

Sandi Regina Vasiliausha

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DOS TÚBULOS
SEMINÍFEROS DE RATOS TRATADOS COM O ANTINEOPLÁSICO BUSULFAN E
SUPLEMENTADOS COM VITAMINA B₁₂**

Araraquara

2012

Sandi Regina Vasiliausha

Avaliação morfológica e morfométrica dos túbulos seminíferos de ratos tratados com o antineoplásico busulfan e suplementados com vitamina B₁₂

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

Orientadora: Profa. Dra. Estela Sasso Cerri

Co-orientador: Prof. Dr. Breno Henrique Caneguim

Araraquara

2012

Dedico esse trabalho aos meus pais e avós, cuja confiança em mim sempre me proporcionou a coragem necessária para realizar os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente pelo dom da vida, força e fé, e por ter colocado as pessoas que citarei abaixo no meu caminho. Como disse Raul Seixas (1974): “Sonho que se sonha só, é só um sonho que se sonha só. Sonho que se sonha junto é realidade.” Se hoje posso ver a conclusão desse trabalho e de todos os sonhos por ele representados, é devido às muitas pessoas que incentivaram, apoiaram e compartilharam esses sonhos.

Agradeço a minha orientadora, professora Estela, por me acolher no meu primeiro ano de faculdade, por me ensinar tudo que sei sobre Histologia, pela paciência, amizade e, sobretudo, pela confiança em mim depositada. Tenho certeza que meu desenvolvimento acadêmico e pessoal não seria o mesmo sem sua orientação.

Agradeço ao meu co-orientador, professor Breno, pelos valiosos conselhos e sugestões, os quais me fizeram uma pessoa mais crítica e, conseqüentemente, refletiram de forma positiva tanto no desenvolvimento deste trabalho como na minha formação profissional.

Meus agradecimentos também ao professor Paulo Cerri e à Flávia Beltrame pelos ensinamentos e paciência nas inúmeras dúvidas que acompanharam a realização desse trabalho. Obrigada também aos técnicos Luís e Pedro (Pedrinho) e aos demais companheiros do laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia, pelo apoio e amizade.

Agradeço ao funcionário Maximiliano (Max) da biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela gentileza e grande ajuda durante todos esses anos de

faculdade. Obrigada ao Alexandre da seção de Graduação e a Ana Lúcia, da Vice-Diretoria pelas informações sempre exatas e pela enorme paciência.

Agradeço a todos os professores pelo seu papel fundamental na minha formação acadêmica e por, mesmo indiretamente, resolverem muitas dúvidas e me darem a base necessária para o desenvolvimento deste trabalho. Também agradeço aos meus colegas de graduação por compartilharem tanto os momentos de dúvida e ansiedade como os de alegria. As seguintes pessoas forneceram imensurável apoio moral: Juliana Bertoldi, Elaine Campos, Juliana Darini e Mayara Del Cistia.

Agradeço a FAPESP pelo apoio financeiro, que propiciou o desenvolvimento desse trabalho, através do processo 2009/17186-4.

Agradeço, finalmente, a minha família pela paciência e amor incondicionais. Meus agradecimentos: aos meus pais, Sandra e Celso, por acreditarem em mim, me apoiarem em todos os momentos; eles serão sempre meu porto seguro; ao meu irmão, Rodrigo, pela amizade e pelo encorajamento; aos meus avós, José e Maria, pelo carinho, confiança e por entenderem meus momentos de ausência durante essa fase tão tumultuada da minha vida; e a minha tia Clarice (Lice) por estar sempre presente, me ajudando sempre que necessário. Muito obrigado não seria o suficiente para exprimir o quanto todos foram fundamentais em minha vida.

SUMÁRIO

Dedicatória

Agradecimentos

Resumo

Lista de Ilustrações

Lista de Tabelas

1. Introdução.....	11
1.1 Espermatogônias.....	12
1.2 Espermatogênese.....	15
1.3 Células de Sertoli.....	16
1.4 Ação de fármacos sobre os testículos.....	18
1.5 busulfan.....	19
1.6 Ação do busulfan na espermatogênese.....	20
1.7 Vitamina B ₁₂	21
2. Desenvolvimento.....	23
2.1 Materiais e métodos.....	23
2.1.1 Animais.....	23
2.1.2 Distribuição dos grupos e tratamento dos animais.....	24
2.1.3 Processamento histológico.....	26
2.1.4 Pesos testiculares absoluto e relativo.....	27
2.1.5 Análises morfométricas.....	27
2.1.6 Análises estatísticas.....	28
2.2 Resultados.....	28
2.2.1 Hemograma: leucócitos e plaquetas.....	28

2.2.2 Peso corpóreo e testicular.....	30
2.2.3 Análise morfológica ao microscópio de luz.....	32
2.2.4 Análises morfométricas.....	37
2.2.4.1 Área tubular total, área da luz tubular e área do epitélio seminífero.....	37
2.2.4.2 Número de espermatogônias por secção tubular.....	39
2.2.4.3 Frequência de túbulos seminíferos contendo células de Sertoli com alterações morfológicas.....	41
2.3 Discussão.....	42
3. Conclusões.....	48
4. Referências bibliográficas.....	49

RESUMO

O busulfan, um antineoplásico utilizado no tratamento de leucemia mieloide, apresenta como mecanismo de ação a alquilação do DNA, impedindo, portanto, a replicação desse ácido nucleico. Dessa maneira, um dos efeitos adversos desse fármaco consiste em danos aos tecidos de intensa atividade proliferativa, incluindo o epitélio seminífero. A vitamina B₁₂ desempenha um papel importante na síntese de DNA, contribuindo no processo de divisão celular. Portanto, neste estudo, foi proposto avaliar a ação do busulfan sobre o epitélio seminífero de ratos e verificar se as alterações provocadas por esse fármaco são amenizadas pela suplementação com vitamina B₁₂ durante o tratamento. Foi também proposto avaliar o hemograma dos animais a fim de verificar se o suplemento vitamínico minimiza a leucopenia e a trombocitopenia, causadas pelo busulfan. Foram utilizados 25 ratos distribuídos em 5 grupos: grupo controle (GC), grupo busulfan (GB), grupo veículo (GV), grupo busulfan+vitamina (GB/B₁₂) e grupo vitamina (GB₁₂). Os tratamentos foram realizados no período de 10 dias da seguinte maneira: os animais do grupo GB receberam duas doses de busulfan (10 mg/kg) no 1º e 4º dias de tratamento. Os animais do grupo veículo (GV) receberam uma solução contendo polietilenoglicol em duas doses de 0,1 ml/100 g de peso corpóreo, semelhantemente ao grupo GB. Os animais de ambos os grupos receberam doses de salina nos demais dias de tratamento. Os animais dos grupos GB/B₁₂ e GB₁₂ receberam busulfan+vitamina B₁₂ e vitamina B₁₂, respectivamente, no 1º e 4º dias de tratamento. Esses animais receberam vitamina B₁₂ durante os demais dias de tratamento. Os animais do grupo GC receberam solução salina em todos os dias do tratamento. Após o tratamento, os animais foram eutanasiados e, por meio de punção cardíaca, o sangue foi coletado para análise do

hemograma. Os testículos foram coletados, pesados, fixados e processados para inclusão em historesina. Em três cortes testiculares por animal, foram avaliados 15 túbulos seminíferos, totalizando 45 túbulos/animal. Em cada túbulo, foram mensuradas a área tubular total, a área do epitélio seminífero, a área da luz tubular e o número de espermatogônias. Em 30 túbulos/animal foi avaliada a frequência de túbulos seminíferos que apresentavam núcleos de células de Sertoli alterados. Esses parâmetros foram submetidos à análise estatística (teste de comparações múltiplas de Tukey). Os resultados revelaram que, embora as áreas epitelial, tubular e da luz tubular não tenham apresentado diferenças significantes entre GB e GC, houve uma diminuição significativa do peso corpóreo e do número de espermatogônias nos animais do GB, bem como um aumento na frequência de túbulos seminíferos contendo células de Sertoli com alterações nucleares. Tanto no GB quanto no GB/B₁₂, houve uma redução significativa no número de leucócitos e de plaquetas. Entretanto, no GB/B₁₂, além da manutenção do peso corpóreo dos animais, foi verificado um aumento significativo no número de espermatogônias e uma diminuição na frequência de túbulos seminíferos contendo células de Sertoli com alterações nucleares, em comparação ao GB. Portanto, a suplementação com vitamina B₁₂ durante o tratamento com busulfan foi capaz de exercer um efeito benéfico sobre a espermatogênese, amenizando as alterações significantes, causadas por esse antineoplásico, nas células progenitoras da linhagem espermatogênica e nas células de Sertoli.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Pesos corpóreos dos animais dos grupos controle (GC), busulfan (GB), busulfan+vitamina (GB/B₁₂), veículo (GV) e vitamina (GB₁₂).....31

Figura 2: Pesos testiculares relativos (PTR) dos animais dos grupos controle (GC), busulfan (GB), busulfan+vitamina (GB/B₁₂), veículo (GV) e vitamina (GB₁₂).....31

Figura 3: Fotomicrografias de secções transversais de túbulos seminíferos dos GC (3A e 3B), GB (3C) e GB/B₁₂ (3D), corados com HE.....34

Figura 4: Fotomicrografias de porções de túbulos seminíferos de ratos dos GB (4A, 4B, 4C, 4D e 4E) e GB/B₁₂ (4F e 4G), corados com HE.....36

Figura 5: Fotomicrografias de porções de túbulos seminíferos de ratos do GC (5A) e GB (5B, 5C, 5D e 5E) coradas com HE.....37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Protocolo de tratamento dos animais de cada um dos grupos, do 1º ao 10º dia.....25

Tabela 2: Valores ($10^3/\text{mm}^3$) referentes aos leucócitos (LEU) e plaquetas (PL) nos animais dos grupos: controle (GV), veículo (GV), vitamina B₁₂ (GB₁₂), busulfan (GB) e busulfan/vitamina B₁₂ (GB/B₁₂).....29

Tabela 3: Área tubular total (AT), área epitelial (AE) e área da luz tubular (AL) dos animais do grupo controle (GC), veículo (GV), vitamina (GB₁₂), busulfan (GB) e busulfan-vitamina (GB/B₁₂).....38

Tabela 4: Número de espermatogônias (NE), número de espermatogônias/túbulo seminífero (NE/túbulo), e número de espermatogônias/ μm^2 de túbulo seminífero ($\text{NE}/\mu\text{m}^2$) dos animais do grupo controle (GC), veículo (GV), vitamina (GB₁₂), busulfan (GB) e busulfan-vitamina (GB/B₁₂).....40

Tabela 5: Frequência (%) de túbulos seminíferos contendo células de Sertoli com alterações morfológicas nos animais dos grupos controle (GC), busulfan (GB) e busulfan-vitamina (GB/B₁₂).....42

1- INTRODUÇÃO

Entre os órgãos que constituem o aparelho reprodutor masculino, destacam-se os testículos, sendo suas principais atribuições a produção de hormônios e espermatozoides. A produção de espermatozoides ocorre nos túbulos seminíferos, os quais são compostos por um epitélio denominado epitélio germinativo ou seminífero. Esse epitélio é constituído por células somáticas de sustentação, as células de Sertoli, e por várias camadas concêntricas de células germinativas, as quais, ao passar por um processo denominado espermatogênese, dão origem aos gametas masculinos, os espermatozoides (RUSSELL et al., 1993).

O compartimento dos túbulos seminíferos é limitado por um endotélio linfático, células mioides e elementos acelulares que, juntos, constituem o tecido peritubular. Lâminas basais são encontradas entre as células endoteliais linfáticas, células mioides e células constituintes do túbulo. (RUSSELL et al., 1993). As células mioides são achatadas e contráteis, sendo responsáveis por promover o movimento dos espermatozoides através dos túbulos seminíferos (KORMANO; HOVATTA, 1972; RUSSELL et al., 1989).

