

AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA GENITAL E DA FUNÇÃO REPRODUTIVA DA PROLE FEMININA DE RATOS WISTAR EXPOSTOS À CISPLATINA DURANTE A PERI- PUBERDADE

PATRÍCIA VILLELA E SILVA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular, Estrutural e Funcional*.

Profa Dra. Wilma De Grava Kempinas

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA GENITAL
E DA FUNÇÃO REPRODUTIVA DA PROLE FEMININA DE
RATOS WISTAR EXPOSTOS À CISPLATINA DURANTE A PERI-
PUBERDADE

PATRÍCIA VILLELA E SILVA

Profa. Dra. WILMA DE GRAVA KEMPINAS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia
Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia
Celular, Estrutural e Funcional*.

Profa Dra. Wilma De Grava Kempinas

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Silva, Patrícia Villela E.

Avaliação do desenvolvimento do sistema genital e da função reprodutiva da prole feminina de ratos Wistar expostos à cisplatina durante a peri-puberdade / Patrícia Villela E Silva. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Wilma de Grava Kempinas

Capes: 20600003

1. Aparelho genital feminino. 2. Homem - Reprodução. 3. Fármacos. 4. Medicamentos - Efeitos colaterais.

Palavras-chave: Cisplatina; Exposição paterna; Rato; Sistema genital feminino; Toxicidade reprodutiva.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, José Renato da Silva e Leila Maria Villela e Silva, pelos ensinamentos e, sobretudo, pelo esforço dedicado à minha formação e caráter, e ao meu irmão, Daniel Villela e Silva, pelo apoio que sempre me deu.

Agradecimentos

A Deus, por todas as vitórias conquistadas, pela proteção e paz que sempre me deu em cada momento difícil da minha vida e pela conclusão desta importante etapa.

Aos meus pais, por fazerem dos meus sonhos os deles e por vibrarem a cada conquista alcançada. Por serem sempre presentes e dedicados tanto à minha formação pessoal quanto profissional. Pelo carinho incondicional que sempre me deram, me apoiando, confortando e ensinando a conquistar meus sonhos mantendo sempre meu caráter.

Ao meu irmão, que tanto amo, pelos conselhos, apoio, carinho, “puxões de orelha” e suporte emocional nos momentos de dificuldades. Por compartilhar alegrias e tristezas, comemorando cada vitória alcançada.

À minha orientadora, Wilma De Grava Kempinas, pelo apoio, incentivo e contribuição ao meu crescimento profissional. Pelos ensinamentos, confiança e paciência, e pelas oportunidades que sempre me deu.

Aos meus familiares, principalmente às minhas primas Luciana Do Valle e Jaqueline Silva, pela amizade e por estarem sempre presentes me apoiando.

A todos os meus amigos, principalmente à Débora Grinet, Silvia Moraes, Hiara de Castro, Bianca Rossi, Ana Carolina Monetta, Mirela Di Bastiani e Paula Zaghetto, pela amizade, companheirismo e por compartilharem os momentos de tristezas e alegrias.

Às minhas companheiras de casa, Jaqueline Rinaldi e Mirian Matsumoto que, em tão pouco tempo, fizeram-se verdadeiras amigas e “anjos” em minha vida.

Aos companheiros de laboratório, principalmente à Raquel Frenedoso da Silva e Cibele dos Santos Borges, por todo o apoio na execução do projeto e pelo trabalho em equipe.

Aos amigos que conheci nesta nova etapa, principalmente à Marília Martins Cavariani, Aline Lima de Barros e Josiane de Lima Rosa, pela amizade, suporte emocional e companheirismo.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro deste trabalho (Processo nº. 2012/12970-1).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de mestrado.

Ao Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP.

À Luciana, secretária do departamento de morfologia, e Davi, secretário da pós-graduação, pelo suporte de sempre.

Ao técnico de laboratório José Eduardo Bozano, pelo suporte, por ser sempre prestativo e pela alegria contagiante de todo dia.

À Profa. Dra. Janete A. A. Franci, ao Dr. Ruither O. G. Carolino e ao Prof. Dr. Fernando B. Junior, pelas dosagens de hormônio e platina.

À Profa. Dra. Camila Contin Diniz de Almeida Francia, ao Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan e a Guilherme Ribeiro Romualdo, pelo grande auxílio na realização das análises imunohistoquímicas.

“Os obstáculos existem por algum motivo. Não estão ali para nos impedir de entrar. Eles existem para nos dar uma chance de mostrarmos as forças de nossas aspirações.”
Randy Pausch

Sumário

	Pág.
Resumo	13
Abstract	15
Introdução	17
1. Morfologia do sistema genital feminino de rato	18
1.1. Genitália externa ou vulva	18
1.2. Vagina	18
1.3. Útero	19
1.4. Tuba uterina	19
1.5. Ovários	19
2. Regulação hormonal feminina e o ciclo estral em ratas	20
3. Puberdade no rato macho	21
4. Epidemiologia do câncer	22
5. Quimioterapia	23
6. Cisplatina e quimioterápicos a base de platina	23
6.1. Cisplatina e sua origem no tratamento de câncer	23
6.2. Mecanismos de ação da cisplatina	24
6.2.1. Administração da cisplatina	25
6.2.2. Entrada e acúmulo da cisplatina na célula	25
6.2.3. Hidrólise da cisplatina no interior da célula	26
6.2.4. Ligação da cisplatina ao DNA e outros alvos celulares	27
6.2.5. Efluxo da cisplatina	27
6.2.6. Ação das enzimas DNA polimerase sobre os adutos de platina	27
6.3. Efeitos adversos da cisplatina	27
7. Efeitos da cisplatina sobre o sistema genital masculino	28
8. Efeitos da cisplatina sobre o sistema genital feminino	29
9. Efeitos da exposição paterna à cisplatina sobre a prole	30
Justificativa	33
Objetivos	35
Manuscrito	37
<i>Abstract and keywords</i>	40
<i>Introduction</i>	41
<i>Materials and methods</i>	42

<i>Results</i>	48
<i>Discussion</i>	49
<i>Acknowledgements</i>	52
<i>References</i>	52
<i>Conflict of interest statement</i>	54
<i>Legends of figures</i>	55
Conclusões	69
Referências bibliográficas da introdução	71
Anexos	80
Comissão de ética	86

A cisplatina é um fármaco amplamente utilizado no tratamento quimioterápico contra diversos tipos de tumores malignos, tais como o câncer de ovário e testículo, sendo este último um dos que mais afeta homens na idade reprodutiva. Seu mecanismo de ação compreende a ligação ao DNA, resultando na formação de adutos, os quais podem afetar os processos celulares fundamentais, tais como a replicação, transcrição e tradução, induzindo a morte das células tumorais. Este fármaco também pode causar efeitos adversos sobre a reprodução masculina, uma vez que forma adutos com células germinativas, resultando em alterações na espermatogênese. Há evidências de que homens tratados com este fármaco podem manter a sua capacidade reprodutiva e os danos genéticos serem transmitidos à prole. Em trabalho anterior, realizado neste Laboratório, esse fato foi demonstrado em ratos, no que se refere à prole masculina. Diante desse contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar os possíveis efeitos da cisplatina sobre o desenvolvimento sexual e o sistema genital da prole feminina de ratos machos expostos à droga durante o período peri-púbere. Para isso, ratos machos Wistar com 45 dias de idade foram alocados em grupo controle, que recebeu solução salina (veículo), e tratado, que recebeu 1mg/Kg/dia de cisplatina diluída em veículo (n=10/grupo experimental), cinco dias por semana, durante três semanas, via intraperitoneal. Após o tratamento, os animais foram acasalados com fêmeas não tratadas para a avaliação dos seguintes parâmetros da prole feminina: contagem de células germinativas no ovário fetal, distância ano-genital, número de aréolas/mamilos, idade de abertura vaginal (indicativa da instalação da puberdade) e do primeiro estro, evolução do peso corpóreo até o desmame; na idade adulta foram determinados os pesos de órgãos vitais e da reprodução, e realizadas dosagens hormonais, avaliação do ciclo estral, comportamento sexual, fertilidade, histologia ovariana e uterina e imunomarcagem de receptores de estrógeno e progesterona no útero. Foram também determinados os níveis de platina no sangue dos ratos expostos à cisplatina, após o período de acasalamento. Os resultados demonstraram redução no número de células germinativas nos ovários fetais, na duração do ciclo estral e nos níveis séricos de FSH, bem como aumento da porcentagem de folículos antrais na prole feminina adulta do grupo tratado com cisplatina, embora a fertilidade não tenha sido alterada. Altos níveis de platina no sangue dos ratos expostos à cisplatina indicaram que o regime experimental foi adequado. Concluiu-se que a exposição paterna à cisplatina, durante a peri-puberdade, causou alterações no desenvolvimento e histofisiologia do sistema genital da prole feminina de ratos. Embora não tenha sido analisada a integridade do DNA espermático, é possível que a formação de adutos e/ou mutações causadas pela exposição paterna à cisplatina possam ser responsáveis por esses efeitos na prole. Devido à eficiência desta droga como agente quimioterápico, devem ser estimulados estudos para a prevenção dos efeitos reprodutivos adversos da cisplatina, tendo-se em vista seu importante papel como agente anti-tumoral.

Abstract

Cisplatin is a drug widely used in chemotherapy against several types of malignant tumors such as ovarian and testicular cancer, which is one of the tumors that most affect men in the reproductive age. Its mechanism of action includes its binding to DNA, resulting in the formation of adducts, which can affect the fundamental cellular processes such as replication, transcription and translation, inducing tumor cell death. This drug can also cause adverse effects on male reproduction, since it forms adducts with germ cells, resulting in changes in spermatogenesis. There are evidences that men treated with this drug can maintain their reproductive capacity, and the genetic damages may be transmitted to offspring. In previous work conducted in this laboratory, this fact has been demonstrated in rats, with regard to male offspring. In this context, the aim of this study was to investigate the possible effects of cisplatin on the sexual development and reproductive system of female offspring of male rats exposed to the drug during the peri-pubertal period. For this, male *Wistar* rats, 45 days old, were allocated into control group, which received saline solution (vehicle), and treated group, which received 1mg/Kg/day of cisplatin diluted in vehicle (n=10/experimental group), five days a week, for three weeks, via intraperitoneal injection. After treatment, the animals were mated with untreated females for the evaluation of the following parameters of female offspring: germ cell counting in fetal ovaries, anogenital distance, number of areolae/nipples, age of vaginal opening (indicative of puberty onset) and first estrus, body weight gain until weaning; at adulthood, weights of vital and reproductive organs were determined, and hormonal measurements, evaluation of the estrous cycle, sexual behavior, fertility, ovarian and uterine histology and immunomarcation for estrogen and progesterone receptors in the uterus were performed. The levels of blood platin were also determined, after the mating period. The results demonstrated a reduction in the number of germ cells in fetal ovaries, in the length of the estrous cycle and serum levels of FSH, as well as an increase on the percentage of antral follicles in adult female offspring of the group treated with cisplatin, although fertility was unchanged. High levels of platin in the blood of the cisplatin-exposed rats indicated the adequacy of the treatment regimen. It was concluded that paternal exposure to cisplatin, during peri- puberty, led to changes in the development and histophysiology of the genital system of rat female offspring. It is suspected that sperm DNA adducts and/or mutations after paternal cisplatin exposure may be responsible for these effects in the offspring, even though no specific studies have been performed to analyse sperm DNA integrity. Due to the efficiency of cisplatin as a chemotherapeutic agent, studies for the prevention of adverse reproductive effects of this drug are to be stimulated, in view of its important role as an anti-tumor agent.

1. Morfologia do sistema genital feminino de rato

O sistema genital feminino de rato consiste em dois ovários (gônadas), duas tubas uterinas ou ovidutos, útero, vagina e a genitália externa ou vulva (Figura 1). É responsável por produzir e transportar os gametas, além de apresentar função endócrina, regular a reprodução, proteger e nutrir o embrião (Hebel e Stromberg, 1976; Allegrini, 2000).

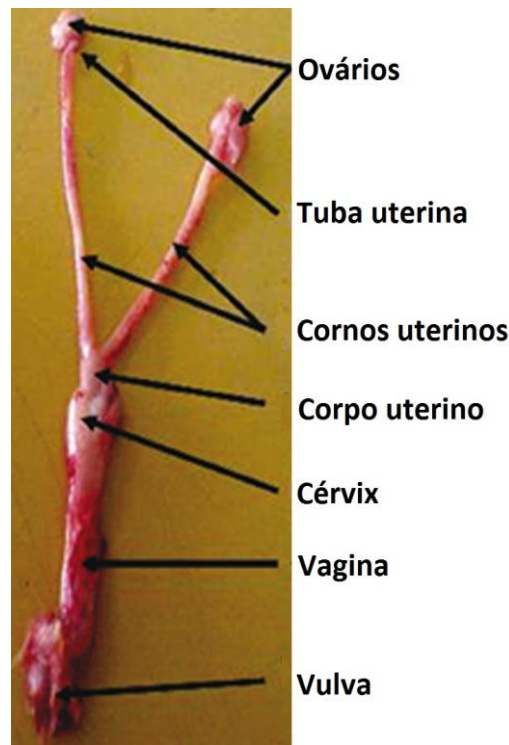


Figura 1: Sistema genital feminino de rato. Fonte: Adaptado de Akinloye e Oke (2010).

1.1. Genitália externa ou vulva

A genitália externa feminina ou vulva é rica em terminações nervosas que contribuem para a fisiologia do estímulo sexual. Consiste no clitóris e algumas glândulas que se abrem no orifício da vagina (Hebel e Stromberg, 1976).

1.2. Vagina

A parede da vagina não possui glândulas, sendo constituída pelas camadas mucosa, muscular e adventícia (Hebel e Stromberg, 1976). A mucosa é constituída por epitélio estratificado pavimentoso que apresenta alterações conforme a fase do ciclo reprodutivo, sendo caracterizado por quatro fases (proestro, estro, metaestro e diestro) conforme a proporção de células epiteliais, queratinizadas e leucócitos encontrados no lúmen da vagina (Hebel e Stromberg, 1976).

Antes da puberdade a vagina é fechada por um septo epitelial transversal, que começa a se degenerar entre os 20 e 35 dias de idade. A desintegração do septo continua entre os 40 e 70 dias de idade, levando à formação de um lúmen contínuo. Neste estágio, o epitélio é constituído por 2 a 5 camadas (Hebel e Stromberg, 1976). Após a puberdade o número de camadas aumenta para 8-12 durante o proestro, apresentando degeneração da mucosa nas camadas mais superficiais e queratinização das camadas mais profundas, sendo encontradas principalmente células epiteliais no lúmen. Durante o estro é possível observar entre 6 e 10 camadas da mucosa, sendo as mais superficiais compostas por células cornificadas. No metaestro essas células permanecem, sendo observada, também, a presença de leucócitos e células epiteliais. Durante o diestro o número de camadas aumenta novamente para 10 e vários leucócitos são encontrados no lúmen (Hebel e Stromberg, 1976; Marcondes *et al.*, 2002).

1.3. Útero

O útero de ratas é um órgão em formato de Y, composto por dois cornos uterinos alongados e completamente separados, constituídos pela camada mucosa (endométrio), muscular (miométrio) e adventícia (Walker e Homberger, 1997; Allegrini, 2000). Eles se fundem parcialmente na porção caudal, onde compartilham uma camada externa de miométrio, formando o corpo uterino, que se projeta em uma região próxima à vagina, sendo denominada cérvix ou colo uterino. Assim, os cornos da rata são independentes, se projetando separadamente na cérvix (Walker e Homberger, 1997; Allegrini, 2000).

1.4. Tuba uterina

A tuba uterina é um órgão enovelado formado pela expansão da extremidade cranial do corno uterino (Hebel e Stromberg, 1976). É composta por uma camada mucosa constituída por epitélio simples contendo células colunares secretoras e células ciliadas, além de uma camada de músculo liso e uma túnica serosa (Allegrini, 2000). Em ratas, divide-se em quatro segmentos: infundíbulo ou pré-ampola, a ampola, que possui o lúmen maior, o istmo, que é mais estreito, e a porção intramural, que é a região de transição entre o oviduto e o corno uterino (Allegrini, 2000).

1.5. Ovários

Os ovários têm duas funções: ovogênese e secreção de hormônios esteroides sexuais femininos, a progesterona e o estrógeno (Ohkura *et al.*, 2000). São formados por epitélio cúbico simples, denominado epitélio germinativo, abaixo do qual é encontrada uma camada de tecido conjuntivo denso denominada túnica albugínea. Externamente estes órgãos são completamente

envoltos por um saco membranoso denominado bursa ovariana, formado pelo infundíbulo e partes adjacentes do ligamento largo (Walker e Homberger, 1997).

Os ovários são formados por duas regiões diferentes, o córtex ou zona parenquimatosa e a medula ou zona vascular. A maior parte é constituída pela zona parenquimatosa, composta por tecido conjuntivo denso no qual, dependendo da idade e da fase do ciclo estral da rata, é encontrada uma variação na quantidade de folículos, corpo lúteo, glândulas intersticiais e outras células em um estroma altamente compactado (Hebel e Stromberg, 1976; Haschek *et al.*, 2010). A zona medular, por sua vez, é constituída por tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos e linfáticos, além de glândulas intersticiais e nervos (Walker e Homberger, 1997; Haschek *et al.*, 2010; Junqueira e Carneiro, 2011).

2. Regulação hormonal feminina e o ciclo estral em ratas

O ciclo estral das ratas tem início logo após a abertura vaginal, que geralmente ocorre entre o 32º e 36º dia de idade. Do início da maturidade sexual até aproximadamente o 10º ou 12º mês de idade, a duração média do ciclo estral é de quatro a cinco dias, podendo apresentar algumas irregularidades (Goldman *et al.*, 2007). Durante o ciclo são observadas quatro fases (proestro, estro, metaestro e diestro), sendo caracterizadas pela predominância de células epiteliais, cornificadas e leucócitos encontrados no lúmen da vagina (Figura 2) (Maeda *et al.*, 2000; Marcondes *et al.*, 2002). A presença dessas células também pode ser correlacionada com os diferentes estádios do útero e dos ovários, que variam conforme as alterações nas concentrações de esteroides sexuais e gonadotrofinas (Goldman *et al.*, 2007).

