LUCILENE REGINA MASCHIO

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS QUANTITATIVAS NO TESTÍCULO DE COBAIAS INDUZIDAS PELA SUPRESSÃO DE ANDRÓGENO

unesp

1910001292

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

LUCILENE REGINA MASCHIO

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E QUANTITATIVAS NO TESTÍCULO DE COBAIAS INDUZIDAS PELA SUPRESSÃO DE ANDRÓGENO

ORIENTADORA: **PROFA. DRA. REJANE MAIRA GÓES**

BIBLIOTECA
Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP - S. J. Rio Preto
t. 1292/04

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de mestre em Biologia Animal

-2003-

†612.616
M395a

20402007

21/10/2004
Doação
R$ 22,00
Autor
ND: 108/04 –
Proc. 047/04

Maschio, Lucilene Regina.
Alterações morfológicas e quantitativas no testículo de cobaias induzidas pela supressão de andrógeno / Lucilene Regina Maschio – São José do Rio Preto : [s.n.], 2003
80 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Rejane Maira Góes
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Testículos. 2. Espermatogênese. 3. Antiandrógeno. 4. Flutamida. 5. Flutamida - Uso terapêutico. I. Góes, Rejane Maira. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas . III. Título.

CDU – 612.616

DATA DA DEFESA: 11/12/2003

BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

PROFA. DRA. REJANE MAIRA GÓES
(ORIENTADORA) _____

PROFA.DRA.MARY ANNE HEIDI DOLDER _____

PROFA.DRA.SILVANA MARTINEZ BARALDI ARTONI _____

SUPLENTES:

PROF. DR. CLASSIUS DE OLIVEIRA _____

PROF. DR. MARCELO MARTINEZ _____

Dedicatória

Aos meus pais Raul J. Maschio e Alice Ap. R. Maschio, que me deram a vida, me iluminaram com afeto e dedicação, se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos em favor dos meus.

A minha irmã Luciana e ao meu irmão Leandro, por terem me incentivado em todos os momentos de minha vida. Obrigado a vocês que me acompanharam com carinho e estímulo, procurando amenizar minha ansiedade em cada cansaço ou rosto desanimado, mantendo-me firme diante dos obstáculos.

Ao meu namorado Claudinei, pela sua amizade, companheirismo, dedicação, carinho e amor. Obrigado por tudo que recebi de você todos estes anos.

A Deus, pelas tantas bênçãos que me conduziram a esta conquista, e que, em momentos de angústia me fez acreditar que a luta é necessária.

Agradecimentos

À minha professora e orientadora Dra. Rejane Maira Góes, pela orientação, dedicação, paciência, persistência, apoio, enfim sua existência, sem os quais essa conquista não seria possível. A ela devo muito, tanto que talvez necessite muitos anos para retribuir à altura.

Aos meus pais pelo exemplo de perseverança e que, apesar da distância, sempre se fizeram presentes nos momentos mais difíceis e pela compreensão da minha ausência em momentos tão difíceis e mesmo assim me amaram e me incentivaram em cada decisão minha.

Ao Claudinei por ser meu maior incentivador e torcedor e que com seu amor me faz fortaleza.

Aos meus irmãos Lú e Lê pelo carinho, amor e amizade.

Antecipadamente, as professoras Dra. Mary Anne Heidi Dolder e Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni por aceitarem compor a banca examinadora.

Ao professor Dr. Sebastião Roberto Taboga, por compartilhar humildemente seus conhecimentos, que sem dúvida foram importantes para a realização deste trabalho.

Ao técnico Luiz Roberto Falleiros Júnior por sua eficiência, amizade e tantos socorros prestados de última hora.

Aos amigos do laboratório Maê, Fernanda Egydio, Marcela, Silvana, Ana Maria, Fernanda, Flávia, Cristiane, Lara, Renato, Wellerson, Rodrigo, Xaropinho, Daniel, Sérgio, Fátima e Mírian pela amizade, ajuda e apoio.

À Lara e Wellerson por tantas caronas para casa.

À Silvana pela compreensão e oportunidade de aprender muito mais, além de poder desabafar em momentos difíceis e sempre receber uma resposta inteligente.

À Maê por suas palavras sempre tão confortadoras e especialmente por sua amizade.

À Ana Maria por seu apoio, carinho e pelas risadas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP- e a CAPES, pelo apoio financeiro destinado a esse trabalho.

Enfim, a todos que de uma maneira ou outra contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. Resumo..... 01

2. Abstract.....02

3. Introdução.....03

4. Objetivos.....13

5. Referências Bibliográficas.....14

6. Artigos

Artigo 1: Alterações testiculares em cobaias induzidas pelo tratamento de curta duração com flutamida.

Artigo 2: Impacto do tratamento de curta duração com flutamida sobre a ultra-estrutura das células testisculares de cobaias.

7. Conclusões Gerais.....80

RESUMO

O presente estudo avalia o efeito do bloqueio androgênico de curta duração, induzido pela administração de flutamida, sobre a dinâmica testicular de cobaias no período puberal, pós-puberal e adulto. Após tratamento por 10 dias com injeções subcutâneas diárias deste antiandrógeno não esteroidal (10mg/Kg de peso corporal) ou apenas do veículo farmacológico, os testículos foram processados para observação em microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Com base na comparação histológica, quantitativa e ultra-estrutural, verifica-se que o bloqueio androgênico com flutamida (i) induz, no *período puberal*, a diferenciação espermatogonial, acelerando a maturação testicular e causando a degeneração e deslocamento de espermatócitos primários e espermátides esféricas, que passam a ser encontrados em grande quantidade no epidídimo; (ii) nos *períodos pós-puberal* e *adulto*, além de causar a degeneração de células germinativas, em especial dos espermatócitos primários e o deslocamento prematuro de espermátides esféricas, prejudica a espermiação e aumenta o volume relativo de células de Leydig; e, (iii) tanto em animais *púberes* como em *adultos*, ocasiona um aumento das organelas envolvidas com a síntese de hormônios esteróides nas células de Leydig, levando ao acúmulo de figuras mielínicas no seu citoplasma e em maior grau no citoplasma das células de Sertoli. Em conclusão, a exposição temporária de cobaias em diferentes idades a doses moderadas de flutamida causa lesões degenerativas, severo descolamento celular prematuro e alta incidência de depósitos de mielina intracelulares, comprometendo, pelo menos temporariamente, o processo espermatogenético nesta espécie de roedor.

ABSTRACT

The present study evaluates the effect of short-term androgen blockade, induced by flutamide administration on testicular dynamics of guinea pigs in pubertal, post-pubertal and adult phases. Following 10 days-treatment with pharmacological vehicle only or with the non-steroidal antiandrogen (10mg/Kg of body weight) the testis were processed for observation on light and transmission electron microscopy. On the basis of histological, quantitative and ultrastructural comparisons is reported that the flutamide androgenic blockade (i) in *pubertal period,* induces the spermatogonial differentiation, accelerates the testis maturation and causes degeneration and detachment of primary spermatocytes and spherical spermatids which are subsequently found in great amounts in the epididymis; (ii) in *post-pubertal* and *adult* guinea pigs, besides to cause germ cell degeneration, especially in primary spermatocytes, and leads to the premature detachment of spherical spermatids, the antiandrogen also impairs the spermiation and increases the relative volume of Leydig cells; (iii) in *pubescent* and *adult* animals, the treatment causes an increase of organelles involved with the steroid hormone synthesis in the Leydig cells and a dramatic accumulation of myelin deposits in their cytoplasm and in larger degree in Sertoli cells. In conclusion, the transient exposition of the guinea pigs to moderate doses of flutamide causes in all investigated ages degenerative lesions, severe premature detachment and high cellular incidence of myelin deposits, compromising at least temporarily, the spermatogenetic process in this rodent species.

INTRODUÇÃO

1. Estrutura e funcionamento do testículo de mamíferos

O testículo é um órgão complexo que desempenha duas funções cruciais para o processo reprodutivo: a síntese e secreção de testosterona e a produção de um número de espermatozóides suficiente para promover a fertilidade (GNESSI et al., 1997). Para realizar esses objetivos, esse órgão está organizado em dois compartimentos principais, o compartimento tubular e o compartimento intersticial (Fig. 1).

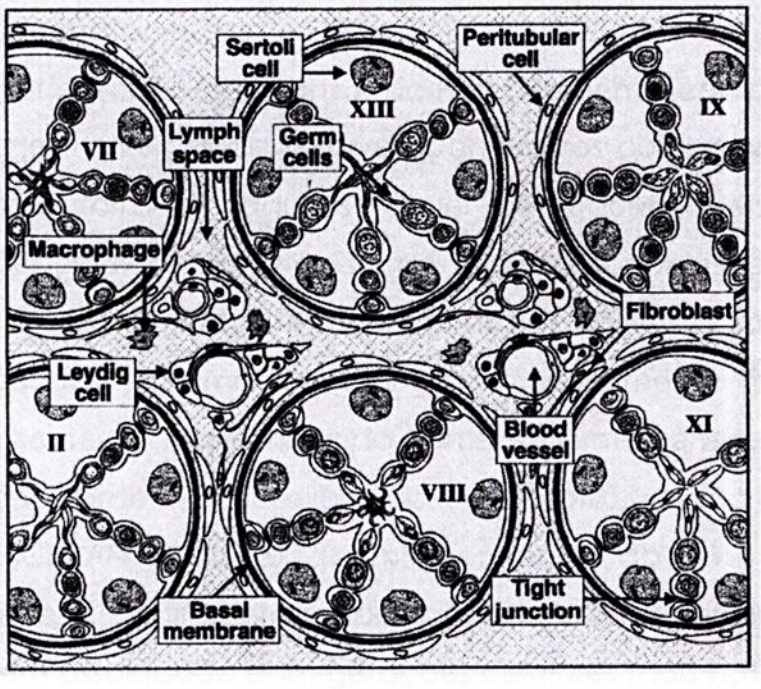


FIGURA 1: Representação esquemática da estrutura testicular de rato adulto mostrando túbulos seminíferos com epitélio em diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero e tecido intersticial. Os principais tipos celulares do órgão estão representados. Extraído de Gnessi et al., 1997.

O compartimento tubular é constituído pelos túbulos seminíferos, os quais são delimitados por uma camada de células mióides peritubulares e pela membrana basal, sendo revestidos internamente pelo epitélio germinativo (FAWCETT, 1994).

O epitélio germinativo é constituído por células de duas naturezas: as células nutrientes de Sertoli e as células da linhagem espermatogênica ou germinativa (Fig. 1). As primeiras formam uma camada contínua ao longo de todo o túbulo seminífero, fornecendo o suporte estrutural e metabólico para as células germinativas, que se dispõem em várias alturas no epitélio à medida que se diferenciam durante a espermatogênese.

A espermatogênese é um processo altamente complexo e sua manutenção em níveis qualitativos e quantitativos compatíveis com as funções reprodutoras de adultos requer um equilíbrio entre quatro etapas seqüenciais: a proliferação de espermatogônias por divisões mitóticas, o direcionamento de algumas destas células para meiose, a diferenciação das espermátides em gametas altamente modificados morfologicamente, etapa conhecida como espermiogênese e, por fim, a espermiação, processo que libera o espermatozóide para a luz do túbulo (McLACHLAN et al., 2002). Em decorrência do curso cíclico da espermatogênese, as diferentes populações de células germinativas são observadas em associação com gerações celulares mais novas ou mais velhas, criando uma constante combinação de células, conhecida como estádios do epitélio seminífero (Fig. 1). Para a cobaia estes estádios foram descritos por Clermont 1960 e estão aqui ilustrados na Figura 2.

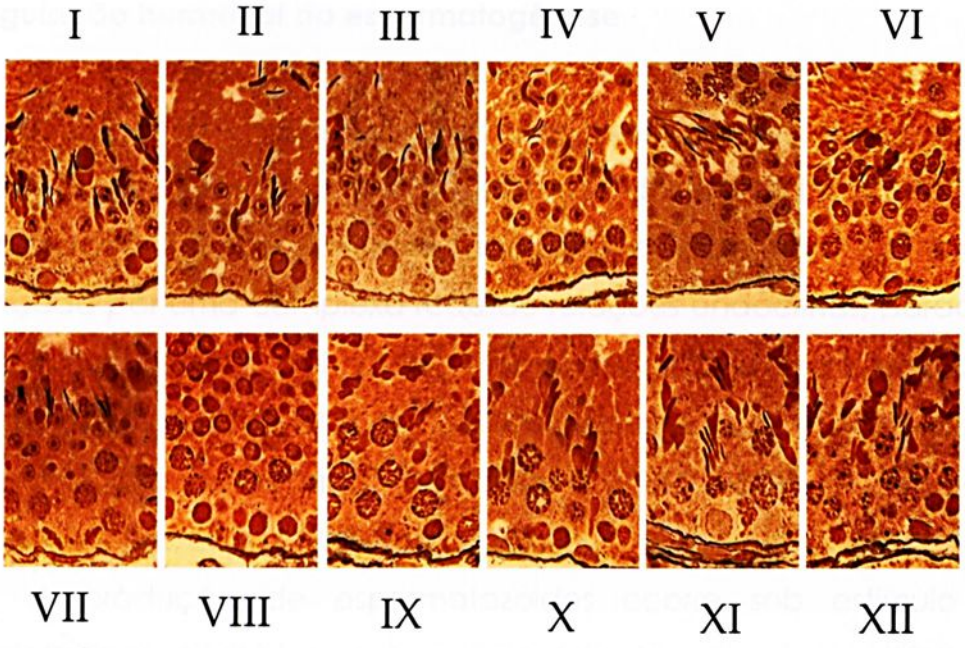


FIGURA 2: Estádios do epitélio seminífero de cobaias obtidos após coloração de cortes histológicos em historresina com o método da Reticulina de Gömöri.

O compartimento intersticial do testículo é composto por fibroblastos, vasos sangüíneos, eventuais macrófagos e pelas células de Leydig, responsáveis pela síntese de andrógenos (FAWCETT,1994; GNESSI et al., 1997). Os andrógenos secretados por estas células são fundamentais para o controle das funções reprodutoras masculinas nos vertebrados, atuando na diferenciação e funcionamento dos órgãos reprodutores, induzindo o comportamento reprodutivo característico da espécie e influenciando a produção de espermatozóides (RODRIGUES e FAVARETTO, 1999).

2. Regulação hormonal da espermatogênese

De maneira geral, o equilíbrio entre as diferentes etapas da espermatogênese é controlado por hormônios, fatores de crescimento, interações celulares e outras substâncias de ação local. Assim, a coordenação necessária para as funções espermatogenéticas é alcançada por uma complexa rede de relações endócrinas, parácrinas e justácrinas, responsáveis pela sintonia metabólica entre células de Leydig, células de Sertoli e células germinativas, num processo conhecido como dinâmica testicular (SPITERIGRECH et al., 1993; O'DONNEL et al., 2001; GUITTON et al., 2000).

A produção de espermatozóides ocorre sob estímulo das gonadotrofinas pituitárias, o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH), que são secretados em resposta do hormônio hipotalâmico liberador de gonadotrofinas (GnRH). Estudos sobre o papel do FSH e testosterona na supressão e restauração da espermatogênese em ratos adultos indicam que esses hormônios exercem efeitos independentes e sinérgicos sobre o desenvolvimento das células germinativas (McLACHLAN et al., 2002).

O FSH, que é secretado pelas células de Sertoli, desempenha um papel chave no desenvolvimento de testículos imaturos, particularmente por controlar a proliferação das células de Sertoli (McLACHLAN et al., 1996). Além disso, atua predominantemente no desenvolvimento e diferenciação espermatogonial, na prevenção da degeneração prematura das espermatogônias e espermatócitos e na divisão meiótica (McLACHLAN et al., 1996).

A testosterona é, entre as múltiplas formas moleculares de andrógenos, a mais potente metabolicamente, correspondendo a 95%

dos andrógenos totais encontrados na circulação sanguínea (LITWACK, 1992). A secreção testicular deste hormônio é estimulada pelo LH, secretado pela adenohipófise (RODRIGUES e FAVARETO, 1999).

Entre os vários efeitos causados pela testosterona no testículo o mais importante é o de facilitar a progressão das espermátides esféricas em espermátides alongadas, pois estudos com ratos mostram que altas doses de FSH foram incapazes de completar este passo vital (McLACHLAN et al., 1996).

Inúmeros estudos, realizados em diferentes grupos de vertebrados têm procurado esclarecer os mecanismos envolvidos no controle da função testicular e em especial do processo de espermatogênese (SHARPE, 1987; ROBERTS e ZIRKIN, 1991; O'DONNEL et al., 2001; GNESSI et al., 1997; McLACHLAN et al., 1996 - 2002). Ao longo das últimas décadas as informações resultantes destes estudos foram compiladas em excelentes artigos de revisão, entre os quais destacam-se por exemplo SHARPE, 1987; McLACHLAN et al., 1996 - 2002; GNESSI et al; 1997. Entretanto, existem vários aspectos relativos à regulação da espermatogênese que permanecem pouco conhecidos.

A interrupção da espermatogênese verificada para ratos submetidos à retirada da hipófise (RUSSEL e CLERMONT, 1977), e relatos posteriores apontando para a recuperação das funções espermatogenéticas em animais hipofisectomizados devido à administração exógena de testosterona (SUN et al., 1989), indicaram que uma alta concentração intratesticular de testosterona é necessária para a manutenção da espermatogênese.

Apesar destas evidências a respeito do papel crucial da testosterona no desenvolvimento das células germinativas, pouco é conhecido sobre os mecanismos de ação deste hormônio e sua efetiva

unesp

contribuição para a fisiologia das diferentes populações celulares encontradas no testículo, existindo ainda muitas controvérsias neste sentido (SHARPE, 1987; GNESSI et al., 1997). Receptores de andrógenos têm sido encontrados apenas em células de Sertoli, mas não nos núcleos de espermatogônias e de outras células germinativas (BREMNER et al., 1994; SUAREZ-QUIAN et al., 1999; ZHU et al., 2000). Além disso, experimentos recentes com transplante de espermatogônias de camundongos com deficiência de receptor de andrógenos para testículos de animais normais, resultaram em uma produção normal de espermatozóides (JOHNSTON et al., 2001). Portanto, com base nestas evidências, têm sido postulado que a testosterona não age diretamente sobre as células germinativas, mas o seu alvo primário de ação são as células de Sertoli, as quais, por sua vez, atuam sobre as células germinativas através da secreção de fatores parácrinos (SHARPE, 1987; PARVINEN et al., 1988; RUSSEL e CLERMONT, 1977).

Análises bioquímicas dos níveis intratesticulares de testosterona em ratos adultos revelaram valores máximos nos estágios VII e VIII do ciclo do epitélio seminífero e valores mais baixos nos estágios de XIII-V (PARVINEN et al., 1988; BREMNER et al., 1994), sugerindo uma ação androgênica preferencial nos estágios VII-XI do ciclo do epitélio seminífero, enquanto os estágios XIII-V são controlados preferencialmente pelo FSH (McLACHLAN et al., 1996).