Entre os túbulos seminíferos está presente um tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos e linfáticos, denominado tecido intersticial. Dentre as células constituintes desse tecido conjuntivo, encontram-se fibroblastos, células conjuntivas indiferenciadas, mastócitos, macrófagos e as células de Leydig, responsáveis pela produção de testosterona. Estas células são arredondadas ou poligonais e apresentam

um núcleo central e citoplasma eosinófilico, rico em pequenas gotículas de lipídios. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; ROSS et al. 2008).

1.1 Espermatogônias

As espermatogônias são células germinativas diploides presentes no epitélio seminífero. Elas têm origem a partir das células germinativas primordiais (PCGs) as quais, por sua vez, são derivadas de células epiblasticas (LAWSON; PEDERSON, 1992). As PGCs, durante o desenvolvimento, migram da base do alantoide, através do intestino posterior, até alcançarem as cristas gonadais, proliferando-se nesse percurso (CLERMONT, PEREY, 1957; SAPSFORD, 1962). A migração das PGCs para as gônadas em desenvolvimento induz as células mesodérmicas das cristas urogenitais e as células do mesotélio celômico a se proliferarem e a formarem os cordões sexuais primários, os quais, posteriormente, diferenciam-se nos cordões seminíferos, que darão origem aos túbulos seminíferos, túbulos retos e rede testicular (ROSS, 2008). Uma vez nas gônadas masculinas, as PCGs originam os gonócitos, que se fixam nos cordões testiculares formados por precursores de células de Sertoli e células mioides peritubulares (PHILLIPS et al., 2010). Os gonócitos apresentam, inicialmente, uma alta atividade mitótica seguida por uma entrada na fase G_0 do ciclo celular, tornando-se mitoticamente quiescentes até o nascimento. A proliferação dessas células é retomada na primeira semana após o nascimento, concomitantemente com sua migração para a lâmina basal dos túbulos seminíferos. Os gonócitos, então, dão origem às espermatogônias-tronco, as quais serão responsáveis pela manutenção da espermatogênese no animal após a puberdade (KLUIN; ROOIJ, 1981).

Inicialmente, foram descritos três tipos de espermatogônias, com base na morfologia nuclear: espermatogônias do tipo A, as quais não apresentam heterocromatina em seu núcleo; espermatogônias do tipo In que apresentam uma quantidade intermediária de heterocromatina e espermatogônias do tipo B, que, por sua vez, apresentam grande quantidade de heterocromatina, indicando uma maior diferenciação (PHILLIPS et al., 2010).

Nos roedores, as espermatogônias do tipo A são classificadas em A_s , A_{pr} , A_{al} , A_1 , A_2 , A_3 e A_4 . As espermatogônias-tronco (A_s) localizam-se na porção basal dos túbulos seminíferos. Essas células dividem-se em duas novas células-tronco ou em um par de espermatogônias A_{pr} , as quais não completam a telófase e permanecem conectadas por uma ponte intercelular (ROOIJ; RUSSELL, 2000; ROOIJ, 2001). Uma vez formadas, as espermatogônias do tipo A_{pr} estão comprometidas com a formação de gametas, sendo a ponte intercelular o primeiro sinal visível da diferenciação das espermatogônias (APONTE et al., 2005). Essas conexões citoplasmáticas permanecem intactas até os estágios finais da maturação das espermátides e são essenciais para o desenvolvimento sincronizado de cada célula-filha, pois permitem o compartilhamento de produtos gênicos entre elas (LEE et al., 1995; ROSS, 2008). Posteriormente, as espermatogônias A_{pr} dividem-se, formando cadeias de 4, 8 ou, ocasionalmente, 32 espermatogônias A_{al} (ZHOU; GRISWOLD, 2008). As espermatogônias do tipo A_{al} sofrem mudanças morfológicas e tornam-se espermatogônias do tipo A_1 . Em roedores, ocorrem cinco divisões mitóticas posteriores, originando sucessivamente espermatogônias dos tipos A_2 , A_3 , A_4 , In e B (CLERMONT, 1962; OAKBERG, 1956).

As espermatogônias do tipo A_s são consideradas as únicas células-tronco verdadeiras no epitélio seminífero, embora estudos recentes tenham sugerido que, sob certas condições, espermatogônias A_{pr} e A_{al} ainda possuam características de células-tronco (YOSHIDA et al., 2007). A função de autorregeneração das espermatogônias-tronco é essencial para a manutenção de um número suficiente de células em reserva, permitindo à espermatogênese iniciar-se regularmente nos túbulos seminíferos (RUSSELL et al., 1993). Para que esse processo seja mantido continuamente durante toda a vida reprodutiva masculina, as espermatogônias-tronco localizam-se em um microambiente específico nos testículos, conhecido como nicho de células-tronco, o qual controla suas características de autorregeneração, pluripotência, quiescência e diferenciação (NÓBREGA et al., 2010), sendo que, em roedores, o nicho de células-tronco encontra-se em regiões do túbulo seminífero adjacentes ao compartimento intersticial (CHIARINI-GARCIA et. al., 2003). Hipóteses sugerem que o ambiente molecular e celular próximo ao compartimento intersticial promove a autorregeneração das espermatogônias-tronco e, quando essas células deixam esse local, as consequentes mudanças ambientais promovem sua diferenciação (ROOIJ, 2009). Esses processos, além de regulados por fatores extrínsecos relacionados às células somáticas, como as células de Sertoli, são também controlados por fatores intrínsecos relacionados ao programa genético das próprias células germinativas (ZHOU; GRISWOLD, 2008).

1.2 Espermatogênese

A espermatogênese pode ser dividida em três fases: a) fase proliferativa, b) fase meiótica e c) fase de diferenciação ou espermiogênese (RUSSELL et al.,1993). A fase proliferativa corresponde às sucessivas divisões mitóticas das espermatogônias, as quais dão origem a novas células-tronco ou espermatogônias comprometidas com a produção de espermatozoides. No final da fase proliferativa, as espermatogônias do tipo B diferenciam-se para formar espermatócitos. Inicia-se, então, a fase meiótica da espermatogênese. Devido às mudanças nucleares durante a primeira fase da meiose, os espermatócitos podem ser classificados em: pré-leptótenos, leptótenos, zigótenos, paquítenos e diplótenos (NIEDERBERG; LAMB, 1997). Os espermatócitos pré-leptótenos possuem maior quantidade de cromatina nuclear do que os leptótenos, sendo que nos últimos aparecem cromossomos condensados. Durante a transição entre essas duas fases, as células movem-se lentamente dentro do túbulo seminífero em direção à luz e adquirem uma forma arredondada (RUSSELL, 1977). Nos espermatócitos zigótenos, os cromossomos homólogos pareiam-se, formando o complexo sinaptonêmico (MOSES, 1968). A recombinação genética ou crossing-over ocorre durante a fase do paquíteno. Nessa fase também há um rápido crescimento da célula e do seu nucléolo. Por fim, durante a fase diplóteno, os cromossomos separam-se e o complexo sinaptonêmico é desintegrado. O espermatócito primário dá origem, então, a espermatócitos secundários, os quais são de difícil observação nos cortes histológicos, porque permanecem um tempo muito curto em interfase. São células haploides, porém com seus cromossomos ainda duplicados e logo entram na segunda

divisão meiótica, originando as espermatídes (NIEDERBERG; LAMB, 1997; RUSSELL et al., 1993).

As espermatídes são células pequenas, localizadas perto da luz tubular e possuem núcleos arredondados. São essas células que passarão pelo processo de espermiogênese ou diferenciação celular e darão origem aos espermatozoides. Na etapa final da espermiogênese, denominada espermiação, uma parte do citoplasma das espermatídes é desprendida, formando os chamados corpos residuais, que são fagocitados pelas células de Sertoli. Ainda nessa etapa, os espermatozoides são liberados na luz do túbulo seminífero (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; KERR; KRETZER, 1974).

A espermatogênese é controlada principalmente pelas gonadotropinas, FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante), secretadas pela hipófise anterior, sob estímulo do hipotálamo. O LH tem um efeito indireto na espermatogênese, estimulando as células de Leydig a produzir testosterona, hormônio necessário para o desenvolvimento normal das células da linhagem espermatogênica (RUSSELL et al., 1993). O FSH estimula diretamente o túbulo seminífero, ligando-se a receptores nas células de Sertoli e promovendo a síntese e a secreção da proteína ligante de andrógeno (ABP), que se combina com a testosterona e é utilizada durante o processo espermatogênico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; MEANS et al., 1976).

1.3 Células de Sertoli

As células de Sertoli são células colunares com extensos prolongamentos apicais e laterais, que circundam as células germinativas adjacentes e ocupam os

espaços entre elas. No microscópio de luz, os limites das células de Sertoli são mal definidos por causa dos numerosos recessos laterais que elas possuem e que abraçam as células da linhagem espermatogênica. O perfil do núcleo das células de Sertoli é frequentemente triangular e possui reentrâncias; exibe pouca heterocromatina e um nucléolo proeminente. Tais núcleos aderem à lâmina basal dos túbulos, e suas extremidades apicais estão na luz dos túbulos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Uma vez que se estendem por toda a espessura do epitélio seminífero, as células de Sertoli conferem uma organização estrutural aos túbulos e criam um microambiente único, o qual é necessário para o desenvolvimento das células germinativas e a progressão do processo espermatogênico (ROSS, 2008). Como os espermatócitos, as espermatídes e os espermatozóides são isolados do contato direto com o plasma pela barreira hematotesticular, essas células dependem das células de Sertoli para a troca de nutrientes e metabólitos. A barreira formada pelas células de Sertoli também protege essas células germinativas de agentes nocivos presentes no sangue e do ataque imunológico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; ROSS, 2008).

Outras funções das células de Sertoli incluem fagocitose de corpos residuais e células germinativas em degeneração e produção de inúmeras proteínas reguladas por hormônios hipofisários, os quais influenciam a atividade das espermatogônias, por concentrarem a testosterona no túbulo seminífero (JOHNSON et al., 2008)

A integridade estrutural do epitélio seminífero é mantida pelo citoesqueleto das células de Sertoli. Os filamentos intermediários ou filamentos de vimentina são componentes importantes desse citoesqueleto, localizando-se na região perinuclear da

célula, no citoplasma apical e em associação com os desmossomos, presentes entre as células de Sertoli e as células germinativas adjacentes (WANG et al., 2002).

1.4 - Ação de fármacos sobre os testículos

Vários estudos têm demonstrado a sensibilidade do epitélio seminífero à ação de fármacos. A perda de células germinativas, causada por agentes químicos, pode ser associada ao colapso dos filamentos de vimentina ou à ruptura das junções oclusivas entre células de Sertoli e células germinativas (RICHBURG; BOEKELHEIDE, 1996; SYED; HECHT, 2002). Sasso-Cerri et al. (2002) estudaram o efeito da cimetidina, uma droga antagonista dos receptores H₂, na espermatogênese. Esses autores observaram alterações no tecido peritubular, incluindo a presença de células mioides, da linhagem espermatogênica e células de Sertoli em apoptose, além de baixa densidade de células germinativas nos túbulos seminíferos. Em um estudo posterior (SASSO-CERRI et al., 2008), demonstrou-se que a perda de células germinativas por apoptose após o tratamento com cimetidina pode ser associada à morte das células de Sertoli. Nesse estudo, observou-se, ainda, a presença de espaços intraepiteliais nos túbulos seminíferos, sugerindo a perda do contato entre as células de Sertoli e as células germinativas.