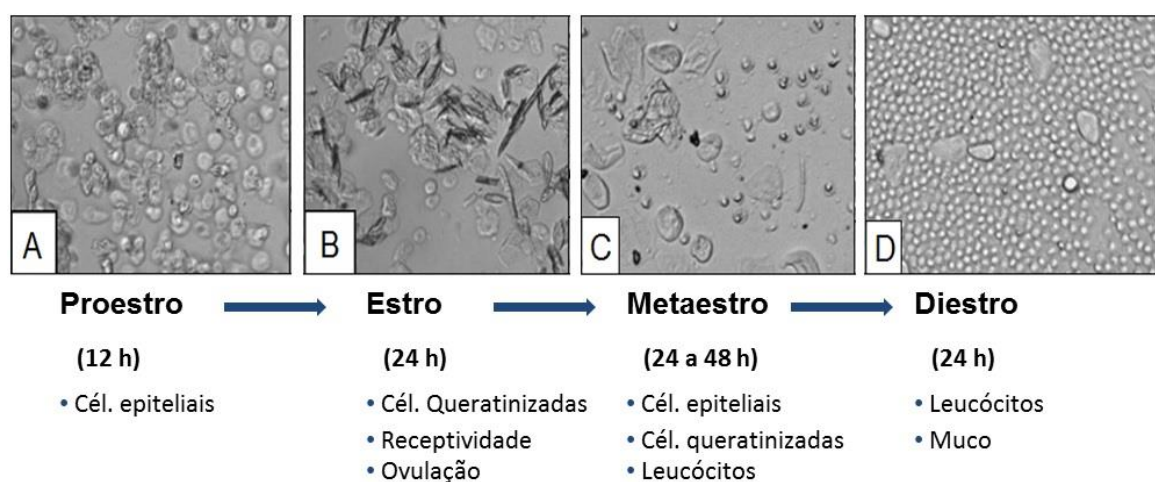


Figura 2: Lavado vaginal obtido em diferentes dias do ciclo estral de ratas. A: proestro; B: estro; C: metaestro; D: Diestro. Fonte: Adaptado de Goldman *et al.*, 2007.

Em ratas, o proestro é caracterizado pelo predomínio de células epiteliais nucleadas encontradas no lúmen vaginal e dura aproximadamente 12 horas. O estro, fase com duração aproximada de 24 horas, corresponde ao período em que a fêmea é receptiva ao macho, havendo o predomínio de células queratinizadas anucleadas disforme, que podem ser encontradas isoladas ou em grupos. Se não ocorrer a concepção, o estro é seguido pelo metaestro, período que dura entre 24 e 48 horas, caracterizado pela proporção equivalente de células epiteliais, queratinizadas e leucócitos. No diestro, que dura aproximadamente 24 horas, encontram-se predominantemente leucócitos, com algumas células epiteliais e muito muco, sendo o período de reinício da secreção de hormônios ovarianos para o próximo ciclo (Antunes-Rodrigues e Favaretto, 1999; Marcondes *et al.*, 2002; Goldman *et al.*, 2007).

A atividade dos ovários de ratas, assim como de outros mamíferos, é controlada pelas gonadotrofinas (hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante; FSH e LH, respectivamente) secretadas pela hipófise (Ohkura *et al.*, 2000).

3. Puberdade no rato macho

A puberdade representa um evento dinâmico e complexo do desenvolvimento sexual, que envolve mudanças físicas, comportamentais e hormonais, através das quais a maturação sexual ocorre e a capacidade reprodutiva é obtida (Golub *et al.*, 2008). Estas mudanças são estabelecidas devido à ocorrência de uma cascata de eventos que levam à maturação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e consequentemente ao início do ciclo reprodutivo da espécie (Ojeda e Urbanski, 1994).

Durante a puberdade ocorrem mudanças no perfil hormonal, especialmente na síntese e secreção de esteróides em resposta ao aumento da pulsatilidade do GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) e ao aumento da síntese e secreção de LH e FSH (Ojeda e Urbanski, 1994). É importante destacar que este aumento dos níveis de gonadotrofinas durante a puberdade pode ter um papel na alta incidência de câncer testicular em indivíduos jovens, especialmente com idade entre 15 e 19 anos (Oliver, 1996; Golub *et al.*, 2008).

Os mecanismos que regem o início da puberdade no rato macho não são bem compreendidos. Desde antes do nascimento, já existem relações entre os elementos do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, que só iniciam sua sincronização durante as primeiras semanas de vida pós-natal (Robb *et al.*, 1978).

O desenvolvimento sexual pós-natal no rato macho tem sido classificado em quatro fases: neonatal (dia pós-natal – DPN 1-7), infantil (DPN 8-21), juvenil (DPN 22-25) e peri-puberal (DPN 36-55 ou 60) (Clegg, 1960; Ojeda *et al.*, 1980).

Aos 40 dias pós-natal são encontradas as primeiras espermátides maduras no testículo, enquanto espermatozóides são observados na cauda do epidídimo apenas aos 50 dias. Assim, o rato macho atinge a puberdade por volta de 50 dias de idade (Robb *et al.*, 1978).

Os pesos relativos do testículo e epidídimo alcançam seus picos por volta dos 70 dias pós-natal. O peso testicular apresenta um rápido crescimento durante o período peri-puberal, provavelmente devido ao aumento no número de receptores de FSH nas células de Sertoli (Ojeda e Urbanski, 1994). O número de receptores de andrógenos aumenta pronunciadamente nas células de Sertoli dos DPN 10-20 até 35-60, sugerindo que andrógenos também apresentam um importante papel na instalação da puberdade no macho (Maeda *et al.*, 2000).

Ratos com 75 dias de idade apresentam a máxima produção de espermatozóides no testículo e aos 100 dias, a máxima concentração de espermatozóides armazenados na cauda do epidídimo, atingindo neste período a maturidade sexual plena (Robb *et al.*, 1978; Zanato *et al.*, 1994).

Como a espermatogênese e a esteroidogênese ainda não estão totalmente estabelecidas durante a peri-puberdade, esta pode ser uma fase crítica do desenvolvimento reprodutivo e consequentemente mais vulnerável a alterações causadas por agentes químicos (Johnson *et al.*, 1997). Assim, qualquer alteração nos eventos característicos que ocorrem nesta fase pode acarretar sérios prejuízos e comprometer a reprodução do indivíduo na vida adulta (Favareto, 2011).

4. Epidemiologia do câncer

Atualmente, o câncer é um dos maiores problemas de saúde pública que afetam tanto países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Estatísticas mundiais apontam que, em 2008, as neoplasias corresponderam a aproximadamente 7,6 milhões de casos de morte no mundo (cerca de 13% do total) (WHO, 2013), sendo estimado, para o ano de 2030, cerca de 27 milhões de casos de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer (INCA, 2011).

Na idade reprodutiva, o câncer testicular é um dos tumores mais comuns que acometem homens, prevalecendo em jovens entre 15 e 35 anos de idade (Segal, 2006). Sua incidência é de 6 a 11 casos para 100 mil homens, sendo que no Brasil é de 2,2/100 mil homens (SBU, 2010). Com os avanços nos tratamentos multimodais (cirurgia, quimioterapia e radioterapia), as possibilidades de cura do tumor tem sido maiores, particularmente quando são realizados logo após o diagnóstico (Rosen *et al.*, 2011).

5. Quimioterapia

A quimioterapia é um método de tratamento que utiliza compostos químicos para o combate de doenças causadas por agentes biológicos, sendo denominada antineoplásica ou antitumoral quando aplicada ao câncer. Tais compostos, denominados quimioterápicos, atuam prejudicando ou inibindo a mitose e, conseqüentemente, a proliferação celular (INCA, 2013).

Com o avanço do conhecimento da biologia molecular e genética dos tumores, vários estudos têm sido realizados na busca de novas formas de tratamento do câncer. Atualmente, os compostos a base de platina estão entre os agentes quimioterápicos mais ativos, sendo amplamente utilizados no tratamento de vários tipos de câncer (Ahmad *et al.*, 2010).

6. Cisplatina e quimioterápicos a base de platina

6.1. Cisplatina e sua origem no tratamento de câncer

Os fármacos a base de platina foram identificados como agentes citotóxicos a partir da descoberta das atividades antitumorais do composto *cis*-diaminodicloroplatina (II), conhecida como *cis*-DDP ou cisplatina (Figura 3).

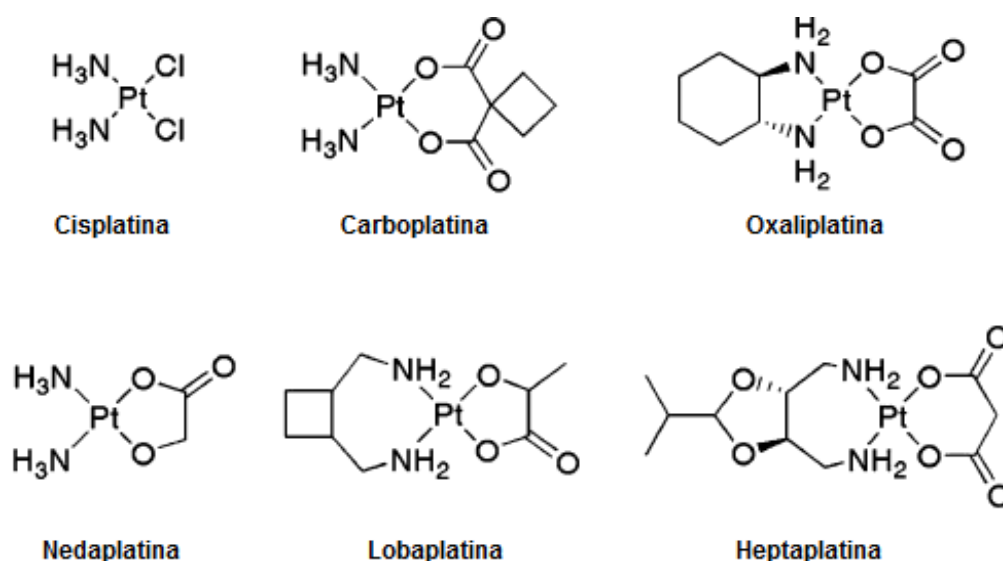


Figura 3. Estruturas químicas de alguns complexos a base de platina utilizados na quimioterapia.

Fonte: Adaptado de Gabano *et al.*, 2008.

Em 1969, Rosenberg e colaboradores aplicaram essas substâncias em camundongos com sarcoma e leucemia induzidos e, relataram pela primeira vez a atividade antineoplásica dos compostos de platina (Rosenberg *et al.*, 1969).

Com a confirmação de testes *in vivo*, o Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos introduziu a cisplatina em ensaios clínicos de fase I e, em 1971, o primeiro paciente foi tratado (Kelland, 2007). Em 1978 a cisplatina foi, então, aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o uso no tratamento de câncer de testículo e de ovário, sendo atualmente comercializada também como Platinol® (Hanigan *et al.*, 1994; Kelland, 2007). Ela é indicada sozinha ou em combinação com outros agentes quimioterápicos, como metotrexato, bleomicina, etoposido, doxorubicina e vimblastina.

A cisplatina revolucionou o tratamento de tumores sólidos de testículo e ovário (Rang *et al.*, 2011). Ela é altamente efetiva no tratamento de câncer testicular, apresentando índices de cura entre 90 e 100% quando o tratamento é realizado logo depois de diagnosticado o tumor (Jung e Lippard, 2007). Além da eficiência no tratamento desses tumores, ela também é utilizada em casos de câncer de esôfago, cabeça e pescoço, colo-retal, linfoma, pulmão, melanoma, bexiga, cervical, osteosarcoma, neuroblastoma, entre outros (Jamieson e Lippard, 1999; Jung e Lippard, 2007; Ikeda *et al.*, 2011).

Apesar de sua ampla utilização na clínica, o tratamento com a cisplatina é limitado por apresentar efeitos adversos, bem como resistência por algumas células tumorais (Kelland, 2007). Assim, nas últimas três décadas, vários estudos tem sido realizados para minimizar essas limitações, sendo o principal foco o desenvolvimento de novos fármacos a base de platina, que levou à descoberta de complexos análogos. Aproximadamente 3000 compostos a base de platina tem sido sintetizados e testados quanto às suas atividades biológicas (Jung e Lippard, 2007), porém, apenas 10 a 15 entraram em ensaios clínicos avançados (Reedijk, 2009).

Atualmente, apenas três compostos a base de platina são aprovados pela FDA para a comercialização: cisplatina, carboplatina e oxaliplatina (Figura 3) (Lebwohl e Canetta, 1998). Além destes, no Japão, China e Coréia do Sul tem sido utilizados outros três compostos: nedaplatina, lobaplatina e heptaplatina, respectivamente (Figura 3) (Wheate *et al.*, 2010).

6.2. Mecanismo de ação da cisplatina

A cisplatina é um complexo formado por um átomo central de platina envolto por dois átomos de cloro e dois grupos amônia (Figura 3). Sua ação é análoga à dos agentes alquilantes. Quando entra na célula, o Cl^- dissocia-se, permitindo sua reação com a água e, então, interage com o DNA (Rang *et al.*, 2011). Essa interação ocorre através da formação de ligações covalentes entre o complexo de platina e as bases nitrogenadas do DNA, particularmente a guanina, gerando adutos (Figura 4). Quando não corrigido pelo sistema de reparo, esses danos podem afetar os

processos celulares fundamentais, como replicação, transcrição, tradução e reparo de DNA, podendo resultar em apoptose (Jamieson e Lippard, 1999; Wozniak e Blasiak, 2002).

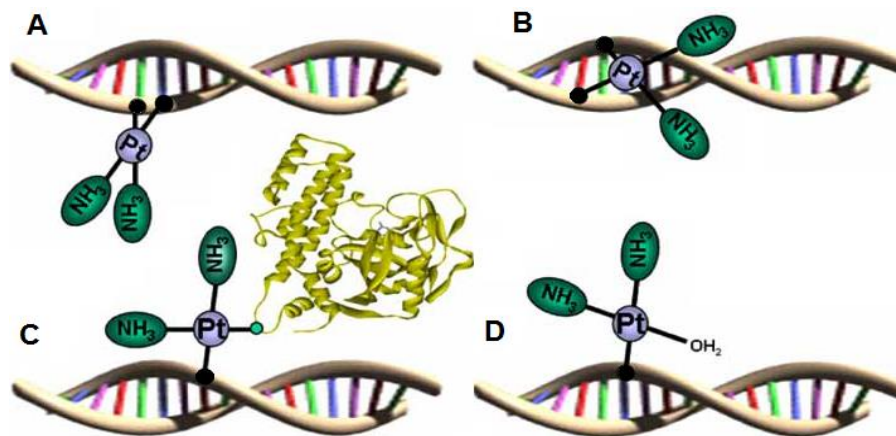


Figura 4: Principais adutos formados pela ligação entre a cisplatina e o DNA. (A) 1,2-intrafitas, (B) interfitas, (C) intermolecular, (D) aduto monofuncional. Fonte: Adaptado de Cepeda *et al.*, 2007.

6.2.1. Administração da cisplatina

A cisplatina é administrada em pacientes através da injeção ou infusão intravenosa lenta (Rang *et al.*, 2011). As doses mais comumente administradas estão entre 100 e 200 mg/dia durante cinco dias consecutivos, por injeção intravenosa (Reedijk, 2009).

Na corrente sanguínea ela é distribuída na sua forma neutra, até alcançar as células-alvo (Gately e Howell, 1993). Durante este percurso, porém, ela pode reagir com algumas moléculas presentes no plasma como cisteína, metionina, glutatona e albumina, que são capazes de se ligar em cerca de 90% da cisplatina circulante, reduzindo sua disponibilidade (Cepeda *et al.*, 2007).

6.2.2. Entrada e acúmulo da cisplatina na célula

A cisplatina pode entrar nas células por difusão passiva ou difusão ativa (Figura 5), pelos transportadores de cobre (CTR1) e transportadores catiônicos orgânicos (Kelland, 2007; Klein e Hambley, 2009). Pesquisas apontam que ao atravessar a membrana celular, a cisplatina pode se ligar a alguns componentes da bicamada lipídica que contêm átomos de nitrogênio e enxofre, incluindo os fosfolípidos e fosfatidilserina (Speelmans *et al.*, 1997).

6.2.3. Hidrólise da cisplatina no interior da célula

Ao entrar na célula o composto de platina sofre sucessivas reações de substituição dos íons cloro por moléculas de água, formando espécies reativas monohidratadas $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$ ou dihidratadas $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ (Cepeda *et al.*, 2007; Klein e Hambley, 2009).

Acredita-se que a hidrólise da cisplatina seja o passo determinante da sua ativação, permitindo a reação da molécula com os alvos celulares, particularmente com o DNA, que finalmente desencadeia a parada do ciclo celular ou a apoptose (Kelland, 2007; Ahmad, 2010). Estudos relatam que as espécies de cisplatina hidrolisadas reagem preferencialmente com moléculas citoplasmáticas contendo altos níveis de enxofre em sua composição, tais como o tripeptídeo glutationa (GSH) e a metalotioneína (MT), que competem com o DNA pela cisplatina (Figura 5) (Cepeda *et al.*, 2007).

No citoplasma, a maior parte das ligações realizadas pela cisplatina ocorre com o GSH (Figura 5), que leva à formação do complexo Pt-GS, restando uma pequena fração que ultrapassa a membrana nuclear para se ligar ao DNA (Cepeda *et al.*, 2007). Porém, estudos apontam que a competição desses ligantes pela cisplatina é superada para que compostos suficientes de platina possam chegar ao DNA nuclear (Reedijk, 2009).

