

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Bárbara Oliveira

“Vitamina B12 exerce um efeito benéfico sobre a
espermatogênese após depleção de espermatogônias causada
pelo Busulfan®”

Araraquara

2013

Bárbara Oliveira

“Vitamina B12 exerce um efeito benéfico sobre a espermatogênese
após depleção de espermatogônias causada pelo Busulfan®”

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de
Farmacêutica-Bioquímica

Orientadora: Prof^a Dr. Estela Sasso Cerri

Co-Orientador: Dr. Breno Henrique Canneguim

Araraquara

2013

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Dalva Stella de Oliveira e Leandro Rodrigo de Oliveira, pelo amor incondicional, pelos conselhos e apoio, não só durante meus anos de graduação, mas em todas as fases da minha vida.

À Profa. Dra. Estela Sasso Cerri, pela oportunidade de aprendizado, confiança em meu trabalho, atenção e sabedoria compartilhada.

Ao meu co-orientador, Dr. Breno Henrique Canneguim pela paciência, dedicação e ajuda em todos os momentos.

À Flávia Luciana Beltrame e Marina Câmara que também estiveram presentes e auxiliaram na realização deste projeto.

Aos meus amigos, que durante os anos de faculdade se tornaram minha família em Araraquara e me incentivaram nos momentos de dificuldade.

À FAPESP, pelo apoio financeiro na realização deste trabalho, na forma de bolsa de iniciação científica.

Resumo

Busulfan® é um quimioterápico que provoca danos aos tecidos que apresentam intensa divisão celular, como o epitélio seminífero. Considerando que a vitamina B12 contribui na síntese de DNA, este estudo avaliou os efeitos da suplementação com vitamina B12 após a depleção das espermatogônias com Busulfan®. Foram usados 64 ratos, distribuídos em oito grupos (n=8/grupo). Alguns grupos receberam injeções intraperitoneais diárias de 3µg de vitamina durante 10 (GB, GVVit, GRec e GVRec1) ou 17 dias (GRecVit e GVRec-2). Nos animais dos grupos GB, GRec e GRecVit, injeções intraperitoneais de 10 mg/Kg de Busulfan® foram administradas no 1º e 4º dias de tratamento. Os grupos GVVit, GVRec1 e GVRec2 receberam doses de polietilenoglicol também nos 1º e 4º dias. Alguns animais receberam polietilenoglicol (1º e 4º dias) e solução salina durante 10 (GV) ou 17 (GVRec-3) dias. Ao final dos tratamentos, o sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca para realização do hemograma. Após eutanásia, os testículos foram removidos, processados para inclusão em parafina e em historesina. Nos cortes de historesina corados pela H&E, foram analisadas 45 secções tubulares por animal, em 5 animais dos grupos GRec, GRecVit, GVRec1, GVRec2, GVRec3, GV, GB e GVVit. As secções tubulares foram classificadas nos estágios I-VI, VII-VIII e IX-XIV (15 secções/estágio) e, de cada secção, as áreas tubular total e epitelial foram mensuradas. A frequência de túbulos alterados e o número de espermatogônias por túbulo foi contado. Os cortes incluídos em parafina foram submetidos à imunohistoquímica para detecção de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). A análise do hemograma mostrou que os animais de GV, GVVit, GVRec1, GVRec2 e GVRec3 apresentaram quantidades de glóbulos brancos e plaquetas dentro dos valores de referência, enquanto que os animais de GB, GRec e GRecVit apresentaram diminuição significativa em tais valores, fato provavelmente ocasionado pelo

busulfan. Os resultados morfológicos e morfométricos mostraram que os animais de GV, GVVit, GVRec1, GVRec2 e GVRec3 não apresentaram alterações significantes, devido ao fato de não terem recebido tratamento com busulfan. Os túbulos seminíferos dos animais de GRec e GRecVit, por sua vez, apresentaram células germinativas descamadas, desorganização epitelial, presença de vacúolos e espaços intraepiteliais. Além disso, uma significativa redução das áreas tubular total, da luz tubular e do epitélio germinativo, indicando atrofia dos túbulos, foi observada. Ainda neste grupo, houve maior frequência de túbulos alterados e redução significativa no número de espermatogônias quando comparado aos demais grupos. Os animais de GRecVit mostraram alterações tubulares similares às observadas no GRec, entretanto, as áreas mensuradas em GRecVit apresentaram menor redução quando comparadas ao GRec. A frequência de túbulos alterados também foi inferior em GRecVit em relação ao GRec, e, além disso, houve uma diminuição menos acentuada do número de espermatogônias de GRecVit em comparação a redução apresentada pelo GRec. Os cortes testiculares submetidos à imuno-histoquímica mostram que todos os grupos tratados com busulfan apresentaram túbulos seminíferos com células germinativas PCNA-positivas. Porém, embora não tenha sido quantificado, os túbulos de GRecVit aparentaram conter mais espermatogônias e espermatócitos PCNA-positivos. Tais parâmetros sugerem que a vitamina B12, portanto, exerce certa atividade benéfica nos túbulos seminíferos de ratos tratados com busulfan, estimulando a atividade mitótica das espermatogônias. Sendo assim, o tratamento com vitamina B12 parece ser uma alternativa para a recuperação da atividade espermatogênica de pacientes oncológicos.

Palavras Chave: Vitamina B12, Morfometria, Antineoplásico, Espermatogônia, Epitélio Seminífero, Busulfan®

Sumário

1 – Introdução.....	9
1.1 - Túbulos Seminíferos.....	9
1.2- Espermatogênese.....	11
1.3 – Fatores que afetam a espermatogênese	12
1.4 – Busulfan: ação farmacológica e efeitos adversos	14
1.5 – Ações do busulfan sobre a espermatogênese	14
1.6 – Vitamina B₁₂.....	15
2 – Proposição.....	17
3- Material e Métodos.....	17
3.1 – Animais.....	17
3.2 – Diluição do busulfan.....	18
3.3 – Definição da dose de vitamina B₁₂.....	18
3.4 – Distribuição dos grupos e tratamento dos animais.....	19
3.5 – Coleta de material e processamento histológico dos testículos.	22
3.6 – Pesos testiculares absoluto e relativo.....	Erro! Indicador não definido.
3.7 – Reação imuno-histoquímica para detecção de PCNA.....	23
3.8 - Análises morfológicas e morfométricas	24
3.9 - Análises Estatísticas	24
4 – Resultados.....	25
4.1 – Hemogramas dos animais.....	25
4.2. Pesos corpóreo e testicular	Erro! Indicador não definido.
4.3. Resultados morfológicos	28
4. 4. Resultados Morfométricos	40
4.4.1. Área tubular total, área da luz tubular e área do epitélio seminífero.	40
4.4.2. Frequência de túbulos alterados.....	41

4.4.3. Média do número de espermatogônias.....	42
5 – Discussão	44
6 - Conclusões.....	48
7- Referências	49

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Distribuição dos grupos e cronograma de tratamento	21
Tabela 2 - Média da contagem de glóbulos brancos ($10^3/\text{mm}^3$) e plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$) dos grupos analisados:	25
Tabela 3 - Área tubular total (AT), área da luz tubular (AL) e área do epitélio seminífero (AE) dos animais dos grupos analisados	41
Tabela 4 - Frequência de túbulos seminíferos alterados.....	42

Lista de Figuras

Figura 1 – Pesos corpóreos (g) dos animais dos grupos analisados.	27
Figura 2 – Pesos testiculares relativos (%) dos animais dos grupos analisados.....	27
Figura 3 - Fotomicrografias de secções transversais de túbulos seminíferos de ratos dos GRec (3A) e GRecVit (3B), GVRec1 (3C), GVRec2 (3D), coradas com H-E....	32
Figura 4 - Fotomicrografias de túbulos seminíferos de GV (4A e 4B), e GB/B ₁₂ (4D), corados com HE.....	33
Figura 5 - Fotomicrografias de secções transversais de túbulos seminíferos de ratos de GVRec1 (5A), GVRec-2 (5B), GRec (5C e 5D) e GRecVit (5E e 5F), coradas com H-E.	35
Figura 6 - Fotomicrografias de porções de secções transversais de túbulos seminíferos de ratos dos GVRec1 (6A), GRec (6C e 6E) e GRecVit (6B, 6D e 6F), coradas pela H-E.	37
Figura 7 - Fotomicrografias de porções de secções transversais de túbulos seminíferos de ratos de GVRec1 (7A e 7B), GRec (7C e 7D), GRecVit (7E 7F) e seu respectivo controle negativo (7G), submetidas a reação imuno-histoquímica para detecção de PCNA.	39
Figura 8 - Média do número de espermatogônias totais nos túbulos em estágios IX-XIV.....	43

1 – Introdução

Os testículos são órgãos ovóides e situam-se no escroto, fora da cavidade corporal (Ross et al., 2008). Uma grossa cápsula de tecido conjuntivo denso, chamada túnica albugínea, envolve cada testículo (Davis et al., 1970; Leeson e Cookson, 1974). Tal cápsula espessa-se na superfície posterior do órgão e invagina-se formando o mediastino testicular, do qual partem septos fibrosos que penetram o testículo e o divide em lóbulos testiculares (Snell et al., 1985; Junqueira e Carneiro, 2008). Cada lóbulo possui de um a três túbulos seminíferos, os quais possuem forma de tubo cego e se enovelam (Junqueira e Carneiro, 2008; Ross et al., 2008). Estes túbulos são permeados por um tecido conjuntivo frouxo denominado tecido intersticial, o qual é constituído pelas células de Leydig, responsáveis pela síntese e secreção de testosterona, além de nervos, vasos sanguíneos e linfáticos (Russell et al., 1990; Shan et al., 1997). Próximo ao mediastino, os túbulos seminíferos assumem curtas formas retas, conhecidas como túbulos retos que se unem para formar uma rede de túbulos anastomosados, chamada rede testicular, a qual se conecta ao epidídimo por meio dos ductos eferentes (Junqueira e Carneiro, 2008; Ross et al., 2008).

1.1 - Túbulos Seminíferos

No interior dos túbulos seminíferos, ocorre a espermatogênese, ou seja, a produção de espermatozóides, os gametas masculinos. Em um corte transversal, os túbulos seminíferos são constituídos, da superfície externa para a interna, por um tecido peritubular, pelo epitélio seminífero (formado por células somáticas e germinativas) e pela luz tubular (Russel et al., 1990).

Em roedores, o tecido peritubular é formado pelo endotélio linfático, por uma única camada de células mióides, e pela matriz extracelular. Este tecido forma uma barreira ao redor dos túbulos, impedindo, assim, a passagem de células e outras substâncias para dentro do mesmo (Russell et al., 1990; Canequim et al., 2008). Dentre as muitas funções, tais como participar da síntese de matriz extracelular, no transporte de substâncias e da paracrinia testicular, o tecido peritubular é responsável pelas contrações que auxiliam a movimentação dos espermatozoides no interior do túbulo seminífero. Isto é possibilitado graças à natureza muscular lisa das células mióides que constituem o tecido peritubular (Kretser et al., 1975; Russell et al., 1990; Maekawa et al., 1996).

O epitélio seminífero é constituído basicamente por dois tipos de células: células somáticas, denominadas células de Sertoli, e células germinativas da linhagem espermatogênica (Junqueira e Carneiro, 2008; Ross et al., 2008). As células de Sertoli estão localizadas adjacentes à lâmina basal do epitélio seminífero, imediatamente após o tecido peritubular. Estas células apresentam forma colunar, possuem um grande núcleo elíptico ou ovóide, o qual apresenta nucléolo e porções justanucleolares bem evidentes. Além disso, seu citoplasma emite extensos prolongamentos apicais e laterais, os quais se estendem até o lúmen tubular e, por meio de junções celulares, conectam-se com as células germinativas e com células de Sertoli vizinhas. Assim, a interação entre as células de Sertoli forma a barreira hematotesticular que confere um microambiente especializado impedindo a passagem de macromoléculas do sangue para o fluido testicular (Nagaosa et al., 2007), além de estabelecer os compartimentos basal e adluminal do túbulo seminífero (Vilar et al., 1962; Fawcett, 1975; Bardin et al., 1988; Mruk et al., 2004; Yao et al., 2010). As células de Sertoli desempenham papéis fundamentais na espermatogênese, tais como: proteção, suporte físico e nutricional para as células

germinativas, síntese e liberação da proteína ligante de andrógeno (ABP), além da síntese e secreção da inibina, um hormônio que inibe a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) pela hipófise anterior (Hooley, et al., 2009).

As células da linhagem germinativa, por sua vez, derivam das células germinativas primordiais, as espermatogônias e organizam-se em camadas concêntricas, do compartimento basal para o compartimento adluminal do túbulo seminífero na seguinte ordem: espermatogônias, espermátocitos I e II, espermátides e espermatozóides (Snell et al., 1985).

1.2- Espermatogênese

O processo de espermatogênese é um processo contínuo, no qual as células germinativas indiferenciadas, as espermatogônias, sofrem divisões mitóticas e meióticas, e uma profunda reorganização morfológica para gerar uma célula capaz de fertilizar um ovócito secundário (de Rooij & Russell 2000; McLean et al., 2002; Aponte et al., 2005).

