



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO  
DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Lígia Maria Micaí Gomide**

**Avaliação de células germinativas e células de  
Sertoli em modelo experimental de criptorquidia e  
orquidopexia**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio  
de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para  
obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo  
Coorientadora: Profa. Dra. Merielen Garcia Nascimento e Pontes

**Botucatu  
2016**

Lígia Maria Micaí Gomide

**Avaliação de células germinativas e células de Sertoli em modelo experimental de criptorquidia e orquidopexia**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo  
Coorientadora: Profa. Dra. Merielen Garcia Nascimento e Pontes

Botucatu  
2016

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

Gomide, Lígia Maria Micai.

Avaliação de células germinativas e células de Sertoli em modelo experimental de criptorquidia e orquidopexia / Lígia Maria Micai Gomide. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: João Lauro Viana de Camargo

Coorientador: Merielen Garcia Nascimento e Pontes

Capes: 40105008

1. Sertoli, Células de. 2. Testículos - Cirurgia. 3. Criptorquidismo. 4. Fatores de risco. 5. Estudos experimentais.

Palavras-chave: Criptorquidia; Modelo experimental; Orquidopexia; Testículo.

*Dedicatória*

*À Deus, que me guia e ilumina minha vida com seus ensinamentos de amor.*

*À minha família, pelas batalhas que lutamos juntos, pelo crescimento que vivemos a cada dia, pelo apoio constante que me dão, e, principalmente, pelo amor incondicional.*

*“Viver é sempre dizer aos outros que eles são importantes, que nós os amamos. Porque um dia eles se vão e ficaremos com a impressão de que não os amamos o suficiente”*

*Chico Xavier*

*Agradecimentos especiais*

*Ao meu orientador, Dr. João Lauro Viana de Camargo, pelos ensinamentos e pelo exemplo de pesquisador e pessoa. Meu muito obrigada!*

*À minha co-orientadora, Dra. Merielen Garcia Nascimento e Pontes, pela contribuição na realização deste trabalho. Muito obrigada pela paciência, pela dedicação e pela amizade!*

*“Eu aprendi que para crescer como pessoa preciso me cercar de gente mais inteligente do que eu”*

*H. Jackson Brown Jr*

# *Agradecimentos*



*À Deus, por escutar minhas preces e por me guiar nessa trajetória.*

*Aos meus pais, Fernando e Fátima, pelo apoio, pela ajuda nessa trajetória e pelos ensinamentos que carregarei por toda a vida. Pelo amor, pelo carinho, pela atenção, pelos cuidados e pela motivação! Muito obrigada por serem as luzes da minha vida!*

*Ao meu namorado Wellington, por me incentivar a seguir em frente, por sempre me ajudar a ser uma pessoa melhor, pelo carinho, pela compreensão e pela paciência! Pelas brincadeiras e pela amizade! Muito obrigada pelo seu amor!*

*À minha irmã Fernanda e meu cunhado Roberto, por estarem sempre perto quando preciso, por me motivarem e por ficarem sempre na torcida! Pela atenção e pelo carinho! Obrigada por serem sempre queridos!*

*À toda minha família, em especial às minhas avós Angela e Odete, que estão sempre na torcida e rezando para que tudo dê certo! Obrigada pelo carinho!*

*À Nathália, não só por me receber em sua casa com toda atenção e carinho sempre que precisei, mas também pelo nosso convívio sempre agradável, pelos momentos engraçados que passamos juntas, pelo companheirismo nas gordices, pelos desabafos, pelo carinho, pelo incentivo, e pela sincera amizade! Muito obrigada Nah!*

*À Ana Paula, não só por dividir a casa, mas pelos conselhos, pela convivência, pela preocupação, pelo carinho, pela atenção e pela amizade*

*verdadeira e ótima que tenho com você! Muito obrigada Ana!*

*À Viviane, por ser humana, por sempre se preocupar com os outros, por sempre rodear todos a sua volta com seu amor e carinho e pelos momentos divertidos que passamos juntas! Obrigada por tudo Vivis!*

*À Rafaela, por me incentivar e me dar apoio seja qual fossem minhas decisões, por ser parceira em tudo, trazer alegria para os meus dias com suas loucuras e histórias engraçadas, e por estar sempre presente quando preciso! Muito obrigada Rafilda!*

*À Gabi, pelo apoio, pela convivência, por sempre estar disponível quando precisei de ajuda, pela atenção e pelo carinho. Muito obrigada!*

*À Carol, pelo companheirismo, pela amizade, pelo convívio e pelas histórias engraçadas. Muito obrigada!*

*À Thânia, Osvaldo e Juliana, pela companhia e convivência.*

*À Paula, pelo convívio, pelos desabafos que fizemos uma a outra, pelos momentos divertidos, pelo carinho e pela atenção! Muito obrigada amiga!*

*À Dra. Maria Luíza, pela convivência, pelo carinho, pela atenção, pela dedicação e por sempre ajudar quando preciso. Muito obrigada Iza por estar sempre presente!*

*Aos queridos alunos do professor Erick, Thálitta, Iane, Jaqueline e Renato,*

*não só por dividirem seu conhecimento, mas também pelo carinho e atenção! Muito obrigada!*

*À Cristina, Vânia, Paulo e Paulo César (PC) que contribuíram muito para o projeto, auxiliando sempre no que precisei. Obrigada pela atenção, dedicação e amizade!*

*À Andréia, irmã da Nathália, pela agradável convivência nos últimos meses e por dividir, junto com Nathália, sua morada! Muito obrigada!*

*Aos docentes e funcionários do Departamento de Patologia, pela convivência e apoio.*

*À Universidade Estadual Paulista, que me acolhe e me oferece estrutura desde à graduação.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo suporte financeiro que permitiu a realização deste trabalho. Processo nº 2012/09873-4.*

*Finalmente, a todos que de alguma forma contribuíram durante o desenvolvimento do meu mestrado.*

*“Ainda que eu falasse a língua dos homens, e falasse a língua dos anjos, sem amor, eu nada seria”*

*Paulo de Tarso, Bíblia, 1 Coríntios 13*

*Resumo*

Criptorquidia, ou não descida testicular, é uma das anormalidades urogenitais mais comum em meninos recém-nascidos e um dos principais fatores de risco para a infertilidade e câncer testicular. Tem sido proposto que o criptorquidismo, baixa qualidade espermática, hipospádia e tumor testicular de células germinativas (TTCG) compreendem a síndrome de disgenesia testicular (SDT), que tem origem comum durante a vida fetal. A criptorquidia induz degeneração do epitélio seminífero com depleção de células germinativas, distúrbios em células de Leydig e de Sertoli e diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos. A correção cirúrgica da criptorquidia (orquidopexia) tem sido utilizada a fim de diminuir o risco de infertilidade e câncer testicular. No entanto, o melhor tempo para realizar esta cirurgia, a fim de obter os melhores resultados tem sido uma preocupação. Além disso, não existe um modelo experimental disponível na literatura que explore alterações morfológicas testiculares associadas à criptorquidia e orquidopexia. Neste estudo, criptorquidismo foi induzido em ratos Sprague-Dawley com 3 semanas de vida; orquidopexia foi realizada em três momentos diferentes (3, 5 e 9 semanas após a cirurgia de criptorquidia), e os animais de cada grupo foram sacrificados após 3 e 8 semanas de recuperação. As análises histológicas e estimativas quantitativas como a média do diâmetro do túbulo seminífero (MSTD), incidência de vacúolos no epitélio, e o número de células de Sertoli por túbulo, além da imunoistoquímica para citoqueratina 18 foram realizados para avaliar alterações testiculares após as cirurgias de criptorquidia e orquidopexia. A criptorquidia provocou degeneração e esfoliação de células germinativas, aumento da incidência de vacúolos intra-epiteliais e diminuição da MSTD e dos pesos dos testículos. No grupo de recuperação de 3 semanas, muitas das alterações constatadas na criptorquidia ainda estavam presentes, a gravidade destas alterações foi proporcional ao período em que os testículos permaneceram na cavidade abdominal até orquidopexia. Após o período de recuperação de 8 semanas, a orquidopexia reverteu quase todas as alterações, independentemente do momento cirúrgico em que foi realizada. Em conclusão, a intensidade dos danos no testículo foi maior nos animais que permaneceram criptorquídicos por mais tempo, sem alterações no número de células de Sertoli, mas com uma provável perturbação da sua função. O modelo adotado pode ser útil para estudar alterações testiculares induzidas pelo criptorquidismo e a recuperação potencial do testículo de ratos após orquidopexia.

*Abstract*

Cryptorchidism, or undescended testis, is one of the most common urogenital abnormalities in newborn boys and one of the main risk factors for infertility and testicular cancer. It has been proposed that cryptorchidism, low sperm quality, hypospadias and testicular germ cell tumor (TGCT) comprise the testicular dysgenesis syndrome (TDS) and that they have a common origin during the fetal life. Cryptorchidism induces seminiferous epithelium degeneration with germ cell depletion, Leydig and Sertoli cell disorders and decreased tubule diameter. The surgical correction of cryptorchidism (orchidopexy) has been applied in order to decrease the risk for infertility and testicular cancer. However, the best moment to perform this surgery in order to obtain successful results has been a concern. Moreover, there is no experimental model available in the literature that explores comprehensively testicular morphological alterations associated to cryptorchidism and orchidopexy. In this study, cryptorchidism was induced in 3-week old Sprague-Dawley rats; orchidopexy was performed at three different moments (3, 5 and 9 weeks after cryptorchidism surgery), and the animals of each group were sacrificed after 3 and 8 weeks of recovery. Histological analyses, and quantitative estimates such as seminiferous tubule diameter (MSTD), incidence of vacuoles in the tubules, and number of Sertoli cells per tubule, and immunohistochemistry for cytokeratin 18 were performed to evaluate testicular alterations after cryptorchidism and orchidopexy surgeries. Cryptorchidism induced germ cell degeneration and exfoliation, increased incidence of intraepithelial vacuoles and decreased MSTD and testes weights. In the 3-week recovery group, many of the alterations seen in cryptorchidism were still present, the severity of these alterations being proportional to the period the testes remained in abdominal cavity until orchidopexy. After the 8-week recovery period, orchidopexy reversed almost all of the alterations irrespective the surgical moment it was performed. In conclusion, the intensity of the damages in the testis was greater in those animals that remained cryptorchid for a longer time, with no alterations in the number of Sertoli cells but with a probable disruption of its function. The adopted model can be useful to study testicular alterations induced by cryptorchidism and the potential recovery of rat testis after orchidopexy.



# *Sumário*

## CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA .....	1
<i>Descida testicular</i> .....	1
<i>Desenvolvimento testicular</i> .....	2
Período neonatal: nascimento ao DPN 7 .....	3
Período infantil: DPN 8 a 20 .....	3
Período juvenil: DPN 21 a 32 .....	4
Período peri-púbere: DPN 32 a 55 .....	5
Período pós-púbere: DPN 56 a 61 .....	5
<i>Histologia e fisiologia testicular</i> .....	7
<i>Padrões de dano testicular</i> .....	10
Degeneração de células germinativas e formação células gigantes multinucleadas .....	10
Esfoliação e depleção de células germinativas .....	11
Vacúolos no epitélio seminífero .....	12
Alteração no diâmetro tubular .....	13
Retenção de espermátides .....	14
Células de Sertoli imaturas .....	15
<i>Criptorquidia e orquidopexia</i> .....	16
<i>Criptorquidia e orquidopexia experimental</i> .....	19
REFERÊNCIAS .....	24
OBJETIVOS .....	29
<i>Gerais</i> .....	29
<i>Específicos</i> .....	29

## CAPÍTULO II

MANUSCRITO .....	31
<i>Abstract</i> .....	32
<i>Introduction</i> .....	33
<i>Materials and methods</i> .....	36
Animals .....	36
Experimental design .....	37
Surgical procedures .....	37
Necropsy and sample collection .....	38
Histological evaluation .....	39
Immunohistochemistry .....	39
Statistical analysis .....	40
<i>Results</i> .....	40
Testes weight .....	40
Prostate, seminal vesicle and epididymis weight .....	41
Testicular histopathology .....	41
Seminiferous tubule diameter, incidence of vacuoles and number of Sertoli cells .....	42
Immunohistochemistry for cytokeratin 18 .....	43
<i>Discussion</i> .....	43
<i>References</i> .....	48
<i>Figures</i> .....	51
<i>Tables</i> .....	59
CONCLUSÃO .....	60
ANEXOS .....	62

# *Capítulo I*

## **REVISÃO DE LITERATURA**

### **Descida testicular**

A descida do testículo da região abdominal para o escroto durante o desenvolvimento pré-natal é um processo bifásico (Hutson, 1985). Em humanos, a primeira fase, transabdominal, ocorre entre a 8ª a 15ª semanas de gestação, sendo caracterizada pela descida do testículo até a posição inferior do abdômen, processo dependente principalmente do hormônio *insulin-like peptide 3* (Insl3) (Hutson et al., 2010). Este hormônio é produzido pelas células de Leydig, e é responsável por regular o desenvolvimento do cordão mesenquimal que liga o testículo fetal ao fundo do saco escrotal, denominado gubernáculo (Hutson et al., 2010). Ainda nesta fase, o hormônio anti-mulleriano (AMH), produzido pelas células de Sertoli, regride os derivativos mullerianos, responsáveis por originar as tubas uterinas e o útero, e promove espessamento do gubernáculo (Ivell e Hartung, 2003; Hutson et al., 2010). A segunda fase, inguinoescrotal, ocorre entre a 25ª a 35ª semanas de gestação, e é dependente de andrógenos, hormônios produzidos pelas células de Leydig fetais, que promovem a contração do gubernáculo e, conseqüentemente, a descida do testículo desde a região inguinal até o escroto (Hutson et al., 2010).

