de drogas, cada um com um mecanismo de ação diferente. Com a estratégia da poliquimioterapia, ocorreram avanços em relação às taxas de resposta aos tratamentos, entretanto os efeitos colaterais ocasionados pelos tratamentos foram e continuam sendo pontos importantes para o sucesso das terapias (49).

Atualmente a quimioterapia e a radioterapia são os tratamentos usuais contra os tumores malignos. Os efeitos adversos destes tratamentos podem causar danos permanentes ou a longo-prazo às funções gonadais, devido à toxicidade que estes apresentam. No sistema reprodutor masculino estes efeitos podem promover disfunções endócrinas, como a redução nos níveis de testosterona (50), mas a manifestação mais importante é a redução prolongada na produção de espermatozoides, podendo causar comprometimento na fertilidade. A intensidade do dano causado nas gônadas vai depender: da idade em que o paciente realizou o tratamento, a região onde o agente foi aplicado, o tipo de irradiação, a dose e a natureza do agente e o sexo do paciente (51). A maturação dos testículos também revela o grau de dano gonadal. Estudos realizados demonstraram que testículos na

pré-puberdade são menos sensíveis aos agentes citotóxicos do que na pós-puberdade (14).

A duração e a permanência da oligo ou azoospermia vão depender da natureza do agente citotóxico e da dose utilizada (15). Os agentes mais prejudiciais às gônadas masculinas são os agentes alquilantes devido à capacidade de interferir nas funções do DNA através da alquilação. Contudo são muito utilizados em procedimentos que envolvem a depleção das células germinativas (52, 53).

Em experimentos com ratos, verificou-se que a cisplatina em altas doses provocou lesão importante em espermatócitos e espermatídes, porém não foram evidenciados danos nas espermatogônias, o que acarretaria infertilidade transitória. Vários autores sugerem que a cisplatina por si só ou combinada com outros agentes, pode ser responsável pela disfunção transitória das células de Leydig (54).

## **2.8. Depleção da Célula-tronco Espermatogonial**

Há muitas formas de depletar as células germinativas dos túbulos seminíferos, entretanto poucas atingem especificamente as espermatogônias A (55). Diferente de outros agentes quimioterápicos que destroem vários tipos de espermatogônias, o busulfano é um potente agente que danifica preferencialmente a célula-tronco espermatogonial ( $A_s$ ) (56, 57) e a dose para causar dano testicular é espécie-específica (55). O busulfano é um agente quimioterápico, alquilante e citostático, facilmente absorvido pelo trato gastrointestinal e apresenta uma meia-



vida de 2 à 3 horas. É metabolizado no fígado, onde é conjugado com a glutatona e oxidado, sendo excretado através da urina. Seus efeitos colaterais se manifestam em diferentes órgãos como: bexiga, fígado, pele, sistema nervoso e gônadas. Exerce atividades imunossupressoras e interfere nas funções do DNA através da alquilação e ligações cruzadas na fita do DNA (56).

## **2.9. Criopreservação**

Para a célula viva se manter viável após um longo período de armazenamento, deve se encontrar em um estado de inativação, no qual possa permanecer durante um longo período e também ser trazida de volta à atividade em algum ponto no futuro (58).

A temperatura normalmente utilizada para o armazenamento de células em mamíferos é  $-196^{\circ}\text{C}$ , o que corresponde à temperatura do nitrogênio líquido. Considerando que os tecidos biológicos se encontram na temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ , os maiores danos durante a criopreservação encontram-se entre as transições das temperaturas: no congelamento até  $-196^{\circ}\text{C}$  e no descongelamento até  $37^{\circ}\text{C}$  (58). Na criopreservação, a formação de cristais de gelo durante o processo é um dos principais problemas que devem ser evitados. Entretanto, a formação de altas concentrações de eletrólitos e solutos também são fatores que prejudicam a criopreservação devido à ação tóxica que atinge as proteínas intracelulares. Por outro lado, durante o descongelamento, a água é liberada, e ocorre um decréscimo de osmolaridade da solução ao seu redor. Este fator também pode comprometer o sucesso da técnica (59).

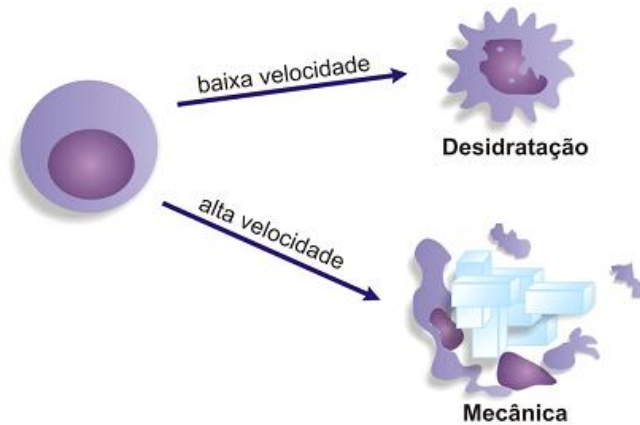
Assim, a simples imersão do tecido celular no nitrogênio líquido torna este método um procedimento inviável. Portanto, a utilização de substâncias crioprotetoras adjuvantes, com o objetivo de evitar o dano celular, tem se apresentado como um consenso. Os crioprotetores podem ser permeáveis ou impermeáveis. Os crioprotetores permeáveis (dimetilsulfóxido e propileno-glicol, etileno-glicol e glicerol) ao serem absorvidos pelas células, formam pontes de hidrogênio com as moléculas de água, prevenindo a formação de cristais. Desse modo, a presença do crioprotetor na solução dilui os eletrólitos e sua toxicidade. Por outro lado o crioprotetor impermeável (sacarose e trehalose) age extraindo o excesso de água intracelular, levando à desidratação da célula e, quando em conjunto com o permeável, aumenta a concentração desse último no espaço intracelular. Os crioprotetores mais utilizados são: dimetilsulfóxido (DMSO); 1,2-propanodiol (PROH); etileno-glicol (EG) e o Glicerol (60).

Além disso, os crioprotetores exercem um importante papel durante o descongelamento. A água gerada pelo derretimento do gelo diminui a pressão osmótica extracelular. O choque extracelular pode ocorrer se o crioprotetor intracelular não puder se difundir rápido o suficiente para prevenir o influxo de água, o inchaço e conseqüentemente a ruptura da célula. Assim, a maioria dos protocolos de descongelamento utiliza o crioprotetor não permeável para evitar que isso ocorra (58). Portanto as maneiras conhecidas que colaboram para evitar as lesões celulares são basicamente duas: aplicação da velocidade ideal para o descongelamento em relação ao o tipo de célula em questão, e o emprego de agentes crioprotetores que minimizam a formação de cristais de gelo e diminuem a intensidade da desidratação celular (61).

## 2.10. Criopreservação de Espermatogônias

A criopreservação de tecido testicular é uma técnica que beneficia pacientes pré-puberes que ainda não são capazes de produzir espermatozóides, mas possuem testículos ricos em espermatogônias e irão ser submetidas à quimioterapia ou a radioterapia. Também é uma opção atraente para meninos na pós-puberdade e adultos jovens que já desenvolveram suas funções gonadais e desejam procriar no futuro, sem o uso dos métodos que a reprodução assistida oferece (62).

A criopreservação é uma técnica que permite o armazenamento de células germinativas onde a integridade estrutural celular é mantida devido ao uso de crioprotetores (63). Estes crioprotetores protegem as células das lesões produzidas pelo congelamento (figura 4) (60). Outra indicação para criopreservação de células testiculares é para pacientes jovens que serão submetidos ao transplante de medula óssea e que irão ter prejuízos nos níveis de androgênios (64, 65). Nestes casos, a criopreservação seguida de re-injeção de uma suspensão celular de células germinativas ou o transplante de tecido testicular intacto, em fatia, poderá ser uma alternativa. Vislumbra-se que após a radio e a quimioterapia as espermatogônias retiradas possam ser re-injetadas nos túbulos, repovoando os testículos de células germinativas. Existem controvérsias quanto ao retorno das células potencialmente neoplásicas aos pacientes considerados curados. Isto é uma contra-indicação em tumores de testículo e leucemias, porém em outros tumores este risco é mínimo (66, 67).



**Figura 4.** Tipos de lesão que podem ocorrer durante a criopreservação celular

**FONTE:** <http://www.fmrp.usp.br/revista>

### 2.11. Transplante de Espermatogônias

Atualmente, a única opção teórica existente para a preservação da fertilidade de crianças na pré-puberdade é a preservação das células-tronco espermatogoniais, através da criopreservação, seguida de transplante autólogo intratesticular (15). Por outro lado, pacientes entre 15 e 45 anos de idade possuem outras opções para conservar a capacidade reprodutiva, como: criopreservação do sêmen; aspiração do sêmen testicular (TESA); extração do sêmen testicular (TESE) através da biópsia testicular e a injeção intracitoplasmática (ICSI) no caso de azoospermia ou obstrução do epidídimo. É importante salientar que o material biológico deve ser coletado antes do tratamento oncológico de qualquer natureza. Esta condição irá garantir a ausência de células que apresentam alterações no DNA no material transplantado (15, 68).

Em modelos animais, a preservação da fertilidade através do transplante de espermatogônias têm se mostrado um método bastante promissor (69).

As células-tronco espermatogoniais iniciam a espermatogênese e possuem a capacidade de se auto-renovar formando células idênticas nos túbulos seminíferos, se diferenciando após as divisões mitóticas. As espermatogônias se dividem aproximadamente 9 a 11 vezes antes do início da meiose (70, 71). O processo espermatogênico se desenvolve até as células atingirem a maturação, quando finalmente o genoma é transmitido para as próximas gerações através de espermatozóides especializados (15).

Estudos realizados em roedores (camundongos e ratos) demonstraram que estes animais possuem mais de nove tipos de espermatogônias que se dividem em 3 subclasses distintas, são elas: as espermatogônias A, as intermediárias e as espermatogônias B (figura 5) (72).

**A<sub>s</sub> → A<sub>pr</sub> → A<sub>a14</sub> → A<sub>a18</sub> → A<sub>1</sub> → A<sub>2</sub> → A<sub>3</sub> → A<sub>4</sub> → In → B**

Figura 5. Evolução das espermatogônias desde A<sub>s</sub> até espermatogônia B

**FONTE:** de Rooij, D. G. and L. D. Russell (2000). "All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask." J Androl **21**(6): 776-798.

Entre as espermatogônias A, existe a do tipo isolada ( $A_s$ ), que é a mais primitiva e também é considerada a célula-tronco dos testículos (73). As espermatogônias  $A_s$  são as únicas células da espermatogênese que não apresentam pontes de conexão intercelulares (figura 6) (15, 69).

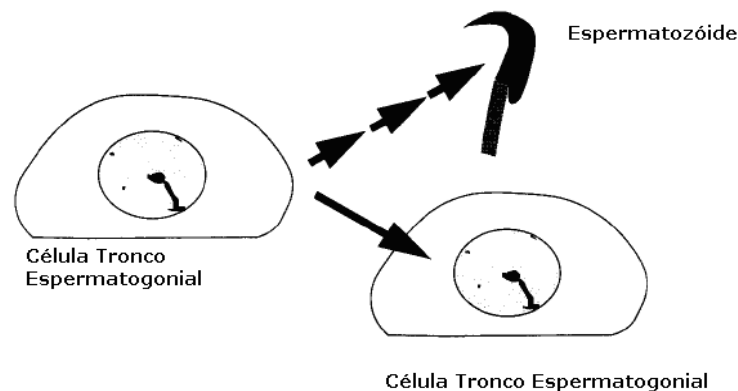


Figura 6. Duas possibilidades de divisão das células tronco.

**FONTE:** de Rooij, D. G. and L. D. Russell (2000). "All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask." *J Androl* **21**(6): 776-798.

Estas pontes permitem o compartilhamento do material genético entre as células idênticas e quando o material genético é compartilhado entre as células adjacentes as atividades celulares se tornam sincronizadas (74, 75). As pontes intercelulares estão presentes nas espermatogônias germinativas e são comprometidas com a formação de espermatozoides, e as espermatogônias  $A_s$  são as células-tronco especializadas em formar células idênticas (figura 7) (69).

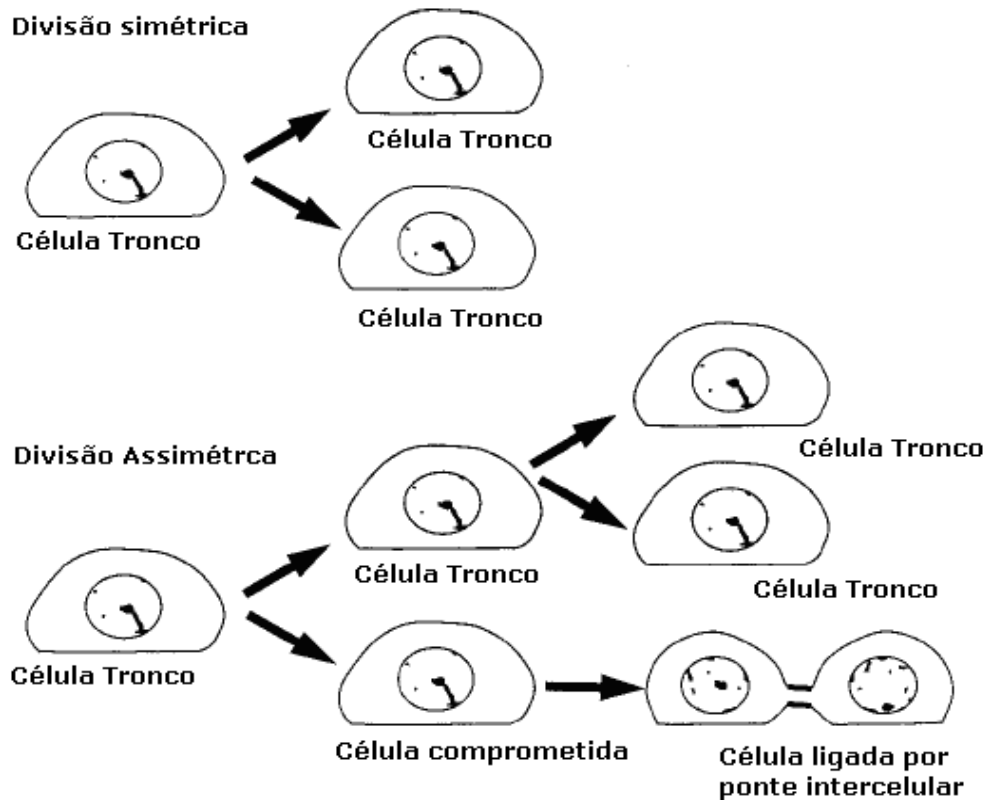


Figura 7. Divisão simétrica X divisão assimétrica das células tronco

**FONTE:** de Rooij, D. G. and L. D. Russell (2000). "All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask." *J Androl* **21**(6): 776-798.

O primeiro transplante de células-tronco espermatogoniais foi realizado em camundongos, em 1994, por Brinster e colaboradores. Neste experimento, as espermatogônias  $A_s$  dos doadores férteis foram injetadas nos túbulos seminíferos dos receptores inférteis. Assim foi possível observar que as células dos doadores eram capazes de colonizar os túbulos seminíferos dos receptores e manter o

processo reprodutivo ativo. O transplante resultou em uma espermatogênese e uma produção espermática com características genéticas dos doadores (56, 57).

Após os primeiros estudos, mais experimentos foram realizados com algumas modificações. Em 1996, Avarbock e colaboradores introduziram a técnica de criopreservação seguida de transplante de espermatogônias. Pela primeira vez, foi possível congelar material biológico de roedores (murinos) sob forma de suspensão celular (76). Estes resultados foram encorajadores, sugerindo que este poderá ser um método promissor. No entanto, mais estudos deverão ser realizados a fim de otimizar a restauração da fertilidade, inclusive em seres humanos (77, 78).



### **3. OBJETIVO**

Verificar a manutenção das funções endócrina e reprodutiva após criopreservação e transplante homólogo de testículo.

#### 4. REFERÊNCIAS

1. Witcombe CLCE. Venus of Willendorf. Porto Alegre, RS2005 [cited 2011 18/01]; Available from: <http://witcombe.sbc.edu/willendorf/>.
2. Stoll HW, Arnold TK, Paul RB. Handbook of the Religion and Mythology of the Greeks, with a short account of the religious system of the Romans ... Translated from the German by R. B. Paul, ... and edited by T. K. Arnold: London; 1852.
3. . 1 ed. São Paulo: Editora Abril Cultural; 1973. Dicionário de Mitologia Greco-Romana; p. 192.
4. Ferrari AN. Infertilidade Involuntária e Aspectos Epidemiológicos. In: LTDA LR, editor. Infertilidade Conjugal. 1 ed. São Paulo1991. p. 13-4.
5. Green DM, Kawashima T, Stovall M, Leisenring W, Sklar CA, Mertens AC, et al. Fertility of male survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. J Clin Oncol. 2010 Jan 10;28(2):332-9.
6. Stiller C. Childhood cancer in Britain : incidence, survival, mortality. Oxford: Oxford University Press; 2007.
7. Robison LL, Armstrong GT, Boice JD, Chow EJ, Davies SM, Donaldson SS, et al. The Childhood Cancer Survivor Study: a National Cancer Institute-supported resource for outcome and intervention research. J Clin Oncol. 2009 May 10;27(14):2308-18.
8. Sklar C. Reproductive physiology and treatment-related loss of sex hormone production. Med Pediatr Oncol. 1999 Jul;33(1):2-8.
9. Sklar CA, Constine LS. Chronic neuroendocrinological sequelae of radiation therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1995 Mar 30;31(5):1113-21.
10. Davis SR, Burger HG. Clinical review 82: Androgens and the postmenopausal woman. J Clin Endocrinol Metab. 1996 Aug;81(8):2759-63.
11. Oosterhuis BE, Goodwin T, Kiernan M, Hudson MM, Dahl GV. Concerns about infertility risks among pediatric oncology patients and their parents. Pediatr Blood Cancer. 2008 Jan;50(1):85-9.
12. Zebrack BJ, Casillas J, Nohr L, Adams H, Zeltzer LK. Fertility issues for young adult survivors of childhood cancer. Psychooncology. 2004 Oct;13(10):689-99.

13. Sherins RJ, Olweny CL, Ziegler JL. Gynecomastia and gonadal dysfunction in adolescent boys treated with combination chemotherapy for Hodgkin's disease. *N Engl J Med*. 1978 Jul 6;299(1):12-6.
14. Rivkees SA, Crawford JD. The relationship of gonadal activity and chemotherapy-induced gonadal damage. *JAMA*. 1988 Apr 8;259(14):2123-5.
15. Geens M, Goossens E, De Block G, Ning L, Van Saen D, Tournaye H. Autologous spermatogonial stem cell transplantation in man: current obstacles for a future clinical application. *Hum Reprod Update*. 2008 Mar-Apr;14(2):121-30.
16. Schover LR. Motivation for parenthood after cancer: a review. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2005(34):2-5.
17. van den Berg H, Repping S, van der Veen F. Parental desire and acceptability of spermatogonial stem cell cryopreservation in boys with cancer. *Hum Reprod*. 2007 Feb;22(2):594-7.
18. Waring AB, Wallace WH. Subfertility following treatment for childhood cancer. *Hosp Med*. 2000 Aug;61(8):550-7.
19. Wallace WH, Thomson AB. Preservation of fertility in children treated for cancer. *Arch Dis Child*. 2003 Jun;88(6):493-6.
20. Miragem A, Neto BS, Reche M, Kliemann LM, Capp E, von Eye Corleta H. Subcutaneous autologous testicle transplantation in Wistar rats. *Int Urol Nephrol*. 2009;41(2):313-8.
21. Yin H, Wang X, Kim SS, Chen H, Tan SL, Gosden RG. Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype. *Hum Reprod*. 2003 Jun;18(6):1165-72.
22. Krinke G. *The laboratory rat*. San Diego, Calif.: Academic Press; 2000.
23. Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003 Apr 11;1:35.
24. Freitas F, Menke CH, Rivoire Wa, Passos EP. *Diferenciação sexual. Rotinas em ginecologia*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed; 2001. p. 584.
25. Knobil E, Neill JD. *The physiology of reproduction*. 2nd ed. ed. New York: Raven Press; 1994.

26. Hebel R, Stromberg MW. Anatomy and embryology of the laboratory rat. Wo\0308rthsee: BioMed Verlag; 1986.
27. Huckins C, Clermont Y. Evolution of gonocytes in the rat testis during late embryonic and early post-natal life. Arch Anat Histol Embryol. 1968;51(1):341-54.
28. Dubin RA, Ostrer H. Sry is a transcriptional activator. Mol Endocrinol. 1994 Sep;8(9):1182-92.
29. Griffiths AJF. An introduction to genetic analysis. 7th ed. ed. New York: W.H. Freeman; 2000.
30. Carrillo A, Berkovitz G. Genetic Mechanisms that Regulate Testis Determination. Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders. 2004;5(1):77-82.
31. Netter FH. Atlas of human anatomy. 5th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2010.
32. Ferrari AN. Fator Masculino. Infertilidade Conjugal. São Paulo: L. R. LTDA.; 1991.
33. Dym M, Fawcett DW. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. Biol Reprod. 1970 Dec;3(3):308-26.
34. Leblond CP, Clermont Y. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. Am J Anat. 1952 Mar;90(2):167-215.
35. Bellve AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. J Cell Biol. 1977 Jul;74(1):68-85.
36. Villee CA. Editorial: Puberty and chemotherapy. N Engl J Med. 1976 May 20;294(21):1177-8.
37. Speroff L, Fritz MA. Male Infertility. In: Wilkins LWA, editor. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 7 ed. Philadelphia2005. p. 1135-74.
38. Wyrobek AJ, Schmid TE, Marchetti F. Relative susceptibilities of male germ cells to genetic defects induced by cancer chemotherapies. J Natl Cancer Inst Monogr. 2005(34):31-5.
39. Schilsky RL, Lewis BJ, Sherins RJ, Young RC. Gonadal dysfunction in patients receiving chemotherapy for cancer. Ann Intern Med. 1980 Jul;93(1):109-14.

40. Aubier F, Flamant F, Brauner R, Caillaud JM, Chaussain JM, Lemerle J. Male gonadal function after chemotherapy for solid tumors in childhood. *J Clin Oncol*. 1989 Mar;7(3):304-9.
41. Mackie EJ, Radford M, Shalet SM. Gonadal function following chemotherapy for childhood Hodgkin's disease. *Med Pediatr Oncol*. 1996 Aug;27(2):74-8.
42. Meister LA, Meadows AT. Late effects of childhood cancer therapy. *Curr Probl Pediatr*. 1993 Mar;23(3):102-31.
43. Mustieles C, Munoz A, Alonso M, Ros P, Yturriaga R, Maldonado S, et al. Male gonadal function after chemotherapy in survivors of childhood malignancy. *Med Pediatr Oncol*. 1995 Jun;24(6):347-51.
44. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer, principles & practice of oncology*. 7th ed. ed. Philadelphia, Pa. ; London: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
45. Tanner JM. *Growth at Adolescence ...* Second edition: pp. xiii. 325. pl. 11. Blackwell Scientific Publications: Oxford; 1962.
46. Corleta HvE. *Disfunção Gonadal. Rotinas em Oncologia*. 1 ed: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008. p. 889-96.
47. Goodman LS, Wintrobe MM, Dameshek W, Goodman MJ, Gilman A, McLennan MT. Landmark article Sept. 21, 1946: Nitrogen mustard therapy. Use of methyl-bis(beta-chloroethyl)amine hydrochloride and tris(beta-chloroethyl)amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. By Louis S. Goodman, Maxwell M. Wintrobe, William Dameshek, Morton J. Goodman, Alfred Gilman and Margaret T. McLennan. *JAMA*. 1984 May 4;251(17):2255-61.
48. Spitz S. The histological effects of nitrogen mustards on human tumors and tissues. *Cancer*. 1948 Sep;1(3):383-98.
49. Frei E, 3rd, Karon M, Levin RH, Freireich EJ, Taylor RJ, Hananian J, et al. The effectiveness of combinations of antileukemic agents in inducing and maintaining remission in children with acute leukemia. *Blood*. 1965 Nov;26(5):642-56.
50. Shalet SM, Tsatsoulis A, Whitehead E, Read G. Vulnerability of the human Leydig cell to radiation damage is dependent upon age. *J Endocrinol*. 1989 Jan;120(1):161-5.