Uma das abordagens experimentais que tem permitido acessar especificamente o papel da testosterona sobre as diferentes etapas espermatogenéticas e principais populações celulares do testículo apóia-se na utilização de agentes antiandrogênicos (CHANDOLIA et al., 1991; LABRIE, 1993; BALBOTIN, 1994; FENNELL et al., 1996; OKAHARA et al.,

unesp

2000; SHETTY et al., 2000 – 2001; SHUTTLESWORTH et al, 2000; HILD et al., 2001; HIROSHI et al., 2001; TOHODA et al., 2001).

Os antiandrógenos inibem os andrógenos de expressarem suas atividades nos tecidos-alvo em decorrência da competição pelos sítios dos receptores de andrógenos, causando o bloqueio da ação periférica da testosterona em órgãos andrógeno-dependentes, como por exemplo testículo e próstata (NEUMANN e TOPERT, 1986; BURTON e TRACHTENBERG, 1986). Por esse motivo, muitos dos agentes antiandrogênicos foram desenvolvidos para aplicação no tratamento de patologias andrógeno-dependentes, como por exemplo a acne, o hirsutismo, as hiperplasias e neoplasias prostáticas. Sua utilização terapêutica, conhecida como castração química, tem sido amplamente testada, seja por meio de monoterapia ou bloqueio conjugado (LABRIE, 1993; LUO et al., 1997; SMALL et al., 1997; ABRAHAMSSON, 2001; MORGANTE et al., 2001).

A terapia antiandrogênica decorrente do bloqueio aos receptores de testosterona pode empregar compostos esteroidais, como o acetato de ciproterona, ou não esteroidais, como a flutamida. A principal diferença entre estas categorias de antiandrógenos reside no fato que, enquanto os primeiros não interferem na secreção de gonadotrofinas, os últimos previnem o feedback negativo dos andrógenos sobre a secreção de LH e de FSH, acarretando um aumento nas concentrações séricas de gonadotrofinas e conseqüente aumento da produção de testosterona (PEETS et al., 1974; SCHACHER e NEUMANN, 1983; VIGUIER-MARTINEZ et al., 1983; POYET e LABRIE, 1985; JUNIEWICZ et al, 1993).

Uma variedade crescente de compostos antiandrogênicos vem sendo testada em diferentes modelos animais, em especial em

roedores, permitindo traçar as conseqüências da supressão de andrógeno em termos das alterações nos níveis hormonais e trazendo importantes contribuições sobre a modulação do comportamento celular na regulação da espermatogênese (FURR et al; 1987; CHANDOLIA et al., 1991; LABRIE, 1993; BALBOTIN, 1994; FENNELL et al., 1996; OKAHARA et al., 2000; SHETTY et al., 2000 – 2001; SHUTTLESWORTH et al, 2000; HILD et al., 2001; HIROSHI et al., 2001; TOHODA et al., 2001).

Tanto em mamíferos como em outros vertebrados a administração de antiandrógenos tem induzido a diferenciação das espermatogônias com conseqüente aumento do número de espermatócitos primários (RAÍ e HAIDER, 1991; SHETTY et al., 2001; TOHODA et al., 2001). Também são relatadas a ocorrência de lesões nas espermátides, a diminuição no número de espermatozóides (VOJTÍSKOVA et al., 1978; RAÍ e HAIDER, 1991; NAMBU e KUMAMOTO, 1995) e a hipertrofia das células de Leydig (RAÍ & HAIDER, 1991). Além disso, a queda nos níveis de andrógenos é acompanhada por um aumento no número de células germinativas apoptóticas. Nesta situação a indução de apoptose é modulada pelos mesmos genes pertencentes à família *bcl-2*, contribuindo para a regulação da população de células germinativas (WOOLVERIDGE et al, 1998).

Tais substâncias acarretam o bloqueio androgênico por abolir a síntese de testosterona pelas células de Leydig ou por impedir sua ação (CHANDOLIA et al., 1991; BALBOTIN et al., 1994; MATSUMIYA et al., 1999; SCHMIDT et al., 2000; LABRIE, 1993).

A flutamida (4-nitro-3-trifluorometil-isobutilanilida) (Fig. 3) é um agente antiandrogênico de ampla utilização no tratamento de hiperplasias e neoplasias prostáticas que atua como antagonista do receptor nuclear de andrógeno. (LABRIE et al., 1993; BOCCONGIBOD et

unesp

al., 1997; LUO et al., 1997). Sua boa aceitação como agente terapêutico, quando comparada com outras drogas antiandrogênicas, justifica-se frente aos poucos efeitos colaterais ocasionados, à manutenção das funções reprodutoras e da libido bem como à baixa incidência de sinais clínicos de feminilização (MARCHETTI e LABRIE, 1988), embora alguns autores considerem anti-ético a administração a pacientes intactos.

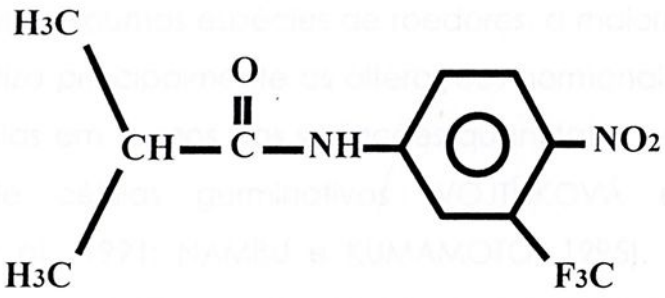


FIGURA 3: Estrutura química da flutamida: 3α,-trifluoro-2-methyl1-4'-nitro-m-propionotoluidide (SUFRIN e COFFEY, 1975).

Estudos recentes têm mostrado que o bloqueio da ação da testosterona pela administração da flutamida no testículo aumenta a produção da enzima testicular 5∝-redutase, responsável pela conversão da testosterona em diidrotestosterona, aumentando assim a concentração da diidrotestosterona testicular (McLACHLAN et al., 2002).

Estudos experimentais em ratos demonstraram que doses de flutamida equivalentes àquelas administradas ao homem (0,2-1mg/Kg), por longos períodos de tempo, levam à inibição da espermatogênese, conforme avaliado pelo número médio de túbulos seminíferos contendo espermatozóides maduros (VOJTISKOVÁ et al., 1978). Severas lesões testiculares foram observadas após duas semanas de tratamento com doses altas de flutamida (acima de 60mg/Kg de peso corporal), indicando seu efeito tóxico. Por sua vez, outros estudos mostraram que a

flutamida age principalmente sobre as espermatogônias, induzindo um aumento no seu número (CHANDOLIA et al., 1991) e também causando danos estruturais as espermátides (NAMBU e KUMAMOTO, 1995).

3. Justificativa do tema

Embora o efeito do bloqueio androgênico sobre o testículo tenha sido analisado em algumas espécies de roedores, a maioria dos estudos existentes enfatiza principalmente as alterações hormonais resultantes e as conseqüências em termos das variações quantitativas nas diferentes populações de células germinativas (VOJTÍSKOVÁ et al., 1978; CHANDOLIA et al., 1991; NAMBU e KUMAMOTO, 1995). Portanto, são muito escassas as análises que abordem a influência da terapia antiandrogênica sobre as três principais populações celulares do testículo e contemplem de maneira integrada as alterações morfológicas em cada tipo celular, as quais, sabidamente, refletem o seu estado fisiológico. Assim, uma compreensão mais abrangente das conseqüências do tratamento antiandrogênico sobre a dinâmica testicular, requer investigações que relacionem os dados quantitativos relativos às diferentes categorias de células às suas respectivas alterações fenotípicas.

O modelo animal aqui utilizado foi escolhido por tratar-se de uma espécie de ampla utilização em estudos experimentais, cujo ciclo do epitélio seminífero e alguns aspectos da espermatogênese são bem conhecidos (CLERMONT, 1960; HIKIM e CHAKRABORTY, 1984; YOSHINAGA et al., 2001) e os estudos relativos aos efeitos da manipulação hormonal sobre o testículo são escassos.

unesp

Consideremos que as informações apresentadas no presente estudo possam contribuir para uma interpretação mais abrangente do papel da testosterona no controle da espermatogênese em roedores e também fornecer subsídios para a compreensão das conseqüências do uso terapêutico da flutamida em termos da estrutura testicular e o comprometimento na formação de espermatozóides.

OBJETIVOS

Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito do bloqueio androgênico causado pela administração a curto termo de flutamida, sobre a dinâmica testicular de cobaias em diferentes idades. Assim, foram examinadas as alterações morfológicas e quantitativas na estrutura e principais populações celulares do testículo, resultantes da terapia com o referido antiandrógeno (Artigo 1). Também foi avaliado o impacto do bloqueio androgênico sobre as características ultra-estruturais das células germinativas e somáticas deste órgão (Artigo 2).

unesp

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSSON, P.A. Treatment of locally advanced prostate cancer. A new role for antiandrogen monotherapy? Eur Urol, v. 39, p. 22-28, 2001.

BALBOTIN, J.B. Flutamide as a tool to-study the hormonal regulation of the reproductive tract in the golden hamster. Androl, v. 26, p. 7-32, 1994.

BOCCONGIBOD, L. ; FOURNIER, G. ; BOTTET, P. ; MARECHAL, J.M. ; GUITER, J. ; RISCHMAN, P. ; HUBERT, J. ; SORET, J.Y. ; MANGIN, P. ; MALLO, C. ; FRAYSSE, C.E. Flutamide versus orchidectomy in the treatment of metastatic prostate carcinoma. Eur Urol, v. 32, p. 391-395, 1997.

BREMNER, W.J. ; MILLAR, M.R. ; SHARPE, R.M. ; SAUNDERS, P.R. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. Endocrinology, v. 135, p. 1227–1234, 1994.

BURTON, S. & TRACHTENBERG, J. Effectiveness of antiandrogens in the rat. Urology, v. 136, p. 932-935, 1986.

CHANDOLIA, R.K. ; WEINBAUER, G.F. ; SIMONI, M. ; BEHRE, H.M. ; NIESCHLAG, E. Comparative effects of chronic administration of the non-steroidal antiandrogens flutamide and Casodex on the reprodutive system of the adult male rat. Acta Endocrinol, v. 125, p. 547-555, 1991.

CLERMONT, Y. Cycle of the seminiferous epithelium of the guinea pig. Fert Steril, v. 6, p. 563-578, 1960.

FAWCET, D.W. Male reproductive system. In: Bloom W, FAWCET DW. A textbook of histology. Chapman and Hall, New York, pp. 768-815, 1994.

FENNEL, M.J. ; RADECKI, S.V. ; PROUDMAN, J.A. ; SCANES, C.G. The supressive effects of testosterone on growth in young chickens appears

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

to be mediated via a peripheral androgen receptor; studies of the anti-androgen ICI 176,334. Poult Sci, v. 75, n. 6, p. 763-766, 1996.

FURR, B.J. ; VALCACCIA, B. ; CURRY, B. ; WOODBURN, J.R. ; CHESTERSON, G. ; TUCKER, H. ICI 176: a novel non-steroidal, peripherally selective antiandrogen. J Endocrinol, v. 113, n. 3, p. 7-9, 1987.

GNESSI, L. ; FABBRI, A. ; SPERA, G. Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. Endocr Ver, v. 18, n. 4, p. 541-590, 1997.

GUITTON, N. ; TOUZALIN, A.M. ; SHARPE, R.M. ; CHENG, C.Y. ; PINON-LATAILLADE, G. ; MERITTE, H. ; CHENAL, C. ; JEGOU, B. Regulatory influence of germ cells on Sertoli cell function in the pre-pubertal rat after acute irradiation of the testis. J Androl, v. 23, n. 6, p. 332-339, 2000.

HIKIM, S. & CHAKRABORTY, J. Quantitative evaluation of guinea pig spermatogenesis: Epon versus paraffin embedding. Arch Androl, v. 13, p. 121-128, 1984.

HILD, A.S. ; MEISTRICH, M.L. ; BLYE, R.P. ; REEL, J.R. Lupron depot prevention of antispermatogenic / antifertility activity of the indenopyridine, CDB-4022, in the rat. Biol Reprod, v. 65, p. 165-172, 2001.

HIROSHI, O. ; KENTARO, O.Y. ; TADOKORO, Y. ; TODA, A. ; DOHMAE, K. ; NISHIMUNE, Y. Defects in germ cells, not in supporte cells, is the cause of male infertility in the *jsd* mutant mouse: proliferation of spermatogonial stem cells without differentiation. Int Rev Androl, v. 24, p. 15-23, 2001.

JOHNSTON, D.S. ; RUSSEL, L.D. ; FRIEL, P.J. ; GRISWOLD, M.D. Murine germ cells do not require functional androgen receptors to complete spermatogenesis following spermatogonial stem cell transplantation. Endocrinology, v. 142, p. 2405-2408, 2001.

JUNIEWICZ, P.E. ; HOEKSTRA, S.J. ; LEMP, B.M. ; BARBOLT, T.A. ; DEVIN, J.A. ; GAUTHIER, E. ; FRENETTE, G. ; DUBE, J.Y. Effect of combination treatment with Zanoterone (WIN 49596), a steroidal androgen receptor antagonist, and Finasteride (MK-906) a steroidal 5 alpha-redutase inhibitor, on the prostate and testes of beagle dogs. Endocrinology, v. 133, n. 2, p. 904-913, 1993.

LABRIE, F. Mechanism of action and pure antiandrogenic properties of flutamide. Cancer, v. 72, n. 12, p. 3816-3827, 1993.

LITWACK, G. Biochemistry of hormones II: steroid hormones. In Textbook of Biochemistry with clinical correlations. Ed. TM Devlin. 3th ed. New York, Wiley-Liss, 901-925p, 1992.

LUO, S.Q. ; MARTEL, C. ; CHEN, C.L. ; LABRIE, C. ; CANDAS, B. ; SINGH, S.M. ; LABRIE, F. Daily dosing with Flutamide or Casodex exerts maximal antiandrogenic activity. Urology, v. 50, p. 913-919, 1997.

MARCHETTI, B. & LABRIE, F. Characteristics of flutamide action on prostatic and testicular functions in rat. J Steroid Biochem, v. 29, n. 6, p. 691-698, 1988.

MATSUMIYA, K. ; MEISTRICH, M.L. ; SHETTY, G. ; DOHMAE, K. ; TOHDA, A. ; OKUYAMA, A. ; NISHIMUNE, Y. Stimulation of spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion (*jsd*) mutant mice by gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. Endocrinology, v. 140, n. 10, p. 4912-4915, 1999.

MCLACHLAN, R.I. ; O´DONNELL, L.O. ; MEACHEM, S.J. ; STANTON, P.G. ; KRETSER, D.M. ; PRATIS, K. ; ROBERTSON, D.M. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. Endocr Soc, p. 149-179, 2002. Artigo de revisão.

MCLACHLAN, R.I. ; WREFORD, N.G. ; O´DONNELL, L. ; DE KRETSER, D.M. ; ROBERTSON, D.M. The endocrine regulation of spermatogenesis:

independ roles for testosterone and FSH. J Endocrinol, v. 148, p. 1-9, 1996.

MORGANTE, E. ; GRADINI, R. ; REALACCI, M. ; SALE, P. ; D'ERAMO, G. ; PERRONE, G.A. ; CARDELO, M.R. ; PETRANGELI, E. ; RUSSO, M.A. ; SILVERIO, F. Effects of long-term treatment with the anti-adrogen bicalutamide on human testis: an ultrastructural and morphometric study. Histopathology, v. 38, n. 3, p. 195-201, 2001.

NAMBU, A. & KUMAMOTO, Y. Studies of spermatogenic damages induced by anti-cancer agent and anti-androgenic agents in rat testes. Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi, v. 86, n. 7, p. 1221-1230, 1995.

NEUMANN, F. & TOPERT, M. Pharmacology of antiandrogenics. J. Steroid Biochem, v. 25, p. 885-895, 1986.

O'DONNELL, L. ; ROBERTSON, K.M. ; JONES, M.E. ; SIMPSON, E.R. Estrogen and spermatogenesis. Endocr Ver, v. 22, n. 3, p. 289-318, 2001.

OKAHARA, A. ; NOMURA, A. ; TANIOKA, H. ; SAKAMOTO, H. ; YAMASHITA, K. ; IKUSE, T. Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats 5. Effects of repeated doses of Flutamide for 2 and 4 weeks. J Toxical Sci, v. 25, p. 63-70, 2000.

PARVINEN, M. ; VIHKO, K.K. ; TOPPARI, J. Cell interactions during the seminiferous epithelial cycle. Int Rev Cytol, v. 104, p. 115-151, 1988.

PEETS, E.A. ; HENSON, M.F. ; NERI, R. On the mechanism of the antiandrogenic action of flutamide (trifluoro-2-methyl-4-nitro-m-propionotoluidide) in the rat. Endocrinology, v. 94, p. 532-540, 1974.

POYET, P. & LABRIE, F. Comparison of the antiandrogenic/androgenic activities of flutamide, cyproterone acetate and megesterol acetate. Mol Cell Endocrinol, v. 42, p. 283-288, 1985.

unesp

RAI, U. & HAIDER, S. Testis and epididymis of the indian wall lizard (Hemidactylus flaviviridis): Effects of flutamide on FSH and testosterone influenced spermatogenesis, Leydig cell, and epididymis. J Morphol, v. 209, p. 133-142, 1991.

RAO, B.R. ; DE VOOGT, H.I. ; GELDOF, A.A. ; GOOREN, L.J. ; BOUMAN, F.G. Merits and considerations in the use of anti-androgen. J Sterid Biochem, v. 31, n. 4B, p. 731-737, 1988.

ROBERTS, K.P. & ZIRKIN, B.R. Androgen regulation of spermatogenesis in the rat. Ann N.Y. Acad Sci, v. 673, p. 90-106, 1991.

RODRIGUES, J.A. & FAVARETTO, A.L.V. Sistema Reprodutor. Cap. 73,. In: Fisiologia. Aires, MM. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 868-891pp, 1999.

RUSSEL, L.D. & CLERMONT, Y. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. Anat Rec, v. 187, p. 347-365, 1977.

SCHACHER, A. & NEUMANN, F. Effects of different antiandrogens on hypothalamic-pituitary function in male rats. Acta Endocrinol (Copenh); (Suppl 253): Abstract 39. (1983)

SCHMIDT, B.M.W. ; GERDES, D. ; FEURING, M. ; FALKENSTEIN, E. ; CHRIST, M. ; WEHLING, M. Rapid, nongenomic steroid actions: A new age?. Frontiers in Neuroendocrinology, v. 21, p. 57-94, 2000.

SHARPE, RM. Testosterone and spermatogenesis. J Endocrinol, v. 113, p. 1-2, 1987.

SHETTY, G. ; WILSON, G. ; HUHTANIEMI, I. ; SHUTTLESWORTH, G.A. ; REISSMANN, T. ; MEISTRICH, M.L. Gonadotropin-releasing hormone analogs stimulate and testosterone inhibits the recovery of spermatogenesis in irradiated rats. Endocrinology, v. 141, n. 5, p. 1735-1745, 2000.

unesp

SHETTY, G. ; WILSON, G. ; HUHTANIEMI, I .; TONG, H.B. ; MEISTRICH, M.L. Testosterone inhibits spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion mice. Endocrinology, v. 142, n. 7, p. 2789-2795, 2001.