Apesar de algumas diferenças, o processo de descida testicular é semelhante entre mamíferos, com conservação de eventos-chave importantes, o que torna válida a extrapolação de modelos animais para humanos (Hutson et al., 2010; Hutson et al., 2015). Nos ratos, a descida testicular ocorre também em duas fases: a primeira (transabdominal) entre os dias embrionários (DE) 13 e 17 e a segunda (inguinoescrotal), diferente dos humanos, ocorre após o nascimento, entre os dias pós-natal (DPN) 21 e 28, portanto após o desmame (Hutson et al., 1994; 2013; Chen et al., 2011).

## Desenvolvimento testicular pós-natal

Após a diferenciação das células de Sertoli, formação dos cordões seminíferos e diferenciação das células de Leydig durante o desenvolvimento embrionário (dias embrionários 13 a 15), o testículo do rato após o nascimento ainda é submetido a uma série de eventos que irão resultar na produção de espermatozoides viáveis (Jost et al., 1981; Magre et al., 1991; Picut et al., 2014). Esses eventos correspondem à proliferação mitótica das células tronco espermatogoniais e a diferenciação pré-meiótica de espermatogônias em espermatócitos primários diplóides; diferenciação meiótica de espermatócitos primários para espermátides arredondadas haplóides por duas divisões sucessivas e espermiogênese, processo de reorganização celular e nuclear que transforma as espermátides em espermatozoides maduros (Nishimune & Okabe, 1993). No rato, são reconhecidos cerca de cinco a seis estágios de desenvolvimento testicular pós-natal: neonatal (DPN 0-7), infantil (DPN 8-20), juvenil (DPN 21-32), peri-púbere (DPN 33-55) e pós-púbere (DPN 56-70), que podem ser correlacionados com estágios de desenvolvimento de humanos (Tabela 1) (Ojeda, Advis, & Andrews, 1980; Barrow, Barbellion, & Stadler, 2011).

**Tabela 1.** Comparação de idade dos estágios de desenvolvimento entre ratos e humanos.

<b>Estágio no rato/humano</b>	<b>Rato<sup>a</sup></b>	<b>Humano<sup>b</sup></b>
Neonatal/recém-nascido	DPN 0 a 7	0 a 28 dias
Infantil/infância	DPN 8 a 20	1 a 23 meses
Juvenil/criança	DPN 21 a 32	2 a 12 anos
Peri-púbere/adolescente	DPN 33 a 55	12 a 16 anos
Pós-púbere/adolescente	DPN 56 a 70	

<sup>a</sup>Ojeda, Advis, e Andrews (1980). <sup>b</sup>Barrow, Barbellion, e Stadler (2011).

As principais mudanças morfológicas do desenvolvimento testicular do rato, de acordo com esses estágios, são as seguintes:

♂ Período neonatal: nascimento ao DPN 7

O período neonatal é caracterizado pela transição dos gonócitos fetais a espermatogônias mitoticamente ativas, alta taxa de mitose e diferenciação de células de Sertoli e regressão de células de Leydig fetais, que são substituídas pelas denominadas células de Leydig progenitoras (Picut et al., 2014).

No DPN 3, os túbulos são constituídos por gonócitos e células de Sertoli em proliferação (Figura 1A). As células de Sertoli, caracterizadas por núcleo oval a alongado, estão alocadas junto a membrana basal. Os gonócitos, localizados no centro dos túbulos seminíferos, são caracterizados como células grandes e arredondadas com núcleo com cromatina dispersa e nucléolo proeminente, mitoticamente inativos. As células de Leydig fetais não têm atividade proliferativa e sua população está em constante regressão, ao passo que as células de Leydig progenitoras estão em intensa atividade mitótica (Picut et al., 2014).

♂ Período infantil: DPN 8 a 20

No início do período infantil, ainda há gonócitos fetais se diferenciando em espermatogônias até em torno do DPN 10. Nesta fase ocorre proliferação de células de Sertoli e espermatogônias tipo A e tipo B nos túbulos seminíferos, e proliferação de células de Leydig progenitoras no interstício (Figura 1B). As células de Sertoli se diferenciam das espermatogônias por apresentarem núcleo alongado com cromatina dispersa e um nucléolo proeminente. As espermatogônias tipo A têm núcleo grande e arredondado com a cromatina pontilhada ou dispersa e nucléolo proeminente; as espermatogônias tipo B têm núcleo pequeno e arredondado com aro periférico de cromatina condensada com pontilhado grosseiro (Picut et al., 2014).

No DPN 15, as espermatogônias e células de Leydig progenitoras continuam a

proliferar; as espermatogônias atingem a densidade máxima, formando uma camada pseudoestratificada com as células de Sertoli de permeio. A taxa de mitose nas espermatogônias diminui comparada àquela do início do período infantil e apoptose dessas células é vista nos centros dos túbulos (Picut et al., 2014).

Do DPN 15 até o fim do período infantil (DPN 20), é atingida a densidade máxima de células em cada túbulo. As células de Sertoli param de se dividir, se inicia o desenvolvimento dos espermatócitos, com o surgimento de espermatócitos em pré-leptóteno, leptóteno e zigóteno, e os túbulos começam a se segregar em estágios, caracterizados como associações celulares específicas observadas pela sincronia de desenvolvimento dos tipos de células germinativas (Figura 1C; Creasy et al., 1997; Picut et al., 2014). Conforme ocorre o desenvolvimento dos espermatócitos, a atividade mitótica das espermatogônias torna-se rara (Picut et al., 2014).

Em torno do DPN 18, é formada a luz do túbulo, como um pequeno espaço central. Nesse momento, ocorre inversão da localização de células de Sertoli e espermatogônias tomando um aspecto distinto em forma de uma rosa, denominado *rosette*, caracterizado por uma camada externa de espermatogônias e uma camada interna de células de Sertoli com núcleo retangular e alongado, de cromatina pontilhada (Figura 1D; Picut et al., 2014).

O interstício contém células de Leydig progenitoras misturadas a pequena população de células de Leydig imaturas, representantes da próxima fase do desenvolvimento dessas células. Nesta fase, ainda, as células de Leydig apresentam intensa atividade mitótica (Picut et al., 2014).

#### ♂ Período juvenil: DPN 21 a 32

Este período é caracterizado pela primeira onda de espermatogênese para

espermátides arredondadas e pelo aumento no diâmetro tubular. São característicos dessa fase os numerosos espermatócitos em paquíteno, a formação de espermatócitos secundários, as espermatogônias ao longo da membrana basal e o aumento do diâmetro dos túbulos com uma única camada de células de Sertoli (Figura 1E; Picut et al., 2014).

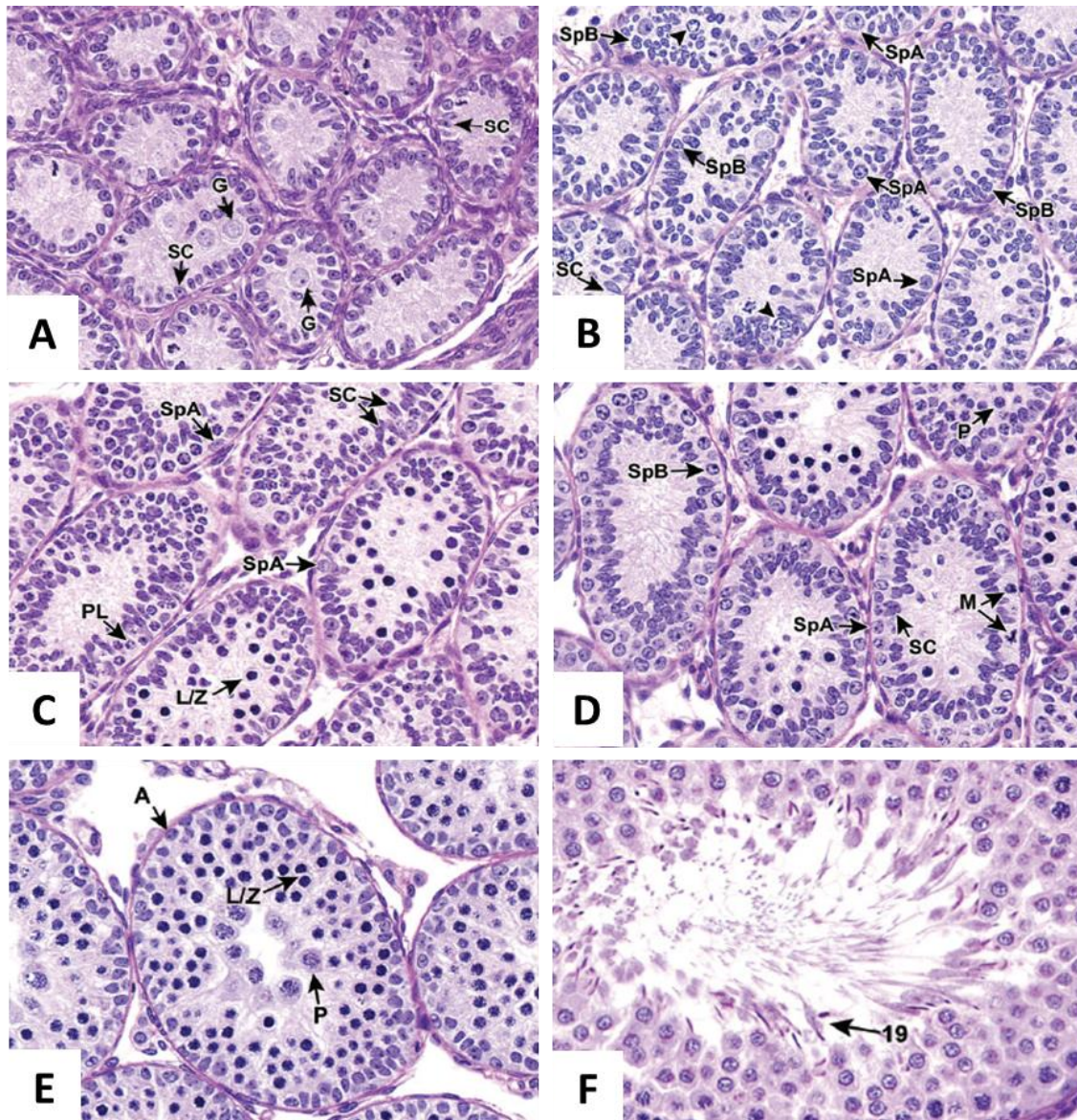
♂ Período peri-púbere: DPN 32 a 55

Nesse período, conforme o diâmetro tubular continua a aumentar, ocorre a espermiogênese, processo de diferenciação da espermátide para espermatozóide (Wouters-Tyrou et al., 1997; Picut et al., 2014). Quando as espermátides maduras surgem no DPN 46, todos os estágios tubulares devem estar presentes (Figura 1F; Picut et al., 2014).

♂ Período pós-púbere: DPN 56 a 61

Durante esse período, ocorre o crescimento contínuo do testículo e as características morfológicas definem o testículo normal adulto. O diâmetro dos túbulos está aumentado, os estágios tubulares podem ser reconhecidos por suas características associações celulares, com aumento do número e densidade de espermátides alongadas (Picut et al., 2014).