51. Fossa SD, Magelssen H. Fertility and reproduction after chemotherapy of adult cancer patients: malignant lymphoma and testicular cancer. *Ann Oncol.* 2004;15 Suppl 4:iv259-65.
52. Pryzant RM, Meistrich ML, Wilson G, Brown B, McLaughlin P. Long-term reduction in sperm count after chemotherapy with and without radiation therapy for non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol.* 1993 Feb;11(2):239-47.
53. Meistrich ML. Male gonadal toxicity. *Pediatr Blood Cancer.* 2009 Aug;53(2):261-6.
54. Wallace WH, Shalet SM, Crowne EC, Morris-Jones PH, Gattamaneni HR, Price DA. Gonadal dysfunction due to cis-platinum. *Med Pediatr Oncol.* 1989;17(5):409-13.
55. Moisan AE, Foster RA, Betteridge KJ, Hahnel AC. Dose-response of RAG2-/-/gammaC-/- mice to busulfan in preparation for spermatogonial transplantation. *Reproduction.* 2003 Aug;126(2):205-16.
56. Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Nov 22;91(24):11303-7.
57. Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Nov 22;91(24):11298-302.
58. Jain JK, Paulson RJ. Oocyte cryopreservation. *Fertil Steril.* 2006 Oct;86(4 Suppl):1037-46.
59. Gook DA, Edgar DH, Stern C. Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1, 2-propanediol. *Hum Reprod.* 1999 Aug;14(8):2061-8.
60. Scholefield H. Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology. Preface. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2008 Oct;22(5):761-2.
61. Santis GCD, Prata KdL. Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells. 1 ed. Ribeirão Preto: Medicina; 2009.
62. Hovatta O. Cryopreservation of testicular tissue in young cancer patients. *Hum Reprod Update.* 2001 Jul-Aug;7(4):378-83.

63. Lucci CM, Kacinskis MA, Lopes LH, Rumpf R, Bao SN. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Theriogenology*. 2004 Apr 15;61(6):1101-14.
64. Siimes MA, Dunkel L, Rautonen J. Risk factors for endocrine testicular dysfunction in adolescent and adult males who have survived malignancies in childhood. *Journal of Cancer*. 1992;5:4.
65. Howell SJ, Radford JA, Ryder WD, Shalet SM. Testicular function after cytotoxic chemotherapy: evidence of Leydig cell insufficiency. *J Clin Oncol*. 1999 May;17(5):1493-8.
66. Orwig KE, Schlatt S. Cryopreservation and transplantation of spermatogonia and testicular tissue for preservation of male fertility. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2005(34):51-6.
67. Shinohara T, Inoue K, Ogonuki N, Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Nakata K, et al. Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination. *Hum Reprod*. 2002 Dec;17(12):3039-45.
68. Ajala T, Rafi J, Larsen-Disney P, Howell R. Fertility preservation for cancer patients: a review. *Obstet Gynecol Int*. 2010;2010:160386.
69. de Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl*. 2000 Nov-Dec;21(6):776-98.
70. McGee JOD, Isaacson PG, Wright NA. *Oxford textbook of pathology*. Oxford: OUP; 1992.
71. Russell LD. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. 1st ed. Clearwater, FL: Cache River Press; 1990.
72. Huckins C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat Rec*. 1978 Apr;190(4):905-26.
73. Oatley JM, Brinster RL. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2008;24:263-86.
74. Lee K, Haugen HS, Clegg CH, Braun RE. Premature translation of protamine 1 mRNA causes precocious nuclear condensation and arrests spermatid differentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Dec 19;92(26):12451-5.

75. Braun RE, Behringer RR, Peschon JJ, Brinster RL, Palmiter RD. Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature*. 1989 Jan 26;337(6205):373-6.
76. Avarbock MR, Brinster CJ, Brinster RL. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nat Med*. 1996 Jun;2(6):693-6.
77. Brinster RL. Male germline stem cells: from mice to men. *Science*. 2007 Apr 20;316(5823):404-5.
78. Goossens E, Tournaye H. Is there a clinical future for spermatogonial stem cells? *Curr Stem Cell Res Ther*. 2007 Sep;2(3):189-95.



**5. ARTIGO EM PORTUGUÊS: Estabilidade do busulfano após a diluição: efeito na depleção da espermatogênese em ratos Wistar**

Ana Luiza Ferrari<sup>1</sup>, Aline Amaral<sup>2</sup>, Fabíola Meyer<sup>3</sup>, Lucia Kliemann<sup>1,4</sup>, Ilma Simoni Brum<sup>2,3,5</sup>, Helena von Eye Corleta<sup>1,3,5</sup>, Edison Capp<sup>1,2,3,5</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Laboratório de Biologia Molecular, Endócrina e Tumoral, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>3</sup> Unidade de Experimentação Animal, Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

<sup>4</sup> Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>5</sup> Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

Endereço para correspondência:

Prof. Dr. Edison Capp

Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular

Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90 035-903 Porto Alegre, RS, Brazil

Tel. +55 51 3308 3671, Fax +55 51 3311 5699

e-mail: edcapp@ufrgs.br

## Resumo

A maioria dos tratamentos oncológicos afeta tecidos responsáveis pelo crescimento celular e alguns são extremamente gonadotóxicos. Muitas vezes, as funções gonadais são afetadas de forma irreversível. **Objetivo:** avaliar o efeito degenerativo do busulfano em diferentes tempos após a diluição sobre o epitélio testicular em ratos Wistar. **Método:** foram avaliados 24 ratos com idade de 60 dias e peso corporal médio de 280 g. Os animais foram distribuídos em 1 grupo controle e 4 grupos tratados com busulfano. Este agente foi diluído e administrado em diferentes tempos após a diluição (TAD, 7, 14, 21, 28 dias). Os animais tratados foram submetidos a uma única injeção intraperitoneal, na dose de 30 mg/kg. A análise histológica foi realizada 42 dias após, através da técnica da coloração de hematoxilina-eosina. **Resultado:** na avaliação da espermatogênese, o maior número de espermatogônias por túbulo seminífero apresentou associação ao grupo de animais submetidos a aplicação do quimioterápico após a diluição de 21 e 28 dias e ao grupo controle. Quanto ao percentual de necrose, o grupo com proporção mais elevada foi o dos animais submetidos ao quimioterápico após 7 dias de diluição. Também foi possível verificar que o grupo controle e os grupos com TAD de 21 e 28 dias apresentaram média de túbulos seminíferos significativamente mais elevada do que os grupos com TAD de 7 e 14 dias. **Conclusão:** O efeito do busulfano é inversamente proporcional ao TAD do mesmo; quanto menor o TAD, maior a ação do quimioterápico sobre a depleção celular no testículo.

**Palavras-chave:** busulfano, degeneração testicular, quimioterapia, espermatogênese

## Introdução

A espermatogênese é um processo celular coordenado, extremamente complexo e essencial para a continuidade das espécies. Este processo é dividido em 3 fases distintas que envolvem a multiplicação e a diferenciação das células germinativas<sup>1, 2</sup>. A primeira fase é conhecida como fase proliferativa, onde as espermatogônias são submetidas a uma série de divisões mitóticas e então se diferenciam em espermatócitos primários<sup>3</sup>. A segunda fase, também conhecida como fase meiótica, os espermatócitos primários sofrem recombinações genéticas e como resultado produzem as espermatídes. Estas células por sua vez, sofrem um rearranjo estrutural do citoesqueleto passando de células germinativas redondas para espermatozóides especializados<sup>4</sup>.

As espermatogônias são as células mais resistentes da espermatogênese<sup>5</sup>. Geralmente sobrevivem à exposição de substâncias tóxicas (ex.: tratamentos quimioterápicos), enquanto as demais células germinativas são destruídas com maior facilidade<sup>6, 7</sup>. O fato das espermatogônias se dividirem com menor frequência, contribui para torná-las mais resistentes<sup>8, 9</sup> à ação das substâncias tóxicas, sendo possível que, a partir delas, os túbulos seminíferos sejam repovoados após a ocorrência de danos testiculares. Quando totalmente eliminadas dos túbulos seminíferos, ocorre a perda irreversível das células germinativas, promovendo incapacidade reprodutiva devido à azoospermia.

Estudos realizados em roedores (camundongos e ratos) demonstraram que estes animais possuem mais de 9 tipos de espermatogônias que se dividem em 3 subclasses distintas, são elas: as espermatogônias A, as intermediárias e as

espermatogônias B<sup>10</sup>. As espermatogônias A são consideradas as células-tronco dos testículos<sup>11</sup>.

Há muitas formas de depletar as células germinativas dos túbulos seminíferos, entretanto poucas atingem especificamente as “espermatogônias A”<sup>12</sup>. Diferente de outros agentes quimioterápicos que destroem vários tipos de espermatogônias, o busulfano é um potente agente que danifica preferencialmente a célula-tronco espermatogonial (**A<sub>s</sub>**)<sup>13, 14</sup>. Contudo, a dose para causar dano testicular é espécie-específica. O busulfano é um agente quimioterápico, alquilante e citostático, facilmente absorvido pelo trato gastrointestinal que desaparece do sangue rapidamente e apresenta uma meia-vida de 2 à 3 horas. É metabolizado e excretado através da urina. Seus efeitos colaterais se manifestam em diferentes órgãos como: bexiga, fígado, pele, sistema nervoso e funções gonadais. Exerce atividades imunossupressoras e interfere nas funções do DNA através da alquilação e ligações cruzadas na fita do DNA<sup>13</sup>.

Estudos realizados demonstraram que os efeitos do busulfano são dependentes da dose, sendo que o efeito mínimo em ratos é obtido com doses entre 10 mg/kg e 15 mg/kg e o efeito máximo entre 30 mg/kg a 40 mg/kg por um período de 6 semanas de tratamento<sup>15</sup>. Os animais submetidos a tratamentos com doses mais elevadas geralmente não sobrevivem<sup>13, 16</sup>.

O busulfano deve ser preparado em alíquotas e armazenado -80°C<sup>12</sup>. Para ser utilizada, a solução estoque deve ser diluída, o que a torna extremamente instável. O presente estudo avaliou os efeitos do busulfano aplicado após diferentes

tempos, após a diluição (TAD) (7, 14, 21 e 28 dias) em ratos machos através de medidas morfométricas e análises histológicas dos testículos.

## **Método**

### **Delineamento do estudo**

Foi realizado um estudo experimental.

### **Animais**

Foram avaliados 24 ratos machos Wistar, provenientes do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com aproximadamente 60 dias de vida e com peso corporal entre 240 g à 280 g. Os animais foram mantidos em caixas que mediam 70 x 70 x 35 cm durante 56 dias, incluindo o período de aclimação (14 dias), recebendo água e alimentação *ad libitum*. O cálculo do tamanho da amostra foi realizado tomando como base a diferença do percentual médio de necrose de 60% entre o TAD de 7 e 28 dias. Considerando um nível de significância  $\alpha$  de 95% ( $\alpha = 0,05$ ) e um poder estatístico de 80% ( $\beta = 0,20$ ) para um teste de hipótese bicaudal, o tamanho da amostra para cada grupo ficou estabelecido em 5 ratos, totalizando 25 animais.

Estes animais (20 ratos) foram tratados com busulfano diluído após diferentes tempos (7, 14, 21 e 28 dias) e 4 ratos formaram 1 grupo definido como controle. Os grupos tratados receberam uma única dose intraperitoneal de 30mg/kg

de busulfano (Sigma-Aldrich lote: B2635-10G, Milwaukee, Wisconsin, USA) e o grupo controle foi submetido a uma injeção de 0,2 mL de uma mistura 1:1 de dimetilsulfóxido (DMSO) e água como veículo<sup>12</sup>. Após 42 dias de tratamentos, os animais foram pesados em uma balança *Marte AS 5500C* e mortos em câmara de CO<sub>2</sub>, segundo normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os testículos foram retirados através de uma incisão na linha média do abdômen e então colocados em uma placa de Petri, pesados (balança *Marte AS 5500C*) e medidos com uma régua simples milimetrada<sup>17</sup>. Devido à forma elipsóide do testículo, o volume foi calculado através da fórmula:  $4/3\pi a.b.c$  onde  $a$ =comprimento,  $b$ =largura e  $c$ =altura. A seguir, os testículos foram colocados em formol a 10% até a análise histológica<sup>9</sup>.

### **Análise Histológica**

Foi coletado aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> de tecido testicular para realização da análise histológica. O material foi fixado em formalina, embebido em parafina, cortado e corado com hematoxilina-eosina (HE).

A espermatogênese foi analisada através de métodos semi-quantitativos capazes de avaliar: o número de espermatogônias por túbulo seminífero (foram observados 5 túbulos por rato); o grau de necrose (para estimar o grau da lesão) e o diâmetro dos túbulos seminíferos (foi observada a média do menor diâmetro de 30 túbulos por rato)<sup>9, 13</sup>. Apenas os túbulos arredondados foram avaliados e através de um corte transversal foi realizada a medida deste diâmetro<sup>18</sup>. Neste estudo

histológico foi verificada a severidade e a freqüência nas alterações das células germinativas<sup>9</sup>.

### **Análise Estatística**

Para a caracterização da presença de espermatogônias e classificação quanto ao percentual de necrose foi utilizada a distribuição de freqüências absolutas e relativas, sendo que para as comparações destas variáveis em relação ao TAD foi utilizado o teste Exato de Fisher por simulação de Monte Carlo.

Em relação às variáveis contínuas a apresentação dos resultados ocorreu pelas medidas de tendência central e de variabilidade, onde inicialmente, foi investigada a simetria das distribuições de dados, através do teste de Kolmogorov-Smirnov.

Para a média do diâmetro dos túbulos seminíferos, percentual de necrose, massa e volume dos testículos, diferença de peso corporal (final - inicial) e percentual de ganho de peso corporal, a comparação em relação ao TAD ocorreu pelo teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Dunn.

Na investigação de linearidade da média do diâmetro dos túbulos seminíferos e do percentual de necrose em relação ao TAD, utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman.

Os dados receberam tratamento estatístico através do software *SPSS 17.0* (*Statistical Package to Social Sciences for Windows*) e o nível de significância de  $p < 0,05$ .

### **Aspectos éticos e de biossegurança**

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - número de registro 07 - 091.

### **Resultados**

O estudo foi realizado com 24 animais, em decorrência da morte de 1 rato no grupo controle, por causas não relacionadas ao uso do quimioterápico.

Quanto ao peso corporal dos ratos (tabela 1), considerando-se a diferença entre os pesos final e inicial, pode-se verificar que todos os grupos apresentaram ganho de peso corporal, onde o grupo com TAD de 7 dias ( $113,6 \pm 20,2$ ) apresentou maior ganho de peso, e o grupo com TAD de 28 dias ( $81,6 \pm 7,0$ ) apresentou o menor ganho de peso (figura 1). A diferença de proporção de ganho de peso mostrou-se significativa apenas entre os grupos com TAD de 7 ( $46,4 \pm 12,3$ ) e 28 dias ( $26,9 \pm 2,1$ ) (figura 2).

De acordo com os resultados da tabela 2, a massa dos testículos do grupo controle ( $1,96 \text{ g} \pm 0,34 \text{ g}$ ) foi maior que a dos outros grupos ( $p < 0,05$ ). As massas médias dos testículos para os TAD de 21 dias ( $1,60 \text{ g} \pm 0,11 \text{ g}$ ) e 28 dias ( $1,58 \text{ g} \pm 0,14 \text{ g}$ ) se mostraram significativamente maiores do que a dos TAD de 14 dias ( $1,28$



g  $\pm$  0,16 g) e 7 dias (1,11 g  $\pm$  0,09 g). Não houve diferença significativa entre as massas médias dos TAD de 21 e 28 dias e entre os TAD 7 e 14 dias.

Quanto ao volume dos testículos (tabela 2), o grupo controle (1,53 g  $\pm$  0,38 g) apresentou volume médio dos testículos significativamente mais elevado do que os grupos com TAD de 14 (0,87 g  $\pm$  0,12 g;  $p < 0,01$ ) e 7 dias (0,85 g  $\pm$  0,19 g;  $p < 0,01$ ). Houve diferença também entre as médias do volume dos testículos dos TAD 21 e 28 dias ( $p < 0,001$ ), sendo que, entre os volumes médios de 7 e 14 dias a diferença não se mostrou significativa ( $p > 0,05$ ). Ainda, verificou-se que, entre o grupo controle e os grupos com TAD de 21 dias (1,23 g  $\pm$  0,10 g) e 28 dias (1,38 g  $\pm$  0,09 g) os volumes médios dos testículos não diferiram de forma significativa ( $p > 0,05$ ).

Na avaliação das variáveis relativas ao estudo histológico (tabela 3), detectou-se uma associação significativa, através do teste Exato de Fisher ( $p < 0,001$ ) na comparação entre o número de espermatogônias e o tempo após diluição (TAD), indicando que, a presença de "*raras espermatogônias*" se mostrou associada ao TAD de 7 dias (figura 8), a presença de "*poucas espermatogônias*" se mostrou associada ao TAD de 14 dias, a presença "*moderada de espermatogônias*" se mostrou associada ao TAD de 21 e 28 dias. Em relação ao grupo controle a associação ocorreu com a presença "*abundante de espermatogônias*" (figura 7)(figura 3).

Na comparação do percentual de necrose e o TAD (tabela 3), pelo teste exato de Fisher ( $p < 0,001$ ), pode-se verificar que a ausência de necrose se mostrou significativamente associada ao grupo controle; o percentual de necrose de 1-25% se mostrou associado ao grupo com TAD de 28 dias; o percentual de necrose de 26-

50% associado ao TAD de 21 dias; o percentual de necrose de 51-75% associado ao TAD de 14 dias e, com o percentual de necrose de 76-100% associado ao TAD de 7 dias ( $p < 0,001$ ) (figura 4).

Considerando a média do diâmetro dos túbulos seminíferos, foi avaliado o tipo de distribuição apresentada e, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov a distribuição se mostrou assimétrica ( $p < 0,1$ ), desta forma, a comparação em relação ao TAD ocorreu pelo teste de Kruskal-Wallis (tabela 3). O grupo controle ( $52,6 \pm 3,7$ ), juntamente com os grupos com TAD de 28 ( $39,2 \pm 17,1$ ) e 21 dias ( $32,3 \pm 11,1$ ), apresentaram média de túbulos seminíferos significativamente mais elevada do que os grupos com TAD de 14 ( $21,5 \pm 11,9$ ) e 7 dias ( $10,7 \pm 10,5$ ) ( $p < 0,001$ ) (Figura 4). Entre as médias do grupo controle e TAD de 28 e 21 dias, assim como entre os grupos com o TAD de 7 e 14 dias, não houve diferença significativa.

De forma geral, pode-se observar que a média do diâmetro dos túbulos seminíferos foi menor quanto menor o TAD. Investigando esta relação através do coeficiente de correlação de Spearman foi detectada uma correlação significativa, positiva e forte ( $r = 0,820$ ;  $p < 0,001$ ) (figura 9), indicando que os menores TAD mostraram-se correlacionados a médias menores do diâmetro dos túbulos seminíferos (ou vice-versa: os maiores tempos de diluição correlacionados a maiores médias do diâmetro dos túbulos seminíferos). Situação inversa foi observada na análise do percentual de necrose, que foi menor à medida que aumentou o TAD ( $r = -0,926$ ;  $p < 0,001$ ) (figura 10).

## Discussão

O busulfano é um quimioterápico utilizado em experimentos visando provocar falência testicular ou ovariana, para posterior estudo de repovoamento da gônada com células tronco, fragmento de tecido gonadal heterólogo ou criopreservado<sup>7</sup>. Estudos prévios demonstraram que a dose ideal para promover maior dano as células germinativas deveria ser a cima de 20 mg/kg e a baixo de 40 mg/kg devido à letalidade da droga<sup>12-16</sup>. No presente estudo foi utilizada uma dose única de 30 mg/kg nos 20 animais tratados. Sabe-se que o busulfano é instável após a diluição<sup>19</sup>, este estudo avaliou o grau e a frequência dos efeitos quimioterápicos de 30 mg/kg de busulfano administrados após diferentes tempos de diluição (7, 14, 21 e 28 dias). Os animais foram avaliados 42 dias após tratamento, por ser este o período necessário para que se observe dano máximo nas células germinativas<sup>16</sup>. Foi possível demonstrar que a droga promoveu maior destruição nas células germinativas dos testículos após as diluições entre 7 à 14 dias.

O peso corporal dos ratos foi controlado durante todo o experimento. Houve diferença significativa de proporção no ganho de peso corporal apenas entre os grupos com 7 ( $46,4 \pm 12,3$ ) e 28 dias ( $26,9 \pm 2,1$ ) após diluição. Como o grupo dos animais que receberam o busulfano com TAD de 7 dias foi o mais afetado, provavelmente este ganho maior de peso, em menor tempo, tenha ocorrido devido a uma hiperplasia reacional à lesão, na tentativa de restabelecer a população celular<sup>9</sup>.

Os grupos com menor TAD do busulfano (7 e 14 dias) apresentaram maior dano celular, podendo indicar atrofia testicular. A massa e volume dos testículos estão diretamente relacionadas ao dano gonadotóxico em humanos<sup>20</sup> e ao número

de células germinativas presentes nos túbulos seminíferos<sup>9</sup>, sugerindo que a maior ação do quimioterápico esteja de fato relacionada ao menor tempo após a diluição.

Sob o efeito do quimioterápico, foi possível correlacionar as alterações histológicas como o número de espermatogônia por túbulos seminíferos, o grau de necrose e o diâmetro dos túbulos seminíferos com o TAD do quimioterápico. Estas medidas estão relacionadas ao número de células germinativas presente nos túbulos seminíferos<sup>9</sup>.

Houve diminuição do número de espermatogônias por túbulo seminífero, do diâmetro dos túbulos seminíferos e maior grau de necrose nos grupos submetidos aos tratamentos com TAD de 7 e 14 dias. Estes resultados demonstram que o busulfano após ser diluído é instável com uma meia-vida extremamente curta<sup>19</sup>. Esta instabilidade após diluição é limitada pela decomposição de uma molécula pela ação da água, processo conhecido como hidrólise<sup>19</sup>.

Estes resultados foram confirmados por estudos prévios onde foi demonstrado que a dose utilizada atingiu a “*espermatogônia A*”, promovendo depleção celular<sup>21-23</sup>. Diferente de outros agentes quimioterápicos que atingem outras células da espermatogênese, o busulfano é um potente agente que destrói a célula-tronco espermatogonial de várias espécies<sup>16</sup>. Portanto, é possível sugerir que este agente serve como parâmetro para avaliar a intensidade do dano celular em modelos animais<sup>9, 24</sup>. Provavelmente a irreversibilidade da azoospermia está relacionada à especificidade e a dose da droga. Na biópsia testicular, os túbulos seminíferos não apresentaram células germinativas, e sim células de Sertoli<sup>20</sup>. Ocasionalmente alguns túbulos poderão apresentar algumas espermatogônias

isoladas. Isto indica que poderá haver uma recuperação do epitélio germinativo, mas enquanto elas estiverem isoladas, podemos sugerir que existe um impedimento para o desenvolvimento espermatogonial<sup>25</sup>.

Para o busulfano exercer a função de depletar as células germinativas, é preciso observar o tempo após a diluição (TAD) antes de utilizá-lo. Quanto menor o TAD do busulfano, maior será a depleção celular. O fato das espermatogônias terem sido eliminadas dos túbulos seminíferos e o diâmetro destes túbulos terem diminuído, se deve provavelmente a capacidade que este agente possui em atingir especificamente a “*espermatogônia A*”, que é a célula responsável pela proliferação celular durante a espermatogênese<sup>7</sup>.

O busulfano é um agente quimioterápico instável, mas muito eficiente na depleção das células do epitélio testicular<sup>7</sup>. A falta de informações em relação à associação entre sua toxicidade e o DMSO, sua instabilidade após diluição e sua baixa solubilidade, faz com que a utilização deste agente se torne desaconselhável quando administrado em altas doses ou em grandes volumes<sup>26</sup>. Portanto, estudos devem ser realizados com a finalidade de esclarecer melhor sua eficácia e conseqüentemente controlar melhor seus efeitos.

## **Conclusão**

De acordo com os resultados encontrados, verifica-se uma associação entre o TAD do busulfano e seus efeitos. As análises histológicas e morfométricas das espermatogônias demonstram que, quanto menor o prazo de utilização deste agente

após sua diluição, maior será a depleção celular. Não apenas a dose do busulfano, mas também o tempo decorrido entre a diluição e a aplicação, são fatores importantes para influenciar os efeitos deste quimioterápico. Este estudo sugere que deveria haver uma padronização no tempo de aplicação após a diluição do busulfano, não ultrapassando o prazo de 7 dias, quando se tem por objetivo causar a máxima depleção celular no animal em estudo.

## Referências

1. Knobil E, Neill JD. The Physiology of reproduction. 2nd ed. New York: Raven Press; 1994.
2. Russell LD, Griswold MD. Spermatogonial transplantation - an update for the millennium. *Mol Cell Endocrinol* 2000;161:117-20.
3. Clermont Y. Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat: a revised model for the renewal of spermatogonia. *Am J Anat* 1962;111:111-29.
4. Desjardins C, Ewing LL. Cell and molecular biology of the testis. New York: Oxford University Press; 1993.
5. de Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 2000;21:776-98.
6. Dym M, Clermont Y. Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following x-irradiation of the rat testis. *Am J Anat* 1970;128:265-82.
7. Meistrich ML. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis. *Eur Urol* 1993;23:136-41; discussion 42.
8. Clermont Y, Bustos-Obregon E. Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto". *Am J Anat* 1968;122:237-47.
9. Russell LD. Histological and histopathological evaluation of the testis. 1st ed. Clearwater, FL: Cache River Press; 1990.
10. Huckins C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat Rec* 1978;190:905-26.
11. Oatley JM, Brinster RL. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008;24:263-86.
12. Moisan AE, Foster RA, Betteridge KJ, Hahnel AC. Dose-response of RAG2-/-/gammaC-/- mice to busulfan in preparation for spermatogonial transplantation. *Reproduction* 2003;126:205-16.
13. Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11303-7.

14. Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11298-302.
15. Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Morimoto T, Matsui S, Honjo T, Shinohara T. Functional assessment of self-renewal activity of male germline stem cells following cytotoxic damage and serial transplantation. *Biol Reprod* 2003;68:1801-7.
16. Anjamrooz SH, Movahedin M, Mowla SJ, Bairanvand SP. Assessment of morphological and functional changes in the mouse testis and epididymal sperms following busulfan treatment. *Iran Biomed J* 2007;11:15-22.
17. Krinke G. *The laboratory rat*. San Diego, Calif.: Academic Press; 2000.
18. Hikim AP, Amador AG, Klemcke HG, Bartke A, Russell LD. Correlative morphology and endocrinology of Sertoli cells in hamster testes in active and inactive states of spermatogenesis. *Endocrinology* 1989;125:1829-43.
19. Feit PW, Rastrup-Andersen N. 4-Methanesulfonyloxybutanol: hydrolysis of busulfan. *J Pharm Sci* 1973;62:1007-8.
20. Avarbock MR, Brinster CJ, Brinster RL. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nat Med* 1996;2:693-6.
21. Bucci LR, Meistrich ML. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. *Mutat Res* 1987;176:259-68.
22. de Rooij DG, Kramer MF. The effect of three alkylating agents on the seminiferous epithelium of rodents. I. Depletory effect. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1970;4:267-75.
23. Kramer MF, de Rooij DG. The effect of three alkylating agents on the seminiferous epithelium of rodents. II. Cytotoxic effect. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1970;4:276-82.
24. Karstens A, Krämer I. Chemical and physical stability of diluted busulfan infusion solutions. *The European Journal of Hospital Pharmacy Science* 2007;13:8.
25. Meistrich ML. Male gonadal toxicity. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53:261-6.
26. Hassan M, Ljungman P, Bolme P, et al. Busulfan bioavailability. *Blood* 1994;84:2144-



## Legendas

**Figura 1.** Ganho de peso corporal (final-inicial) em relação ao TAD.

**Figura 2.** Percentual de ganho de peso corporal em relação ao TAD.

**Figura 3.** Distribuição relativa da quantidade de espermatogônias segundo o tempo após diluição (TAD).

**Figura 4.** Distribuição relativa do percentual de necrose segundo o tempo após diluição (TAD).

**Figura 5.** Diâmetro do Túbulo Seminífero: medida realizada a partir do diâmetro entre a lâmina basal de um lado a outro do túbulo seminífero (indicada pela seta). Sempre considerando o menor diâmetro do túbulo. A = 40X.

**Figura 6.** Média e desvio padrão para o diâmetro do túbulo seminífero, segundo o tempo após diluição (TAD).

**Figura 7.** Túbulo Seminífero Intacto - Grupo Controle - Células da espermatogênese. A = 40X.

**Figura 8.** Túbulo Seminífero Tratado com busulfano 30mg/kg – tempo após diluição (TAD) de 7 dias. A = 100X.

**Figura 9.** Correlação de Spearman entre a média do diâmetro dos túbulos seminíferos e o TAD

**Figura 10.** Correlação de Spearman o percentual de necrose ao TAD

**Tabela 1.** Diferença de peso corporal (final -inicial) e % ganho de peso corporal nos diferentes tempos após a diluição. DP=desvio padrão;  $\theta$ : Teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn (letras diferentes implicam em médias significativamente diferentes para um  $\alpha \leq 0,05$ ).

**Tabela 2.** Variação de massa e volume nos diferentes tempos após a diluição. DP=desvio padrão;  $\theta$ : Teste de Kruskal Wallys complementado pelo teste de Dunn (letras diferentes implicam em médias significativamente diferentes para um  $\alpha \leq 0,05$ ).

**Tabela 3.** Distribuição absoluta e relativa quanto à presença de espermatogônias e necrose segundo o tempo após diluição (TAD) e medidas de tendência central e de variabilidade para média do diâmetro dos túbulos seminíferos e percentual necrose.\*Valores apresentados da forma n (%) com percentuais obtidos com base no total de cada grupo;  $\S$ : Teste Exato de Fisher por simulação de Monte Carlo;  $\nabla$ :  $Q_1$  concentra 25% da amostra com valores inferiores ou iguais ao definido por  $Q_1$ ;  $Q_2$  = mediana: concentra 50% da amostra com valores inferiores ou iguais aos definidos por  $Q_2$ ;  $Q_3$ : concentra 75% da amostra com valores inferiores ou iguais ao definido por  $Q_3$ .  $\theta$ : Teste de Kruskal Wallys complementado pelo teste de Dunn (letras

diferentes implicam em médias significativamente diferentes para um  $\alpha \leq 5 \%$ ); §: Teste Exato de Fisher por simulação de Monte Carlo.

Figura 1

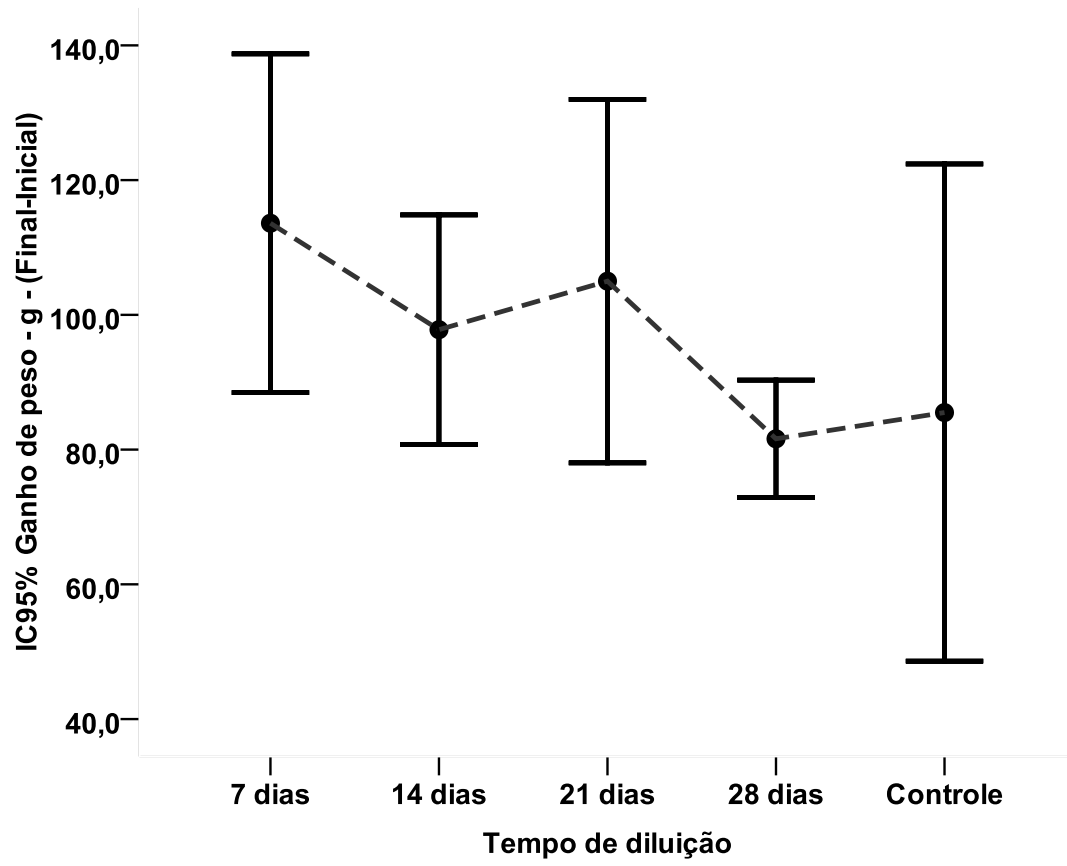


Figura 2

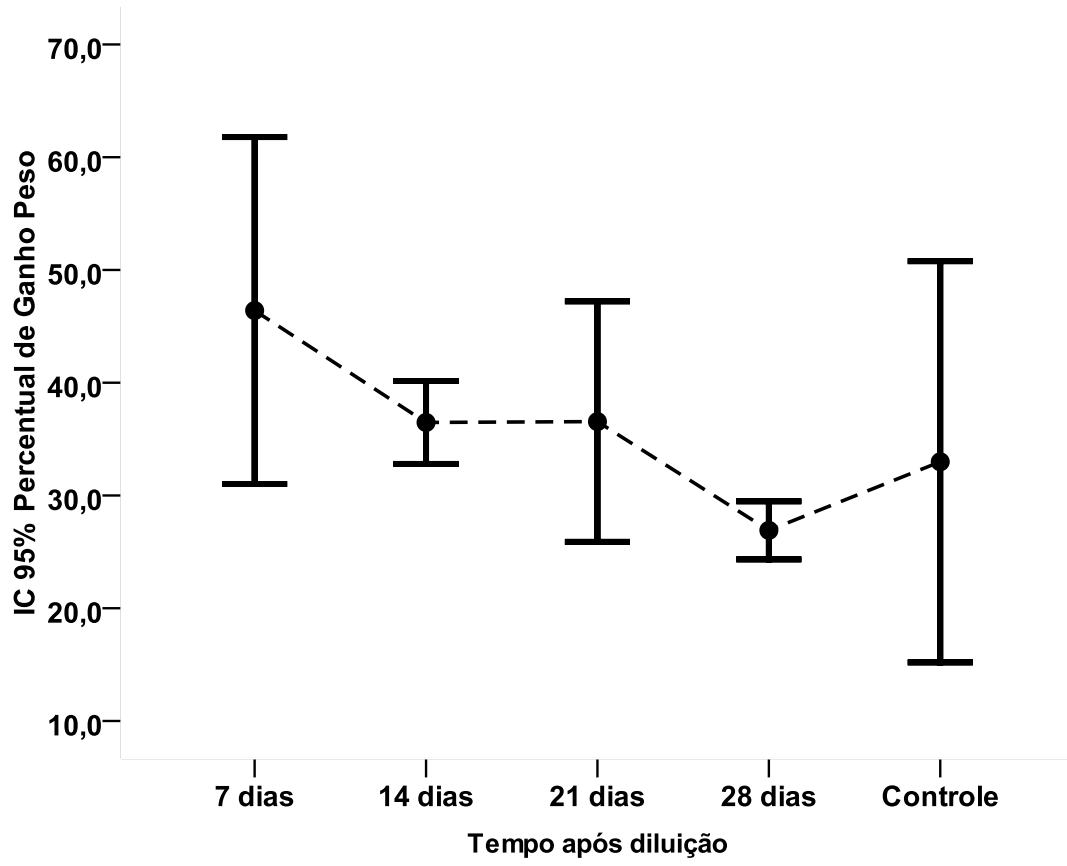


Figura 3

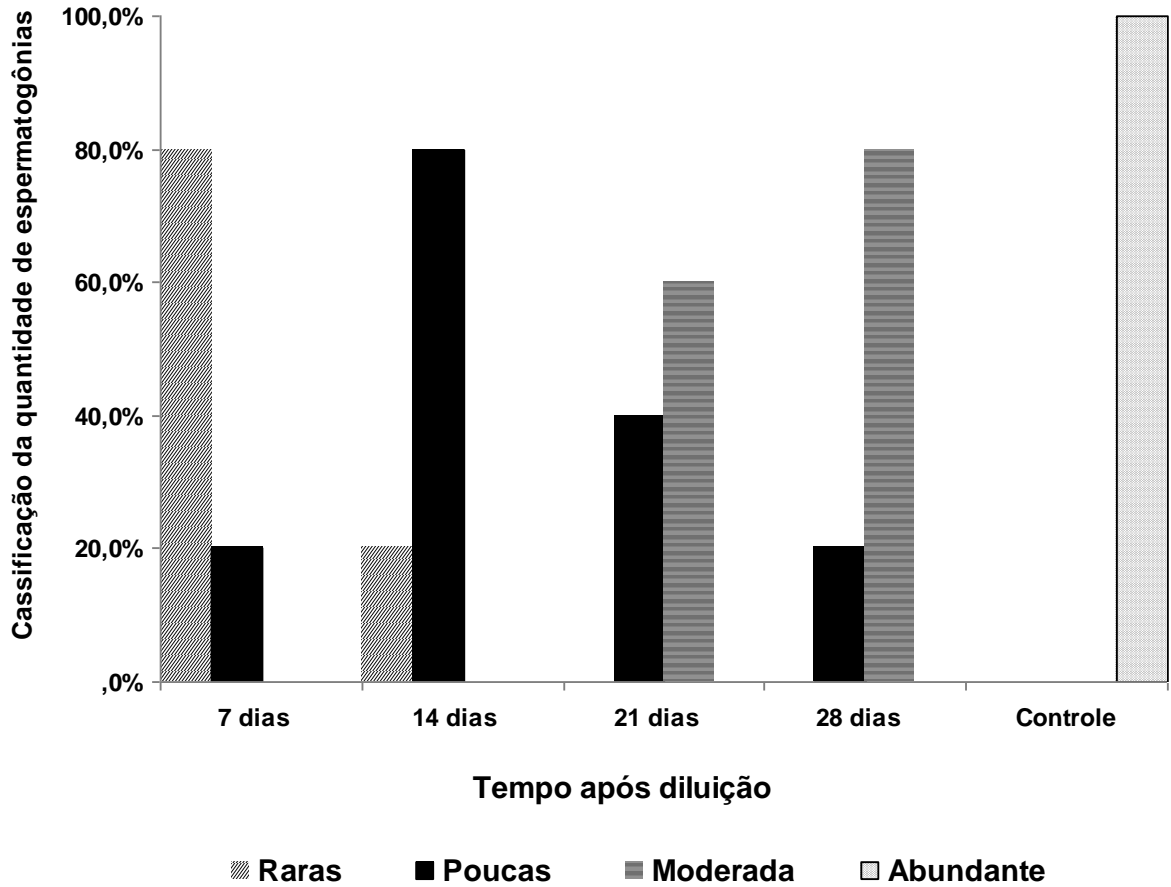
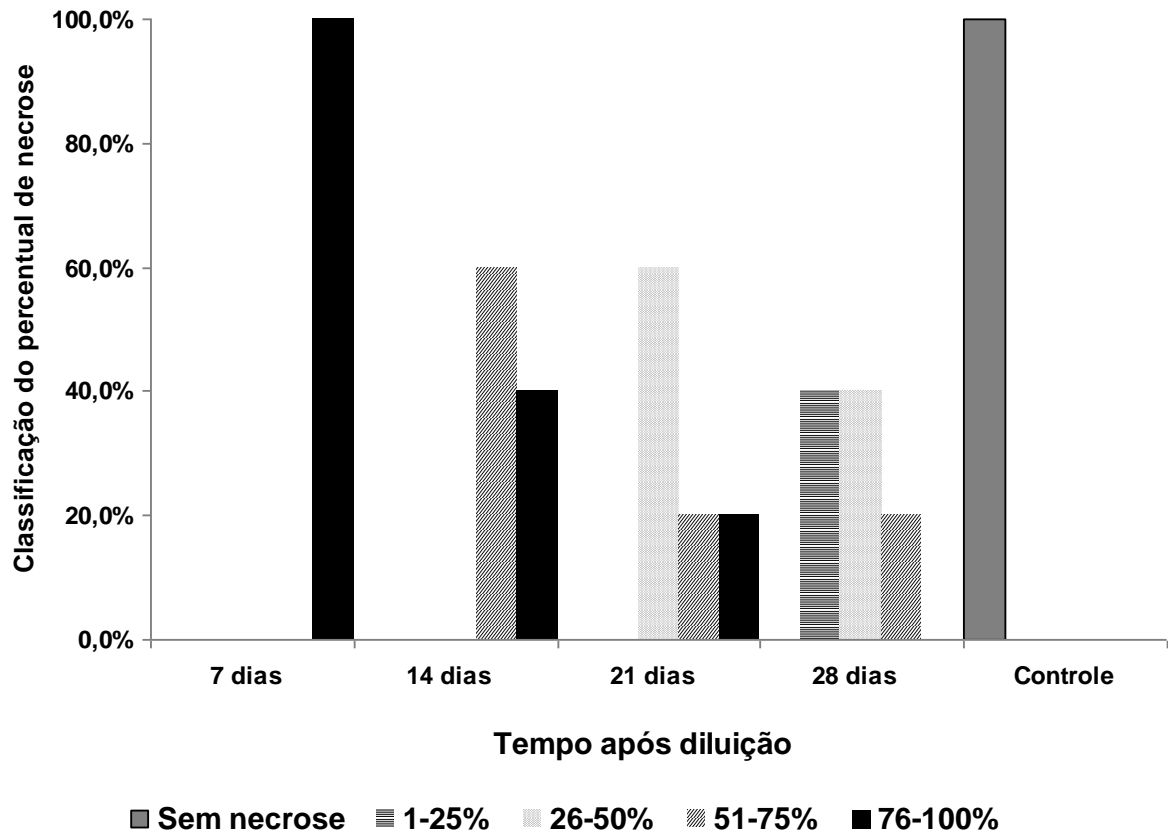


Figura 4



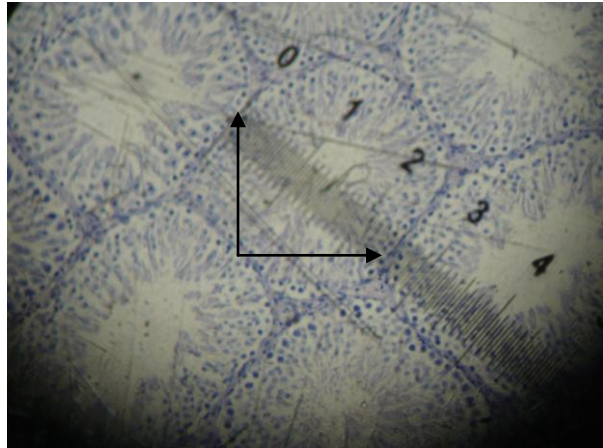
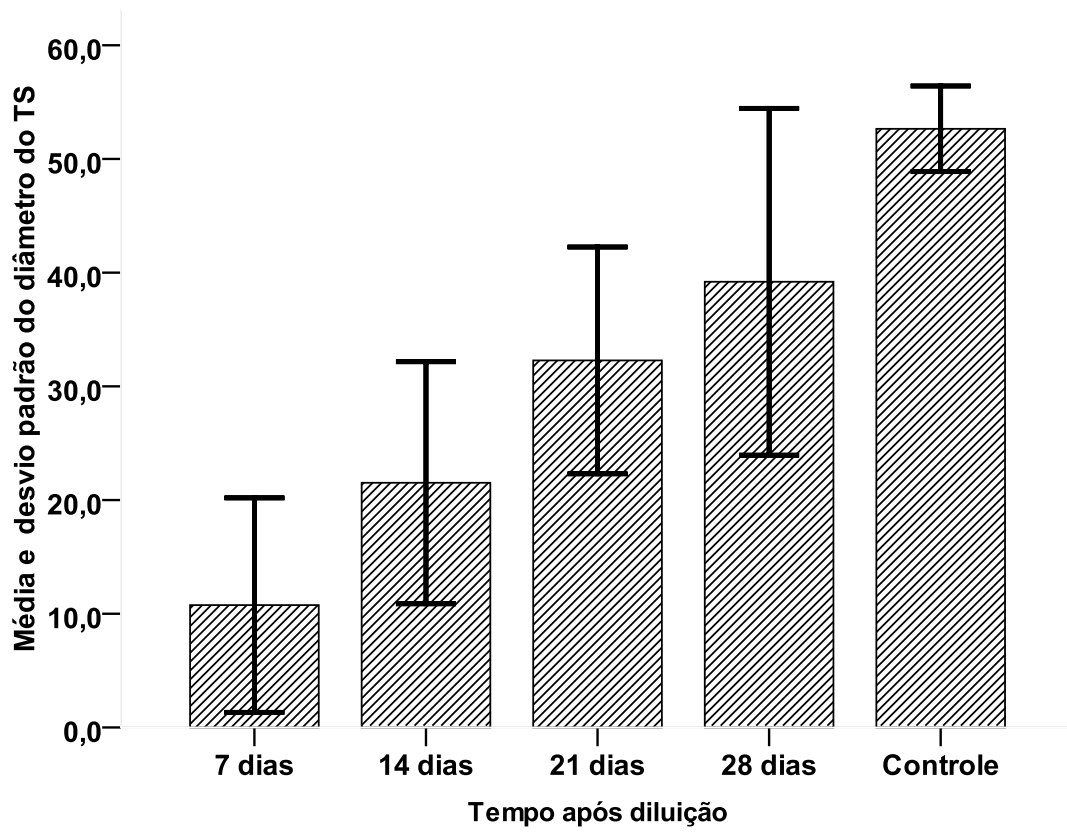
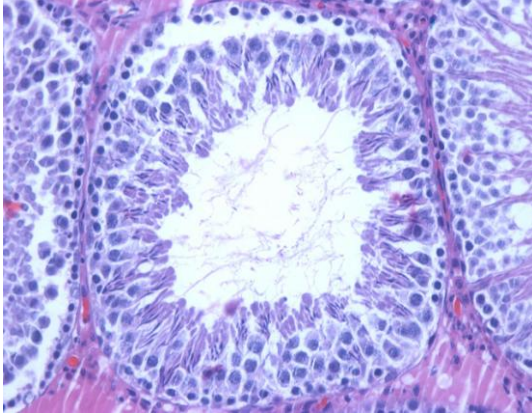
**Figura 5****Foto: Ana Luiza Ferrari**

Figura 6





**Figura 7**



**Figura 8**

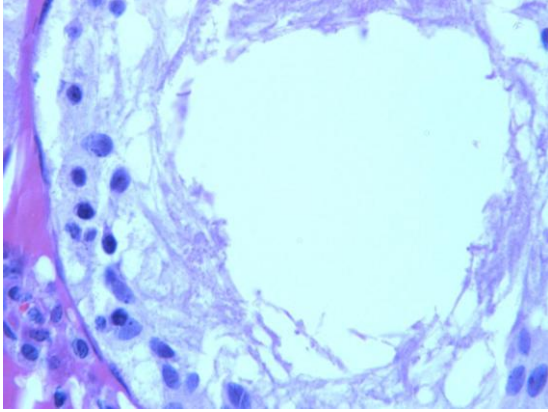


Figura 9

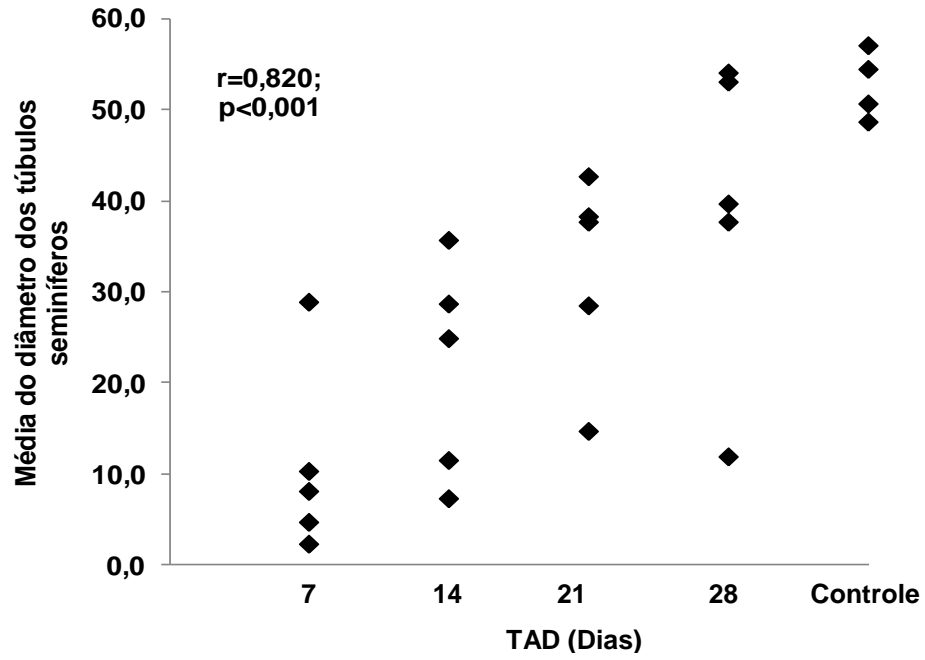
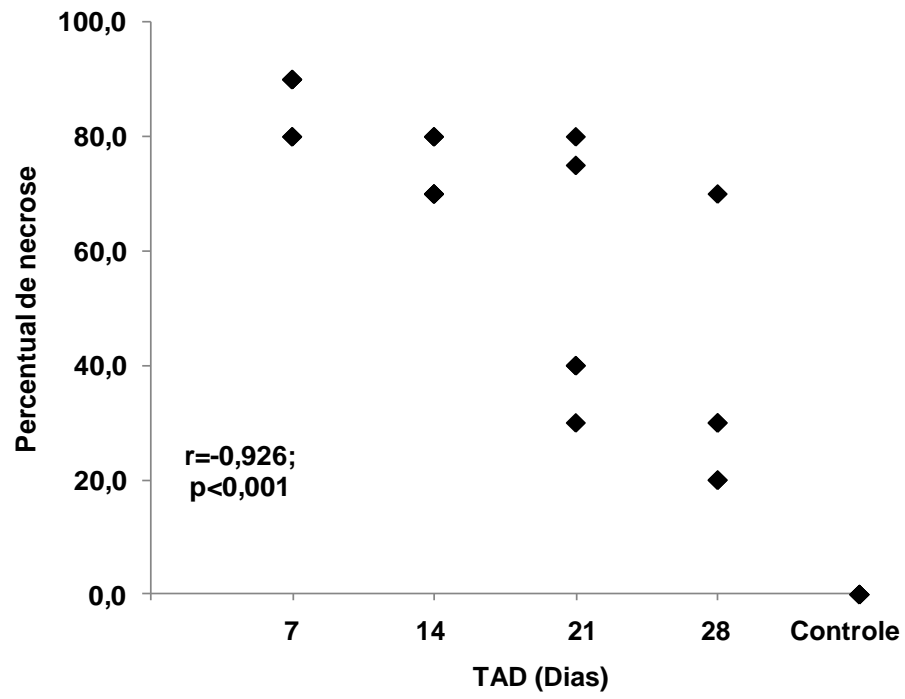