SHUTTLESWORTH, G.A. ; ROOIJ, D.G. ; HUHTANIEMI, I. ; REISSMANN, T. ; RUSSEL, L.D. ; SHETTY, G. ; WILSON, G. ; MEISTRICH, M.L. Enhancement of a spermatogonial proliferation and differentiation in irradiated rats by gonadotropin-releasing hormone antagonist administration. Endocrinology, v. 141, n. 1, p. 37-49, 2000.

SMALL, E.J. ; BARON, A. ; BOK, R. Simultaneous antiandrogen withdrawal and treatment with ketoconazole and hydrocortisone in patients with advanced prostate carcinome. Cancer, v. 80, n. 9, p. 1755-1759, 1997.

SPITERIGRECH, J.; WEINBAUER, G.F. ; BOLZE, P. ; CHANDOLIA, R.K. ; BARTLETT, J.M.S. ; NIESCHLAG, E. Effects of FSH and testosterone on intratesticular insulin-germ-like growth factor-I and specific-germ-cell populations in rats treated with gonadotropin-releasing-hormone antagonist. J Endocrinol, v. 137, n. 1, p. 81, 1993.

SUAREZ-QUIAN, C.A. ; MARTINEZ-GARCIA, F. ; NISTAL, M. ; REGADERA, J. Androgen receptor distribuition in adult human testis. J Clin Endocrinol Metab, v. 84, p. 350-358, 1999.

SUFRIN, G. & COFFEY DS. Flutamide: Mechanism of action of a new nonsteroidal antiandrogen. Investigate Urology, v. 13, n. 6, p. 429-434, 1975.

SUN, Y.T. ; IRBY, D.C. ; ROBERTSON, D.M. ; de KRETSER, D.M. The effects of exogenously administered testosterone on spermatogenesis in intact and hypophysectomized rats. Endocrinology, v. 125, p. 1000-1010, 1989.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

TOHDA, A. ; MATSUMIYA, K. ; TADOKORO, Y. ; YOMOGIDA, K. ; MIYAGAWA, Y. ; DOHMAE, K. ; OKUYAMA, A. ; NISHIMUNE, Y. Testosterone supresses spermatogenesis in juvenile spermatogonial depletion jsd mice. Biol Reprod, v. 65, p. 532-537, 2001.

VIGUIER-MARTINEZ, M.C. ; HOCHEREAU de REVIERS, M.T. ; BARENTON, B. ; PERREAU, C. Endocrinological and histological changes induced by flutamide treatment on the hypothalamo-hypophyseal testicular axis of the adult male rat and their incidences on fertility. Acta Endocrinol, v. 104, p. 246-252, 1983.

VOJTÍSKOVA, M. ; POLÁCHOVÁ, M. ; VIKLICKÝ, V. ; KHODA, M.E. Reversible inhibitory effect of the non-steroidal antiandrogen flutamide (SCH 13521) on spermatogenesis in mice. Endokrinologie, v. 71, n. 2, p. 135-142, 1978.

WOOLVERIDGE, I. ; BRYDEN, A.A. ; TAYLOR, M.F. ; GEORGE, N.J. ; WU, F.C. ; MORRIS, J.D. Apoptosis and expression of apoptotic regulators in the human testis following short-and long-term anti-androgen treatment. Mol Hum Reprod, v. 4, n. 7, p. 701-707, 1998.

YOSHINAGA, K. ; TANII, I. ; OH-OKA, T. ; TOSHIMORI, K. Changes in distribuition and molecular weight of the acrosomal protein acrin 2 (MC 41) during guinea pig spermiogenesis and epididymal maturation. Cell Tissue Res, v. 303, n. 2, p. 253-261, 2001.

ZHU, L. ; HARDY, M.P. ; INIGO, I.V. ; HUHTANIEMI, I. ; BARDIN, C.W. ; MOO-YOUNG, A.J. Effects of androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative imunohistochemical study. Biol Reprod, v. 63, p. 368-376, 2000.

ALTERAÇÕES TESTICULARES EM COBAIAS INDUZIDAS PELO TRATAMENTO DE CURTA DURAÇÃO COM FLUTAMIDA

Lucilene Regina Maschio e Rejane Maira Góes

Departamento de Biologia- IBILCE/UNESP, 15054-000 – São José do Rio Preto , SP, Brasil.

Palavras-chave: testículo, antiandrógeno, espermatogênese, cobaia

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de LRM, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos auxílios no. 2001-12078-7 e no. 2000/11648-1. Também agradecem o suporte Técnico de Luiz Roberto Falleiros Júnior.

Endereço para correspondência

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE – UNESP
Departamento de Biologia
Rua Cristóvão Colombo, 2265
Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, SP, Brasil.
CEP: 15054-000

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito a curto termo do bloqueio androgênico, causado pela administração temporária do antiandrógeno não esteroidal flutamida, sobre a dinâmica testicular de cobaias púberes (15-60 dias), pos-púberes (60-120 dias) e adultas (120-360 dias). Animais na metade do tempo de cada período de desenvolvimento pós-natal foram submetidos a tratamento de 10dias com injeções subcutâneas diárias de flutamida (10mg/Kg de peso corporal) ou com injeções contendo apenas o veículo farmacológico. A análise histológica e a avaliação do escore de Johnsen modificado indicaram que o tratamento antiandrogênico induziu a diferenciação espermatogonial em animais púberes, acelerando a maturação testicular. O tratamento não causou interrupção da fase inicial da espermatogênese em animais adultos e pós-púberes, mas levou ao aumento do volume relativo das células de Leydig em ambas as idades ($p < 0,001$). Independentemente das idades, o bloqueio androgênico ocasionou o descolamento prematuro de espermátides esféricas e de espermatócitos primários, que passaram a obliterar a luz tubular. Um nível maior de descolamento celular foi encontrado nos animais púberes, dois dos quais exibiram túbulos seminíferos despopulados. Em todas as idades analisadas, mas em especial em animais adultos e pós-púberes, a terapia com flutamida induziu a degeneração de espermatócitos primários. Em conclusão, a terapia de curta duração com este antiandrógeno não esteroidal induz a maturação testicular em animais púberes e causa lesões degenerativas e severo descolamento celular em todas as idades analisadas, comprometendo, pelo menos temporariamente, o processo espermatogenético nesta espécie de roedor.

INTRODUÇÃO

A espermatogênese é um processo de diferenciação celular altamente complexo, cuja regulação depende da coordenação metabólica entre células de Sertoli, células de Leydig e células germinativas. Estudos experimentais *in vivo* têm procurado elucidar os mecanismos hormonais e locais envolvidos no controle da espermatogênese em roedores, humanos e demais primatas e excelentes revisões sobre o tema estão disponíveis (GNESSI et al., 1997; SINHA HIKIN et al., 1999; McLACHLAN et al., 2002). O uso de bloqueio androgênico por administração de agentes antiandrogênicos isoladamente (CHANDOLIA et al., 1991; JUNIEWICZ et al., 1993; OKAHARA et al., 2000; MORGANTE et al., 2001) ou em associação com outros supressores hormonais (HILD et al., 2001; SHETTY et al., 2000 – 2001; HIROSHI et al., 2001) tem se revelado uma abordagem extremamente útil na elucidação dos sítios específicos de ação hormonal ao longo deste processo (BALBOTIN, 1994). Entretanto, em decorrência da diversidade de tratamentos e modelos animais utilizados, bem como da dificuldade de se analisar isoladamente o efeito específico de cada hormônio, muitos aspectos da regulação do desenvolvimento espermatogenético permanecem obscuros e não existe um consenso sobre o impacto do uso destes antiandrógenos para a estrutura e função testicular.

Embora a maioria dos agentes androgênicos tenha sido desenvolvida para aplicação terapêutica no tratamento de patologias andrógeno dependentes, tais como hiperplasia e neoplasias prostáticas (LABRIE, 1993; LUO et al., 1997; SMALL et al., 1997; ABRAHANSSON, 2001), seu uso tem se difundido amplamente no tratamento de distúrbios como acne e hirsutismo (NEUMANN e TOPERT, 1986), de incidência elevada em indivíduos jovens. Assim, torna-se interessante comparar os efeitos do uso

unesp

destes agentes sobre a estrutura testicular e espermatogênese em diferentes períodos do desenvolvimento pós-natal.

A flutamida (4-nitro-3-trifluorometil-isobutilanilida) é um agente antiandrogênico que atua como antagonista do receptor nuclear de andrógeno (MARCHETTI e LABRIE, 1988; LABRIE et al., 1993; LUO et al., 1997). Sua grande aceitação como agente terapêutico em comparação com outras drogas antiandrogênicas é decorrente dos poucos efeitos colaterais, da satisfatória manutenção das funções reprodutoras e da libido e da baixa incidência de sinais clínicos de feminilização (MARCHETTI e LABRIE, 1988).

O presente estudo foi delineado com o objetivo de avaliar o efeito do bloqueio direto da ação da testosterona sobre a estrutura testicular e espermatogênese de cobaias em diferentes períodos do desenvolvimento pós-natal, utilizando-se para isso tratamento de curta duração com flutamida. Com base nos dados obtidos podemos concluir que a terapia aguda com este antiandrógeno não esteroidal induz a maturação testicular em animais púberes e causa lesões degenerativas e severo descolamento celular em todas as idades analisadas, comprometendo, pelo menos temporariamente o processo espermatogenético nesta espécie de roedor.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento Experimental

Foram utilizadas 30 cobaias machos (*Cavia porcellus*), provenientes do Biotério Central da Unesp, Câmpus de Botucatu, e mantidos sob condições controladas de temperatura e luminosidade, no Biotério do

Laboratório de Microscopia e Microanálise do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Unesp – Campus de São José do Rio Preto.

Grupos contendo dez animais foram separados segundo as fases do desenvolvimento pós-natal, previamente estabelecidas por Horsfall e cols. (1994), em púberes (15-60 dias de idade), pós-púberes (60-120 dias de idade) e adultos (120-360 dias de idade). O início do tratamento ocorreu nas idades de 30, 85 e 235 dias, respectivamente. Metade dos animais de cada grupo recebeu 0,5ml de injeção subcutânea diária contendo 10mg/Kg de flutamida (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) em 1% de gelatina e 0,9% da NaCl, durante dez dias (MARCHETTI e LABRIE, 1988). A outra metade foi tratada, durante o mesmo período, apenas com veículo farmacológico. As injeções foram administradas entre as 8 e 10horas.

Após o período de tratamento, os animais foram anestesiados com éter etílico, mortos por deslocamento cervical e os testículos imediatamente removidos.

Análise histológica

Os testículos foram imersos imediatamente em solução fixadora Karnovsky (paraformaldeído a 5% e glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato Sörensen 0,1M, pH 7,2), e, após 30min, seccionados em fragmentos de 5mm de espessura e processados para inclusão em historresina (Leica-historesin embbeding kit). Os cortes histológicos de 3µm de espessura foram corados com Hematoxilina-Eosina e com a técnica de impregnação pela prata da reticulina de Gömöri (GÖMÖRI, 1937; BEHMER et al., 1976).

Desenvolvimento testicular

O grau de maturação testicular foi avaliado com base no Escore de Johnsen (1970), o qual foi modificado para aplicação ao desenvolvimento testicular de cobaias. Para cada animal 200 túbulos foram estadiados, segundo o escore da TABELA 1, e então calculado o valor médio para cada animal.

Análises morfométrico-esterológicas

Todas as análises quantitativas foram realizadas a partir de três fragmentos testiculares diferentes de cada animal, com o uso de *Câmera CCD-IRIS (Sony)* e do sistema analisador de Imagens Image-Pro®Plus version 4.5 for Windows™, acoplados ao microscópio de luz Olympus.

O diâmetro dos túbulos seminíferos foi medido sob o aumento de 200x, utilizando-se 50 túbulos por animal. O volume relativo dos principais componentes testiculares (túbulos seminíferos, células de Leydig, vasos sangüíneos e outros componentes do tecido intersticial) foi determinado no mesmo aumento, com o uso do sistema-teste de arranjo triangular M168 de Weibel (1978), baseado na aplicação de retículo com 168 pontos à imagem e subseqüente cálculo da porcentagem relativa de cada componente (HUTTUNEN et al., 1981).

A freqüência de cada tipo celular do epitélio germinativo foi estabelecida em 50 cortes transversais de túbulos seminíferos em estádios I-VII do ciclo seminífero (CLERMONT, 1960), por animal, seguindo-se os procedimentos de Chandolia e cols. (1991), modificados para aplicação à cobaia. Esses estádios foram escolhidos por conterem representantes das principais fases de diferenciação das células

unesp

germinativas (espermatogônias, espermatócitos, espermátides esféricas e espermátides alongadas).

Os dados foram inicialmente analisados por ANOVA e se as diferenças foram significativas submetidos ao teste T, usando o Software Statistica 6.0 (Copyright©StatSoft, Inc. 1984-1996). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Efeitos do tratamento em animais púberes

A análise histológica indicou uma variação no grau de maturação testicular entre as cobaias nesta fase do desenvolvimento pós-natal. A maioria dos animais do grupo controle apresentou estrutura testicular similar à ilustrada nas Figuras 1 e 2, com túbulos seminíferos totalmente indiferenciados, enquanto os outros animais encontravam-se em fase um pouco mais adiantada da maturação gonadal (Fig. 3). Neste último caso, a espermatogênese já havia sido iniciada e a maioria dos túbulos seminíferos continha uma população variável de espermatócitos primários e eventuais espermátides esféricas embora espermátides alongadas e espermatozóides não tenham sido observados.

O testículo indiferenciado caracteriza-se pela presença de túbulos seminíferos com pequeno diâmetro (Tab. 2), significativo em relação aos períodos pós-púbere e adulto ($p< 0,0001$), sem lúmem, contendo apenas células de Sertoli imaturas e espermatogônias em diferenciação (Figs. 1, 2). A ocorrência de células epiteliais apoptóticas é bastante comum neste período do desenvolvimento pós-natal. Além disso, nesta fase do desenvolvimento observa-se uma maior quantidade

de tecido intersticial e o tecido peritubular é relativamente mais espesso (Figs. 1, 2) quando comparado com o testículo maduro.

De maneira geral, após o tratamento de curta duração com flutamida os testículos apresentaram um nível maior de maturação, com um aumento do diâmetro dos túbulos seminíferos (Tab. 2, $p < 0,0001$) em relação aos animais controle, que passaram a exibir células de Sertoli diferenciadas (Fig. 4). Além disso, espermatócitos e espermátides esféricas foram observados na grande maioria dos túbulos seminíferos (Figs. 4, 6), enquanto as espermátides finais foram encontradas apenas ocasionalmente (Figs. 6).

Várias alterações estruturais foram verificadas nos túbulos seminíferos em todos os animais do grupo púbere submetidos ao tratamento antiandrogênico. Assim, embora alguns túbulos aparecessem inalterados após a administração de flutamida, muitos passaram a exibir epitélio vacuolizado, com amplos espaços entre as células, e nítidos sinais de descolamento das células imaturas, principalmente espermatócitos e espermátides esféricas, os quais, freqüentemente, formavam grumos obliterando a luz tubular (Fig. 6). Algumas destas células, em especial os espermatócitos, apresentavam nítidos sinais de degeneração (fig. 6), sendo também comum a ocorrência de grupos de células germinativas apoptóticas (Fig. 5). Estes efeitos foram ainda mais drásticos para dois dos animais estudados, nos quais a maioria dos túbulos seminíferos apresentou epitélio com poucas células germinativas (Fig. 7) e presença de grandes quantidades de espermátides e espermatócitos no epidídimo (Fig. 8).

O nível maior de maturação testicular verificado pela análise histológica após o tratamento com o antiandrógeno foi confirmado

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

pela análise do Escore de Johnsen modificado, cujo valor médio para o grupo passou de 5,69 ± 0,4 para 7,37 ± 1,4 (Fig. 19).

A análise estereológica confirmou as informações obtidas ao exame histológico, revelando que o tratamento com flutamida induziu importantes modificações no volume relativo dos compartimentos testiculares (Fig. 20). O volume relativo do tecido seminífero aumentou significativamente de 50% ± 8 para 75% ± 6 ($p < 0,05$), alcançando valores próximos aos detectados para os animais pós-puberes normais. Verificou-se uma diminuição do volume ocupado pelos vasos sangüíneos e demais componentes do tecido intersticial, enquanto o volume relativo das células de Leydig não se alterou no grupo tratado com o antiandrógeno.

Efeitos do tratamento em animais pós-púberes e adultos

Histologicamente, os testículos dos animais pós-púberes do grupo controle foram muito semelhantes aos dos animais adultos (Figs. 9, 14), exibindo valores médios de diâmetro tubular muito próximos (Tab. 2). Nos animais pós-púberes do grupo controle, o processo de espermatogênese já havia sido iniciado em todos os túbulos seminíferos e as principais fases celulares da diferenciação espermática, bem como os estádios do epitélio seminífero foram facilmente reconhecidos (Figs. 9-11).

Em ambas as idades pós-púbere e adulta o tratamento com flutamida ocasionou desorganização da arquitetura do epitélio seminífero, com espermátides esféricas ou em início de alongação formando aglomerados próximos ao lúmem (Figs. 12,13,17). Também foi freqüente a ocorrência de massas de espermatócitos degradados na região central do túbulo (Fig 18). As células descoladas do epitélio ou

em níveis variáveis de degradação geralmente formavam grumos que bloqueavam completamente a luz tubular (Figs 12, 13, 14.), de modo que a maioria dos túbulos aparecia sem luz. Não foram detectadas alterações em termos do diâmetro tubular para estes grupos (Tab. 2).

As mudanças em termos do volume relativo dos componentes testiculares induzidas pelo tratamento com flutamida estão ilustradas na Figura 20. Nos animais controle, a maior parte do volume do órgão correspondia aos túbulos seminíferos e o tecido intersticial ocupava um percentual menor (26% ± 9 no pós-púbere e 22% ± 9 no adulto). O tratamento com o antiandrógeno levou a uma diminuição de 74% ± 7 para 68% ± 6, do volume ocupado pelo tecido seminífero nos animais pós-puberes ($p < 0,05$). No grupo controle, as células de Leydig ocuparam um volume testicular menor nos animais pós-púberes e adultos, em comparação com os animais púberes. O tratamento antiandrogênico aumentou o volume relativo deste tipo celular nos animais pós-púberes ($p < 0,001$) e nos adultos ($p < 0,001$), sendo que neste último caso os valores excederam os encontrados no período puberal.

A quantificação dos principais tipos celulares do epitélio germinativo (Fig 21) revelou um leve aumento na freqüência de espermatócitos e espermátides alongadas para os animais pós-púberes tratados (Fig. 21A) enquanto para os animais adultos verificou-se um leve aumento na freqüência de espermatogônias, um aumento acentuado na freqüência de espermátides esféricas e um aumento moderado na freqüência de espermátides alongadas (Fig 21B).