**Figura 1.** Fases do desenvolvimento testicular pós-natal (Adaptado de Picut et al., 2014). **A.** DPN 3 (neonatal): túbulos revestidos por numerosas células de Sertoli (SC) depositadas na membrana basal. Gonócitos (G) tem um grande núcleo redondo e localizam-se no centro dos túbulos. **B.** DPN 9 (infantil): túbulos são revestidos por células de Sertoli e espermatogônias, formando uma camada pseudoestratificada. Células de Sertoli têm núcleo alongado para poligonal com cromatina dispersa e um nucléolo proeminente. Espermatogônias tipo A (SpA) tem um núcleo grande e oval e espermatogônias tipo B (SpB) têm um núcleo pequeno e redondo. É possível observar figuras de mitose em espermatogônias, Leydig progenitoras, e populações de células de Sertoli, assim como muitas células em prófase (cabeça de seta). **C.** DPN 16 (infantil): Formação de espermatócitos em leptóteno e zigóteno (L/Z) adluminais em alguns túbulos. Outros túbulos são povoados por espermatócitos em preleptoteno (PL). **D.** DPN 18 (infantil): Espermatogônias e células de Sertoli formam uma dupla camada denominada *rosette*, com uma linha exterior de tipos de espermatogônias tipo A e B e uma linha interior de núcleos de células de Sertoli. Espermatócitos em paquíteno (P) aparecem e poucas espermatogônias mitoticamente ativa (M) ainda estão presentes. **E.** DPN 25 (juvenil): Desenvolvimento de espermatócitos em paquíteno continua e as células de Sertoli e espermatogônias recuam para uma única camada conforme o diâmetro do túbulo expande. **F.** DPN 46 (peri-púbere): Espermátides na etapa 19 presentes em túbulo no estágio VII (seta).

## Histologia e fisiologia testicular

Em mamíferos, o testículo adulto, já totalmente desenvolvido, é coberto por uma membrana fibrosa denominada túnica albugínea. Abaixo dessa membrana, e constituindo o testículo, existem dois compartimentos principais: o interstício e os túbulos seminíferos. O compartimento intersticial contém a matriz intercelular, fibroblastos, vasos sanguíneos e linfáticos, e as células de Leydig, que são a principal fonte de androgênios, testosterona e outros esteróides (Russel et al., 1990). Os túbulos seminíferos são laços convolucionados conectados à *rete testis* e revestidos por epitélio seminífero e delimitados pela túnica própria, onde as células mióides peritubulares são encontradas. Estas células são contráteis, fornecendo a força para o movimento de propulsão de líquidos e de espermatozoides através dos túbulos seminíferos. O epitélio seminífero consiste em células somáticas de suporte, as células de Sertoli, e células germinativas em várias fases de diferenciação. Conforme as células germinativas amadurecem, elas se movem em direção ao lúmen onde são liberadas e transportadas para a *rete testis* (Haschek & Rousseaux, 1998).

As células de Sertoli não apenas dão suporte as células germinativas durante o processo de espermatogênese, mas também tem importante participação durante o desenvolvimento do testículo. Durante o período embrionário e início da vida pós-natal, a célula de Sertoli, denominada célula de Sertoli imatura: 1) expressa o gene Sry (região determinante do sexo, mapeado no cromossomo Y) e estimula a produção de fatores de transcrição que ativam e/ou reprimem genes alvo para iniciar o desenvolvimento do trato reprodutor masculino (Koopman et al., 1991; Capel, 2000); 2) interage com o epitélio germinativo, permitindo a migração das células germinativas primordiais para os cordões seminíferos primitivos, além de produzir fatores que previnem que as últimas

entrem em meiose (Mackay, 2000; Cupp & Skinner, 2005); 3) produz fatores que direcionam a diferenciação das células mióides peritubulares e células de Leydig (Cupp & Skinner, 2005) e, 4) produz o hormônio antimulleriano (AMH), que inibe o crescimento dos ductos mullerianos, responsáveis por originar o trato reprodutor feminino, além de influenciar a descida do testículo para bolsa escrotal (Mackay, 2000; Josso, 1990).

A proliferação das células de Sertoli, que também ocorre durante o desenvolvimento embrionário e início da vida pós-natal, é um evento chave para espermatogênese, pois o número de células de Sertoli é o determinante primário do número de espermatozóides produzidos por dia, e conseqüentemente, do volume testicular no adulto (Orth et al., 1988; Hutchison et al., 2008). Assim, a quantidade de células de Sertoli nos túbulos seminíferos pode indicar a eficiência da espermatogênese, e, por isso, a estimativa da quantidade dessas células no interior do túbulo seminífero tem sido utilizada para avaliação de alterações testiculares (Hutchison et al., 2008; Kollin et al., 2012).

Após a puberdade, a célula de Sertoli completa sua diferenciação, perde sua habilidade proliferativa e torna-se madura, passando a exibir funções importantes para o apoio a espermatogênese, como: 1) formação das junções de adesão entre as células de Sertoli estabelecendo a barreira hematotesticular, que mantém a citoarquitetura do epitélio seminífero, bloqueia ações deletérias do sistema imune e a exposição a xenobióticos, promove um microambiente adequado para o processo completo de meiose e espermiogênese e controla o processo de progressão das células germinativas ao longo do túbulo seminífero (Fawcett, 1975; Jégou, 1992; Brehm and Steger, 2005); 2) formação de junções entre células de Sertoli e células germinativas, permitindo o controle do processo de espermiacção dessas últimas (Hess e França, 2005); 3) secreção

de fluído que nutre as células germinativas e participa da liberação dos espermatozóides e do transporte de substâncias químicas da porção basal para a porção apical do epitélio seminífero (Jégou, 1992) e 4) produção de proteína ligante de andrógeno (ABP) e da inibina, que também têm atuação sobre a espermatogênese (Jégou, 1992). Deste modo, as células de Sertoli controlam a integridade das células germinativas e sua progressão ao longo do túbulo seminífero.

A espermatogênese é o processo pelo qual uma espermatogônia primitiva se desenvolve em um espermatozóide altamente especializado. Este processo pode ser dividido em três fases: proliferativa, em que as células espermatogoniais passam por sucessivas divisões mitóticas; fase meiótica, em que o material genético do espermatócito é recombinado e segregado, e por fim a fase de diferenciação, quando as espermátides se transformam em células estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar o ovúlo (Russel et al., 1990). Esse processo é alimentado por células-tronco que executam ou a divisão, ou auto-renovação ou produzem espermatogônias.

A glândula pituitária, sob a influência de estimulação hipotalâmica, secreta dois hormônios glicoproteicos que promovem a espermatogênese, o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). O LH tem um efeito indireto sobre a espermatogênese via estimulação das células de Leydig. Essas células contêm receptores de superfície para o LH (LHR), e respondem a estímulos produzindo e liberando andrógenos, principalmente a testosterona. Os receptores de andrógenos (AR) estão presentes nas próprias células de Leydig, nas células mióides peritubulares e nas células de Sertoli. Esses andrógenos agem de modo parácrino no testículo, desempenhando um papel crítico no suporte da espermatogênese, e retroalimentam negativamente as células produtoras das gonadotrofinas na hipófise, inibindo

seletivamente a produção de LH (Wang et al., 2009; Picut et al., 2014; Smith & Walker, 2014).

O FSH tem efeito direto sobre as células de Sertoli através da ligação com seu receptor (FSHR) presente nessas células. O FSH estimula a produção da proteína ligante de andrógeno (ABP), que sequestra e transporta a testosterona e seu metabólito, a dihidrotestosterona, para o interior dos túbulos seminíferos, e a produção da inibina, que retroalimenta negativamente as células produtoras das gonadotrofinas na hipófise, inibindo seletivamente a produção de FSH (O'Donnell et al., 2006; Picut et al., 2014). Ainda, o FSH via estimulação do FSHR promove a liberação de fatores parácrinos pelas células de Sertoli, que atuam nas células de Leydig, estimulando a produção de andrógenos (Vihko et al., 1991; O'Shaughnessy et al., 2002; O'Shaughnessy et al., 2010).

### **Padrões de dano testicular**

Entre os principais achados histológicos de toxicidade testicular estão: degeneração, depleção ou esfoliação e ou formação de agregados multinucleados de células germinativas, retenção de espermatídes alongadas no epitélio seminífero, impedindo sua liberação, vacuolização de células de Sertoli, e alteração do diâmetro tubular (Lanning et al., 2002; Creasy et al., 2012).

#### ♂ *Degeneração de células germinativas e formação células gigantes multinucleadas*

A morte de células germinativas ocorre predominantemente por apoptose, processo regulado pelas células de Sertoli (Lee et al., 1999). Os espermatócitos em apoptose geralmente apresentam citoplasma eosinofílico e núcleo picnótico, mas as espermatídes redondas mostram marginação da cromatina (Lanning et al., 2002), i.e., o

padrão morfológico da apoptose varia dependendo do estágio em que se acha a célula germinativa. Quando a morte celular progride rapidamente, a célula apoptótica é fagocitada pela célula de Sertoli e qualquer evidência de morte celular é rapidamente removida (Lanning et al., 2002; Creasy et al., 2001). Quando o processo degenerativo é lento, as células germinativas de um mesmo grupo celular podem formar agregados multinucleados provavelmente devido à quebra de fibras do citoesqueleto, que constituem pontes citoplasmáticas (Figura 2A). A fagocitose dos agregados multinucleares pelas células de Sertoli é lenta e, por isso, as células multinucleadas podem ser visualizadas com maior frequência (Lanning et al., 2002).

#### ♂ Esfoliação e depleção de células germinativas

A esfoliação resulta de perda de adesão entre as células germinativas e as de Sertoli ou da alteração de componentes do citoesqueleto. As células se desprendem do epitélio para a luz do túbulo seminífero e são transportadas para a *rete testis* e epidídimo (Figura 2B). Essas células podem parecer morfológicamente normais, mas são rapidamente removidas do testículo e, uma vez removidas, a depleção celular é o único achado reconhecível (Lanning et al., 2002).

A depleção é o distúrbio espermatogênico mais frequente e geralmente é consequência da morte de células germinativas ou da remoção dessas células pela esfoliação. Ela pode afetar um número variado de túbulos e ocorrer de forma generalizada ou parcial, ou pode apenas afetar um tipo específico de células germinativas (ex. espermatogônias) (Lanning et al., 2002). A depleção pode ser reversível se espermatogônias ainda estiverem presentes e não houver comprometimento das funções das células de Sertoli (Meistrich et al., 1986; Blanchard et al., 1998).

♂ Vacúolos no epitélio seminífero

A alteração morfológica mais comum que indica dano em células de Sertoli é a presença de vacúolos no epitélio seminífero, que pode ocorrer no interior dessas células (vacúolos intracelulares) ou entre elas e suas vizinhas germinativas ou mesmo entre as próprias células de Sertoli (vacúolos extracelulares) (Figura 2C) (Lanning et al., 2002). Por microscopia de luz os vacúolos são, em alguns casos, únicos e situados em diferentes alturas do epitélio seminífero (da base ao lúmen), e, em outros, apresentam-se como microvacúolos, afetando a área basal do citoplasma da célula de Sertoli e provocando desorganização das células germinativas (Creasy, 2001; Lanning et al., 2002). Por microscopia eletrônica, esses vacúolos poderiam ser consequência de duas condições: dilatações de partes do retículo endoplasmático liso (REL) ou dilatações de espaços intercelulares na região dos complexos juncionais, após degeneração e eliminação de células germinativas (Kerr et al., 1979; Bergh, 1983; Hild et al., 2001; Creasy, 2001; Lanning et al., 2002). Na primeira condição, as dilatações no REL formam vacúolos no interior da célula de Sertoli, e podem indicar um comprometimento da síntese de esteróides (Bergh, 1983). Na segunda condição, as dilatações de espaços intercelulares formam vacúolos extracelulares, localizados na região dos complexos juncionais, sugerindo que a função da barreira hematotesticular pode ter sido comprometida (Kerr et al., 1979).

A barreira hematotesticular é formada por complexos juncionais entre as células de Sertoli, localizadas na porção basal do túbulo seminífero. Ela divide o túbulo seminífero em dois compartimentos: um compartimento basal que contém espermatogônias e espermatócitos primários nos estágios iniciais, e um compartimento adluminal, que contém os espermatócitos mais avançados e as espermátides (Fawcett,

1975; Russell, 1978; Cheng & Mruk 2012). A barreira hematotesticular é responsável pela manutenção da citoarquitetura do epitélio seminífero, constituição de um microambiente necessário para a realização da espermatogênese, além de prevenir o contato do sistema imune com antígenos de superfície específicos presentes nos espermatócitos em prófase tardia e nas espermátides (Fawcett, 1975). Portanto, qualquer comprometimento dos complexos juncionais dessa barreira pode provocar danos as células germinativas e levar a degeneração do epitélio seminífero.

A presença de vacúolos no epitélio seminífero sugere disfunções em células de Sertoli. A taxa de vacúolos, caracterizada pela razão número de túbulos com vacúolos/número total de túbulos examinados, é um parâmetro frequentemente utilizado para demonstrar comprometimento de células de Sertoli (Markelewicz et al., 2004; Moffit et al., 2007).