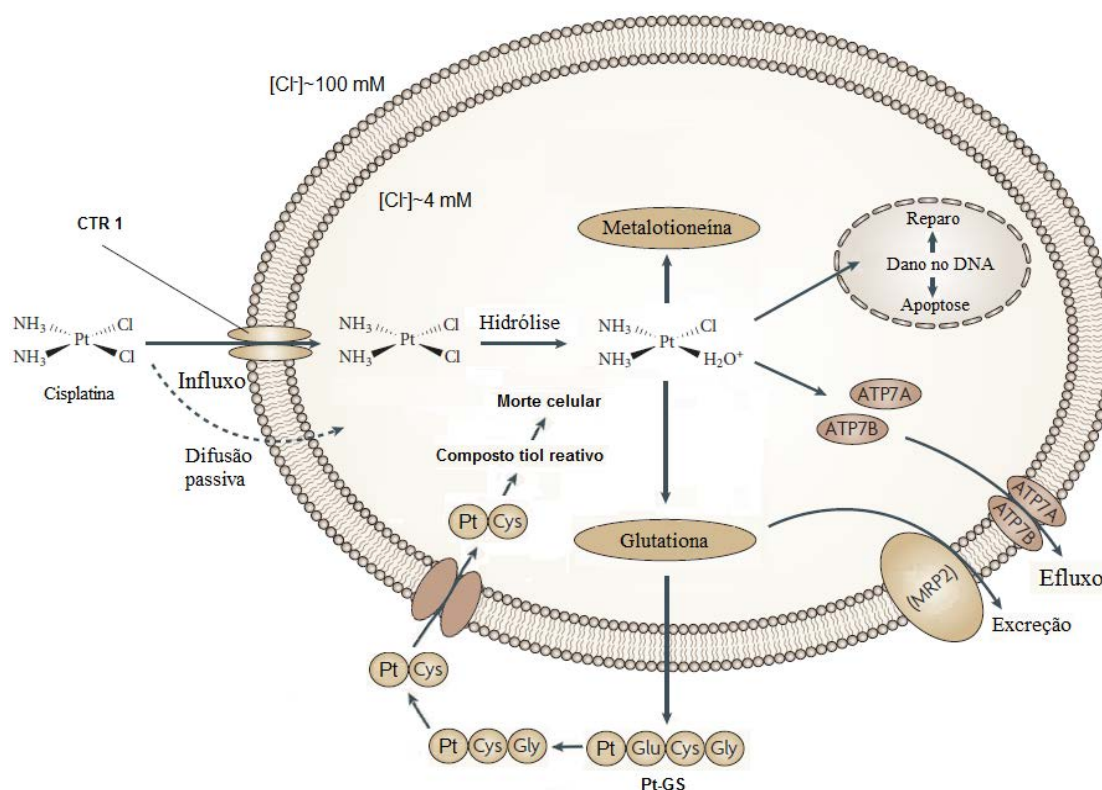


Figura 5: Percurso da cisplatina pelas células e suas ligações com componentes celulares. Fonte: Adaptado de Kelland, 2007.

6.2.4. Ligação da cisplatina ao DNA e outros alvos celulares

Uma vez no núcleo, o composto pode se ligar a várias moléculas, sendo o seu principal alvo biológico o DNA (Ahmad, 2010). Ele se liga de forma covalente aos átomos de nitrogênio da posição 7 (N7) das bases purinas (guanina e adenina), resultando na formação de adutos (Figura 4), sendo os principais os monofuncionais e os bifuncionais. Nos adutos monofuncionais, cada átomo de platina faz uma ligação com o DNA. Já nos bifuncionais, cada platina se liga a duas posições do DNA, podendo ocorrer na mesma fita (intrafita) ou em fitas diferentes (interfita) (Fontes *et al.*, 1997). Além das ligações intrafita e interfita, outro tipo de aduto bifuncional que também pode ser formado, porém em menor quantidade, é o intermolecular, no qual uma platina se liga ao DNA enquanto outra se liga a outras biomoléculas como, por exemplo, proteínas e aminoácidos (Figura 4) (Fontes *et al.*, 1997; Fuertes *et al.*, 2003; Cepeda *et al.*, 2007).

A formação dos adutos altera significativamente a estrutura do DNA, o que leva à torção da dupla hélice, fazendo com que o DNA seja reconhecido por várias proteínas celulares, dentre elas as proteínas envolvidas no mecanismo de reparo do DNA (Kelland, 2007).

6.2.5. Efluxo da cisplatina

Estudos têm demonstrado que transportadores de cobre tipo P adenosina trifosfatase (ATP7B), responsáveis pelo efluxo de cobre, possuem importante papel no efluxo da cisplatina e está associada à resistência *in vitro* da droga. Outras proteínas também envolvidas no efluxo a cisplatina são as bombas de efluxo MRP1 e MRP2, pertencentes à superfamília de “ATP-binding cassette” (ABC) (Figura 5) (Cepeda *et al.*, 2007).

6.2.6. Ação das enzimas DNA polimerase sobre os adutos de platina

As células de mamíferos saudáveis têm a capacidade de sintetizar o DNA através da atividade de enzimas polimerases. Entretanto, algumas dessas enzimas são capazes de replicar o DNA mesmo quando este possui danos em sua estrutura. Essa replicação ocorre através do processo denominado síntese de translesão (TLS), que depende da atividade das enzimas polimerases β , μ e η , tendo um importante papel na transmissão das propriedades mutagênicas da cisplatina (Albertella *et al.*, 2005).

6.3. Efeitos adversos da cisplatina

Apesar do seu sucesso terapêutico, a cisplatina, como a maioria dos quimioterápicos, pode apresentar efeitos tóxicos importantes, como ototoxicidade, hiperuricemia, toxicidade

gastrointestinal, neurotoxicidade e nefrotoxicidade, sendo as duas últimas consideradas dose limitantes (Cepeda, 2007; Ahmad, 2010; Rang *et al.*, 2011).

7. Efeitos da cisplatina no sistema genital masculino

Embora a utilização cisplatina apresente altos índices de cura contra o câncer testicular (Einhorn, 1990), dependendo da dose e do tempo de tratamento, pode resultar em vários efeitos adversos sobre o sistema genital masculino como, por exemplo, a indução de apoptose nas células germinativas, culminando em azoospermia ou oligospermia (Stephenson *et al.*, 1995).

A cisplatina pode se acumular nos testículos (Poirier *et al.*, 1992), ultrapassar a barreira hematotesticular (Meistrich *et al.*, 1982) e atingir principalmente as células germinativas, formando adutos. A formação desses adutos pode resultar na morte de células germinativas em diferentes estágios da espermatogênese (Huang *et al.*, 1990).

Atessahin *et al.* (2006) relataram que a administração de uma única dose de 7 mg/kg de cisplatina em ratos resultou na redução significativa da concentração e da motilidade dos espermatozoides, bem como no aumento das taxas de anormalidades espermáticas.

Estudos em ratos têm relatado que a cisplatina pode promover a redução na secreção de inibina B e transferrina pelas células de Sertoli, bem como a inibição da secreção de testosterona pelas células de Leydig (Carreau *et al.*, 1988; Monsees *et al.*, 2000; Yamaguchi *et al.*, 2008). Estudo *in vitro* também aponta que o tratamento agudo com cisplatina, em ratos, reduz a produção da proteína ligadora de andrógeno (ABP), lactato e estradiol pelas células de Sertoli de forma dose-dependente (Huang *et al.*, 1990).

A redução de células germinativas causada pelo tratamento com cisplatina pode resultar em infertilidade temporária, porém sabe-se que os túbulos seminíferos têm a capacidade de se repopular através das células-tronco germinativas remanescentes (Sawhney *et al.*, 2005). Entretanto, quando administrada em altas doses, os danos causados às gônadas podem ser severos e persistentes. Meistrich *et al.* (1989) constataram que, em homens, a infertilidade permanente causada pelo tratamento com altas doses de cisplatina pode estar relacionada à perda das células-tronco germinativas.

O uso prolongado da cisplatina também pode levar à redução ou depleção das células-tronco germinativas. Estudos em camundongos adultos expostos a 2,5 mg/Kg de cisplatina por cinco dias consecutivos, durante quatro semanas, apresentaram redução significativa de espermatogônias tronco, indicada pela ausência de células germinativas em 95% dos túbulos seminíferos (Sawhney *et al.*, 2005). A ausência de alguns estágios de células germinativas nos túbulos seminíferos por longo período, mesmo após o término do tratamento com cisplatina,

indica que há desregulação permanente da auto-renovação e diferenciação das células-tronco. A falha na recuperação completa das células germinativas pode estar relacionada aos danos causados nas células de Sertoli, uma vez que essas células, responsáveis pela manutenção da estrutura do túbulo seminífero e pela nutrição das células germinativas, não são capazes de sofrer renovação após a puberdade, o que pode dificultar o restabelecimento da espermatogênese (Sawhney *et al.*, 2005).

Estudos em roedores demonstram que a cisplatina é capaz alterar a integridade da cromatina de espermatozoides, bem como induzir aberrações cromossômicas na divisão de espermatogônias e de espermátócitos primários, apresentando efeito clastogênico (Adler e Tarras, 1989;1990; Delbes *et al.*, 2007).

Favareto *et al.* (2011b) demonstraram que ratos peri-púberes tratados com 1 mg/Kg/dia de cisplatina (3 ciclos de 5 dias) apresentaram, logo após o tratamento, alterações nos parâmetros reprodutivos, como redução da produção e reserva espermática, espermatozoides com movimento progressivo, diâmetro tubular, níveis de testosterona intratesticular e potencial de fertilidade, bem como aumento de perdas pré-implantação, número de túbulos seminíferos TUNEL-positivos e de espermatozoides imóveis. Além disso, foram observadas alterações no comportamento sexual e na histologia testicular, como túbulos seminíferos com poucas camadas de células germinativas, vacuolização nas células de Sertoli, células acidófilas com núcleos picnóticos e descamação de células germinativas imaturas. Essas alterações foram recuperadas na idade adulta, exceto a motilidade espermática e histopatologia testicular.

8. Efeitos da cisplatina no sistema genital feminino

As gônadas femininas, assim como outros órgãos com intensa proliferação celular, são importantes alvos de fármacos antitumorais, particularmente de compostos alquilantes, os quais podem causar alterações na morfologia ovariana (Gol'dberg e Borovskaya, 2003; Yucebilgin *et al.*, 2004). Os efeitos adversos sobre as gônadas causados pelo tratamento quimioterápico podem se apresentar como alterações ovarianas amenas ou levar à falência total dos ovários (Yeh *et al.*, 2006). Em humanos, a incidência da falência ovariana prematura em pacientes submetidos à quimioterapia é cerca de 40% (Singh *et al.*, 2005).

Entre as principais alterações histológicas observadas em animais experimentais após o tratamento com quimioterápicos estão edema intersticial, morte de células do epitélio folicular, degeneração do núcleo das células do ovócito, formação de cistos nos folículos e picnose e degradação de células do corpo lúteo (Gol'dberg e Borovskaya, 2003; Borovskaya *et al.*, 2004).

Yucebilgin e colaboradores (2004) demonstraram que ratas jovens tratadas com dose única de cisplatina apresentaram redução de folículos primordiais em aproximadamente 40%. Como as células dos folículos primordiais não são capazes de se regenerar, sua destruição pode resultar em disfunção ovariana, se manifestando como falência ovariana prematura ou infertilidade (Yucebilgin *et al.*, 2004).

Borovskaya *et al.* (2004) observaram que ratas *Wistar* tratadas com 4mg/Kg de cisplatina apresentaram alterações morfológicas nos ovários, com redução do número de elementos estruturais e funcionais, que foram acompanhados por prolongamento do ciclo estral e esterilidade reversível. A análise morfológica revelou edema intersticial, dilatação de vasos sanguíneos nos ovários, picnose e degradação das células do corpo lúteo, degradação do núcleo de ovócitos, organização anormal da granulosa de alguns folículos e da teca interna, bem como degradação do núcleo de células dos folículos primordiais, que foram reduzidas 25 a 35%. Também foi observada a formação de cistos de macrófagos em alguns folículos atresícos, que pode estar relacionada à fagocitose de células da superfície da camada granulosa (Borovskaya *et al.*, 2004).

Estudos apontam que, em roedores, o hormônio anti-mülleriano (HAM), responsável pela regressão dos ductos paramesonéfricos durante a diferenciação sexual masculina em fetos, também é produzido pelas células da granulosa dos folículos ovarianos, podendo servir como um marcador para a avaliação da reserva folicular (Durlinger *et al.*, 1999; Themmen, 2005). Em ratas adultas tratadas com 4,5 ou 6 mg/Kg de cisplatina, foi observado redução significativa do HAM circulante e da porcentagem de folículos HAM-positivos, além do aumento dose-dependente na porcentagem de cistos foliculares e de folículos com evidência de apoptose (Yeh *et al.*, 2006).

Yeh *et al.* (2009) relataram que o tratamento de ratas adultas com a cisplatina causa queda nos níveis de canais ativados por hiperpolarização (HCN), uma das classes de canais iônicos associadas à excitabilidade do coração e do cérebro, presentes também em diferentes células germinativas femininas (Whitaker *et al.*, 2007). A redução desses canais no ovário foi acompanhada por danos nos ovócitos, células antrais e células da teca folicular, o que sugere perda da função ovariana.

9. Efeitos da exposição paterna e materna à cisplatina sobre a prole

Apesar de a cisplatina ser capaz de causar danos ao DNA das células germinativas, estudos demonstram que roedores expostos ao fármaco podem manter sua capacidade de fertilização

resultando, porém, em efeitos adversos sobre a progênie (Hooser *et al.*, 2000; Favareto *et al.*, 2011a).

Em ratos submetidos a um tratamento subcrônico com cisplatina, na dose de 0,5 mg/Kg/dia, foi observada redução na contagem e na motilidade espermática de aproximadamente 60 e 50%, respectivamente, bem como redução no peso de órgãos reprodutores, na síntese de testosterona intratesticular e nos níveis séricos de testosterona e de hormônio luteinizante (LH), havendo aumento na perda pré e pós-implantacional dos fetos, bem como no número de malformações externas e retardo no crescimento fetal. Entre as principais malformações encontradas estão a onfalocele e o micrognatismo (hipoplasia mandibular). Além disso, foi observada a geração de fetos natimortos e alteração significativa na razão sexual da prole, havendo redução na proporção de fetos machos em relação às fêmeas (Seethalakshmi *et al.*, 1992).

Estudo com ratos adultos tratados durante nove semanas com 3 mg/Kg de cisplatina combinada com bleomicina (1,5 mg/Kg) e etoposido (15 mg/Kg) relatou redução significativa no peso dos testículos e epidídimo, bem como na contagem e motilidade espermática. Apesar dessas alterações, não foi observada redução significativa da fertilidade, porém, houve um aumento na mortalidade dos filhotes entre o nascimento e o dia pós-natal 2, o que pode estar associado ao atraso no parto (Bieber *et al.*, 2006).

Favareto *et al.* (2011a) relataram que ratos tratados com 1mg/Kg/dia de cisplatina (3 ciclos de 5 dias) e acasalados logo após o tratamento geraram prole masculina com atraso do trânsito espermático e da descida testicular, redução da glândula seminal cheia e aumento do número de espermatozoides na cabeça e corpo do epidídimo. Na prole masculina de animais acasalados 74 dias após o tratamento, persistiram apenas as alterações espermáticas.

Em estudos já foi demonstrado que a cisplatina também possui a capacidade de atravessar a placenta e se incorporar ao material genético de vários órgãos fetais. Giurgiovich *et al.* (1996) relataram que primatas *Erythrocebus patas* tratados com 0,315 mg/Kg de cisplatina durante a gestação apresentaram formação de adutos com o DNA do núcleo das células de órgãos fetais, como das glândulas adrenais, cérebro, rim, fígado, pele, baço e timo. Em outro estudo paralelo com ratas tratadas com 15 mg/Kg de cisplatina no dia gestacional 18, foi observada a formação de adutos entre a cisplatina e o DNA nuclear e mitocondrial do rim, fígado, pulmão e cérebro dos fetos, bem como na placenta. Em alguns órgãos, o nível de adutos observados no DNA mitocondrial foi de 2 a 50 vezes maior que o observado no DNA nuclear, o que sugere que a exposição transplacentar pode levar à toxicidade mitocondrial nos fetos (Giurgiovich *et al.*, 1997).

Estudos com roedores revelam que o tratamento materno com cisplatina durante a gestação também pode resultar em efeitos adversos sobre a prole, levando a embriotoxicidade e efeitos teratogênicos (Keller e Aggarwal, 1983). Furukawa *et al.* (2013) relataram que ratas expostas a 2 mg/Kg de cisplatina nos dias gestacionais 11 e 12 apresentaram redução significativa no peso dos fetos e placentas, bem como aumento na taxa de mortalidade fetal de aproximadamente 65%. Análises histopatológicas também evidenciaram indução de hipoplasia placentária, bem como aumento de apoptose de células das zonas labirinto e basal da placenta, o que pode estar associado ao baixo peso das placentas.

Pesquisas relatam que ratos e camundongos tratados com 3 mg/Kg de cisplatina durante a gestação apresentaram embriotoxicidade, evidenciada pelo aumento significativo na mortalidade dos fetos. Todas as ratas tratadas nos dias gestacionais 8 ou 11 apresentaram 100% de reabsorção fetal, enquanto que a frequência encontrada em camundongos tratados no dia gestacional 8 foi de 40,9%. Nos fetos que sobreviveram, foi observado aumento na incidência de malformações esqueléticas, incluindo a presença de costelas rudimentares e extras, além de fendas vertebrais (vértebras bipartidas em forma de haltere) (Keller e Aggarwal, 1983).

Em camundongos, a exposição à cisplatina em diferentes dias gestacionais, especialmente durante a organogênese, provocou embriofetividade e embriotoxicidade. Entre os efeitos observados estão a redução dose-dependente do tamanho das ninhadas e do peso corpóreo dos fetos, bem como retardo no processo de ossificação do esqueleto. Além disso, 10 a 20% dos fetos exibiram sinais de hidrocefalia quando a cisplatina foi administrada no dia gestacional 12 (Kopf-Maier *et al.*, 1985).