DISCUSSÃO

Os dados morfológicos e quantitativos expostos no presente estudo indicam que o tratamento de curta duração com o antiandrógeno flutamida causa, a curto prazo, severas alterações na estrutura testicular e no tecido seminífero de cobaias nas diferentes idades analisadas. Embora não tenham sido efetuados ensaios específicos para testar a efetividade do tratamento aqui empregado no bloqueio da ação da testosterona, doses bem inferiores deste antiandrógeno (0,2 a 2mg/peso de Kg corporal) têm sido usadas com sucesso em outras espécies de roedores (VOJTISKOVÁ et al., 1978). Além disso, um efeito atrófico acentuado foi relatado para próstata deste roedor com o uso desta dosagem, em condições experimentais semelhantes às utilizadas aqui, o que confirma a eficácia de sua ação antiandrogênica (CORDEIRO et al., 2003). Portanto, é razoável admitir que os achados histológicos e quantitativos observados para o testículo deste roedor, após a terapia com flutamida, são, pelo menos em parte, causados pelo bloqueio da ação da testosterona aqui empregado.

Algumas alterações testiculares decorrentes do tratamento antiandrogênico foram comuns a todas as idades. É o caso das lesões no epitélio seminífero tais como a vacuolização citoplasmática, degeneração e descolamento celular, que indicam um certo grau de comprometimento da espermatogênese. Embora a degeneração celular tenha sido previamente relatada para camundongos adultos submetidos ao bloqueio androgênico pela flutamida, por períodos prolongados de tempo (VOJTISKOVÀ et al., 1978), não são do nosso conhecimento relatos sobre a indução de eventos degenerativos em roedores em tratamentos de duração tão curta e doses moderadas, como aqui utilizado. Ainda no que se refere a bloqueios androgênicos

unesp

de curta duração, alterações celulares degenerativas muito semelhantes às encontradas no presente estudo, embora em grau mais acentuado e envolvendo inclusive perda das associações celulares típicas do epitélio seminífero, foram também descritas para o testículo de chimpanzés adultos submetidos à supressão androgênica por 21 dias com antagonista do GnRH (SMITHWICK e YOUNG, 2001). O maior grau de distúrbio na estrutura epitelial relatado para chimpanzés em comparação com os nossos resultados em cobaias pode ser explicado pela característica diferencial dos bloqueios, pela maior duração do tratamento ou mesmo pela existência de mecanismos específicos de resposta ao tratamento antiandrogênico entre primatas e roedores, hipóteses que a presente abordagem não permite esclarecer.

Em concordância com descrições anteriores (VOJTISKOVÀ et al., 1978; KERR et al., 1993; McLACHLAN et al., 1996; SMITHWICK e YOUNG, 2001), o fenômeno de degeneração celular causado pela supressão androgênica aqui detectado atinge principalmente espermatócitos em paquíteno. Embora a importância da testosterona na prevenção da degeneração de espermatócitos seja bem conhecida (KERR et al., 1993; McLACHLAN et al., 2002), os mecanismos moleculares que direcionam esse processo não são totalmente esclarecidos. O exame histológico também indicou um aparente aumento na freqüência de células apoptóticas nos grupos tratados, em especial no período púbere. Tendo em vista a dependência androgênica para a regulação negativa do processo apoptótico (SINHA HIKIN et al.,1999), torna-se interessante quantificar esse aumento em cortes histológicos previamente submetidos a marcadores específicos para células apoptóticas.

Alguns efeitos do tratamento com flutamida foram idade-dependentes. Assim, no período puberal, a terapia antiandrogênica

unesp

ocasionou um acentuado aumento na população de espermatócitos primários, acompanhado do aumento do diâmetro tubular e diferenciação histológica do testículo em direção ao um estado de maior maturidade funcional. Pelo menos em parte, essas alterações são decorrentes da diferenciação espermatogonial, o que nos permite concluir que a supressão androgênica, durante a puberdade, teve um efeito estimulador para esta fase inicial da espermatogênese. Um discreto aumento na população de espermatócitos primários também foi observado para animais pós-púberes, mas não para adultos. A estimulação da diferenciação espermatogonial tem sido previamente descrita para roedores em tratamentos antiandrogênicos de longa duração (VOJTISKOVÀ et al., 1978) e mesmo para répteis em período de recrudescência testicular (RAI e HAIDER, 1991).

Sabe-se que a testosterona é essencial para a iniciação da espermatogênese, sendo necessárias altas concentrações intratesticulares para a sua manutenção (SHARPE et al., 1988; McLACHLAN et al., 2002). Recentemente, tem sido constatado que a supressão androgênica causada pelo agonista ou antagonista do GnRH estimula a diferenciação espermatogonial e a conseqüente recuperação da espermatogênese em ratos nos quais este processo foi previamente interrompido devido a irradiação (SHETTY et al., 2000). De modo similar, camundongos com mutação no gene *jsd* ("juvenile spermatogonial depletion"), cujo processo espermatogenético é interrompido após a primeira onda (BEAMER et al., 1988), têm a espermatogênese recuperada com a administração de antagonista de GnRH (MATSUMYA et al., 1999) ou inibida após a suplementação com testosterona exógena (TOHDA et al., 2001). Portanto, a utilização de outros modelos animais e abordagens experimentais têm apontado

unesp

para um papel inibidor desse hormônio na diferenciação espermatogonial nas condições acima citadas. Com base nestes achados, os autores têm relacionado o papel inibitório da testosterona à influência, provavelmente indireta, nas espermatogônias do tipo A indiferenciadas. Nossos dados indicam que é provável que isso também se aplique ao testículo de animais normais durante o período puberal, que contém também uma grande população de espermatogônias indiferenciadas, cujos fatores envolvidos na diferenciação são ainda pouco compreendidos.

A resposta testicular observada para animais púberes foi, pelo menos em alguns aspectos, diversa da encontrada para pós-púberes e adultos, sendo mais semelhante nestes dois últimos grupos. Enquanto o tratamento com flutamida no período puberal causou uma intensa diferenciação espermatogonial e mesmo um maior nível de diferenciação espermatogenética, no período pós-púbere e adulto prevaleceram as alterações celulares degenerativas, variações nas freqüências de células germinativas e um aumento no volume de células de Leydig. Em termos da estrutura testicular, as alterações mais drásticas foram observadas no período puberal, onde dois animais do grupo tratado com flutamida apresentaram a maioria dos túbulos seminíferos com alto nível de despopulação, restando apenas ocasionais espermatócitos primários no testículo, visto que a maioria das células degeneradas ou descoladas foram observadas no epidídimo.

Provavelmente as variações na resposta ao tratamento são conseqüência dos diferentes níveis hormonais, principalmente de andrógenos, encontrados em cada fase. Tem sido relatado, ao longo do desenvolvimento pós-natal de roedores, um aumento na concentração sérica de testosterona nas semanas que antecedem o

unesp

período puberal e níveis ainda mais altos foram observados durante o período pós-puberal (VILAMAIOR, 2003). Portanto, é possível que a ação mais drástica aqui constatada para os animais púberes seja conseqüência de uma maior efetividade do bloqueio androgênico, visto a menor competição com o receptor, conforme tem sido previamente relatado para testículo (McLACHLAN et al., 2002) e também para a próstata (ZHAO et al., 1993; CORDEIRO et al., 2003).

A interpretação dos dados causados por interrupções transitórias do controle hormonal da função testicular normal é cercada de inúmeras dificuldades, tendo em vista a complexidade inerente ao processo de diferenciação das células germinativas e as inúmeras interações entre diferentes hormônios e fatores parácrinos, as quais na maioria das vezes não permitem avaliar o efeito de um agente hormonal isolado (McLACHLAN et al., 2002). Apesar do uso de delineamento experimental relativamente simples para análise dos efeitos diretos do bloqueio da ação da testosterona sobre o testículo, é provável que algumas das alterações aqui verificadas sejam resultado da influência da flutamida nos níveis de outros hormônios, sendo, portanto conseqüência de sua ação indireta. Em roedores, a flutamida bloqueia a atividade de "feedback" negativo que a testosterona exerce sobre o eixo hipotálamo-pituitário aumentando a liberacão de LH e, por conseguinte, a síntese de testosterona (VIGUIER-MARTINEZ et al., 1983; NEUMANN e TOPERT, 1986). Isso explica a hipertrofia das células de Leydig descrita para cobaias pós-púberes e adultas e também para outros roedores (VOJTISKOVÀ et al., 1978), após o tratamento com antiandrógenos puros. Nestas condições, o aumento da concentração de testosterona leva ao aumento da secreção de FSH. Com bases nestas considerações é possível assumir que parte das alterações

unesp

observadas, principalmente o estímulo ao desenvolvimento espermatogonial, são conseqüência do aumento dos níveis deste hormônio, uma vez conhecido seu efeito estimulatório nesta fase específica.

As análises histológicas e das freqüências de células germinativas indicam que o bloqueio da testosterona por este período não foi suficiente para interromper imediatamente a atividade espermatogênica em animais adultos e pós-puberes. Tendo em vista as maiores concentrações de testosterona nestas idades, uma das explicações para esse fato seria que em condições de bloqueio androgênico parcial, o FSH, em concentração normal ou mais elevado, seria capaz de sustentar a fase inicial da espermatogênese (McLACHLAN et al., 1996).

Tendo em vista que os estudos existentes até o momento mostram que a duração da espermatogênese e conseqüentemente as associações celulares presentes no epitélio não são alteradas por tratamentos experimentais (MÄUSLE et al., 1982; McLACHLAN et al., 2002) e considerando ainda que nesta espécie um novo clone de células é formado a cada 10-12dias (NOLLER et al., 1977), as variações na freqüência de células germinativas devem ser interpretadas como decorrentes da ação do tratamento naquela fase de diferenciação específica ou na fase anterior. Assim, podemos sugerir que o aumento na quantidade de espermátides esféricas detectado para animais adultos, após o tratamento com flutamida, seja conseqüência de interferência no processo de alongação, conhecidamente dependente de testosterona (McLACHLAN et al., 2002). Do mesmo modo o aumento na quantidade de espermátides alongadas pode ser conseqüência de

sua retenção no epitélio, uma vez que o papel da testosterona na espermiação também é bem conhecido (McLACHLAN et al., 2002).

Em conclusão, o tratamento durante 10 dias com doses diárias de flutamida induz lesões celulares degenerativas e descolamento prematuro de espermatócitos e espermátides esféricas no tecido seminífero de cobaias púberes, pós-púberes e adultas. Os estudos existentes na literatura usam preferencialmente tratamentos a longo prazo, tendo em vista o período longo de duração da espermatogênese, que dificulta a análise dos efeitos sobre as células da linhagem germinativa em tempos curtos. Assim, consideramos que a principal contribuição do atual estudo relaciona-se as evidências de lesões degenerativas graves em células epiteliais causadas pelo bloqueio da testosterona por curto período de tempo. Com o intuito de avaliar especificamente o comprometimento deste tratamento para a fisiologia testicular, torna-se interessante examinar em maiores detalhes o seu impacto sobre a estrutura das diferentes populações celulares do testículo (MASCHIO et al., 2003). Além disso, apesar das evidências da literatura que indicam uma recuperação testicular satisfatória, mesmo em tratamentos antiandrogênicos a longo prazo, a descrição dos processos de reparação das lesões aqui descritas certamente contribuirá para o esclarecimento dos efeitos secundários do uso terapêutico deste antiandrógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSSON, P.A. Treatment of locally advanced prostate cancer. A new role for antiandrogen monotherapy? Eur Urol, v. 39, p. 22-28, 2001.

BALBOTIN, J.B. Flutamide as a tool to-study the hormonal regulation of the reproductive tract in the golden hamster. Andrology, v. 26, p. 27-32, 1994.

BEAMER, W.G. ; CUNLIFE-BEAMER, T.L. ; LANGLEY, S.H. ; RODERICK, T.H. Juvenile spermatogonial depletion (jsd): a genetic defect of germ cell proliferation of male mice. Biol Repord, v. 38, p. 899-908, 1988.

BEHMER, A.O. ; TOLOSA, E.M.C. ; FREITAS-NETO, A.G. Manual para histologia normal e patológica. Edart-Edusp, São Paulo, 225p, 1976.

CHANDOLIA, R.K. ; WEINBAUER, G.F. ; SIMONI, M. ; BEHRE, H.M. ; NIESCHLAG, E. Comparative effects of chronic adminisntration of the non-seteroidal antiandrogens flutamide and Casodex on the reprodutive system of the adult male rat. Acta Endocrinol, v. 125, p. 547-555, 1991.

CLERMONT, Y. Cycle of the seminiferous epithelium of the guinea pig. Fertil Steril, v. 6, p. 563-578, 1960.

CORDEIRO, R.S. ; TABOGA, S.T. Avaliação histoquímica e morfométrica do lobo lateral da próstata de cobaia (Cavia porcellus) sob efeito da terapia anti-androgênica pela flutamida. 2003. In press.

GNESSI, L. ; FABBRI, A. ; SPERA, G. Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. Endocr Ver, v. 18, n. 4, p. 541-590, 1997.

GÖMÖRI, G. Silver impregnation for reticulin in paraffin sections. Am. J. Pathol., Aust, v. 140, p. 219-221, 1937.

HILD, A.S. ; MEISTRICH, M.L. ; BLYE, R.P. ; REEL, J.R. Lupron depot prevention of antispermatogenic / antifertility activity of the indenopyridine, CDB-4022, in the rat. Biol Reprod, v. 65, p. 165-172, 2001.

HIROSHI, O. ; KENTARO, Y. ; TADOKORO, Y. ; HTOHDA, A. ; DOHMAE, K. ; NISHIMUNE, Y. Defects in germ cells, not in supporte cells, is the cause of male infertility in the (jsd) mutant mouse: proliferation of spermatogonial stem cells without differentiation. Int Rev Androl, v. 24, p.15-23, 2001.

HORSFALL, D.J. ; MAYNE, K. ; RICCIARDELLI, C. ; RAO, M. ; SKINNER, J.M. ; HENDERSON, D.W. ; MARSHALL, V.R. ; TILLEY, W.D. Fase-related in guinea pig prostatic stroma. Lab Invest, v. 70, p. 753-763, 1994.

HUTTUNEN, E. ; ROMPPNEN, T. ; HELMINEN, H.J. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. J. Anatomy, v. 3, p. 357-370, 1981.

JOHNSEN, S.G. Testicular biopsy score count- a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. Hormones, v. 1, p. 2-25, 1970.

JUNIEWICZ, P.E. ; HOEKSTRA, S.J. ; LEMP, B.M. ; BARBOLT, T.A. ; DEVIN, J.A. ; GAUTHIER, E. ; FRENETTE, G. ; DUBE, J.Y. Effect of combination treatment with Zanoterone (WIN 49596), a steroidal androgen receptor antagonist, and Finasteride (MK-906) a steroidal 5 alpha-redutase inhibitor, on the prostate and testes of beagle dogs. Endocrinology, v. 133, n. 2, p. 904-913, 1993.

KERR, J.B. ; MILLAR, M. ; MADDOCKS, S. ; SHARPE, R.M. Anatomical Record, v. 235, p. 547-559, 1993.

LABRIE, F. Mechanism of action and pure antiandrogenic properties of flutamide. Cancer, v. 72, n. 12, p. 3816-3827, 1993.

LUO, S.Q. ; MARTEL, C. ; CHEN, C.L. ; LABRIE, C. ; CANDAS, B. ; SINGH, S.M. ; LABRIE, F. Daily dosing with Flutamide or Casodex exerts maximal antiandrogenic activity. Urology, v. 50, p. 913-919, 1997.

MARCHETTI, B. ; LABRIE, F. Characteristics of flutamide action on prostatic and testicular functions in rat. J Steroid Biochem, v. 29, n. 6, p. 691-698, 1988.

MASCHIO, L.R. ; PINTO, M.E. ; CORDEIRO, R.S. ; TABOGA, S.R. ; GÓES, R.M. Ultrastructural evaluation of flutamide treatment upon different cell types of guinea pig testis. XIX Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise. Acta em preparo. 2003.

MATSUMIYA, K. ; MEISTRICH, M.L. ; SHETTY, G. ; DOHMAE, K. ; TOHDA, A. ; OKUYAMA, A. ; NISHIMUNE, Y. Stimulation of spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion (jsd) mutant mice

by gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. Endocrinology, v. 140, n. 10, p. 4912-4915, 1999.

MÄUSLE, E. ; STÄDTLER, F. ; STENGER, D. Effects of cyproterone acetate and oestradiol benzoate on the rat testis. Path. Res. Pract., v. 173, p. 218-224, 1982.

McLACHLAN, R.I. ; WREFORD, N.G. ; O´DONNELL, L. ; de KRETSER, D.M. ; ROBERTSON, D.M. The endocrine regulation of spermatogenesis: independ roles for testosterone and FSH. J Endocrinol, v. 148, p. 1-9, 1996.

McLACHLAN, R.I. ; O´DONNELL, L.O. ; MEACHEM, S.J. ; STANTON, P.G. ; KRETSER, D.M. ; PRATIS, K. ; ROBERTSON, D.M. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. Endocr Society, p. 149-179, 2002.

MORGANTE, E. ; GRADINI, R. ; REALACCI, M. ; SALE, P. ; D'ERAMO, G. ; PERRONE, G.A. ; CARDELO, M.R. ; PETRANGELI, E. ; RUSSO, M.A. ; SILVERIO, F. Effects of long-term treatment with the anti-adrogen bicalutamide on human testis: an ultrastructural and morphometric study. Histopathology, v. 38, n. 3, p. 195-201, 2001.

NEUMANN, F. & TOPERT, M. Pharmacology of antiandrogenics. J. Steroid Biochem, n. 25, p. 885-895, 1986.

NOLLER, D.W. ; HOWARDS, S.S. ; FLICKINGER, C.J. Duration of the seminiferous epithelial cycle in the mature guinea pig: influence of unilateral orchiectomy. Fertil Steril, v. 28, n. 9, p. 998-1002, 1977.

OKAHARA, A. ; NOMURA, A. ; TANIOKA, H. ; SAKAMOTO, H. ; YAMASHITA, K. ; IKUSE, T. Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats 5. Effects of repeated doses of Flutamide for 2 and 4 weeks. J Toxical Sci, v. 25, p. 63-70, 2000.

RAI, U. & HAIDER, S. Testis and epididymis of the indian wall lizard (Hemidactylus flaviviridis): Effects of Flutamide on FSH and testosterone influenced spermatogenesis, Leydig cell, and epididymis. J Morphol, v. 209, p. 133-142, 1991.

SHARPE, R.M. ; DONACHIE, K. ; COOPER, I. Re-evaluation of the intratesticular level of testosterone required for quantitative maintenance of spermatogenesis in the rat. J Endocrinol, v. 117, p. 19-26, 1988.

SHETTY, G. ; WILSON, G. ; HUHTANIEMI, I. ; BOETTGER-TONG, H. ; MEISTRICH, M.L. Testosterone inhibits spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion mice. Endocrinology, v. 142, p. 2789-2795, 2001.

SHETTY, G. ; WILSON, G. ; HUHTANIEMI, I. ; SHUTTLESWORTH, G.A. ; REISSMANN, T. ; MEISTRICH, M.L. Gonadotropin-releasing hormone analogs stimulate and testosterone inhibits the recovery of spermatogenesis in irradiated rats. Endocrinology, v. 141, n. 5, p.1735-1745, 2000.