Este processo é dividido em três etapas distintas: a fase proliferativa, a fase meiótica e a fase de espermiogênese (Schmidt et al., 2009). Durante a fase proliferativa, as espermatogônias se multiplicam por mitoses sucessivas. As espermatogônias são células arredondadas, sendo possível distinguir três tipos, de acordo com o aspecto do núcleo: espermatogônias escuras (núcleo fortemente corado) e claras (núcleo pouco corado) do tipo A, e espermatogônias do tipo B (núcleo esférico com grumos de cromatina ao longo da membrana nuclear) (Snell et al., 1985; Junqueira e Carneiro, 2008).

As espermatogônias escuras do tipo A se dividem para manter o número de células germinativas primordiais (McLean et al., 2002; Choi et al., 2006) e também para formar algumas espermatogônias claras do tipo A. Estas, por sua vez, dividem-se e diferenciam-se em espermatogônias do tipo B, e, após essa divisão, diferenciam-se em espermatócitos primários (Junqueira e Carneiro, 2008; Ross et al., 2008).

Na fase meiótica, os espermatócitos primários iniciarão o processo de divisão celular que envolve duas divisões seqüenciais (Meiose I e II), seguidas por diferenciação celular (espermiogênese), dando origem às espermátides que contém metade do número cromossômico e, portanto, metade do DNA encontrado nas espermatogônias. Assim, enquanto os espermatócitos primários dirigem-se ao compartimento adluminal do epitélio seminífero, estas células passam pela primeira divisão meiótica, resultando em células menores, os espermatócitos secundários, cada um contendo metade do número de cromossomos da célula-mãe (Ross et al., 2008).

Os espermatócitos secundários logo passam pela segunda divisão meiótica, originando as espermátides haplóides (Meng et al., 2000). Na fase espermiogênica, as espermátides passam por uma extensa diferenciação celular originando os espermatozóides.

1.3 – Fatores que afetam a espermatogênese

As células da linhagem germinativa são muito sensíveis a agentes nocivos, tais como: temperatura elevada, fatores ambientais, doenças congênitas ou adquiridas, radiação e substâncias biologicamente ativas. Entre as substâncias

biologicamente ativas, podem-se citar substâncias químicas e fármacos que podem ter efeitos adversos sobre a espermatogênese (Pasqualotto et al., 2004). Muitos estudos têm demonstrado efeitos nocivos de fármacos sobre a espermatogênese, como por exemplo, a cimetidina, um fármaco utilizado no tratamento de úlcera duodenal. Este fármaco age como inibidor competitivo dos receptores de histamina (H_2). Entretanto, nos órgãos sexuais masculinos a cimetidina exerce um efeito antiandrogênico, competindo com a dihidrotestosterona (DHT) pelos receptores de andrógenos e inibindo a ação deste hormônio em órgãos andrógeno-dependentes. Como resultado de sua ação, se constatou alterações, como a redução significativa do diâmetro tubular devido à perda de células germinativas (Sasso-Cerri et al., 2001) e, no tecido peritubular, a presença de células mióides em apoptose (França et al., 2000; Sasso-Cerri e Miraglia, 2002). Além destas alterações, também foram observadas células da linhagem espermatogênica e células de Sertoli em apoptose (Sasso-Cerri et al., 2002; Sasso-Cerri e Cerri, 2008; Beltrame et al., 2011).

Muitos estudos também têm comprovado a ação de outros fármacos sobre a espermatogênese, em especial os antineoplásicos (Pasqualotto et al., 2004). Os agentes antineoplásicos, utilizados na terapia do câncer, causam grandes alterações na espermatogênese, pois atuam de forma inespecífica, lesando tanto células malignas, como células normais, principalmente de tecidos com alta taxa de divisão celular, como ocorre nos órgãos reprodutores masculinos (Rodrigues, 2010). As células mais sensíveis a agentes mutagênicos são as células da linhagem espermatogênica, pois estão em constante processo de divisão e diferenciação celular (Ross et al., 2008). Células que não estão se dividindo, como células de Sertoli, células de Leydig e espermatogônias de reserva, são menos afetadas por fatores nocivos (Van Keulen e de Rooij, 1975; Aich e Manna, 2001; Hwang et al., 2003).

1.4 – Busulfan: ação farmacológica e efeitos adversos

O Busulfan (1,4-butanodiol metanosulfonato) apresenta fórmula molecular $C_6H_{14}O_6S_2$ e é um fármaco antineoplásico indicado para o tratamento de neoplasias hematológicas, além de ser usado como um pré-tratamento antes do transplante de células-tronco hematopoiéticas (Iwamoto et al., 2004; Choi et al., 2006; Almong et al., 2010). Este fármaco caracteriza-se por ser um agente alquilante bifuncional, isto é, apresenta dois grupos capazes de reagir com a molécula de DNA e, por isso, formam ligações cruzadas interfilamentosas ou intercadeia. Esse mecanismo impede a replicação do DNA, causando assim a morte da célula (Van Keulen e de Rooij, 1975; Almeida et al., 2005; Choi et al., 2006; Rang et al., 2008).

Os agentes alquilantes apresentam severos efeitos adversos para o organismo humano. Entre os efeitos mais comuns do busulfan, destacam-se: náuseas, citopenia, erupções de pele e depressão da medula óssea. Além disso, seu uso prolongado causa depressão da gametogênese, sobretudo em homens (Rang et al., 2008).

1.5 – Ações do busulfan sobre a espermatogênese

Estudos têm sido realizados a fim de analisar a ação citotóxica do busulfan e demonstraram que a duração da esterilidade está relacionada com o grau de depleção das células germinativas (Bucci et al., 1987).

Aich et al. (2001) mostraram que o tratamento com única dose de busulfan (10 mg/kg de peso corporal) causa diminuição no diâmetro dos túbulos seminíferos dos ratos tratados, além da perda de adesão entre as células germinativas. Neste

mesmo estudo, constatou-se que, somente 100 dias após o tratamento, o epitélio seminífero estava completamente recuperado.

Jahnukainen et al. (2006) constataram que o busulfan provocou uma diminuição significativa no número de túbulos seminíferos contendo células germinativas em ratos, além disso, mostraram também que o busulfan afeta seletivamente as espermatogônias em processo de diferenciação, uma vez que alguns espermátócitos presentes foram capazes de continuar se diferenciando.

Em estudo realizado recentemente no nosso laboratório, constatou-se que, após tratamento com busulfan, houve uma redução significativa tanto da área do epitélio seminífero quanto da área total dos túbulos seminíferos. Estes resultados foram relacionados à diminuição significativa do número de espermatogônias. Além disso, foram encontradas espermatogônias com aspecto apoptótico, sugerindo que a perda destas células ocorreu devido à indução de morte celular por apoptose.

1.6 – Vitamina B₁₂

A vitamina B₁₂, ou cianocobalamina é uma vitamina solúvel em água sintetizada exclusivamente por microrganismos. É encontrada em praticamente todos os tecidos animais e estocada primariamente no fígado, na forma de adenosilcobalamina (Paniz et al., 2005).

A vitamina B₁₂ é disponibilizada pela digestão de proteínas de origem animal, sendo então capturada pela haptocorrina, uma proteína produzida na saliva e no estômago. O complexo haptocorrina-cianocobalamina é degradado pelas enzimas pancreáticas, e a molécula de vitamina B₁₂ é transferida para o fator intrínseco gástrico (FI), uma glicoproteína produzida pelas células parietais do estômago. A ligação da vitamina B₁₂ ao FI forma um complexo que resiste às enzimas

proteolíticas do intestino. No íleo terminal, diferentemente do FI, a vitamina B₁₂ é absorvida e ligada a um transportador plasmático para, então, ser lançada na circulação (Oh e Brown, 2003; Paniz et al., 2005).

No organismo humano a vitamina B₁₂ funciona como um cofator essencial de enzimas envolvidas nas reações do metabolismo da homocisteína, um aminoácido, que em excesso no organismo causa problemas cardiovasculares. Além disso, as enzimas, em que a cianocobalamina desempenha seu papel de cofator, são importantes em reações de síntese de DNA e metilação (Paniz et al., 2005; Banerjee et al., 1990). Assim, a vitamina B₁₂ apresenta importante papel na replicação celular.

A deficiência desta vitamina tem sido associada a baixas contagens de espermatozoides e baixa mobilidade dos mesmos (Sinclair, 2000), pois a produção de espermatozoides está intimamente envolvida com a síntese de DNA durante o processo espermatogênico, anteriormente mencionado. Além disso, a baixa mobilidade dos espermatozoides também pode estar relacionada à necessidade da adenosilcobalamina, como cofator para inúmeras reações mitocondriais importantes para a obtenção de energia, através da formação do ATP, no ciclo de Krebs (Paniz et al., 2005). Sem a energia obtida com a formação do ATP, a função das mitocôndrias localizadas na peça intermediária do flagelo do espermatozoide é danificada.

Ozaki et al. (1988) constataram que o tratamento com vitamina B₁₂ causou um aumento significativo no número de espermatozoides e no diâmetro dos túbulos seminíferos de ratos previamente tratados com doxorubicina, um fármaco antineoplásico. Além disso, em um estudo realizado por Kawata et al. (2004), os efeitos da deficiência nutricional de vitamina B₁₂ foram detectados por meio de análises morfológicas dos testículos de ratos com dieta deficiente em vitamina B₁₂.

Assim, pode-se constatar uma diminuição no peso total e relativo dos testículos. Estudos anteriores mostraram também atrofia dos túbulos seminíferos e aplasia de espermatídes e espermatozóides (Kawata et al., 1997). Foi também demonstrado que em 43% de casais que sofriam de infertilidade, pelo menos um dos parceiros apresentava deficiência de vitamina B₁₂ (Pront et al., 2009). Por outro lado, pacientes que receberam o tratamento com vitamina B₁₂ mostraram aumento na concentração espermática, na mobilidade dos espermatozóides, nos níveis séricos de LH, FSH e testosterona e também aumento no número de espermatozóides (Sinclair, 2000).

2 – Proposição

Considerando que o busulfan induz, em ratos tratados, uma depleção de células germinativas, especificamente de espermatogônias, foi proposto avaliar se nos animais com alterações nos túbulos seminíferos, causadas pelo busulfan, a vitamina B₁₂ é capaz de estimular a recuperação do epitélio seminífero, com ênfase nas espermatogônias.

3- Material e Métodos

3.1 – Animais

No presente estudo, foram utilizados 64 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Holtzmann, com 60 dias de idade, pesando aproximadamente 250g, procedentes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de

Mesquita Filho” (UNESP) - Campus de Araraquara. Durante o tempo de tratamento, os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr/UNESP) em gaiolas de polipropileno forradas com maravalha, em ambiente a temperatura controlada de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas e 12 horas escuro. Os animais foram alimentados com ração Guabi® (Nutrilabor, Brasil) e água *ad libitum*.

Antes do início do tratamento, os animais passaram por um período de aclimação de 10 dias no local aonde ocorreram os tratamentos; durante este período de adaptação, os animais foram diariamente manuseados pelo pesquisador que realizou as aplicações e a eutanásia. O protocolo referente ao tratamento dos animais foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOAr (processo número: 03/2011).

3.2 – Diluição do busulfan

A diluição do busulfan ocorreu da seguinte maneira: 100 mg de busulfan (Sigma-Aldrich, USA) foram diluídos em 10 mL de solução a qual contém 8 mL de polietilenoglicol (Sigma-Aldrich), utilizado como veículo, e 2 mL de solução salina.

3.3 – Definição da dose de vitamina B₁₂

A dose de vitamina B₁₂ (Bedozil®, 5000 µg – Bunker), utilizada, foi definida a partir de uma avaliação prévia da quantidade de ração consumida diariamente pelos animais nesta idade, segundo Beltrame et al., (2011). Assim, sabendo-se que na ração Guabi® (Nutrilabor, Brasil) há 40 µg de vitamina B₁₂/Kg, e que os ratos consomem, aproximadamente, 35 g ração/dia, a quantidade de vitamina B₁₂ ingerida diariamente é de 1,4 µg. Segundo o NCCAM (*National Institute of Health, USA*), o excesso de vitamina B₁₂ não apresenta efeitos tóxicos e é eliminado pela urina.

Portanto, neste estudo, foi administrado, aproximadamente, o dobro da quantidade ingerida diariamente com a ração, ou seja, uma dose fixa de 3 µg de vitamina B₁₂/dia para cada rato.

3.4 – Distribuição dos grupos e tratamento dos animais

De acordo com a tabela 1, os animais foram distribuídos em oito grupos, com oito animais cada: Grupo Veículo (GV), Grupo Busulfan (GB), Grupo Veículo Vitamina B₁₂ (GVVit), Grupo Recuperação sem Vitamina B₁₂ (GRec), Grupo Recuperação com Vitamina B₁₂ (GRecVit), Grupo Veículo Recuperação 1 (GVRec1), Grupo Veículo Recuperação 2 (GVRec2) e Grupo Veículo Recuperação 3 (GVRec3).