Figura 10



**Tabela 1**

Peso	Tempo após diluição (TAD)					p $\theta$
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	Controle	
<b>Diferença de peso corporal (final - inicial)</b>						
Média $\pm$ DP	113,6 $\pm$ 20,2	97,8 $\pm$ 13,7	105,5 $\pm$ 21,7	81,6 $\pm$ 7,0	85,5 $\pm$ 23,2	0,064
Mínimo - máximo	83-136	85-116	77-127	70-89	55-108	
<b>% ganho de peso corporal</b>						
Média $\pm$ DP	46,4 $\pm$ 12,3a	36,4 $\pm$ 2,9ab	36,6 $\pm$ 8,6ab	26,9 $\pm$ 2,1c	32,9 $\pm$ 11,1b	0,026
Mínimo - máximo	29,1-56,9	34,4-40,0	26,9-43,9	23,7-28,9	19,5-46,1	

DP=desvio padrão;  $\theta$ : Teste Análise de Variância (One Way) Pos Hoc teste de Tukey;

**Tabela 2**

Variáveis	Tempo após diluição (TAD)					p $\theta$
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	Controle	
<b>Massa testicular</b>						
Média $\pm$ DP	1,11 $\pm$ 0,09c	1,28 $\pm$ 0,16c	1,60 $\pm$ 0,11b	1,58 $\pm$ 0,14b	1,96 $\pm$ 0,34a	<0,001
Mínimo - máximo	0,98-1,20	1,12-1,52	1,52-1,78	1,33-1,71	1,46-2,21	
<b>Volume testicular</b>						
Média $\pm$ DP	0,85 $\pm$ 0,19c	0,87 $\pm$ 0,12c	1,23 $\pm$ 0,10b	1,38 $\pm$ 0,09b	1,53 $\pm$ 0,38a	<0,001
Mínimo - máximo	0,66-1,15	0,81-1,10	1,13-1,36	1,26-1,50	1,04-1,96	

DP=desvio padrão;  $\theta$ : Teste de Kruskal Wallis complementado pelo teste de Dunn;

Tabela 3

Variáveis	Tempo de diluição					p
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	Controle	
<b>Presença de Espermatogônias</b>						
Raras	4 (80,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Poucas	1 (20,0)	4 (80,0)	2 (40,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	<0,001§
Moderada	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (60,0)	4 (80,0)	0 (0,0)	
Abundante	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (100,0)	
<b>MÉDIA DO DIAMETRO DOS túbulos seminíferos</b>						
Média ± DP	10,7±10,5	21,5±11,9	32,3±11,1	39,2±17,1	52,6±3,7	
Mínimo – máximo	2,2-28,8	7,2-35,6	14,6-42,6	11,8-54,0	48,6-57,0	<0,001¶
Mediana (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> ) ▽	8 (3,4-19,5)	25 (9,3-32,1)	37 (21,5-40,4)	39 (24,7-53,5)	52 (49,1-56,3)	
<b>Necrose</b>						
Ausência	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (100,0)	
1-25%	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (40,0)	0 (0,0)	
26-50%	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (60,0)	2 (40,0)	0 (0,0)	<0,001§
51-75%	0 (0,0)	3 (60,0)	1 (20,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	
76-100%	5 (100,0)	2 (40,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
<b>Percentual de necrose</b>						
Média ± DP	86,0±5,5a	74,0±5,5a	53,0±22,8b	34,0±20,7b	0,0±0,0c	
Mínimo – máximo	80 – 90	70 – 80	30 – 80	20 – 70	0,0 – 0,0	<0,001¶
Mediana (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> ) ▽	90 (80-90)	70 (70-80)	40 (35-77)	30 (20-50)		

\*Valores apresentados da forma n(%) com percentuais obtidos com base no total de cada grupo ; §: Teste Exato de Fisher por simulação de Monte Carlo; ¶: Teste Análise de Variância (One Way) Pos Hoc teste de Tukey; ▽: Q<sub>1</sub> concentra 25% da amostra com valores inferiores ou iguais ao definido por Q<sub>1</sub>; Q<sub>2</sub> = mediana: concentra 50% da amostra com valores inferiores ou iguais aos definidos por Q<sub>2</sub>; Q<sub>3</sub>: concentra 75% da amostra com valores inferiores ou iguais ao definido por Q<sub>3</sub>;

6. ARTIGO EM INGLÊS: **Busulfan stability after dilution: effects in spermatogenesis depletion in Wistar rats**

Ana Luiza Ferrari<sup>1,6</sup>, Aline Amaral<sup>2,6</sup>, Fabíola Meyer<sup>3</sup>, Lucia Kliemann<sup>1,4</sup>, Ilma Simoni Brum<sup>2,3,5,6</sup>, Helena von Eye Corleta<sup>1,3,5,6</sup>, Edison Capp<sup>1,2,3,5,6</sup>

<sup>1</sup> Post-graduation Program in Medicine: Medical Sciences, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

<sup>2</sup> Post-graduation Program in Biological Sciences: Physiology, Laboratory of Molecular Biology, Tumor and Endocrine, Federal University of Rio Grande do Sul (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

<sup>3</sup> Animal Experimentation Unit, Research Center of Hospital de Clinicas Porto Alegre

<sup>4</sup> Department of Pathology, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Brazil

<sup>5</sup> Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Brazil

<sup>6</sup> Laboratory of Molecular Gynecology and Obstetrics

Mailing address:

Prof. Dr. Edison Capp

Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, Research Center of Hospital de Clinicas Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350, Zip Code 90 035-903 Porto Alegre, RS, Brazil

Tel. +55 51 3308 3671, Fax +55 51 3311 5699

e-mail: edcapp@ufrgs.br



## Summary

Most cancer treatment affects tissues responsible for cell growth and some are extremely gonadotoxic. Often, gonadal functions are irreversibly affected.

**Objective:** Assess the degenerative effect of busulfan at different periods after dilution over testicular epithelium in Wistar rats. **Methods:** 24 rats aged 60 days and 280g of mean body weight were evaluated. Animals were divided into one control group and 4 groups treated with busulfan. This agent was diluted and administered at different periods after dilution (PAD, 7, 14, 21, 28 days). Treated animals were subjected to a single intraperitoneal (IP) injection at a 30mg/kg dose. Histological analysis was performed after 42 days, using the hematoxylin-eosin staining method.

**Results:** in the assessment of spermatogenesis, the largest number of spermatogonia per seminiferous tubule was associated with the group of animals subjected to chemotherapy after dilution of 21 and 28 days and the control group. Regarding necrosis, the group with the highest degree was the animals subjected to the chemotherapy after 7 days of dilution. It was also possible to observe that the control group and groups with PAD of 21 and 28 days had a mean of seminiferous tubules significantly higher than groups with PAD of 7 and 14 days. **Conclusion:** The effect of busulfan is inversely proportional to its PAD, the lower the PAD, the greater the action of the chemotherapeutic over testicular cell depletion.

**Key-words:** busulfan, testicular degeneration, chemotherapy, spermatogenesis

## Introduction

Spermatogenesis is a coordinated cellular process, extremely complex and critical to the species continuation. The process is divided into three distinct phases involving proliferation and differentiation of the germinative cells<sup>1, 2</sup>. The first stage is known as the proliferative phase, where spermatogonia undergo a series of mitotic divisions and then differentiate into primary spermatocytes<sup>3</sup>. At second phase, also known as meiotic phase, primary spermatocytes undergo genetic recombination and as a result produce spermatids. These cells undergo a structural cytoskeleton rearrangement going from round germ cells to specialized spermatozoa<sup>4</sup>.

Spermatogonia are the most resistant cells of the spermatogenesis<sup>5</sup>. They usually survive exposure to toxic substances (e.g., chemotherapy treatments), while other germ cells are more easily destroyed<sup>6, 7</sup>. The fact that the spermatogonia divide less frequently, help to make them more resistant to the action of toxic substances<sup>8, 9</sup>, being possible, from them on, the repopulation of the seminiferous tubules after the occurrence of testicular damage. When they are fully eliminated from the seminiferous tubules, there is a irreversible loss of germ cells, promoting infertility due to azoospermia.

Studies in rodents (mice and rats) showed that these animals have more than nine types of spermatogonia, which divide themselves into three distinct subclasses, such as: *A spermatogonia*, *intermediate spermatogonia* and *B spermatogonias*<sup>10</sup>. The *A spermatogonia* are considered stem cells of the testicles<sup>11</sup>.

There are many ways to deplete germ cells of seminiferous tubules, although few specifically meet the *A spermatogonia*<sup>12</sup>. Unlike other chemotherapy agents that

destroy various types of spermatogonia, busulfan is a potent agent that preferentially impairs spermatogonial stem cell ( $A_s$ )<sup>13,14</sup>. However, the dose to cause testicular damage is species-specific. Busulfan is an alkylating and cytostatic agent, easily absorbed by the gastrointestinal tract, which disappears quickly from blood and has a half-life from 2 to 3 hours. It is metabolized and excreted through urine. Its side effects manifest in different organs such as bladder, liver, skin, nervous system and gonadal functions. It exerts immunosuppressive activities and interferes in DNA functions by alkylating and cross-linking in DNA strands<sup>13</sup>.

Studies have shown that busulfan effect is dose-dependent, with minimum effect obtained in rats at doses of 10mg/kg and 15mg/kg, and maximum effect between 30mg/kg to 40mg/kg for a period of 6 weeks of treatment<sup>15</sup>. Animals subjected to treatments with higher doses generally do not survive<sup>13, 16</sup>.

Busulfan should be prepared in aliquots and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ <sup>12</sup>. To be used, stock solution should be diluted, what makes it extremely unstable. The present study evaluated busulfan effects applied after different periods after dilution (PAD) (7, 14, 21 and 28 days) in male rats by morphometric measurements and histological analysis of the testes.

## Methods

An experimental study was carried out with 24 male Wistar rats, aged 60 days and weighing between 240g to 280g. Animals were maintained in boxes that measured 70x70x35 cm for 56 days, including acclimation period (14 days), receiving food and water *ad libitum*. Sample size was calculated based on the difference in mean necrosis degree of 60% between the PAD of 7 and 28 days. Assuming a 95% significance level ( $\alpha = 0.05$ ) and a 80% power ( $\beta = 0.20$ ) for a two-tailed hypothesis test, sample size for each group was established in five rats, totaling 25 animals.

Twenty animals were treated with busulfan diluted after different periods (7, 14, 21 and 28 days) and four animals were the control group. The treated groups received a single IP, 30mg/kg busulfan dose (Sigma-Aldrich Lot: B2635-10G, Milwaukee, Wisconsin, USA) and the control group underwent an injection of 0.2 mL of a 1:1 dimethylsulfoxide (DMSO) and water solution as vehicle<sup>12</sup>. After 42 days from treatment, animals were weighed on a *Marte AS 5500C* scale, and killed in a CO<sub>2</sub> chamber, according to the regulations of Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). Testicles were removed by an incision in the abdominal midline and then placed in a petri dish, weighed and measured with a simple millimeter rule<sup>17</sup>. Due to the ellipsoidal shape of the testicle, volume was calculated using the formula:  $4/3\pi a.b.c$  where  $a = length$ ,  $b = width$  and  $c = height$ . Then, testicles were conserved in 10% formalin until histological analysis<sup>9</sup>.

## **Histological Analysis**

Approximately 0.5cm<sup>2</sup> of testicular tissue was collected in order to perform the histological analysis. Tissue was fixed in formalin, embedded in paraffin, sliced and stained with hematoxylin-eosin (HE).

Spermatogenesis was analyzed by semi-quantitative methods which were able to evaluate: number of spermatogonia per seminiferous tubule (5 tubules per rat were observed), necrosis degree (to estimate injury degree) and diameter of seminiferous tubules (average of the smallest diameter of 30 tubules per rat was observed)<sup>9,13</sup>. Only rounded tubules were evaluated and its diameter was measured through a cross section of them<sup>18</sup>. This histological study verified severity and frequency of the changes in germ cells<sup>9</sup>.

## **Statistical analysis**

The distribution of absolute and relative frequencies was used for spermatogonia analysis and classification of necrosis degree, and for comparisons of these variables in relation to PAD, Fisher's Exact test by Monte Carlo simulation was used.

For continuous variables, results were presented by central tendency and variability measurements, where, initially, data symmetry distributions were investigated by Kolmogorov-Smirnov test.

For the seminiferous tubule mean diameter, necrosis degree, mass and volume of the testicles, body weight difference (final - initial) and percentage of body weight gain, a comparison in relation to PAD was made by Kruskal-Wallis' test and complemented by Dunn's test.

Spearman correlation coefficient was used in order to investigate linearity of the seminiferous tubule mean diameter and necrosis degree in relation to PAD.

Data were analyzed using SPSS 17.0 (*Statistical Package to Social Sciences for Windows*) software and the significance level of  $p < 0.05$ .

This study was approved by Research Ethics Committee from Hospital de Clínicas de Porto Alegre - registration number 07 - 091.

## **Results**

Study was conducted with 24 animals, due to the death of one rat in the control group, for reasons not related to chemotherapy.

Regarding the animal's body weight (Table 1), and considering the difference between final and initial weights, it can be seen that all groups showed body weight gain, where the group with PAD of 7 days ( $113.6 \pm 20.2$ ) showed higher weight gain, and the group with PAD of 28 days ( $81.6 \pm 7.0$ ) had the lowest weight gain (Figure 1). The difference in rate of weight gain was significant only between groups with PAD of 7 ( $46.4 \pm 12.3$ ) and 28 days ( $26.9 \pm 2.1$ ) (Figure 2)

According to the results in Table 2, the mass of the testicles of the control group ( $1.96\text{g} \pm 0.34\text{g}$ ) was higher than the other groups ( $p < 0.05$ ). Average masses of the testicles to the PAD of 21 days ( $1.60\text{g} \pm 0.11\text{g}$ ) and 28 days ( $1.58\text{g} \pm 0.14\text{g}$ ) were significantly higher than that of PAD of 14 days ( $1.28\text{g} \pm 0.16\text{g}$ ) and 7 days ( $1.11\text{g} \pm 0.09\text{g}$ ). There was no significant difference between the average masses of PAD of 21 and 28 days and between the PAD of 7 and 14 days.

Regarding the volume of the testicles (Table 2), the control group ( $1.53\text{g} \pm 0.38\text{g}$ ) showed mean volume of the testicles significantly higher than groups with PAD of 14 ( $0.87\text{g} \pm 0.12\text{g}$ ;  $p < 0.01$ ) and 7 days ( $0.85\text{g} \pm 0.19\text{g}$ ;  $p < 0.01$ ). There were also differences between the mean volume of the testicles of PAD of 21 and 28 days ( $p < 0.001$ ), considering that between average volumes of 7 and 14 days the difference was not significant ( $p > 0.05$ ). Moreover, it was found that among the control group and the groups with PAD of 21 days ( $1.23\text{g} \pm 0.10\text{g}$ ) and 28 days ( $1.38\text{g} \pm 0.09\text{g}$ ), average volumes of the testicles did not differ significantly ( $p > 0.05$ ).

In the assessment of variables related to the histological study (Table 3) a significant association was detected by Fisher Exact test ( $p < 0.001$ ) when comparing the number of spermatogonia and the PAD, indicating that the presence of "*rare spermatogonia*" was associated to PAD of 7 days (Figure 8), the presence of "*few spermatogonia*" was associated to the PAD of 14 days, the presence of "*moderate spermatogonia*" was associated to the PAD of 21 and 28 days. The control group was associated with the presence of "*abundant spermatogonia*" (Figures 7 and 3).

When comparing necrosis degree and the PAD (Table 3), by Fisher's Exact test ( $p < 0.001$ ), it was verified that the absence of necrosis was significantly

associated with the control group, necrosis degree of 1-25% was associated with the group with PAD of 28 days, necrosis degree of 26-50% was associated with the PAD of 21 days, necrosis degree of 51-75% was associated with the PAD of 14 days, and necrosis degree of 76-100% associated with the PAD of 7 days ( $p < 0.001$ ) (Figure 4).

Considering the mean diameter of seminiferous tubules, the distribution shown to be asymmetric by the Kolmogorov-Smirnov test ( $p < 0.1$ ), thus, the PAD comparison was performed by the Kruskal-Wallis test (Table 3). The control group ( $52.6 \pm 3.7$ ), and also the groups with PAD of 28 ( $39.2 \pm 17.1$ ) and 21 days ( $32.3 \pm 11.1$ ), presented mean of seminiferous tubules significantly higher than the groups with PAD of 14 ( $21.5 \pm 11.9$ ) and 7 days ( $10.7 \pm 10.5$ ) ( $p < 0.001$ ) (Figure 4). Among the means of the control group and PAD of 28 and 21 days, as well as among the groups with the PAD of 7 and 14 days, there was no significant difference.

Overall, we can observe that the mean of diameter of seminiferous tubules was smaller the lower the PAD. Investigating this relationship through the Spearman correlation coefficient, a significant correlation was detected, strong and positive ( $r = 0.820$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 9), indicating that the lower PAD proved to be correlated to lower mean diameter of seminiferous tubules (or vice versa: the largest dilution periods were correlated to higher mean diameter of seminiferous tubules). The opposite situation was observed in the analysis of necrosis degree, which was lower as the PAD increases ( $r = -0.926$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 10).



## Discussion

Busulfan is a chemotherapeutic drug used in experiments to cause ovarian or testicular failure, for further study of gonadal repopulation with stem cells, heterologous gonadal fragments of tissue or criopreserved<sup>7</sup>. Previous studies have shown that the optimal dosage to promote greater damage to germ cells should be above 20mg/kg and below 40mg/kg due to the lethality of the drug<sup>12-16</sup>. In this study, a single dose of 30mg/kg was used in the 20 animals treated. It is known that busulfan is unstable after dilution<sup>19</sup>, this study evaluated the degree and frequency of the chemotherapeutic effects of 30mg/kg busulfan administered at different periods after dilution (7, 14, 21 and 28 days). Animals were evaluated 42 days after treatment, as this is the period required for maximum damage in germ cells<sup>16</sup>. It was possible to demonstrate that the drug caused greater destruction in the germ cells of the testicles after dilution from 7 to 14 days.

Body weight of the rats was monitored throughout the experiment. There were significant differences in the proportion of body weight gain between the groups with 7 ( $46.4 \pm 12.3$ ) and 28 days ( $26.9 \pm 2.1$ ) after dilution. As the group of animals treated with PAD of 7 days busulfan was the most affected, probably this higher weight gain, in the shortest period, has occurred due to a reaction hyperplasia to the injury in an attempt to restore the cell population<sup>9</sup>.

The groups with the least PAD of busulfan (7 and 14 days) had increased cell damage and may indicate testicular atrophy. The mass and volume of the testicles are directly related to gonadotoxic damage in humans<sup>20</sup> and to the number of germ

cells in the seminiferous tubules<sup>9</sup>, suggesting that most of the chemotherapeutic action is indeed related to the shortest period after dilution.

Under the effect of the chemotherapy, it was possible to correlate histological changes such as the number of spermatogonia per seminiferous tubule, necrosis degree and diameter of seminiferous tubules with the PAD of the chemotherapy drug. These measures are related to the number of germ cells present in the seminiferous tubules<sup>9</sup>.

There was a decrease of the number of spermatogonia per seminiferous tubule, of the seminiferous tubule diameter and a greater degree of necrosis in the groups submitted to treatment with PAD of 7 and 14 days. These results demonstrate that busulfan is unstable after being diluted with a extremely short half-life<sup>19</sup>. This instability after dilution is limited by the decomposition of a molecule by the action of water, a process known as hydrolysis<sup>19</sup>.

These results were confirmed by previous studies where it was shown that the dose used reached the "*spermatogonia A*", promoting cell depletion<sup>21-23</sup>. Unlike other chemotherapeutic agents affecting different cells of the spermatogenesis, busulfan is a potent agent that destroys the spermatogonial stem cells of several species<sup>16</sup>. Therefore, it is possible to suggest this agent as a parameter for assessing the severity of cell damage in animal models<sup>9,24</sup>. Probably the irreversibility of azoospermia is related to the drug specificity and dosage. On testicular biopsy, the seminiferous tubules did not show any germ cells, but Sertoli cells<sup>20</sup>. Occasionally, some tubules may show some isolated spermatogonia. This indicates that there may

be a recovery of the germinal epithelium, but while they are in isolation, we may suggest that there is an impediment to the spermatogonial development<sup>25</sup>.

In order to busulfan deplete germ cells, it is necessary to observe the period after dilution (PAD) before using it. The lower the PAD of busulfan, the greater the cell depletion. The fact that the spermatogonia have been eliminated from the seminiferous tubules and the diameter of these tubules have decreased is probably due to the ability of this agent to reach specifically the "A spermatogonia", which is responsible for cell proliferation during spermatogenesis<sup>7</sup>.

The chemotherapeutic agent busulfan is an unstable but very efficient drug in depleting testicular epithelial cells<sup>7</sup>. The lack of information regarding the association between DMSO and its toxicity, its instability after dilution and its low solubility, discourages the use of this agent when administered in high doses or large volumes<sup>26</sup>. Therefore, studies should be conducted in order to clarify its effectiveness and hence better control its effects.

## **Conclusion**

According to the results, there is an association between the PAD of busulfan and its effects. Spermatogonia histological and morphometric analysis demonstrate that the shorter the period of use of this agent after its dilution, the greater the cell depletion. Not only the dosage of busulfan, but also the elapsed period between dilution and application, are important factors to influence the effects of this chemotherapeutic. This study suggests that there should be a standard in the

application period after dilution of busulfan, not exceeding the period of 7 days when the objective is to cause maximum depletion in the animal model at study.

## References

1. Knobil E, Neill JD. The Physiology of reproduction. 2nd ed. New York: Raven Press; 1994.
2. Russell LD, Griswold MD. Spermatogonial transplantation - an update for the millennium. *Mol Cell Endocrinol* 2000;161:117-20.
3. Clermont Y. Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat: a revised model for the renewal of spermatogonia. *Am J Anat* 1962;111:111-29.
4. Desjardins C, Ewing LL. Cell and molecular biology of the testis. New York: Oxford University Press; 1993.
5. de Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 2000;21:776-98.
6. Dym M, Clermont Y. Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following x-irradiation of the rat testis. *Am J Anat* 1970;128:265-82.
7. Meistrich ML. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis. *Eur Urol* 1993;23:136-41; discussion 42.
8. Clermont Y, Bustos-Obregon E. Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto". *Am J Anat* 1968;122:237-47.
9. Russell LD. Histological and histopathological evaluation of the testis. 1st ed. Clearwater, FL: Cache River Press; 1990.
10. Huckins C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat Rec* 1978;190:905-26.
11. Oatley JM, Brinster RL. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008;24:263-86.
12. Moisan AE, Foster RA, Betteridge KJ, Hahnel AC. Dose-response of RAG2-/-/gammac-/- mice to busulfan in preparation for spermatogonial transplantation. *Reproduction* 2003;126:205-16.
13. Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11303-7.
14. Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11298-302.

15. Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Morimoto T, Matsui S, Honjo T, Shinohara T. Functional assessment of self-renewal activity of male germline stem cells following cytotoxic damage and serial transplantation. *Biol Reprod* 2003;68:1801-7.
16. Anjamrooz SH, Movahedin M, Mowla SJ, Bairanvand SP. Assessment of morphological and functional changes in the mouse testis and epididymal sperms following busulfan treatment. *Iran Biomed J* 2007;11:15-22.
17. Krinke G. *The laboratory rat*. San Diego, Calif.: Academic Press; 2000.
18. Hikim AP, Amador AG, Klemcke HG, Bartke A, Russell LD. Correlative morphology and endocrinology of Sertoli cells in hamster testes in active and inactive states of spermatogenesis. *Endocrinology* 1989;125:1829-43.
19. Feit PW, Rastrup-Andersen N. 4-Methanesulfonyloxybutanol: hydrolysis of busulfan. *J Pharm Sci* 1973;62:1007-8.
20. Avarbock MR, Brinster CJ, Brinster RL. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nat Med* 1996;2:693-6.
21. Bucci LR, Meistrich ML. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. *Mutat Res* 1987;176:259-68.
22. de Rooij DG, Kramer MF. The effect of three alkylating agents on the seminiferous epithelium of rodents. I. Depletory effect. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1970;4:267-75.
23. Kramer MF, de Rooij DG. The effect of three alkylating agents on the seminiferous epithelium of rodents. II. Cytotoxic effect. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1970;4:276-82.
24. Karstens A, Krämer I. Chemical and physical stability of diluted busulfan infusion solutions. *The European Journal of Hospital Pharmacy Science* 2007;13:8.
25. Meistrich ML. Male gonadal toxicity. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53:261-6.
26. Hassan M, Ljungman P, Bolme P, et al. Busulfan bioavailability. *Blood* 1994;84:2144-

## Legends

**Figure 1.** Body weight gain (final-initial) in relation to PAD.

**Figure 2.** Percentage of body weight gain in relation to PAD.

**Figure 3.** Relative distribution of the amount of spermatogonia according to the period after dilution (PAD).

**Figure 4.** Relative distribution of the necrosis degree according to the period after dilution (PAD).

**Figure 5.** Seminiferous tubule diameter: measured from the diameter of the basal lamina from one side to another of the seminiferous tubule (indicated by arrow). Always considering the smallest diameter of the tubule. A = 40X.

**Figure 6.** Mean and standard deviation for the diameter of the seminiferous tubule, according to period after dilution (PAD).

**Figure 7.** Intact seminiferous tubule - Control Group - Spermatogenesis cells. A = 40X.

**Figure 8.** Seminiferous tubule treated with busulfan 30mg/kg – period after dilution (PAD) of 7 days. A = 100X.

**Figure 9.** Spearman correlation between the mean seminiferous tubule diameter and PAD.

**Figure 10.** Spearman correlation of the necrosis degree and PAD.

**Table 1.** Difference in body weight (final-initial) and % body weight gain at different periods after dilution. SD = standard deviation;  $\theta$ : Kruskal-Wallis Test complemented by Dunn's test (different letters imply a significantly mean difference for  $\alpha \leq 0.05$ ).

**Table 2.** Changes in mass and volume at different periods after dilution. SD = standard deviation;  $\theta$ : Kruskal Wallis test complemented by Dunn's test (different letters imply a significantly mean difference for  $\alpha \leq 0.05$ ).

**Tabela 3.** Absolute and relative distribution for the presence of spermatogonia and necrosis according to the period after dilution (PAD) and measurement of central tendency and variability for the seminiferous tubule mean diameter and necrosis degree. Values presented as n (%) with percentages obtained based on the total of each group,  $\S$ : Fisher's Exact test by Monte Carlo simulation; ¶: Analysis of Variability Test (One Way) Pos Hoc Tukey test  $\nabla$ : Q1 concentrates 25% of the sample with values lower than or equal to that defined by Q1; Q2 = median: concentrates 50% of the sample with values lower or equal to those defined by Q2; Q3: concentrates 75% of the sample with values lower than or equal to that defined by Q3.  $\theta$ : Kruskal-Wallis test complemented by Dunn's test (different letters imply a significantly mean difference for  $\alpha \leq 5\%$ )  $\S$ : Fisher's Exact test by Monte Carlo simulation.

Figure 1

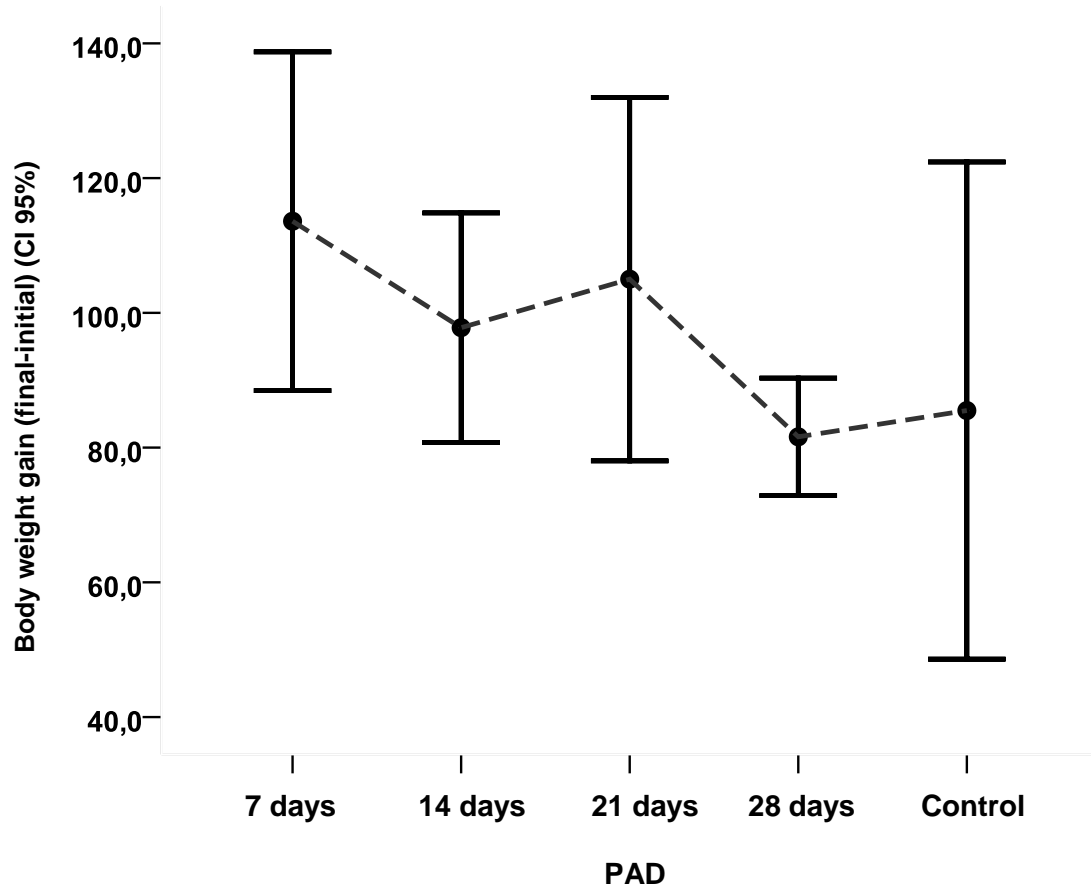




Figure 2

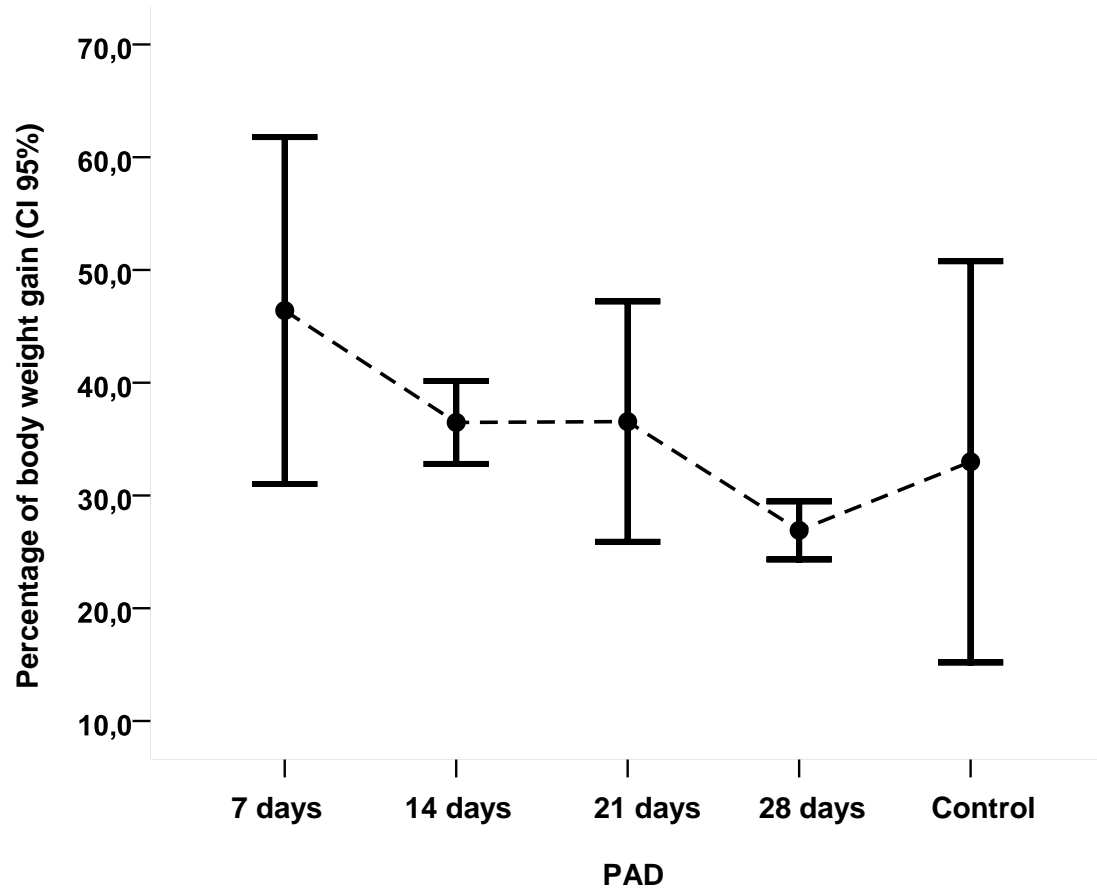


Figure 3

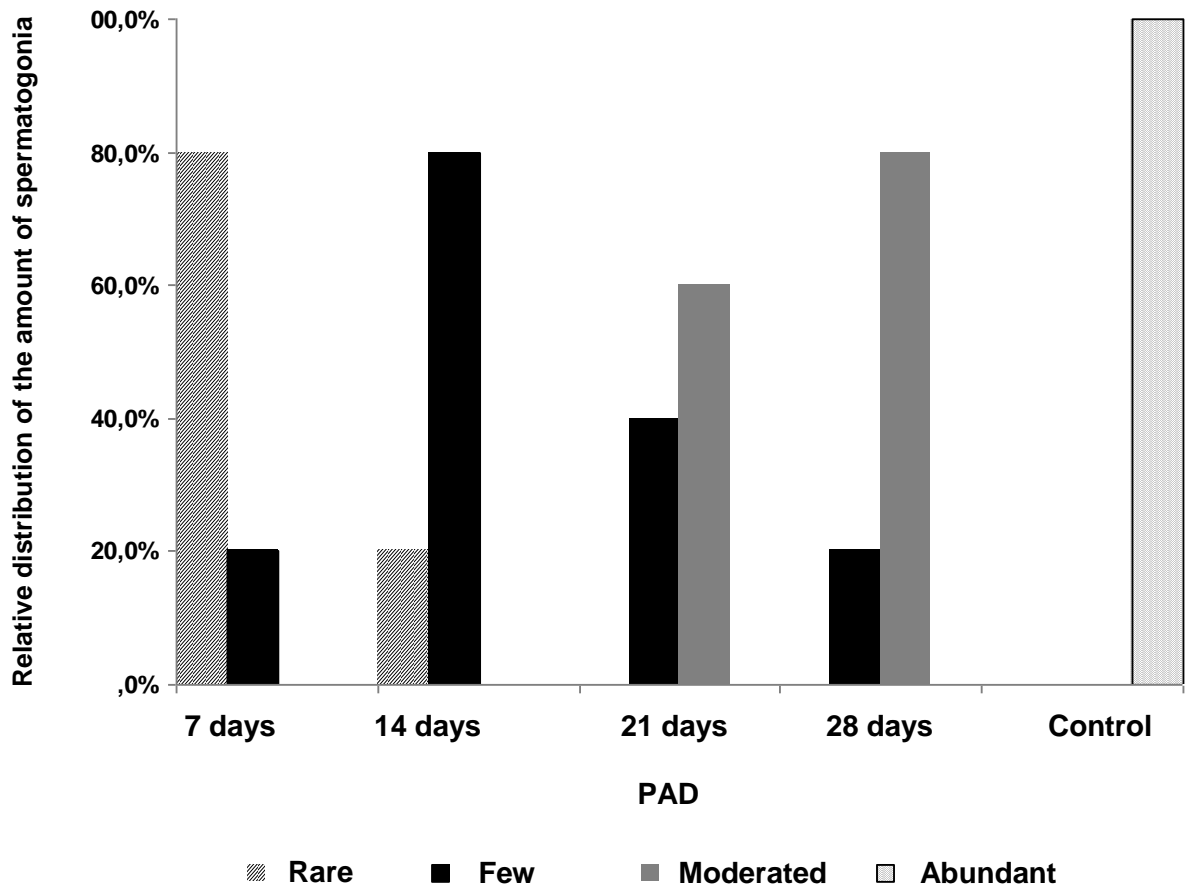
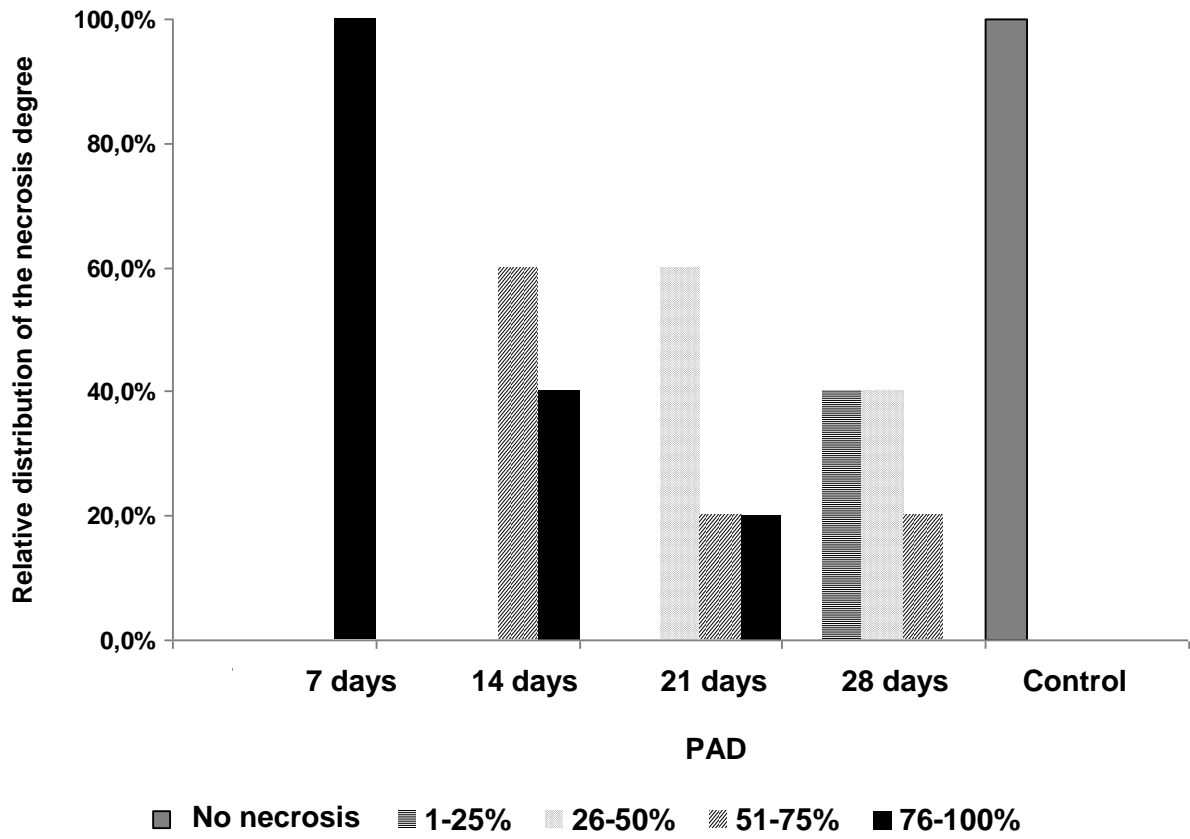
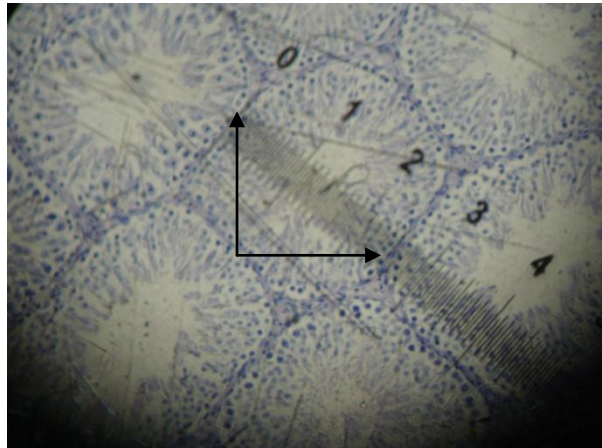


Figure 4

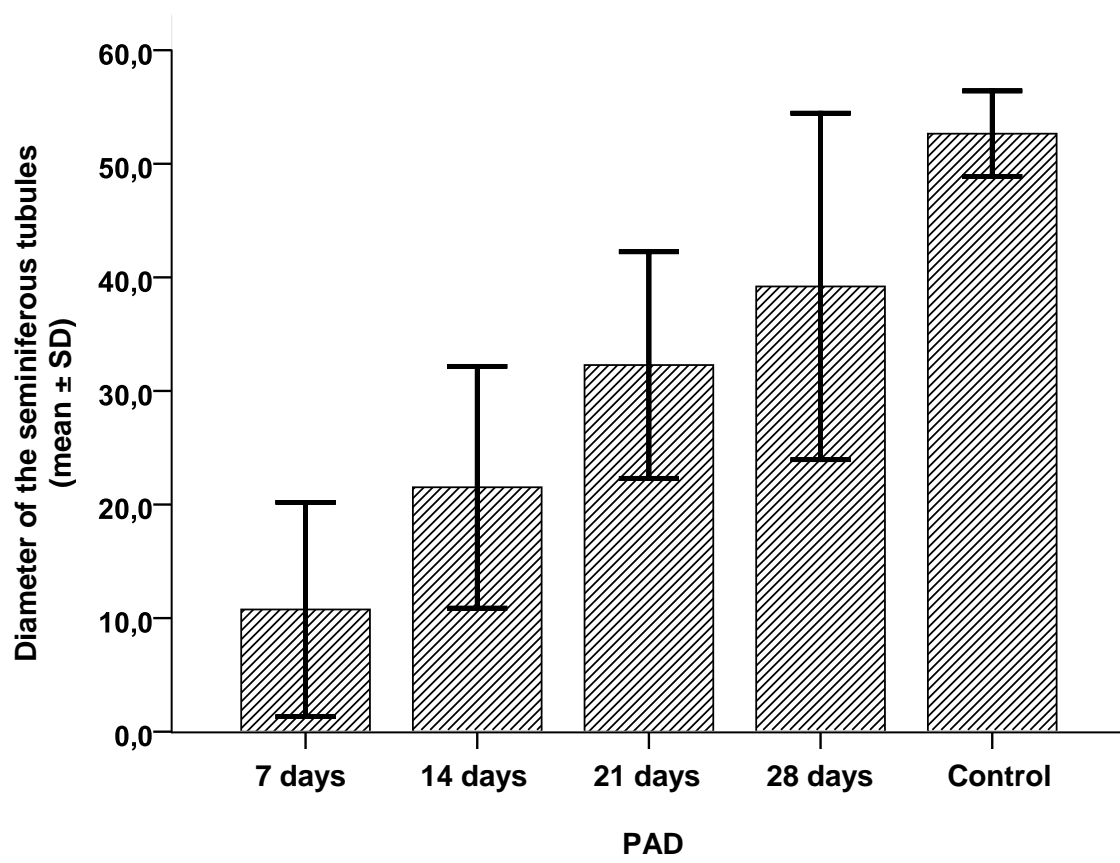


**Figure 5**

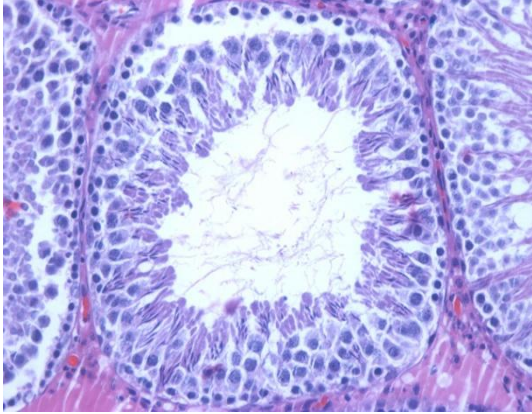


**Photo: Ana Luiza Ferrari**

Figure 6



**Figure 7**



**Figure 8**

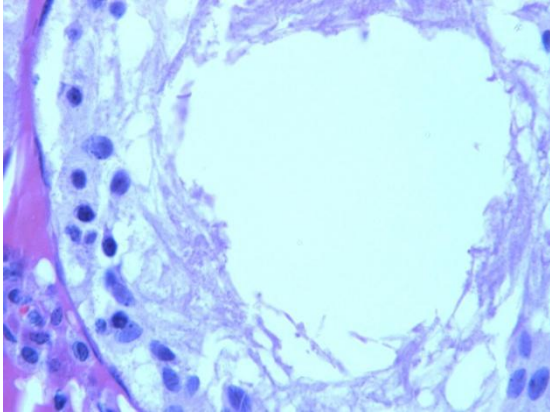


Figure 9

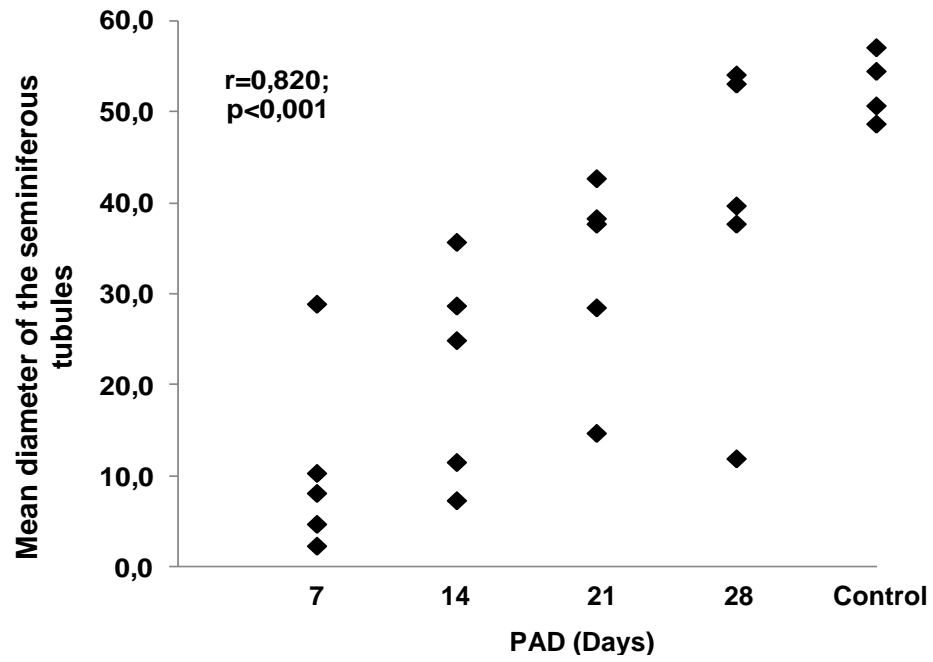
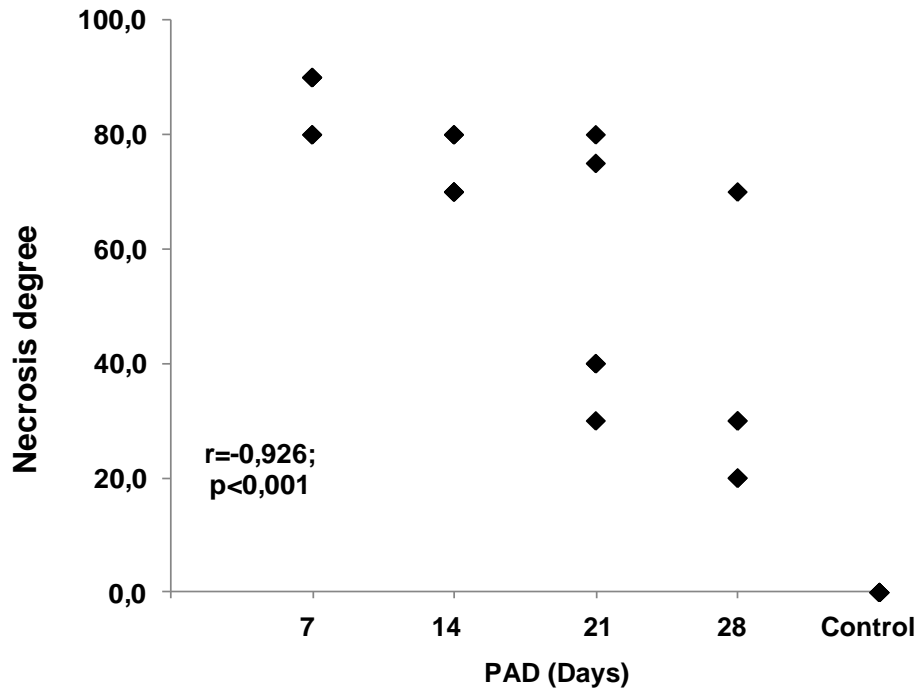