SINHA HIKIN, A.P. ; SWERDLOFF, R.S. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. Rev Reprod, v. 4, p. 38-47, 1999.

SMALL, E.J. ; BARON, A. ; BOK, R. Simultaneous antiandrogen withdrawal and treatment with ketoconazole and hydrocortisone in patients with advanced prostate carcinome. Cancer, v. 80, n. 9, p. 1755-1759, 1997.

SMITHWICK, E.B. ; YOUNG, L.G. Effects of androgen deprivation on the histology of adult chimpanzee testis. Tissue & Cell, v. 33, n. 3, p. 262-272, 2001.

TOHDA, A. ; MATSUMIYA, K. ; TADOKORO, Y. ; YOMOGIDA, K. ; MIYAGAWA, Y. ; DOHMAE, K. ; OKUYAMA, A. ; NISHIMUNE, Y. Testosterone supresses spermatogenesis in juvenile spermatogonial depletion jsd mice. Biol Reprod, v. 65, p. 532-537, 2001.

VIGUIER-MARTINEZ, M.C. ; HOCHEREAU de REVIERS, M.T. ; BARENTON, B. ; PERREAU, C. Endocrinological and histological changes induced by flutamide treatment on the hypothalamo-hypophyseal testicular axis of the adult male rat and their incidences on fertility. Acta Endocrinol, v. 104, p. 246-252, 1983.

VILAMAIOR, P.S.L. Regulação hormonal e interações células-matriz extracelular na próstata ventral de ratos. 2003, 91p Tese (Doutorado em Biologia Celular), Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, 2003p.

VOJTÍSKOVÁ, M. ; POLÁCHOVÁ, M. ; VIKLICKÝ, V. ; KHODA, M.E. Reversible inhibitory effect of the non-steroidal antiandrogen flutamide (SCH 13521) on spermatogenesis in mice. Endokrinologie, v. 71, n. 2, p. 135-142, 1978.

WEIBEL, E.R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. Laboratory Investigation, v. 12, p. 131-155, 1978.

ZHAO, C.Y. ; TAM, C.C. ; WONG, Y.C. Morphogenesis and ductal development of the prostatic complex of guinea pig. J Morphol, v. 217, p. 219-227, 1993.

TABELA 1: Escore de JONHSEN para avaliação da maturação testicular, modificado para aplicação a cobaias em diferentes idades.

Escore	Aspecto histológico
10	Espermatogênese completa, numerosos espermatozóides
9	Ausência de espermatozóides, numerosas espermátides alongadas.
8	Ausência de espermatozóides e espermátides alongadas, mas numerosas espermátides esféricas.
7	Ausência de espermatozóides, poucas espermátides, numerosos espermatócitos e espermatogônias.
6	Ausência de espermatozóides e espermátides esféricas, numerosas espermatogônias e raros espermatócitos.
5	Ausência de espermatozóides, espermátides e espermatócitos, mas numerosas espermatogônias.
4	Ausência de espermatozóides, espermátides e espermatócitos, poucas espermatogônias (<10).
3	Ausência de células germinativas, apenas células de Sertoli.
2	Poucas células de Sertoli (<10).
1	Ausência de células no túbulo.

TABELA 2: Diâmetro dos túbulos seminíferos (μm) de animais tratados com veículo farmacológico (Controle) e com a flutamida (Tratamento anti-androgênico). Estão representados os valores médios ± desvio padrão.

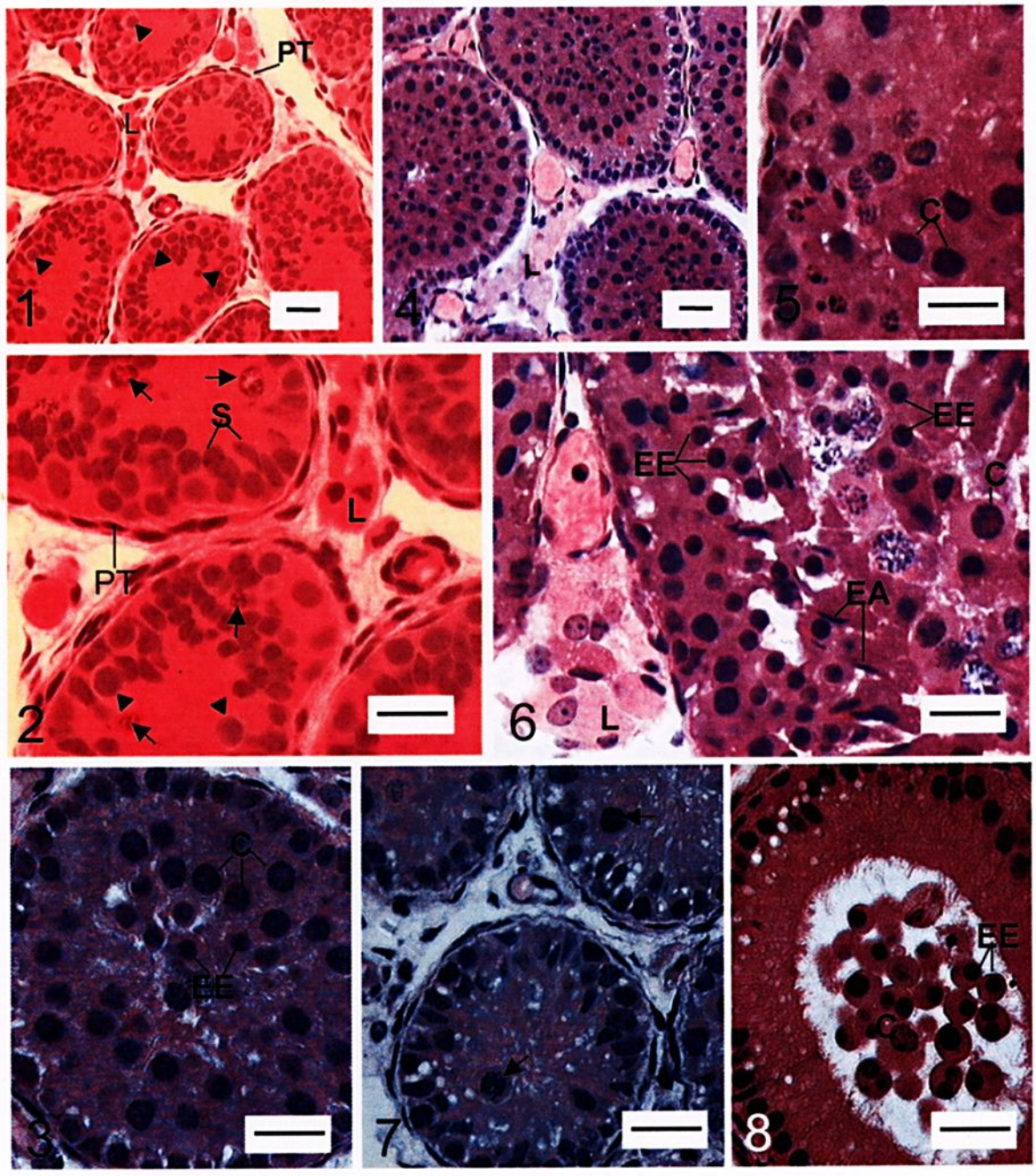
Períodos do desenvolvimento	Animais	Controle	Tratamento Antiandrogênico
Púbere	1	80,6 ± 8,8	144,3 ± 7,5
	2	112,5 ± 13,5	144,9 ± 17,6
	3	133,5 ± 26,2	114,1 ± 14,5
	4	159,0 ± 34,3	161,2 ± 26,8
	5	117,6 ± 177	109,3± 11,0
	Média ± d.p.	**121,2 ± 34,1**	**135,0± 26,1 ***
Pós-Púbere	1	259,3 ±42,8	238,1 ± 36,0
	2	257,5± 40,8	252,9 ± 48,4
	3	260,6 ±57,8	248,0 ± 45,4
	4	234,0 ± 31,6	275,9 ± 47,2
	5	260,0 ± 46,6	240,3 ± 35,4
	Média ± d.p.	**252,8 ± 43,4**	**251,1± 44,6**
Adulto	1	244,3 ± 38,8	254,0 ± 41,2
	2	249,4 ± 36,7	226,0 ± 28,0
	3	262,8 ± 41,1	264,5 ± 41,0
	4	274,0 ± 41,8	267,4 ± 37,0
	5	276,4 ± 38,4	260,8 ± 24,9
	Média ± d.p.	**261,5 ± 41,1**	**257,7 ± 34,5**

* $p < 0,0001$

unesp

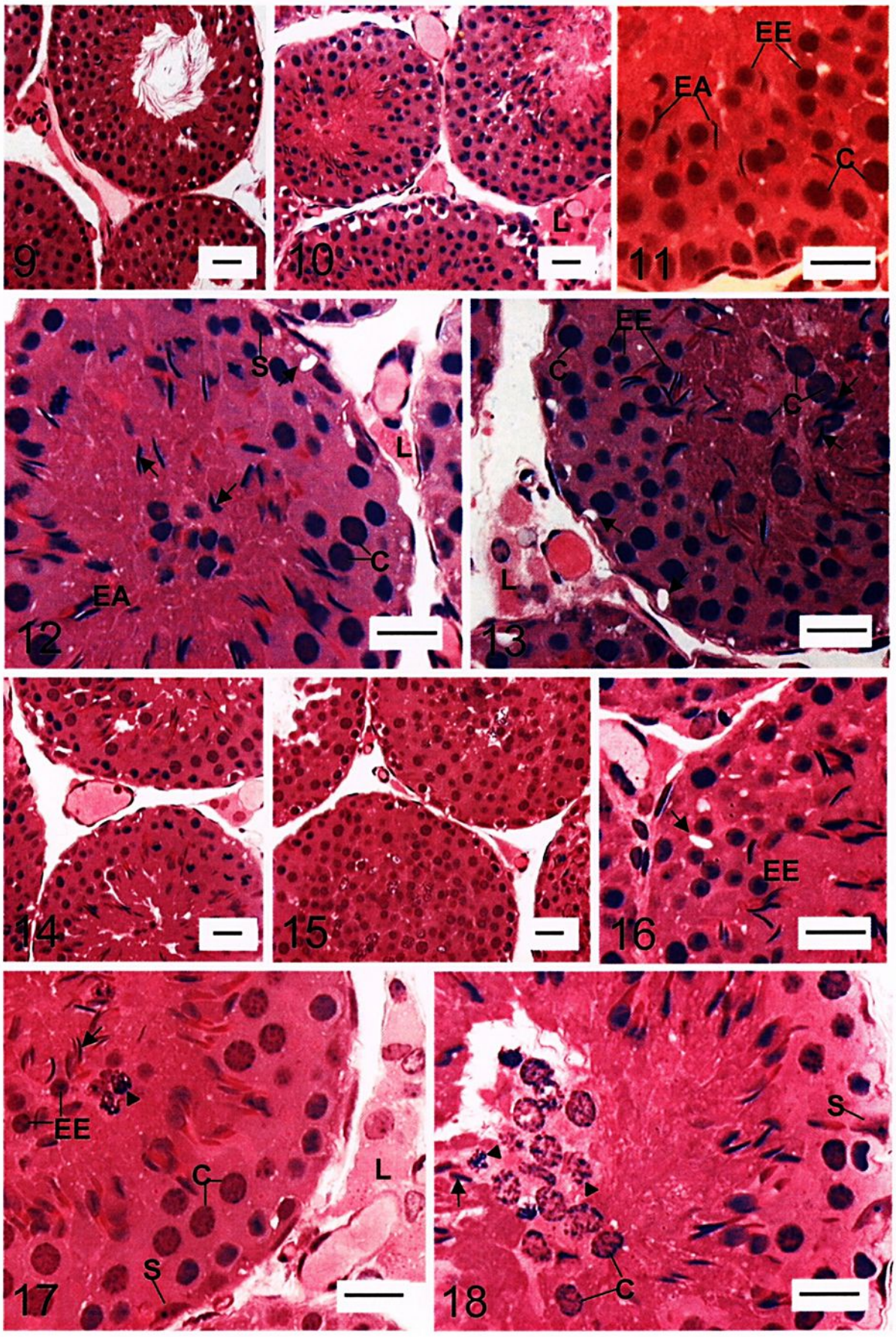
FIGURAS 1-8: Cortes em historresina corados com Hematoxilina-Eosina mostrando túbulos seminíferos **(1-7)** e epidídimo **(8)** de animais púberes do grupo controle (Figs. 1-3) e tratados com flutamida (Figs. 4-8). **Figs. 1-3:** Visão geral **(1)** e detalhe **(2, 3)** do testículo mostrando os túbulos seminíferos, o tecido peritubular (PT) e aglomerados de células de Leydig (L). Em alguns animais **(1, 2),** o epitélio seminífero continha apenas espermatogônias (cabeças de seta), células de Sertoli indiferenciadas (S) e freqüentes células apoptóticas (setas), enquanto, em outros, exibia inúmeros espermatócitos primários (C) e raras e espermátides esféricas (EE). **Figs. 4-6:** Animais tratados com flutamida exibiram aumento das células de Leydig (L), aumento da população de espermatócitos primários (C) e de espermátides esféricas (EE) e o surgimento de espermátides alongadas (EA). **Fig. 7:** Alguns testículos de animais submetidos ao tratamento antiandrogênico apresentaram um alto nível de depopulação de células germinativas, exibindo apenas eventuais espermatócitos primários (setas). **Fig. 8:** Nota-se a grande quantidade de espermátides esféricas e espermatócitos primários no interior do dúctulo do epidídimo de cabaias púberes tratadas com flutamida. 1, 4 = 200x; 2, 3, 5 a 8 = 400x.

unesp


PT
L
1
L
4
C
5
S
L
PT
2
EE
EE
C
EA
L
6
C
EE
3
7
EE
C
8

FIGURAS 9-18: Cortes em historresina corados com Hematoxilina-Eosina mostrando túbulos seminíferos de animais pós-púberes **(9-13)** e adultos **(14-18)**, tratados apenas com o veículo farmacológico **(9, 11, 14)** ou com flutamida **(10, 12, 13, 15-18)**. O testículo de animais pós-púberes do grupo controle **(9)** assemelha-se ao de adultos controle **(14)**, apresentando as principais fases de diferenciação espermatogonial **(11)**. Tais fases também são detectadas em ambas as idades, após o tratamento antiandrogênico **(10, 12, 13, 15-18)**, entretanto, grumos de espermatócitos primários (C), espermátides esféricas (EE) ou em início de alongação (setas), prematuramente descolados do epitélio, foram observados obliterando o lúmem tubular **(12, 13, 17, 18)**. Vacuolização citoplasmática **(12, 13, 16** – setas**)** e espermatócitos degenerados **(17, 18** - cabeças de seta**)** foram observados após o tratamento antiandrogênico. Legenda: espermátides alongadas (EA), células de Sertoli (S), e células de Leydig (L). 9, 10, 14, 15 = 200x; 11 – 13, 16 -18 = 400x.

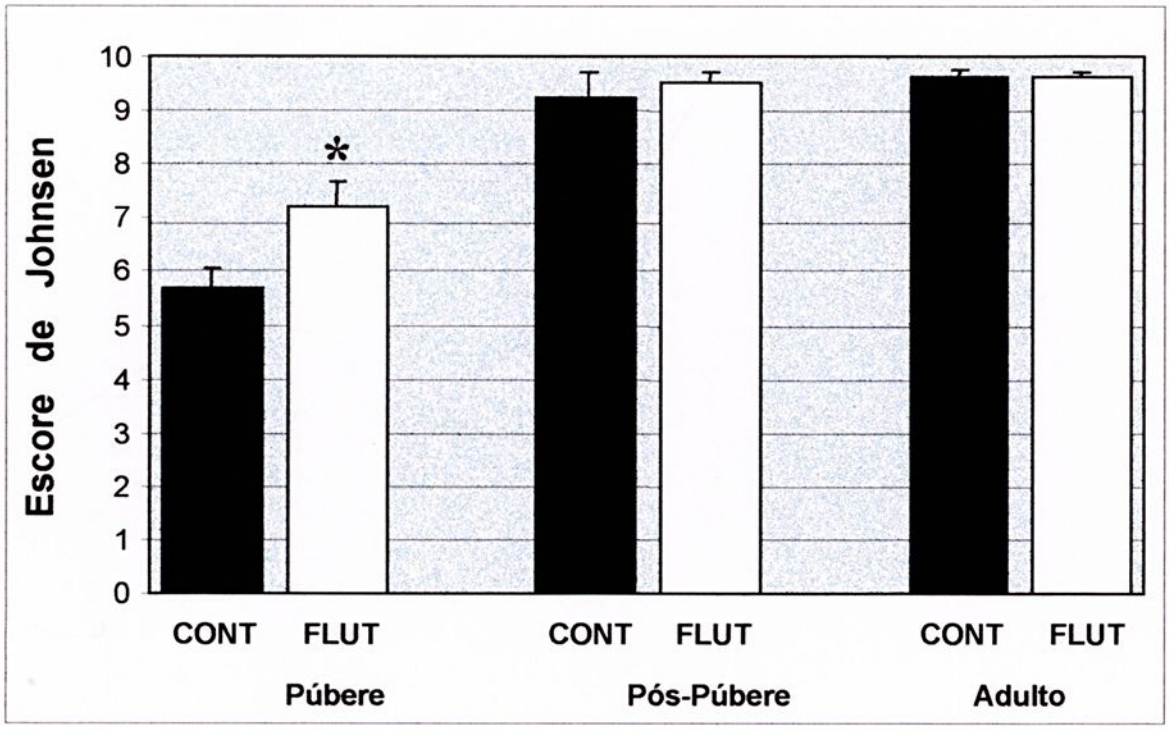
unesp


9
10
L
11
EE
EA
C
12
S
L
C
EA
13
EE
C
C
L
14
15
16
EE
17
EE
C
L
S
18
S
C

t. 1.292/04

FIGURA 19: Mudanças no nível de maturação testicular induzidas pelo tratamento com flutamida, verificada pela análise do Escore de Johnsen modificado. * $p < 0,05$.

unesp



Univ. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
- S. J. Rio Preto -

FIGURA 20: Influência do tratamento com flutamida sobre o volume relativo (%) dos componentes testiculares em animais púberes **(A)**, pós-púberes **(B)** e adultos **(C).** a = $p < 0,05$; b = $p < 0,001$.