Várias alterações no processo espermatogênico causadas por antineoplásicos também têm sido estudadas. Os antineoplásicos são fármacos particularmente nocivos à atividade espermatogênica dos testículos, muitas vezes levando à oligospermia ou à azoospermia logo após o início do tratamento (PASQUOLOTTO et al., 2004). Foi demonstrado que o etoposide, quimioterápico largamente utilizado, causa diminuição

na densidade de células nos túbulos seminíferos, principalmente de espermatogônias diferenciadas (STUMPP et al., 2004). Outros antineoplásicos conhecidos por sua ação danosa à espermatogênese são a ciclofosfamida, a vimblastina, a cisplatina e o busulfan (COSTABILE, 1993).

1.5- busulfan

O busulfan é um antineoplásico classificado como agente alquilante, indicado no tratamento da leucemia mieloide. Possui a fórmula molecular $C_6H_{14}O_6S_2$, sendo bem estável na forma anidra. É bem absorvido após administração por via oral e desaparece no sangue rapidamente após infusão intravenosa (DELUCIA et al., 2004). Seu mecanismo de ação está baseado na clivagem das ligações alquil-oxigênio da molécula, produzindo um composto eletrofílico que forma ligações cruzadas entre as fitas de DNA. Esse fármaco interfere, portanto, na duplicação do DNA e transcrição do RNA, impedindo a divisão celular. Sua citotoxicidade está diretamente relacionada com esse efeito de alquilação, pois como sua atividade não depende da síntese de RNA, o busulfan pode afetar células que estão em qualquer fase do ciclo celular (SIKIC, 2005).

Os principais efeitos tóxicos do busulfan são relacionados às suas propriedades mielossupressivas. Em baixas doses, há a redução na produção de granulócitos e plaquetas; em doses elevadas, o fármaco diminui a produção de eritrócitos (RANG et al., 2007). Há também ocorrência de alopecia, mucosites e esterilidade (SIKIC, 2005). O busulfan pode causar outros efeitos adversos pouco frequentes, como o aparecimento de fibrose pulmonar difusa e um quadro semelhante à síndrome de Addison, caracterizado pelo aparecimento de hiperpigmentação cutânea e fraqueza. Devido ao

intenso catabolismo de purinas que acompanha a rápida destruição celular, pode ocorrer ainda hiperuricemia, com consequente lesão renal (DELUCIA et al., 2004).

1.6- Ação do busulfan na espermatogênese

Um dos efeitos adversos do busulfan é a esterilidade causada pela ação citotóxica dessa substância às células componentes dos túbulos seminíferos. Em camundongos adultos, a dose de 10 mg/kg de busulfan provocou significativas alterações nos túbulos seminíferos, comprometendo a divisão celular na fase das espermatogônias e dos espermátócitos primários (MONOYER, 1962). Aich et al. (2001) observaram que essa mesma dose causou um decréscimo do diâmetro dos túbulos seminíferos após 40 dias do final do tratamento. Nesse período, os túbulos observados apresentavam apenas espermatogônias, células de Sertoli e alguns espermátócitos zigótenos. Somente após 100 dias do final do tratamento, a espermatogênese estava completamente recuperada.

Em ratos e camundongos tratados com busulfan, Bucci et al. (1987) e Jiang (1998) observaram perda, por apoptose, da maior parte das células germinativas dos túbulos seminíferos, restando apenas poucas espermatogônias em contato com as porções basais das células de Sertoli. Jahnukainen et al. (2006) estudaram o efeito do busulfan nos testículos de macacos e observaram que esse fármaco afeta seletivamente as espermatogônias em processo de diferenciação, uma vez que alguns espermátócitos presentes no momento do tratamento foram capazes de continuar o processo de diferenciação.

Uma análise dos parâmetros morfométricos dos testículos mostrou que o tratamento com busulfan leva à diminuição do volume dos testículos, dos túbulos seminíferos e do epitélio germinativo. Houve também redução no diâmetro dos túbulos e na espessura do epitélio seminífero. Por outro lado, o volume de tecido intersticial aumentou, assim como o número de células de Leydig (MOHAMMAD-GHASEMI et al., 2006).

Kopecky et al. (2005) observaram que o tratamento com busulfan provocou a vacuolização das células de Sertoli. Além disso, observou-se diminuição da imunorreatividade dos filamentos de vimentina apicais e aumento dos filamentos ao redor do núcleo. Essa condensação perinuclear na região basal sugere colapso do citoesqueleto das células de Sertoli. Essas alterações foram acompanhadas por diminuição das células germinativas no epitélio seminífero. Estudos demonstraram, ainda, que o tratamento com busulfan causa perda da adesão entre as células do túbulo seminífero, com mudanças na expressão de proteínas relacionadas às junções oclusivas entre células de Sertoli e células germinativas (AICH et al., 2001; POSPECHOVA et al., 2007).

1.7- Vitamina B₁₂

A vitamina B₁₂, também conhecida como cobalamina, é uma vitamina hidrossolúvel, essencial na nutrição, que se encontra em uma variedade de alimentos de origem animal. A absorção da vitamina B₁₂ ocorre no intestino delgado, após ter sido ativada no estômago, onde chega com a ingestão de alimentos ligada a proteínas. O ácido clorídrico, produzido pelo estômago, facilita a “quebra” do complexo proteína-B₁₂.

Assim, a vitamina fica livre para ligar-se ao fator intrínseco (FI), produzido pelas células parietais do estômago, e ser absorvida na porção terminal do íleo (OH; BROWN, 2003).

Entre outras funções, a vitamina B₁₂ desempenha um importante papel na síntese de DNA, contribuindo no processo de divisão celular (BECK et al., 1965; OH; BROWN, 2003). Dessa forma, essa vitamina é indispensável em processos que requerem alta taxa de renovação celular, como o crescimento e desenvolvimento durante a infância e a eritropoiese, além de ser necessária para a manutenção da integridade do sistema nervoso (VOLKOV et al., 2006).

Watson (1962) demonstrou uma importante relação entre a vitamina B₁₂ e o desempenho reprodutivo masculino, sugerindo que essa vitamina é essencial para a manutenção das funções testiculares. Posteriormente, Grasbeck e Salonen (1976) observaram que pacientes com anemia perniciosa apresentavam total ausência de espermatogênese; entretanto, a terapia com vitamina B₁₂ não só era eficaz contra a anemia, mas também estimulava a atividade espermatogênica desses pacientes. Desde então, a vitamina B₁₂ vem sendo um dos agentes terapêuticos mais utilizados no tratamento da infertilidade masculina.

Apesar do mecanismo de ação da vitamina B₁₂ sobre o processo espermatogênico ainda não estar bem esclarecido, alguns trabalhos sugerem algumas hipóteses. Yamakawa et al. (1988) estudaram os efeitos da vitamina B₁₂ sobre a síntese de DNA em testículos de ratos danificados experimentalmente e observaram que a vitamina B₁₂ estimula a síntese de DNA nas espermatogônias e espermatócitos. Em ratos tratados com o antineoplásico doxorrubicina, a vitamina estimula a síntese de

ácidos nucléicos, restaurando, assim, o processo espermatogênico, prejudicado pelo tratamento com esse fármaco (OZAKI, 1988; OSHIO et al., 1989).

2. DESENVOLVIMENTO

Considerando que o busulfan apresenta uma ação alquilante que impede a replicação do DNA e, conseqüentemente, afeta tecidos ou órgãos de intensa atividade de proliferação celular, como os testículos, o presente estudo teve como objetivos:

- 1- Avaliar a ação do busulfan sobre o epitélio seminífero de ratos adultos, com ênfase na possível ação prejudicial desse fármaco sobre as espermatogônias;
- 2- Avaliar a ação do busulfan sobre as células de Sertoli, uma vez que tais células suportam estrutural e nutricionalmente as células germinativas;
- 3- Verificar se as alterações causadas pelo busulfan nos túbulos seminíferos são amenizadas pelo suplemento com vitamina B₁₂, durante o tratamento.
- 4- Avaliar o hemograma (leucócitos e plaquetas) dos animais a fim de verificar se o suplemento vitamínico ameniza o efeito imunossupressor bem como a trombocitopenia, causados pelo busulfan.

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Animais

Neste trabalho, foram utilizados 25 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Holtzmann, com 60 dias de idade, pesando aproximadamente 250g, procedentes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) -

Campus de Araraquara. Durante o período de tratamento, os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr/UNESP, em gaiolas plásticas forradas com maravalha, à temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração Guabi[®] (Nutrilabor, Brasil) e água *ad libitum*. O protocolo referente ao tratamento dos animais utilizados neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara.

2.1.2 Distribuição dos grupos e tratamento dos animais

De acordo com a tabela 1, os animais foram distribuídos em cinco grupos, os quais continham cinco animais cada: grupo controle (GC), grupo busulfan (GB), grupo veículo (GV), grupo busulfan+vitamina (GB/B₁₂) e grupo vitamina (GB₁₂). A diluição do busulfan foi realizada da seguinte maneira: 100 mg de busulfan (Sigma-Aldrich, USA) foram diluídos em 10 ml de solução contendo 8 ml de polietilenoglicol e 2 ml de solução salina.

Os animais do grupo busulfan (GB) foram tratados com 20 mg/kg de busulfan (FURUKAWA et al., 2007), ou seja, durante o período de tratamento, cada rato recebeu duas doses (10 mg/kg), por via intraperitoneal, na concentração de 0,1ml do fármaco diluído/100 g de peso corpóreo. Tais aplicações foram realizadas em dois momentos distintos: a primeira dose foi aplicada no primeiro dia de tratamento e a segunda, no quarto dia de tratamento. Os animais do grupo veículo (GV) receberam uma solução contendo polietilenoglicol e salina, em duas doses de 0,1 ml/100 g de peso corpóreo, semelhantemente ao GB. Os animais de ambos os grupos receberam doses de salina

nos demais dias de tratamento (2º, 3º, 5º, 6º, 7º, 8º, 9º e 10º dias). Os animais dos GB/B₁₂ e GB₁₂ receberam, respectivamente, busulfan/veículo + vitamina B₁₂-hidroxocobalamina (Rubranova[®], 5000µg – Bristol-Myers Squibb) e vitamina B₁₂/veículo no primeiro e quarto dias de tratamento, também por via intraperitoneal. Esses animais receberam durante todos os demais dias de tratamento (2º, 3º, 5º, 6º, 7º, 8º, 9º e 10º dias), 3 µg de vitamina B₁₂. Essa dose de vitamina foi definida a partir de uma avaliação prévia da quantidade de ração consumida diariamente pelos animais nesta idade, de acordo com Beltrame et al. (2011). Os animais do grupo controle (GC) receberam solução salina (cloreto de sódio 0,9%) em todos os dias do tratamento (Tabela 1).

Tabela 1- Protocolo de tratamento dos animais de cada um dos grupos, do 1º ao 10º dia.

[illegible]

2.1.3- Processamento Histológico

Após o término do tratamento, ou seja, no décimo primeiro dia, os animais foram pesados e anestesiados com injeção intraperitoneal de solução de quetamina (0,08 mL/100g de peso corpóreo) associado ao cloridrato de xylasina (0,04 mL/100g de peso corpóreo). A cavidade torácica foi exposta e, por meio de punção cardíaca, o sangue foi coletado diretamente dos ventrículos em tubos (BD Vacutainer® Blood Collection Tubes, SST II Plus, BD Biosciences) para análise do hemograma no Laboratório de Análises Clínicas e Microbiológicas São Lucas de Araraquara (SP). Em seguida, os testículos foram imediatamente removidos da bolsa escrotal e os animais foram eutanasiados por dessangramento, seccionando-se a artéria aorta. Os testículos direitos e esquerdos foram pesados em uma balança analítica digital Marte (AL 500).

Os testículos esquerdos foram fixados por imersão em solução contendo formaldeído 4% preparada a partir de paraformaldeído (MERK - Alemanha) e tamponada com fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4. Após 1 hora de fixação, os testículos foram seccionados na região equatorial e mantidos por 48 horas na solução fixadora.