Figure 10



**Table 1**

<b>Weight</b>	<b>Period after dilution (PAD)</b>					<b>p <math>\theta</math></b>
	<b>7 days</b>	<b>14 days</b>	<b>21 days</b>	<b>28 days</b>	<b>Control</b>	
<b>Diference in body weight (final - initial)</b>						
Mean $\pm$ SD	113,6 $\pm$ 20,2	97,8 $\pm$ 13,7	105,5 $\pm$ 21,7	81,6 $\pm$ 7,0	85,5 $\pm$ 23,2	0,064
Minimum - maximum	83-136	85-116	77-127	70-89	55-108	
<b>% body weight gain</b>						
Mean $\pm$ SD	46,4 $\pm$ 12,3a	36,4 $\pm$ 2,9ab	36,6 $\pm$ 8,6ab	26,9 $\pm$ 2,1c	32,9 $\pm$ 11,1b	0,026
Minimum - maximum	29,1-56,9	34,4-40,0	26,9-43,9	23,7-28,9	19,5-46,1	

SD=standard deviation;  $\theta$ : Analysis of Variability Test (One Way) Pos Hoc Tukey test;

**Table 2**

Variables	Period after dilution (PAD)					p $\theta$
	7 days	14 days	21 days	28 days	Control	
<b>Testicular mass</b>						
Mean $\pm$ SD	1,11 $\pm$ 0,09c	1,28 $\pm$ 0,16c	1,60 $\pm$ 0,11b	1,58 $\pm$ 0,14b	1,96 $\pm$ 0,34a	<0,001
Minimum - maximum	0,98-1,20	1,12-1,52	1,52-1,78	1,33-1,71	1,46-2,21	
<b>Testicular volume</b>						
Mean $\pm$ SD	0,85 $\pm$ 0,19c	0,87 $\pm$ 0,12c	1,23 $\pm$ 0,10b	1,38 $\pm$ 0,09b	1,53 $\pm$ 0,38a	<0,001
Minimum - maximum	0,66-1,15	0,81-1,10	1,13-1,36	1,26-1,50	1,04-1,96	

SD=standard deviation;  $\theta$ : Kruskal Wallis Test complemented by Dunn's test;

Table 3

Variables	Dilution period					P
	7 days	14 days	21 days	28 days	Control	
<b>Presence of spermatogonia</b>						
Rare	4 (80,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Few	1 (20,0)	4 (80,0)	2 (40,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	<0,001§
Moderated	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (60,0)	4 (80,0)	0 (0,0)	
Abundant	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (100,0)	
<b>Mean diameter of the seminiferous tubules</b>						
Mean ± SD	10,7±10,5	21,5±11,9	32,3±11,1	39,2±17,1	52,6±3,7	
Minimum – maximum	2,2-28,8	7,2-35,6	14,6-42,6	11,8-54,0	48,6-57,0	<0,001¶
Median (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> ) ▽	8 (3,4-19,5)	25 (9,3-32,1)	37 (21,5-40,4)	39 (24,7-53,5)	52 (49,1-56,3)	
<b>Necrosis</b>						
Absence	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (100,0)	
1-25%	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (40,0)	0 (0,0)	
26-50%	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (60,0)	2 (40,0)	0 (0,0)	<0,001§
51-75%	0 (0,0)	3 (60,0)	1 (20,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	
76-100%	5 (100,0)	2 (40,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
<b>Necrosis degree</b>						
Mean ± SD	86,0±5,5a	74,0±5,5a	53,0±22,8b	34,0±20,7b	0,0±0,0c	
Minimum – maximum	80 – 90	70 – 80	30 – 80	20 – 70	0,0 – 0,0	<0,001¶
Median (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> ) ▽	90 (80-90)	70 (70-80)	40 (35-77)	30 (20-50)		

\* Values presented as n (%) with percentages obtained based on the total of each group, §: Fisher's Exact test by Monte Carlo simulation; ¶: Analysis of Variability Test (One Way) Pos Hoc Tukey test ▽: Q1 concentrates 25% of the sample with values lower than or equal to that defined by Q1; Q2 = median: concentrates 50% of the sample with values lower or equal to those defined by Q2; Q3: concentrates 75% of the sample with values lower than or equal to that defined by Q3.

## 7. ARTIGO EM PORTUGUÊS: **Preservação da função testicular (endócrina e reprodutiva) em ratos Wistar após criopreservação e transplante**

Ana Luiza Ferrari<sup>1</sup>, Aline Amaral<sup>2</sup>, Fabíola Meyer<sup>3</sup>, Lucia Kliemann<sup>1,4</sup>, Ilma Simoni Brum<sup>2,3,5</sup>, Helena von Eye Corleta<sup>1,3,5</sup>, Edison Capp<sup>1,2,3,5</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Laboratório de Biologia Molecular, Endócrina e Tumoral, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>3</sup> Unidade de Experimentação Animal, Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

<sup>4</sup> Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>5</sup> Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>6</sup> Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Endereço para correspondência:

Prof. Dr. Edison Capp

Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular

Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90 035-903 Porto Alegre, RS, Brazil

Tel. +55 51 3308 3671, Fax +55 51 3311 5699

e-mail: [edcapp@ufrgs.br](mailto:edcapp@ufrgs.br)

## RESUMO

A infertilidade é um dos efeitos indesejados da maioria dos tratamentos quimioterápicos. Atualmente, cerca de 5% das neoplasias malignas acometem pessoas com menos de 35 anos, sendo que 85% dos tratamentos são eficazes. A maioria dos tratamentos oncológicos afeta tecidos responsáveis pelo crescimento celular e alguns são extremamente gonadotóxicos prejudicando as funções gonadais muitas vezes de forma irreversível. Este estudo sugere uma nova possibilidade de evitar a reposição hormonal através da criopreservação (manutenção da viabilidade de material biológico em baixas temperaturas) das gônadas, seguida de transplante homólogo. **Objetivo:** verificar a manutenção das funções endócrinas e reprodutivas após criopreservação e transplante homólogo de testículo. **Métodos:** foram utilizados 43 ratos Wistar (160g-290g) com 50 a 60 dias de idade, provenientes do Centro de Pesquisa do HCPA. Os animais foram submetidos à orquidectomia unilateral e o tecido testicular congelado de duas formas: em fatias e como suspensão celular em 2 tipos diferentes de crioprotetores (PROH e DMSO). Os animais foram então submetidos à quimioterapia (QT) com busulfano em dose única de 40mg/Kg intraperitoneal, visando promover degeneração testicular. Quarenta e dois dias após a QT o material testicular foi descongelado e autotransplantado no testículo preservado. Características histológicas do tecido testicular foram comparadas antes e após tratamento quimioterápico. Os níveis plasmáticos de testosterona total, LH e FSH também foram avaliados. **Resultados:** a função endócrina do testículo não foi afetada de forma significativa após o transplante. No entanto, o transplante das células-tronco espermatogoniais contribuiu para restaurar a capacidade reprodutiva no modelo animal estudado. **Conclusão:** A técnica de criopreservação seguida de transplante homólogo de testículo é bastante promissora para ser utilizada em clínicas de fertilidade, podendo restaurar a capacidade reprodutiva de pacientes pré-puberes submetidos à quimioterapia. No entanto, existem muitos aspectos a serem considerados, inclusive os relacionados às questões éticas.

**Palavras-chave:** quimioterapia, degeneração celular, criopreservação, transplante homólogo, busulfano, testosterona, FSH, LH.

## INTRODUÇÃO

A infertilidade em pacientes jovens é um dos parafeitos indesejados da maioria dos tratamentos quimioterápicos. Atualmente, cerca de 5% das neoplasias malignas acometem pessoas com menos de 35 anos, sendo que 85% dos tratamentos são eficazes<sup>1</sup>. A evolução dos tratamentos oncológicos vem permitindo a sobrevivência dos pacientes com neoplasias malignas<sup>2</sup>, e esse grupo de sobreviventes está aumentando a cada ano<sup>3</sup>. Atualmente, cerca de 80% das crianças submetidas à quimioterapia sobrevivem pelo menos 5 anos após o diagnóstico<sup>4, 5</sup>. Contudo, os efeitos da quimioterapia são extremamente tóxicos e afetam as funções gonadais causando danos irreversíveis aos testículos e indiretamente ao eixo hipotálamo-hipófise<sup>6, 7</sup> podendo ocorrer declínio de androgênios causando sintomas de função sexual reduzida, perda de energia e efeito negativo sobre a massa óssea<sup>8</sup>. Logo, a sobrevivência destes indivíduos acarreta preocupações relacionadas ao potencial de fertilidade na vida adulta<sup>9, 10</sup>. Portanto, semelhante ao que foi feito em tecido ovariano, bancos testiculares oferecem uma possibilidade de conservar a capacidade reprodutiva, se o material biológico for transplantado com sucesso<sup>11</sup>.

Sendo assim, para garantir a qualidade de vida destes pacientes na fase em que desejarem procriar, será necessário focar estas questões antes, durante e após os tratamentos oncológicos. Este estudo sugere uma nova possibilidade de evitar a reposição hormonal através da criopreservação (manutenção da viabilidade de material biológico em baixas temperaturas) das

gônadas, seguida de transplante homólogo. Logo, há chances potenciais de preservar as células germinativas, conservando, assim, a fertilidade na infância.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a manutenção das funções endócrinas e reprodutivas após criopreservação e transplante homólogo de testículo. Assim, através dos resultados encontrados, espera-se contribuir com a otimização de técnicas de restauração e preservação da capacidade reprodutiva destes pacientes tão jovens.



## **OBJETIVOS**

### **Geral**

Verificar a manutenção das funções endócrina e reprodutiva após criopreservação e transplante homólogo de testículo.

### **Específicos**

1. Verificar histologicamente as características do tecido testicular transplantado considerando: espermatogônias, espermátides, diâmetro dos túbulos seminíferos e necrose das células germinativas.
2. Verificar os níveis séricos de testosterona total (TT), hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH)
3. Verificar as medidas morfométricas: peso e volume dos testículos, peso e comprimento do fêmur e peso das vesículas seminais em conjunto com a próstata.
4. Avaliar a presença de espermatozóides no ejaculado mediante lavado vaginal – Teste Pós-coital (TPC).
5. Verificar a ação dos crioprotetores PROH e DMSO e as formas de congelamento (suspensão celular e testículo fatiado) após transplante do tecido testicular.

## MÉTODOS

### Delineamento do estudo

Estudo experimental

### Amostra

Participam deste estudo 43 ratos Wistar machos, com peso corporal entre 160g e 290g, provenientes do Centro de Pesquisa do HCPA. No início do experimento as idades dos animais variaram entre 45 e 60 dias. Este período foi escolhido para que no início dos procedimentos, os mesmos não estivessem sexualmente maduros, o que ocorre no mínimo a partir dos 90 dias de vida. Os animais foram mantidos durante todo experimento (138 dias) incluindo o período de aclimação (14 dias) em caixas de policarbonato cristal transparente que mediam 70 x 70 x 35 cm, e receberam água e alimentação *ad libitum*.

Para calcular o tamanho da amostra foram considerados os valores séricos de testosterona em animais castrados e animais intactos<sup>11</sup>. Para um poder estatístico de 80%, nível de significância de 95%, e uma diferença de 0,5 ng/mL entre os grupos foram necessários 4 animais em cada grupo. A distribuição dos animais foi aleatória entre os grupos (Figura 1). O cálculo foi realizado utilizando o programa PEPI 3.0. Os animais foram distribuídos em 7 grupos: 3 grupos com n=4 e 4 grupos com n=6, totalizando 36 ratos machos. Em razão da possível perda de animais devido a quimioterapia, foram incluídos 2 ratos a mais em cada um dos

grupos que seriam submetidos a terapia oncológica. Dos 46 animais, 3 morreram por causas não relacionadas a quimioterapia (2 ratos morreram durante a cirurgia e 1 rato apresentou pneumonia) totalizando portanto, um n= 43 animais. Também foram utilizadas 10 fêmeas, que foram ooforectomizadas e induzidas a receptividade sexual no final do experimento, para a realização do teste pós-coital. O estudo piloto foi realizado em 10 animais com a finalidade de determinar a dose e o tempo de administração do quimioterápico.

## **Procedimentos**

O algoritmo dos procedimentos é descrito na Figura 2, e o esquema temporal é descrito na Figura 3.

A orquidectomia unilateral foi realizada nos grupos 3, 4, 5, 6, 7. Um dos testículos foi retirado e congelado sob forma de suspensão celular e tecido fatiado, com diferentes crioprotetores: 1,2-Propanediol (PROH) e dimetilsulfóxido (DMSO). As amostras foram colocados em criotubos de 1,2 mL (Corning) e preenchidos com 1 mL de solução crioprotetora de 1,2-Propanediol (PROH) (Sigma Chemical Co., St Louis MO, USA) 1,5M em meio 199 (M 199) suplementado com HEPES e sais de Hanks, contendo 0,4% de BSA (M 199+) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 0,1M de sacarose (S-188, Sigma Chemical Co., St Louis MO, USA) . O material armazenado com DMSO também foi colocado em criotubos de 1,2 mL (Corning) e preenchido com 1 mL de solução crioprotetora de DMSO (Sigma Chemical Co., St Louis MO, USA) 1,5M.

O tecido fatiado foi obtido através de corte transversal no testículo, com aproximadamente 3 mm de espessura. O tecido restante foi utilizado para o preparo da suspensão celular.

### **Suspensão Celular**

A suspensão celular foi adaptada do protocolo de Brinster e colaboradores (1994)<sup>12, 13</sup>. Após a orquidectomia, o testículo foi separado da túnica albugínea, e os túbulos seminíferos foram isolados e lavados com PBS (calcium-free phosphate-buffered saline). Os túbulos seminíferos foram então colocados em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagles's Médium) tamponado com HEPES 20mM, acrescido de colagenase tipo 1 (1mg/ml; Sigma catalogue no. C-0130). Após, foram incubados à 37°C por 15min, sob agitação manual com 5 minutos de intervalo. O material foi centrifugado (600g por 5 minutos) duas vezes em PBS e o sobrenadante desprezado. Após a lavagem o material foi novamente incubado em PBS com EDTA 1mM e tripsina 0,25% por 5 min à 37°C, sob agitação manual. Foi adicionado 1 ml de soro bovino fetal para inativar a tripsina e o material foi filtrado em uma membrana de 60µm. Após a filtração, a solução foi centrifugada (600g por 5 minutos) e o sobrenadante removido. O pellet foi ressuspensionado em 200µl de meio de injeção formando uma suspensão concentrada de células. Para utilizar o meio, foi adicionado 20-50µl de suspensão concentrada em 500µl de meio de injeção. Desta forma, a concentração celular ficou entre de 10<sup>6</sup> e 10<sup>7</sup> células/ml. O azul de tripan foi utilizado para monitorar a presença de células não viáveis na suspensão, que correspondem a menos de 5%.

## **Criopreservação**

O processo de criopreservação foi realizado em vapor de nitrogênio líquido de forma lenta. Inicialmente as amostras foram submetidas a duas fases de resfriamento gradual (4°C e -20°C) em intervalos de 30 minutos. Após estes dois estágios pré-congelamento, o material foi submetido ao vapor de nitrogênio líquido onde permaneceu por mais 30 minutos. Depois de congeladas, as amostras foram transferidas para o banco de criopreservação onde ficaram armazenadas a -196°C até o transplante<sup>14</sup>.

Para o descongelamento, os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e foram colocados em banho-maria à 37°C por 5 minutos. O material sob forma de suspensão foi centrifugado (600X g durante 5 minutos à 16°C) e o sobrenadante desprezado. O pellet foi ressuspendido em 400µl de meio de injeção<sup>13</sup>.

## **Quimioterapia**

A partir do estudo piloto, ficou estabelecido o busulfano (Sigma-Aldrich lote: B2635-10G, Milwaukee, Wisconsin, USA) como o agente quimioterápico por ser um potente agente que danifica preferencialmente a célula-tronco espermatogonial (A<sub>s</sub>)<sup>12, 13</sup>. Este agente foi administrado nos animais 24 h após sua diluição<sup>15, 16</sup>, na dose única intraperitoneal de 40 mg/kg. Após a administração do busulfano, os animais ficaram 42 dias sob observação, período necessário para ocorrer degeneração celular<sup>17</sup>.

## Transplante

O sucesso do transplante das células espermatogoniais está associado ao número de células injetadas<sup>18</sup> e ao local do transplante<sup>19</sup>. O primeiro método utilizado para realização deste procedimento em camundongo foi a microinjeção intratubular em locais diversos dos túbulos seminíferos<sup>13, 19</sup>. Posteriormente, outros locais foram testados, como o canal deferente e a *rete testis*. Desta forma, foi possível demonstrar que outros locais são capazes de promover o reinício da espermatogênese<sup>20, 21</sup>. Também foi demonstrado que o local destas microinjeções deve variar de acordo com a espécie do animal. No caso dos primatas e seres humanos a técnica de infusão mais promissora é através de múltiplas injeções guiadas por ultrasonografia na *rete testis*, visto que injeções nos túbulos seminíferos ou no canal deferente apresentaram-se ineficientes em testículos maiores<sup>22</sup>.

Decorridos 42 dias do tratamento quimioterápico, o material biológico previamente preparado foi descongelado e autotransplantado no testículo preservado dos animais<sup>23</sup>. Para os grupos 4 e 5 o transplante foi realizado sob forma de tecido fatiado (0,3g à 0,2g), e para os grupos 6 e 7 sob forma de suspensão celular (10 $\mu$ l). A suspensão celular foi injetada no testículo preservado através de seringa de insulina 50 UI com agulha curta de 30G e comprimento de 8 mm (BD Ultra Fine™ II, BD BioSciences, San Jose, CA), nos túbulos seminíferos<sup>20</sup> e o tecido fatiado foi introduzido no testículo preservado através de uma incisão cirúrgica de aproximadamente 1cm na altura da bolsa escrotal do animal<sup>24</sup>.

Os procedimentos cirúrgicos foram conduzidos sob anestesia intramuscular combinando: quetamina (Ketalar, Parke-Davis, São Paulo, Brasil) e Xilazina (Rompum, Bayer, São Paulo, Brasil) na proporção de 100:50 mg/kg. Após a

orquidectomia e transplante os animais ficaram sob observação em ambiente aquecido (28°C) até completa recuperação. No pós-operatório e na aplicação da quimioterapia, foi administrada dipirona sódica na dose de 200mg/kg<sup>23, 24</sup>.

### **Indução Hormonal das Fêmeas e Acasalamento**

As fêmeas, com aproximadamente 90 dias de vida, foram ooforectomizadas e induzidas a receptividade sexual<sup>23</sup> por injeções subcutâneas seqüenciais de 2 µg de estradiol (Benzoginoestril, Sarsa, Rio de Janeiro, Brasil) 48 h antes e 500 µg de progesterona (Ginecoside, Darrow, Rio de Janeiro, Brasil) 6 h antes do início do teste. Somente fêmeas sexualmente receptivas (apresentando comportamento lordótico) foram utilizadas neste procedimento<sup>24</sup>.

Para realização do Teste Pós-Coital (TPC), 75 dias após o transplante<sup>25</sup>, os ratos machos foram colocados com as fêmeas para acasalar. Para adaptação ao ambiente, os machos foram colocados em caixas individuais 20 minutos antes das fêmeas<sup>23, 24</sup>. Em um período mínimo de 12 horas após a cópula, foi realizado o TPC (método foi adaptado de Oei *et al*, 1998). A coleta do muco endocervical das ratas foi realizada com o auxílio de pipetas *Pasteur* contendo soro fisiológico, para verificar a presença de espermatozóides no muco. A avaliação das lâminas foi realizada sob microscopia ótica (Carl Zeiss – bifocal) e foram contados 10 campos sob aumento de 400X. Foi determinado valor positivo quando as ratas apresentaram espermatozóides no muco endocervical e valor negativo quando as ratas que não apresentaram espermatozóides no muco endocervical. Porém, todos os animais que apresentaram TPC negativo foram submetidos à coleta de

espermatozoides do canal deferente com a finalidade de descartar a hipótese de falha da indução hormonal nas ratas<sup>26</sup>. Após o TPC os animais foram pesados e mortos em câmara de CO<sub>2</sub>, segundo normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

### **Medidas Morfométricas**

Após a morte dos animais foram obtidas as medidas morfométricas, através de uma balança da marca Marte AS 5500C e uma régua simples milimetrada. Os testículos foram retirados através de uma incisão na linha média do abdômen e então colocados em uma placa de Petri para serem pesados e medidos. Devido à forma elipsóide do testículo, o volume foi obtido através da fórmula:  $\frac{4}{3} \pi a.b.c$  onde a=comprimento, b=largura e c=altura<sup>25</sup>. Da mesma forma, o fêmur foi pesado e medido e as vesículas seminais e a próstata foram pesadas de forma conjunta.

### **Análise Histológica**

Foi coletado aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> de tecido testicular para realização da análise histológica. Após a coleta o material foi conservado em formol à 10% até ser submetido à análise<sup>23</sup>. O tecido testicular foi fixado em formalina, embebido em parafina, cortado e corado através da técnica hematoxilina-eosina (HE)<sup>23, 27</sup>.



A espermatogênese foi analisada através do método semi-quantitativo e os critérios utilizados para verificar a severidade e a frequência nas alterações das células germinativas foram: a contagem de espermatogônias, contagem de espermátides, medida do diâmetro dos túbulos seminíferos (média do menor diâmetro de cada túbulo) e o grau de necrose (para estimar o grau da lesão) <sup>12, 27</sup>. Para a realização do estudo histológico foi padronizada a análise de 30 túbulos seminíferos, sendo avaliados apenas túbulos arredondados<sup>28</sup>. O grau de necrose foi classificado de acordo com critérios já estabelecidos em: grau 1 para grau mínimo de lesão; grau 2 para grau médio; grau 3 para moderado; grau 4 para máximo de dano e grau 5 para necrose das células do túbulo<sup>27</sup>.

O material utilizado para análise histológica foi coletado durante três procedimentos: orquidectomia unilateral (T1), transplante (T2) e após morte dos animais (T3).

### **Análise Hormonal**

Os níveis plasmáticos de testosterona total (TT), hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) foram determinados através de radioimunoensaio. O sangue foi coletado através do plexo venoso retro-ocular na orquidectomia e no transplante. Na morte dos animais a coleta foi realizada através da veia porta. As amostras foram centrifugadas para separação do soro, que foi armazenado a -20°C até a análise através de kits comerciais (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Los Angeles, CA) <sup>24</sup>.

O material utilizado para análise hormonal foi coletado durante três procedimentos: orquidectomia unilateral (T1), transplante (T2) e após morte dos animais (T3).

### **Análise Estatística**

Foi realizada a análise de variância de medidas repetidas não-paramétrica, teste de Friedman, pelo software *SPSS 17.0 (Statistical Package to Social Sciences for Windows)* complementado pelo teste de Dunn na comparação das variáveis: a. Presença de Espermatogônias (ESMTG), b. Média do Diâmetro dos Túbulos Seminíferos (MDTS), c. Grau de Necrose (GN), d. Presença de Espermátides (ESPTD) em função do tempo e entre os grupos. Para a comparação entre dois grupos independentes foi utilizado o teste de Mann Whitney, e nas situações de dados pareados o teste de Wilcoxon. Na comparação entre as variáveis qualitativas foi utilizado teste Exato de Fisher. Para todas as análises foi considerando significativo  $p < 0,05$ .

### **Aspectos éticos e de biossegurança**

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - número de registro 07 - 091.

## RESULTADOS

### Análise Histológica

Na Tabela 1 são apresentados os valores para o percentual de espermatogônias (média e erro padrão) de acordo com os diferentes grupos e tempos. O percentual de espermatogônias nos túbulos seminíferos dos grupos 3, 4, 5, 6 e 7 diminuiu na análise histológica realizada 42 dias após o tratamento quimioterápico (T2) quando comparado ao grupo 1 ( $p < 0,05$ ). Na análise histológica realizada 75 dias após o transplante (T3) para os grupos 3 a 7, a média de espermatogônias presentes nos túbulos seminíferos aumentou em relação ao T2 ( $p < 0,05$ ), e retornou aos valores iniciais observados em T1, sendo que, para todos os grupos, as médias em T3 foram semelhantes a média do grupo 1 ( $p > 0,05$ ).