Justificativa

O câncer de testículo é um dos que mais acomete homens jovens e a cisplatina é um quimioterápico amplamente utilizado para o seu tratamento. Apesar da sua eficiência, este fármaco causa danos no DNA das células germinativas, podendo ser transmitidos às próximas gerações. São escassos os estudos que investigam a associação entre a exposição paterna à cisplatina e seus efeitos sobre o sistema genital da prole. O presente trabalho foi desenvolvido para investigar, em ratos, os efeitos do tratamento paterno com cisplatina, durante a peri-puberdade, sobre aspectos reprodutivos da prole feminina, tendo em vista a utilização da cisplatina nessa faixa etária, em seres humanos.

Objetivos

O objetivo fundamental do presente projeto foi analisar se a exposição paterna à cisplatina, durante a peri-puberdade pode causar efeitos adversos sobre o sistema genital e a função reprodutiva da prole feminina, em ratos.

Especificamente, a prole feminina foi utilizada para investigar:

- o número de células germinativas fetais;
- a idade de instalação da puberdade;
- na idade adulta, aspectos morfofuncionais do sistema genital feminino e a fertilidade.

Para tanto, ratos machos da linhagem Wistar, com 45 dias de idade, foram alocados em grupo controle, que recebeu solução salina (veículo), e tratado, que recebeu 1mg/Kg/dia de cisplatina diluída em veículo (n=10/grupo experimental), cinco dias por semana, durante três semanas, via intraperitoneal. Após o tratamento, os animais foram acasalados com fêmeas não tratadas para a avaliação dos seguintes parâmetros da prole feminina (F1): contagem de células germinativas no ovário fetal, distância ano-genital, número de aréolas/mamilos, idade de abertura vaginal (indicativa da instalação da puberdade) e do primeiro estro. Na idade adulta foram determinados os pesos de órgãos vitais e da reprodução, e realizadas dosagens hormonais, avaliação do ciclo estral, comportamento sexual, fertilidade, histologia ovariana e uterina e imunomarcção de receptores de estrógeno e progesterona no útero. Foram também determinadas as concentrações de platina no sangue dos ratos expostos, após o período de acasalamento.

O presente trabalho deu origem ao manuscrito “**SEXUAL DEVELOPMENT AND HISTOPHYSIOLOGY OF THE GENITAL SYSTEM OF THE FEMALE OFFSPRING OF MALE RATS EXPOSED TO CISPLATIN DURING PERI-PUBERTY**”, que foi submetido para publicação na revista Reproductive Toxicology, USA, Elsevier, ISSN:0890-0638, Fator de Impacto: 3,141.

SEXUAL DEVELOPMENT AND HISTOPHYSIOLOGY OF THE GENITAL SYSTEM OF THE FEMALE OFFSPRING OF MALE RATS EXPOSED TO CISPLATIN DURING PERI-PUBERTY

Patrícia Villela e Silva^a, Raquel Frenedoso da Silva^a, Cibele dos Santos Borges^a, Marília Martins Cavariani^a, Camila Contin Diniz de Almeida Francia^b, Fernando Barbosa Júnior^c, Wilma De Grava Kempinas^{a,*}

Departments of ^aMorphology and ^bAnatomy, Institute of Biosciences, UNESP – Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil.

^cDepartment of Clinical, Toxicological and Bromatological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, USP – University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

*Corresponding author:

Wilma De Grava Kempinas

Laboratory of Biology and Toxicology of Reproduction and Development

Department of Morphology, Institute of Biosciences of Botucatu

UNESP – Univ Estadual Paulista, 18618-970, Botucatu, SP, Brazil

Phone: +55 14 3880-0476, e-mail: kempinas@ibb.unesp.br

ABSTRACT

Cisplatin acts as a chemotherapeutic agent binding to the DNA, inducing tumor cell death. This drug also impairs spermatogenesis, since it can bind to germ cells. It has been demonstrated that DNA damage to spermatozoa can result in adverse effects in offspring resulting from those sperm. This study aimed to investigate the effects of paternal peripubertal treatment with cisplatin on the female rat sexual development and histophysiology of the F1 offspring. For this, 45 days old *Wistar* male rats were treated with 1 mg/Kg/day of cisplatin or vehicle (saline solution), for 3 weeks, 5 times per week. Results showed that paternal treatment with cisplatin promoted reduction in the estrous cycle length, FSH levels, fetal germ cell number, and an increase of antral follicles in the adult unexposed progeny, without affecting fertility. These results, in rats, suggest possible reproductive implications for young boys undergoing cancer therapy.

Keywords: cisplatin, female rat, reproductive toxicity, peri-puberty.

1. INTRODUCTION

Cancer is a leading cause of death worldwide and, in reproductive age, testicular cancer is one of the most common tumors that affect men, predominantly in young people between 15 and 35 years old [1]. Advances in multimodal treatment (surgery, chemotherapy and radiotherapy), have increased curing rates of tumors, particularly when performed soon after diagnosis [2].

Cisplatin (CP) is a metal complex of platinum widely used as a chemotherapeutic agent in the treatment of ovarian cancer, head and neck, bladder, colorectal and lung cancer [3-7]. Its ability to inhibit tumor growth is a result of several factors, including diffusion through the cell membrane, accumulation in the cells and the binding to tumor cell DNA, generating adducts [8]. Its application in chemotherapy shows high cure rates of testicular cancer [9, 10], however, the therapeutic success has been accompanied by several adverse effects, including nephrotoxicity, neurotoxicity, ototoxicity and abnormal spermatogenesis [11, 12].

The formation of covalent bonds with DNA affects fundamental cellular processes, inducing tumor cell apoptosis [13]. Despite the efficiency in curing cancer, cisplatin can also form adducts with DNA of germ cells, resulting in azoospermia or oligospermia [14]. If not corrected by the system repair, the damage of sperm DNA can result in adverse effects in offspring [15]. Treatment of male *Wistar* rats with 0.5 mg/Kg/day of cisplatin for 9 weeks showed a prominent increase in pre and post-implantation losses of fetuses and a decrease in the male-to-female ratio of the offspring. It was also observed a significant number of fetuses with external malformations (omphalocele and micrognathia) and growth retardation among the offspring of cisplatin treated group [16].

Few studies investigated the association between paternal treatment with cisplatin and the reproductive system and fertility of the offspring. In a previous study from our laboratory we showed that the exposure of peri-pubertal male rats to 1mg/Kg/day of cisplatin resulted in adverse effects in the male offspring, evidenced by impairment of postnatal growth, delay in testicular descent, decrease in seminal gland weight and adverse effects in the spermatogenesis [17].

Thus, the present study aimed to investigate the possible adverse effects on reproductive development and function of female offspring from male rats exposed to cisplatin during peri-puberty.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals

Male (45 days old, n=38) and female (66 days old, n=38) *Wistar* rats were supplied by the Central Biotherium of UNESP - Univ Estadual Paulista and maintained in the Small Mammal Biotherium at the Department of Morphology, Institute of Biosciences, UNESP, Botucatu, SP, Brazil, under controlled conditions ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 30% air humidity, 12:12-h photoperiod) with food and water delivered *ad libitum*. The animals were housed in polypropylene cages ($43\text{cm} \times 30\text{cm} \times 15\text{cm}$) with laboratory-grade pine shavings as bedding. The experimental protocol followed the Ethical Principles in Animal Research of the Brazil College of Animal Experimentation and was approved by the Bioscience Institute/UNESP Ethics Committee for Animal Experimentation (protocol no 426-CEEA).

2.2. Experimental design and treatment

The male rats were randomly divided into two experimental groups: control group (n=20) that received saline solution 0.9% (vehicle) and the CP-treated group (n=18) which received 1mg/Kg/day of cisplatin (cisdiammineplatinum (II) dichloride, Sigma Chemical Co., P4394, St. Louis, USA) diluted in vehicle, by intraperitoneal injection. Dose and treatment regimen were selected based on clinical use of the drug on human chemotherapy for testicular cancer [18]. The clinical dose of cisplatin usually used in human (20 mg/m^2) was converted to rat doses by adjusting for body weight/surface area ratio [19], and a third of the rat dose was chosen, once the correspondent rat dose lead to pronounced mortality in the rats of a previously study in our laboratory [20]. The drug was administrated during peri-puberty, from postnatal day 45 (PND 45) until PND 63, 5 days per week, for 3 weeks (Figure 1).

The study was conducted in two steps. In experiment 1, naïve females were mated with males from control (n=10) and CP-treated (n=8) groups for the evaluation of the F1 offspring fetal ovaries and blood platinum (Pt) levels of male rats from experimental groups. In experiment 2, other naïve females were mated with males from the experimental groups (n=10/group) and were allowed to deliver the F1 offspring, whose postnatal female reproductive parameters were analyzed. In both experiments,

pregnancy was detected by vaginal smears analysis after mating, and the presence of spermatozoa was considered day 0 of gestation (GD 0).

2.3. Experiment 1

2.3.1. *Pt serum levels*

On PND 78, following the mating period, males from control (n=10) and CP-treated (n=8) were euthanized by CO₂ inhalation followed by decapitation and the blood was collected from the ruptured cervical vessels into tracemetals free tube containing K₂EDTA anticoagulant (BD Vacutainer[®]) for the determination of blood Pt levels, according to Batista *et al.* [21]. Measurement was performed using inductively coupled plasma–mass spectrometry (ICP-MS) (ELAN DRC II, Perkin Elmer, Norwalk, CT).

2.3.2. *Fetal ovaries*

Pregnant rats were euthanized in GD 20 by CO₂ inhalation followed by decapitation and the ovaries from the fetuses (n=5/group) were collected. The gonads were fixed in Karnovsky (2.5% glutaraldehyde, 8% paraformaldehyde), embedded in historesin, sectioned at 5 µm and stained with hematoxylin and eosin. Germ cells were counted in 3 sections per animal with 50 µm of distance among them and the results were expressed as germ cell number/area (germ cell number/mm²).

2.4. Experiment 2:

After the mating period, pregnant rats were weighed on alternate days from GD 0 until GD 20. The day of F1 pups' delivery was recorded in the females mated with control and CP treated rats.

2.4.1. *Anogenital distance and number of nipples/areolas*

On PND 1 the male and female offspring was weighed and the anogenital distance (AGD, the distance from the anus to the genital papilla) measured with a pachymeter and normalized by dividing AGD to the cube root of body weight [22]. The offspring was sexed and the number of pups per litter (litter size) and sex ratio (number of female pups/number of male pups × 100) were scored. Then, the offspring was reduced to eight pups per litter maintaining, preferentially, females. On PND 13, the number of nipples/areolas was counted by the examination of epidermis in the region of the nipples and scored based on the presence or absence of a nipple bud or a discoloration of the

skin surrounding the nipple [23]. On PND 22, the offspring was weaned, weighed and reduced to four females per litter. The male and female pups that were not used for the study were euthanized by CO₂ inhalation followed by decapitation

2.4.2. Postnatal growth

Both female and male pups from experimental groups were weighed in PND 1, PND 8, PND 13 and PND 22 for the evaluation of body weight gain of the litters until weaning.

2.4.3. Puberty onset

From PND 30, all females (n=4 females per litter) were evaluated daily for the complete vaginal opening (CVO), an external indicative of puberty installation in rats [24]. After the CVO, the vaginal lavage was collected daily for the determination of the occurrence of the first estrous, characterized by the predominance of cornified squamous epithelial cells.

2.4.4. Estrous cycle

From PND 60 and over a period of 15 days, vaginal lavage from both control and CP-treated groups (n=4 females per litter) was collected for the assessment of the estrous cyclicity as described by Marcondes *et al.* [25]. For this, each day at the same time, 10µL of saline solution was gently introduced into the rat vagina with an automatic pipettor and the fluid aspirated was placed on clean histological slides for analysis under a light microscope. The estrous cycle phases were classified based on the proportion of cellular types from the vaginal smear: proestrous (predominance of nucleated epithelial cells), estrous (predominance of anucleated cornified cells), metaestrous (the same proportion among leukocytes, cornified, and nucleated epithelial cells) and diestrous (predominance of leukocytes). Data of each animal were used to calculate the frequency of the phases (number of days in each phase), cycle length (number of days from the beginning to the end of each estrous cycle) and number of cycles of the litters.

2.4.5. Blood and collection of organs

In the first estrous after PDN 75, one female per litter from control (n=10) and CP-treated (n=7) groups, was weighed and euthanized by CO₂ inhalation followed by

decapitation. Blood was collected from the ruptured cervical vessels for the determination of sexual hormonal levels as described below. Liver, kidney, pituitary, ovaries, uterus (with fluid) and adrenal glands were removed and their weight (absolute and relative to body weights) were recorded. The reproductive organs were fixed in Bouin (75% saturated picric acid solution, 25% formaldehyde and 5% acetic acid) for subsequent histological and immunohistochemical analysis.

2.4.6. Histological analysis of reproductive organs

After collected and fixed in Bouin, ovary and right uterine horn were processed and embedded in paraffin, sectioned at 5 μm , stained with hematoxylin and eosin and scanned for histomorphometric analysis with Pannoramic Viewer software.

The ovarian structures (corpora lutea and follicles) were counted in one section per animal. Classification of the follicles was based on the different stages of follicular development, the morphology of the follicles and the number of layers of granulosa cells according to Borgeest *et al.* [26] and Talsness *et al.* [27]. Follicles were classified as primordial when the oocytes were surrounded by a single layer of squamous cells, while primary follicles were surrounded by a single layer of cuboidal epithelial cells. Preantral follicles were characterized by oocytes surrounded by more than one layer of granulosa cells with no antral space. Antral follicles were classified when containing three or more layers of granulosa cells and a clearly defined antral space. Follicles were considered atretic if they presented pyknotic granulosa cells, disorganized granulosa cells, degenerating oocyte and detachment from the basement membrane. These follicles and corpora lutea are expressed as percentages of the total number of ovarian structures [28].

In right uterine horns, height of the luminal epithelium and thickness of the endometrium (μm) were measured in five different regions of three sections per animal.

2.4.7. Immunohistochemistry

After collected and fixed in Bouin, the left uterine horns were dehydrated in ethanol, embedded in paraplast and serial transverse sections (5 μm) were mounted on silanized slides for immunohistochemical detection of the ER α and PR proteins expression, using the polymer system (MACH 4 Universal HRP polymer Detection, Biocare, CA, USA).

The slides were deparaffinized in xylene and rehydrated in decreased concentrations of ethanol followed by antigen recovery with citrate buffer (0.01 M, pH 6.0) in a Pascal

Pressure Chamber (Dako Cytomation Denmark A/S) at 1200°C for 5 min. After that, the sections were allowed to cool down to room temperature, washed three times in phosphate-buffered saline (PBS), incubated in 3% of H₂O₂ diluted in PBS for 10 min to block endogenous peroxidase activity, rinsed again, incubated in nonfat milk for 60 min and finally incubated overnight at 4°C with mouse monoclonal anti-ER- α (6F11, 1:50 dilution, Biocare Medical, USA) or rabbit polyclonal anti-PR (sc-538, 1:50 dilution, Santa Cruz Biotechnology, USA).

Following three 5 min washes in PBS and incubation in mouse probe and HRP polymer for 10 min each in room temperature, the peroxidase activity was revealed using the 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride chromogen (DAB, Sigma-Aldrich Co., USA) for 10 min at room temperature. The slides were counterstained with Harris haematoxylin, dehydrated in ethanol, cleared with xylene and mounted with Permount.

The PR expression in the uterine luminal epithelium was quantitatively assessed, while ER α expression was semi-quantitatively assessed by manual scoring, based on the intensity of the DAB reaction product. The staining intensity was arbitrarily graded on a scale of (0) no visible staining, (1) low intensity of staining and (2) high intensity of staining, based on Markey *et al.* [29] with adaptations. Ten different randomly-selected areas (40x magnification) from one transverse section of each sample were observed in the light microscope Leica DMLB and scanned in the image analyzer Leica Q-win software version 3.1 for Windows TM to perform the cell counts.

To measure the percentage of stained cells that expressed ER α , the number of cells from each intensity was divided by the total number of counted cells.

2.4.8. Serum hormone levels

The blood collected from the females euthanized in the first estrous after PDN 75 was centrifuged at 4°C for 20 minutes at 2400 rpm and the serum collected was stored at -20°C until analysis. Serum concentrations of estradiol, progesterone, follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) were measured by a double-antibody radioimmunoassay (RIA). Plasma FSH and LH concentrations were performed using specific kits supplied by the National Institute of Arthritis, Diabetes and Kidney Diseases (NIADDK, USA), while estradiol and progesterone concentrations were determined using MAIA kits provided by Biochem Immunosystems (Bologna, Italy). The intra-assay coefficient of variation was 3.4% for LH, 2.8% for FSH, 4.3% for

estradiol and 7.5% for progesterone. All samples were dosed in duplicate in the same assay to avoid inter-assay errors.

2.4.9. Sexual behavior

Adult F1 females from control (n=10) and CP-treated groups (n=7), one female per litter, were used for the mating test. For this, after nine days of acclimation in the inverted dark cycle and during the first proestrous phase after PND 84, the females were introduced in the cage of a sexually experienced male which were allowed to mount ten times on the female. In each mount, the presence or absence of lordosis was recorded and the results were expressed as lordosis quotient (LQ; number of lordosis/ ten mounts x 100).

2.4.10. Fertility

Immediately after sexual behavior test, the same F1 females were evaluated for fertility. For this, they were maintained with the same male for 4 hours and, after that, vaginal smears were collected, examined and presence of spermatozoa was considered GD 0.

On GD 20, pregnant females were euthanized by CO₂ inhalation followed by decapitation. The uterus and ovaries were collected and the number of corpora lutea, implantation sites (implants), early or late resorptions, live fetuses and fetal weights were recorded for subsequent determination of the following fertility parameters: gestational rate: number of pregnant females/number of inseminated females $\times$ 100; implantation rate (efficiency of implantation): implantation sites/corpora lutea $\times$ 100; pre-implantation loss rate: number of corpora lutea – number of implantations/number of corpora lutea $\times$ 100; post-implantation loss rate: number of implantations – number of live fetuses/number of implantations $\times$ 100; sex ratio: number of female fetuses/number of male fetuses $\times$ 100 [30].