Os testículos foram processados para inclusão em historesina (Historesin-Embedding Kit, JUNG). Para tal, os mesmos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, pré-infiltrados em solução de historesina e etanol (1:1) e infiltrados em solução A, contendo historesina e pó ativador. Após 24 horas, as peças foram incluídas em uma solução contendo a solução A e líquido endurecedor. Com o auxílio de um micrótomo Spencer (Microtome 820), foram realizados cortes histológicos dos blocos. De cada animal foram obtidos 3 cortes de 3 µm de espessura, não

seriados, com intervalo aproximado de 36µm entre si, os quais foram corados com hematoxilina e eosina (H.E.), conforme descrito por Cerri e Sasso-Cerri (2003).

2.1.4- Pesos testiculares absoluto e relativo

Os testículos direitos e esquerdos foram pesados com o auxílio de uma balança analítica digital Marte (AL 500), obtendo-se, assim, os pesos testiculares absolutos (PTA). O peso testicular relativo (PTR), que representa o valor percentual do testículo em relação ao peso do animal, foi obtido a partir da seguinte fórmula:

$$\text{PTR} = \frac{\text{PTA}}{\text{peso do animal}} \times 100$$

2.1.5- Análises Morfométricas

As análises morfométricas descritas a seguir foram realizadas nos cortes de testículos incluídos em historesina e corados pela H.E. As imagens de secções transversais circulares de túbulos seminíferos, totalizando 45 túbulos por animal, foram capturadas aleatoriamente utilizando-se uma câmera de captura de imagens Olympus (DP71) acoplada a um microscópio Olympus (BX-51). Em cada secção tubular, a área total, do epitélio seminífero e da luz dos túbulos seminíferos foram mensuradas, utilizando-se um programa de análise de imagens - Image Pro-Express 6.0 (Olympus). O número de espermatogônias foi quantificado em cada secção tubular analisada, obtendo-se o número de espermatogônias por túbulo seminífero e o número de espermatogônias por área de epitélio seminífero.

Utilizando-se imagens de 30 túbulos seminíferos por animal, foi, ainda, quantificada, a frequência de túbulos seminíferos contendo células de Sertoli cujos núcleos apresentavam uma ou mais das seguintes alterações morfológicas: núcleo deslocado da porção basal do epitélio (localizado no compartimento adluminal ou na luz tubular), núcleo com morfologia atípica (contorno irregular, vacúolos ou com cromatina condensada fortemente basófila).

2.1.6- Análise Estatística

Os dados foram analisados, utilizando-se um programa de análise estatística - SigmaStat (versão 3.2). Segundo a análise de variância ANOVA, os dados foram submetidos ao teste estatístico de comparação múltipla de Tukey. O nível de significância considerado foi $p \leq 0,05$.

2.2. RESULTADOS

2.2.1- Hemograma: leucócitos e plaquetas

Os resultados referentes ao hemograma revelaram que tanto o número de leucócitos (LEU), quanto de plaquetas (PL) foram significativamente menores em GB e GB/B₁₂ em relação aos GC, GV e GB₁₂. (Tabela 2) Comparando-se estes três últimos grupos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre eles.

Tabela 2- Valores ($10^3/\text{mm}^3$) referentes aos leucócitos (LEU) e plaquetas (PL) nos animais dos grupos: controle (GV), veículo (GV), vitamina B₁₂ (GB₁₂), busulfan (GB) e busulfan/vitamina B₁₂ (GB/B₁₂).

Animais	LEU	PL
GC-1	5,5	690
GC-2	4,2	708
GC-3	9,3	646
GC-4	5,1	630
GC-5	4,3	780
X±DP	5,7 ± 2,1^a	691 ± 59^a
GV-1	8,9	699
GV-2	4,6	666
GV-3	5,6	713
GV-4	3,9	624
GV-5	5,2	548
X±DP	5,6 ± 1,9^a	650 ± 67^a
GB ₁₂ -1	2,1	545
GB ₁₂ -2	4,4	719
GB ₁₂ -3	7,8	591
GB ₁₂ -4	7,7	607
GB ₁₂ -5	5,7	670
X±DP	5,5 ± 2,4^a	626 ± 68^a
GB-1	1,4	284
GB-2	0,7	110
GB-3	1,7	132
GB-4	1,1	276
GB-5	0,9	298
X±DP	1,2 ± 0,4^b	220 ± 91^b
GB/B ₁₂ -1	1,9	211
GB/B ₁₂ -2	0,9	351
GB/B ₁₂ -3	0,6	111
GB/B ₁₂ -4	1,8	196
GB/B ₁₂ -5	1,6	275
X±DP	1,4 ± 0,6^b	229 ± 90^b

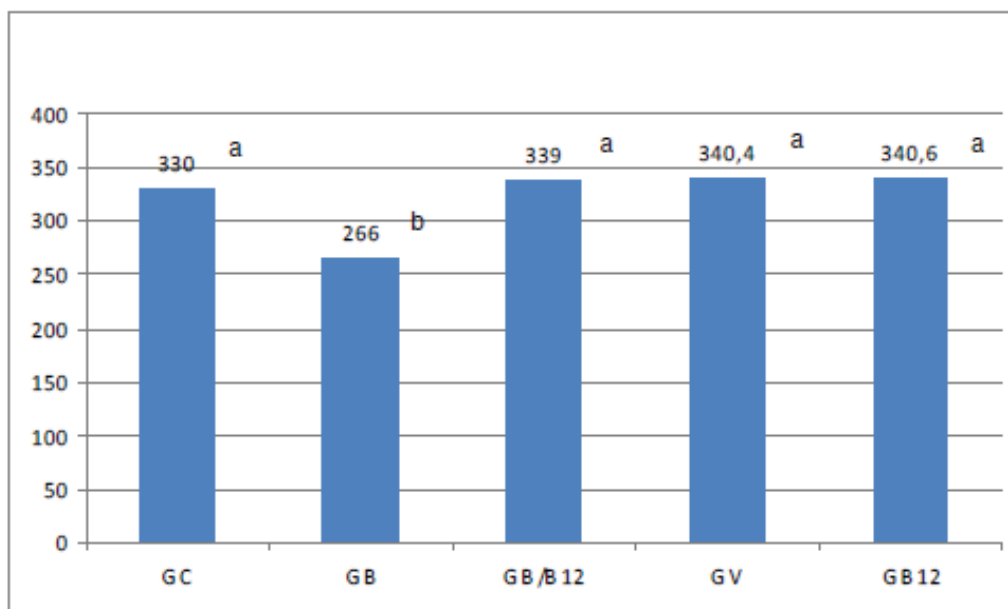
a ≠ b (p ≤ 0,05; estatisticamente significante)

2.2.2- Peso corpóreo e testicular

Os animais de GB apresentaram redução estatisticamente significativa do peso corpóreo de 19,39%, em média, quando comparados aos animais do GC (Figura 1). Os animais do GB/B₁₂ apresentaram aumento significativo no peso corpóreo em relação aos animais do GB, representando um aumento médio de 21,53% do peso total. Não foram observadas diferenças significantes entre os pesos corporais dos GV, GC e GB₁₂.

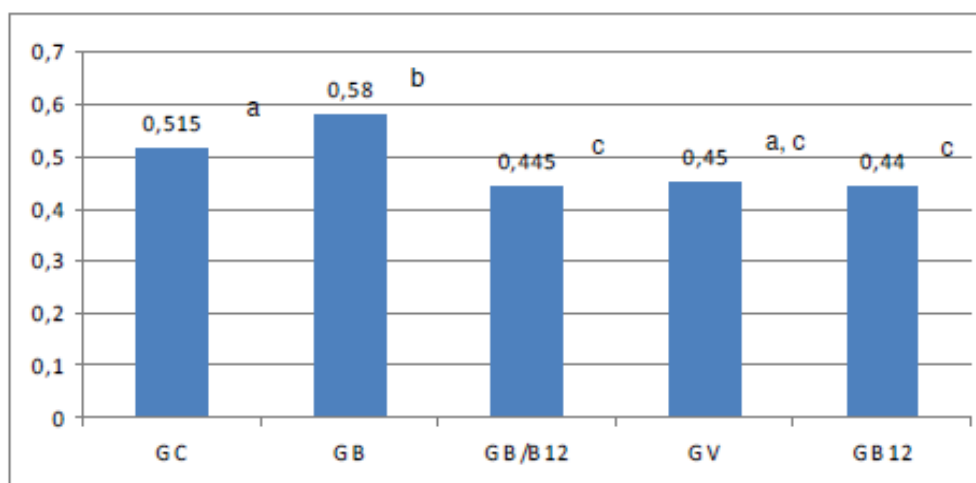
Em relação ao peso testicular relativo (PTR) médio, os animais do GB apresentaram um aumento significativo de 11,20%, quando comparado aos animais do GC (Figura 2). Houve redução significativa de 23,28%, do PTR médio dos animais do GB/B₁₂ em comparação aos animais do GB. Embora não tenha sido observada diferença significativa entre o peso corporal dos animais do GC e GB/B₁₂, notou-se uma redução significativa do PTR médio entre dos animais do GB/B₁₂, de 13,59%, em comparação aos animais do GC. Não houve diferença significativa entre os pesos testiculares relativos dos animais dos GV e GC. Os resultados, porém, revelaram uma diminuição significativa do PTR médio dos animais do GB₁₂, de 14,56%, quando comparado ao GC.

Figura 1- Pesos corpóreos dos animais dos grupos controle (GC), busulfan (GB), busulfan+vitamina (GB/B₁₂), veículo (GV) e vitamina (GB₁₂).



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

Figura 2- Pesos testiculares relativos (PTR) dos animais dos grupos controle (GC), busulfan (GB), busulfan+vitamina (GB/B₁₂), veículo (GV) e vitamina (GB₁₂).



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

2.2.3- Análise morfológica ao microscópio de luz

As secções transversais dos testículos dos animais do grupo controle apresentaram túbulos seminíferos com forma circular ou elíptica característica e raramente foram encontradas células germinativas descamadas na luz tubular (Figura 3A). No epitélio seminífero, foram observados núcleos de células de Sertoli na camada basal e células germinativas distribuídas em camadas concêntricas, da base para a luz tubular, podendo ser identificadas: espermatogônias, espermatócitos e espermátides (Figura 3B). Os núcleos das células de Sertoli possuíam formato triangular ou ovóide, levemente corado com hematoxilina, e nucléolo tripartido evidente (figura 5A). Os animais dos GV e GB₁₂ apresentaram túbulos seminíferos com formato característico, onde pôde ser observada a presença de todos os tipos celulares característicos do epitélio germinativo, organizadamente distribuídos (resultados não ilustrados).