#### ♂ Alteração no diâmetro tubular

Alterações no diâmetro dos túbulos seminíferos podem ser provocadas por distúrbios na secreção do fluido secretado pelas células de Sertoli que, além de manter o tamanho luminal, é responsável pelo transporte dos espermatozóides (Griswold & McLean, 2006; Lanning et al., 2002). O volume de fluido tubular e o tamanho do lúmen são mantidos pelas junções de adesão entre as células de Sertoli. A formação e rearranjo dessas junções durante a espermatogênese é dependente de andrógenos, e, como a expressão de receptores de andrógenos nas células de Sertoli é cíclica, o tamanho do lúmen se modifica durante esse processo (Meng et al., 2005; Pelletier et al., 2011).

A redução no diâmetro do túbulo seminífero pode estar relacionada a depleção de células germinativas e/ou diminuição da produção de fluido tubular pelas células de Sertoli (Lanning et al., 2002). Essa redução pode ocorrer tanto pela diminuição do



número total de células, como também pela depleção específica de espermátides em alongamento ou alongadas, que perdem grande quantidade de água durante a sua maturação. Essa água perdida torna-se um dos constituintes do fluido testicular, juntamente com aquele produzido pelas células de Sertoli. A diminuição do volume do fluido tubular e a perda de células germinativas, além da redução do diâmetro tubular, resultam na diminuição do peso testicular (Russel et al., 1989; Russel, 1993; Lanning et al., 2002).

O aumento do diâmetro tubular pode ser provocado pelo acúmulo de fluido luminal secretado pelas células de Sertoli, pela diminuição da taxa de expulsão de fluido do túbulo, função desempenhada pelas células mióides peritubulares, pela diminuição da reabsorção do fluido pelas células epiteliais da *rete testis* e ductos eferentes, ou ainda, pela obstrução do fluxo de saída (Creasy, 2001; Lanning et al., 2002). O aumento do volume de fluido tubular é refletido pelo aumento do peso testicular, a menos que haja perda concomitante significativa de células (Lanning et al., 2002).

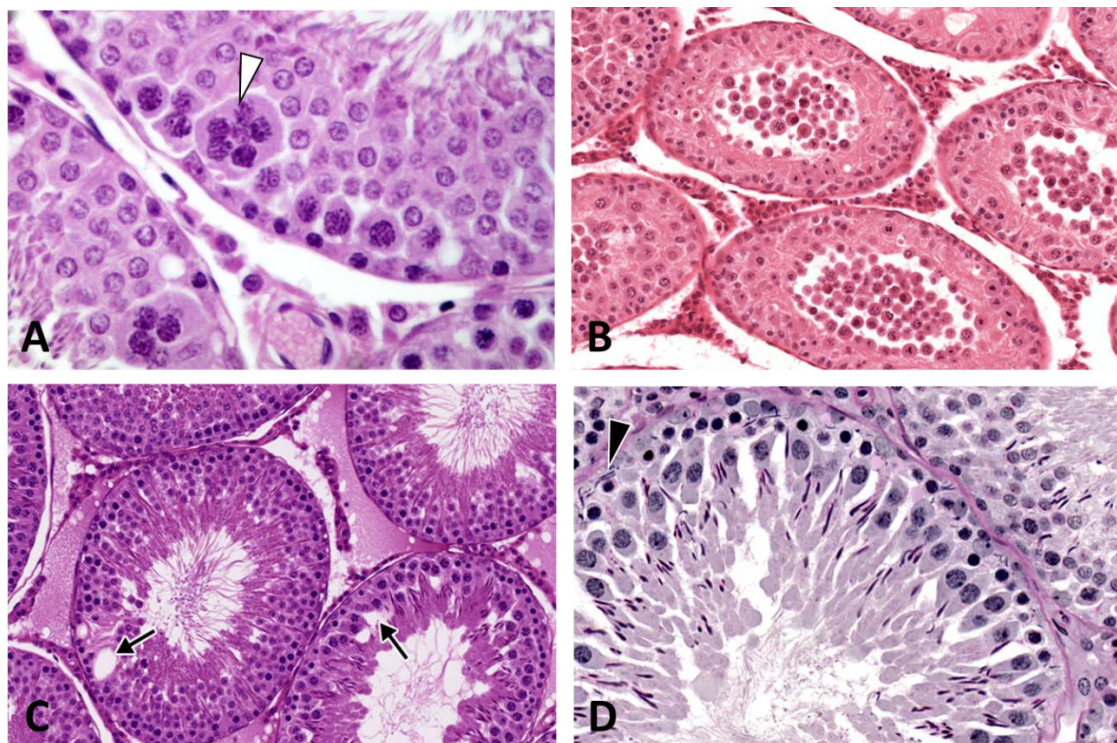
#### ♂ Retenção de espermátides

A liberação dos espermatozóides maduros para o lúmen é dependente da ação de andrógenos, que modificam os sítios de adesão entre as células de Sertoli e espermatozóides, levando à perda da ligação entre essas células, promovendo assim, a liberação dos espermatozóides para a luz do túbulo (Smith et al., 2014). Quando ocorre alteração na sinalização de andrógenos, os espermatozóides maduros, que deveriam ser liberados durante o estágio VIII, ficam retidos, sendo fagocitados pela célula de Sertoli (Figura 2D) (Holdcraft & Braun, 2004; Lanning et al., 2002). Por isso, a retenção de espermátides – com alterações de morfologia, motilidade e número de espermatozoides, com fertilidade anormal - é frequentemente associada a distúrbios

em células de Sertoli (Creasy, 2001; Lanning et al., 2002).

♂ Células de Sertoli imaturas

A avaliação morfológica das células de Sertoli, principalmente de seu núcleo, tem sido utilizada para verificar alterações em sua maturação (Regadera et al., 2000). A célula de Sertoli imatura, presente nos túbulos seminíferos durante a vida fetal e início da vida pós-natal, é morfológicamente caracterizada por núcleo redondo ou alongado (Regadera et al., 2000; Picut et al., 2014). A célula de Sertoli madura, terminalmente diferenciada após a puberdade, é caracterizada por núcleo redondo a triangular e nucléolo proeminente (Regadera et al., 2000). Em algumas condições, como em testículos criptorquídicos, as células de Sertoli podem perder suas características maduras e apresentar morfologia de células imaturas, o que sugere prejuízo de sua função (Regadera et al., 2000).



**Figura 2.** Padrões de dano testicular (Adaptado de Creasy et al., 2012). **A.** Célula gigante multinucleada formada por espermatócitos cujas pontes citoplasmáticas foram quebradas, permitindo a fusão dos conteúdos celulares (cabeça de seta branca). **B.** Esfoliação de células germinativas no lúmen do túbulo seminífero; epitélio germinativo com comprometimento da espermatogênese. **C.** Vacúolos nos epitélios

seminíferos (setas pretas). **D.** Retenção de espermatídes alongadas na região basal do túbulo seminífero em estágio XII (cabeça de seta preta).

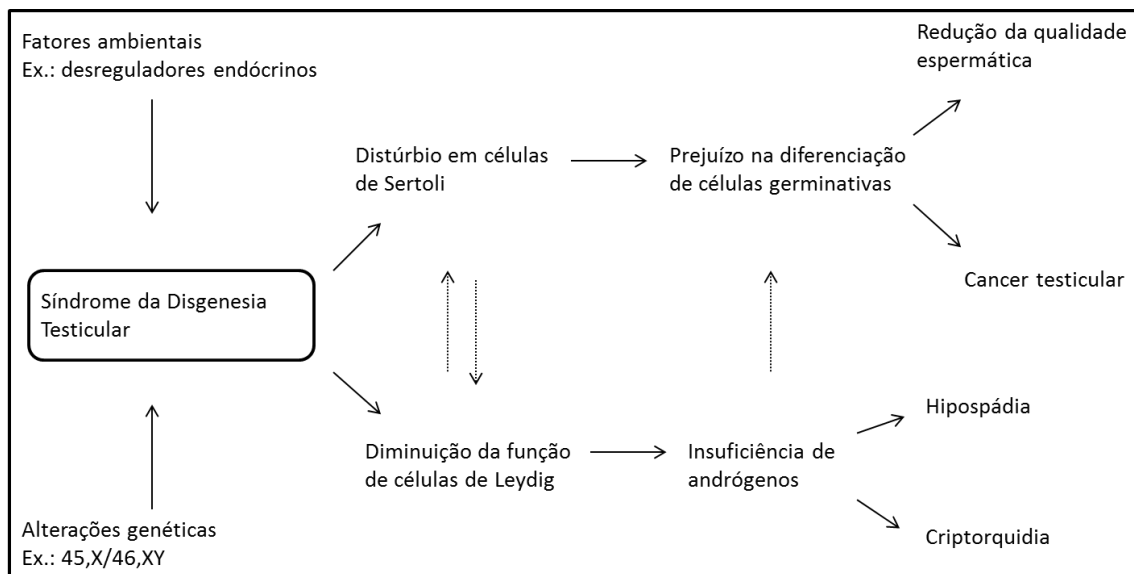
### **Criptorquidia e orquidopexia**

A criptorquidismo é uma das anormalidades urogenitais mais comuns em recém-nascidos do sexo masculino e um dos principais fatores de risco para infertilidade e câncer testicular (Hutson et al., 2010). A causa da não descida testicular é multifatorial, podendo estar associada a distúrbios hormonais (Hutson et al., 1997). Acredita-se que a exposição do epitélio seminífero à alta temperatura da cavidade abdominal seja responsável pela degeneração tubular observada nessa condição (Zorgniotti, 1991; Mieusset et al., 1993).

Em humanos, o criptorquidismo pode ser unilateral, quando apenas um dos testículos não completa a descida, ou bilateral, quando ambos os testículos não migram para bolsa escrotal (Foresta et al., 2008). O criptorquidismo unilateral ocorre em dois terços dos casos e, embora tenha completado sua descida e locação naturais, o testículo contralateral pode apresentar algumas alterações morfológicas e funcionais (Foresta et al., 1996). Isso sugere que o criptorquidismo pode ser considerado um sinal de alteração congênita prévia e comum a ambos os testículos, como uma das manifestações clínicas da síndrome de disgenesia testicular (SDT) (Foresta et al., 2008).

A síndrome de disgenesia testicular (SDT) é constituída por alterações que podem ocorrer em conjunto, isoladas, ou combinadas de modo variado: criptorquidismo, hipospádia, baixa qualidade espermática (infertilidade) e tumor testicular (Skakkebaek et al., 2001). Essas alterações possuem origem provavelmente comum na vida fetal, provocadas por disfunções de células de Leydig e/ou Sertoli durante o desenvolvimento gonadal (Skakkebaek et al., 2001; Sharpe & Skakkebaek,

2008; Jorgensen et al., 2010). Essas disfunções podem estar associadas tanto a alterações cromossômicas (45,X/46,XY) quanto à exposição a agentes químicos exógenos; entretanto, o rápido aumento das incidências dessas desordens reprodutivas sugere que fatores ambientais e/ou estilo de vida são causas mais prováveis do que as alterações genéticas (Figura 3; Skakkebaek et al., 2001). Pacientes acometidos por tumores testiculares de células germinativas (TTCG) apresentam no testículo contralateral (livre de tumor) túbulos seminíferos indiferenciados, com células de Sertoli imaturas, microlitíase, carcinoma *in situ* (CIS) e túbulos somente com células de Sertoli (SCS), indicando que há comprometimento de ambos os testículos naquela condição, sendo o TTCG uma das manifestações desse comprometimento (Skakkebaek et al., 2003).



**Figura 3.** Representação esquemática das relações entre componentes e manifestações clínicas da Síndrome de Disgenesia Testicular (SDT). Adaptado de Skakkebaek et al., 2001.

A ocorrência de criptorquidismo está relacionada com aumento de 3,7 a 7,5 vezes do risco de tumores testiculares de células germinativas (TTCG) (Thorup et al., 2010). A incidência dos cânceres testiculares tem aumentado nos últimos 30 anos,

atingindo homens entre 15 a 34 anos nos países industrializados, sendo a segunda principal neoplasia responsável pelo óbito de homens jovens (Sharpe & Skakkebaek, 2003; Walsh et al., 2007; Ye et al., 2012). Os principais aspectos da criptorquidia associados ao aumento da incidência de TTCG são a duração do período em que o testículo permanece criptorquídico (quanto maior o tempo de criptorquidia, maior a incidência de TTCG), sua localização abdominal ao invés de inguinal ao longo do trajeto em direção à bolsa escrotal, e a intensidade das alterações da gônada, como inibição da diferenciação da espermatogônia resultando na parada da espermatogênese, tamanho tubular reduzido, depleção de células germinativas e fibrose (Ferguson & Agoulnik, 2013).