Os animais dos grupos GB, GRec e GRecVit foram tratados com 20 mg/Kg de busulfan (Furukawa et al., 2007), ou seja, cada rato recebeu duas doses (10 mg/kg), por via intraperitoneal, na concentração de 0,1ml do fármaco diluído/100 g de peso corpóreo; uma no primeiro dia de tratamento e outra no quarto dia. Até o 10º dia de tratamento, todos os animais receberam diariamente doses de Vitamina B₁₂. Do 11º ao 17º dia, os animais do grupo GRec receberam doses de solução salina, enquanto os animais do GRecVit continuaram recebendo doses de Vitamina B₁₂ (Tabela 1).

Os animais dos grupos GV, GVVit, GVRec1, GVRec2 e GVRec3 receberam, no 1º e no 4º dias, injeções intraperitoneais de polietilenoglicol diluído em solução salina. Os animais dos grupos GV e GVRec3 receberam, nos demais dias de tratamento, injeções intraperitoneais de solução salina, até o 10º e 17º dias de tratamento, respectivamente. Já os animais dos grupos GVVit, GVRec2 e GVRec3 receberam injeções intraperitoneais de vitamina B₁₂ durante todos os dias de tratamento (inclusive no 1º e 4º dias) até o 10º. Do 11º ao 17º dia, os animais do

GVRec1 receberam doses de solução salina, enquanto os animais do GVRec-2 receberam Vitamina B₁₂.

Conforme um estudo prévio feito em nosso laboratório é essencial que a vitamina B₁₂ seja aplicada durante o tratamento com o busulfan devido ao fato de que a suplementação com esta vitamina ameniza os efeitos adversos deste fármaco (trombocitopenia e hemorragias, depressão do sistema imunológico e perda de apetite), sem prejudicar a ação deletéria esperada deste antineoplásico sobre as espermatogônias-tronco.

É importante ressaltar que, devido à oleosidade/densidade do polietilenoglicol, os animais que receberam este composto foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de solução contendo 0,08 mL/100 g de Cetamin[®] e 0,02 mL/100 g de Xilasin[®] a fim de evitar dor ou desconforto aos animais durante as injeções intraperitoneais.

Tabela 1 – Distribuição dos grupos e cronograma de tratamento

Dias	Grupos (n=8)							
	GV	GB	GVVit	GRec	GRecVit	GVRec-1	GVRec-2	GVRec-3
1º	V	Bus+Vit	V+Vit	Bus+Vit	Bus+Vit	V+Vit	V+Vit	V
2º	S	Vit	Vit	Vit	Vit	Vit	Vit	S
3º	S	Vit	Vit	Vit	Vit	Vit	Vit	S
4º	V	Bus+Vit	V+Vit	Bus+Vit	Bus+Vit	V+Vit	V+Vit	V
5º	S	Vit	Vit	Vit	Vit	Vit	Vit	S
6º	S	Vit	Vit	Vit	Vit	Vit	Vit	S
7º	S	Vit	Vit	Vit	Vit	Vit	Vit	S
8º	S	Vit	Vit	Vit	Vit	Vit	Vit	S
9º	S	Vit	Vit	Vit	Vit	Vit	Vit	S
10º	S	Vit	Vit	Vit	Vit	Vit	Vit	S
11º	Eutanásia	Eutanásia	Eutanásia	S	Vit	S	Vit	S
12º				S	Vit	S	Vit	S
13º				S	Vit	S	Vit	S
14º				S	Vit	S	Vit	S
15º				S	Vit	S	Vit	S
16º				S	Vit	S	Vit	S
17º				S	Vit	S	Vit	S
18º				Eutanásia	Eutanásia	Eutanásia	Eutanásia	Eutanásia

V = veículo (solução de polietilenoglicol)

Bus= busulfan

Vit = vitamina B12

S = salina.

3.5 – Coleta de material e processamento histológico dos testículos.

No 10º dia, após o tratamento dos grupos GV, GVVit e GB e 18º dia, após tratamento dos grupos GRec, GRecVit, GVRec-1, GVRec-2 e GVRec-3, os animais foram pesados e posteriormente anestesiados com injeção intraperitoneal de hidrato de cloral 10% na proporção de 0,4 ml/100g de peso corpóreo. A cavidade torácica foi exposta e foi realizada uma punção cardíaca, na qual o sangue foi coletado diretamente dos ventrículos em tubos (BD Vacutainer® Blood Collection Tubes, SST II Plus, BD Biosciences) para análise do hemograma, a qual foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas e Microbiológicas São Lucas, Araraquara. Em seguida, os testículos dos animais foram removidos da bolsa escrotal e os animais foram eutanasiados por dessangramento, seccionando a artéria aorta.

Os testículos foram pesados em uma balança analítica digital Marte (AL 500) e fixados em solução contendo formaldeído 4% (preparada a partir de paraformaldeído, MERK - Alemanha) em tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,4. Após 1 hora de fixação, os testículos foram seccionados na região equatorial e imersos na mesma solução fixadora por 48 horas.

Metade dos fragmentos testiculares foi desidratada em soluções crescentes de etanol e processados para inclusão em historesina (Historesin-Embedding Kit, JUNG) de acordo com Cerri, Sasso-Cerri (2003). Os blocos foram cortados em um micrótomo Leica (modelo RM2255) e os cortes de 5 µm foram corados com Hematoxilina e Eosina (H.E.). A outra metade dos fragmentos testiculares foi desidratada em concentração crescente de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. O cortes (5 µm) dos testículos incluídos em parafina foram obtidos

utilizando um micrótomo Micron (modelo HM325), para posterior detecção imuno-histoquímica do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA).

3.6 – Pesos testiculares absolutos e relativos

A partir do peso testicular absoluto (PTA) de cada testículo, previamente mensurado, foram calculados os pesos testiculares relativos (PTR), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{PTR} = \frac{\text{PTA}}{\text{Peso Corpóreo}} \times 100$$

3.7 – Reação imuno-histoquímica para detecção de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)

Três cortes não seriados dos animais de GVRec1, GRec e GRecVit foram aderidos à lâminas silanizadas. As lâminas foram imersas em solução tamponada de citrato de sódio 0,01 M, pH 6,0, e mantidas em forno de micro-ondas a 95°C para recuperação antigênica. Após bloqueio da peroxidase endógena, com solução de peróxido de hidrogênio a 9%, e lavagens em tampão fosfato de sódio 50 mM suplementado com 200 mM de cloreto de sódio 200 mM, pH 7,3 (PBS), os cortes foram incubados com soro de cavalo (Vector Laboratories). A seguir, os cortes testiculares foram incubados *overnight* a 4°C com anticorpos primários produzidos em camundongos anti-PCNA (Biocare Medical, USA) na diluição de 1:100. Após lavagens em PBS e incubação com anticorpos secundários biotinilados anti-coelho/camundongo (Vector Laboratories), os cortes foram incubados com Vectastain® Elite® ABC reagent (Vector Laboratories). Após lavagens em PBS, a

reação foi revelada com uma solução contendo tetracloridrato de 3,3'-diaminobenzidina a 0,06% e 100 µl peróxido de hidrogênio, e os cortes foram contracorados com Hematoxilina de Carazzi. (Beltrame et al., 2011; Caneguim et al., 2013).

3.8 - Análises morfológicas e morfométricas

As análises morfológicas e morfométricas, bem como a documentação fotográfica, foram realizadas em três cortes não-seriados de testículos incluídos em historesina, corados pela H.E, a partir de cinco animais de cada grupo. Em cada corte, foram selecionadas cinco seções transversais de túbulos seminíferos em cada um dos seguintes estágios do ciclo seminífero: estágios I-VI, estágios VII-VIII e estágios IX-XIV, totalizando 15 túbulos por corte, ou seja, 45 túbulos por animal. A imagem de cada seção transversal foi capturada utilizando-se uma câmera de captura (Olympus, DP71) acoplada a um microscópio de luz (Olympus, BX- 51).

Utilizando-se um sistema de análise de imagens Image Pro-Express 6.0 (Olympus), foram mensuradas as áreas tubulares totais, do epitélio e da luz dos túbulos seminíferos. Além disso, foi obtida a frequência de túbulos alterados, com uma ou mais das seguintes alterações: túbulos pregueados, túbulos com células descamadas na luz tubular, presença de espaços ou vacúolos intraepiteliais. Também foi feita a quantificação do número de espermatogônias nos túbulos em estágios IX-XIV, devido ao

3.9 - Análises Estatísticas

Os resultados morfométricos foram analisados utilizando-se um programa de análise estatística - SigmaStat (versão 3.2). A diferença entre os grupos foi analisada pelo teste de variância “one-way” ANOVA seguido pelo teste de Tukey,

para mais de dois grupos, ou pelo teste de t-Student, para apenas dois grupos. O nível de significância considerado foi de $p \leq 0,05$.

4 – Resultados

4.1 – Hemogramas dos animais

Os resultados dos hemogramas dos animais GB, GRec e GRecVit mostram que o número de glóbulos brancos e plaquetas apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa quando comparados aos animais dos demais grupos. Entretanto, entre GB, GRec e GRecVit, não houve diferença estatisticamente significativa.

Tabela 2: Média da contagem de glóbulos brancos ($10^3/\text{mm}^3$) e plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$) dos grupos analisados:

Grupos	Glóbulos Brancos	Plaquetas
GV	5,6±1,9 ^a	650±67 ^a
GB	1,4±0,6 ^b	229±90 ^b
GVVit	5,5±2,4 ^a	626±68 ^a
GRec	1,7±0,7 ^b	68,2±28,8 ^b
GrecVit	1,2±0,1 ^b	46,2±6,4 ^b
GVRec1	5,3±1,01 ^a	575,8±55,9 ^a
GVRec2	3,1±1,2 ^a	577,2±39,6 ^a
GVRec3	4,2±2,6 ^a	485,8±65,9 ^a

a ≠ b ($p \leq 0,05$; estatisticamente significativa)

4.2. Pesos corpóreo e testicular

Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os pesos corpóreos e testiculares relativos dos animais dos GB, GV e GVVit.

Na figura 1 observou-se um decréscimo de peso corpóreo do GRec quando comparado aos grupos veículo GVRec2 e GVRec3, entretanto, houve diferença significativa apenas em comparação ao GVRec1 (decréscimo de 21,78%, em média). Quando o peso corpóreo dos animais do grupo GRecVit foram comparados aos animais dos GVRec1, GVRec2 e GVRec3, notou-se que não houve nenhuma alteração estatisticamente significativa.

Quando se comparou as médias dos pesos testiculares relativos dos grupos, foi verificado um aumento de 12,5%, dos animais do GRec em relação a GVRec1 e GVRec2, e de 8% em média quando comparado com os GRecVit e GVRec3, sendo estes dados estatisticamente não significantes. Os animais de GV, GB e GVVit também não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

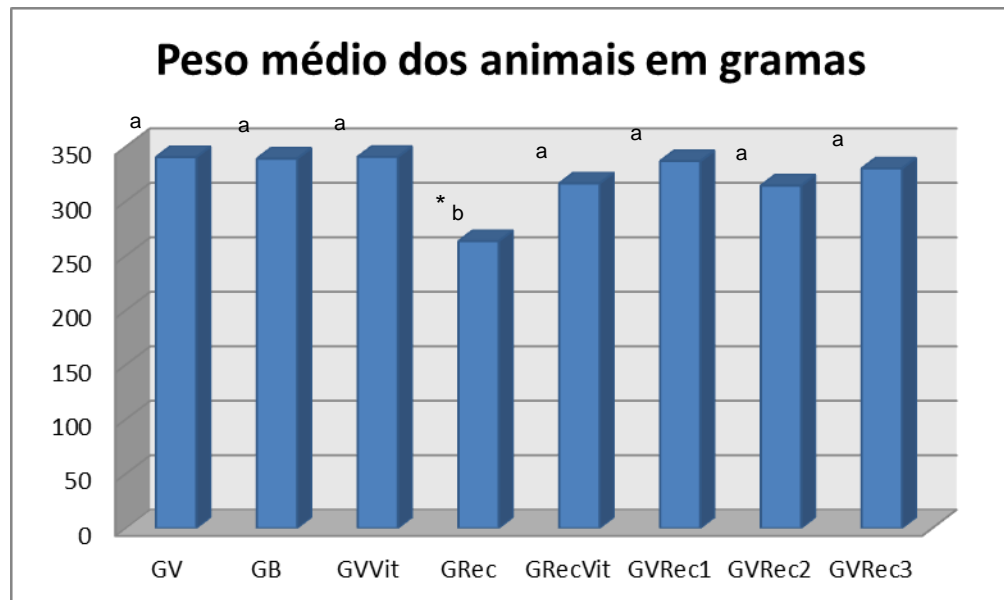


Figura 1 – Pesos corpóreos (g) dos animais dos grupos analisados. a ≠ b; * estatisticamente diferente em relação ao GVRec1; ($p \leq 0,05$)