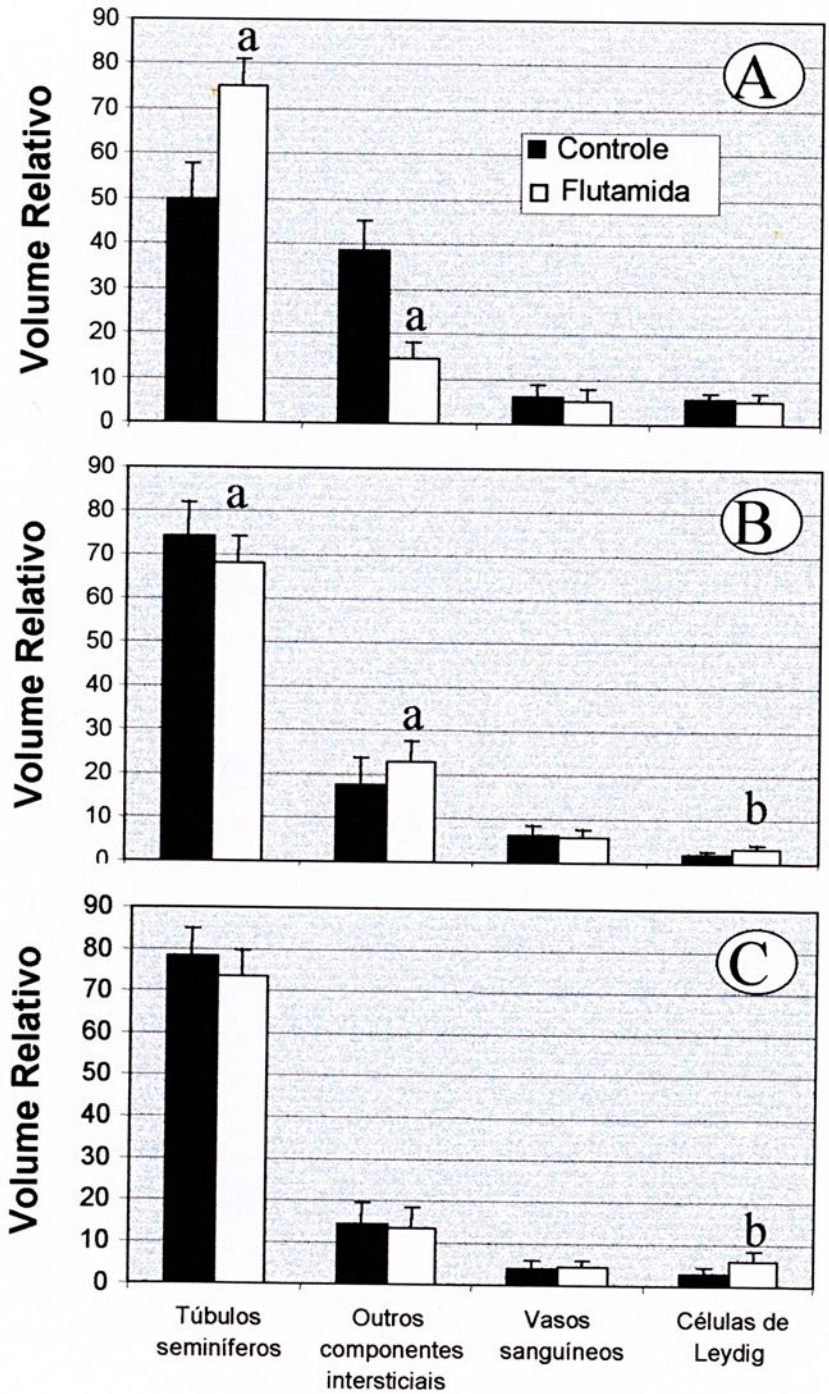
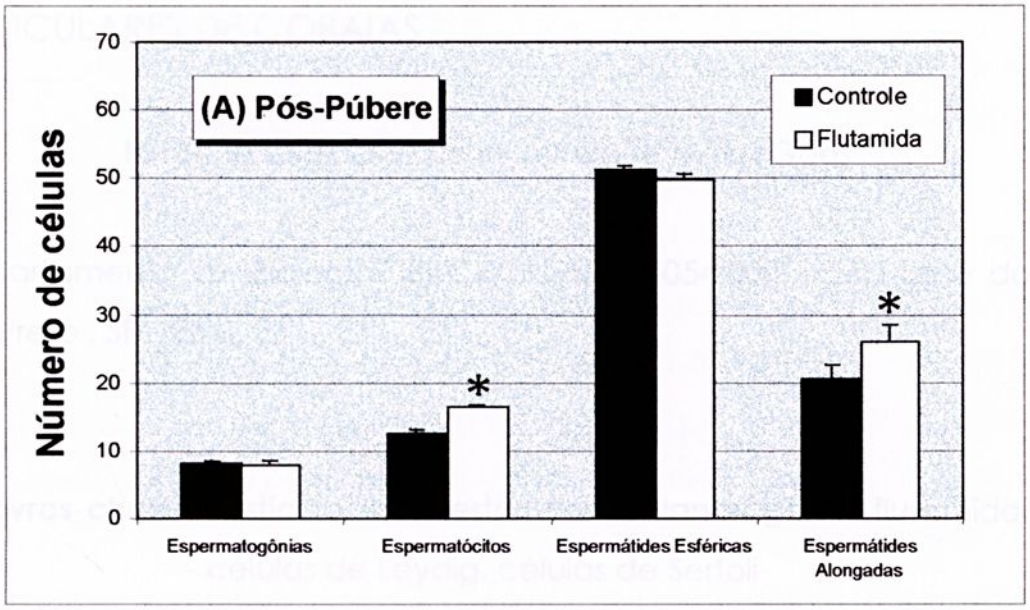
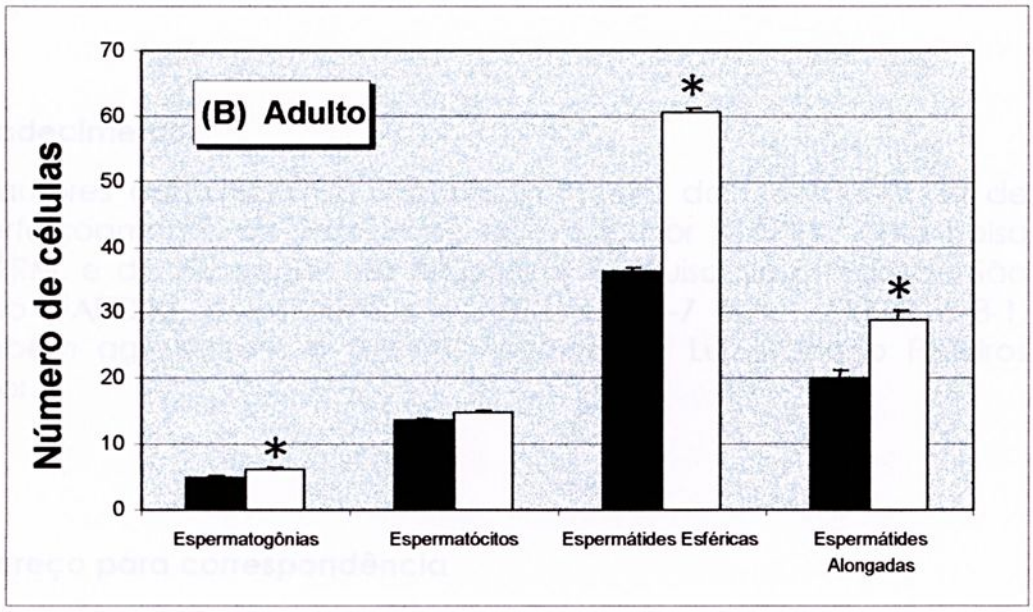

A
B
C
Volume Relativo
Volume Relativo
Volume Relativo
Controle
Flutamida
a
a
a
a
b
b
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
Túbulos seminíferos
Outros componentes intersticiais
Vasos sanguíneos
Células de Leydig

FIGURA 21: Variação na freqüência dos tipos celulares do epitélio seminífero em animais pós-púberes e adultos, tratados com o veículo farmacológico e com flutamida. * $p < 0,05$.


(A) Pós-Púbere
Controle
Flutamida
Número de células
70
60
50
40
30
20
10
0
*
*
Espermatogônias
Espermatócitos
Espermátides Esféricas
Espermátides Alongadas


(B) Adulto
Número de células
70
60
50
40
30
20
10
0
*
*
*
Espermatogônias
Espermatócitos
Espermátides Esféricas
Espermátides Alongadas

IMPACTO DO TRATAMENTO DE CURTA DURAÇÃO COM FLUTAMIDA SOBRE A ULTRA-ESTRUTURA DAS CÉLULAS TESTICULARES DE COBAIAS

Lucilene Regina Maschio e Rejane Maira Góes

Departamento de Biologia- IBILCE/UNESP, 15054-000 – São José do Rio Preto , SP, Brasil.

Palavras-chave: testículo, ultra-estrutura, antiandrógeno, flutamida, células de Leydig, células de Sertoli

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de LRM, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos auxílios no. 2001-12078-7 e no. 2000/11648-1. Também agradecem o suporte Técnico de Luiz Roberto Falleiros Júnior.

Endereço para correspondência

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE – UNESP
Departamento de Biologia
Rua Cristóvão Colombo, 2265
Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, SP, Brasil.
CEP: 15054-000

RESUMO

O presente estudo apresenta uma descrição dos efeitos do tratamento com o antiandrógeno flutamida sobre a estrutura das células do testículo de cobaias púberes e adultas. Durante 10 dias, os animais de ambas as idades receberam injeções subcutâneas diárias de flutamida (10mg/kg de peso corporal), sendo, então, sacrificados e os testículos processados para análise em microscopia eletrônica de transmissão. Com base na análise ultra-estrutural constatamos que o tratamento antiandrogênico induziu: (i) a aquisição de um fenótipo de atividade esteroidogênica intensa, em células de Leydig de animais púberes, aumentando sua atividade metabólica também em adultos; (ii) levou à diferenciação das células de Sertoli no período puberal, (iii) aumentou a quantidade de organelas envolvidas com a via biossintética secretora de espermatócitos em início de paquíteno nos animais púberes, levando a posterior degeneração destas células em ambas as idades; (iv) não afetou a estrutura das espermatogônias nem acarretou alterações morfológicas evidentes durante os processos de diferenciação espermática; (v) ocasionou o surgimento de grandes quantidades de figuras mielínicas em células de Sertoli em ambas as idades e em células de Leydig, principalmente no período puberal. Em conclusão, o uso de doses moderadas de flutamida, por curto período de tempo, afeta a estrutura das células de Leydig, que passam a exibir características de maior atividade esteroidogênica. Além disso, a flutamida também induz o acúmulo de vesículas mielínicas, neste tipo celular e em maior grau nas células de Sertoli, comprometendo sua organização estrutural e provavelmente interferindo no funcionamento celular.

INTRODUÇÃO

Antiandrógenos são compostos que suprimem a síntese de andrógenos ou bloqueiam sua ação em tecidos-alvo devido à competição com os receptores androgênicos específicos (NEUMANN e TOPERT, 1986; BURTON e TRACHTENBERG, 1986). A utilização terapêutica destes agentes é conhecida como castração química, pois impede a ação androgênica periférica, promovendo, em órgãos andrógeno-dependentes como a próstata, efeitos semelhantes aos da castração (LUO et al., 1997; SMALL et al., 1997; ABRAHAMSSON, 2001; MORGANTE et al., 2001).

Os testículos são, ao mesmo tempo, o principal local de produção e ação de andrógenos e, por esse motivo, a concentração de testosterona intratesticular é cerca 40-50 vezes maior do que na circulação (McLACHLAN et al., 2002). Grande parte dos estudos referentes aos efeitos testiculares do uso de antiandrógenos em humanos (KATCHEN e BUXBAUM, 1975; KNUTH et al., 1984) ou em modelos experimentais (CHANDOLIA et al., 1991; JUNIEWICZ et al., 1993; TENA-SEMPRE et al., 1993; BALBOTIN, 1994), focalizam principalmente as alterações nos níveis hormonais. O comprometimento da estrutura testicular e do processo espermatogenético é avaliado em termos das alterações na freqüência de células germinativas e nos estádios do epitélio seminífero, no número de túbulos com espermátides alongadas e quantidade de espermatozóides no epidídimo (VOJTISKOVÀ et al., 1978; GEORGE et al., 1989; CHANDOLIA et al., 1991). Tais análises apóiam-se fundamentalmente em observações em microscopia de luz, sendo insuficientes para fornecer uma visão abrangente das conseqüências do tratamento com antiandrógenos sobre a morfo-fisiologia celular.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Tem sido demonstrado que a terapia por 10 dias com o antiandrógeno não esteroidal flutamida induz a diferenciação espermatogonial em cobaias púberes, causando, tanto nesta idade, como nas idades pós-puberal e adulta, lesões degenerativas e descolamento prematuro de células germinativas (MASCHIO et al., 2002). Um aumento do volume ocupado pelas células de Leydig também tem sido relatado após este tratamento antiandrogênico. Assim, no presente estudo nós pretendemos ampliar as informações do efeito da flutamida sobre a espermatogênese em cobaias, explorando as alterações ultra-estruturais induzidas nas diferentes populações celulares do testículo deste roedor, com especial ênfase para as células de Leydig e de Sertoli.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento Experimental

Os animais utilizados neste estudo foram obtidos do Biotério Central da Unesp (Botucatu, SP, Brasil) e mantidos no Biotério do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Unesp (São José do Rio Preto, SP, Brasil), em condições controladas de luminosidade e temperatura. Foram utilizados dois grupos de dez animais, um na fase puberal (15-60 dias de idade) e outro na fase adulta (120-360 dias de idade). As fases do desenvolvimento pós-natal foram escolhidas segundo estudo de Horsfall e cols. (1994).

O tratamento antiandrogênico com duração de 10 dias foi efetuado no período central de cada fase do desenvolvimento, ou seja, do 30° ao 40° dia, para os animais púberes, e do 235 ao 245° dia, para os

adultos. O antiandrógeno foi administrado por meio de injeções subcutâneas diárias de 10mg/Kg de flutamida (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) em 1% de gelatina e 0,9% da NaCl (MARCHETTI e LABRIE, 1988), aplicadas entre 8-10horas. Os animais do grupo controle (N=5) foram injetados apenas com o veículo farmacológico. Após o período de tratamento, os animais foram anestesiados com éter etílico, mortos por deslocamento cervical e os testículos imediatamente removidos.

Análise Ultra-estrutural

Fragmentos coletados de ambos os testículos foram fixados em solução de glutaraldeído a 3% e ácido tânico a 0,25% em tampão Milloning, pH 7,3, durante 2 horas, à temperatura ambiente. Após a lavagem em tampão, os fragmentos foram pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 1%, no mesmo tampão, durante 1 hora, lavados brevemente em solução tamponada, sendo, seqüencialmente, desidratados em acetona e incluídos em araldite (COTTA-PEREIRA et al., 1976).

Os cortes ultrafinos foram contrastados pelo acetato de uranila a 2%, por 20 minutos (WATSON, 1958) e pelo citrato de chumbo a 2% em solução de hidróxido de sódio 1N (VENABLE e COGGESHALL, 1965), por 8 minutos. As análises foram feitas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss EM-900.

RESULTADOS

Células de Leydig

No testículo dos animais púberes do grupo controle foi observado apenas uma população de células de Leydig, as quais possuíam núcleo com formato esférico ou alongado, citoplasma eletrondenso,

unesp

geralmente com gotículas lipídicas de grande tamanho (Fig. 1). O tratamento alterou o fenótipo da maioria destas células que passou a exibir uma maior área de citoplasma, com grande quantidade de retículo endoplasmático liso na forma de pequenas vesículas, além de freqüentes vesículas citoplasmáticas com conteúdo eletrondenso (Figs. 2, 3). Aparentemente, houve uma diminuição na quantidade de gotículas lipídicas acompanhada do surgimento de depósitos citoplasmáticos de material muito eletrondenso, provavelmente de natureza lipídica, semelhantes a figuras mielínicas (Fig. 2).

Em animais adultos controle foram encontradas duas populações de células de Leydig (Fig. 4), muitas vezes em íntima associação. A primeira e mais numerosa correspondia a células com características ultra-estruturais típicas, tais como nucléolo evidente, grumos periféricos de cromatina e citoplasma rico em retículo endoplasmático liso e mitocôndrias (Fig. 4). Em comparação com a primeira, a segunda população continha células com núcleo mais volumoso, cromatina descompactada e embora possuíssem um mesmo padrão de organelas citoplasmáticas que as células de Leydig com morfologia típica, geralmente apresentavam menor quantidade de gotículas lipídicas e de retículo endoplasmático liso (Fig. 4).

Em ambas as populações celulares, mas em especial nas células com morfologia típica, ocorreu um aparente aumento da quantidade de vesículas de retículo endoplasmático liso e de mitocôndrias (Fig. 5). Similar ao encontrado para animais púberes, figuras mielínicas passaram a ser observadas no citoplasma ou próximas à superfície deste tipo celular (Fig. 5).

Células de Sertoli

A maioria das células de Sertoli dos animais púberes do grupo controle possuíam um aspecto indiferenciado, exibindo núcleo irregular com cromatina descompactada, nucléolo evidente, citoplasma escasso e com poucas organelas (Fig. 6), sendo comum a ocorrência de grandes inclusões lipídicas.

O tratamento antiandrogênico levou a uma diferenciação dessas células, com um aumento do citoplasma e de organelas como mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e liso. Isso foi acompanhado de uma redução dos depósitos lipídicos e do surgimento de figuras mielínicas, que podiam ocupar grandes áreas do citoplasma (Fig. 7). Depósitos de natureza provavelmente lipídica foram freqüentemente encontrados em associação com estas figuras mielínicas (Fig. 8).

Com base na análise ultra-estrutural foi possível constatar que as células de Sertoli de animais adultos exibiram uma resposta variável ao tratamento antiandrogênico, visto que em algumas células a quantidade e disposição de organelas citoplasmáticas não foram afetadas significativamente, enquanto outras passaram a apresentar citoplasma bastante eletrondenso e com grande quantidade de gotículas lipídicas de tamanho pequeno situadas principalmente em regiões apicais (Fig. 10) ou abundantes inclusões lipídicas dispersas por todo citoplasma (Fig. 12). Apesar destas variações nas características ultra-estruturais, a grande maioria dessas células em animais tratados continha inúmeras figuras mielínicas, localizadas preferencialmente em regiões basais do citoplasma (Fig. 11) ou na superfície celular em contato com as células adjacentes (Fig. 9). Freqüentemente, tais figuras mielínicas exibiam um íntimo contato com lamelas anuladas (Fig. 11).

unesp

Amplos espaços foram observados entre as células de Sertoli e células germinativas, indicando a ruptura das junções celulares aí presentes (Fig. 12).

Células Germinativas

Entre as diferentes populações de células germinativas, as espermatogônias foram as menos afetadas pelo tratamento antiandrogênico, não sendo identificadas alterações estruturais relevantes em nenhuma das idades analisadas.

Conforme demonstrado anteriormente (MASCHIO et al., 2002), a terapia com flutamida levou à diferenciação espermatogonial em animais púberes e inúmeros espermatócitos e mesmo espermátides esféricas foram encontrados após o tratamento. Nestes animais, os espermatócitos primários em paquíteno inicial exibiram um drástico aumento nas organelas envolvidas com a via secretora, apresentando grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso com cisternas dilatadas (Fig. 13) e também grande quantidade de pilhas de complexo de Golgi (Fig. 14). O mesmo não foi verificado para os animais adultos, cujos espermatócitos primários, geralmente em fases mais adiantadas de paquíteno, exibiram diferentes níveis de degeneração celular, caracterizado por edema celular, dilatação do envoltório nuclear e rompimento de membranas intracelulares (Fig. 12). Espermatócitos primários apoptóticos também foram freqüentemente observados (Fig. 9).