2.5. Statistical analysis

Data are presented as mean $\pm$ standard error of mean (SEM) or median and interquartil range. Student's t-test was used for comparison of parametric variables. Nonparametric variables were compared by Mann-Whitney test. Chi-square test was utilized for comparison of the gestational rate between groups. Differences were

considered significant when $p < 0.05$. The statistical analyses were performed by GraphPad InStat (version 5).

3. RESULTS

3.1. Experiment 1

From the 10th day until the end of the treatment, significant reduction of body weight was observed in CP-treated group (Figure 2). The serum levels of Pt ($\mu\text{g/L}$, mean $\pm$ SEM, Mann-Whitney test) in males euthanized on PND 78 was significantly increased ($p < 0.001$) in CP-treated group ($2,411.00 \pm 146.50$) when compared to control group (0.30 ± 0.25).

Gestational rate of CP-treated group was significantly reduced (62.5%, 5 pregnant in 8 inseminated) when compared to control group (100%, $p < 0.05$, Chi-square test). There was a significant decrease in the number of germ cells per ovarian area of female fetuses of CP-treated group when compared to the control group (Figure 3).

3.2. Experiment 2

All sperm-positive females mated with males of the control group had a successful pregnancy, whereas in the treated group, the gestational rate was 80% (8 pregnant in 10 inseminated, $p > 0.05$). During pregnancy, no statistical difference was observed in the body weight gain of the pregnant females mated with males from experimental groups (data not shown). In general, pregnant females delivered pups on GD 21 or GD 22, except one female from CP-treated group that gave birth to six stillborn fetuses on GD 23 and presented 10 uterine resorption sites.

The absolute and relative AGD of the offspring, as well as the litter size and sex ratio were similar between experimental groups (Table 1). On PND 1, there was a decrease in the body weight of the offspring from CP-treated rats, which was not persistent thereafter (data not shown).

Evaluation of the age of CVO, first estrous and analysis of the number of nipples showed that paternal treatment with cisplatin did not interfere with these parameters (Table 2).

There was a significant decrease in the estrous cycle length in the offspring of CP-treated group (Table 3).

The absolute and relative organ weights of the female offspring euthanized on the first estrous after PDN 75 were similar between groups (Table 4). In contrast,

assessment of the hormonal levels revealed that FSH serum concentrations were significantly reduced in CP-treated group (Figure 4).

Histological analysis of the ovary and uterus did not evidence structural alterations due to CP paternal treatment. The height of the uterine luminal epithelium (control= 38.70 ± 1.13 ; CP= 38.92 ± 1.88 , Mann-Whitney test, $p > 0.05$) and thickness of the endometrium (control= 369.60 ± 42.56 ; CP= 419.40 ± 28.09 , Mann-Whitney test, $p > 0.05$) were also comparable between groups. On the other hand, assessment of the ovarian structures (follicles and corpora lutea) showed a significant increase in the percentage of antral follicles (Figure 5) in the CP-treated group.

Immunohistochemical analysis of the right uterine horns revealed no difference in the ER α and PR proteins expression pattern on the luminal epithelium in CP-treated group when compared to control group (Figures 6 and 7). Semi-quantitative analysis of the ER α expression showed no statistical difference between groups (Table 5).

In the first proestrous after PND 84, no statistical difference between the female offspring of experimental groups was observed in sexual behavior test, calculated by lordosis quotient (data not shown). Fertility test showed no alterations in the female offspring of CP-treated group when compared to the control group (Table 6).

4. DISCUSSION

Currently there are several studies in the literature demonstrating the direct effects of CP exposure on male and female genital systems [31-33]. However, few of them have reported the effects of paternal exposure to the drug on the reproductive system and fertility of the offspring. In a previous work [17] we demonstrated, in the male offspring of male rats exposed to cisplatin at peri-puberty, impairment of postnatal growth, delay in testicular descent, decrease in seminal gland weight and adverse effects in the spermatogenesis. In the present study, carried out to evaluate the female offspring of male rats exposed to CP in the same experimental conditions, reproductive dysfunctions were also observed.

Peri-pubertal male rats treated with CP showed a significant increase of Pt blood concentration 15 days after the end of the treatment, when compared with control group, demonstrating the efficacy of the treatment. A significant decrease in body weight during the treatment period was also observed, as described in other experimental studies [16, 32], indicating possible systemic toxicity. Tsavaris *et al.* [34] reported that patients undergoing chemotherapy with CP present frequent incidence of nausea and

emesis, what can lead to a decrease in body weight and may explain the decrease of body weight of animals exposed to CP in the present study.

Despite the known ability of CP to bind to the DNA, to induce apoptosis in the germ cells and lead to azoospermia or oligospermia [14, 35], in Experiments 1 and 2 the gestational rates were lower in the females mated with the treated males, compared with the control group. One female from CP-treated group delivered stillbirth offspring on GD 23. This decreased fertility and delay in the delivery day was also observed in previous studies [16, 17]. Nevertheless, in the present study the body weight gain of the pregnant females during gestation period was comparable between experimental groups.

The litter size as well as the absolute and relative anogenital distance at PND 1 were comparable between the offspring from experimental groups corroborating the results of Bieber *et al.* [31] and Favareto *et al.* [17]. Female offspring of the CP-treated group showed a significant decrease in the body weight on PND 1, which was recovered thereafter. Bieber *et al.* [31] has also observed no changes in body weight of the offspring from mice treated for 6 and 9 weeks with BEP cocktail (1.5 mg/kg of bleomycin, 15.0 mg/kg of etoposide and 3.0 mg/kg of CP).

Puberty in mammals is timed by the increase in gonadotropin-releasing-hormone (GnRH) secretion [36]. The maturation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, specifically the pulsatile release of GnRH from the hypothalamus, is necessary for normal puberty development, since this hormone promotes gonadal steroidogenesis. In rats, the age of vaginal opening and first estrous are markers of puberty onset [24]. The estrous cycle in these animals begins immediately after the vaginal opening, which occurs around PND 32 and PND 36 [37]. In the present study, no changes were observed in the age of vaginal opening and first estrous, as well as the number of nipples, indicating that puberty onset was not affected by paternal exposure to CP.

FSH is the most important hormone that stimulates follicular development in post-pubertal mammals and represents an important indicative of follicular reserve in the ovaries. However, it is only in the last stages of maturation that follicles are under control of this hormone [38]. The secretion of FSH, in turn, is regulated by the levels of estradiol, which is synthesized by the granulosa cells of the follicles [38]. In the present study, female offspring of CP-treated group showed a significant decrease in the serum concentration of FSH. In contrast, the levels of estradiol showed a trend to increase, which suggests negative feedback of this hormone on gonadotrophin secretions, explaining, at least in part, the lower levels of FSH. Despite the fact that no gross

structural damage was found in the ovaries and uterus of the female offspring, the histomorphometric assessment of the ovarian structures in adult female offspring revealed a significant increase of antral follicles in CP-treated group, which may explain the tendency to increase in estradiol serum levels observed in this group. Uterine receptors for estrogen and progesterone were not altered by paternal CP treatment, as revealed by immunohistochemistry.

The estrous cyclicity is an important parameter used in toxicological studies in order to indicate changes that may occur during the rat reproductive age. Female rats present four estrous cycle phases: proestrous, estrous, metestrous and diestrous. Each phase is characterized by the proportion of leukocytes and epithelial and cornified cells [25]. Since the onset of maturity until approximately 10-12 months of age, the average length of the estrous cycle is four to five days, although there may be some irregularities over this period [37]. In the present study, the length of the estrous cycles was significantly reduced in the offspring of CP-treated group when compared to control group. It is possible that the decrease in FSH levels contributed to shorten the estrous cycle length.

No significant changes were detected in vital and reproductive organ weights of the progeny due to paternal CP exposure. These data corroborate with Favareto *et al.* [17], who reported no difference in the organ weights of adult male offspring from male rats treated with CP at peri-puberty. In the same manner, there were no significant differences in sexual behavior and fertility, which indicates that paternal CP treatment did not interfere in the reproductive capacity of adult female offspring.

It is becoming established that DNA damage to spermatozoa can result in adverse effects in offspring resulting from those sperm [15]. In female mammals, the reproductive lifespan is determined by the pool of primordial follicles established during embryonic development, which represents the total population of available germ cells during their entire reproductive life [39]. Establishment of this cell population at birth is essential for reproductive success [40]. The histomorphometrical analysis of fetal ovaries revealed a decrease in the number of germ cells per ovarian area in the offspring of CP-treated group when compared to control group, indicating that paternal treatment with CP adversely affected the progeny ovary. However, as aforementioned, at adulthood the number of ovarian structures was not lower in the offspring of CP-treated rats.

In conclusion, our results revealed that paternal exposure to CP during peri-puberty interfered with the histophysiology of the female F1 offspring, as shown previously in the male offspring. It is suspected that sperm DNA adducts and/or mutations may be responsible for these effects, even though no specific studies have been performed herein to analyse sperm DNA integrity after CP treatment. Due to the efficiency of cisplatin as a chemotherapeutic agent, studies for the prevention of adverse reproductive effects of this drug are stimulated, in view of its important role as an anti-tumor agent.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP, Grant 2012/12970-1) and CAPES (Coordinating Body for the Improvement of Postgraduate Studies in Higher Education). The authors are grateful to José Eduardo Bozano for technical support, Dr. Janete Aparecida Anselmo-Franci and Ruither de Oliveira Gomes Carolino of the Department of Morphology, Stomatology and Physiology, Dental School of Ribeirão Preto, USP for the hormonal assays, Carlos César Ramos of the Department of Pathology, Botucatu Medicine School, UNESP for the scanning of histological slides and Dr. Luis Fernando Barbisan and Guilherme Ribeiro Romualdo of the Department of Morphology, Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP for the help in performing the immunohistochemical analyzes.

6. REFERENCES

- [1] Segal R. Surveillance programs for stage I nonseminomatous germ cell tumors of the testis. *Urol Oncol.* 2006;24:68-74.
- [2] Rosen A, Jayram G, Drazer M, Eggener SE. Global trends in testicular cancer incidence and mortality. *Eur Urol.* 2011;60:374-9.
- [3] Ikeda M, Matsumoto K, Niibe Y, Satoh T, Fujita T, Iwamura M, et al. The radiotherapy with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin treatment is an effective therapeutic option in patients with advanced or metastatic bladder cancer. *J Radiat Res.* 2011;52:674-9.
- [4] Park JY, Jin KL, Kim DY, Kim JH, Kim YM, Kim KR, et al. Surgical staging and adjuvant chemotherapy in the management of patients with adult granulosa cell tumors of the ovary. *Gynecol Oncol.* 2012;125:80-6.
- [5] Gilbert J, Rudek MA, Higgins MJ, Zhao M, Bienvenu S, Tsottles N, et al. A phase I trial of erlotinib and concurrent chemoradiotherapy for stage III and IV (M0) squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2012;18:1735-42.
- [6] Takara K, Fujita M, Minegaki T, Yamamoto K, Takahashi M, Yokoyama T, et al. Treatment schedule-dependent effect of 5-fluorouracil and platinum derivatives in colorectal cancer cells. *Eur J Pharm Sci.* 2012;45:272-81.

- [7] Gameiro SR, Caballero JA, Hodge JW. Defining the molecular signature of chemotherapy-mediated lung tumor phenotype modulation and increased susceptibility to T-cell killing. *Cancer Biother Radiopharm*. 2012;27:23-35.
- [8] Gabano E, Colangelo D, Ghezzi AR, Osella D. The influence of temperature on antiproliferative effects, cellular uptake and DNA platination of the clinically employed Pt(II)-drugs. *J Inorg Biochem*. 2008;102:629-35.
- [9] Einhorn LH. Treatment of testicular cancer: a new and improved model. *J Clin Oncol*. 1990;8:1777-81.
- [10] Einhorn LH, Foster RS. Bleomycin, etoposide, and cisplatin for three cycles compared with etoposide and cisplatin for four cycles in good-risk germ cell tumors: is there a preferred regimen? *J Clin Oncol*. 2006;24:2597-8; author reply 8-9.
- [11] Sawhney P, Giammona CJ, Meistrich ML, Richburg JH. Cisplatin-induced long-term failure of spermatogenesis in adult C57/Bl/6J mice. *J Androl*. 2005;26:136-45.
- [12] Erdem T, Bayindir T, Filiz A, Iraz M, Selimoglu E. The effect of resveratrol on the prevention of cisplatin ototoxicity. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2012;269:2185-8.
- [13] Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev*. 1999;99:2467-98.
- [14] Lutzker SG, Barnard NJ. Testicular germ cell tumors: molecular understanding and clinical implications. *Mol Med Today*. 1998;4:404-11.
- [15] Hooser SB, van Dijk-Knijnenburg WC, Waalkens-Berendsen ID, Smits-van Prooije AE, Snoeiij NJ, Baan RA, et al. Cisplatin-DNA adduct formation in rat spermatozoa and its effect on fetal development. *Cancer Lett*. 2000;151:71-80.
- [16] Seethalakshmi L, Flores C, Kinkead T, Carboni AA, Malhotra RK, Menon M. Effects of subchronic treatment with cis-platinum on testicular function, fertility, pregnancy outcome, and progeny. *J Androl*. 1992;13:65-74.
- [17] Favareto AP, de Toledo FC, Kempinas Wde G. Paternal treatment with cisplatin impairs reproduction of adult male offspring in rats. *Reprod Toxicol*. 2011;32:425-33.
- [18] Benedetto P. Chemotherapy of Testis Cancer. *Cancer Control*. 1999;6:549-59.
- [19] Bachmann K, Pardoe D, White D. Scaling basic toxicokinetic parameters from rat to man. *Environ Health Perspect*. 1996;104:400-7.
- [20] Favareto AP, Fernandez CD, da Silva DA, Anselmo-Franci JA, Kempinas Wde G. Persistent impairment of testicular histology and sperm motility in adult rats treated with Cisplatin at peri-puberty. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011;109:85-96.
- [21] Batista BL, Rodrigues JL, Nunes JA, Souza VC, Barbosa F, Jr. Exploiting dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for sequential determination of trace elements in blood using a dilute-and-shoot procedure. *Anal Chim Acta*. 2009;639:13-8.
- [22] Gallavan RH, Jr., Holson JF, Stump DG, Knapp JF, Reynolds VL. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod Toxicol*. 1999;13:383-90.
- [23] Mylchreest E, Wallace DG, Cattley RC, Foster PM. Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to Di(n-butyl) phthalate during late gestation. *Toxicol Sci*. 2000;55:143-51.
- [24] Kinsey-Jones JS, Li XF, Knox AM, Lin YS, Milligan SR, Lightman SL, et al. Corticotrophin-releasing factor alters the timing of puberty in the female rat. *J Neuroendocrinol*. 2010;22:102-9.
- [25] Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*. 2002;62:609-14.
- [26] Borgeest C, Symonds D, Mayer LP, Hoyer PB, Flaws JA. Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse. *Toxicol Sci*. 2002;68:473-8.

- [27] Talsness CE, Shakibaei M, Kuriyama SN, Grande SW, Sterner-Kock A, Schnitker P, et al. Ultrastructural changes observed in rat ovaries following in utero and lactational exposure to low doses of a polybrominated flame retardant. *Toxicol Lett.* 2005;157:189-202.
- [28] Panwar S, Herrid M, Kauter KG, McFarlane JR. Effect of passive immunization against leptin on ovarian follicular development in prepubertal mice. *J Reprod Immunol.* 2012;96:19-24.
- [29] Markey CM, Wadia PR, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract. *Biol Reprod.* 2005;72:1344-51.
- [30] Nassr AC, Arena AC, Toledo FC, Bissacot DZ, Fernandez CD, Spinardi-Barbisan AL, et al. Effects of gestational and lactational fenvalerate exposure on immune and reproductive systems of male rats. *J Toxicol Environ Health A.* 2010;73:952-64.
- [31] Bieber AM, Marcon L, Hales BF, Robaire B. Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on the male rat reproductive system, spermatozoa, and fertility. *J Androl.* 2006;27:189-200.
- [32] Huang HF, Pogach LM, Nathan E, Giglio W. Acute and chronic effects of cisplatin upon testicular function in the rat. *J Androl.* 1990;11:436-45.
- [33] Yeh J, Kim B, Liang YJ, Peresie J. Mullerian inhibiting substance as a novel biomarker of cisplatin-induced ovarian damage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;348:337-44.
- [34] Tsavaris N, Kosmas C, Mylonakis N, Bacoyiannis C, Kalergis G, Vadiaka M, et al. Parameters that influence the outcome of nausea and emesis in cisplatin based chemotherapy. *Anticancer Res.* 2000;20:4777-83.
- [35] Leng M, Brabec V. DNA adducts of cisplatin, transplatin and platinum-intercalating drugs. *IARC Sci Publ.* 1994:339-48.
- [36] Nakahara T, Uenoyama Y, Iwase A, Oishi S, Nakamura S, Minabe S, et al. Chronic peripheral administration of kappa-opioid receptor antagonist advances puberty onset associated with acceleration of pulsatile luteinizing hormone secretion in female rats. *J Reprod Dev.* 2013;59:479-84.
- [37] Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2007;80:84-97.
- [38] Detti L, Uhlmann RA, Lu M, Diamond MP, Saed GM, Fletcher NM, et al. Serum markers of ovarian reserve and ovarian histology in adult mice treated with cyclophosphamide in pre-pubertal age. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30:1421-9.
- [39] Kezele P, Nilsson E, Skinner MK. Cell-cell interactions in primordial follicle assembly and development. *Front Biosci.* 2002;7:d1990-6.
- [40] Pepling ME. Follicular assembly: mechanisms of action. *Reproduction.* 2012;143:139-49.

7. CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that there are no conflicts of interest.

8. LEGENDS OF FIGURES

Figure 1. Experimental design and treatment. PND=postnatal day.

Figure 2. Body weight gain (g) of male rats from control (n=10) and CP-treated (n=8) groups during treatment period. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. Student's t-test. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

Figure 3. Number of germ cells per ovarian area (mm²) of female fetuses from control (n=5) and CP-treated (n=5) groups. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. Student's t-test. ** p <0.01.