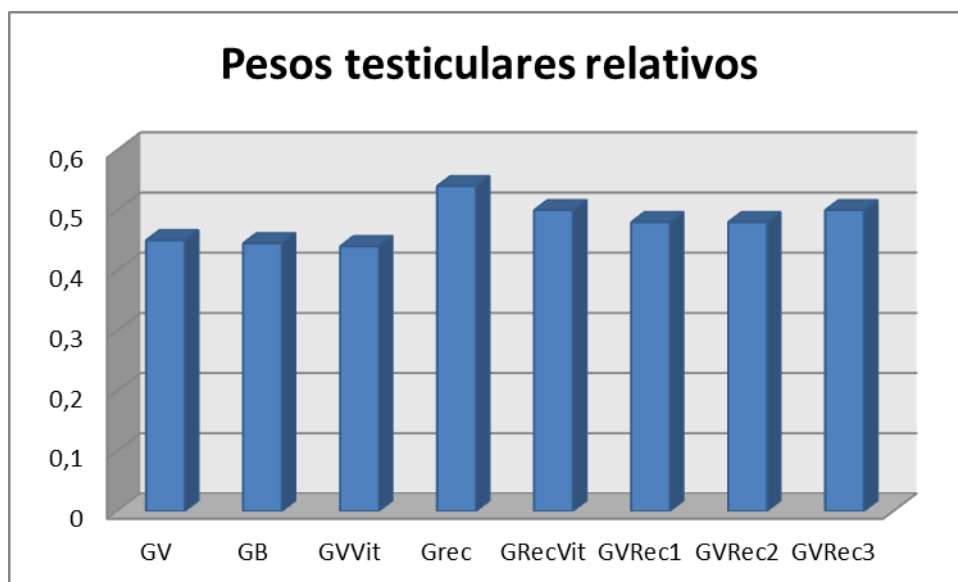


Figura 2 – Pesos testiculares relativos (%) dos animais dos grupos analisados

4.3. Resultados morfológicos

Os testículos dos animais do GRec apresentaram alguns túbulos com conformação normal, porém, majoritariamente, os animais apresentaram secções transversais de túbulos seminíferos irregulares, alterados e, aparentemente, menores que os túbulos seminíferos do GVRec1 (figura 3C), GVRec2 (figura 3D) e GRecVit (figura 3B).

A luz tubular mostrou-se preenchida por células germinativas que sofreram descamação, o epitélio seminífero apresentou espaços intraepiteliais, vacúolos e desorganização epitelial (figura 3A). Com relação ao tecido peritubular de GRec, este apresentou-se descontínuo ou com perda da adesão ao epitélio seminífero (figura 6C). Os túbulos apresentaram também células epiteliais na luz tubular e vacúolos intraepiteliais, indicando descamação de células (Figuras 5C e 5D). Além disso, nota-se diminuição aparente do número de células tronco germinativas nos túbulos de GRec (Figura 6 E) em comparação aos outros grupos (Figuras 6A e 6F).

O GRecVit apresentou secções transversais contendo alguns túbulos seminíferos alterados, entretanto, em sua maioria, os túbulos apresentavam-se aparentemente normais ou com alterações leves. Nos túbulos alterados, a luz tubular estava geralmente preenchida por células da linhagem germinativa (figura 3B). O epitélio seminífero também se apresentou desorganizado, entretanto com pouca frequência. É de grande importância ressaltar que as alterações encontradas em GRecVit, embora sejam as mesmas encontradas em GRec, apresentaram-se em menor número, ou de maneira atenuada.

Observou-se também no GRecVit ausência de espermatogônias (Figura 6B e 6F), entretanto, aparentemente de forma atenuada quando comparada ao GRec (Figura 6E). Notou-se também o atraso de espermição nos túbulos, caracterizado pela presença de espermátides alongadas em estágios finais anormalmente posicionadas na porção basal de um túbulo em estágio pós-espermição XI-XIV, indicando atraso ou falha da espermição (Figura 6B). Este fenômeno também foi observado nos túbulos do GRec.

Nos animais dos GV, GVVit, GVRec1 e GVRec2 foram notadas secções transversais de túbulos seminíferos com formato circular ou elíptico delimitados por tecido peritubular íntegro, características essas próprias de túbulos seminíferos de animais normais. Raramente foram encontradas células germinativas descamadas na luz tubular. No compartimento intertubular, foram observadas porções de tecido intersticial e espaços linfáticos normais (figuras 3C, 3D, 4A e 4B).

No epitélio seminífero, foram observados núcleos de células de Sertoli na camada basal e células germinativas distribuídas em camadas concêntricas, da base para a luz tubular, podendo ser identificadas: espermatogônias, espermátides e espermatócitos (Figura 4B).

Nos cortes testiculares dos animais de GVRec1, GRec e GRecVit foram observados túbulos seminíferos com imunomarcção positiva para detecção de PCNA, a qual foi evidenciada em castanho (Figuras 7A, 7B, 7C, 7D, 7E e 7F). Nesses túbulos, pode-se observar a presença de espermatogônias (Figuras 7B, 7D e 7F) e espermatócitos (Figuras 7A, 7B, 7C, 7D, 7E e 7F) PCNA imuno-positivos. Embora não tenha sido realizada qualquer tipo de quantificação, as secções transversais dos túbulos seminíferos dos animais de GRecVit apresentam um ligeiro aumento de células germinativas PCNA-positivas em relação a GVRec1 e GRecVit,

além de um aparente aumento na frequência de túbulos imuno-marcados. Nos controles negativos, células PCNA-imunopositivas não foram encontradas nos túbulos seminíferos (Figura 7G).

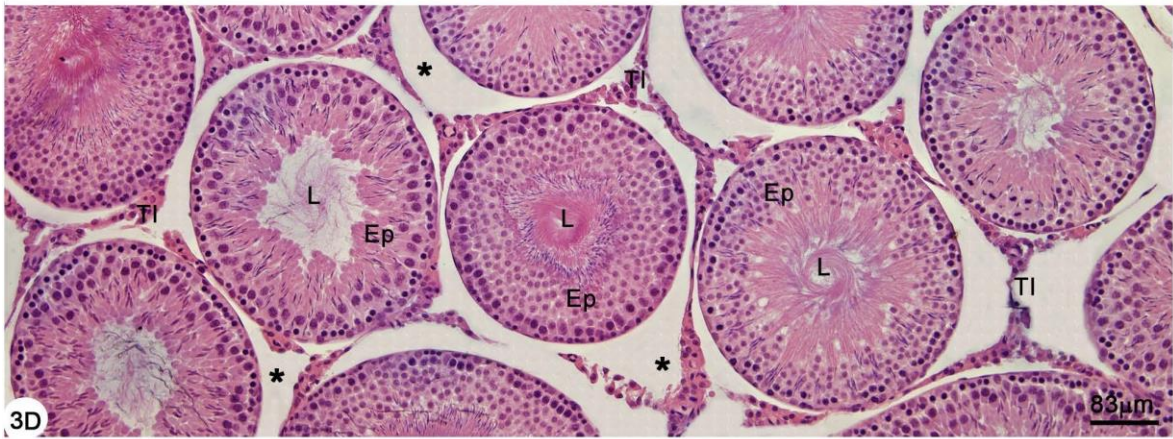
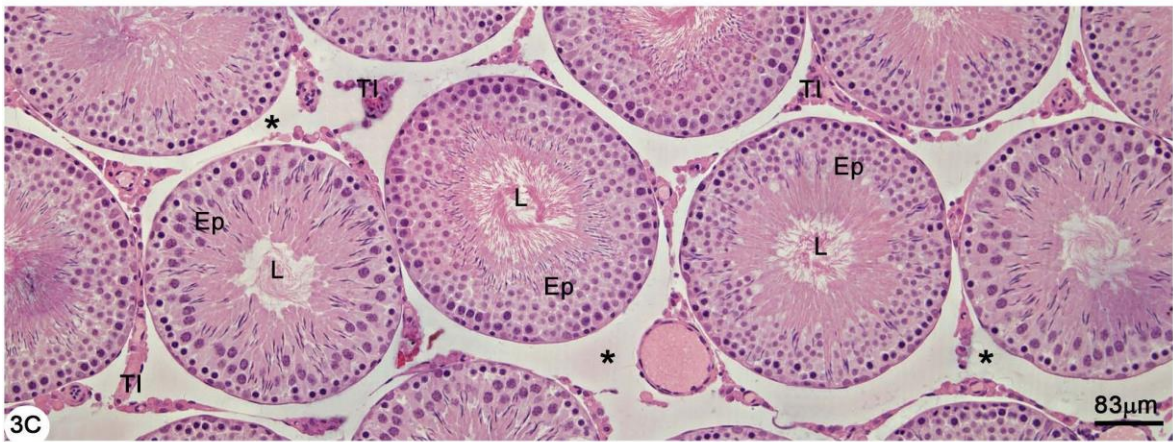
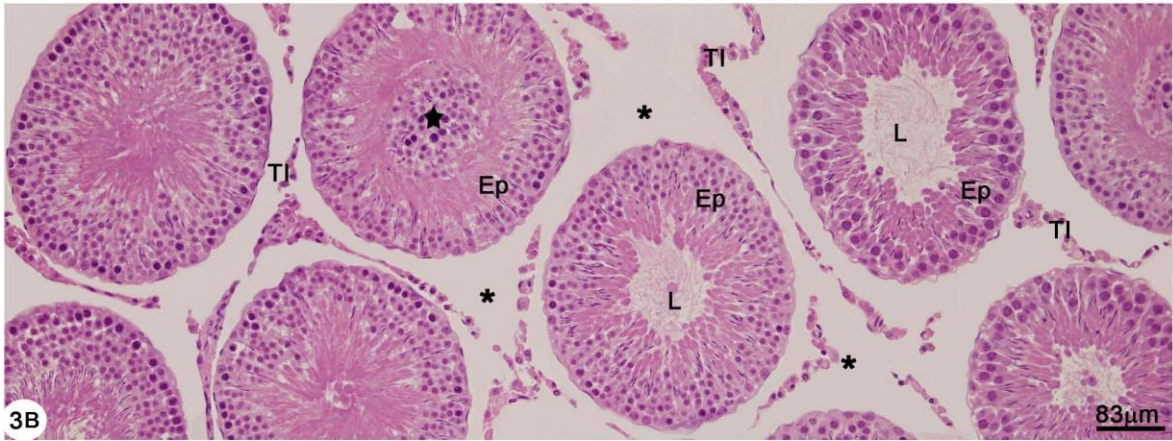
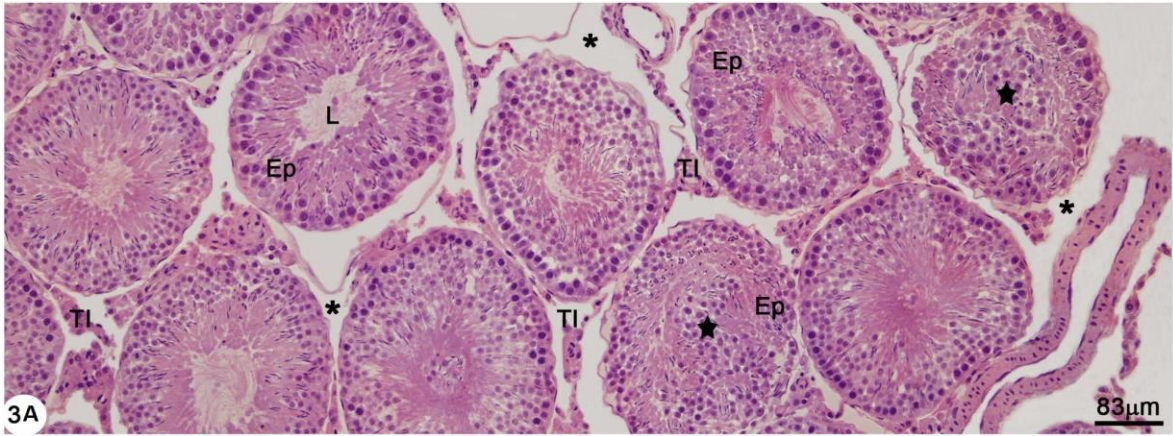


Figura 3 - Fotomicrografias de secções transversais de túbulos seminíferos de ratos dos GRec (3A) e GRecVit (3B), GVRec1 (3C), GVRec2 (3D), coradas com H-E.

Nas figuras **3A e 3B**, observam-se secções de túbulos seminíferos alterados, os quais apresentam contorno irregular, epitélio seminífero (Ep) desorganizado e luz tubular preenchida por células descamadas (estrelas). Note que tais secções tubulares da fig. **3A** (GRec) são menores em relação às da fig. **3B** (GRecVit). Nas figuras **3C e 3D**, podem ser vistas secções de túbulos seminíferos normais, constituídos por epitélio seminífero (EP) e luz tubular (L). Entre os túbulos, nota-se a presença de tecido intersticial (TI) e espaço linfático (asteriscos).