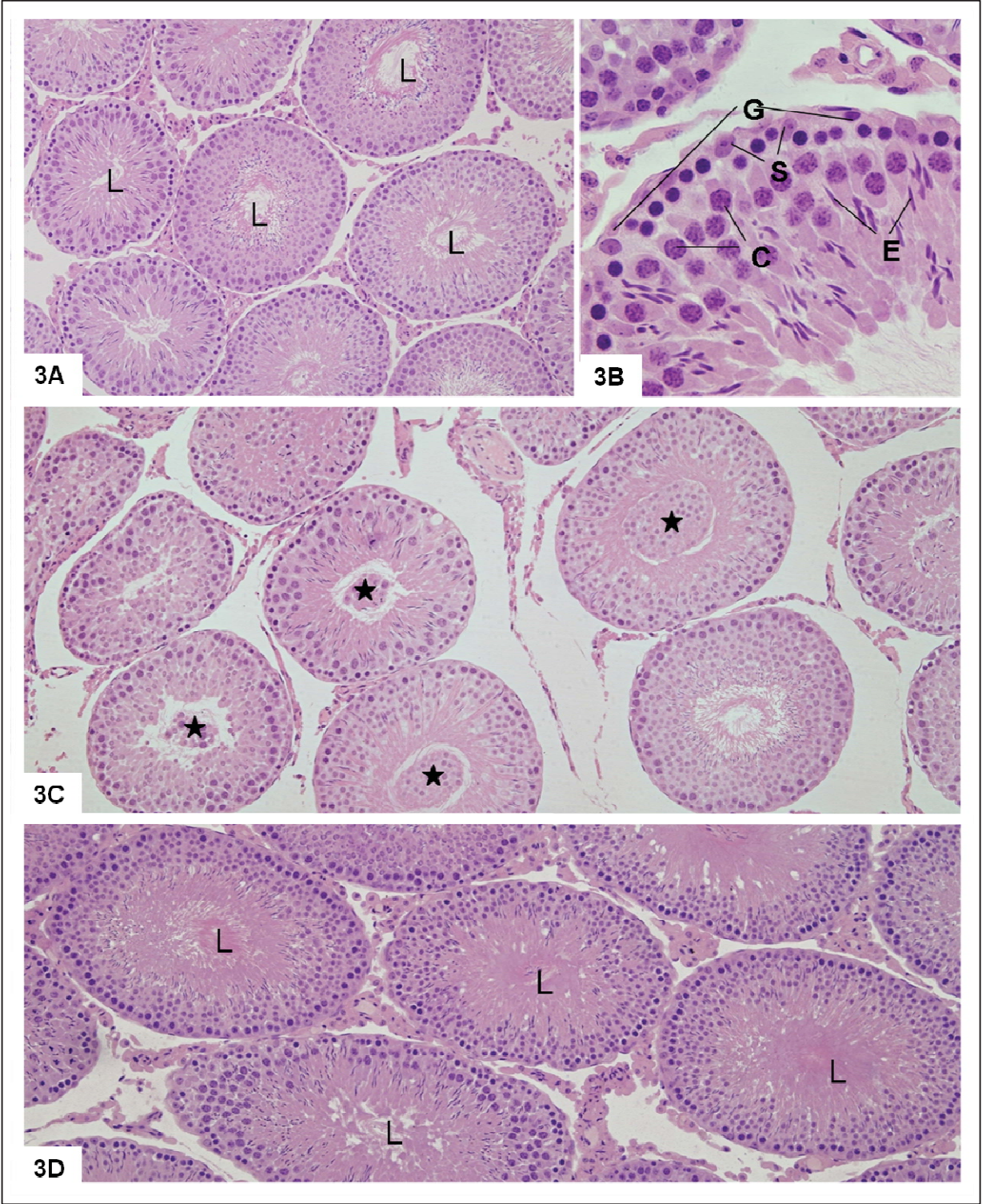
Nas secções testiculares referentes ao grupo busulfan, foram observados túbulos seminíferos com células germinativas descamadas na luz (Figuras 3C, 4A e 4D). Além disso, túbulos seminíferos com contorno irregular e epitélio composto por células germinativas desorganizadamente distribuídas também foram observados (Figura 4D). Em vários túbulos, foram observados espaços intraepiteliais, bem como ausência de espermatogônias na porção basal do epitélio seminífero (Figuras 4B e 4D). Foram também observadas células germinativas (espermatócitos e espermátides) com características de apoptose (Figuras 4C e 4E), bem como a presença de fragmentos celulares (Figura 4C).

As secções testiculares referentes aos animais do grupo busulfan+vitamina apresentaram epitélio seminífero com camadas celulares organizadas normalmente de

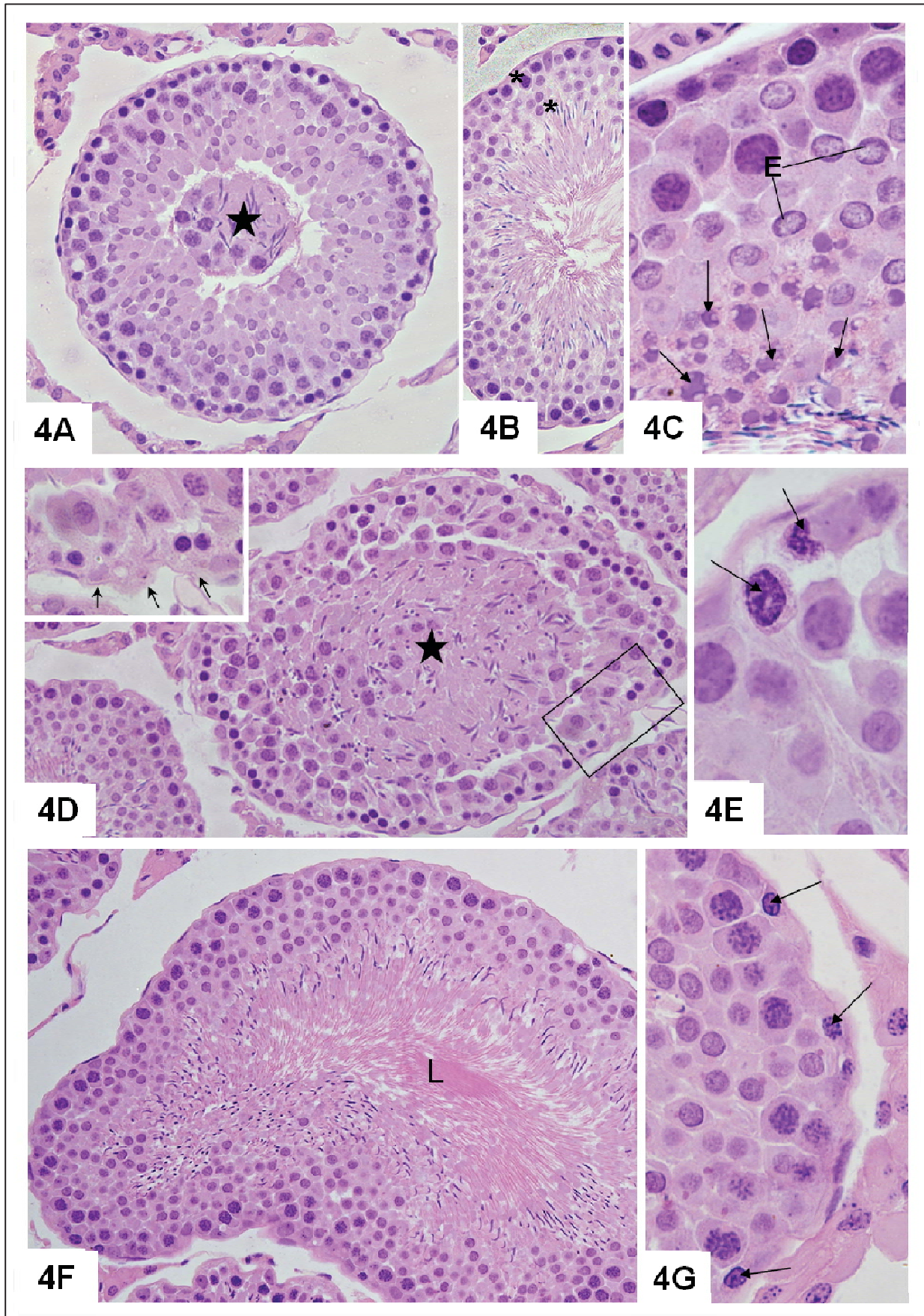
maneira concêntrica e raramente foram observadas células germinativas descamadas na luz tubular (Figuras 3D e 4F). Na maioria dos túbulos, notou-se a presença de espermatogônias na porção basal do epitélio seminífero (Figura 4G).

Nas secções testiculares referentes ao grupo busulfan e busulfan-vitamina, foram observados túbulos seminíferos com células de Sertoli deslocadas da porção basal (figura 5C). Em vários núcleos, foi observada cromatina periférica fortemente corada por hematoxilina e a presença de halos nítidos (figuras 5B, 5D e 5E). Além disso, observaram-se núcleos de células de Sertoli com formato irregular.

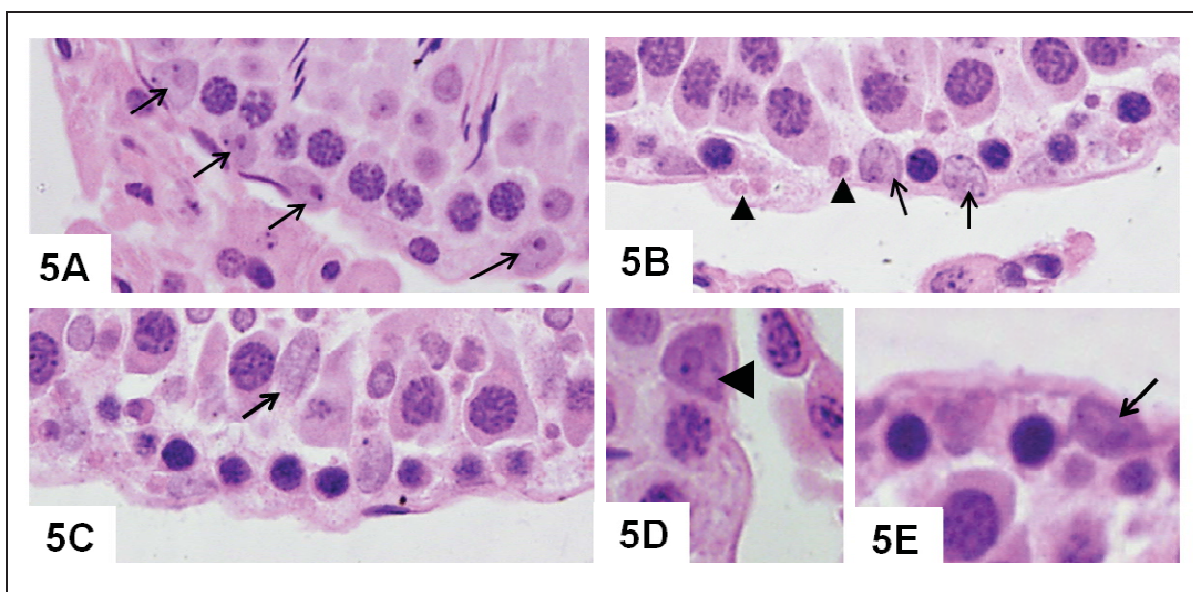
Figuras 3A a 3D- Fotomicrografias de secções transversais de túbulos seminíferos dos GC (3A e 3B), GB (3C) e GB/B₁₂ (3D), corados com H.E. Na figura **3A**, os túbulos seminíferos apresentam nítida distinção entre o epitélio seminífero e a luz tubular (L), na qual não são observadas células germinativas. A figura **3B** mostra uma secção transversal do epitélio seminífero em estágio XI, de aspecto normal, no qual são observadas células germinativas organizadas em camadas concêntricas, da base para a luz tubular. Nota-se a presença de núcleos de células de Sertoli (S) na porção basal e as seguintes células germinativas: espermatogônias (G), espermatócitos (C) e espermátides alongadas (E). Na figura **3C**, observa-se a presença de células germinativas na luz dos túbulos seminíferos (estrelas). A figura **3D** mostra túbulos seminíferos com epitélio germinativo organizado, não havendo presença de células germinativas na luz dos túbulos (L). Aumentos: **3A** (141x), **3B** (195x), **3C** e **3D** (164x).



Figuras 4A a 4G- Fotomicrografias de porções de túbulos seminíferos de ratos do GB (4A, 4B, 4C, 4D e 4E) e GB/B₁₂ (4F e 4G), corados com H.E. Nas figuras **4A** e **4B**, túbulos seminíferos mostram células germinativas preenchendo a luz tubular (estrela) e espaços intraepiteliais na porção basal do epitélio seminífero (asteriscos), respectivamente. Na figura **4C** são observadas espermatídes com cromatina periférica condensada, indicando apoptose (E) e diversos fragmentos celulares fortemente basófilos (setas). A figura **4D** mostra um túbulo seminífero com contorno irregular, apresentando células germinativas distribuídas de forma desorganizada e preenchendo a luz tubular (estrela). Em algumas regiões da porção basal do epitélio, não são observadas espermatogônias (inset/setas). A figura **4E** mostra uma porção de um túbulo seminífero no qual são observadas células com aspecto apoptótico, provavelmente espermatócitos (setas). A figura **4F** mostra um túbulo seminífero, cujas células germinativas apresentam-se distribuídas de forma organizada. Não é observada a presença de células preenchendo a luz tubular (L). Na figura **4G**, observa-se a presença de espermatogônias (setas). Aumentos: **4A** (272x), **4B** (258x), **4C** (1071x), **4D** e **4F** (244x), **inset** (393x), **4E** (893x) e **4G** (588x).