Figure 4. Serum hormonal levels (ng/mL) of estradiol, progesterone, FSH and LH of female offspring from control (n=10) and CP-treated (n=7) groups on the first estrous after PND 75. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. Student t-test. * p <0.05.

Figure 5. Ovarian structures (follicles and corpora lutea) percentages from control (n=7) and CP-treated (n=7) groups. Values expressed as median (Q1-Q3). Mann-Whitney test. * p <0.05.

Figure 6. Immunostaining of ER α in adult female offspring uterus (at estrus phase) from control (A, B and C) and CP-treated groups (D, E and F). L=lumen; En=endometrium; Eg=endometrium gland; LE= luminal epithelium; Black arrows=not stained cells; Blue arrows=low intensity of staining; Red arrows=high intensity of staining.

Figure 7. Immunostaining of PR in adult female offspring uterus (at estrus phase) from control (A, B and C) and CP-treated groups (D, E and F). L=lumen; En=endometrium; Eg=endometrium gland; LE= luminal epithelium.

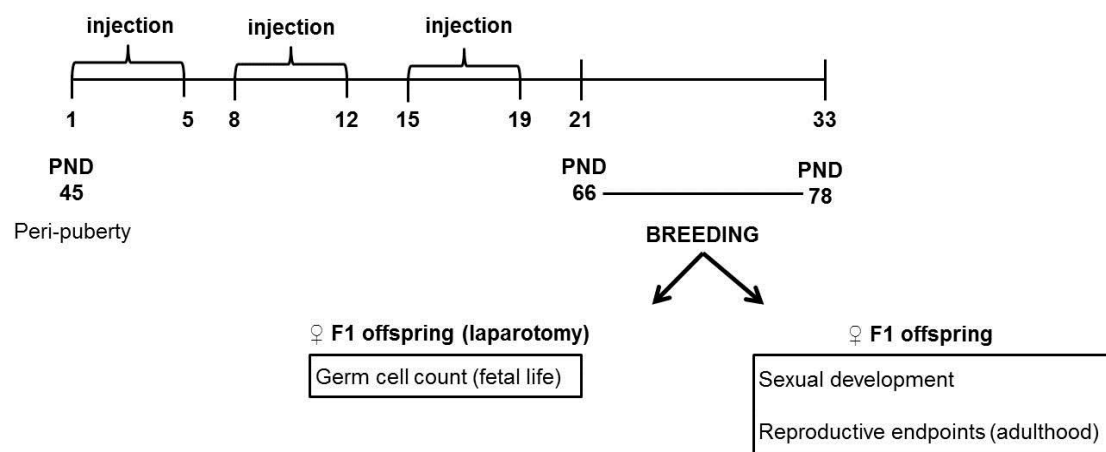
Figure 1

Figure 2

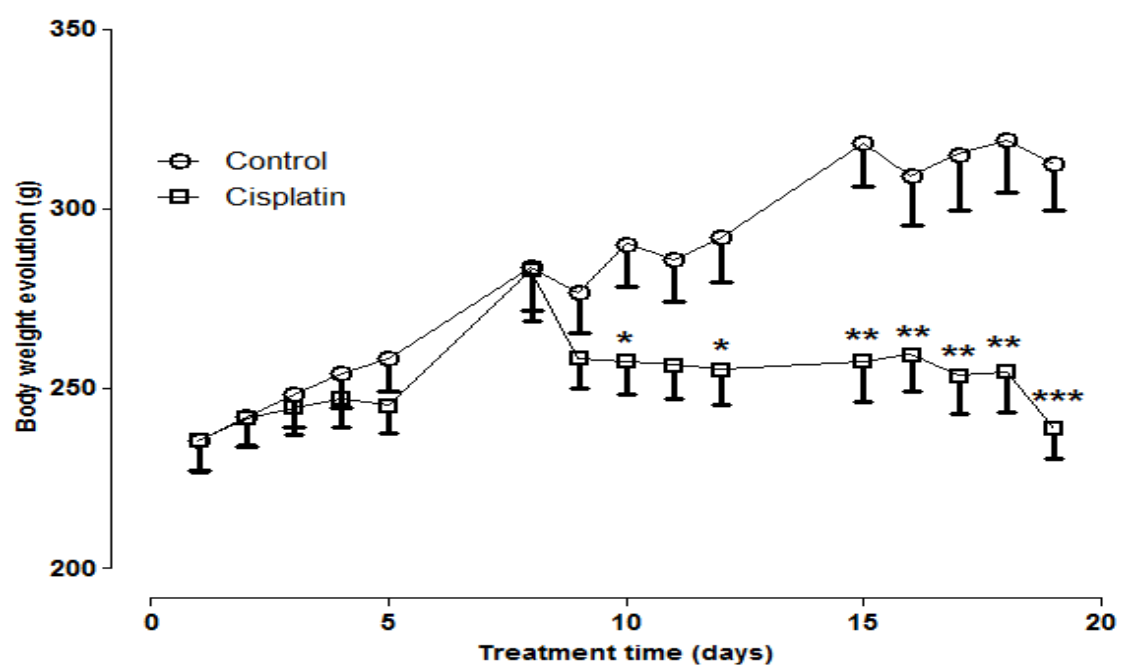


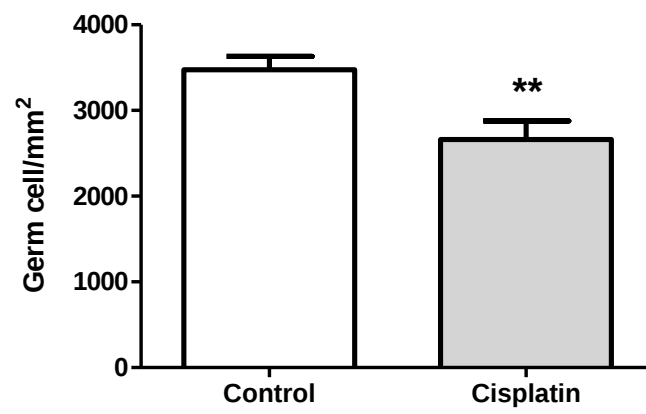
Figure 3

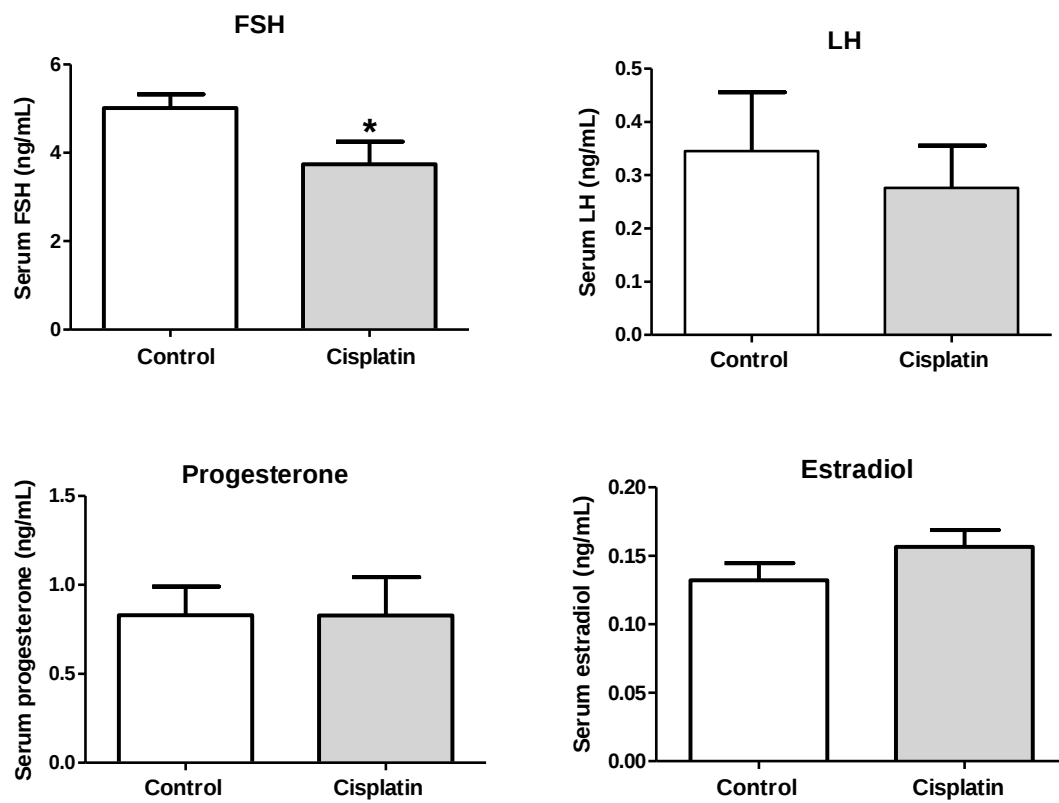
Figure 4

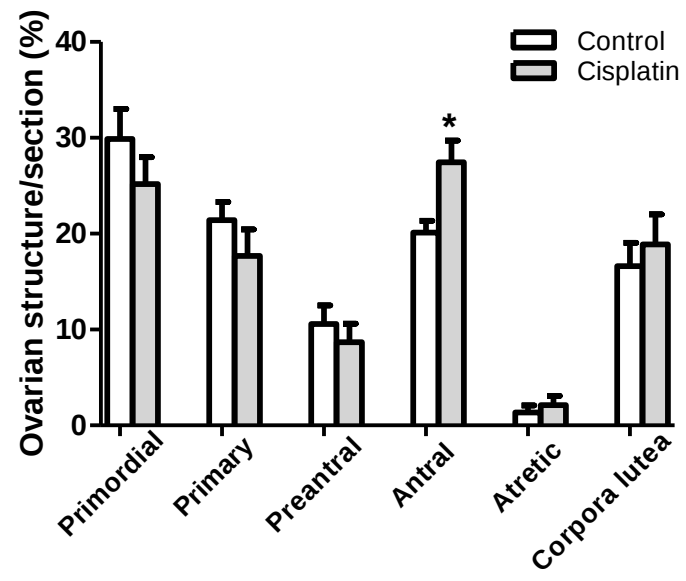
Figure 5

Figure 6

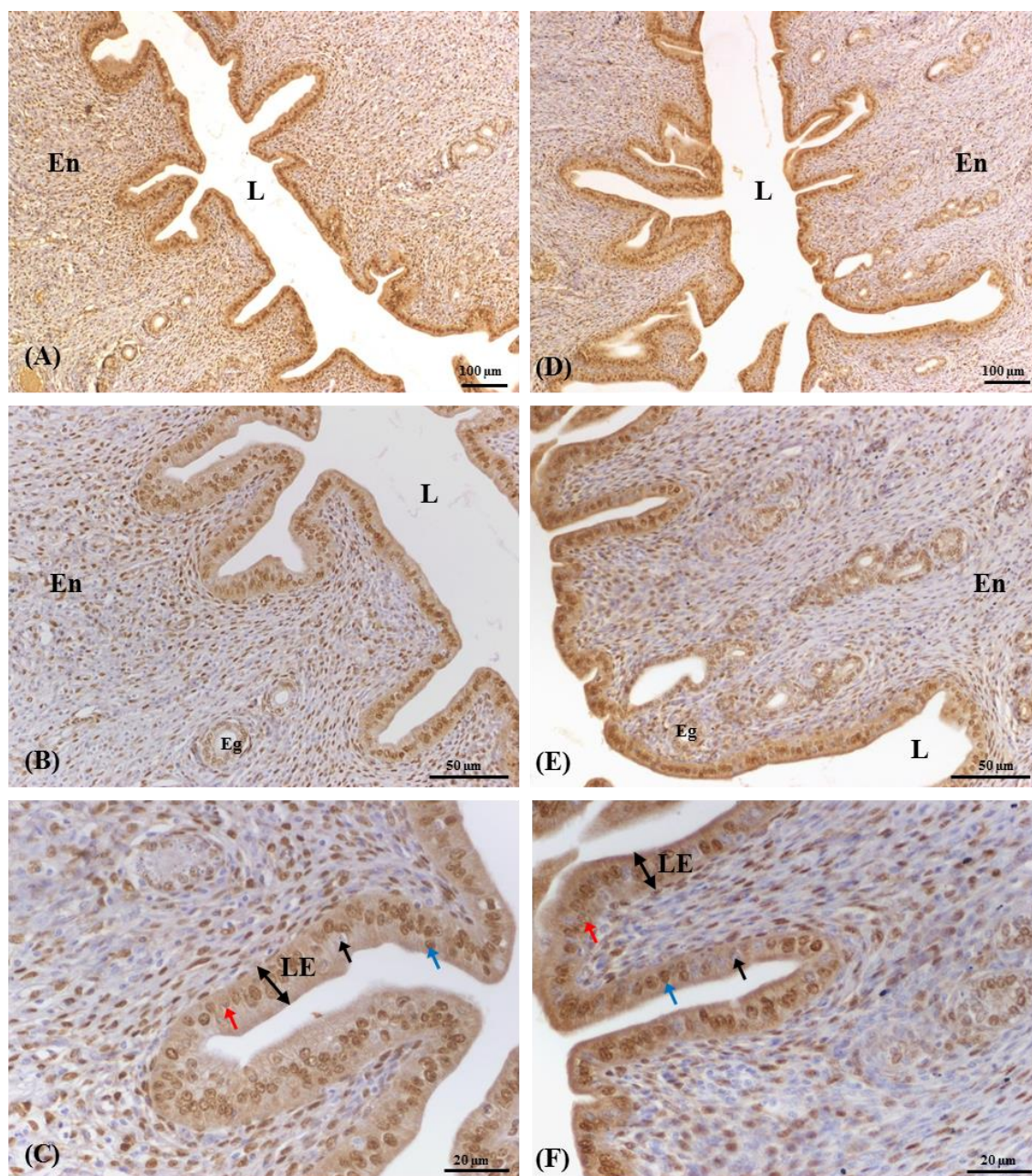


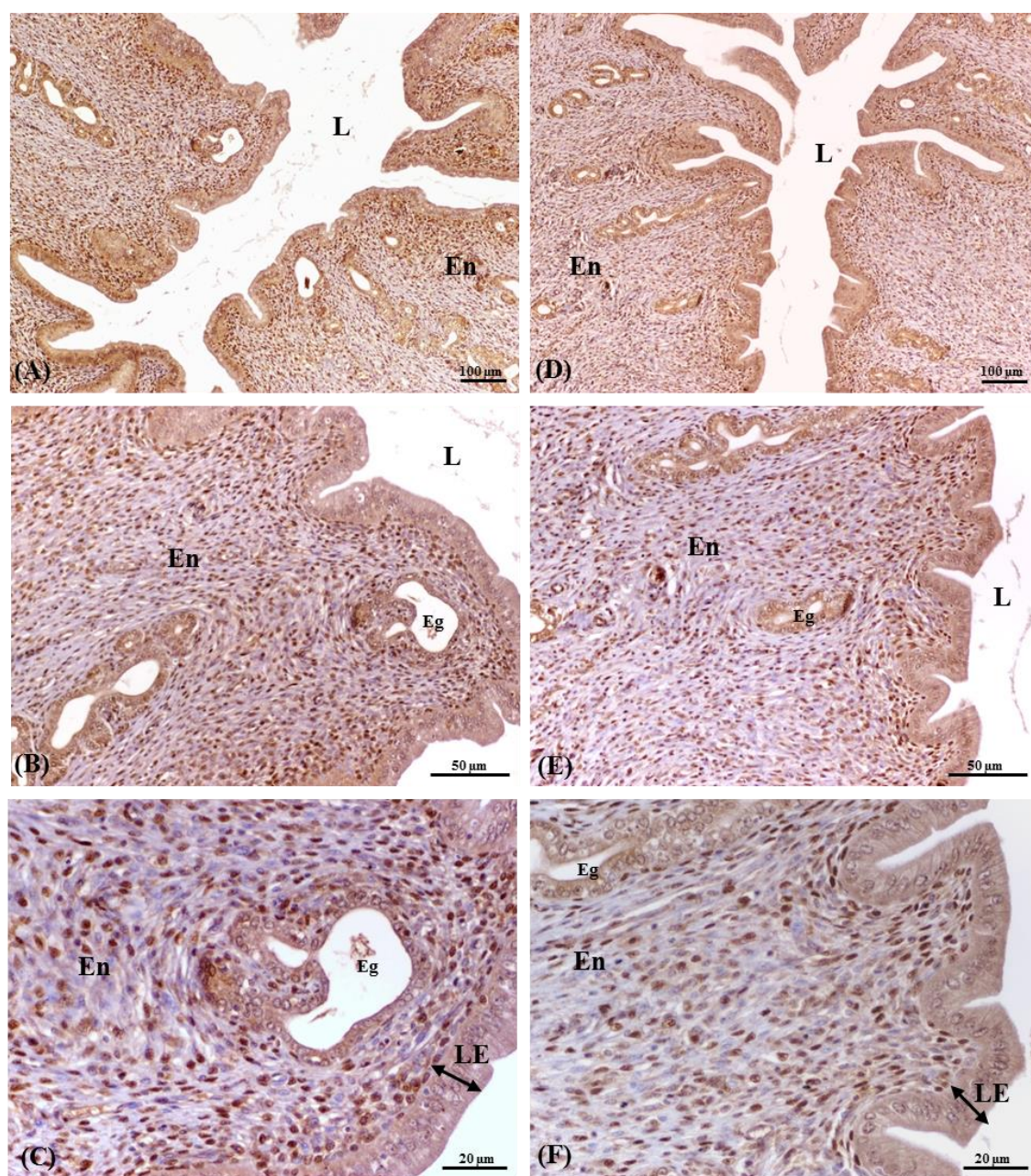
Figure 7

Table 1. Litter size, body weight and absolute and relative anogenital distance of the offspring from the control and CP-treated groups in PND 1.