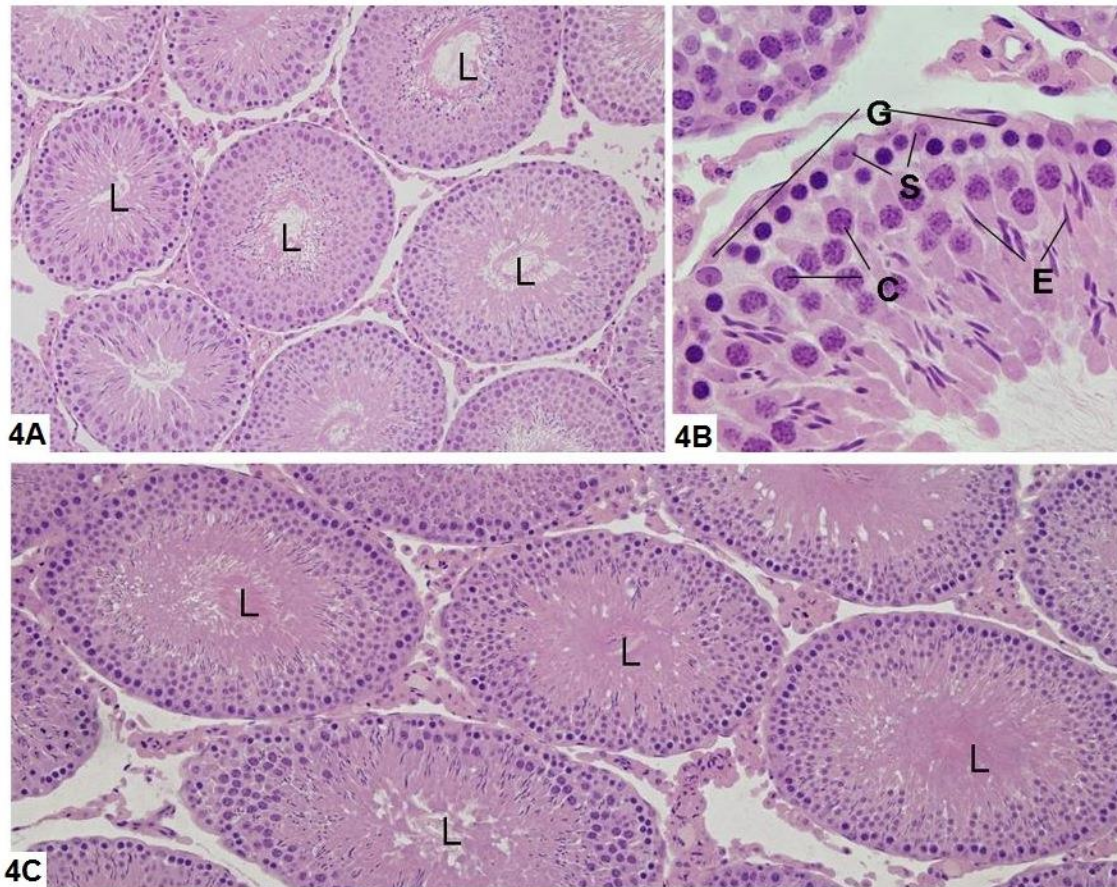


Figura 4 - Fotomicrografias de túbulos seminíferos de GV (4A e 4B), e GB/B₁₂ (4C), corados com HE.

Na figura **4A**, os túbulos seminíferos apresentam nítida distinção entre o epitélio seminífero e a luz tubular (L), na qual não são observadas células germinativas. A figura **4B** mostra uma secção transversal do epitélio seminífero em estágio XI, de aspecto normal, no qual são observadas células germinativas organizadas em camadas concêntricas, da base para a luz tubular. Nota-se a presença de núcleos de células de Sertoli (S) na porção basal e as seguintes células germinativas: espermatogônias (G), espermatócitos (C) e espermátides alongadas (E). A figura **4D** mostra túbulos seminíferos com epitélio germinativo organizado, não havendo presença de células germinativas na luz dos túbulos(L). Aumentos: **4A** (141x), **4B** (195x) e **4D** (164x).

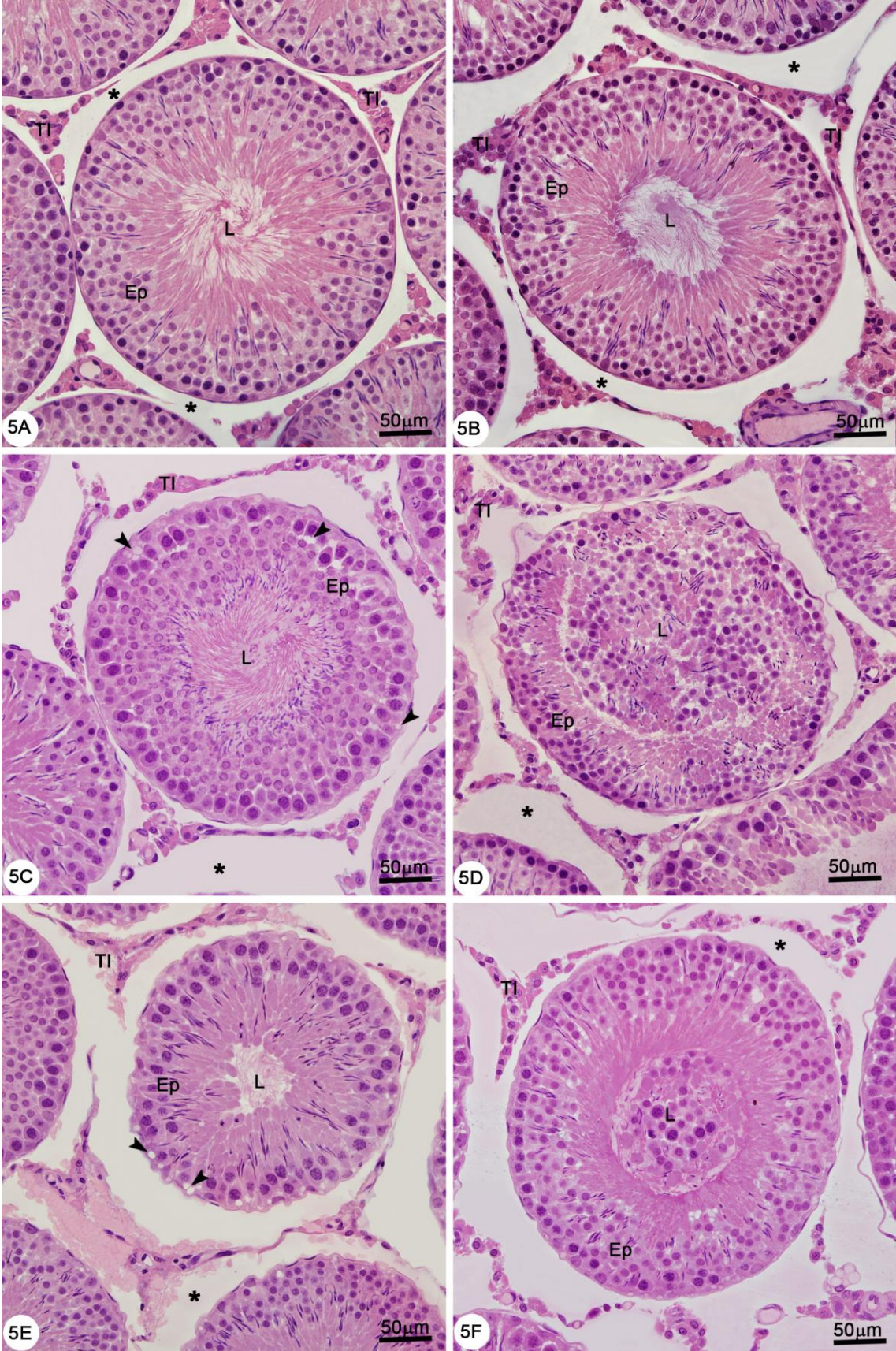


Figura 5 - Fotomicrografias de secções transversais de túbulos seminíferos de ratos de GVRec1 (5A), GVRec-2 (5B), GRec (5C e 5D) e GRecVit (5E e 5F), coradas com H-E.

Nas figuras **5A e 5B** são observados secções de túbulos seminíferos normais, apresentando epitélio seminífero (Ep) organizado. As figuras **5C e 5E** mostram secções de túbulos seminíferos apresentando vacúolos intraepiteliais (cabeças de setas). Nas figuras **5D e 5F**, note que a luz tubular (L) das secções tubulares dos GRec e GRecVit, respectivamente, está preenchida por células germinativas descamadas. Luz tubular (L). Tecido intersticial (TI). Espaço linfático (asterisco).

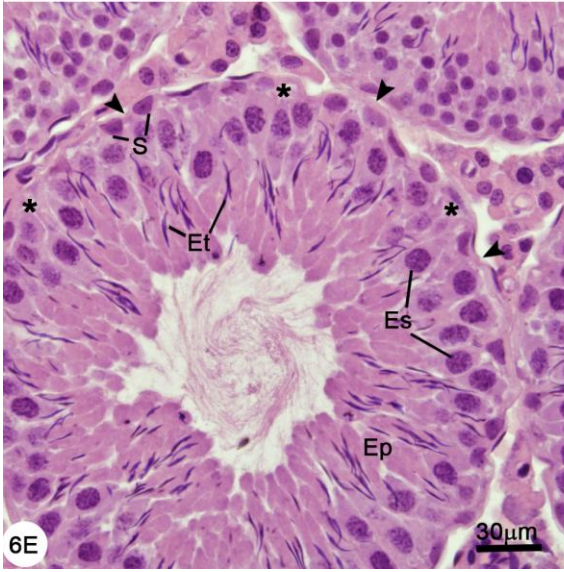
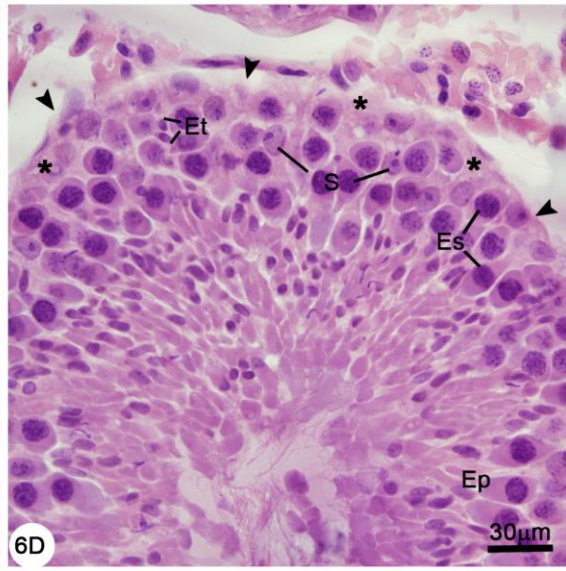
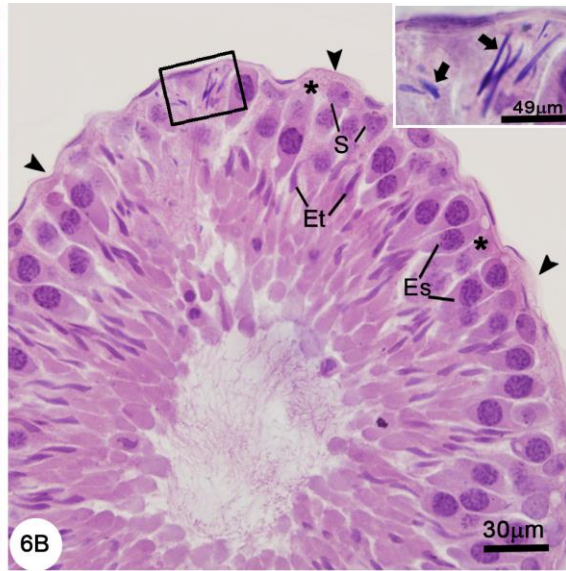


Figura 6 - Fotomicrografias de porções de secções transversais de túbulos seminíferos de ratos dos GVRec1 (6A), GRec (6C e 6E) e GRecVit (6B, 6D e 6F), coradas pela H-E.

Na figura 6A, observa-se uma porção de uma secção tubular na qual nota-se epitélio seminífero (Ep) normal, contendo células germinativas organizadas concentricamente, da base para a luz tubular, na seguinte ordem: espermatogônias (G), espermatócitos (Es) e espermatídes (Et). Células de Sertoli (S) e tecido peritubular íntegro (cabeças de seta) também podem ser observados. Na figura **6B** nota-se ausência de espermatogônias na camada basal do túbulo (asteriscos). Além disso, nota-se a presença de espermatídes alongadas em estágios finais (espermiacção) anormalmente posicionadas na porção basal de um túbulo em estágio pós- espermiacção XI-XIV (setas; porção ampliada). Na figura **6C** vê-se desorganização do epitélio seminífero, com células de Sertoli afastadas e espermatídes próximas da porção basal. A figura **6D** mostra secção de um túbulo apresentando atenuada desorganização epitelial. Em **6C e 6D**, o tecido peritubular mostra-se descontínuo e alterado (cabeça de setas). Na figura **6E e 6F**, pode-se ver um túbulo seminífero com epitélio mais organizado, entretanto, com ausência de espermatogônias (asteriscos) em **6E**, e tecido peritubular contínuo apresentando reentrâncias atenuadas em **6F** (cabeças de seta).