O acompanhamento da diferenciação espermática nos animais adultos não permitiu identificar, para as células ainda associadas ao epitélio, alterações estruturais que indicassem comprometimento dos processos de formação do acrossomo,

desenvolvimento flagelar, compactação cromatínica e eliminação citoplasmática (Figs. 15, 16).

DISCUSSÃO

As informações aqui apresentadas vêm complementar estudo realizado previamente para avaliação dos efeitos da flutamida sobre a dinâmica testicular de cobaias em diferentes idades (MASCHIO et al., 2002). Assim, utilizamos a mesma abordagem experimental com o intuito de averiguar o nível de comprometimento da estrutura dos diferentes tipos celulares do testículo nestes roedores após o tratamento antiandrogênico. Embora o exame anterior do testículo (MASCHIO et al., 2002) não permitisse examinar adequadamente o grau de desequilíbrio estrutural causado por este tratamento, tendo em vista que a maioria das células não apresentou alterações morfológicas identificáveis com técnicas histológicas de rotina, a análise ultra-estrutural revelou vários distúrbios morfológicos envolvendo principalmente as células somáticas. Com base nas alterações ultra-estruturais, podemos estabelecer que o bloqueio androgênico de curta duração levou às seguintes modificações no testículo de cobaias. (i) Em animais púberes, induziu as células de Leydig à aquisição de um fenótipo de atividade esteroidogênica intensa, aumentando sua atividade metabólica também em adultos. (ii) Levou à diferenciação das células de Sertoli no período puberal. (iii) Aumentou a quantidade de organelas envolvidas com a via biossintética secretora de espermatócitos em início de paquíteno, em animais púberes, levando a degeneração destas células em adultos. (iv) Ocasionou o surgimento de grandes quantidades de vesículas de mielina em células de Sertoli, em ambas as idades

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

analisadas e também em células de Leydig. Neste último caso o aumento foi mais acentuado no período puberal.

As análises ultra-estruturais indicam que o aumento do volume testicular ocupado pelas células de Leydig, após o tratamento com doses moderadas de flutamida, detectado previamente para este roedor em idades adulta e pós-púbere (MASCHIO et al., 2002), é decorrente de transformação hipertrófica. Indica ainda, que a hipertrofia provavelmente relaciona-se com o aumento da atividade esteroidogênica, tendo em vista o aumento de organelas comprometidas com esta via biossintética. Esse fato vem ao encontro de estudos fisiológicos em outros roedores que associam o tratamento com flutamida à estimulação do aumento dos níveis de LH, o hormônio estimulador da atividade esteroidogênica deste tipo celular (VIGUIER-MARTINEZ et al., 1983; MARCHETTI e LABRIE, 1988; CHANDOLIA et al., 1991; BALBOTIN, 1994).

Um aumento da atividade celular também foi detectado para espermatócitos primários em início de paquíteno, que passaram a exibir uma grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi. Esses dados inéditos serão confirmados com o uso de métodos quantitativos. Também foi possível confirmar as observações efetuadas previamente em microscopia de luz (MASCHIO et al., 2002) mostrando a degeneração destas células após o bloqueio androgênico, tanto em animais adultos como em púberes. Esse fato tem sido relatado por outros autores para roedores adultos em tratamentos de longa duração com doses altas (NEUMAN et al., 1976) ou moderadas do antiandrógeno acetado de ciproterona (MÄUSLE et al., 1982; McLACHLAN et al., 2002). Além disso, o exame ultra-estrutural indicou

unesp

que os sinais de degeneração ocorriam preferencialmente nos períodos intermediário e tardio do paquíteno.

Não foram encontradas aberrações nos processos de formação do acrossomo, do flagelo, compactação cromatínica e morfogênese das espermátides. Embora, a princípio isso possa sugerir que a dosagem de antiandrógeno e a duração do tratamento aqui empregadas não interferiram negativamente nos processos de diferenciação espermática, tal afirmação requer o acompanhamento das células expostas a esse tratamento ao longo do período de sua diferenciação. De qualquer modo, nossas observações são consistentes com estudos prévios que relatam efeitos deletérios as espermátides em tratamentos com doses moderadas de antiandrógenos apenas após tratamentos por períodos acima de 9 semanas mas não em tratamentos de curta duração (STEINBECK et al., 1971).

São raros os estudos que analisam os efeitos de antiandrógenos sobre a ultra-estrutura das células do epitélio seminífero (MÄUSLE et al., 1982; MORGANTE et al 2001). É bem conhecido o papel fundamental da célula de Sertoli na metabolização de andrógenos, síntese de estrógenos, produção de proteína ligante de andrógeno e outros fatores de ação local (GNESSI et al., 1997). Este tipo celular também desempenha papel essencial na proteção das células germinativas contra drogas, atuando em processos de detoxificação (FAWCETT, 75; PARVINEN et al. 1998). Apesar de sua importância para o processo espermatogenético, são escassas as informações a respeito de sua participação nos eventos induzidos pelo tratamento antiandrogênico. Nambu e Kumamoto (1995), analisando o conteúdo e quantidade de transferrina secretada pelas células de Sertoli, indicam que antiandrógenos esteroidais e não esteroidais ocasionam vários

efeitos danosos nestes tipos celulares, afetando significativamente sua função, mesmo quando administrados em baixas doses (7,5mg/Kg de peso). Nossas observações sugerem uma resposta variável destas células ao antiandrógeno, o que provavelmente dever estar relacionado com variação na sua sensibilidade metabólica nos diferentes estádios do ciclo seminífero (PARVINEN et al., 1988).

Os amplos espaços verificados entre as células de Sertoli e as células germinativas em algumas regiões do epitélio são indicativos da ruptura nas junções entre estas células, e explicam o descolamento celular prematuro associado ao tratamento antiandrogênico. Recentemente, tem sido mostrado que a expressão de ocludina, uma proteína encontrada nas junções de oclusão, é aumentada pela administração de testosterona a células de Sertoli em cultura (CHUN e CHENG, 2001) e diminuída após o tratamento com flutamida (GYE e OHSAKO, 2003). Além de indicar que o bloqueio da ação da testosterona pode levar ao comprometimento das junções de oclusão, esses achados bioquímicos também podem explicar, pelo menos em parte, o descolamento das células germinativas aqui registrado.

Um dos resultados mais intrigantes obtidos com a análise ultra-estrutural relaciona-se a grande quantidade de depósitos lipídicos, estruturalmente muito semelhantes a figuras de mielina. As células de Sertoli apresentaram maior concentração destes depósitos, que freqüentemente ocupavam grandes áreas citoplasmáticas. Embora nossas análises estritamente morfológicas não permitam afirmar quanto à natureza destas inclusões, é muito provável que correspondam a depósitos de ceramida e seus derivados, freqüentemente encontrados em células submetidas a drogas quimioterápicas ou a outros tratamentos como irradiação (RADIN, 2002). A ceramida é um

unesp

esfingolipídeo proveniente da hidrólise da esfingomielina, que possui importantes funções regulatórias, pois atua como mensageiro secundário em diversos processos celulares (HANNUM, 1994). Nas células de Leydig, especificamente, tem um papel modulador da sua função, induzindo a esteroidogênese (KWUN et al., 1999; MERONI et al., 2000). Assim, o surgimento dos depósitos acima mencionados nestes tipos celulares é compatível com o estado de maior atividade esteroidogênica verificado após o tratamento com flutamida. Recentemente, estruturas semelhantes aos depósitos de ceramida aqui observados para as células de Sertoli e de Leydig foram detectadas em grande quantidade em células prostáticas de animais tratados com finasterida, um antiandrógeno inibidor da enzima 5α redutase (CORRADI et al., 2003). Neste caso e em estudo anterior com outros agentes antiandrogênicos (KIMURA et al., 2001) a ocorrência de depósitos de ceramida tem sido relacionada à indução de apoptose, hipótese que também pode ser aplicada ao presente experimento.

Em conclusão, os resultados obtidos mostram que o uso de doses moderadas de flutamida, por curto período de tempo, afeta a estrutura das células de Leydig, que passam a exibir características de maior atividade esteroidogênica. Esse tratamento também induz o acúmulo de estruturas citoplasmáticas semelhantes a depósitos de ceramida, neste tipo celular e principalmente em células de Sertoli, provavelmente interferindo no funcionamento celular. Estudos adicionais serão realizados para confirmar a natureza destes depósitos lipídicos, e sua efetiva relação com acúmulo da flutamida ou de seus produtos bem como as conseqüências para fisiologia testicular.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSSON, P.A. Treatment of locally advanced prostate cancer. A new role for antiandrogen monotherapy? Eur Urol, v. 39, p. 22-28, 2001.

BALBONTIN, J.B. Flutamide as a tool to study the hormonal regulation of the reproductive tract in the golden hamster. Andrology, v. 26, p. 27-32, 1994.

BURTON, S. ; TRACHTENBERG, J. Effectiveness of antiandrogens in the rat. Urology, v. 136, p. 932-935, 1986.

CHANDOLIA, R.K. ; WEINBAUER, G.F. ; SIMONI, M. ; BEHRE, H.M. ; NIESCHLAG, E. Comparative effects of chronic administration of the non-steroidal antiandrogens flutamide and Casodex on the reproductive system of the adult male rat. Acta Endocrinol, v. 125, p. 547-555, 1991.

CHUNG, N.P. ; CHENG, C.Y. Is cadmium chloride-induced inter-Sertoli tight junction permeability barrier disruption a suitable in vitro model to study the events of junction disassembly during spermatogenesis in the rat testis. Endocrinology, v. 142, p. 156-159, 2001.

CORRADI, L.S. ; GÓES, R.M. ; CARVALHO, H.F. ; TABOGA, S.R. Inhibition of 5-alpha-reductase activity induces stromal remodeling and smooth muscle dedifferentiation in adult gerbil ventral prostate. In press.

COTTA-PEREIRA, G. ; RODRIGO, F.G. ; DAVID-FERREIRA, J.F. The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. Stain Technol, v. 51, p. 7-11, 1976.

FAWCETT, D.W. Ultrastructure and function of the Sertoli cell. In: HALMITON DW, GREEO RO (eds), Handbook of Physiology, Sec 7. Endocrinology Vol V. Male Reproductive System. Washington DC: Am Physiol Soc pp 21-25, 1975.

GEORGE, F.W. ; JOHNSON, L. ; WILSON, J.D. The effect of a 5∝-reductase inhibitor on androgen physiology in the immature male rat. Endocrinology, v. 125, n. 5, p. 2434-2438, 1989.

unesp

GNESSI, L. ; FABBRI, A. ; SPERA, G. Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. Endocr Rev, v. 18, n. 4, p. 541-590, 1997.

GYE, M.C. ; OHSAKO, S. Effects of flutamide in the rat testis on the expression of occludin, an integral member of the tight junctions. Toxicology Letters, v. 143, n. 2, p. 217-222, 2003.

HANNUN, Y.A. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. J Biol Chem, v. 269, p. 3125-3128, 1994.

HORSFALL, D.J. ; MAYNE, K. ; RICCIARDELLI, C. ; RAO, M. ; SKINNER, J.M. ; HENDERSON, D.W. ; MARSHALL, V.R. ; TILLEY, W.D. Fase-related in guinea pig prostatic stroma. Lab Invest, v. 70, p.753-7631,1994.

JUNIEWICZ, P.E. ; HOEKSTRA, S.J. ; LEMP, B.M. ; BARBOLT, T.A. ; DEVIN, J.A. ; GAUTHIER, E. ; FRENETTE, G. ; DUBE, J.Y. Effect of combination treatment with Zanoterone (WIN 49596), a steroidal androgen receptor antagonist, and Finasteride (MK-906) a steroidal 5 alpha-redutase inhibitor, on the prostate and testes of beagle dogs. Endocrinology, v. 33, n. 2, p. 904-913, 1993.

KATCHEN, B. ; BUXBAUM, S. Disposition of a new, non-steroid, antiandrogen, alpha, alpha, alpha-trifluoro-2-methyl-4′-nitro-m-propionotoluidide (Flutamide), in men following a single oral 200mg dose. J Clin Edocrinol Metabol, v. 41, p. 373-379, 1975.

KIMURA, K. ; MARKOWSKI, M. ; BOWEN, C. ; GELMANN, E.G. Androgen blocks apoptosis of hormone-dependent prostate cancer cells. Cancer Res, v. 61, p. 5611-5618, 2001.

KNUTH, U.A. ; HANO, R. ; NIESCHLAG, E. Effect of flutamide or cyproterone acetate on pituitary and testicular hormones in normal men. J Clin Endocrinol Metab, v. 59, p. 963-969, 1984.

KWUN, C. ; PATEL, A. ; PLETCHER, S. ; LYONS, B. ; ABDELRAHIM, M. ; NICHOLSON, D. ; MORRIS, E. ; SALATA, K. ; FRANCIS, G.L. Ceramide increases steroid hormone production in MA-10 Leydig cells. Steroids, v. 64, p. 499-509, 1999.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

LUO, S.Q. ; MARTEL, C. ; CHEN, C.L. ; LABRIE, C. ; CANDAS, B. ; SINGH, S.M. ; LABRIE, F. Daily dosing with Flutamide or Casodex exerts maximal antiandrogenic activity. Urology, v. 50, p. 913-919, 1997.

MARCHETTI, B. & LABRIE, F. Characteristics of flutamide action on prostatic and testicular functions in rat. J Steroid Biochem, v. 29, n. 6, p. 691-698, 1988.

MASCHIO, L.R. ; CORDEIRO, R.S. ; TABOGA , S.R. ; GÓES, R.M. Alterations in Sertoli and Leydig cells following androgen ablation. Anais do XI Congresso Brasileiro de Biologia Celular, pg 55, 2002.

MÄUSLE, E. ; STÄDTLER, F. ; STENGER, D. Effects of cyproterone acetate and oestradiol benzoate on the rat testis. Path. Res. Pract, v. 173, p. 218-224, 1982.

McLACHLAN, R.I. ; O´DONNELL, L.O. ; MEACHEM, S.J. ; STANTON, P.G. ; KRETSER, D.M. ; PRATIS, K. ; ROBERTSON, D.M. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. Endocr Society, p. 149-179, 2002.

MERONI, S.B. ; CÁNEPA, D.F. ; PELLIZZARI, E.H. ; SCHTEINGART, H.F. ; CIGORRAGA, S.B. Effect of N-acetylsphingosine (C2) and the ceramidase inhibitor (1S, 2R)- D-erythro-2-(N-myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol on the regulation of Sertoli cell function. J Androl, v. 20, p. 619-625, 1999.

MORGANTE, E. ; GRADINI, R. ; REALACCI, M. ; SALE, P. ; D'ERAMO, G. ; PERRONE, G.A. ; CARDELO, M.R. ; PETRANGELI, E. ; RUSSO, M.A. ; SILVERIO, F. Effects of long-term treatment with the anti-androgen bicalutamide on human testis: an ultrastructural and morphometric study. Histopathology, v. 38, n. 3, p. 195-201, 2001.

NAMBU, A. & KUMAMOTO, Y. Studies of spermatogenic damages induced by anti-cancer agent and antiandrogenic agents in rat testes. Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi, v. 86, n. 7, p. 1221-1230, 1995.

NEUMANN, F. ; GRÄF, K.J. ; HASAN, S.H. ; SCHENCK, B. ; STEINBECK, H. Action of antiandrogens on testis function and the male genital tract. Sperm. Action Progr. Reprod. Biol, v. 1, p. 268-283, 1976.

NEUMANN, F. & TOPERT, M. Pharmacology of antiandrogenics. J Steroid Biochem, v. 25, p.885-895, 1986.

PARVINEN, M. ; VIHKO, K.K. ; TOPPARI, J. Cell interactions during the seminiferous epithelial cycle. Int Rev Cytol, v. 104, p. 115-151, 1988.

RADIN, N.S. Cancer progression in the kidney and prostate: vital roles of sphingolipids in chemotherapy. Urology, v. 60, p.562-568, 2002.

SMALL, E.J. ; BARON, A. ; BOK, R. Simultaneous antiandrogen withdrawal and treatment with ketoconazole and hydrocortisone in patients with advanced prostate carcinome. Cancer, v. 80, n. 9, p. 1755-1759, 1997.

STEINBECK, H. ; MEHRING, M. ; NEUMANN, F. Comparison of the effects of cyproterone, cyproterone acetate and oestradiol on testicular function, acessory sexual glands and fertility in a long term study on rats. J Reprod. Fert, v. 26, p. 65-76, 1971.

TENA-SEMPRE, M. ; PINILLA, L. ; AGUILAR, E. Follicle-stimulating hormone and luteinizante hormone secretion in male rats orchidectomized or injected with ethylene dimethane sulfonate. Endocrinology, v. 133, n. 3, p. 1173-1181, 1993.

VENABLE, J.H. & COGGESHALL, R. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. J Cell Biol , v.25, p. 407-408, 1965.

VIGUIER-MARTINEZ, M.C. ; HOCHEREAU de REVIERS, M.T. ; BARENTON, B. ; PERREAU, C. Endocrinological and histological changes induced by flutamide treatment on the hypothalamo-hypophyseal testicular axis of the adult male rat and their incidences on fertility. Acta Endocrinol, v. 104, p. 246-252, 1983.