Figuras 5A a 5E. Fotomicrografias de porções de túbulos seminíferos de ratos do GC (5A) e GB (5B, 5C, 5D e 5E) coradas com H.E. Na figura **5A**, observam-se núcleos de células de Sertoli com aspecto normal, localizados na porção basal do túbulo seminífero (setas). A figura **5B** mostra núcleos de células de Sertoli com porções de cromatina condensada (setas) e diversos fragmentos celulares fortemente acidófilos (cabeças de seta). A figura **5C** mostra núcleo de célula de Sertoli deslocado da porção basal do epitélio seminífero (seta). Na figura **5D**, observa-se a presença de halo nítido no núcleo da célula de Sertoli (cabeça de seta). A figura **5E** mostra um núcleo de célula de Sertoli com cromatina periférica condensada fortemente corada pela hematoxilina. Aumentos: **5A, 5B e 5C** (588X), **5D** (893x) e **5E** (936x).



2.2.4- Análises Morfométricas

2.2.4.1- Área tubular total, área da luz tubular e área do epitélio seminífero

Não foram observadas diferenças significantes das áreas tubular total, epitelial e da luz dos túbulos seminíferos entre todos os grupos analisados (Tabela 3).

Tabela 3 - Área tubular total (AT), área epitelial (AE) e área da luz tubular (AL) dos animais do grupo controle (GC), veículo (GV), vitamina (GB₁₂), busulfan (GB) e busulfan-vitamina (GB/B₁₂).

Animais	AT (µm²)	AE (µm²)	AL (µm²)
GC-1	80466,77	71437,46	9009,30
GC-2	91227,86	83072,80	8155,06
GC-3	87716,97	75169,20	12547,73
GC-4	99068,09	89805,30	9262,75
GC-5	87893,54	80133,23	7760,31
X±DP	89274,65 ± 6738,68	79923,60 ± 7110,35	9347,03 ± 1891,04
GV-1	71509,38	65526,16	5983,22
GV-2	80801,03	73632,10	7168,93
GV-3	78468,82	71563,04	6905,78
GV-4	91765,76	82746,94	9018,83
GV-5	97835,61	85572,42	12263,19
X±DP	84076,12 ± 10589,44	75808,13 ± 8245,65	8267,99 ± 2490,44
GB ₁₂ -1	80573,25	74473,68	6099,57
GB ₁₂ -2	85256,07	75648,58	9067,50
GB ₁₂ -3	81712,37	74103,89	7608,48
GB ₁₂ -4	89837,87	83303,29	6534,58
GB ₁₂ -5	87400,12	78215,73	9184,39
X±DP	84955,94 ± 3860,90	77149,03 ± 3797,84	7698,90 ± 1414,34
GB-1	78615,16	70049,45	8565,71
GB-2	66272,86	60214,36	6058,50
GB-3	82784,34	73296,00	9488,34
GB-4	81201,44	73959,23	7242,22
GB-5	78155,13	67422,3	10723,85
X±DP	77405,79 ± 6505,81	68988,27 ± 5563,88	8415,72 ± 1832,63
GB/B ₁₂ -1	84445,71	76687,86	7757,85
GB/B ₁₂ -2	92786,05	84387,35	8398,69
GB/B ₁₂ -3	82734,38	72918,00	9816,38
GB/B ₁₂ -4	79476,70	72159,10	7317,60
GB/B ₁₂ -5	78467,01	71988,70	6478,30
X±DP	83581,97 ± 5683,21	75628,20 ± 5255,27	7953,76 ± 1253,73

2.2.4.2 - Número de espermatogônias por secção tubular

Não foi observada diferença significativa no número de espermatogônias, número de espermatogônias/túbulo seminífero e número de espermatogônias/ μm^2 de túbulo seminífero entre os animais dos grupos controle, veículo e vitamina (Tabela 4).

Os animais do GB apresentaram redução significativa de 94,89%, em média, no número de espermatogônias quando comparados aos animais do GC. Essa mesma redução foi observada no número de espermatogônias/túbulo seminífero. Quanto ao número de espermatogônias por μm^2 de túbulo seminífero, foi observada uma redução estatisticamente significativa de 94,18%, em média, no GB, em relação ao GC.

Embora tenha sido observada uma diminuição significativa no número de espermatogônias dos animais do GB/B₁₂ em relação ao GC, os resultados revelaram um aumento significativo de 437,5%, em média, no número de espermatogônias dos animais do GB/B₁₂ em relação aos animais do GB. Esses mesmos resultados foram observados no número de espermatogônias/túbulo seminífero. Observou-se, ainda, um aumento significativo de 402,7%, em média, no número de espermatogônias por μm^2 de túbulo seminífero do GB/B₁₂, quando comparado ao GB.

Tabela 4- Número de espermatogônias (NE), número de espermatogônias/túbulo seminífero (NE/túbulo), e número de espermatogônias/ μm^2 de túbulo seminífero (NE/ μm^2) dos animais do grupo controle (GC), veículo (GV), vitamina (GB₁₂), busulfan (GB) e busulfan-vitamina (GB/B₁₂).

Animais	NE	NE/túbulo	NE/μm^2
GC-1	495	11,00	$6,93 \times 10^{-3}$
GC-2	533	11,84	$6,41 \times 10^{-3}$
GC-3	441	9,80	$5,86 \times 10^{-3}$
GC-4	500	11,11	$5,56 \times 10^{-3}$
GC-5	536	11,91	$6,69 \times 10^{-3}$
X$\pm$DP	501,00 $\pm$ 38,36^a	11,13 $\pm$ 0,85^a	6,29 $\times 10^{-3} \pm 0,57 \times 10^{-3a}$
GV-1	498	11,07	$7,60 \times 10^{-3}$
GV-2	476	10,58	$6,46 \times 10^{-3}$
GV-3	403	8,95	$5,63 \times 10^{-3}$
GV-4	489	10,87	$5,91 \times 10^{-3}$
GV-5	613	13,62	$7,16 \times 10^{-3}$
X$\pm$DP	495,80 $\pm$ 75,48^a	11,02 $\pm$ 1,68^a	6,55 $\times 10^{-3} \pm 0,83 \times 10^{-3a}$
GB ₁₂ -1	465	10,33	$6,24 \times 10^{-3}$
GB ₁₂ -2	536	11,91	$7,09 \times 10^{-3}$
GB ₁₂ -3	450	10,00	$6,07 \times 10^{-3}$
GB ₁₂ -4	492	10,93	$5,91 \times 10^{-3}$
GB ₁₂ -5	540	12,00	$6,90 \times 10^{-3}$
X$\pm$DP	496,60 $\pm$ 40,70^a	11,03 $\pm$ 0,91^a	6,44 $\times 10^{-3} \pm 0,52 \times 10^{-3a}$
GB-1	22	0,49	$0,31 \times 10^{-3}$
GB-2	14	0,31	$0,23 \times 10^{-3}$
GB-3	19	0,42	$0,26 \times 10^{-3}$
GB-4	35	0,78	$0,47 \times 10^{-3}$
GB-5	38	0,84	$0,56 \times 10^{-3}$
X$\pm$DP	25,60 $\pm$ 10,41^b	0,57 $\pm$ 0,23^b	0,37 $\times 10^{-3} \pm 0,14 \times 10^{-3b}$
GB/B ₁₂ -1	132	2,93	$1,72 \times 10^{-3}$
GB/B ₁₂ -2	98	2,18	$1,16 \times 10^{-3}$
GB/B ₁₂ -3	157	3,49	$2,15 \times 10^{-3}$
GB/B ₁₂ -4	102	2,27	$1,41 \times 10^{-3}$
GB/B ₁₂ -5	71	1,58	$0,99 \times 10^{-3}$
X$\pm$DP	112,00 $\pm$ 33,17^c	2,49 $\pm$ 0,74^c	1,49 $\times 10^{-3} \pm 0,46 \times 10^{-3c}$

a $\neq$ b $\neq$ c (p $\leq$ 0,05; estatisticamente significante)

2.2.4.3 Frequência de túbulos seminíferos contendo células de Sertoli com alterações morfológicas

Os resultados indicam que houve diferença significativa na frequência de túbulos seminíferos contendo células de Sertoli com alterações morfológicas entre os grupos controle e busulfan (Tabela 5).

Embora tenha sido observado um aumento significativo na frequência de túbulos com células de Sertoli alteradas no GB/B₁₂ em relação ao grupo controle, os resultados revelaram uma diminuição significativa na frequência desses túbulos seminíferos nos animais do grupo busulfan-vitamina quando comparados aos animais do GB.

Tabela 5- Frequência (%) de túbulos seminíferos contendo células de Sertoli com alterações morfológicas nos animais dos grupos controle (GC), busulfan (GB) e busulfan-vitamina (GB/B₁₂)

Animais	Frequência (%)
GC-1	33,33
GC-2	6,67
GC-3	23,33
GC-4	16,67
GC-5	16,67
X±DP	19,34± 9,83^a
GB-1	60,00
GB-2	70,00
GB-3	66,67
GB-4	73,33
GB-5	56,67
X±DP	65,33±6,91^b
GB/B ₁₂ -1	50,00
GB/B ₁₂ -2	50,00
GB/B ₁₂ -3	60,00
GB/B ₁₂ -4	36,67
GB/B ₁₂ -5	53,33
X±DP	50,00±8,50^c

a ≠ b ≠ c; p≤0,05 (estatisticamente significante)

2.3 DISCUSSÃO

Os resultados revelaram que o tratamento com busulfan causou uma redução significativa do peso corpóreo dos animais, como já observado anteriormente por Jiang (1998) e Gibson et al. (2003). Logo, supõe-se que o aumento observado no peso testicular relativo ocorreu devido à redução do peso corpóreo, uma vez que o peso testicular relativo corresponde à porcentagem do peso testicular absoluto em relação ao peso corpóreo. Em pesquisas anteriores, alguns autores verificaram diminuição no peso

testicular em animais tratados com o antineoplásico busulfan (ANJAMROOZ et al., 2007; GOMES et al., 1973). No entanto, esses resultados foram obtidos após um maior período de restabelecimento pós-tratamento. Verificou-se um aumento significativo no peso corpóreo dos animais tratados com busulfan e suplementados com a vitamina B₁₂, em relação àqueles que foram submetidos ao tratamento apenas com busulfan. Esse aumento no peso corpóreo resultou em uma diminuição no peso testicular relativo dos animais do grupo busulfan+vitamina.

Os resultados do hemograma demonstraram que o tratamento com o antineoplásico busulfan causa leucopenia e trombocitopenia, resultados esperados, uma vez que esse fármaco é utilizado no tratamento da leucemia mieloide crônica. Gibson et al. (2003) observaram diminuição de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e plaquetas um dia após a administração de 10,5 mg/kg do quimioterápico. A suplementação com vitamina B₁₂ nos animais tratados com o fármaco não elevou o número de leucócitos e plaquetas no sangue.