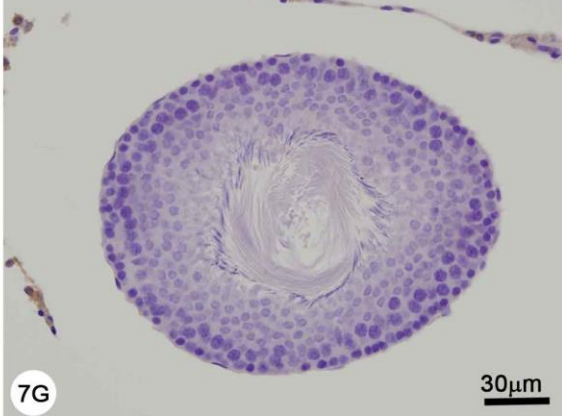
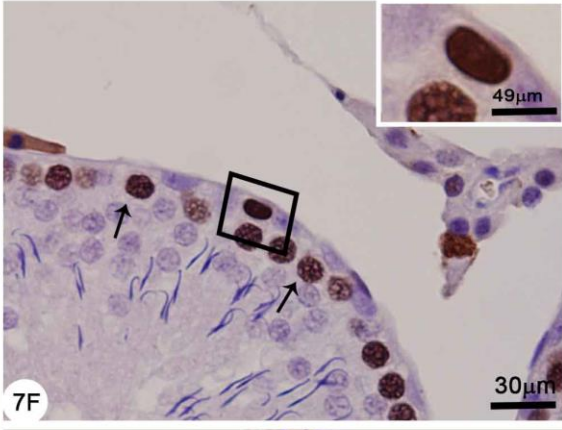
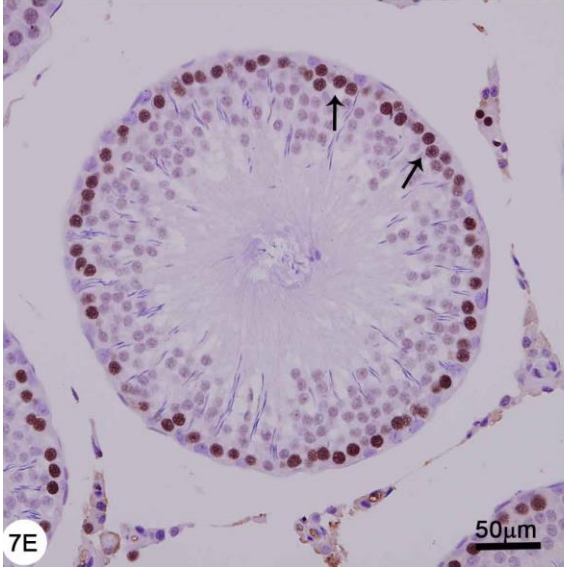
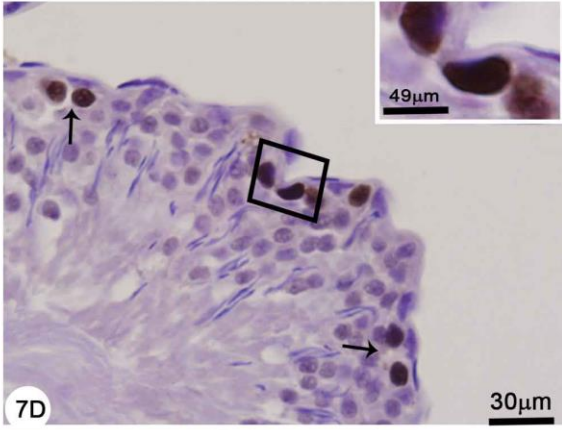
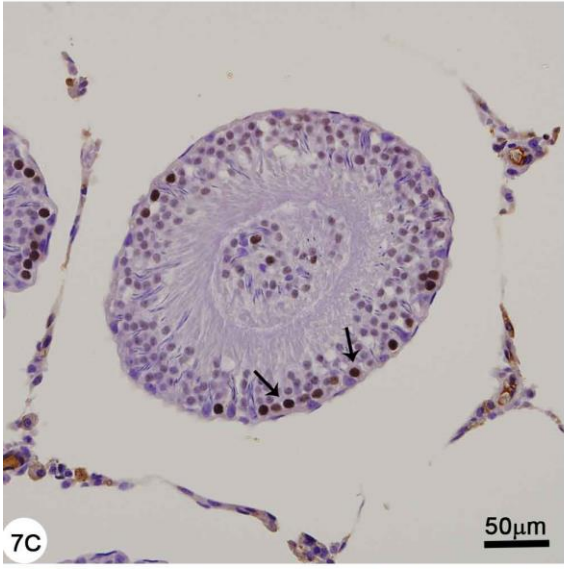
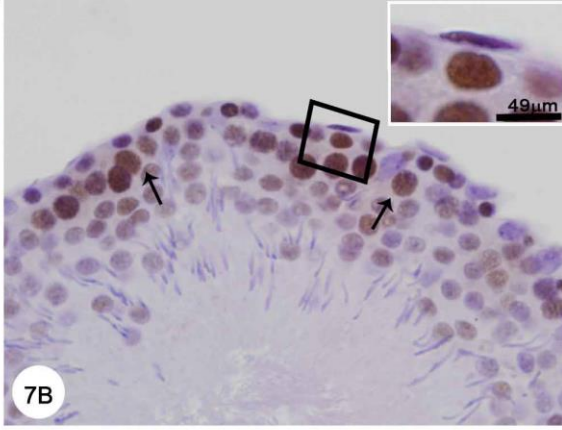
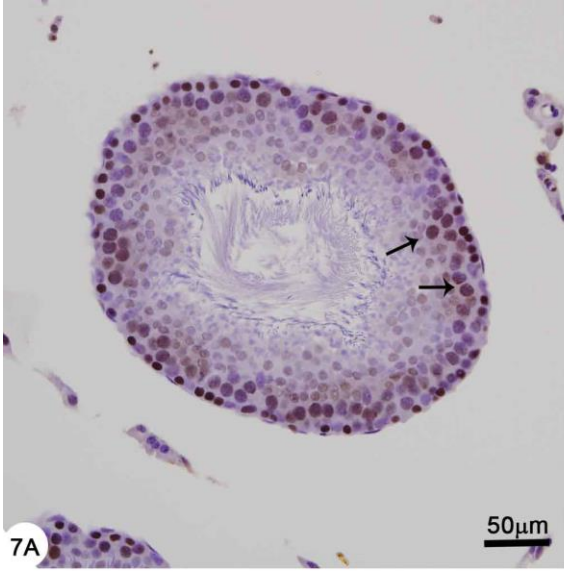


Figura 7 - Fotomicrografias de porções de secções transversais de túbulos seminíferos de ratos de GVRec1 (7A e 7B), GRec (7C e 7D), GRecVit (7E 7F) e seu respectivo controle negativo (7G), submetidas a reação imuno-histoquímica para detecção de PCNA.

Túbulos PCNA-positivos podem ser observados nas figuras 7A, 7C e 7E. Nas figuras 7B, 7D e 7F podem-se notar espermatogônias (porções ampliadas) e espermatócitos PCNA-imunopositivos (setas). Em 7G, não foram encontradas células PCNA-imunopositivas nos túbulos seminíferos.

4. 4. Resultados Morfométricos

4.4.1. Área tubular total, área da luz tubular e área do epitélio seminífero

De acordo com a tabela 3, os animais dos GB, GV e GVVit não apresentaram entre si, diferença estatisticamente significativa para área tubular total, área da luz tubular e área do epitélio.

A área tubular total dos animais do GRec apresentou redução significativa de 32,23%, 32,27% e 32,82%, em média, em relação aos GVRec1, GVRec2 e GVRec3, respectivamente. Embora a área tubular total não tenha apresentado alteração significativa entre os animais dos GRec e GRecVit, houve um decréscimo deste parâmetro (14,73%) nos animais do GRec em relação ao GRecVit. Já o grupo GRecVit apresentou uma redução estatisticamente significativa de 20,52%, 20,57% e 21,21% (em média) da área tubular total, quando comparado ao GVRec1, GVRec2 e GVRec3, respectivamente.

Com relação à área da luz tubular, o GRec apresentou redução de 34,27%, 33,55% e 31,53%, em comparação ao GVRec1, GVRec2 e GVRec3, respectivamente, e redução não significativa de 7,27%, quando comparado à área da luz tubular do GRecVit.

Nota-se também, uma diminuição estatisticamente significativa, de 32,39%, 26,65% e 33,62%, da área do epitélio do GRec em comparação com GVRec1, GVRec2 e GVRec3 e um diminuição não siginificante de 16,69% quando comparado com o GRecVit. O GRecVit teve uma diminuição estatisticamente significativa de 18,84% , de 11,94% e de 20,30%, com relação ao GVRec1, GVRec2

e GVRec3, respectivamente, e um aumento não significativo de 8,07%, com relação ao GRec.

Tabela 3 – Área tubular total (AT), área da luz tubular (AL) e área do epitélio seminífero (AE) dos animais dos grupos analisados.

Grupos	AT (μm^2)	AL (μm^2)	AE (μm^2)
GV	84076,12 \pm 10589,44 ^a	8267,99 \pm 2490,44 ^a	75808,13 \pm 8245,65 ^a
GB	83581,97 \pm 5683,21 ^a	7953,76 \pm 1253,73 ^a	75628,20 \pm 5255,27 ^a
GVVit	84955,94 \pm 3860,90 ^a	7698,90 \pm 1414,34 ^a	77149,03 \pm 3797,84 ^a
GRec	59726,66 \pm 9419,51 ^b	9492,88 \pm 1839,29 ^b	49823,77 \pm 7820,40 ^b
GRecVit	70049,22 \pm 7950,04 ^b	10237,58 \pm 946,99 ^b	59811,64 ^a \pm 5983,34 ^b
GVRec 1	88143,47 \pm 6001,92 ^a	14442,41 \pm 2815,36 ^a	73701,07 \pm 3749,27 ^a
GVRec 2	88195,53 \pm 5349,88 ^a	14285,84 \pm 1725,93 ^a	67928,97 \pm 14148,31 ^a
GVRec 3	88914.23 \pm 2960,19 ^a	13865,32 \pm 1725,60 ^a	75048,77 \pm 7820,40 ^a

Valores discriminados em média \pm desvio padrão.

a - estatisticamente diferente ($p \leq 0,05$) em relação aos GVRec 1 e GVRec 2;

b - estatisticamente diferente ($p \leq 0,05$) em relação ao GVRec2

4.4.2. Frequência de túbulos alterados

De acordo com os resultados mostrados na tabela 4, nota-se que os animais do GRec apresentaram um aumento estatisticamente significativo na frequência de túbulos alterados, quando comparado a todos os demais grupos. O GRecVit também apresentou um aumento significativo de túbulos alterados em relação aos GVRec1 e

GVRec2. Entretanto, este aumento foi inferior quando comparado aos animais do GRec.

Tabela 4 - Frequência de túbulos seminíferos alterados

<i>Grupo</i>	<i>Estágios I-VI</i>	<i>Estágios VII-VIII</i>	<i>Estágios IX-XIV</i>
GV	5,33 ± 5,57	5,33 ± 8,69	21,33 ± 13,66
GVVit	8,00 ± 10,95	10,66 ± 14,60	17,33 ± 12,11
GB	33,34 ± 19,77	28,00 ± 8,69	37,33 ± 10,10
GRec	68,00 ± 20,22*	66,66 ± 20,55*	73,33 ± 16,33*
GRecVit	37,34 ± 19,77 ^{ab}	38,66 ± 20,23 ^{ab}	44,00 ± 20,33 ^{ab}
GVRec1	5,33 ± 7,30 ^a	9,32 ± 5,96 ^a	4,00 ± 3,65 ^a
GVRec2	6,68 ± 8,16 ^a	4,00 ± 3,65 ^a	12,02 ± 10,95 ^a
GVRec 3	6,68 ± 8,16 ^a	2,66 ± 3,65 ^a	10,66 ± 7,60 ^a

Valores discriminados em média ± desvio padrão dos grupos

* estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) em relação aos demais grupos. a≠b para o grupo GRecVit em relação a GVRec1, GVRec2 e GVRec3

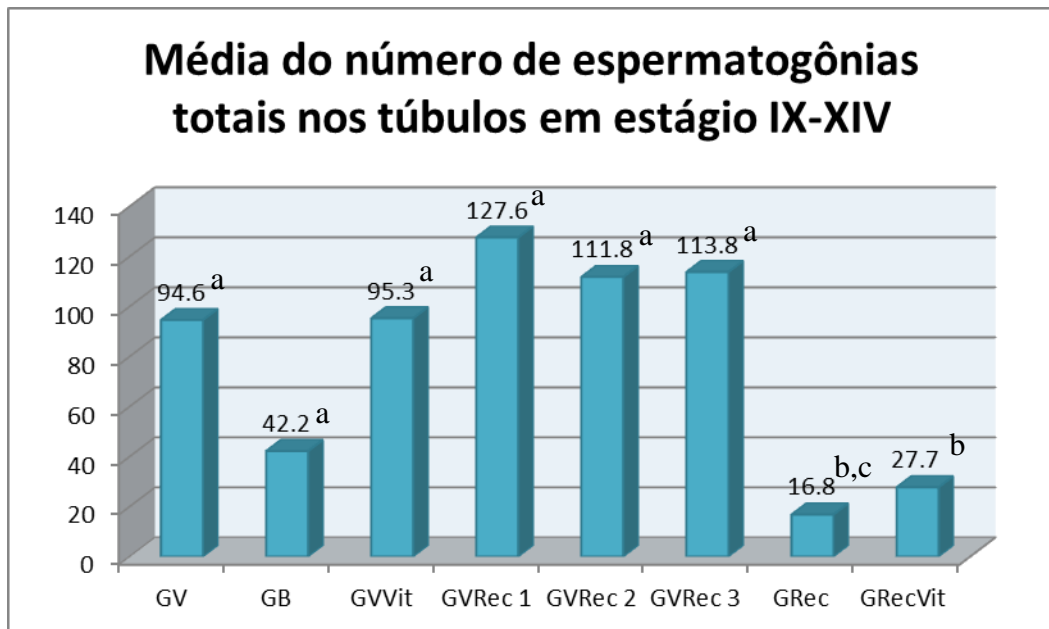
4.4.3. Média do número de espermatogônias

A média do número de espermatogônias nos túbulos seminíferos de estágio IX-XIV mostra que houve uma diminuição estatisticamente significativa, de 86,83%, 84,97%, 85,23% do número de espermatogônias do GRec, em relação ao GVRec1, GVRec2 e GVRec3 respectivamente.