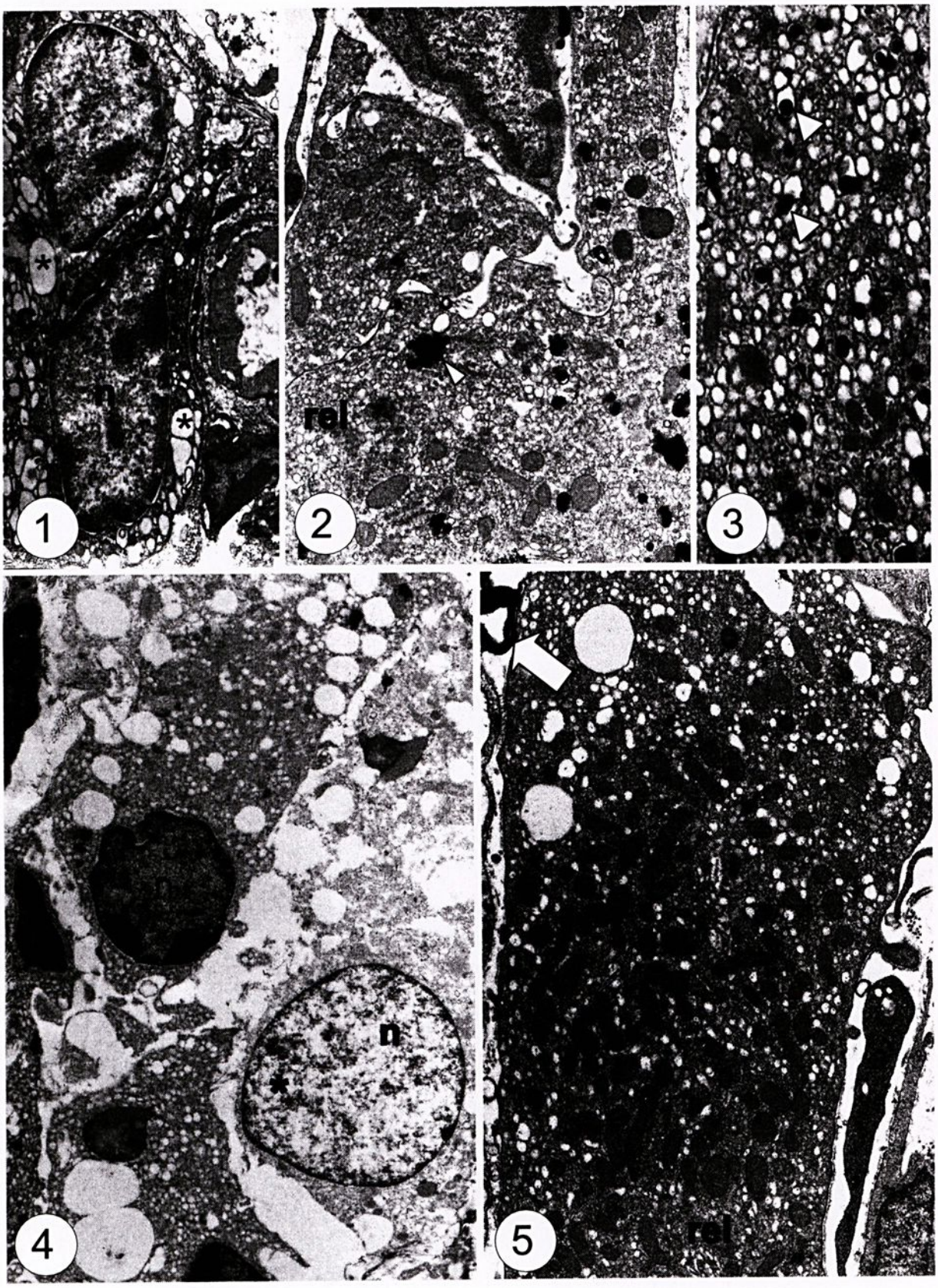
VOJTÍSKOVÁ, M. ; POLÁCHOVÁ, M. ; VIKLICKÝ, V. ; KHODA, M.E. Reversible inhibitory effect of the non-steroidal antiandrogen flutamide (SCH 13521) on spermatogenesis in mice. Endokrinologie, v. 71, n. 2, p. 135-142, 1978.

WATSON, M.L. Staining tissue sections of electron microscopy with heavy metals. J Biophys Biochem Cytol, v. 4, p. 475-478, 1958.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

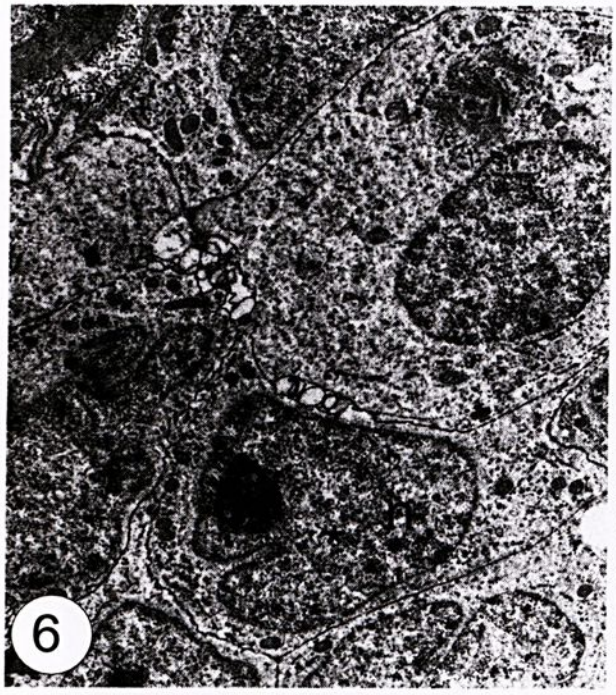
FIGURAS 1-5: Células de Leydig de cobaias púberes **(1-3)** e adultas **(4,5).** **(1)** Em animais púberes controle, elas exibem núcleo alongado (n), citoplasma eletrondenso (c) e gotículas lipídicas de grande tamanho (*). 6640x. **(2 e 3)** Após o tratamento androgênico, nota-se um aumento de retículo endoplasmático liso (rel), o surgimento de vesículas com conteúdo eletrondenso (cabeça de seta) e de depósitos eletrondensos (d). 2– 12860x e 3 – 14300x. **(4)** Nos animais adultos controle, células de Leydig com núcleo volumoso, cromatina descompactada (*) e menor quantidade de organelas citoplasmáticas foram observadas em íntima associação com células de Leydig com características típicas (Ly). 7200x. **(5)** Nas cobaias adultas tratadas com flutamida observa-se um aumento de mitocôndrias (m) e de vesículas e túbulos do retículo endoplasmático liso (sr). Seta - figuras mielínicas. 15500x.

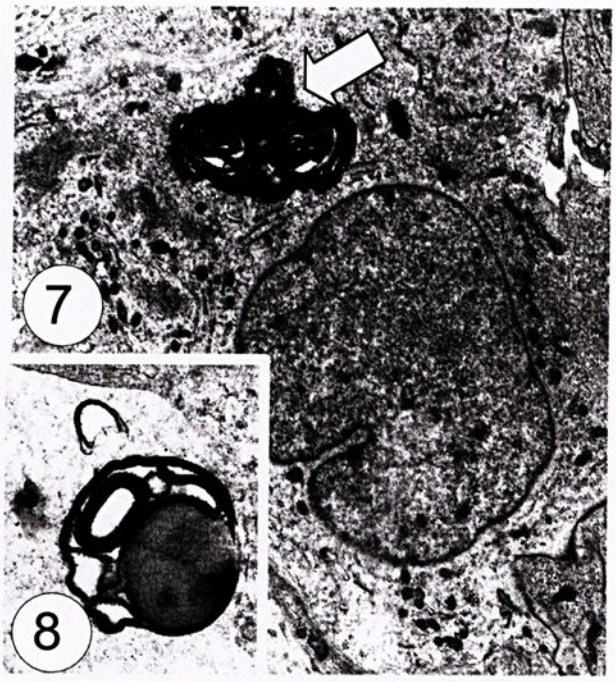
unesp


1
2
3
4
5
n
rel
n
rel

FIGURAS 6-11: Aspectos das células de Sertoli de cobaias púberes **(6-8)** e adultas **(9-11),** tratadas com o veículo farmacológico **(6)** e com flutamida **(7-11). (6)** Nos animais púberes, as células de Sertoli apresentam citoplasma escasso, núcleo (n) irregular com cromatina descompactada (*) e nucléolo evidente (nu). 8250x. **(7)** Um aumento do citoplasma, de organelas citoplasmáticas e o surgimento de figuras mielínicas (seta) são evidentes após o tratamento. 6460x. **(8)** Detalhe de uma figura mielínica associada à inclusão lipídica (l) no interior de uma célula de Sertoli de cobaia púbere tratado previamente com o antiandrógeno. 21960x. **(9)** Célula de Sertoli de cobaia adulto tratado, exibindo figura mielínica próxima à sua superfície basal (seta) e separada por um espaço intercelular de espermatócito primário em apoptose (CA). 7440x. **(10)** Prolongamentos celulares apicais de célula de Sertoli de animal tratado com flutamida contendo inúmeras gotículas lipídicas (seta). 5390x. **(11)** Detalhe da região basal do citoplasma da célula de Sertoli com grande quantidade de figuras mielínicas (seta) associadas a lamelas anuladas. 16000x.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

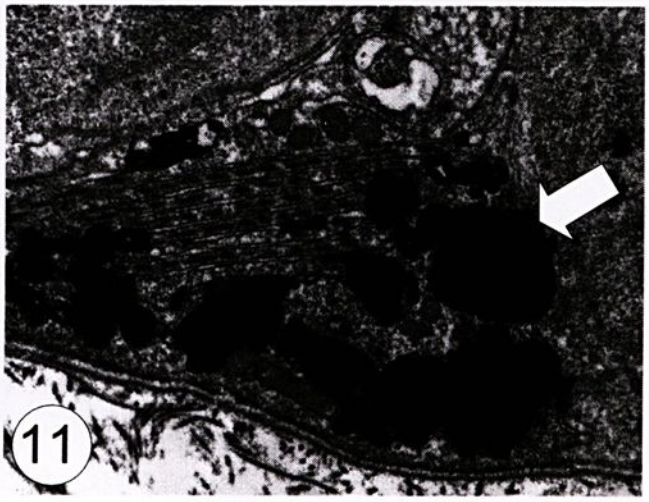

6


7

8

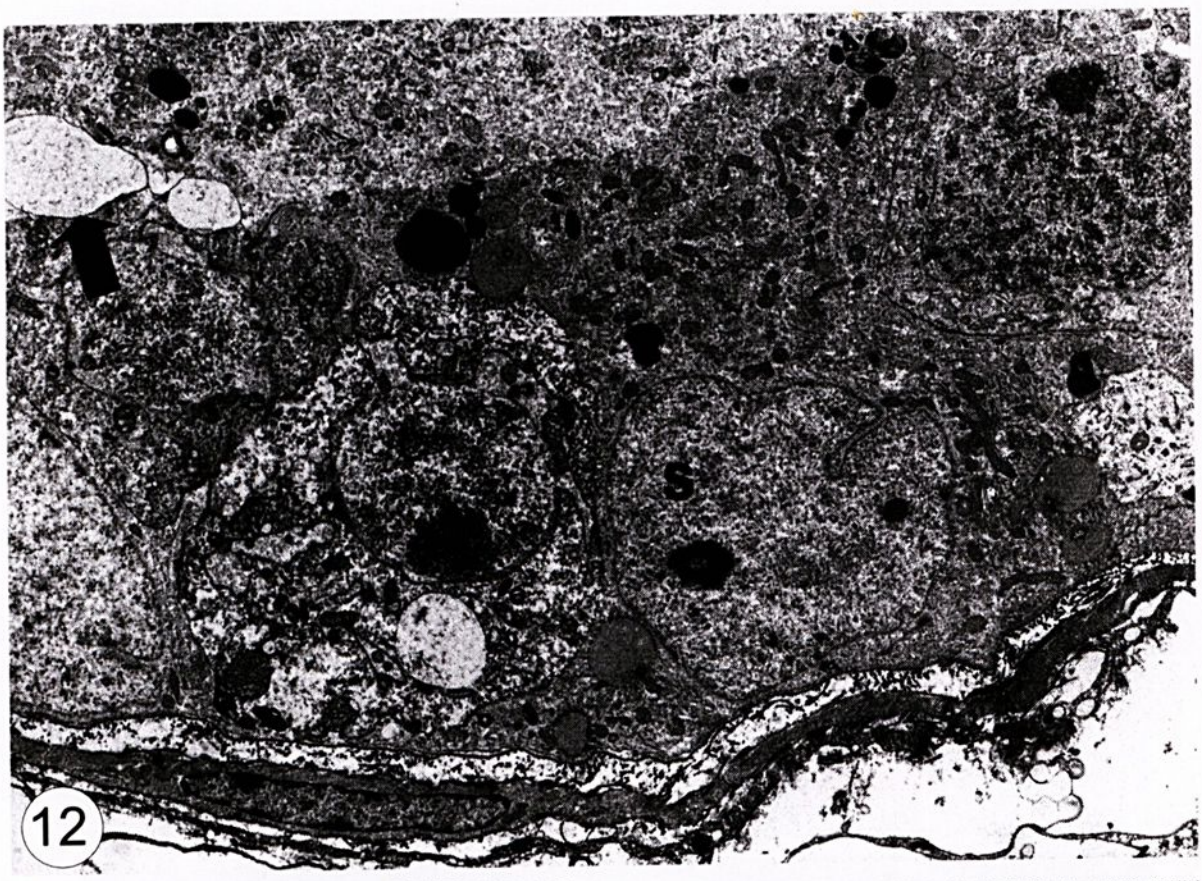

CA
9

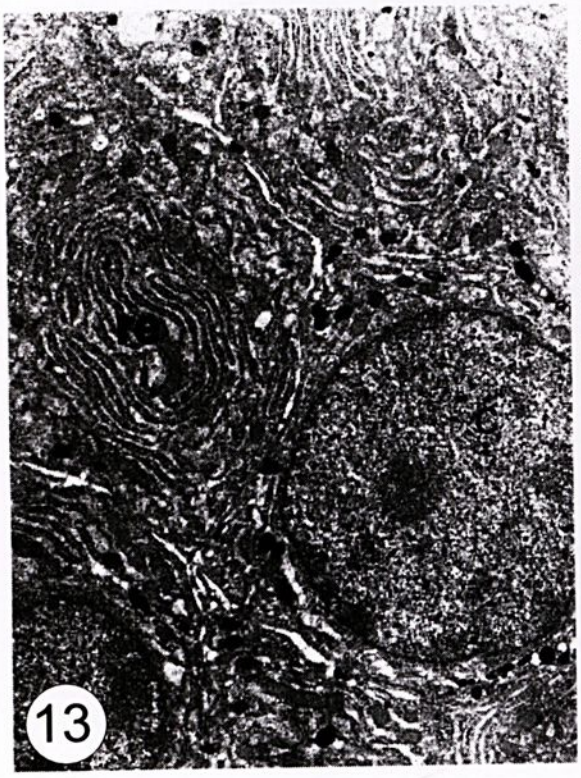

10


11

FIGURAS 12-14: Aspecto de epitélio seminífero de animais adulto **(12)** púbere **(13-14)**, tratados com flutamida. **(12)** Nos animais adultos foi notada a presença de espermatócitos (c) em processo de degeneração celular e amplos espaços (seta) entre o citoplasma das células de Sertoli (S) e as células germinativas. 6040x. **(13)** Espermatócitos em início de paquíteno (c) de cobaia púbere tratada, exibindo grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso com cisternas dilatadas. 8370x. **(14)** – Detalhe do citoplasma do espermatócito primário de cobaia púbere tratada, mostrando a grande quantidade de pilhas de complexo de Golgi. 17640x.

unesp


12


13

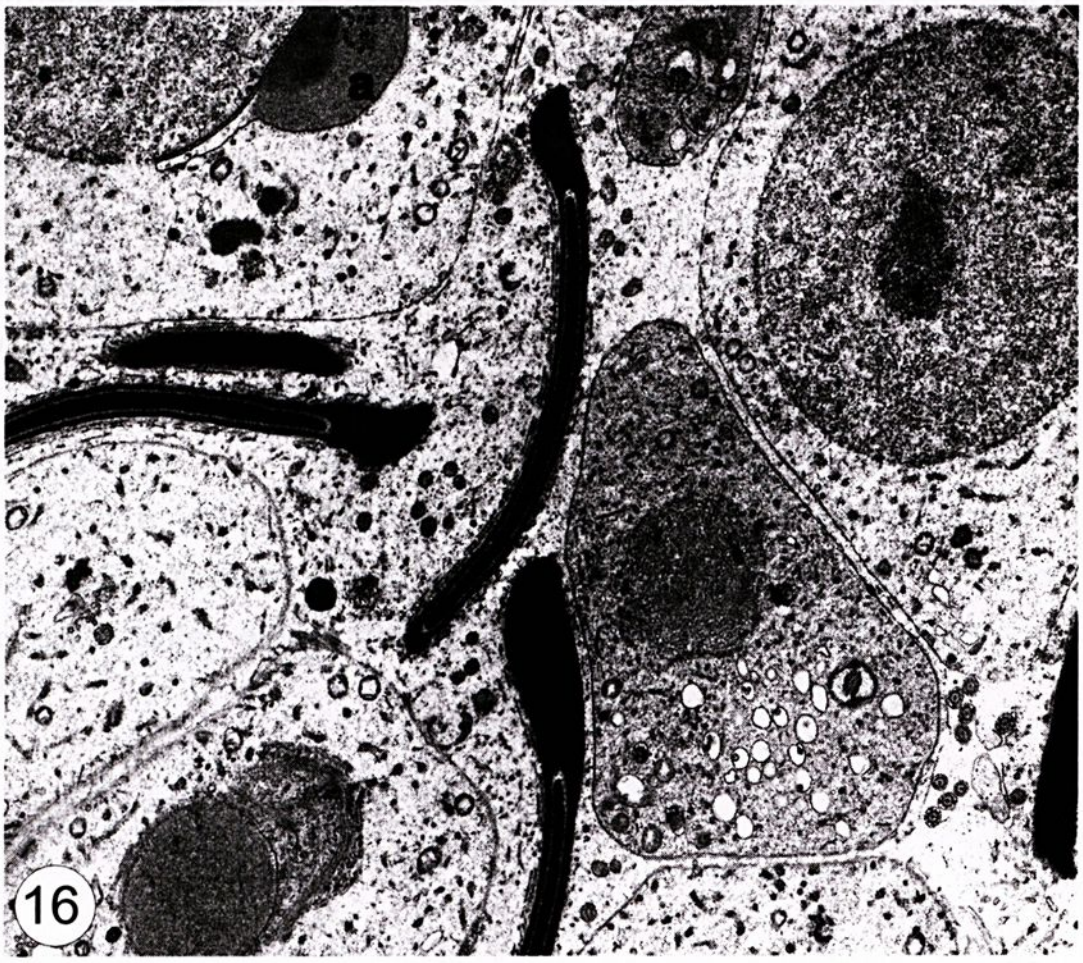

14

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

FIGURAS 15-16: Detalhe dos estádios VIII **(15)** e III **(16)** do epitélio seminífero de cobaias adultas tratadas mostrando o aspecto normal das estruturas relacionadas ao desenvolvimento acrossomal (a), flagelar, a elongação nuclear e compactação cromatínica de espermátides em fases progressivas do desenvolvimento. 15= 9300x.; 16=10000x.

unesp


15


16

CONCLUSÕES GERAIS

Com base no conjunto dos resultados obtidos após a avaliação histológica, quantitativa e ultra-estrutural, conclui-se que:

Em cobaias púberes, o tratamento de curta duração com doses moderadas de flutamida (i) induz a diferenciação espermatogonial, acelerando a maturação testicular (ii) causando também a degeneração e deslocamento de espermatócitos primários e espermátides esféricas, que passam a ser encontrados em grande quantidade no epidídimo.

Quando administrada nos períodos pós-púbere e adulto, (i) além de causar a degeneração de células germinativas, em especial dos espermatócitos primários e (ii) o deslocamento prematuro de espermátides esféricas, a flutamida (iii) prejudica a espermiação e (iv) aumenta o volume relativo de células de Leydig.

Tanto em animais púberes como em adultos, o bloqueio androgênico (i) induz um aumento das organelas envolvidas com a síntese de hormônios esteróides, nas células de Leydig, e (ii) leva ao acúmulo de figuras de mielina no citoplasma destas células e em maior grau das células de Sertoli, comprometendo sua organização estrutural.

Por fim, em todas as idades analisadas, a exposição por curto período de tempo a doses moderadas de flutamida causa lesões degenerativas, o surgimento de depósitos lipídicos intracelulares e severo descolamento celular comprometendo, pelo menos temporariamente, o processo espermatogenético nesta espécie de roedor.

unesp


cm 1 2 3 4 5 6 7
unesp
11 12 13 14 15 16 17 18