Testículos criptorquídicos de meninos com 9 meses de vida apresentam maior número de células de Sertoli e de células germinativas do que os de meninos com 3 anos de idade. Em ambos os casos, a correlação entre volume testicular e número de células de Sertoli foi positiva, ou seja, quando havia redução do número destas células o volume testicular também se encontrava reduzido (Kollin et al., 2012). Portanto, há relação entre o tempo de criptorquidia e o funcionamento testicular. Por outro lado, as células de Sertoli de homens pós-puberes com criptorquidia unilateral não apresentam imunexpressão do receptor de andrógeno (AR), indicador de maturidade daquelas células, o que foi correlacionado com hipoplasia dos túbulos seminíferos e ausência de diferenciação de células germinativas no testículo criptorquídico (Regadera et al., 2000).

A correção cirúrgica da criptorquidia (orquidopexia) pode diminuir a infertilidade e o risco de câncer testicular. O momento em que esta cirurgia é realizada pode influenciar essas alterações: o câncer testicular é de 2 a 3,5 vezes mais provável de ocorrer em garotos que se submeteram a orquidopexia após a puberdade do que

naqueles que realizaram a cirurgia no período pré-púbere (Petterson et al. 2007; Walsh et al., 2007).

### **Criptorquidia e orquidopexia experimental**

Modelos de criptorquidia experimental têm sido utilizados para melhor entendimento da etiologia, patofisiologia e potencial tratamento dessa condição humana (Bergh & Soder, 2007). Existem dois métodos experimentais para interromper a descida testicular pela intervenção cirúrgica: criptorquidismo primário e secundário. O criptorquidismo experimental primário baseia-se em intervenção no gubernáculo ou no escroto em desenvolvimento, impedindo a locação final da gônada (Quinn et al., 1991; Bergh & Solder, 2007). O criptorquidismo experimental secundário, mais comum, compreende o realojamento cirúrgico dos testículos, que já se acham no saco escrotal, na parede abdominal. Ambos os procedimentos podem ser uni ou bilaterais (Bergh & Solder, 2007).

Em roedores, o criptorquidismo experimental provoca modificações do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular do testículo, com degeneração de células germinativas e consequente diminuição do peso testicular (Jégou et al., 1983; Bergh & Soder, 2007). As primeiras células germinativas afetadas e as mais sensíveis à elevada temperatura abdominal são as espermátides alongadas, os espermatócitos em divisão e as espermátides recém-formadas (Liu et al., 2012). Em seguida, as outras células germinativas são afetadas e acabam sendo eliminadas por apoptose, levando a falhas da espermatogênese e diminuição da capacidade reprodutiva (Bergh & Soder, 2007; Liu et al., 2012). A apoptose das células germinativas é causada pelo estresse oxidativo observado no testículo criptorquídico (Turner & Lysiak, 2008). O aumento da

temperatura testicular leva, indiretamente, ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuição da expressão de enzimas antioxidantes, levando ao comprometimento das células germinativas e ocasionando sua morte por apoptose, com consequente degeneração testicular (Ahotupa & Huhtanime, 1992; Li et al., 2006).

Além da degeneração das células germinativas, o criptorquidismo experimental uni- ou bilateral leva à disfunção de células de Sertoli, com acúmulo de lipídios no citoplasma, mudanças na morfologia do seu retículo endoplasmático liso, alterações na orientação e na forma do núcleo, além da formação de grande quantidade de vacúolos (Kerr et al., 1979). Ocorrem ainda diminuição da produção da ABP e do fluido produzido pelas células de Sertoli, ambos elementos importantes para a adequada função dessa célula (Hagenas & Ritzen, 1975; Kerr et al., 1979).

Ratos Sprague-Dawley adultos submetidos à criptorquidia apresentaram vacúolos no epitélio seminífero, caracterizados por dilatações em espaços intercelulares entre superfícies opostas de células de Sertoli adjacentes (Kerr et al., 1979). Aspecto semelhante foi registrado após exposição do escroto de ratos Wistar adultos em banho maria a 43°C por 30 minutos por dia, durante 6 dias, e eutanasiados após 1, 14 e 35 dias (Kanter et al., 2011). Essas dilatações sugerem que temperaturas elevadas modificam as junções entre as células de Sertoli, podendo alterar a permeabilidade da barreira hematotesticular (Hagenas et al., 1977; Kerr et al., 1979).

Em outro estudo com ratos Sprague-Dawley, em que cirurgia de criptorquidia unilateral foi realizada em animais recém-nascidos e as eutanásias foram executadas em 16, 20 e 24 DPN, foram observados dois tipos de vacúolos por ultraestrutura: dilatações intracelulares de partes do REL e dilatações extracelulares entre as células de Sertoli (Bergh, 1983). O primeiro tipo de vacúolo provocado por dilatações no REL dentro da

célula de Sertoli pode ser relacionado com alterações na produção de esteroides e, o segundo tipo de vacúolo, caracterizado por dilatações dos espaços intercelulares, não foram associadas com o comprometimento da barreira hematotesticular, pois a fixação com lantânio realizada nesse estudo, mostrou que esse composto se concentrou apenas nas partes periféricas dos túbulos nos animais eutanasiados em 16 e 20 DPN, o que diferiu dos estudos anteriores, que sugeriram prejuízo da função da barreira hematotesticular (Bergh, 1983). Apesar das diferenças, esses estudos demonstram que a presença de vacúolos no epitélio germinativo está intimamente relacionada com a função da célula de Sertoli, podendo, portanto, ser utilizada para avaliação de sua função.

Alterações do citoesqueleto da célula de Sertoli também foram observados no criptorquidismo unilateral em roedores (Maekawa et al., 1995; Wang et al., 2002) e macacos (Zhang et al., 2004). De maneira geral, filamentos de actina e filamentos intermediários como vimentina e citoqueratina 18 mostraram-se alterados após a criptorquidia experimental (Maekawa et al., 1995; Wang et al., 2002; Zhang et al., 2004). Os filamentos de actina e vimentina são constituintes das células de Sertoli em qualquer fase de seu desenvolvimento. Após criptorquidia experimental, ambos os filamentos apresentaram um padrão anormal, não observado nas células de Sertoli saudáveis: os filamentos de actina se tornaram mais delgados e desorganizados e os filamentos de vimentina mostraram-se fragmentados ao redor do núcleo da célula de Sertoli (Maekawa et al., 1995; Wang et al., 2002).

A citoqueratina 18, presente apenas durante a fase fetal e pós-natal do desenvolvimento das células de Sertoli, participa da integridade do epitélio seminífero e da dinâmica das junções entre células de Sertoli e células germinativas (Stosiek et al.,



1990; Vogl et al., 2008). A imunomarcagem de citoqueratina 18 tornou-se mais intensa com o aumento do tempo após cirurgia de criptorquidia realizada em macacos *Rhesus* adultos, eutanasiados após 5, 10, 15 e 30 dias após a intervenção cirúrgica, o que sugere que elas sofreram um processo de desdiferenciação, com provável perda de sua função e consequente interrupção da espermatogênese (Zhang et al., 2004).

Nas últimas décadas, têm sido discutido se a cirurgia de orquidopexia deve ser realizada antes ou depois da puberdade. Alguns acreditam que a orquidopexia deve ser realizada antes dos 2 anos de idade, mas outros sugerem que o momento em que esta cirurgia ocorre não afeta a fertilidade, uma vez que o efeito nocivo do criptorquidismo já foi instalado *in utero* (Hadziselimovic et al., 1975; Lipshultz, 1976; Quinn et al., 1991; Mizuno et al, 2008). Em consequência, estudos recentes têm analisado os efeitos da orquidopexia antes e depois da puberdade sobre a fertilidade e risco de câncer testicular em humanos (Engeler et al., 2000; Lee, 2005; Petterson et al., 2007; Walsh et al., 2007). Esses estudos têm demonstrado que a orquidopexia antes da puberdade pode diminuir o risco de câncer testicular e infertilidade (Engeler et al, 2000; Lee, 2005; Petterson et al., 2007; Walsh et al., 2007). No entanto, outros estudos não encontraram relação entre o momento da orquidopexia e risco de câncer testicular (Lipshultz, 1976; Pike et al., 1986).

Em ratos, não foi observada relação entre o momento da orquidopexia e risco de câncer testicular, uma vez que os roedores com criptorquidismo não desenvolvem esse tipo de câncer (Hutson et al., 2013). No entanto, considerando parâmetros morfológicos e morfométricos analisados em estudos de criptorquidismo experimental em ratos, a melhor recuperação do testículo foi observada quando a cirurgia de orquidopexia foi realizada antes da puberdade do animal, apesar dessa relação não ter

sido confirmada em todos os estudos (Jégou et al. 1984; Quinn et al, 1991; Patkowski et al, 1992). Além disso, a orquidopexia mostrou-se importante para evitar a progressão das lesões e ou instalação de lesões futuras.

**REFERÊNCIAS**

- Ahotupa M, Huhtaniemi I. Impaired detoxification of reactive oxygen and consequent oxidative stress in experimentally cryptorchid rat testis. *Biol Reprod.* 1992. 46, 1114-1118.
- Barrow PC, Barbellion S, Stadler J. Preclinical evaluation of juvenile toxicity. *Methods Mol Biol.* 2011. 691, 17–35.
- Bergh A. Early morphological changes in the abdominal testes in immature unilaterally cryptorchid rats. *Int J Androl.* 1983. 6, 73-90.
- Bergh A, Soder O. Studies of cryptorchidism in experimental animal models. *Acta Paediatr.* 2007. 96(5): 617-21.
- Blanchard KT, Lee J, Boekelheide K. Leuprolide, a gonadotropin-releasing hormone agonist reestablishes spermatogenesis after 2,5-hexanedione-induced irreversible testicular injury in the rat resulting in normalized stem cell factor expression. *Endocrinol.* 1998. 139, 236-244.
- Brehm R, Steger K. Regulation of Sertoli cell and germ cell differentiation. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2005. 181, 1 – 97.
- Capel B. The battle of the sexes. *Mech. Dev.* 2000. 92(1), 89–103.
- Chen N, Harisis GN, Farmer P, Buraundi S, Sourial M, Southwell BR, Balic A, Hutson JM. Gone with the Wnt: the canonical Wnt signaling axis is present and androgen dependent in the rodent gubernaculum. *J Paediatr Surg.* 2011. 46:2363–2369.
- Cheng, CY, Mruk DD. The blood-testis barrier and its implication in male contraception. *Pharmacol Rev.* 2012. 64, 16-64.
- Creasy DM. Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: The appropriate use of spermatogenic staging. *Toxicol Pathol.* 1997. 25, 119–31.
- Creasy DM. Pathogenesis of Male Reproductive Toxicity. *Toxicol Pathol.* 2001. 29(1), 64-76.
- Creasy D, Bube A, de Rijk E, Kandori H, Kuwahara M, Masson R, Nolte T, Reams R, Regan K, Rehm S, Rogerson P, Whitney K. Proliferative and non proliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system. *Toxicol Pathol.* 2012. 40, 40S-121S.
- Cupp AS, Skinner MK. Embryonic Sertoli cell differentiation. In “Sertoli Cell Biology” (M. K. Skinner and M. D. Griswold). 2005. p.43-70. Elsevier Science, USA.
- Engeler DS, Hosli PO, John H, Bannwart F, Sulser T, Amin MB, Heitz PU, Hailemariam S. Early orchiopexy: prepubertal intratubular germ cell neoplasia and fertility outcome. *Urology.* 2000. 56, 144–148.
- Fawcett DW. Gametogenesis in the male: prospects for its control. *Symp Soc Dev Biol.* 1975. 33, 25-53.
- Ferguson L, Agoulnik AI. Testicular cancer and cryptorchidism. *Frontiers in Endocr.* 2013. 4 (32); 1-9.
- Foresta C, Zuccarello D, Garolla A, Ferlin A. Role of hormones, genes, and environment in human cryptorchidism. *Endocr Rev.* 2008. 29(5):560-80.
- Foresta C, Ferlin A, Garolla A, Milani C, Oliva G, Rossato M. Functional and cytologic features of the contralateral testis in cryptorchidism. *Fertil Steril.* 1996, 66:624–629.
- Griswold MD, Mc Lean D. The Sertoli cell. *Knobil and Neill’s Physiology of Reproduction.* Third Edition. Chapter 19. 2006. 949-975.
- Hadziselimovic F, Herzog B, Seguchi H. Surgical correction of cryptorchidism at 2 years: electron microscopic and morphometric investigations. *J Paediatr Surg.* 1975. 10,19-26.
- Hagenas L, Ritzen EM. Impaired Sertoli cell function in experimental cryptorchidism

in the rat. *Mol and Cell Endoc.* 1975. 4; 25-34.