Em relação ao GRecVit, houve uma redução de 37,31% do número de espermatogônias nos animais pertencentes ao GRec. Embora esta redução não tenha sido estatisticamente significativa quando todos os grupos foram comparados pelo teste de Tukey, essa mesma redução apresentou-se estatisticamente significativa quando GRec e GRecVit foram comparados pelo teste de t-Student.

GRecVit apresentou redução estatisticamente significativa em relação à GVRec1, GVRec2 e GVRec3 de, respectivamente, 78,31%, 75,25% e 75,68%. Entretanto, embora estatisticamente significativa, esta redução foi menos acentuada do que em GRec.

Entre GV, GB e GVVit, GB apresentou redução estatisticamente significativa de 55,39% e 55,71% em relação à GV e GVVit, respectivamente.



a,b: $p \leq 0,05$ (Teste de Tukey); c: $p \leq 0,05$ em relação a GRecVit (Teste de t-Student)

Figura 8 - Média do número de espermatogônias totais nos túbulos em estágios IX-XIV.

5 – Discussão

A análise dos hemogramas revelou uma diminuição estatisticamente significativa na contagem de plaquetas e glóbulos brancos dos grupos submetidos ao tratamento com busulfan. Nossos achados corroboram com outros estudos os quais demonstraram um efeito trombocitopênico associado ao busulfan (Rang et al., 2008; Freise et al., 2008; Molyneux et al., 2011). O tratamento com vitamina B12 não foi capaz de elevar o número de glóbulos brancos e plaquetas dos animais tratados com este fármaco.

Os resultados do presente trabalho mostraram uma queda no peso corpóreo do grupo experimental tratado com busulfan e vitamina B12 por 10 dias, e submetido ao período de recuperação sem vitamina (GRec), enquanto que o grupo tratado com busulfan e que recebeu vitamina B12 durante todos os dias de tratamento e de recuperação (GRecVit) apresentou um peso corpóreo semelhante aos demais grupos; ou seja, dentro dos padrões normais. A diminuição do peso corpóreo dos animais do GRec provavelmente foi causada pelos efeitos adversos característicos de fármacos da classe dos quimioterápicos (Rang et al., 2008) e acredita-se que o grupo que recebeu vitamina B12 durante todo o tempo de tratamento não tenha mostrado uma queda no peso corpóreo devido aos efeitos orexígenos que a vitamina B12 apresenta (Kachani et al., 2005; Pires, 2012). Além disso, é importante ressaltar que o aumento observado no peso testicular relativo do GRec se deve a perda de peso corpóreo dos animais, uma vez que o peso testicular relativo é o valor referente à porcentagem do peso testicular absoluto em relação ao peso corpóreo. O GRecVit, por sua vez, não apresentou queda no peso corpóreo, quando comparado aos demais grupos, provavelmente devido ao tratamento com Vitamina B₁₂ durante todos os dias do experimento.

Nas análises morfológicas, os túbulos seminíferos dos animais do GRec mostraram-se menores, com células descamadas, vacuolização, epitélio desorganizado, espaços intraepiteliais e atraso ou falha da espermição, tal qual observados em outros estudos (Udagawa et al., 2001; Amjarooz et al., 2007; Perez-Crespo et al., 2011, Zohni et al., 2012). Os animais do GRecVit apresentaram alterações similares às do GRec, entretanto, estas se manifestaram de forma atenuada. Este efeito benéfico deve-se, provavelmente, à ação mitótica/meiótica da vitamina B12, já relatada em outros trabalhos (Paniz et al., 2005; Banerjee et al., 1990, Beltrame et al., 2011). Esta ação da vitamina B12 também pode ser responsável pela diminuição significativa da frequência de túbulos com alterações nos animais do GRecVit em comparação aos animais do GRec.

Os resultados morfométricos mostraram uma redução tanto da área tubular total quanto da área epitelial dos testículos dos ratos tratados com Busulfan® e submetidos à recuperação sem vitamina, quando comparados com as áreas de animais dos grupos controles. Esta redução foi também observada em estudos semelhantes (Aich e Manna., 2001; Amjarooz et al., 2007; Pérez-Crespo et al., 2011). Pode-se observar que os animais do GRecVit apresentaram um aumento da área dos túbulos seminíferos comparado ao GRec. Resultado semelhante foi encontrado por Ozaki et al (1988), em um estudo que mostra um aumento significativo no diâmetro dos túbulos seminíferos de ratos previamente tratados com doxorubicina e vitamina B12, quando comparado com grupos não tratados com vitamina B12. Portanto, acredita-se que a diminuição da área tubular deve-se a atrofia dos túbulos em decorrência da perda de células germinativas. Sendo assim, é possível que a redução da área tubular tenha sido menos expressiva devido à menor perda de células germinativas ou ao maior índice mitótico e/ou meiótico no epitélio seminífero, já que a vitamina B12 apresenta efeito citoprotetor e/ou reparador.

A queda nos valores das áreas totais e do epitélio seminífero foram mais acentuadas nos GRec e GRecVit do que em GB. Considerando o fato de que os animais do GB foram sacrificados apenas seis dias após a última dose de busulfan, enquanto que os animais do GRec e GRecVit foram sacrificados 13 dias após a última dose de busulfan, acredita-se que os efeitos nestes últimos foram mais acentuados, pois os animais destes grupos ficaram mais tempo expostos aos efeitos deletérios do busulfan.

Alguns estudos relacionam tratamento quimioterápico com busulfan ao decréscimo no nível sérico de vitamina B12 (Rachmilewitz et al., 1971; Michaeli et al., 1993). Rachmilewitz et al., 1971 mostrou que a vitamina B12 se encontra ligada a uma proteína globulina transcobalamina I (maior quantidade) e II (menor quantidade) e que após tratamento quimioterápico, a capacidade de ligação da globulina transcobalamina I diminui, causando uma diminuição da concentração sérica de vitamina B12.

A vitamina B12 funciona como um cofator essencial em reações de síntese de DNA e metilação, auxiliando a proliferação celular (Paniz et al., 2005; Banerjee et al., 1990). Portanto, o período de recuperação dos animais submetidos ao tratamento quimioterápico e suplementados com vitamina B12 parece auxiliar na proliferação celular e na recuperação tecidual.

Além destes parâmetros morfométricos, a contagem do número de espermatogônias por túbulo seminífero dos estágios IX-XIV em todos os grupos do estudo mostraram que GRec e GRecVit tiveram uma diminuição estatisticamente significativa no número de espermatogônias. Entretanto, esta queda se mostrou mais acentuada para o GRec do que para o grupo tratado com busulfan e submetido à recuperação com vitamina B12 (GRecVit). Este resultado se deve, possivelmente,

aos efeitos fisiológicos benéficos da vitamina B12. Este efeito citoprotetor e/ou mitótico da vitamina B12 foram demonstrados em estudos que avaliaram a espermatogênese de ratos submetidos à dieta deficiente em vitamina B12 e suplementados com a referida vitamina (Kawata, et al., 1997; Watanabe et al., 2003; Watanabe et al., 2007).

A imunomarcção para PCNA mostrou que todos os túbulos seminíferos dos animais de GRec, GVRec1 e GRecVit apresentaram células germinativas PCNA-*imunopositivas*. Entretanto, embora não tenha sido realizado nenhum tipo de quantificação, foi notado que os túbulos seminíferos dos animais GRecVit apresentaram um aparente aumento de espermatogônias e espermatócitos primários PCNA-*imunopositivos* quando comparado a GVRec1 e GRec, fortalecendo a hipótese de que a vitamina B12 estimula a atividade mitótica e/ou meiótica nas células germinativas. Este efeito proliferativo é evidenciado por Beltrame et al. (2011), os quais verificaram que a suplementação com vitamina B12 em animais submetidos ao tratamento com cimetidina foi capaz de atenuar os efeitos deletérios da cimetidina ao epitélio seminífero. No referido estudo, os autores mostraram, também por detecção imuno-histoquímica para PCNA, um aumento de espermatogônias, espermatócitos e também de células de Sertoli PCNA-*positivas* nos grupos suplementados com vitamina B12 (Beltrame et al., 2011). Sendo assim, é possível que, no presente trabalho, a suplementação com vitamina B12 durante 18 dias consecutivos (GRecVit) tenha estimulado a atividade mitótica e/ou meiótica das células germinativas, amenizando a depleção celular ocasionada pelo tratamento com busulfan. Além disso, levando-se em consideração a contagem do número de espermatogônias nos túbulos seminíferos em estágios IX-XIV e a imuno-marcção para detecção de PCNA, é possível inferir que a atividade mitótica das

espermatogônias, estimulada pela vitamina B12, tenha amenizado a redução do número de espermatogônias nos estágios avaliados.

A quantificação do número de espermatogônias mostrou também que os animais do GB apresentaram uma redução estatisticamente significativa em relação à GV e GVVit. Entretanto, esta redução foi menos expressiva que em GRec e GRecVit, provavelmente devido ao fato de que os animais do GB foram submetidos à um menor período de tratamento e, portanto, menos expostos aos efeitos deste fármaco.

6 - Conclusões

De acordo com os resultados deste estudo, pode-se concluir que as alterações no epitélio seminífero, causadas pelo tratamento com busulfan, foram amenizadas significativamente após uma semana de recuperação com suplementação de vitamina B12. A recuperação do epitélio seminífero parece estar diretamente relacionada à ação desta vitamina sobre a atividade mitótica das espermatogônias.

Portanto, a suplementação com vitamina B12 durante a recuperação pós-tratamento quimioterápico parece ser uma boa alternativa para estimular a atividade espermatogênica e recuperar o desempenho reprodutivo de pacientes oncológicos.

7- Referências

AICH, S.; MANNA, C. K. Histophysiological changes of the testicular tissue due the busulphan administration in the wild Indian house rat (*Rattus rattus*). **Acta. Biol. Hung.** 52 (1):105-116, 2001.

ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Quim. Nov.** 28(1) 118-129, 2005

ALMONG, S.; KURNIK, D.; SHIMONI, A.; LOEBSTEIN, R.; HASSOUN, E.; GOPHER, A.; HALKIN, H.; NAGLER, A. Linearity and stability of intravenous busulfan pharmacokinetics and the role of glutathione in busulfan elimination. **Biol. Blood Marrow Transplant.** 17(1):117-23, 2011.

ANJAMROOZ, S.H.; MOVAHEDIN, M.; MOWLA, S. J.; BAIRANVAND S. P. Assessment of Morphological and Functional Changes in the Mouse Testis and Epididymal Sperms Following Busulfan Treatment. Iran. **Biomed. J.** v. 11 n.1, p. 15-22, 2007.

ANTHONY, C. T.; SKINNER, M. K. Cytochemical and biochemical characterization of testicular peritubular myoid cells. **Biol Reprod.** 40(4):811-823, 1989.

APONTE, P. M.; van BRAGT, M. P.; de ROOIJ, D. G.; van PELT, A.M. Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. **APMIS.** 113(11-12):727-42; 2005.

BANERJEE, R.V.; MATTHEWS, R.G. Cobalamin-dependent methionine synthase. **FASEB J.** 4(5):1450-9; 1990.

BARDIN, C. W.; CHENG C. Y.; MUSTO, N. A.; GUNSALUS, G.L. The Sertoli Cell. In: KNOBIL E.; NEILL, J. The Physiology of Reproduction. **Raven Press**, 933-974, 1988.