A análise morfológica dos cortes testiculares dos animais tratados com busulfan indicou que o uso desse fármaco causa alterações nos túbulos seminíferos, como a descamação de células germinativas do epitélio para a luz tubular e a presença de espaços intraepiteliais. Entretanto, não foram observadas alterações nas áreas tubular, epitelial e luminal dos túbulos seminíferos dos animais tratados com o antineoplásico, em relação aos animais do grupo controle. Amjarooz et al. (2007) observaram uma diminuição no diâmetro dos túbulos seminíferos de animais tratados com 20 mg/kg de busulfan, apenas quatro semanas após a administração do fármaco, sendo a diminuição máxima desse parâmetro morfométrico observada somente após seis

semanas. Como, no presente experimento, os testículos foram coletados após seis dias da administração da última dose de busulfan, supõe-se que o período de tratamento foi muito curto para desencadear alterações significantes nos parâmetros morfométricos tubulares.

Os resultados revelaram uma redução significativa do número de espermatogônias (94,18%, em média) nos animais tratados com o quimioterápico em relação aos animais do grupo controle. Trabalhos anteriores (ANJAMROOZ et al., 2007; KOPECKY et al., 2005) também relataram tal diminuição, podendo essa depleção já ser observada cinco dias após o tratamento com o quimioterápico (O'SHAUGHNESSY et al., 2008). A explicação provável para a perda das células da linhagem germinativa, após o uso de busulfan, é a morte celular, a qual pôde ser observada no presente experimento pela presença de espermatogônias e também de outros tipos celulares (espermátócitos e espermátides) com aspecto apoptótico nos túbulos seminíferos dos animais do GB.

As espermatogônias são células-tronco presentes no epitélio seminífero que apresentam tanto a característica de auto-renovação, mantendo-se como precursoras de outras espermatogônias, como a de se diferenciar dando origem a espermatogônias do tipo B, responsáveis pela progressão da espermatogênese no túbulo seminífero (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Assim, a diminuição desse tipo celular, causada pelo tratamento com o antineoplásico busulfan, traz sérias consequências à fertilidade masculina. Zschauer e Hodel (1980) classificaram o busulfan como uma substância radiomimética, isto é, uma droga que possui um efeito direto nas espermatogônias e, conseqüentemente, no desenvolvimento posterior da espermatogênese. Foi também

observado que as espermatogônias-tronco são mais vulneráveis à ação desse fármaco do que as espermatogônias diferenciadas (ROOIJ; VERGOUWEN, 1991). Apesar disso, Bucci e Meistrich (1987) observaram que não há aumento da ocorrência de mutações dominantes letais, causadas por um possível dano genético nas espermatogônias, após o tratamento com o busulfan. Dessa forma, acredita-se que as células-filhas, oriundas das células-tronco que sobreviveram à ação alquilante do fármaco, não recebem um número significativo de aberrações cromossômicas.

Os resultados revelaram também que o tratamento com o quimioterápico busulfan causa alterações morfológicas nas células de Sertoli. A frequência de túbulos com núcleos de células de Sertoli que apresentavam alterações no grupo tratado com o fármaco foi de aproximadamente 65%, em média. Dentre as alterações destacaram-se deslocamento do núcleo da porção basal do túbulo seminífero, presença de cromatina periférica condensada e halos nucleares nítidos. Trabalhos anteriores também relataram alterações nas células de Sertoli com a mesma dose do quimioterápico, incluindo sua vacuolização (KOPECKY et al., 2005; POSPECHOVA et al., 2007). A via de ação do busulfan consiste na formação de ligações cruzadas nas moléculas de DNA, interferindo, portanto, nos processos celulares de replicação e transcrição (SIKIC, 2005). A alquilação do DNA, causada pelo busulfan, está associada ao período de interfase do ciclo celular. Dessa forma, a alquilação pode ocorrer em células que não estão em proliferação, como as de Sertoli. Logo, a presença de cromatina periférica condensada no núcleo das células de Sertoli, observada no presente experimento, é sugestiva de fragmentação nuclear causada pelo fármaco.

As alterações causadas nas células de Sertoli pelo tratamento com o busulfan podem ter efeito negativo sobre as células germinativas, uma vez que as células de Sertoli são responsáveis pela manutenção estrutural e nutricional das células germinativas. Além disso, as células de Sertoli são responsáveis pela manutenção da barreira hematotesticular. Sendo assim, as células germinativas em estágios mais avançados da espermatogênese, como os espermatócitos e as espermátides, são mantidas isoladas e protegidas de substâncias do sangue e agentes nocivos (ROSS, 2008). Dessa forma, um possível dano às células de Sertoli pode resultar em alterações na barreira hematotesticular e, conseqüentemente, na exposição das células germinativas ao antineoplásico presente no sangue, como pôde ser observado pela presença de espermatócitos e espermátides com aspecto apoptótico (figuras 4C e 4E).

A presença de células de Sertoli deslocadas da porção basal do epitélio seminífero nos animais tratados com o busulfan, em conjunto com a perda de células germinativas causadas pelo fármaco, sugere a perda de adesão entre as células de Sertoli e as células germinativas. Pospechova et al. (2007) observaram alterações nas proteínas relacionadas às junções adesivas nos túbulos seminíferos de animais tratados com o antineoplásico. Kopecky et al. (2005) demonstraram que o tratamento com o fármaco causa o colapso dos filamentos de vimentina nas células de Sertoli. Considerando que o colapso dos filamentos de vimentina pode afetar a integração entre as células de Sertoli e as células germinativas, é possível que as alterações causadas pelo busulfan nas células de Sertoli sejam responsáveis pela perda de células germinativas nos túbulos mais alterados.

Tendo em vista as alterações destrutivas causadas pelo busulfan ao epitélio germinativo, observadas nesse estudo, faz-se necessário buscar tratamentos que amenizem os efeitos adversos desse fármaco no aparelho reprodutor masculino. É importante ressaltar que, segundo os resultados do hemograma dos animais, o número de leucócitos e plaquetas dos animais do GB/B₁₂ foi semelhante ao dos animais do GB. Portanto, a vitamina não foi capaz de minimizar o efeito imunossupressor bem como a trombocitopenia, causados por este antineoplásico, nos animais tratados. Apesar destes resultados hematológicos, os animais do GB/B₁₂ apresentaram um significativo aumento no número de espermatogônias, o qual foi aproximadamente 4,4 vezes maior do que nos animais apenas tratados com o busulfan. Além deste efeito benéfico, a suplementação dos animais tratados com a vitamina B₁₂ causou uma diminuição significativa na frequência de túbulos com células de Sertoli alteradas morfológicamente em relação aos animais não suplementados.

Trabalhos anteriores (BECK et al, 1965; OH; BROWN, 2003) demonstraram que a vitamina B₁₂ estimula a síntese de DNA e contribui para a divisão celular. Beltrame et al. (2011) observaram uma maior incidência de espermatogônias e espermatócitos PCNA-positivos em animais tratados com vitamina B₁₂, indicando uma intensa atividade proliferativa dessas células. Logo, uma das possíveis explicações para o aumento do número de espermatogônias nos animais suplementados com vitamina durante o tratamento com o antineoplásico é o maior índice mitótico destas células, induzido pela vitamina, compensando a perda de células devido à morte celular causada pelo fármaco. Entretanto, não foi observado nenhum aumento no número de espermatogônias dos animais apenas suplementados com a vitamina B₁₂, em relação

aos animais do grupo controle. Uma hipótese para tal resultado se baseia no fato de que as vitaminas do complexo B são hidrossolúveis e, todo o excesso dessas vitaminas, quando ingeridas em quantidade superior às necessidades fisiológicas, é eliminado na urina (FUKUWATARI et al., 2010). Dessa forma, podemos sugerir que, em condições normais, nas quais o processo espermato gênico encontra-se nutricionalmente suprido, a suplementação com vitamina B₁₂ não estimula a atividade mitótica das células germinativas. Por outro lado, nos animais tratados com o antineoplásico; ou seja, sob condições em que uma possível deficiência de vitamina B₁₂ estaria prejudicando o processo espermato gênico, a suplementação com essa vitamina poderia ter estimulado a atividade mitótica das espermatogônias. Essa hipótese pode ser reforçada pelo fato de que pacientes tratados com busulfan, segundo Anger et al (1979), apresentam uma diminuição nos níveis séricos de vitamina B₁₂. Outra explicação para o aumento do número de espermatogônias e para a diminuição da frequência de túbulos seminíferos com células de Sertoli alteradas nos animais suplementados é a possível ação protetora parcial da vitamina B₁₂ sobre os túbulos seminíferos. Mori et al (1991) observaram que a administração de metilcobalamina em animais tratados com óxido de etileno exerce um efeito preventivo sobre os testículos, impedindo a redução do peso testicular e do número de espermátides, alterações que ocorriam quando os animais não eram suplementados com essa vitamina.

Sendo assim, futuros estudos serão necessários para esclarecer se a vitamina B₁₂ exerce um efeito protetor ou mitótico sobre as células que constituem o epitélio seminífero nos animais tratados com o antineoplásico busulfan.

3. CONCLUSÕES

Os resultados revelaram que o tratamento com o busulfan causa diminuição do peso corpóreo e alterações nos túbulos seminíferos, incluindo redução significativa no número de espermatogônias e alterações morfológicas nos núcleos das células de Sertoli.

Embora nos animais tratados e suplementados com a vitamina, as alterações hematológicas (leucopenia e trombocitopenia) não tenham sido minimizadas pela suplementação, esta foi capaz de impedir a perda de peso corpóreo dos animais. Além disso, nos animais tratados e suplementados com a vitamina, houve um aumento significativo no número de espermatogônias e diminuição da frequência de túbulos seminíferos contendo células de Sertoli alteradas. Portanto, o tratamento com vitamina B₁₂, associado ao tratamento com busulfan, foi capaz de amenizar o efeito prejudicial deste antineoplásico sobre as espermatogônias-tronco e sobre as células de Sertoli.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AICH, S.; MANNA, C. K. Histophysiological changes of the testicular tissue due to busulphan administration in the wild Indian house rat (*Rattus rattus*). **Acta Biol. Hung.**, v. 52, n.1, p. 105-116, 2001.
2. ANGER, G.; SENF, L.; SCHMIDT, U.; MATTHEUS, A. Determination of serum vitamin B₁₂ in hematologic diseases. **Z. Gesamte. Inn. Med.**, v. 34, n.15, p. 196-197, 1979.

3. ANJAMROOZ, S. H.; MOVAHEDIN, M.; MOWLA, S. J.; BAIRANVAND S. P. Assessment of morphological and functional changes in the mouse testis and epididymal sperms following busulfan treatment. **Iran. Biomed. J.**, v. 11, n.1, p. 15-22, 2007.
4. APONTE, P. M.; BRAGT, M. P. V.; ROOIJ, D. G.; PELT, A. M. V. Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. **APMIS**, v.113, n. 11-12, p. 727–742, 2005.
5. BECK, W. S.; GOULIAN, M.; KASHKET, S. The role of vitamin B₁₂ in deoxyribonucleic acid synthesis: studies of a model megaloblast. **Trans. Assoc. Am. Physicians**, v.78, p. 343-361, 1965.
6. BELTRAME, F. L.; CANEGUIM, B. H.; MIRAGLIA, S. M.; CERRI, P. S.; SASSO-CERRI E. Vitamin B₁₂ supplement exerts a beneficial effect on the seminiferous epithelium of cimetidine-treated rats. **Cells Tissues Organs**, v. 193, n.3, p.184-194, 2011.
7. BUCCI, L. R.; MEISTRICH M. L. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. **Mutat. Res.**, v. 176, n.2, p. 259-268, 1987.
8. CERRI, P. S.; SASSO-CERRI, E. Staining methods applied to glycol methacrylate embedded tissue sections. **Micron.**, v. 34, n.8, p.365-372, 2003.
9. CHIARINI-GARCIA, H.; RAYMER, A. M.; RUSSELL, L. D. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. **Reproduction**, v.126, n.5, p.669–680, 2003.