Parameters	Control (n=10)	CP (n=7)
Number of pups	11.70 ± 0.56	11.57 ± 0.81
Female	5.80 ± 0.47	5.57 ± 0.43
Male	5.90 ± 0.41	6.00 ± 0.69
Sex ratio (%)	108.30(80.36-180.00)	100.00(85.71-133.30)
Absolute anogenital distance (mm)		
Female	2.43 ± 0.05	2.37 ± 0.06
Male	4.39 ± 0.08	4.39 ± 0.07
Relative anogenital distance (mm/g ^{1/3})		
Female	1.33 ± 0.04	1.29 ± 0.03
Male	2.29 ± 0.04	2.35 ± 0.03

Sample size (n) expressed in litters. Values are expressed as mean ± SEM. Student t-test. $p > 0.05$.

Table 2. Age of complete vaginal opening (CVO) and first estrous (FE), and number of nipples/areolas from control and CP-treated groups.

Parameters	Control (n=10)	CP (n=7)
CVO (days)	35.63 $\pm$ 0.87	35.04 $\pm$ 0.54
Body weight on CVO day (g)	114.00 $\pm$ 4.41	111.20 $\pm$ 5.10
FE (days)	37.40 $\pm$ 1.04	37.19 $\pm$ 0.78
Body weight on FE day (g)	123.00 $\pm$ 5.17	123.20 $\pm$ 4.67
Number of nipples/areolas	12.09 $\pm$ 0.04	12.21 $\pm$ 0.09

Sample size (n) expressed in litters. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. Student t-test. $p>0.05$.

Table 3. Assessment of estrous cycle regularity in the female offspring from control and CP-treated groups.

Parameters	Control (n=10)	CP (n=7)
Frequency of proestrous (days)	3.35 ± 0.15	2.96 ± 0.16
Frequency of estrous (days)	3.87 ± 0.11	3.54 ± 0.18
Frequency of metestrous (days)	4.60 ± 0.43	5.18 ± 0.38
Frequency of diestrous (days)	3.12 ± 0.46	3.25 ± 0.38
Number of cycles	2.82 ± 0.08	2.79 ± 0.18
Estrous cycle lenght (days)	4.21 ± 0.09	3.79 ± 0.08**

Sample size (n) expressed in litters. Values are expressed as mean ± SEM. Student t-test. ** $p < 0.01$.

Table 4. Relative and absolute organ weights of adult female offspring from control and CP-treated groups on the first estrous after PND 75.

Parameters	Control (n=10)	CP (n=7)
Body weight (g)	225.20 ± 6.98	215.10 ± 12.19
Absolute weights		
Uterus (mg)	407.80 ± 18.54	363.50 ± 25.26
Ovaries (mg)	88.06 ± 5.01	86.10 ± 5.99
Pituitary (mg)	12.65 ± 1.61	9.31 ± 0.87
Liver (g)	10.30 ± 0.16	9.49 ± 0.56
Kidneys (g)	1.73 ± 0.03	1.63 ± 0.09
Adrenal glands (mg)	7.50 ± 0.29	8.43 ± 0.74
Relative weights		
Uterus (mg/100g)	182.20 ± 8.68	168.50 ± 5.20
Ovaries (mg/100g)	39.63 ± 3.07	40.00 ± 1.40
Pituitary (mg/100g)	5.60 ± 0.61	4.30 ± 0.26
Liver (g/100g)	4.59 ± 0.13	4.43 ± 0.16
Kidneys (g/100g)	0.77 ± 0.25	0.76 ± 0.01
Adrenal glands (mg/100g)	3.35 ± 0.13	3.91 ± 0.26

Values are expressed as mean ± SEM. Student t-test. $p>0.05$.

Table 5. Percentages of luminal epithelial cells immunostained for ER α in female offspring from control (n=5) and CP-treated (n=5) groups.

Staining intensity	Control (n=5)	CP (n=5)
0 (%)	8.56 (6.53-12.56)	10.44 (9.02-12.83)
1 (%)	29.47 (23.48-34.97)	44.21 (19.02-52.76)
2 (%)	61.96 (57.21-65.25)	46.05 (36.86-69.16)

Values expressed as median (Q1-Q3). Mann-Whitney test. $p>0.05$.

Table 6. Fertility test of adult female offspring of control and CP-treated groups.

Parameters	Control (n=10)	CP (n=7)
¹ Gestational rate (%)	100	100
² Implantation rate (%)	94.44 (93.33-100.00)	92.86 (84.62-100.00)
³ Fetal weight (g)	3.40 ± 0.06	3.60 ± 0.14
³ Placenta weight (g)	0.53±0.15	0.51±0.01
³ Number of live fetuses	13.60 ± 0.43	11.14 ± 1.37
³ Number of corpora lutea	15.20 ± 0.61	14.57 ± 0.78
³ Number of implantations	14.50 ± 0.48	12.86 ± 0.70
³ Number of resorptions	0.90 ± 0.35	1.86 ± 0.86
² Sex ratio (%)	116.70 (49.17-170.00)	114.30 (55.56-225.00)
² Pre-implantation loss (%)	5.56 (0.00-6.67)	7.14 (0.00-15.38)
² Post-implantation loss (%)	3.33 (0.00-13.57)	9.09 (0.00-27.27)

Sample size (n) expressed in litters. ¹Chi-square test. ²Values expressed as median (Q1-Q3). Mann-Whitney test. ³Valores expressed as mean ± SEM. Student t-test. $p>0.05$.

Conclusões

Concluiu-se que a administração de cisplatina para ratos machos peri-púberes provocou alterações no desenvolvimento e histofisiologia do sistema genital da prole feminina adulta desses animais. Esses resultados experimentais, somados aos efeitos deletérios anteriormente obtidos na prole masculina, indicam um potencial risco reprodutivo da exposição à cisplatina para a espécie humana, considerando-se a utilização desse quimioterápico por meninos e adolescentes na peri-puberdade.

Referências bibliográficas da introdução

ADLER, D.; EL-TARRAS, A. Clastogenic effects of *cis*-diamminedichloroplatinum: I. Induction of chromosomal aberrations in somatic and germinal cells of mice. *Mutation Research*, v. 211, p. 131-137, 1989.

ADLER, D.; EL-TARRAS, A. Clastogenic effects of *cis*-diamminedichloroplatinum: II. Induction of chromosomal aberrations in primary spermatocytes and spermatogonial stem cells of mice. *Mutation Research*, v. 243, p. 173-178, 1990.

AHMAD, S. Platinum-DNA interactions subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes. *Chemistry & Biodiversity*, v. 7, p. 543-566, 2010.

AKINLOYE, A. K; OKE, B. O. Characterization of the Uterus and Mammary Glands of the Female African Giant Rats (*Cricetomys gambianus*, Waterhouse) in Nigeria. *International Journal of Morphology*, v. 28, p. 93-96, 2010.

ALBERTELLA, M. R.; GREEN, C. M.; LEHMANN, A. R.; O'CONNOR, M. J. A role for polymerase h in the cellular tolerance to cisplatin-induced damage. *Cancer Research*, v. 65, p. 9799, 2005.

ALLEGRI, P. R. Synopsis of the organ anatomy. In: KRINKE, G. J. *The laboratory rat*. San Diego: Academic Press, 2000. p. 283-319.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; FAVARETTO, A. L. V. Sistema reprodutor. In: AIRES, M. M. *Fisiologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 877-917.

ATESSAHIN, A.; KARAHAN, I.; TURK, G.; GUR, S.; YILMAZ, S.; CERIBASI, A. O. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reproductive Toxicology*, v. 21, p. 42-47, 2006.

BIEBER, A. M.; MARCON, L.; HALES, B. F.; ROBAIRE, B. Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on the male rat reproductive system, spermatozoa, and fertility. *Journal of Andrology*, v. 27, n. 2, p. 189-200, 2006.

BOROVSKAYA, T. T.; GOLDBERG, V. E.; FOMINA, T. I.; PAKHOMOVA, A. V.; KSENEVA, S. I.; POLUEKTOVA, M. E.; GOLDBERG, E. D. Morphological and functional state of rat ovaries in early and late periods after administration of platinum cytostatics. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v. 137, n. 4, p. 331-335, 2004.

CARREAU, S.; PAPADOPOULOS, V.; BOUJRAD, N.; DROSDOWSKY, M. A. Effects of cisplatin and bleomycin on mature Rat Leydig cell testosterone production. *Journal of Steroid Biochemistry*, v. 30, n. 1-6, p. 449-451, 1988.

CEPEDA, V.; FUERTES, M. A.; CASTILLA, J.; ALONSO, C.; QUEVEDO, C.; PÉREZ, J. M. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, v. 7, p. 3-18, 2007.

CLEGG, E. The age at which male rats become fertile. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 1, p. 119-20, 1960.

DELBES, G.; HALES, B. F.; ROBAIRE, B. Effects of the chemotherapy cocktail used to treat testicular cancer on sperm chromatin integrity. *Journal of Andrology*, v. 28, n. 2, p. 241-249, 2007.

DURLINGER, A. L. L.; KRAMER, P.; KARELS, B.; JONG, F.; UILENBROEK, J. T. J.; GROOTEGOED, A.; THEMMEN, A. P. N. Control of Primordial Follicle Recruitment by Anti-Müllerian Hormone in the Mouse Ovary. *Endocrinology*, v. 140, p. 5789-5796, 1999.

EINHORN, L. H. Treatment of testicular cancer: a new and improved model. *Journal of Clinical Oncology*, v. 8, n. 11, p. 1777-1781, 1990.

FAVARETO, A.P.A. Avaliação imediata e tardia da função reprodutiva e da progênie de ratos machos tratados com cisplatina durante a peri-puberdade. 2011. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

VIANNA, P.T.G. Efeitos da ketamina sobre a função renal e eletrólitos (sódio e potássio): estudo experimental no cão. 1971. 83f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1971.

FAVARETO, A. P. A.; TOLEDO, F. C.; KEMPINAS, W. G. Paternal treatment with cisplatin impairs reproduction of adult male offspring in rats. *Reproductive Toxicology*, v. 32, p. 425-433, 2011a.

FAVARETO, A. P. A.; FERNANDEZ, C. D. B.; SILVA, D. A. F.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; KEMPINAS, W. G. Persistent impairment of testicular histology and sperm motility in adult rats

treated with cisplatin at peri-puberty. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 109, p. 85-96, 2011b.

FONTES, A. P. S.; ALMEIDA, S. G.; NADER, L. A. Compostos de platina em quimioterapia do câncer. *Química Nova*, v. 20, n. 4, p. 398-406, 1997.

FUERTES, M. A.; ALONSO, C.; PÉREZ, J. M. Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chemical Reviews*, v. 103, n. 3, p. 645-662, 2003.

FURUKAWA, S.; HAYASHI, S.; USUDA, K.; ABE, M.; HAGIO, S.; OGAWA, I. Effect of cisplatin on rat placenta development. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 65, p. 211-217, 2013.

GABANO, E.; COLANGELO, D.; GHEZZI, A. R.; OSELLA, D. The influence of temperature on antiproliferative effects, cellular uptake and DNA platination of the clinically employed Pt(II)-drugs. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 102, p. 629-635, 2008.

GATELY, D. P.; HOWELL, S. B. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *British Journal Cancer*, v. 67, n. 6, p. 1171-1176, 1993.

GIURGIOVICH, A. J.; ANDERSON, L. M.; JONES, A. B.; DOVE, L. F.; MOSKAL, T. J.; RICE, J. M.; OLIVERO, O. A.; POIRIER, M. C. Transplacental cisplatin exposure induces persistent fetal mitochondrial and genomic dna damage in patas monkeys. *Reproductive Toxicology*, v. 11, n. 1, p. 95-100, 1996.

GIURGIOVICH, A. J.; DIWAN, B. A.; OLIVERO, O. A.; ANDERSON, L. M.; RICE, J. M.; POIRIER, M. C. Elevated mitochondrial cisplatin-DNA adduct levels in rat tissues after transplacental cisplatin exposure. *Carcinogenesis*, v. 18, n. 1, p. 93-96, 1997.

GOL'DBERG, E. E.; BOROVSKAYA, T. G. GONADOTOXIC Effects of antitumor preparations. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v. 135, n. 3, p. 211-217, 2003.

GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research (Part B)*, v. 80, p. 84-97, 2007.

GOLUB, M.S.; COLLMAN G.W.; FOSTER P.M.; KIMMEL C.A.; RAJPERT-DE MEYTS E.; REITER E.O. Public health implications of altered puberty timing. *Pediatrics*, v. 121, p. 218 – 230, 2008.

HANIGAN, M. H.; GALLAGHER, B. C.; TAYLOR, P. T.; LARGE, M. K. Inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase activity by acivicin in vivo protects the kidney from cisplatin-induced toxicity. *Cancer Research*, v. 54, p. 5925-5929, 1994.

HASCHEK, W.; ROUSSEAUX, C. G.; WALLIG, M. A. Female reproductive system. In: _____. *Fundamentals of toxicologic pathology*. San Diego: Academic Press, 2010. p. 599-631.

HEBEL, R.; STROMBERG, M. W. Female reproductive organs. In: _____. *Anatomy of the laboratory rat*. Baltimore: Waverly Press, 1976. p. 76-82.

HOOSER, S. B.; DIJK-KNIJNENBURG, W. C. M.; WAALKENS-BERENDSEN, I. D. H.; PROOIJE, A. E. S.; SNOEIJ, N. J.; BAAN, R. A.; FICHTINGER-SCHEPMAN, A. M. J. Cisplatin-DNA adduct formation in rat spermatozoa and its effect on fetal development. *Cancer Letters*, v. 151, p. 71-80, 2000.

HUANG, H. F. S.; POGACH, L. M.; NATHAN, A. E.; GIGLIO, W. Acute and chronic effects of cisplatin upon testicular function in the rat. *Journal of Andrology*, v. 11, n. 5, p. 436-445, 1990.

IKEDA, M.; MATSUMOTO, K.; NIIBE, Y.; SATOH, T.; FUJITA, T.; IWAMURA, M.; ISHIYAMA, H.; KOTANI, S.; HAYAKAWA, K.; BABA, S. The radiotherapy with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin treatment is an effective therapeutic option in patients with advanced or metastatic bladder cancer. *Journal of Radiation Research*, v. 52, p. 674-679, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. *Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. *Quimioterapia*. Rio de Janeiro: INCA, 2013. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101>. Acesso em: 4 jul. 2013.

JAMIESON, E. R.; LIPPARD, S. J. Structure, recognition, and processing of cisplatin-dna adducts. *Chemical Reviews*, v. 99, p. 2467-2498, 1999.

JOHNSON, L.; WELSH T.H.J.; WILKER C.E. Anatomy and physiology of the male reproductive system and potential targets of toxicants. In: Boekleheide K.; Chapin R.E.; Hoyer P.B.; Harris C. *Comprehensive toxicology*. 1. ed. Vol. 10. New York: Pergamon, 1997. p. 5-61.

JUNG, Y.; LIPPARD, S. J. direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chemical Reviews*, v. 107, n. 5, p. 1387-1407, 2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor feminino. In: _____. *Histologia básica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 431-451.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature*, v. 7, p. 573-584, 2007.

KELLER, K. A.; AGGARWAL, S. K. Embryotoxicity of cisplatin in rats and mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 69, p. 245-256, 1983.

KOPF-MAIER, P.; ERKENSWICK, P.; MERKER, H. J. Lack of severe malformations versus occurrence of marked embryotoxic effects after treatment of pregnant mice with cis-platinum. *Toxicology*, v. 34, p. 321-331, 1985.

LEBWOHL, D.; CANETTA, R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *European Journal of Cancer*, v. 34, n. 10, p. 1522-1534, 1998.

MAEDA, K-I.; OHKURA, S.; TSUKAMURA, H. Physiology of reproduction. In: KRINKE, G. J. *The laboratory rat*. San Diego: Academic Press, 2000. p. 145-176.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, v. 62, p. 609-614, 2002.

MEISTRICH, M. L.; CHAWLA, S. P.; DA CUNHA, M. F.; JOHNSON, S. L.; PLAGER, C.; PAPADOPOULOS, N. E.; LIPSHULTZ, L. I.; BENJAMIN, R. S. Recovery of sperm production after chemotherapy for osteosarcoma. *Cancer*, v. 63, p. 2115-2123, 1989.

MEISTRICH, M. L.; FINCH, M.; CUNHA, M. F.; HACKER, U.; AU, W. W. Damaging effects of fourteen chemotherapeutic drugs on mouse testis cells. *Cancer Research*, v. 42, p. 122-131, 1982.

MONSEES, T. K.; FRANZ, M.; GEBHARDT, S.; WINTERSTEIN, U.; SCHILL, W. -B.; HAYATPOUR, J. Sertoli cells as a target for reproductive hazards. *Andrologia*, v. 32, p. 239-246, 2000.

OHKURA, S.; TSUKAMURA, H.; MAEDA, K-I. Endocrinology. In: KRINKE, G. J. *The laboratory rat*. San Diego: Academic Press, 2000. p. 401-418.

OJEDA, S.R.; URBANSKI H.F. Puberty in the rat. In: Knobil E.; Neil J.D. *The physiology of reproduction*. 2. ed. V.1. New York: Raven Press, 1994. p. 365-409.

OLIVER, R.T. Testicular cancer. *Currentopinion in oncology*, v. 8, p. 252-258, 1996.

POIRIER, M. C.; REED, E.; LITTERST, C. L.; KATZ, D.; GUPTA-BURT, S. Persistence of platinum-ammine-DNA adducts in gonads and kidneys of rats and multiple tissues from cancer patients. *Cancer Research*, v. 52, p. 149-153, 1992.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. Fármacos anticâncer. In: _____. *Rang & Dale Farmacologia*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 673-688.

REEDIJK, J. Platinum anticancer coordination compounds: study of DNA binding inspires new drug design. *European Journal of Inorganic Chemistry*, v. 10, p. 1303-1312, 2009.

ROBB, G.W.; AMANN, R.P.; KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 54, p. 103-7, 1978.

ROSEN, A.; JAYRAM, G.; DRAZER, M.; EGGNER, S. E. Global trends in testicular cancer incidence and mortality. *European Urology*, v. 60, n. 2, p. 374-379, 2011.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; TROSKO, J. E.; MANSOUR, V. H. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*, v. 222, p. 385-386, 1969.