BELTRAME, F.L.; CANEGUIM, B. H.; MIRAGLIA, S. M.; CERRI, P. S.; SASSO-CERRI, E. Vitamin B(12) Supplement Exerts a Beneficial Effect on the Seminiferous Epithelium of Cimetidine-Treated Rats. **Cells Tissues Organs.** 193:184–194, 2011.

BUCCI, L. R.; MEISTRICH M. L. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. **Mutat. Res.** 176 (2): 259-268, 1987.

CANEGUIM, B. H. Apoptose nas células mióides peritubulares: Uma possível relação com as alterações do epitélio seminífero em ratos imunossuprimidos com Tacrolimus (FK-506). 2008. 78 f. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 2008.

CANEGUIM, B. H.; LUZ, J. S.; VALENTINI, S. R.; CERRI, P. S.; SASSO-CERRI, E. Immunoexpression of aromatase and estrogen receptors b in stem spermatogonia of bullfrogs indicates a role of estrogen in the seasonal spermatogonial mitotic activity. **General and Comparative Endocrinology** 182; 65–72, 2013.

CERRI, P. S.; SASSO-CERRI, E.; Staining methods applied to glycol methacrylate embedded tissue sections. **Micron.** 34(8):365-372 2003.

CHOI, Y. J.; SONG, H.; KWON, D.N.; CHO, S.K.; KANG, S.J.; YOE S.M.; KIM H.C.; LEE, H.T.; PARK C.; KIM J.H. Significant IgG-immunoreactivity of the spermatogonia of the germ cell-depleted testis after busulfan treatment. **Anim Reprod Sci.** 91(3-4):317-335. 2006

DAVIS, J. R.; LANGFORD, G.A.; KIRBY, P.J. The testicular capsule. In: Johnson, A. D.; Gomes, W. R. VanDemark, N. L. The Testis. vol. 1. Nova York: **Academic Press**, 1970, p. 281-337.

FAWCETT, D. W. Ultrastructure and function of the Sertoli cell. In: HAMILTON, D. W.; GREEP R. O., **Handbook of Physiology**. Vol. 5. American Physiological Society, p. 21-55, 1975.

FRANÇA, L. R.; LEAL, M. C.; SASSO-CERRI, E.; VASCONCELOS, A.; DEBELJUK, L.; RUSSELL, L. D. Cimetidine (Tagamet) is a reproductive toxicant in male rats affecting peritubular cells. **Biol Reprod.** 63(5):1403-12; 2000.

FREISE, K. J.; SCHMIDT, R. L.; WIDNESS, J. A.; VENG-PEDERSEN, P. Pharmacodynamic modeling of the effect of changes in the environment on cellular lifespan and cellular response. **J Pharmacokinet Pharmacodyn.** 35(5): 527-52, 2008.

FURUKAWA S.; USUDA, K.; ABE, M.; HAYASHI, S.; OGAWA, I. Busulfan-induced apoptosis in rat placenta. **Exp Toxicol Pathol.** 59(2): 97-103, 2007.

HOOLEY, R. P.; PATERSON, M.; BROWN, P.; KERR, K.; SAUNDERS, P.T. Intra-testicular injection of adenoviral constructs results in Sertoli cell-specific gene expression and disruption of the seminiferous epithelium. **Reproduction.**137(2):361-70; 2009.

IWAMOTO, T.; HIRAKU, Y.; OIKAWA, S.; MIZUTANI, H.; KOJIMA, M.; KAWANISHI, S. DNA intrastrand cross-link at the 5'-GA-3' sequence formed by busulfan and its role in the cytotoxic effect. **Cancer Sci.** 95(5):454-8; 2004.

JAHNUKAINEN, K.; EHMCKE, J.; SCHLATT, S. Testicular xenografts: a novel approach to study cytotoxic damage in juvenile primate testis. **Cancer Res.** 66(7): 3813-3818, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan: Cap. 21, 2008.

KACHANI, A. T.; ABREU, C. L. M.; LISBOA, S. B. H.; FISBERG, M. Selective nourishment of the child. **Pediatria** (São Paulo); 27(1):48–60, 2005.

KAWATA, T.; FUNADA, U.; WADA, M.; MATSUSHITA, M.; SANAI, T.; YAMADA, H.; KUWAMORI, M.; ARAI, K.; YAMAMOTO, Y.; TANAKA. N.; TADOKORO, T.; MAEKAWA, A. Breeding severely vitamin B12-deficient mice as model animals. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.** 74(1):57-63; 2004.

KAWATA, T.; TAMIKI, A.; TASHIRO, A.; SUGA, K.; KAMIOKA, S.; YAMADA, K.; WADA, M.; TANAKA. N.; TADOKORO, T.; MAEKAWA, A. Effect of vitamin B12-deficiency on testicular tissue in rats fed by pair-feeding. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.** 67(1):17-21; 1997.

KEULEN, C.J.; DE ROOIJ, D.G. Spermatogenetic clones developing from repopulating stem cells surviving a high dose of an alkylating agent. **Cell Tissue Kinet.** 8(6):543-51; 1975

KRETZER, D. M.; KERR, J. B.; PAULSEN, C. A. The peritubular tissue in the normal and pathological human testis. An ultrastructural study. **Biol Reprod.** 12(3):317-24,1975.

LEESON, T. S.; COOKSON, F. B. The mammalian testicular capsule and its muscle elements. **J. Morph.** 144(2): 237-354, 1974.

MAEKAWA, M.; KAMIMURA, K.; NAGANO, T. Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol.* 59(1):1-13, 1996.

MCLEAN, D.J.; RUSSELL, L.D.; GRISWORLD, M.D. Biological activity and enrichment of spermatogonial stem cells in vitamin A-deficient and hyperthermia-exposed testes from mice based on colonization following germ cell transplantation. **Biol Reprod.** 66(5):1374-1379, 2002.

MENG, X.; LINDAHL, M.; HYVONEN, M. E.,; PARVINEN, M.;DE ROOIJ, D.G.; HESS, M. W.; RAATIKAINEN-AHOKAS, A.; SAINIO, K.; RAUVALA, H.; LAKSO, M.; PICHEL, J.G.; WESTPHAL, H.; SAARMA, M.; SARIOLA, H. et al Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. **Science**, 287(5457):1489-1493, 2000.

MICHAELI, J.; FIBACH, E.; RACHMILEWITZ, E. A. Induction of differentiation of myeloid leukemic cells by busulphan: in vivo and in vitro observations. **Leuk Lymphoma.** 11(3-4):287-91. 1993.

MOLYNEUX, G.; ANDREWS, M.; YORK, M.; BARNETT, A.; QUIRK, E.; YEUNG, W.; TURTON, J. Haemotoxicity of busulphan, doxorubicin, cisplatin and cyclophosphamide in the female BALB/c mouse using a brief regimen of drug administration. **Cell Biol Toxicol.** 27(1):13-40, 2011.

MRUK D. D.; CHENG C. Y. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocr Rev.** 25(5):747-806; 2004.

NAGAOSA, K.; KISHIMOTO, A.; KIZU, R.; NAKAGAWA, A.; SHIRATSUCHI, A.; NAKANISHI, Y. Perturbation of spermatogenesis by androgen antagonists directly injected into seminiferous tubules of live mice. **Reproduction.** 133(1):21-7, 2007.

OH, R.C.; BROWN, D.L.. Vitamin B12 deficiency. **Am. Fam. Physician.** v. 67, 979-86, 2003

OZAKI S, OHKAWA I, KATOH Y, TAJIMA T, KIMURA M, ORIKASA S. Study on producing rats with experimental testicular dysfunction and effects of mecobalamin. **Nippon Yakurigaku Zasshi.** 91(4):197-207, 1988

PANIZ, C.; GROTTTO, D.; SCHIMITT, G. C.;VALENTINI,J.;SCHOTT, K. L.; POMBLUM, V. J.;GARCIA,S. C. Physiopathology of vitamin B12 deficiency and its laboratorial diagnosis **J Bras Patol Med Lab.** 41(5):323-334; 2005.

PASQUOLOTTTO, F. F.; LUCON, A. M.; SOBREIRO, B. P.; PASQUALOTTO, E. B.; ARAP, S. Effects of medical therapy, alcohol, smoking, and endocrine disruptors on male infertility. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo.** 59 (6): 375-382, 2004.

PÉREZ- CRESPO, M.; PERICUESTA, M.; PÉREZ- CEREZALES, S.; ARENAS, M. I.; LOBO, M. V.; DÍAZ-GIL, J. J.; GUTIERREZ-ADAN,A. Effect of liver growth factor on both testicular regeneration and recovery of spermatogenesis in busulfan-treated mice. **Reprod Biol Endocrinol.** 4;9:21, 2011.

PIRES, M. D. **O poder das vitaminas**. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2012.

PRONT, R.; MARGALIOH, E. J.; GREEN, R.; ELDAR-GEVA, T.; MAIMONI, Z.; ZIMRAN, A.; ELSTEIN, D. Prevalence of low serum cobalamin in infertile couples. **Andrologia**. 41(1):46-50; 2009.

RACHMILEWITZ, B.; RACHMILEWITZ, M. Chemotherapy-induced changes in serum vitamin B 12 binding proteins in myeloid leukemia. **Isr J Med Sci**. 7(10):1140-5. 1971

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M., MOORE, P. K. Farmacologia. 5. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2004.

RODRIGUES, A. A. S. terapêutica quimioterápica e citoprotetora em pacientes oncológicos. **Rev. Pesq. Inov. Farm** 2(1):37-47; 2010.

DE ROOIJ, D.G; RUSSELL, L.D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. **J Androl**. 21(6):776-98; 2000

ROSS, M. H.;PAULINA, W. **Histologia**: texto e atlas. 5 ed. São Paulo: Saraiva, 2008.

RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; HIKIM, A. P. S.; CLEGG. E. D. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. 1. ed. **Cache River Press**, 1990. cap.1.

SASSO-CERRI, E.; MIRAGLIA, S. M. In situ demonstration of both TUNEL-labeled germ cell and Sertoli cell in the cimetidine-treated rats. **Histol Histopathol**. 17(2): 411-417, 2002.

SASSO-CERRI, E.; GIOVANONI, M.; HAYASHI, H., MIRAGLIA, S. M. Morphological alterations and intratubular lipid inclusions as indicative of spermatogenic damage in cimetidine-treated rats. **Arch Androl.** 46(1): 5-13; 2001.

SASSO-CERRI, E.; CERRI, P. S. Morphological evidences indicate that the interference of cimetidine on the peritubular components is responsible for detachment and apoptosis of Sertoli cells. **Reprod Biol Endocrinol.** 9;6:18; 2008

SHAN L. X.; BARDIN C. W.; HARDY M. P. Immunohistochemical analysis of androgen effects on androgen receptor expression in developing Leydig and Sertoli cells. **Endocrinology.** 138(3): 1259-66; 1997.

SINCLAIR, S. Male infertility: nutritional and environmental considerations. **Altern Med Rev.** 5(1):28-38, 2000.

SNELL, R. S. **Histologia** 1^a ed. Interamericana, 1984 cap 14.

TRIPP, B. M.; LAMB, D. J. Sertoli Cells. In: LIPSHULTZ, L. I.; HOWARDS S. S. Infertility in the Male. **Mosby-Year Book**, 1997.

UDAGAWA, K. et al. GnRH analog, leuprorelin acetate, promotes regeneration of rat spermatogenesis after severe chemical damage. **Int J Urol** 8(11):615-22, 2001.

VALISIAUSHA, S. R. Estudo morfológico e morfométrico dos túbulos seminíferos de ratos tratados com o quimioterápico busulfan e suplementados com vitamina B12. 2010. 29 f. Relatório (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara. 2010.

VILAR, O.; PEREZ DEL CERRO, M. I.; MANCINI, R. E. The Sertoli cell as a “bridge cell” between the basal membrane and the germinal cells. **Exp. Cell Res.** 27: 158-161,1962.

WATANABE, T.; OHKAWA, K.; KASAI, S.; EBARA, S.; NAKANO, Y.; WATANABE, Y. The effects of dietary vitamin B12 deficiency on sperm maturation in developing and growing male rats. **Congenit Anom (Kyoto)**. 43(1):57-64. 2003.

WATANABE, T.; EBARA, S.; KIMURA, S.; MAEDA, K.; WATANABE, Y.; WATANABE, H.; KASAI, S.; NAKANO, Y. Maternal vitamin B12 deficiency affects spermatogenesis at the embryonic and immature stages in rats. **Congenit Anom (Kyoto)**. 47(1):9-15. 2007.

YAO, P. L.; LIN, Y. C.; RICHBURG, J. H. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate-induced disruption of junctional complexes in the seminiferous epithelium of the rodent testis is mediated by MMP2. **Biol Reprod.** 82(3):516-27, 2010.

ZOHNI, K.; ZHANG, X.; TAN, S. L.; CHAN, P.; NAGANO, M. C. The efficiency of male fertility restoration is dependent on the recovery kinetics of spermatogonial stem cells after cytotoxic treatment with busulfan in mice. **Hum Reprod.** (1):44-53, 2010.

Araraquara, ____ de janeiro de 2014.

Aluna

Bárbara Oliveira

De acordo,

Orientadora

Estela Sasso Cerri