Na Tabela 2 são apresentados os valores para o percentual de espermátides (média e erro padrão) de acordo com os diferentes grupos e tempos. Foi observada uma diminuição das espermátides nos grupos 3 a 7 no T2 em relação ao T1 ( $p < 0,01$ ). O grupo 3 apresentou média em T2 significativamente menor do que os demais ( $p < 0,006$ ). A contagem de espermátides aumentou no T3 em relação ao T2 para os grupos 3 a 7 ( $p < 0,01$ ).

Na Tabela 3 são apresentadas as medidas do diâmetro dos túbulos seminíferos (média e erro padrão) de acordo com os diferentes grupos e tempos. Na comparação em relação ao tempo para os grupos 4, 5 e 6, verificou-se que as medidas no T2 diminuíram em relação ao T1, e aumentaram no T3 em relação ao T2 ( $p < 0,02$ ). O grupo 7 não mostrou diferenças significativas entre os tempos, não

tendo diminuído a MDTS no T2 ( $p>0,05$ ). O grupo 1 manteve a média do T1 para o T2 e aumentou no T3 ( $p<0,04$ ).

Na Tabela 4 são apresentados os valores para o grau de necrose (média e erro padrão) de acordo com os diferentes grupos e tempos. Todos os grupos tiveram aumento significativo de necrose no T2 quando comparado ao T1 ( $p<0,02$ ). O grupo 1 apresentou o menor grau de necrose no T2 ( $p<0,001$ ). Foi observada uma diminuição no grau de necrose no T3 em relação ao T2 para os grupos 4 a 6 ( $p<0,01$ ). Os grupos 3 e 7 não apresentaram diferença no grau de necrose no T3 em relação ao T2 ( $p>0,05$ ).

### **Análise Hormonal**

Na Tabela 5 são apresentados os valores para os níveis de testosterona (média e erro padrão) de acordo com os diferentes grupos e tempos. Em relação aos níveis de testosterona, no T1 foram observadas diferenças entre os grupos, de forma que os grupos 1, 3, 5 e 7 apresentaram médias maiores do que os grupos 4 e 6. As médias dos grupos 4 e 6, quando comparadas a média do grupo 2, foram maiores ( $p<0,02$ ). Também foram observadas diferenças no grupo 1, cujos níveis de testosterona diminuíram do T1 para o T2, e aumentaram do T2 para o T3 ( $p<0,04$ ). Quanto ao grupo 6, verificou-se inicialmente um aumento nos níveis de testosterona no T2 em relação ao T1 e uma diminuição do T3 em relação ao T2 ( $p<0,009$ ). No T3, pode-se observar que a média do grupo 1 foi maior do que a média dos demais grupos. Entre os grupos 3 a 7, as médias foram semelhantes, e a média do grupo 2 foi significativamente menor do que as demais ( $p<0,03$ ).

Na Tabela 6 são apresentados os valores para os níveis de FSH (média e erro padrão) de acordo com os diferentes grupos e tempos. Em relação aos níveis médios de FSH em cada um dos tempos e também entre os grupos, as diferenças não se mostraram significativas ( $p>0,05$ ).

Na Tabela 7 são apresentados os valores para os níveis de LH (média e erro padrão) de acordo com os diferentes grupos e tempos. Em relação aos níveis médios de LH em cada um dos tempos e também entre os grupos, as diferenças não se mostraram significativas, com exceção do grupo 3. Este grupo apresentou um aumento do valor médio no T2 em relação ao T1, e uma diminuição do valor médio no T3 em relação ao T2 ( $p<0,03$ ).

### **Análise Morfométrica**

Na Tabela 8 são apresentados os resultados das análises morfométricas: peso e volume do testículo, peso e comprimento do fêmur e peso das vesículas e da próstata (média e erro padrão), para os diferentes grupos (T3).

Na comparação do peso e volume do testículo, os grupos 3 a 7 apresentaram médias significativamente menores do que o grupo 1 ( $p<0,002$  e  $p<0,004$ , respectivamente).

Verificou-se que o peso e o comprimento do fêmur não diferiram de forma significativa entre os grupos ( $p<0,0201$  e  $p<0,487$ , respectivamente).

Em relação ao peso conjunto das vesículas e da próstata, o grupo 2 foi o que apresentou o menor peso em relação aos demais grupos. Os demais grupos apresentaram peso significativamente maior que o grupo 2, no entanto, para os grupos 6 e 7, o peso foi significativamente menor do que para o grupo 1 ( $p<0,002$ ).

### **Teste Pós-Coital - TPC**

Na Tabela 9 são apresentados resultados da distribuição do teste pós-coital e análise seminal para cada grupo. Em relação às proporções de resultados positivos e negativos entre os grupos no TPC, as variações observadas não foram significativas ( $p=0,25$ ).

### **Relação entre os Dados Morfométricos e o TPC**

Os dados morfométricos foram comparados entre si de acordo com os resultados encontrados no TPC, com objetivo de verificar possíveis relações entre as variáveis e o sucesso do transplante, representado pelo resultado positivo do teste (Figura 8). Os resultados não diferiram de forma significativa entre os grupos com TPC positivo e negativo, indicando que as medidas morfométricas analisadas não alteram o resultado do teste ( $p>0,05$ ).

### **Relação entre os Crioprotetores e Formas de Congelamento e Transplante e o TPC**

Possíveis diferenças entre os crioprotetores (DMSO e PROH) e as formas de congelamento seguido de transplante (suspensão celular e tecido fatiado), foram comparadas em relação ao resultado do TPC (Tabela 10). Os resultados demonstram que não houve diferença significativa em relação às formas de congelamento e o resultado do TPC ( $p>0,05$ ). O mesmo foi observado em relação aos diferentes crioprotetores, indicando que o resultado do teste pós-coital independe do crioprotetor utilizado e da forma de congelamento e transplante.

## DISCUSSÃO

### Análise Histológica

As espermatogônias são consideradas células-tronco dos testículos e estão localizadas na membrana basal dos túbulos seminíferos. Estas células se diferenciam ao passar por vários ciclos de mitoses e estas divisões marcam o início do processo espermatogênico<sup>29, 30</sup>.

Foi observado que, após o tratamento com busulfano (T2), a contagem de espermatogônias diminuiu em relação ao grupo não-tratado, de forma semelhante as observações de Brinster & Avarbock (1994) e Brinster e Zimmermann (1994). Isto ocorre devido à capacidade do busulfano de causar dano celular nas células germinativas, principalmente na espermatogônia  $A_s$ <sup>12, 13</sup>. O aumento da contagem de espermatogônias observado 75 dias após o transplante (T3) indica que o transplante de células após o tratamento quimioterápico pode contribuir para a restauração da população de espermatogônias<sup>17, 20</sup>.

No entanto, o mesmo foi observado para a média de espermatogônias do grupo 3, que não realizou o transplante após a quimioterapia, indicando que algumas células-tronco espermatogoniais resistiram ao tratamento quimioterápico, restaurando alguns túbulos seminíferos. As espermatogônias são as células mais resistentes da espermatogênese<sup>31</sup> e geralmente sobrevivem à exposição de substâncias tóxicas (quimioterapia), provavelmente porque se dividem com menor frequência<sup>27, 32</sup>.

De forma semelhante, Anjamrooz e col. (2007) demonstraram que alterações nos túbulos seminíferos foram observadas 42 dias após tratamento

quimioterápico, que é o período em que o agente quimioterápico atinge o efeito de dano máximo nas células germinativas. Observaram também que, em torno de 56 dias depois, as espermatogônias que sobreviveram à terapia oncológica começaram a restabelecer o processo de mitose aumentando o número de células germinativas<sup>17</sup>.

Estudos realizados em camundongos demonstraram que os efeitos do busulfano nas espermatogônias são dependentes da dose, e que a dose é espécie-específica<sup>33</sup>. A duração do dano testicular provocado pelo busulfano vai depender da extensão da depleção celular<sup>34</sup>. Existe, portanto, a possibilidade de que ocorra a perda irreversível das células germinativas, promovendo azoospermia, possivelmente com aplicações de doses mais elevadas do busulfano. No entanto, foi demonstrado que a dose deve ser controlada, porque experimentos que utilizaram doses entre 45-50mg/kg promoveram a morte dos animais<sup>35</sup>. Resultados recentes do nosso grupo de pesquisa indicam que a dose ideal para não comprometer a sobrevivência dos animais é de 40 mg/Kg (dados ainda não publicados). Provavelmente a perda irreversível da fertilidade também possa ocorrer devido a sucessivos tratamentos quimioterápicos.

A contagem de espermátides nos túbulos seminíferos foi realizada com a finalidade de confirmar a restauração do processo espermatogênico. Portanto, a diminuição das espermátides observada no T2 reflete a diminuição de espermatogônias, que são as células precursoras das espermátides. O efeito mais pronunciado do quimioterápico na contagem de espermátides pode ser observado para o grupo 3, cuja média em T2 foi significativamente menor do que os demais grupos, o que pode representar uma variação na resposta individual ao quimioterápico.



Da mesma forma que a média de espermatogônias, a média de espermátides aumentou devido à restauração da proliferação e da diferenciação das células-tronco espermatogoniais. Também para o grupo 3 a média de espermátides aumentou, confirmando os resultados observados para as espermatogônias em relação a este grupo no T3<sup>17, 20</sup>.

Os resultados relativos à MDTs demonstram que sob o efeito do quimioterápico a medida dos túbulos diminuiu significativamente, e aumentou devido à restauração das células germinativas dos testículos transplantados<sup>20</sup>.

O grau de necrose do tecido testicular aumentou após a quimioterapia. O efeito do busulfano neste parâmetro foi semelhante entre os grupos tratados<sup>19</sup>. A diminuição do grau de necrose observada na maioria dos grupos transplantados permite sugerir que o transplante contribuiu de forma significativa para o repovoamento celular dos túbulos seminíferos, o que pode ser confirmado pela manutenção do grau de necrose no que não realizou o transplante<sup>17, 19, 20</sup>.

No caso particular do grupo 1, foi observado um aumento progressivo no grau de necrose. Como este grupo não é submetido à quimioterapia nem ao transplante, estas alterações podem ter ocorrido devido às sucessivas biópsias, hemorragia ou possível infecção decorrente da biópsia<sup>36</sup>.

### **Análise Hormonal**

As gonadotrofinas liberadas pela adeno-hipófise, FSH e LH, desempenham um papel extremamente importante no funcionamento das células-tronco espermatogoniais. O LH atua nas células de Leydig, estimulando a síntese e liberação de testosterona, que por sua vez regula a espermatogênese atuando nas

células de Sertoli. O FSH e a testosterona estimulam nas células de Sertoli a síntese de proteínas de ligação de androgênios, que se ligam na testosterona, aumentando a concentração deste hormônio no fluido do lúmen tubular. Desta forma, as gonadotrofinas e a testosterona atuam de forma sincronizada para que ocorra o processo de diferenciação das espermatogônias, originando os espermatozóides<sup>29</sup>. Sob a influência do FSH, as células de Sertoli liberam a proteína inibina B, que exerce feedback negativo na secreção de FSH. De forma semelhante, a testosterona exerce feedback negativo sobre a liberação de LH<sup>37</sup>.

A deficiência na produção da testosterona, nos receptores de androgênios ou nas proteínas de ligação de androgênios resulta em elevação dos níveis de LH e interrupção da espermatogênese durante a meiose, indicando que a ação da testosterona sobre as células de Sertoli é essencial para esta etapa da divisão celular<sup>38, 39</sup>.

As diferenças nos níveis de testosterona observadas entre os grupos no T1 podem ocorrer devido a variações encontradas nos níveis deste hormônio na fase pré-puberal, que corresponde à idade dos animais em torno de 60 dias<sup>37</sup>.

As variações observadas em alguns grupos em relação aos tempos analisados podem ser devidas à baixa atividade do eixo hipotálamo-hipófise na pré-puberdade, e às limitações dos procedimentos de coleta de sangue e dos kits comerciais utilizados para a análise hormonal, sugere-se que mais estudos devam ser realizados para otimizar as técnicas necessárias para este modelo animal<sup>37, 40</sup>.

As células de Leydig, por serem menos suscetíveis ao busulfano, mantiveram os níveis séricos de testosterona significativamente mais elevados em todos os grupos em relação aos animais castrados.

Os níveis séricos de LH variaram em um único grupo em relação aos tempos. Uma elevação nos níveis de LH corresponderia a uma diminuição nos níveis de testosterona, por ausência de feedback negativo. No entanto, este grupo apresentou nível de testosterona estável ao longo do tempo. De forma semelhante ao observado em outros grupos para os níveis séricos de testosterona, é provável que a variação dos níveis séricos de LH tenha ocorrido devido à baixa atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas na pré-puberdade, e pelas limitações dos procedimentos de coleta de sangue e dos kits comerciais utilizados para a análise hormonal<sup>37</sup>.

Krawczuk-Rybak e col. verificaram os níveis hormonais em meninos na pré-puberdade, antes e 2,5 anos após serem submetidos a quimioterapia, e não encontraram diferença nos níveis séricos de FSH, LH e testosterona, quando comparados aos respectivos valores do grupo controle (meninos saudáveis na pré-puberdade). Uma das conclusões importantes deste trabalho diz respeito à limitação que as técnicas oferecem para dosagem hormonal de crianças na pré-puberdade, e, de forma semelhante aos resultados de outros autores, verificou-se que não há diferença nos níveis séricos de FSH, LH e testosterona. Estes resultados sugerem a possibilidade de recuperação dos níveis hormonais existentes antes do tratamento<sup>37</sup>. No presente estudo, o tempo decorrido entre o tratamento quimioterápico e a análise hormonal no T3 foi proporcionalmente menor do que o tempo do estudo de Krawczuk-Rybak e cols. No entanto, esta comparação é difícil de ser estabelecida com precisão, devido à diferença dos modelos experimentais entre os estudos.

Outra possibilidade de não terem sido verificadas diferenças significativas em relação aos níveis hormonais do LH e FSH pode estar relacionada ao padrão de secreção pulsátil das gonadotrofinas<sup>41</sup>. Devido às variações diárias na

concentração destes hormônios, o mais adequado seria analisar um *pool* de amostras coletadas em um determinado tempo, para que as informações sobre os níveis plasmáticos sejam precisas.

### **Análise Morfométrica**

As alterações observadas no peso e no volume do testículo possivelmente refletem a ação alquilante do agente quimioterápico nos túbulos seminíferos, já observada na análise histológica.

Anjamrooz e colaboradores (2007) em um estudo com camundongos demonstraram que o transplante das células espermatogênicas desempenha um papel importante na recuperação das células germinativas, através da observação do aumento de peso e volume dos testículos, 75 dias após o transplante<sup>17</sup>. No entanto, o presente estudo verificou que os grupos submetidos a quimioterapia e transplante não recuperaram o peso e o volume dos testículos em relação ao grupo 1, no mesmo tempo de 75 dias após o transplante. É possível que este tempo não tenha sido suficiente para o aumento do peso e do volume do testículo após o transplante, para este modelo animal<sup>35</sup>.

Entre os tecidos-alvo da testosterona, foram analisados o tecido ósseo, através das medidas de peso e comprimento do fêmur, e o tecido glandular, através do peso das vesículas seminais e da próstata.

A manutenção do peso e comprimento do fêmur indica que as variações observadas nos níveis de testosterona séricos no T3 não causaram alterações significativas na massa óssea<sup>41</sup>.

Em relação ao peso conjunto das vesículas e da próstata, o grupo castrado foi o que apresentou o menor peso em relação aos demais grupos, demonstrando que o crescimento destas glândulas é dependente de testosterona<sup>41</sup>.

### **Teste Pós-Coital - TPC**

Nos animais em que o TPC foi negativo, a análise seminal foi realizada através de material coletado do canal deferente para verificar a presença de espermatozóides, apenas em caráter descritivo. Para os grupos 1, 3, 4 e 5, mesmo o TPC sendo negativo, verificou-se a presença de espermatozóides no canal deferente.

O grupo 3, que não realizou o transplante, apresentou maior proporção de resultados negativos, e para todos os animais deste grupo a contagem de espermatozóides foi baixa, inclusive para os animais que apresentaram TPC positivo (menos de 10 espermatozóides por campo). No entanto, em todos os grupos submetidos ao transplante (grupos 4 a 7), no mínimo dois animais em cada grupo apresentaram contagem superior a 10 espermatozóides por campo e TPC positivo.

Estes resultados sugerem que o transplante de células testiculares promove uma importante contribuição na restauração do processo espermatogênico<sup>19, 20, 35, 42</sup>.

### **Relação entre os Crioprotetores e Formas de Congelamento e Transplante e o TPC**

A suspensão celular tem sido utilizada para facilitar o processo de criopreservação. Na preparação deste método, utiliza-se a digestão enzimática e

mecânica do tecido, comprometendo a sobrevivência das células<sup>22</sup>. A interação entre as células, que é um mecanismo importante para a proliferação e diferenciação celular, também apresenta alterações quando as células são submetidas e este método<sup>39, 42</sup>.

Geens e colaboradores (2008) demonstraram, em estudos realizados em diferentes modelos animais, uma viabilidade celular após o descongelamento em torno de 29-82%. Em seres humanos a viabilidade após o descongelamento das células testiculares preparadas sob forma de suspensão apresentou-se em torno de 60%<sup>42, 43</sup>.

A criopreservação do tecido testicular fatiado pode ser considerada um método alternativo para não comprometer o contato entre as células-tronco germinativas e as células de Sertoli, preservando assim o nicho necessário para que as células-tronco sobreviventes alcancem o estágio de maturação<sup>44</sup>. Outra vantagem deste método pode ser a preservação das células de Sertoli<sup>45</sup> e das células de Leydig<sup>38, 46</sup>.

## CONCLUSÃO

Após o tratamento quimioterápico foi possível verificar a degeneração das células germinativas, e que os grupos transplantados recuperaram as características histológicas normais. Porém, verificou-se que algumas células-tronco espermatogoniais resistiram ao tratamento quimioterápico, restaurando alguns túbulos seminíferos. Desta forma, acreditamos que para melhor avaliação do transplante autólogo, sucessivos tratamentos quimioterápicos devem ser realizados com o objetivo de depletar de forma irreversível as células germinativas dos túbulos seminíferos.

Apesar das limitações encontradas na análise hormonal, verificou-se que os níveis de testosterona não variaram, indicando que as células de Leydig são menos suscetíveis ao busulfano.

O teste pós-coital seguido da análise seminal do canal deferente é um bom indicador da capacidade reprodutiva. Através destes testes, foi possível verificar que os animais não transplantados apresentaram uma baixa contagem de espermatozoides, indicando um comprometimento da fertilidade. Os animais transplantados apresentaram contagem mais elevada, indicando que o transplante de células-tronco espermatogoniais contribui para a restauração da capacidade reprodutiva.

As diferentes formas de congelamento e transplante de tecido, bem como os crioprotetores estudados, se mostraram igualmente eficazes para garantir a integridade das células durante o congelamento, descongelamento e transplante.

## REFERÊNCIAS

1. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer, principles & practice of oncology. 7th ed. ed. Philadelphia, Pa. ; London: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
2. Stiller CA. Population based survival rates for childhood cancer in Britain, 1980-91. *BMJ* 1994;309:1612-6.
3. Aslam I, Fishel S, Moore H, Dowell K, Thornton S. Fertility preservation of boys undergoing anti-cancer therapy: a review of the existing situation and prospects for the future. *Hum Reprod* 2000;15:2154-9.
4. Robison LL, Armstrong GT, Boice JD, et al. The Childhood Cancer Survivor Study: a National Cancer Institute-supported resource for outcome and intervention research. *J Clin Oncol* 2009;27:2308-18.
5. Stiller C. Childhood cancer in Britain : incidence, survival, mortality. Oxford: Oxford University Press; 2007.
6. Sklar C. Reproductive physiology and treatment-related loss of sex hormone production. *Med Pediatr Oncol* 1999;33:2-8.
7. Sklar CA, Constine LS. Chronic neuroendocrinological sequelae of radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;31:1113-21.
8. Davis SR, Burger HG. Clinical review 82: Androgens and the postmenopausal woman. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2759-63.
9. Oosterhuis BE, Goodwin T, Kiernan M, Hudson MM, Dahl GV. Concerns about infertility risks among pediatric oncology patients and their parents. *Pediatr Blood Cancer* 2008;50:85-9.
10. Zebrack BJ, Casillas J, Nohr L, Adams H, Zeltzer LK. Fertility issues for young adult survivors of childhood cancer. *Psychooncology* 2004;13:689-99.



11. Yin H, Wang X, Kim SS, Chen H, Tan SL, Gosden RG. Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype. *Hum Reprod* 2003;18:1165-72.
12. Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11303-7.
13. Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11298-302.
14. Vieira M, Ferragout LM, Brand VBF. Criopreservação de espermatozoides. In: I Consenso Brasileiro de Embriologia em Medicina Reprodutiva. São Paulo; 2004.
15. Hassan M, Ljungman P, Bolme P, et al. Busulfan bioavailability. *Blood* 1994;84:2144-50.
16. Karstens A, Krämer I. Chemical and physical stability of diluted busulfan infusion solutions. *The European Journal of Hospital Pharmacy Science* 2007;13:8.
17. Anjamrooz SH, Movahedin M, Mowla SJ, Bairanvand SP. Assessment of morphological and functional changes in the mouse testis and epididymal sperms following busulfan treatment. *Iran Biomed J* 2007;11:15-22.
18. Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biol Reprod* 1999;61:1331-9.
19. Geens M, Goossens E, De Block G, Ning L, Van Saen D, Tournaye H. Autologous spermatogonial stem cell transplantation in man: current obstacles for a future clinical application. *Hum Reprod Update* 2008;14:121-30.
20. Ogawa T, Arechaga JM, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol* 1997;41:111-22.
21. Stefanini M. Testicular function : from gene expression to genetic manipulation. Berlin ; New York: Springer-Verlag; 1998.

22. Brook PF, Radford JA, Shalet SM, Joyce AD, Gosden RG. Isolation of germ cells from human testicular tissue for low temperature storage and autotransplantation. *Fertil Steril* 2001;75:269-74.
23. Rasia-Filho AA, Lucion AB. Effects of 8-OH-DPAT on sexual behavior of male rats castrated at different ages. *Horm Behav* 1996;30:251-8.
24. Miragem A, Neto BS, Reche M, Kliemann LM, Capp E, von Eye Corleta H. Subcutaneous autologous testicle transplantation in Wistar rats. *Int Urol Nephrol* 2009;41:313-8.
25. Krinke G. *The laboratory rat*. San Diego, Calif. ; London: Academic; 2000.
26. Oei SG, Helmerhorst FM, Bloemenkamp KW, Hollants FA, Meerpoel DE, Keirse MJ. Effectiveness of the postcoital test: randomised controlled trial. *BMJ* 1998;317:502-5.
27. Russell LD. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. 1st ed. Clearwater, Fl: Cache River Press; 1990.
28. Hikim AP, Amador AG, Klemcke HG, Bartke A, Russell LD. Correlative morphology and endocrinology of Sertoli cells in hamster testes in active and inactive states of spermatogenesis. *Endocrinology* 1989;125:1829-43.
29. Oatley JM, Brinster RL. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008;24:263-86.
30. Schlatt S, von Schonfeldt V, Schepers AG. Male germ cell transplantation: an experimental approach with a clinical perspective. *Br Med Bull* 2000;56:824-36.
31. de Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 2000;21:776-98.

32. Clermont Y, Bustos-Obregon E. Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto". *Am J Anat* 1968;122:237-47.
33. Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Morimoto T, Matsui S, Honjo T, Shinohara T. Functional assessment of self-renewal activity of male germline stem cells following cytotoxic damage and serial transplantation. *Biol Reprod* 2003;68:1801-7.
34. Meistrich ML. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis. *Eur Urol* 1993;23:136-41; discussion 42.
35. Avarbock MR, Brinster CJ, Brinster RL. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nat Med* 1996;2:693-6.
36. David A, Rios AR, Tarragô RP, Dalmina V. Biópsia com agulha nos tumores ósseos. *Revista Brasileira de Ortopedia* 1996;31:4.
37. Krawczuk-Rybak M, Solarz E, Wolczynski S. Male gonadal function before and after chemotherapy in prepubertal boys. *Rocz Akad Med Bialymst* 2004;49 Suppl 1:126-8.
38. Howell SJ, Shalet SM. Testicular function following chemotherapy. *Hum Reprod Update* 2001;7:363-9.
39. Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 1998;9:411-6.
40. Brougham MF, Kelnar CJ, Wallace WH. The late endocrine effects of childhood cancer treatment. *Pediatr Rehabil* 2002;5:191-201.
41. Knobil E, Neill JD. *The Physiology of reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1994.
42. Wyns C, Curaba M, Vanabelle B, Van Langendonck A, Donnez J. Options for fertility preservation in prepubertal boys. *Hum Reprod Update* 2010;16:312-28.