SAWHNEY, P.; GIAMMONA, C. J.; MEISTRICH, M. I.; RICHBURG, J. H. Cisplatin-induced long-term failure of spermatogenesis in adult C57/Bl/6J mice. *Journal of Andrology*, v. 26, n. 1, p. 136-145, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA. *Tumores do testículo: câncer urológico*. Rio de Janeiro: SBU, 2010. Disponível em: <<http://www.sbu.org.br/2010/03/tumores-do-testiculo>>. Acesso em: 15 fev. 2012.

SEETHALAKSHMI, L.; FLORES, C.; KINKEAD, T.; CARBONI, A. A.; MALHOTRA, R. K.; MENON, M. Effects of Subchronic Treatment with cis-platinum on testicular function, fertility, pregnancy outcome, and progeny. *Journal of Andrology*, v. 13, n. 1, p. 65-74, 1992.

SEGAL, R. Surveillance programs for stage I nonseminomatous germ cell tumors of the testis. *Urologic Oncology*, v. 24, n. 1, p. 68-74, 2006.

SINGH, K. L.; DAVIES, M.; CHATTERJEE, R. Fertility in female cancer survivors: pathophysiology, preservation and the role of ovarian reserve testing. *Human Reproduction Update*, v. 11, n. 1, p. 69-89, 2005.

SPEELMANS, G.; STAFFHORST, R. W. H. M.; VERSLUIS, K.; REEDIJK, J.; KRUIJFF, B. Cisplatin complexes with phosphatidylserine in membranes. *Biochemistry*, v. 36, p. 10545-10550, 1997.

STEPHENSON, H. T.; POIRIER, S. M.; RUBIN, L.; EINHORN, L. H. Evaluation of reproductive capacity in germ cell tumor patients following treatment with cisplatin, etoposide, and bleomycin. *Journal of Clinical Oncology*, v. 13, n. 9, p. 2278-2280, 1995.

THEMMEN, A. P. N. Anti-Müllerian Hormone: Its Role in Follicular Growth Initiation and Survival and as an Ovarian Reserve Marker. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, v. 34, p. 18-21, 2005.

WALKER JUNIOR, W. F.; HOMBERGER, D. G. Urogenital system. In: _____. *Anatomy & dissection of the rat*. 3. ed. Inglaterra: W.H. Freeman And Company, 1997. p. 65-78.

WHEATE, N. J.; WALKER, S.; CRAIG, G. E.; OUN, R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Transactions*, v. 39, n. 35, p. 8097-8340, 2010.

WHITAKER, G. M.; ANGOLI, D.; NAZZARI, H.; SHIGEMOTO, R.; ACCILI, E. A. HCN2 and HCN4 Isoforms Self-assemble and co-assemble with equal preference to form functional pacemaker channels. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 31, p. 22900-22909, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Cancer*. Geneva: WHO, 2013. Fact Sheet no. 297. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 01 jul. 2013.

WOZNIAK, K.; BLASIAK, J. Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts. *Acta Biochimica Polonica*, v. 49, n. 3, p. 583-596, 2002.

YAMAGUCHI, K.; ISHIKAWA, T.; KONDO, Y.; FUJISAWA, M. Cisplatin regulates sertoli cell expression of transferrin and interleukins. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 283, p. 68-75, 2008.

YEH, J.; KIM, B. S.; PERESIE, J.; PAGE, C. Declines in levels of Hyperpolarization-Activated Cation (HCN) channels in the rat ovary after cisplatin exposure. *Reproductive Sciences*, v. 16, p. 986-994, 2009.

YEH, J.; KIM, B.; LIANG, Y. J.; PERESIE, J. Mullerian inhibiting substance as a novel biomarker of cisplatin-induced ovarian damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 348, p. 337-344, 2006.

YUCEBILGIN, M. S.; TEREK, M. C.; OZSARAN, A.; AKERCAN, F.; ZEKIOGLU, O.; ISIK, E.; ERHAN, Y. Effect of chemotherapy on primordial follicular reserve of rat: An animal model of premature ovarian failure and infertility. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 44, p. 6-9, 2004.

ZANATO, V.F.; MARTINS, M.P.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; PETENUSCI, S.O.; LAMANO-CARVALHO, T.L. Sexual development of male Wistar rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 27, p. 1273-1280, 1994.

As figuras e tabela pertencentes a esta seção não foram inclusas no manuscrito, entretanto foram análises realizadas durante a execução do projeto de pesquisa que originou esta dissertação.

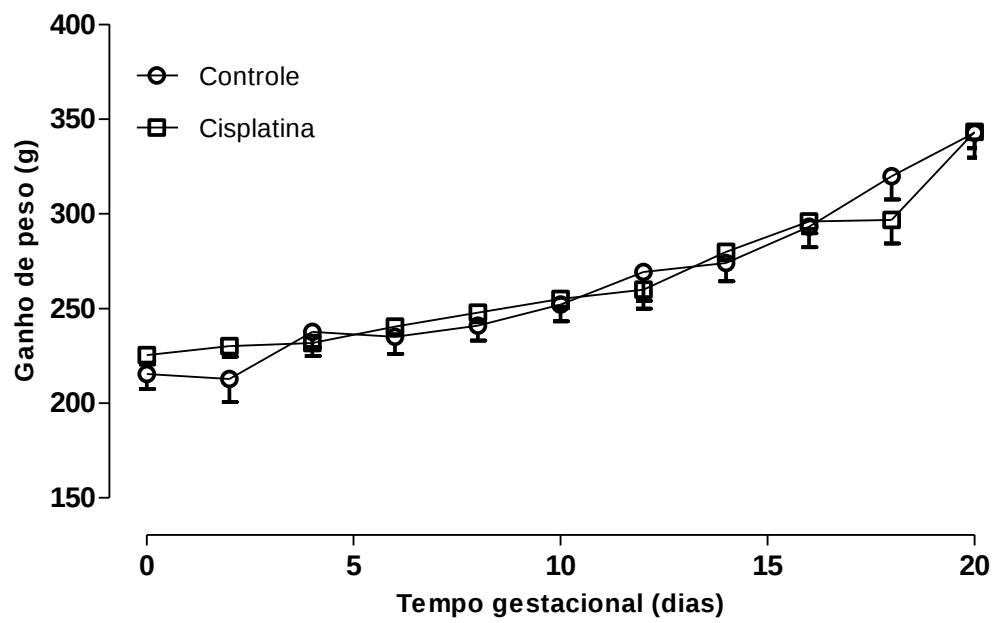


Figura 1. Evolução do peso corpóreo (g) das fêmeas prenhes acasaladas com animais do grupo controle (n=10) e tratado com cisplatina (n=8), do segundo experimento. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Teste t-Student. $p > 0,05$

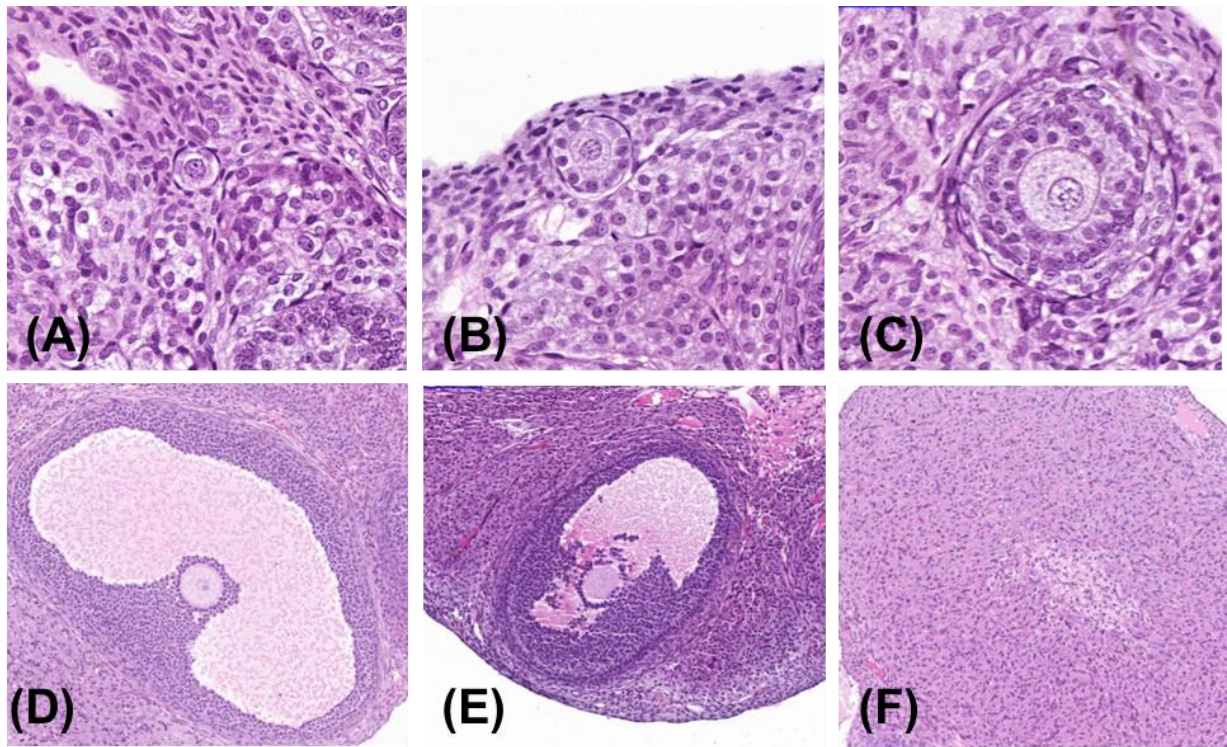


Figura 2: Fotomicrografias de estruturas ovarianas da prole feminina adulta do grupo controle, coloração em HE. (A) Folículo primordial, (B) Folículo primário, (C) Folículo pré-antral, (D) Folículo antral, (E) Folículo atrésico, (F) Corpo lúteo. A, B e C: aumento de 400x; D, E e F: aumento de 100x.

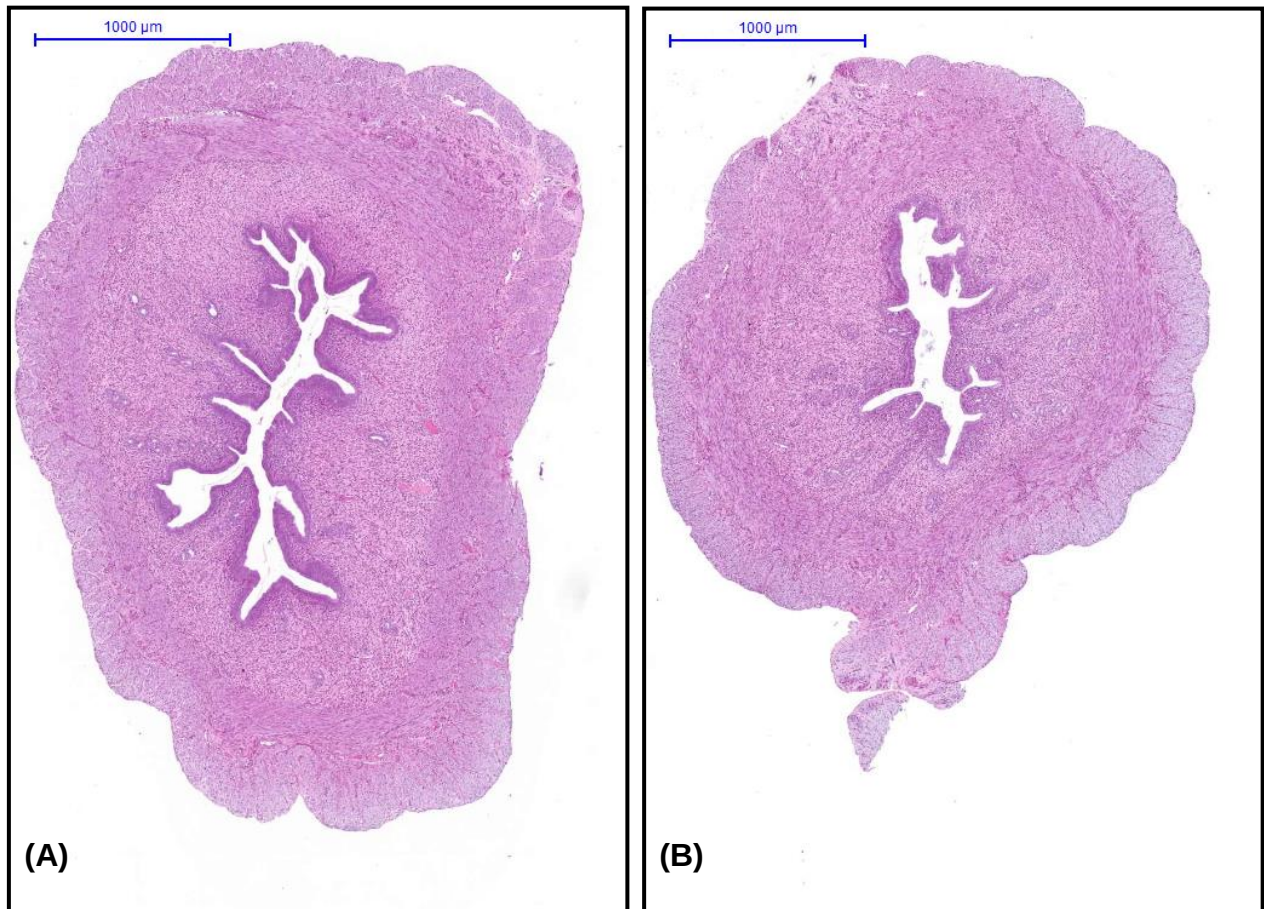


Figura 3: Fotomicrografia de cortes transversais de útero de ratas em estro, coloração em HE. (A) Grupo controle; (B) Grupo tratado com cisplatina. E: endométrio; M: miométrio (20x).

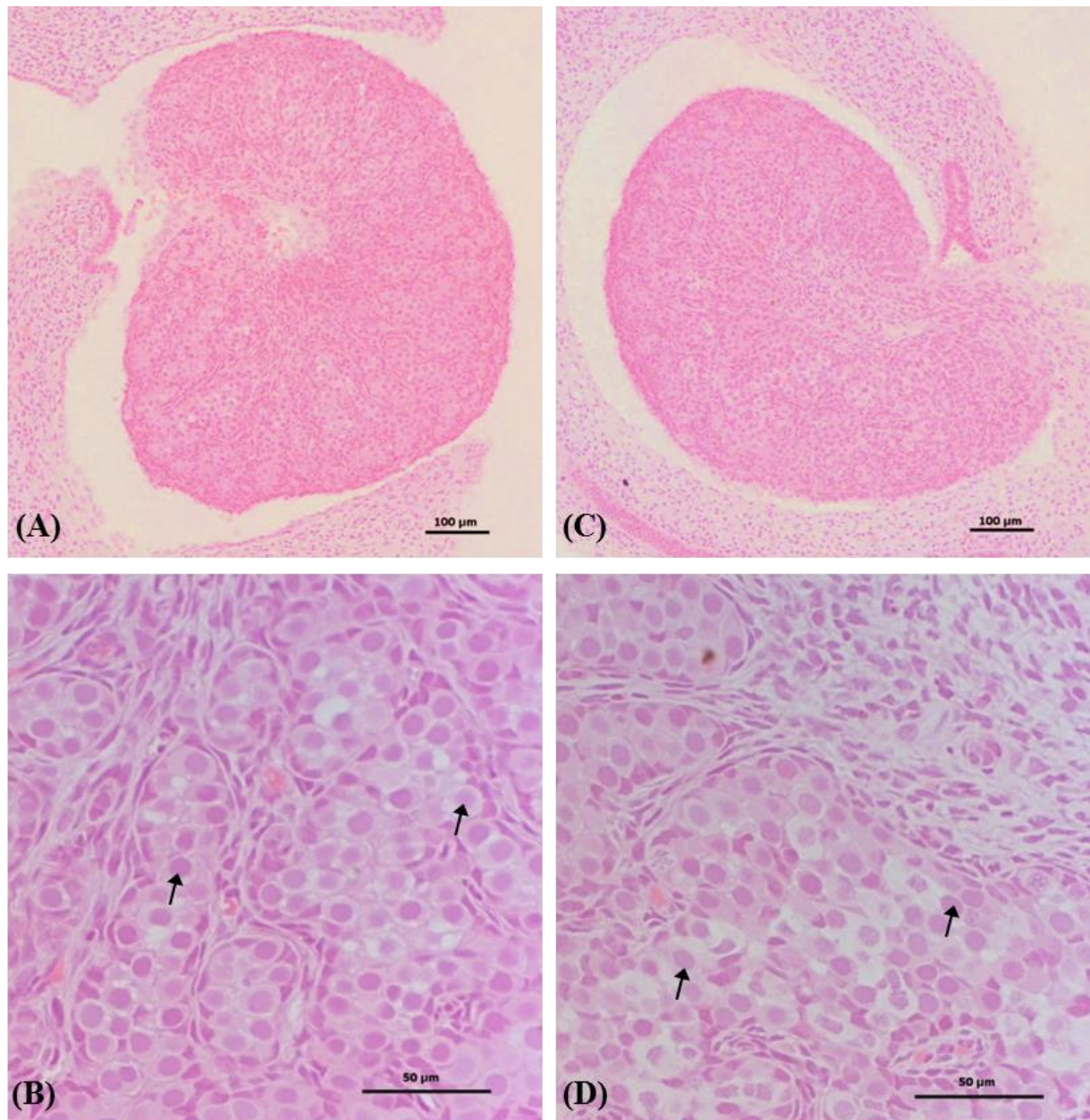


Figura 3: Fotomicrografia de cortes transversais de ovário fetal de ratas do grupo controle (A e B) e tratado com cisplatina (C e D), coloração em HE. Setas: células germinativas (40x).

Comissão de ética

Certificado

Certificamos que o Protocolo nº 426-CEUA, sobre "Avaliação do desenvolvimento do sistema genital e da função reprodutiva da prole feminina de ratos Wistar expostos à cisplatina durante a peri-puberdade", sob a responsabilidade de **Wilma De Grava Kempinas**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado "Ad referendum" da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Botucatu, 23 de agosto de 2012.



Prof.ª Dr.ª Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro
Presidenta da CEUA