10. CLERMONT, Y.; PEREY, B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules of immature rats. **Am. J. Anat.**, v. 100, n.2, p.241–267, 1957.
11. CLERMONT, Y. Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat: a revised model for the renewal of spermatogonia. **Am. J. Anat.**, v.111, p.111–129, 1962.
12. COSTABILE, R. A. The effects of cancer and cancer therapy on male reproductive function. **J. Urol.**, v. 149, n.5, p. 1327-1330, 1993.
13. DELUCIA, R.; BELIZÁRIO, J. E.; GARAY M. Fármacos Antineoplásicos. In: DELUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R. M. **Farmacologia Integrada**. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2004, cap. 54, p. 502-525.
14. FUKUWATARI, T.; YOSHIDA, E.; TAKAHASHI, K., SHIBATA, K. Effect of fasting on the urinary excretion of water-soluble vitamins in humans and rats. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**. v. 56, n.1, p.19-26, 2010.
15. FURUKAWA, S.; USUDA, K.; ABE, M.; HAYASHI, S.; OGAWA, I. Busulfan-induced apoptosis in rat placenta. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 59, n.2, p. 97-103, 2007.
16. GIBSON, F. M.; ANDREWS, C. M.; DIAMANTI, P.; RIZZO, S.; MACHARIA, G.; GORDON-SMITH, E. C.; WILLIAMS, T.; TURTON, J. A new model of busulphan-induced chronic bone marrow aplasia in the female BALB/c mouse. **Int. J. Exp. Path.**, v. 84, n.1, p. 31-48, 2003.
17. GOMES, W. R.; HALL R. W.; JAIN S. K.; BOOTS L. R. Serum gonadotropin and testosterone levels during loss and recovery of spermatogenesis in rats. **Endocrinology**, v. 93, n. 4, p.800-809, 1973.
18. GRÄSBECK, R.; SALONEN, E. M. Vitamin B₁₂. **Prog. Food Nutr. Sci.**, v. 2, n.5, p. 193-231, 1976.

19. JAHNUKAINEN, K.; EHMCKE, J.; SCHLATT, S. Testicular xenografts: a novel approach to study cytotoxic damage in juvenile primate testis. **Cancer Res.**, v. 66, n.7, p. 3813-3818, 2006.
20. JIANG, F. X. Behaviour of spermatogonia following recovery from busulfan treatment in the rat. **Anat. Embryol. (Berl.)**, v. 198, n.1, p. 53-61, 1998.
21. JOHNSON, L.; Jr. THOMPSON, D. L.; VARNER, D. D. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 105, n. 1-2, p. 23-51, 2008.
22. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor Masculino. In:_____ **Histologia Básica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. Cap. 21, p. 414-430.
23. KERR, J. B.; De KRETZER, D. M. Proceedings: The role of the Sertoli cells in phagocytosis of the residual bodies of spermatides. **J. Reprod. Fertil.**, v. 36, n.2, p.439-440, 1974.
24. KLUIN, P. M.; ROOIJ, D. G. A comparison between the morphology and cell kinetics of gonocytes and adult type undifferentiated spermatogonia in the mouse. **Int. J. Androl.**, v.4, n.4, p.475–493, 1981.
25. KOPECKY, M.; SEMECKY, V.; NACHTIGAL, P. Vimentin expression during altered spermatogenesis in rats. **Acta Histochem.**, v. 107, n.4, p. 279-289, 2005.
26. KORMANO, M.; HOVATTA, O. Contractility and histochemistry of the myoid cell layer of the rat seminiferous tubules during postnatal development. **Z. Anat. Entwickl.**, v.137, n.3, p. 239-248. 1972.

27. LAWSON, K. A.; PEDERSON, R. A. Clonal analysis of cell fate during gastrulation and early neurulation in the mouse. In: CIBA FOUNDATION SYMPOSIUM. **Post-implantation Development in the Mouse**. New York: John Wiley & Sons, 1992, p. 3-26.
28. LEE, K.; HAUGEN, H. S.; CLEGG, C. H.; BRAUN, R. E. Premature translation of protamine 1 mRNA causes precocious nuclear condensation and arrests spermatid differentiation in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, n.26, p.12451–12455, 1995.
29. MEANS, A. R.; FAKUNDING, J. L.; HUCKINS, C.; TINDALL, D. J.; VITALE, R. Follicle-stimulating hormone, the Sertoli cell, and spermatogenesis. **Recent Prog. Horm. Res.**, v.32, p. 477-522, 1976.
30. MOHAMMAD-GHASEMI, F.; SOLEIMANI-RAD, J.; GHANBARI, A. A. A morphological and morphometric study of adult mouse testis following different doses of busulfan administration. **Faslnamah-i Pizishki-i Barvar va Nabarvar**, v.7. n.1, p.25-36, 2006.
31. MONOYER, J. F. Changes of spermatogenesis in rats treated by Myleran. **C. R. Seances Soc. Biol. Fil.**, v.156, p. 968-970, 1962.
32. MORI, K.; KAIDO, M.; FUJISHIRO, K.; INOUE, N.; IDE, Y.; KOIDE, O. Preventive effects of methylcobalamin on the testicular damage induced by ethylene oxide. **Arch. Toxicol.**, v. 65, n.5, p. 396-401, 1991.
33. MOSES, M. J. Synaptinomal Complex. **Ann. Rev. Genet.**, v. 2, p. 363, 1968.
34. NIEDERBERG, C. S.; LAMB, D. J. Spermatogenesis in the adult. In: LIPSHULTZ, L. I.; HOWARDS S. S. **Infertility in the Male**. St. Louis: Mosby-Year Book, 1997, p.106-122.

35. NÓBREGA, R. H.; GREEBE, C. D.; KANT, H. V.; BOGERD, J.; De FRANÇA, L. R.; SCHULZ, R. W. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. 11, 2010.
36. OAKBERG, E. F. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. **Am. J. Anat.** v. 99, n.3, p.391–413, 1956.
37. OH, R. C.; BROWN, D. L. Vitamin B₁₂ deficiency. **Am. Fam. Physician**, v. 67, n. 5, p.979-986, 2003.
38. O'SHAUGHNESSY, P. J.; HU, L.; BAKER, P. J. Effect of germ cell depletion on levels of specific mRNA transcripts in mouse Sertoli cells and Leydig cells. **Reproduction**, v. 135, n.6, p. 839-850, 2008.
39. OSHIO, S.; OZAKI, S.; OHKAWA, I.; TAJIMA, T.; KANEKO, S.; MOHRI, H. Mecobalamin promotes mouse sperm maturation. **Andrologia**, v. 21, n.2, p.167-173, 1989.
40. OZAKI, S.; OHKAWA, I.; KATOH, Y.; TAJIMA, T.; KIMURA, M.; ORIKASA, S. Study on producing rats with experimental testicular dysfunction and effects of mecobalamin. **Nihon Yakurigaku Zasshi**, v. 91, n.4, p.197-207, 1988.
41. PASQUOLOTTI, F. F.; LUCON A. M.; SOBREIRO B. P.; PASQUALOTTO E. B.; ARAP, S. Effects of medical therapy, alcohol, smoking, and endocrine disruptors on male infertility. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. São Paulo**, v. 59, n.6, p. 375-382, 2004.
42. PHILLIPS, B. T.; GASSEI, K.; ORWIG, K. E. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 365, n. 1546, p. 1663–1678, 2010.

43. POSPECHOVA, K.; KOPECKY, M.; NACHTIGAL, P.; POSPISILOVA, G.; JAMBOROVA, G.; SEMECKY, V. Changes in the expression of P-cadherin in the normal, cryptorchid and busulphan-treated rat testis. **Int. J. Androl.**, v. 30, n.5, p. 430-438, 2007.
44. RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M., MOORE, P. K. **Farmacologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, 829p.
45. RICHBURG, J. H.; BOEKELHEIDE, K. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 137, n. 1, p. 42-50, 1996. ROOIJ, D. G. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. **Reproduction**, v.121, n.3, p. 347–354, 2001.
46. ROOIJ, D.G. The spermatogonial stem cell niche. **Microsc. Res. Tech.**, v.72, n.8, p.580–585, 2009.
47. ROOIJ, D. G.; RUSSELL, L. D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. **J. Androl.**, v. 21, n.6, p. 776–798, 2000.
48. ROOIJ, D.G.; VERGOUWEN, R.P. The estimation of damage to testicular cell lineages. **Progr. Clin. Biol. Res.**, v. 372, p.467–480, 1991.
49. ROSS, M.H. **Histologia: Texto e Atlas**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008, 908 p.
50. RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; HIKIM, A. P. S.; CLEGG. E. D. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. **Int. J. Androl.**, v.16, n.1, p.83, 1993.
51. RUSSELL, L. D.; SAXENA, N. K.; TURNER, T. T. Cytoskeletal involvement in spermiation and sperm transport. **Tissue Cell**, v. 21, n.3, p. 361-376, 1989.

52. RUSSELL, L.D. Movement of spermatocytes from the basal to adluminal compartment of the rat testis. **Am. J. Anat.**, v. 148, n.3, p.313-328, 1977.
53. SAPSFORD, C. S. Changes in the cells of the sex cords and the seminiferous tubules during development of the testis of the rat and the mouse. **Aust. J. Zool.**, v.10, p.178–192, 1962.
54. SASSO-CERRI, E.; MIRAGLIA, S. M. In situ demonstration of both TUNEL-labeled germ cell and Sertoli cell in the cimetidine-treated rats. **Histol. Histopathol.**, v.17, n.2, p. 411-417, 2002.
55. SASSO-CERRI, E.; CERRI, P. S. Morphological evidences indicate that the interference of cimetidine on the peritubular components is responsible for detachment and apoptosis of Sertoli cells. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 6, p. 18, 2008.
56. SEIXAS, R. Préludio. In: _____ **Gita**. Philips Records, 1974, Faixa 10.
57. SIKIC, B. L. Fármacos Antineoplásicos. In: CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. **Farmacologia moderna com aplicações clínicas**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2005, cap. 56, p.601-618.
58. STUMPP, T.; SASSO-CERRI, E.; FREYMÜLLER, E.; MIRAGLIA, S. M. Apoptosis and testicular alterations in albino rats treated with etoposide during the prepubertal phase. **Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell Evol. Biol.**, v. 279, n.1, p. 611-622, 2004.
59. SYED, V.; HECHT, N. B. Disruption of germ cell-Sertoli cell interactions leads to spermatogenic defects. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 186, n.2, p. 155-157, 2002.
60. VOLKOV, I.; PRESS, Y.; RUDOY, I. Vitamin B₁₂ could be a “master key” in the regulation of multiple pathological processes. **J. Nihon. Med. Sch.**, v. 73, n.2, p. 65-69, 2006.

61. WANG, Z. Q.; WATANABE, Y.; TOKI, A.; ITANO T. Altered distribution of Sertoli cell vimentin and increased apoptosis in cryptorchid rats. **J. Pediatr. Surg.**, v. 37, n. 4, p. 648-652, 2002.
62. WATSON A. A. Seminal vitamin B₁₂ and sterility. **Lancet.**, v. 2, p.644,1962.
63. YAMAKAWA, G. J.; SAKATOKU, G.J.; ISOYAMA, R.; TAKIHARA, H.; OZAKI, S.; TAJIMA, T. The effects of Mecobalamin on recovering spermatogenesis of experimentally damaged rat testis evaluated by flow cytometry. **Nishinohon J. Urol.** v.50, p.1163-1167, 1988.
64. YOSHIDA, S.; NABESHIMA, Y.; NAKAGAWA, T. Stem-cell heterogeneity: actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1120, p. 47–58, 2007.
65. ZHOU, Q.; GRISWOLD, M. D. Regulation of spermatogonia. In: MELTON, D. **Stem Book**. Cambridge: Harvard Stem Cell Institute, 2008, p.527-549.
66. ZSCHAUER, A.; HODEL, C. Drug-induced histological changes in rat seminiferous tubular epithelium. **Arch. Toxicol. Suppl.**, v.4, p. 466-470, 1980.