43. Hovatta O. Cryopreservation of testicular tissue in young cancer patients. *Hum Reprod Update* 2001;7:378-83.
44. Ogawa T, Ohmura M, Ohbo K. The niche for spermatogonial stem cells in the mammalian testis. *Int J Hematol* 2005;82:381-8.
45. Bar-Shira Maymon B, Yogev L, Marks A, Hauser R, Botchan A, Yavetz H. Sertoli cell inactivation by cytotoxic damage to the human testis after cancer chemotherapy. *Fertil Steril* 2004;81:1391-4.
46. Richie JP. Testicular function following chemotherapy. *J Urol* 2002;168:1287.

## LEGENDAS

**Figura 1:** Algoritmo da distribuição dos animais em cada grupo

**Figura 2:** Algoritmo dos procedimentos

**Figura 3:** Esquema temporal dos procedimentos

**Figura 4:** Média e Intervalo de Confiança 95% (IC95%) para o peso e volume do testículo, peso e comprimento do fêmur, e peso das vesículas e da próstata segundo o resultado do teste pós-coital. §: teste de Mann Whitney.

**Tabela 1:** Média e erro padrão de espermatogônias (contagem de túbulos com espermatogônias em um total de 30 túbulos). § Teste de Friedman, teste de Dunn Post Hoc, onde médias com letras minúsculas iguais (na mesma linha ou na mesma coluna) são semelhantes estatisticamente ( $p > 0,05$ ); ¶: Teste de Mann Whitney, teste de Dunn Post Hoc, onde médias com letras maiúsculas iguais (na mesma linha ou na mesma coluna) são semelhantes estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 2:** Média e erro padrão de espermátides (contagem de túbulos com espermátides em um total de 30 túbulos). § Teste de Friedman, teste de Dunn Post Hoc, onde médias com letras minúsculas iguais (na mesma linha ou na mesma coluna) são semelhantes estatisticamente ( $p > 0,05$ ); ¶: Teste de Mann Whitney, teste de Dunn Post Hoc, onde médias com letras maiúsculas iguais (na mesma linha ou na mesma coluna) são semelhantes estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 3:** Média e erro padrão da medida do diâmetro dos túbulos seminíferos. § Teste de Friedman, teste de Dunn Post Hoc, onde médias com letras minúsculas iguais (na mesma linha ou na mesma coluna) são semelhantes estatisticamente ( $p > 0,05$ ); ¶: Teste de Mann Whitney, teste de Dunn Post Hoc, onde médias com letras maiúsculas iguais (na mesma linha ou na mesma coluna) são semelhantes estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 4:** Média e erro padrão do grau de necrose. § Teste de Friedman, teste de Dunn Post Hoc, onde médias com letras minúsculas iguais (na mesma linha ou na mesma coluna) são semelhantes estatisticamente ( $p > 0,05$ ); ¶: Teste de Mann Whitney, teste de Dunn Post Hoc, onde médias com letras maiúsculas iguais (na mesma linha ou na mesma coluna) são semelhantes estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 5:** Média e erro padrão dos níveis séricos de testosterona. § Teste de Friedman, teste de Dunn Post Hoc, onde médias com letras minúsculas iguais (na mesma linha ou na mesma coluna) são semelhantes estatisticamente ( $p > 0,05$ ); ¶: Teste de Mann Whitney, teste de Dunn Post Hoc, onde médias com letras maiúsculas iguais (na mesma linha ou na mesma coluna) são semelhantes estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 6:** Média e erro padrão dos níveis séricos de FSH. § Teste de Friedman, teste de Dunn Post Hoc, onde médias com letras minúsculas iguais (na mesma linha ou na mesma coluna) são semelhantes estatisticamente ( $p > 0,05$ ); ¶: Teste de Mann

Whitney, teste de Dunn Post Hoc, onde médias com letras maiúsculas iguais (na mesma linha ou na mesma coluna) são semelhantes estatisticamente ( $p>0,05$ )

**Tabela 7:** Média e erro padrão dos níveis séricos de LH. § Teste de Friedman, teste de Dunn Post Hoc, onde médias com letras minúsculas iguais (na mesma linha ou na mesma coluna) são semelhantes estatisticamente ( $p>0,05$ ); ¶: Teste de Mann Whitney, teste de Dunn Post Hoc, onde médias com letras maiúsculas iguais (na mesma linha ou na mesma coluna) são semelhantes estatisticamente ( $p>0,05$ )

**Tabela 8:** Medidas morfométricas. §: Teste de Kruskal Wallis, teste de Dunn Post Hoc, onde médias com letras iguais são semelhantes estatisticamente ( $p>0,05$ )

**Tabela 9:** Distribuição absoluta e relativa para o resultado do teste pós-coital e da análise seminal. §: Teste Exato de Fisher por Simulação de Monte Carlo para o teste pós-coital ( $p=0,252$ )

**Tabela 10:** Distribuição absoluta e relativa para as forma de congelamento e transplante e crioprotetor segundo o resultado do teste pós-coital. Resultados apresentados da forma  $n(\%)$ , com percentuais obtidos com base no total de cada categoria dos grupos;§: Teste Exato de Fisher

## FIGURAS

Figura 1

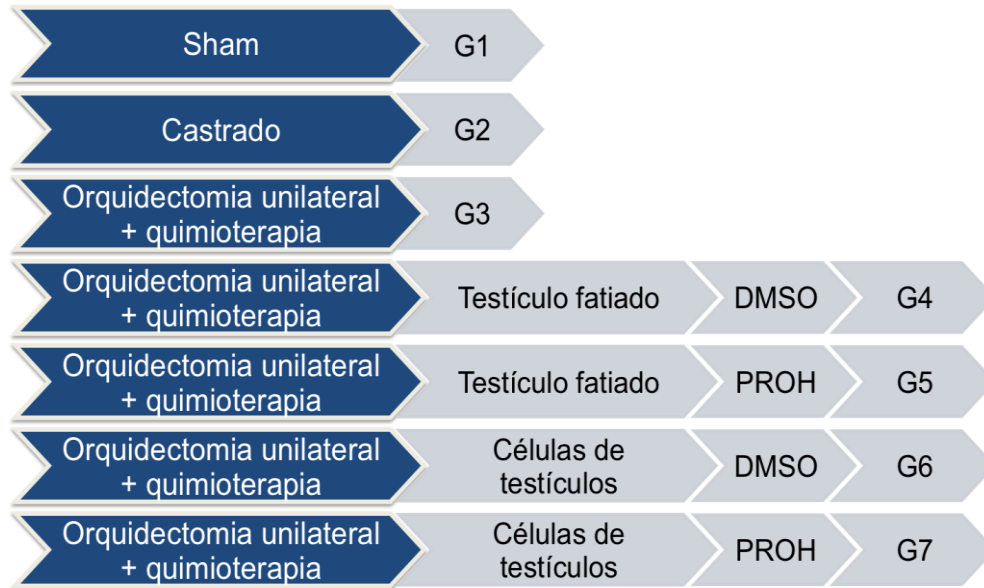






Figura 3

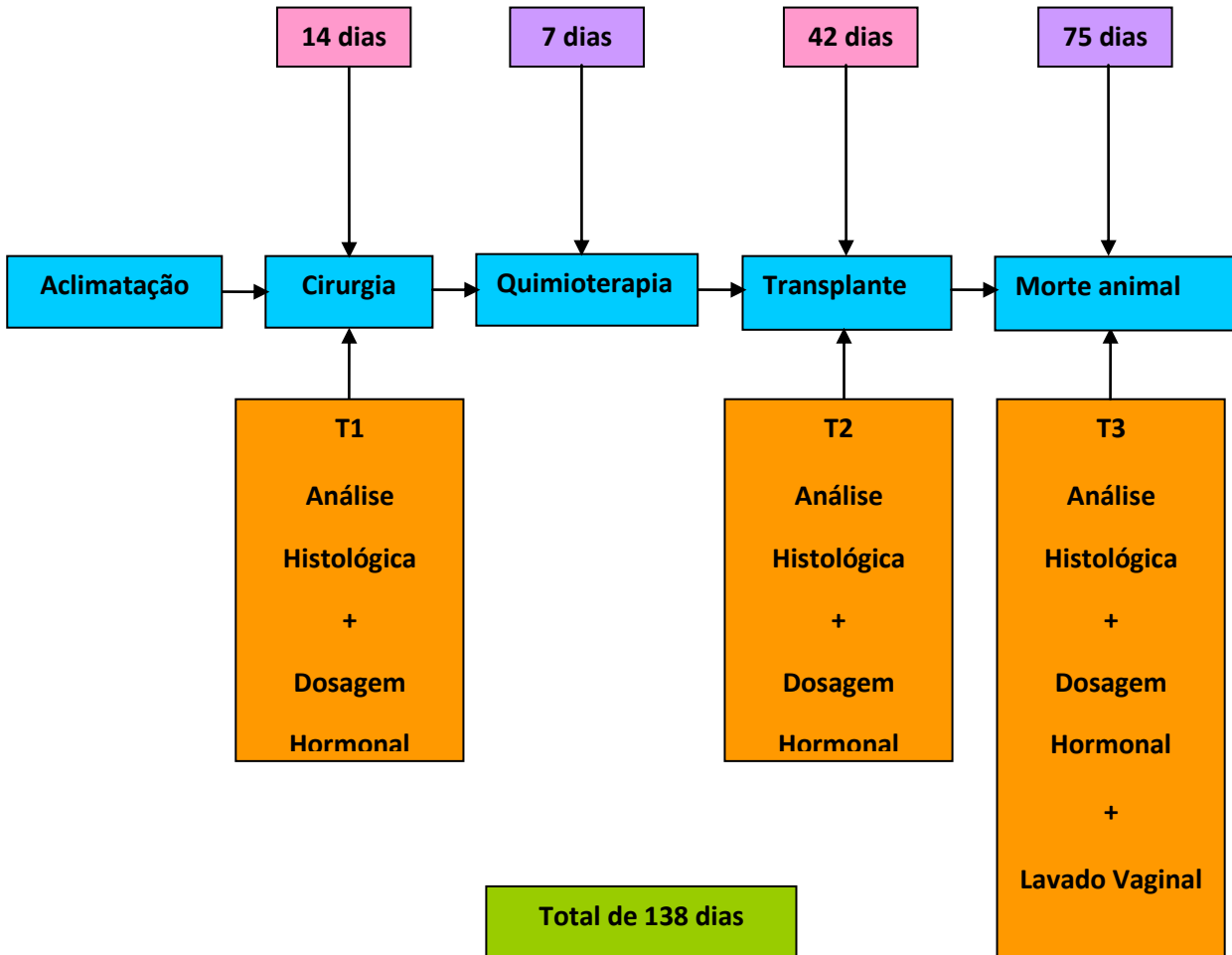
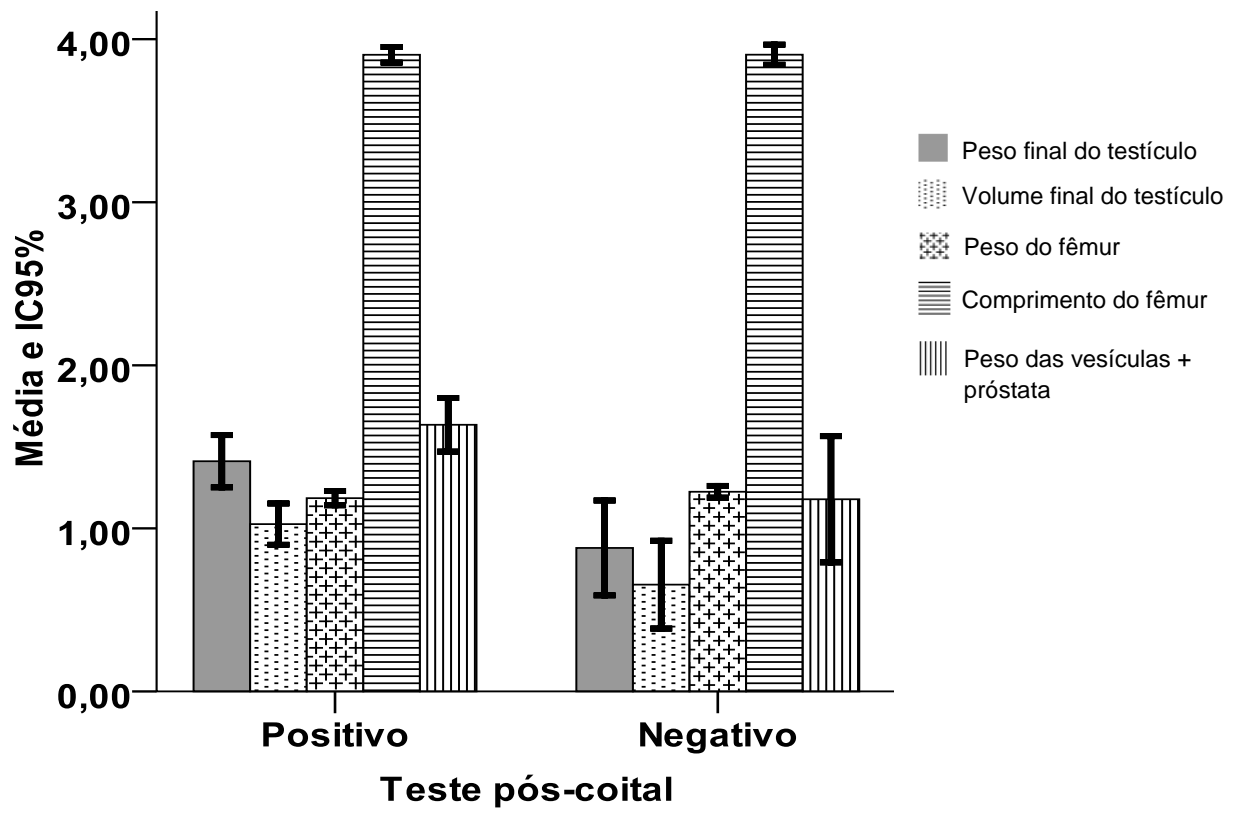


Figura 4



## TABELAS

Tabela 1

Contagem de Espermatogônias	Tempo			p§
	T1	T2	T3	
	Média ±	Média ±	Média ±	
	Erro padrão	Erro padrão	Erro padrão	
Grupo 1	100±0,0 a	100,0±0,0 A	100,0±0,0	1,000
Grupo 2	-	-	-	
Grupo 3	100±0,0 a	36,8±6,6 b C	81,1±16,4 a	0,015
Grupo 4	100±0,0 a	61,4±10,4 b B	98,6±1,5 a	0,030
Grupo 5	100±0,0 a	31,7±10,6 b C	80,0±7,7 a	0,002
Grupo 6	100±0,0 a	50,9±10,6 b B	87,5±12,5 a	0,006
Grupo 7	100±0,0 a	21,8±5,0 b D	66,7±21,1 a	0,041
<b>p¶</b>	1,000	0,003	0,404	

Tabela 2

Contagem de Espermátides	Tempo			p§
	T1	T2	T3	
	Média ±	Média ±	Média ±	
	Erro padrão	Erro padrão	Erro padrão	
Grupo 1	93,60±1,39 a	93,60±1,39 b A	70,82±8,65 b	0,064
Grupo 2	-	-	-	
Grupo 3	85,57±3,62 a	0,75±0,15 c C	63,90±13,46 b	0,009
Grupo 4	77,60±7,48 a	9,52±3,87 c B	75,25±8,87 b	0,005
Grupo 5	77,94±7,45 a	2,51±1,37 c B	53,35±7,91 b	0,002
Grupo 6	80,41±7,08 a	2,09±1,08 c B	71,26±11,61 b	0,010
Grupo 7	75,00±8,64 a	6,10±2,77 c B	43,90±15,53 b	0,006
<b>p¶</b>	0,093	0,006	0,282	

Tabela 3

Medida do diâmetro dos túbulos seminíferos ( $\mu\text{m}$ )	Tempo			p§
	T1	T2	T3	
	Média $\pm$	Média $\pm$	Média $\pm$	
	Erro padrão	Erro padrão	Erro padrão	
Grupo 1	20,75 $\pm$ 0,82 b	22,35 $\pm$ 1,13 b	27,21 $\pm$ 0,99 a	0,039
Grupo 2	-	-	-	
Grupo 3	21,87 $\pm$ 0,49	18,52 $\pm$ 0,87	22,10 $\pm$ 4,41	0,069
Grupo 4	21,58 $\pm$ 0,42 b	17,70 $\pm$ 0,55 c	26,01 $\pm$ 0,57 a	0,001
Grupo 5	22,00 $\pm$ 0,55 a	19,54 $\pm$ 1,47 b	24,60 $\pm$ 1,07 a	0,021
Grupo 6	22,04 $\pm$ 0,33 a	18,10 $\pm$ 0,55 b	22,99 $\pm$ 3,32 a	0,005
Grupo 7	21,45 $\pm$ 0,64	20,15 $\pm$ 0,74	16,35 $\pm$ 5,35	0,513
<b>p¶</b>	0,807	0,076	0,518	

Tabela 4

Grau de necrose	Tempo			p§
	T1	T2	T3	
	Média ±	Média ±	Média ±	
	Erro padrão	Erro padrão	Erro padrão	
Grupo 1	1,00±0,0 c	2,00±0,0 b B	3,00±0,0 a	0,018
Grupo 2	-	-	-	
Grupo 3	1,50±0,34 b	4,00±0,0 a A	3,17±0,40 a	0,008
Grupo 4	1,71±0,28 b	4,00±0,0 a A	1,86±0,41 b	0,003
Grupo 5	1,63±0,26 b	3,75±0,16 a A	2,88±0,12 b	0,001
Grupo 6	1,75±0,16 b	3,50±0,18 a A	2,13±0,47 b	0,009
Grupo 7	1,83±0,31 b	4,00±0,0 a A	3,33±0,55 a	0,015
<b>p¶</b>	0,344	<0,001	0,064	

Tabela 5

Testosterona (nmol/mL)	Tempo			p§
	T1	T2	T3	
	Média ±	Média ±	Média ±	
	Erro padrão	Erro padrão	Erro padrão	
Grupo 1	2,21±1,01 a A	0,78±0,25 b C	4,00±0,92 aA	0,039
Grupo 2	0,17±0,09 C	-	0,08±0,00 C	
Grupo 3	1,85±0,40 A	1,80±0,69 B	1,42±0,41 B	0,846
Grupo 4	0,78±0,16 B	1,68±0,38 B	1,75±0,38 B	0,254
Grupo 5	1,03±0,17 A	1,83±0,36 B	1,58±0,32 B	0,417
Grupo 6	0,52±0,10 c B	2,36±0,50 a A	1,41±0,26 bB	0,008
Grupo 7	1,06±0,26 A	3,78±0,73 A	1,28±0,57 B	0,091
<b>p¶</b>	0,016	0,026	0,026	

Tabela 6

FSH (mUI/mL)	Tempo			p§
	T1	T2	T3	
	Média ±	Média ±	Média ±	
	Erro padrão	Erro padrão	Erro padrão	
Grupo 1	0,35±0,05	0,05±0,00	2,19±1,14	0,135
Grupo 2	0,05±0,00	-	0,05±0,00	- - -
Grupo 3	0,09±0,02	0,66±0,30	0,83±0,28	0,422
Grupo 4	0,41±0,16	0,45±0,31	0,80±0,52	0,819
Grupo 5	0,08±0,04	0,88±0,37	1,01±0,32	0,145
Grupo 6	0,34±0,24	0,78±0,42	1,02±0,18	0,627
Grupo 7	0,43±0,27	0,97±0,52	0,18±0,13	0,526
<b>p¶</b>	0,225	0,668	0,140	



Tabela 7

LH (mUI/mL)	Tempo			p§
	T1	T2	T3	
	Média	Média	Média	
	Erro padrão	Erro padrão	Erro padrão	
Grupo 1	0,84±0,0	0,33±0,19	0,14±0,00	
Grupo 2	0,14±0,00	-	0,43±0,03	
Grupo 3	0,14±0,00 b	0,57±0,15 a	0,22±0,08 b	0,023
Grupo 4	0,15±0,01	1,22±0,95	0,15±0,01	0,670
Grupo 5	0,21±0,06	0,42±0,18	0,20±0,06	0,497
Grupo 6	0,14±0,0	0,14±0,0	1,25±0,41	0,223
Grupo 7	0,48±0,15	0,57±0,25	0,69±0,23	0,627
<b>p¶</b>	0,070	0,487	0,080	

Tabela 8

GRUPOS	Peso do testículo (g)		Volume do testículo (cm <sup>3</sup> )		Peso do fêmur (g)		Comprimento do fêmur (cm)		Peso das vesículas + próstata (g)	
	Média	Erro padrão	Média	Erro padrão	Média	Erro padrão	Média	Erro padrão	Média	Erro padrão
1	1,96a	0,17	1,52a	0,21	1,26	0,03	3,92	0,05	1,79 <sup>a</sup>	0,10
2	---	---	---	---	1,20	0,05	3,82	0,12	0,12c	0,04
3	1,10c	0,15	0,78b	0,12	1,18	0,02	3,86	0,05	1,78 <sup>a</sup>	0,30
4	1,27b	0,08	1,01b	0,10	1,20	0,02	3,95	0,05	1,82 <sup>a</sup>	0,14
5	1,29b	0,14	0,87b	0,12	1,26	0,04	3,90	0,04	1,59 <sup>a</sup>	0,16
6	1,35b	1,07	0,75b	0,11	1,17	0,04	3,87	0,02	1,37b	0,17
7	1,29b	0,23	0,97b	0,22	1,15	0,02	3,96	0,03	1,05b	0,20
p§	0,002		0,004		0,201		0,487		0,002	

Tabela 9

Grupos	Resultado do		Análise seminal	
	Teste pós-coital			
<b>Grupo 1</b>	Positivo	3 (75%)	Dez ou mais espermatozóides por campo	4 (100%)
	Negativo	1 (25%)		
<b>Grupo 2</b>	Positivo	0	Ausência de espermatozóides	4 (100%)
	Negativo	4 (100%)		
<b>Grupo 3</b>	Positivo	2 (33,3%)	Menos de dez espermatozóides por campo	4 (100%)
	Negativo	4 (66,7%)		
<b>Grupo 4</b>	Positivo	4 (57,1%)	Dez ou mais espermatozóides por campo	4 (57,1%)
	Negativo	3 (42,9%)	Ausência de espermatozóides	1 (14,3%)
			Menos de dez espermatozóides por campo	2 (28,6%)
<b>Grupo 5</b>	Positivo	5 (62,5%)	Dez ou mais espermatozóides por campo	4 (50%)
			Menos de dez espermatozóides por campo	1 (12,5%)
	Negativo	3 (37,5%)	Menos de dez espermatozóides por campo	2 (25%)
			Ausência de espermatozóides	1 (12,5%)
<b>Grupo 6</b>	Positivo	6 (75%)	Dez ou mais espermatozóides por campo	5 (62,5%)
			Menos de dez espermatozóides por campo	1 (12,5%)
	Negativo	2 (25%)	Ausência de espermatozóides	2 (25%)
<b>Grupo 7</b>	Positivo	3 (50%)	Dez ou mais espermatozóides por campo	2 (33,3%)
			Menos de dez espermatozóides por campo	1 (16,7%)
	Negativo	3 (50%)	Ausência de espermatozóides	3 (50%)

Tabela 10

	Teste pós-coital		p§
	Positivo	Negativo	
<b>Forma de congelamento e transplante</b>			
Suspensão celular	9 (64,3)	5 (35,7)	1,000
Tecido fatiado	9 (60,0)	6 (40,0)	
<b>Crioprotetor</b>			
DMSO	10 (66,7)	5 (33,3)	0,710
PROH	8 (57,1)	6 (42,9)	

## 8. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Considerando o fato de que os tratamentos oncológicos vêm melhorando com o passar dos anos, e em razão desta melhora o número de pacientes sobreviventes têm aumentado, é possível prever alguns fatores que envolvem as questões reprodutivas. A preservação da fertilidade é uma questão extremamente importante que causa impacto psicológico e interfere na qualidade de vida dos seres humanos, principalmente no caso de pacientes que são submetidos a tratamentos oncológicos durante a infância. Atualmente, a única opção que meninos na pré-puberdade possuem para preservar a fertilidade é o transplante autólogo de células-tronco espermatogoniais. Esta técnica é bastante promissora para ser utilizada em clínicas de fertilidade, mas existem muitos aspectos a serem considerados, inclusive os relacionados às questões éticas.

Apesar das vantagens que este método oferece, é preciso considerar o risco de contaminação de células malignas através do reimplante de tecido neoplásico. Assim, o caminho mais aconselhável é o do transplante de tecido criopreservado antes da terapia gonadotóxica somente em pacientes com doenças benignas ou sem metástase.

Preservar a capacidade reprodutiva em pacientes na fase pré-púbere deverá se tornar uma questão cada vez mais relevante. Estudos deverão ser realizados com a finalidade de oferecer mais opções para que a restauração da fertilidade seja alcançada, proporcionando a estes pacientes a esperança de procriarem com a sua própria herança genética na vida adulta.