Hagenas L, Ploen L, Ritzen EM, Ekwall H. Blood-testis barrier. Maintained function of inter-Sertoli cell junctions in experimental cryptorchidism in the rat, as judged by a simple lanthanum-immersion technique. *Andrologia.* 1977. 9, 250-254.

Hascheck WM, Rouseaux CG. Male reproductive system. In "Fundamentals of Toxicologic Pathology". 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press. 1998. p. 443-438.

Hess RA, França LR. Structure of the Sertoli cell. In "Sertoli Cell Biology" (M. K. Skinner and M. D. Griswold). 2005. p. 19-40. Elsevier Science, USA.

Hild SA, Reel, JR, Larener, JM, Blye RP. Disruption of spermatogenesis and Sertoli cell structure and function by the Indenopyridine CDB-4022 in rats. *Biol Reprod.* 2001. 65, 1771-79.

Holdcraft RW, Braun RE. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development.* 2004. 131, 459-67.

Hutchison GR, Scott HM, Walker M, McKinnell C, Ferrara D, Mahood K, Sharpe RM. Sertoli cell development and function in an animal model of Testicular Dysgenesis Syndrome. *Biol Reprod.* 2008. 78, 352–360.

Hutson JM. A biphasic model for the hormonal control of testicular descent. *Lancet.* 1985. 2, 419–421.

Hutson JM, Baker M, Terada M, Zhou B, Paxton G. Hormonal control of testicular descent and the cause of cryptorchidism. *Reproduction, Fertility and Development.* 1994. 6, 151–156.

Hutson JM, Hasthorpe S, Heyns CF. Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocr Rev.* 1997. 18 (2); 259-280.

Hutson JM, Balic A, Nation T, Southwell, B. Cryptorchidism. *Semin. Pediatr. Surg.* 2010. 19, 215–224.

Hutson JM, Southwell BR, Li R, Lie G, Ismail K, Harisis G, Chen N. The regulation of testicular descent and the effects of cryptorchidism. *Endocr. Rev.* 2013. 34(5), 725-52.

Hutson JM, Li R, Southwell BR, Newgreen D, Cousinery M. Regulation of testicular descent. *Pediatr Surg Int.* 2015. 31, 317–325.

Ivell R, Hartung S. The molecular basis of cryptorchidism. *Mol Human Rep.* 2003. 9, 175-81.

Jégou B, Laws AO, Kretser DM. The effect of cryptorchidism and subsequent orchidopexy on testicular function in adult rats. *J Reprod Fert.* 1983. 69, 137-145.

Jégou B, Peake RA, Irby DC, de Kretser DM. Effects of the induction of experimental cryptorchidism and subsequent orchidopexy on testicular function in immature rats. *Biol Reprod.* 1984. 30(1), 179-187.

Jégou B. The Sertoli cell. *Bailliere's Clin Endocrinol and Metab.* 1992. 6, 273 – 311.

Jorgensen N, Rajpert-De Meyts E, Main KM, Skakkebaek NE. Testicular dysgenesis syndrome comprises some but not all cases of hypospadias and impaired spermatogenesis. *Int J Androl.* 2010. 33(2), 298-303.

Josso N. Anti-mullerian hormone: Hormone or growth factor? *Prog Growth Factor Res.* 1990. 2(3), 169–179.

Jost A, Magre S, Agelopoulou R. Early stages of testicular differentiation in the rat. *Hum Genet.* 1981. 58(1), 59–63.

Kanter M, Aktas C, Erbogga M. Heat stress decreases testicular germ cell proliferation and increases apoptosis in short term: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Toxicol Ind Health.* 2011. 29(2), 99-113.

Kerr JB, Rich KA, Kretser DM. Effects of experimental cryptorchidism on the ultrastructure and function of the Sertoli cell and peritubular tissue of the rat testis. *Bio*

of *Reprod.* 1979. 21, 823-838.

Kollin C, Stukenborg JB, Nurmio M, Sundqvist E, Gustafsson T, Soder O, Toppari J, Nordenskjold A, and Ritzén EM. Boys with undescended testes: endocrine, volumetric and morphometric studies on testicular function before and after orchidopexy at nine months or three years of age. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012. 97(12), 4588–4595.

Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature.* 1991. 351(6322), 117–121.

Lanning LL, Creasy DM, Chapin RE, Mann PC, Barlow NJ, Regan KS, Goodman DG. Recommended Approaches for the Evaluation of Testicular and Epididymal Toxicity. *Toxicol Pathol.* 2002. 30(4), 507-520.

Lee J, Richburg JH, Shipp EB, Meistrich ML, Boekelheide K. The Fas system a regulator of testicular germ cell apoptosis is differentially up-regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis. *Endocrinology.* 1999. 140, 852–858.

Lee PA. Fertility after cryptorchidism: epidemiology and other outcome studies. *Urology.* 2005. 66, 427–431.

Li Y, Hu X, Xiao L, Hu Z, Guo J, Zhang K, Song X, Liu Y. An oligonucleotide microarray study on gene expression profile in mouse testis of experimental cryptorchidism. *Frontiers in Bioscience.* 2006. 11, 2465-2482.

Lipshultz LI. Cryptorchidism in the subfertile male. *Fertil Steril.* 1976. 27, 609.

Liu F, Huang H, Xu Z, Qian X, Qiu W. Germ cell removal after induction of cryptorchidism in adult rats. *Tissue and Cell.* 2012. 44, 281– 287.

Mackay S. Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels. *Int Rev Cytol.* 2000. 200, 47–99.

Maekawa M, Kazama H, Kamimura K, Nagano T. Changes in the Arrangement of Actin Filaments in Myoid Cells and Sertoli Cells of Rat Testes During Postnatal Development and After Experimental Cryptorchidism. *Anat Rec.* 1995. 241, 59-69.

Magre S, Jost A. Sertoli cells and testicular differentiation in the rat fetus. *J Electron Microscop Tech.* 1991. 19(2), 172–88.

Markelewicz RJ, Hall SJ, Boekelheide K. 2,5-hexanedione and carbendazim coexposure synergistically disrupts rat spermatogenesis despite opposing molecular effects on microtubules. *Toxicol Sci.* 2004. 80, 92–100.

Meistrich ML. Critical components of testicular function and sensitivity to disruption. *Biol Reprod.* 1986. 34, 17-28.

Meng J, Holdcraft RW, Shima JE, Griswold MD, Braun RE. Androgens regulate the permeability of the blood–testis barrier. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005. 102, 16696-700.

Mieusset R, Fonda PJ, Vaysse P, Guitard J, Moscovia J, Juskiewenski S. Increase in testicular temperature in cases of cryptorchidism in boys. *Fertil Steril.* 1993. 59, 1319–1321.

Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Kurokawa S, Sasaki S, Kohri K. Early orchiopexy improves subsequent testicular development and spermatogenesis in the experimental cryptorchid rat model. *J Urol.* 2008. 179, 1195-1199.

Moffit JS, Bryant BH, Hall SJ, Boekelheide K. Dose-Dependent Effects of Sertoli Cell Toxicants 2,5-Hexanedione, Carbendazim, and Mono-(2-ethylhexyl) phthalate in Adult Rat Testis. *Toxicol Pathol.* 2007. 35, 719-727.

Nishimune Y, Okabe M. Mammalian male gametogenesis: growth, differentiation and maturation of germ cells. *Dev Growth Differ.* 1993. 35, 479–486.

O'Donnell L, Meachem SJ, Staton PG, McLachlan RI. Endocrine regulation of spermatogenesis. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (J. D. Neill, T. M. Plant, D.W. Pfaff, J. R. G. Challis, D. M. de Kretser, J. S. Richards, and P. M. Wassarman, eds).

2006. Vol 2, 3<sup>rd</sup> ed, p. 2061-2126. Academic Press, San Diego, CA.

O'Shaughnessy PJ, Johnston H, Willerton L, Baker PJ. Failure of normal adult Leydig cells development in androgen-receptor-deficient mice. *Journal of Cell Science*. 2002. 115, 3491-3496.

O'Shaughnessy PJ, Monteiro A, Verhoeven G, De Gendt K, Abel MH. Effect of FSH on testicular morphology and spermatogenesis in gonadotrophin-deficient hypogonadal mice lacking androgen receptors. *Reproduction*. 2010. 139(1), 177-184.

Ojeda, SR, Advis, JP, Andrews WW. Neuroendocrine control of the onset of puberty in the rat. *Fed Proc*. 1980. 39, 2365-71.

Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*. 1988. 122, 787-794.

Patkowski D, Czernik J, Jelen M. The natural course of cryptorchidism in rats and the efficacy of orchidopexy or orchiectomy in its treatment before and after puberty. *J Pediatr Surg*. 1992. 7, 870-873.

Pelletier RM. The blood-testis barrier: the junctional permeability, the proteins and the lipids. *Prog Histochem Cytochem*. 2011. 46, 49-127.

Petterson A, Richiardi L, Nordenskjold A, Kaijser M, Akre O. Age at surgery for undescended testis and risk of testicular cancer. *N Engl J Med*. 2007. 356, 1835-41.

Picut CA, Remick AK, de Rijk EPCT, Simons ML, Stump DG, Parker GA. Postnatal Development of the Testis in the Rat: I. Morphologic Study and II. Correlation of Morphology to Neuroendocrine Parameters. *Toxicol Pathol*. 2014. XX, 1-17.

Pike MC, Chilvers C, Peckham MJ. Effect of age at orchidopexy on risk of testicular cancer. *Lancet*. 1986. 1, 1246.

Quinn FM, Crockard AD, Brown S. Reversal of degenerative changes in the scrotal testis after orchidopexy in experimental unilateral cryptorchidism. *J Pediatr Surg*. 1991. 26: 451-4.

Regadera J, Martínez-García F, González-Peramato P, Serrano A, Nistal M, Suárez-Quian C. Androgen receptor expression in Sertoli cells as a function of seminiferous tubule maturation in the human cryptorchid testis. *The Journal of Clin End Met*. 2000. 86, (1); 413-421.

Russell LD. The blood-testis barrier and testis to spermatocyte maturation in the adult rat: a lanthanum tracer study. *Anat Rec*. 1978. 190, 79 - 112.

Russell LD, Bartke A, Goh JC. Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *Am J Anat*. 1989. 184, 179-189.

Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. Histological and histopathological evaluation of the testis. *Cache River Press, Clearwater*. 1990. 62-193.

Russell LD. Role in spermiation. In: Russell LD, Griswold MD. *The Sertoli Cell*. Clearwater, FL. Cache River Press. 1993. 269-303.

Schlatt S, Ehmcke J. Regulation of spermatogenesis: An evolutionary biologist's perspective. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2014. 29, 2-16.

Sharpe RM, Skakkebaek NE. Male reproductive disorders and the role of endocrine disruption: advances in understanding and identification of areas for future research. *Pure Appl. Chem*. 2003. 75, 2023-2038.

Sharpe RM, Skakkebaek NE. Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertil Steril*. 2008. 89, 33-8.

Skakkebaek NE, Rajpert-de Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects *Human*

Reproduction. 2001. 16, 972–978.

Skakkebaek NE., Holm M, Hoei-Hansen C, Jorgensen N, Rajpert-De Meyts E. Association between testicular dysgenesis syndrome (TDS) and testicular neoplasia: Evidence from 20 adult patients with signs of mal development of the testis. 2003. 111, 1–11.

Smith LB, Walker WH. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin Cell Dev Biol.* 2014. 30, 2-13.

Stosiek P, Kasper M, Karsten U. Expression of cytokeratins 8 and 18 in human Sertoli cells of immature and atrophic seminiferous tubules. *Differentiation.* 1990. 43, 66-70.

Thorup J, Mclachlan R, Cortes D, Nation TR, Balic A, Southwell BR. What is new in cryptorchidism and hypospadias - a critical review on the testicular dysgenesis hypothesis. *J. Pediatr. Surg.* 2010. 45, 2074–2086.

Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *J Androl.* 2008. 29, 488 - 498.

Vihko KK, Lapolt PS, Nishimori K, Hsueh AJ. Stimulatory effects of recombinant follicle-stimulating hormone on Leydig cell function and spermatogenesis in immature hypophysectomized rats. *Endocrinology.* 1991. 129, 1926-1932.

Vogl AW, Vaid KS, Guttman JA. The Sertoli cell cytoskeleton. *Molecular mechanisms of spermatogenesis.* Chapter 11. 2008. 186-211.

Walsh TJ, Dall’Era MA, Croughan MS, Carroll PR, Turek PJ. Prepubertal orchiopexy for cryptorchidism may be associated with lower risk of testicular cancer. *The Journal of Urology.* 2007. 178, 1440-46.

Wang RS, Yeh S, Tzeng CR, Chang C. Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endroc Rev.* 2009. 30, 119-132.

Wang ZQ, Watanabe Y, Toki A, Itano T. Altered Distribution of Sertoli Cell Vimentin and Increased Apoptosis in Cryptorchid Rats. *J Pediatr Surg.* 2002. 37, 648-652.

Wouters-Tyrou D, Martinage A, Chevaillier P, Sautière P. Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie.* 1998. 80, 117-128.

Ye H, Ulbright, TM. Difficult differential diagnoses in testicular pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2012. 136, 435-46.

Zhang Z, Hu Z, Song X, Xiao L, Zou R, Han C, Liu Y. Disrupted expression of intermediate filaments in the testis of rhesus monkey after experimental cryptorchidism. *Int J Androl.* 2004. 27, 234–239.

Zorgniotti AA. *Temperature and environmental effects on the testis.* Plenum Press. 1991. 1–335.

## **OBJETIVOS**

### **Gerais**

O presente estudo visa explorar experimentalmente as relações entre criptorquidia, sua correção cirúrgica em diferentes momentos de maturação testicular pós-natal (períodos pré e pós-púbere) e as características morfofuncionais das células germinativas e das células de Sertoli. Ao final, é esperado que este modelo experimental contribua para enriquecer a discussão existente sobre o melhor momento da realização da cirurgia de orquidopexia.

### **Específicos**

1. Documentar parâmetros que indicam dano testicular, de forma indireta através do peso de órgãos (testículos, próstata ventral, vesícula seminal, e epidídimos).
2. Verificar alterações morfológicas no epitélio germinativo de animais submetidos a criptorquidia e orquidopexia.
3. Avaliar parâmetros associados indiretamente à função das células de Sertoli, como o diâmetro tubular, incidência de vacúolos no epitélio seminífero, média do número de células de Sertoli por túbulo e imunoistoquímica para citoqueratina 18.



## *Capítulo II*

**Evaluation of germ and Sertoli cells in an experimental model of cryptorchidism and orchidopexy\***

Lígia Maria M. Gomide<sup>1</sup>, Ana Paula F. Cardoso<sup>1</sup>, Nathália P. Souza<sup>1</sup>, João Lauro V. de Camargo<sup>1</sup>, Merielen G. Nascimento e Pontes<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>UNESP- São Paulo State University, Botucatu Medical School, Department of Pathology, Botucatu, São Paulo, Brazil*

**\* To be submitted to Toxicologic Pathology, Impact Factor: 2.137.**

**ABSTRACT**

Cryptorchidism, or undescended testis, is one of the most common urogenital abnormalities in newborn boys and one of the main risk factors for infertility and testicular cancer. It has been proposed that cryptorchidism, low sperm quality, hypospadias and testicular germ cell tumor (TGCT) comprise the testicular dysgenesis syndrome (TDS) and that they have a common origin during the fetal life. Cryptorchidism induces seminiferous epithelium degeneration with germ cell depletion, Leydig and Sertoli cell disorders and decreased tubule diameter. The surgical correction of cryptorchidism (orchidopexy) has been applied in order to decrease the risk for infertility and testicular cancer. However, the best moment to perform this surgery in order to obtain successful results has been a concern. Moreover, there is no experimental model available in the literature that explores comprehensively testicular morphological alterations associated to cryptorchidism and orchidopexy. In this study, cryptorchidism was induced in 3-week old Sprague-Dawley rats; orchidopexy was performed at three different moments (3, 5 and 9 weeks after cryptorchidism surgery), and the animals of each group were sacrificed after 3 and 8 weeks of recovery. Histological analyses, and quantitative estimates such as seminiferous tubule diameter (STD), incidence of vacuoles in the tubules, and number of Sertoli cells per tubule, and immunohistochemistry for cytokeratin 18 were performed to evaluate testicular alterations after cryptorchidism and orchidopexy surgeries. Cryptorchidism induced germ cell degeneration and exfoliation, increased incidence of intraepithelial vacuoles and decreased MSTD and testes weights. In the 3-week recovery group, many of the alterations seen in cryptorchidism were still present, the severity of these alterations being proportional to the period the testes remained in abdominal cavity until orchidopexy. After the 8-week recovery period, orchidopexy reversed almost all of the alterations irrespective the surgical moment it was performed. In conclusion, the intensity of the damages in the testis was greater in those animals that remained cryptorchid for a longer time, with no alterations in the number of Sertoli cells but with a probable disruption of its function. The adopted model can be useful to study testicular alterations induced by cryptorchidism and the potential recovery of rat testis after orchidopexy.

## **INTRODUCTION**

Failure of testicular descent or cryptorchidism is a common anomaly of newborn boys (Hutson et al., 2010). The incidence of this congenital alteration has increased in several countries in the last years and has been associated with risk factors like genetic abnormalities, exposure to environmental contaminants and or parental life-style (Toppari et al., 2010; Hutson et al., 2010; Ferguson & Agoulnik, 2013). It has been proposed that cryptorchidism, low sperm counts, hypospadias and testicular germ cell tumor (TGCT) have a common origin during the fetal life and comprise, individually or jointly, the testicular dysgenesis syndrome (TDS) (Skakkebaek et al., 2001; Sharpe & Skakkebaek, 2008).

In humans, cryptorchidism is the main risk factor for infertility and testicular cancer (Hutson et al., 2010). The most frequent morphological alteration in the cryptorchid testis is tubular degeneration with germ cell depletion and decrease of seminiferous tubule diameter (Zorngiotti, 1991; Mieuisset et al., 1993; AbouZeid et al., 2011). In experimental animals, cryptorchidism induces death or disruption of most testicular cell types (Bergh & Solder, 2007). The main alterations observed are degeneration of germ cells, dysfunction of Leydig and Sertoli cell, decrease in seminiferous tubule diameter (STD) and reduction of testicular weight (Jégou et al., 1983; Mizuno et al., 2008; Liu et al., 2012).

Sertoli cells are somatic cells present in the seminiferous epithelium with two roles in distinct periods of mammals life. In the fetal and early postnatal life periods, it produces the anti-Müllerian hormone (AMH), that inhibits the development of the female reproductive tract, and the transcription factors that initiates the formation of the male reproductive tract like the migration of primordial germ cells to the primitive

seminiferous cords and the differentiation of peritubular and Leydig cells (Josso, 1990; Koopman et al., 1991; Capel, 2000; Mackay, 2000; Cupp and Skinner, 2005). In the postpubertal life, Sertoli cells provides the environment and support to germ cells during the spermatogenesis process (Sharpe, 1994; Mackay, 2000). Besides playing an important role in the development of the testis and in the early postnatal period, the Sertoli cells are immature at these periods. In this phase, they are able to proliferate but are not to differentiate terminally. During puberty Sertoli cells become mature, lose the proliferative ability, and start to support germ cells in spermatogenesis (Fischer et al., 2003). Each Sertoli cell can support a fixed number of germ cells what allows to associate the number of Sertoli cells with the daily sperm production in the adult testis (Orth et al., 1988). The cytoskeleton of the Sertoli cell is very active and highly organized, playing a role in the spermatogenesis process. Their components are constituents of junctions between Sertoli and germ cells and Sertoli-Sertoli cells (Vogl et al., 2008). One of these components is the intermediate filament cytokeratin 18 (CK18) that is expressed during fetal and postnatal life and is absent after puberty, when Sertoli cells are mature. The immunoexpression of this antigen marker have been used to identify immature Sertoli cells (Stosiek et al., 1990; Aumuller et al., 1992).

Several studies have explored Sertoli cells alterations in cryptorchid testes. In humans, decreased number of Sertoli cells was observed in boys that remained cryptorchid until 3 years of age compared with those with 9 months of age, furthermore, adult men with cryptorchid testes showed positive staining for AMH and sialo glycoprotein M2A, other markers that identify immature Sertoli cells, suggesting that these cells not completed the differentiation process in cryptorchid testes (Kollin et al., 2012; Nistal et al., 2013). In experimental animals, increased incidence of vacuoles in the

seminiferous epithelium, a morphological indication of Sertoli cell disorder, has been detect in cryptorchid testis of rats (Kerr et al., 1979; Bergh et al., 1983; Lanning et al., 2002). These vacuoles may be associated with disturbance in the fluid balance of Sertoli cells, and/or, may represent dilatations of the smooth endoplasmic reticulum (SER) or the visualization of the space previously occupied by germ cells, after significant degeneration and elimination of these cells (Kerr et al., 1979; Kerr et al., 1993; Hild et al., 2001). Furthermore, the positive immunostaining for CK18, a biomarker of immature Sertoli cells, in testis of *Rhesus* monkeys submitted to the cryptorchidism, suggest a dedifferentiation process of these cells due to the ectopic position of the testis (Zhang et al., 2004).

The ideal moment to perform the surgical correction of cryptorchidism (orchidopexy) is a concern for the last decades and there is no consensus about it. Some experts suggest that the moment of the surgery is not relevant because the impact of undescended testis on the male fertility was already installed during the fetal life, but most of them advice that orchidopexy should be done before puberty (Hadziselimovic et al., 1975; Lipshultz, 1976; Quinn et al., 1991; Mizuno et al., 2008). Another point in favor to perform orchidopexy before puberty is that it decreases in 2 to 3.5 times the risk for testicular cancer (Pettersson et al., 2007; Walsh et al., 2007). As observed in humans, several experimental studies have been showed that when orchidopexy is performed before puberty, testicular alterations are totally or partially reversed compared to orchidopexy realized after puberty, when some injuries are still observed (Jégou et al., 1984; Quinn et al; 1991; Mizuno et al., 2008). However, not all experimental studies related early orchidopexy, realized before puberty, with better reversion of

testicular alterations, suggesting that the moment of orchidopexy was not relevant for the testes recovery (Patkowski et al., 1992).

Rodent experimental models of cryptorchidism have been used to study this disorder and its resulting infertility (Bergh & Soder, 2007), also evaluating the potential reversibility of orchidopexy (Jégou et al., 1984; Quinn et al; 1991; Mizuno et al., 2008). However, the discussion about the best moment to perform orchidopexy still concern researchers. The present study used a rat cryptorchidism and orchidopexy protocol to characterize the testicular alterations after three different moments of orchidopexy (3, 5 and 9 weeks after cryptorchidism surgery) and two intervals of recovery (3 and 8 weeks after the orchidopexies) with the eventual purpose of better understanding the pathogenesis of testicular alterations induced by cryptorchidism and the potential recovery of rat testis after orchidopexy.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Animals*

This study was approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the UNESP Medical School, SP, Brazil, protocol No. 926/2012. Sprague Dawley rats were obtained from the Multidisciplinary Center of Biological Investigations (CEMIB UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil) and kept under a 12-h light/dark cycle and controlled temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Standard pellet food (Presence; Evalis, Paulínia, SP, Brazil) and water were provided ad libitum. After 3-week acclimatization period, adult female rats were mated overnight at the proportion of two females to each male. Vaginal smears were collected daily and the sperm detection was considered as day 0 of gestation.

### Experimental design

Three groups of randomly 21-days old animals – immediately after weanling – were surgically submitted to abdominal cryptorchidism, as described below. Animals from one group were euthanized three, six or eleven weeks after cryptorchidism induction: groups CPT+3, CTP+6 and CPT+11, respectively. Another groups were also submitted to orchidopexy after three (ORC3), five (ORC5) or nine (ORC9) weeks after cryptorchidism induction. Animals from these groups were euthanized either after three (groups ORC3+3 ORC5+3 and ORC9+3) or eight (groups ORC3+8, ORC5+8 and ORC9+8) weeks after orchidopexy. Sham animals were operated at the same moments as the cryptorchidism or orchidopexy surgical procedures (Figure 1). For each surgical and sham groups at least 10 and 5 animals were used, respectively.

### Surgical procedures

On the 3rd week of life, rats were anesthetized with ketamine (30 mg/kg i.p.) and xylazine (4 mg/kg i.p.). Abdominal anesthetic and analgesic effects were achieved with lidocaine injections (7 mg/kg s.c.) and ketoprofen (10 mg/kg s.c.), respectively. The abdominal cavity was aseptically opened by small midline incision and both testes were translocated from the scrotum into the abdominal cavity through the inguinal rings. During this step care was taken to avoid twisting of the spermatic cord, which could lead to testicular damage. The testes were fixed to the dorsolateral abdominal wall with two stitches passing through the tunica albuginea in the cranial and caudal regions of the testes using a 5-0 blunt needle and non-absorbable suture material (NL50CR13 Nylon, Bioline, BR). The muscle and skin layers were then closed and the animals were kept at



30°C for 30 minutes to minimize the deleterious effects of hypothermia induced by anesthesia.

For the orchidopexy, the anesthetic, analgesic and asepsis procedures were the same as for the cryptorchidism surgery. At each of the three scheduled moments a midline abdominal incision was made and the sutures which held both testes in the dorsolateral abdominal wall were carefully removed. The scrotum wall was clamped and reversed to facilitate the manipulation; the testes were sutured through the tunica albuginea to the inner wall of the scrotum by a 5-0 blunt needle (NL50CR13 Nylon, Bionline, BR). Finally, the testes were gently guided into the scrotum. The muscular and skin layers were closed, cleaned and the animals left to recover under the same conditions described above. All animals received antibiotic treatment (enrofloxacin 5 mg/kg sc) during the three days following surgery.

Control animals were submitted to sham surgeries under the same anesthesia, analgesia and aseptic conditions as described above. They had only the skin and muscle layers of the abdomen opened and then sutured.

#### *Necropsy and sample collection*

The animals were anesthetized between 8:00 and 10:00 a.m. with ketamine (30 mg/kg ip) and xylazine (4 mg/kg ip) and euthanized by exsanguination via heart puncture. Immediately after the euthanasia, the testes and epididymis were removed, weighed, and placed in modified Davidson's fixative for 24h (Latendresse et al. 2002; Kittel et al. 2004) and embedded in paraffin. The seminal vesicles and ventral prostate were collected, weighed, fixed in 10% formalin and embedded in paraffin.

### *Histological evaluation*

The paraffin blocks containing the testes were cut in histological sections of 5  $\mu\text{m}$  thickness and stained by hematoxylin and eosin (H&E). The histological analyses were systematically performed following the criteria of the Society of Toxicologic Pathology (Lanning et al., 2002; Creasy et al., 2012). Fifty seminiferous tubules were randomly counted from each testis for measuring seminiferous tubule diameter and incidence of vacuoles. The seminiferous tubule diameter (STD) was calculated from round, randomly selected seminiferous tubules per tissue section and measured with the use Panoramic Viewer software (3DHISTECH Ltd). Two diametrically opposed measures of the outer face of the basement membrane to the other side were obtained for each tubule and the mean value was used to calculate the mean of seminiferous tubule diameter (MSTD) (Tenorio et al., 2010). The incidence of vacuoles was defined as the presence of one or more vacuoles with  $\geq 16 \mu\text{m}$  in the greatest diameter located within the seminiferous epithelium (Markelewicz et al., 2004). One hundred round seminiferous tubules were randomly selected from each testis to determine Sertoli cell number. Sertoli cell nuclei were identified and counted based on their morphological characteristics; the number of nuclei was assumed to equate to the number of Sertoli cells (Kollin et al., 2012).

### *Immunohistochemistry*

The testes were kept immersed in modified Davidson's fixative, latter embedded in paraffin and sectioned at 5  $\mu\text{m}$  thickness. For detection of the cytokeratin 18 antibody (CK18), a heat-induced antigen retrieval was performed with Trilogy (Cell Marque, USA) with 30 seconds of pre-heat at 80°C then more 30 seconds at 125°C. The sections were treated for endogenous peroxidase with Peroxidazed 1 (Biocare Medical, USA) for 10

minutes, followed by incubation with Background Sniper (Biocare Medical, USA) for 15 minutes. Subsequently, they were incubated overnight with monoclonal CK18 antibody using a 1:400 dilution (ABCAM, AB668). After that, the sections were treated with MACH4 Universal HRP Polymer (Biocare Medical, USA) according to manufacturer's instructions. Finally, antibody revelation with DAB and counterstaining with hematoxylin was applied in the sections. Between the incubations periods the slides were washed with TBST buffer.

### Statistical analysis

The estimated parameters obtained from the cryptorchidism/orchidopexy groups were compared to their respective control groups. Tests of normality and variance were followed by the Student's t test (when parametric) or Mann-Whitney (when non-parametric). When necessary, ANOVA test was performed among the cryptorchidism subgroups: 3-week recovery and 8-week recovery groups. A p value < 0.05 was considered statistically significant.

## **RESULTS**

### Testes weight

All groups submitted to surgeries (cryptorchidism or orchidopexy) had a significant decrease of testes weights compared to control groups (Figure 2). The 8-week recovery groups (ORC3+8, ORC5+8 and ORC9+8) recovered absolute testes weights, although these recoveries did not attain the control group levels.

*Prostate, seminal vesicle and epididymis weight*

Groups CPT+11, ORC5+3, ORC9+3 and ORC9+8 had significant decrease of prostate weights; decrease of the seminal vesicle weight was observed only in CPT+6 group. All groups had a significant decrease of epididymis weights when compared to control groups (Table 1).

*Testicular histopathology*

Rats euthanized 3 weeks after the sham surgery for cryptorchidism showed the seminiferous epithelium with cell populations consistent with the age of the animals (PND 42, peri-pubertal period) and normal spermatogenesis process. Only rare seminiferous tubules showed vacuoles (usually just one vacuole by tubule) and/or apoptotic germ cells. On the contrary, rats subjected only to cryptorchidism (CPT group) presented severe impairment of spermatogenesis. The CPT+3 group, euthanized 3 weeks after cryptorchidism surgery displayed several changes in the seminiferous tubules: apoptosis and or exfoliation of germ cells, intraepithelial vacuoles and giant multinucleated cells. The unique cell populations present in the seminiferous epithelium of the cryptorchid testes were Sertoli cells, spermatogonia and primary spermatocytes; some tubules displayed a Sertoli cell-only (SCO) pattern, where Sertoli cells seemed immature, with round to elongated nuclei (Figure 3A and 3B).

Groups euthanized 6 and 11 weeks after cryptorchidism, CPT+6 and CPT+11, respectively, showed the same seminiferous tubules changes observed in CPT+3 group, described above (Figure 3C). In the CPT+11 group, besides the changes already described, there were also atrophic seminiferous tubules with spermatogonia and Sertoli cells or exclusively with Sertoli cells only (SCO) (Figure 3D).

Animals from groups ORC3+3, ORC5+3 and ORC9+3 presented several tubular alterations, but these were less frequent than in cryptorchid-only animals. The morphological changes were intraepithelial vacuoles, germ cells apoptosis, depletion and exfoliation, and the presence of giant cells (Figure 4A and 4B). Also present were SCO-pattern tubules with immature-like Sertoli cells and atrophic tubules. One ORC3+3 animal presented intratubular calcification. In these groups, the seminiferous epithelium consisted mostly by Sertoli cells, spermatogonia, primary and secondary spermatocytes and round spermatids. Control animals of these groups showed complete spermatogenesis, with sperm, with rare tubules with vacuoles or exfoliated germ cells.

Animals euthanized eight weeks after orchidopexy (ORC3+8, ORC5+8, ORC9+8) had most of the tubules with complete spermatogenesis. The morphological changes, although less frequent, were similar to those observed in groups euthanized three weeks after orchidopexy. These changes included multinucleated giant cells in tubules with germ cells depletion and less frequent SCO-pattern tubules (Figure 4C). Of interest, most of rats submitted to orchidopexy after puberty (9 weeks after cryptorchidism surgery) and euthanized eight weeks after surgery (ORC9+8) had atrophic tubules, a condition not seen in other groups that had the testes relocated to the scrotum (Figure 4D). The seminiferous tubules of control animals contained all stages of spermatogenesis, with presence of sperm.

#### *Seminiferous tubule diameter, incidence of vacuoles and number of Sertoli cells*

All groups submitted to cryptorchidism (CPT+3, CPT+6 and CPT+11), 3-week recovery groups (ORC3+3, ORC5+3 and ORC9+3) and the ORC9+3 group had a significant

decrease in the mean seminiferous tubule diameter compared to the control groups. The ORC3+8 and ORC9+8 groups had the MSTD similar to control group (Figure 5).

Significant increases in the incidences of vacuoles were observed in groups CPT+6, CPT+11, ORC3+3, ORC5+3 and ORC9+3 (Figure 6).

Significant, but slight increase in the mean of number of Sertoli cells per tubule was observed just in the ORC3+3 group (Figure 7).

#### *Immunohistochemistry for cytokeratin 18*

Sertoli cells of prepubertal testis, a positive control, stained positively for CK18 (Figure 8). However, none of the operated groups (cryptorchidism and or orchidopexy) showed positive immunostaining for cytokeratin 18 antibody (CK18) within the seminiferous tubules.

## **DISCUSSION**

In the last decades, the best period to perform orchidopexy has been debated regarding the reestablishment of fertility and the reduction of the risk for testicular cancer (Lee, 2005; Petterson et al., 2007; Walsh et al., 2007). However, there is not a comprehensive study available that systematically characterized the testicular changes induced by experimental cryptorchidism and its reversion. The purpose of the present study was to document the damage induced by cryptorchidism in the seminiferous tubules cell populations, to evaluate the potential of these alterations for reversibility and to suggest the best moment for orchidopexy.

The cryptorchidism model applied in the present study was able to induce a similar pattern of testicular damage already recorded in other studies, attesting the

success of the surgical model used (Jégou et al, 1983; Salman et al, 1988; Dutta et al, 2013). Apoptosis and germ cells exfoliation, presence of vacuoles in seminiferous epithelium and SCO tubules were observed in the testis of CPT animals. The quantitative evaluation of vacuoles showed no significant difference from CPT+3 group, probably due to the short time between the cryptorchidism and the euthanasia. However, significant increase of the incidence of this parameter was observed in the groups submitted to CPT (CPT+6 and CPT+11), indicating that a progressive damage in Sertoli cells occur in these animals. However, these alterations were not followed by changes in Sertoli cells number and in the immunoexpression of CK18 in the testes from both groups, suggesting that the damage induced by cryptorchidism neither causes Sertoli cells death nor modifies their maturity state.

The CK18 antigen was not immunohistochemically expressed in any of the groups, including in the CPT groups. Similar observation was done in SCO tubules in human's cryptorchid testis biopsies, that showed weak or absent CK18 immunoexpression (Rogatsch et al., 1996; Nistal et al., 2013). On the other hand, *Rhesus* monkey's criptorchid testis had positive expression for that biomarker, suggesting that these cells could be going through a dedifferentiation process (Zhang et al., 2004). Further than CK18, others immaturity markers as anti-Mullerian hormone (AMH) and sialo-glycoprotein (M2A antigen) have been used to verify the maturity of Sertoli cells (Hutchison et al., 2008; Nistal et al., 2013). Those humans cryptorchid testis that were negative for CK18 showed positive expression for AMH and M2A antigen (Nistal et al., 2013). This suggests that Sertoli cells could be under a dedifferentiation process modulated by the environment and depending on the injuries suffered can change its maturity characteristics. The use of more than one biomarker of immature Sertoli cells

could be more informative to confirm the profile of the Sertoli cells maturity.

The germ cell depletion observed in all testis from CPT groups (CPT+3, +6 and +11) was followed by decreased values of the mean seminiferous tubule diameter (MSTD) and of the testes and epididymides weights. It is suggested that the germ cell loss was the cause of the other testicular and epididymides disruptions, although they can also be due to the reduction in fluid production by Sertoli cells (Jégou et al., 1983). In opposite to what was observed in the cryptorchid testis, the animals from control group showed a continuous increase in the testicular growth: the MSTD and testes weights reached their maximum development in CPT+6 and got a plateau in CPT+11 group. These results suggest that germ cells depletion and eventual alterations on fluid production caused by cryptorchidism decreased the testes weights and, consequently, inhibited their normal development.

The 3-week recovery groups (ORC3+3, ORC5+3 and ORC 9+3) still showed many of the alterations observed in CPT groups such as apoptosis, exfoliation and depletion of germ cells, presence of vacuoles and SCO tubules. The MSTD and testes weights in these groups were also similar to those of the CPT groups, but the incidences of vacuoles were increased in all 3-week recovery groups. This increase was time-dependent – it was more prominent in the group with the longest period between cryptorchidism and its reversion (ORC9+3) and decreased proportionally in the others two groups (ORC3+3, ORC5+3). These results suggest that sooner the orchidopexy was performed, lower the presence of vacuoles on seminiferous epithelium, and possibly, less Sertoli cells damage.

The mean of number of Sertoli cells per tubule in all 3-week recovery groups (ORC3+3, ORC5+3 and ORC9+3) were not different from control animals, even with the increased incidence of vacuoles, except for ORC3+3 group, that showed a significant



slight increase. However, no differences were observed among the three 3-weeks recovery groups by ANOVA. This possibly means that the slight increase of Sertoli cell number in the ORC3+3 group, besides being significantly different from its control group, could be just due to a biological difference among the animals and does not reflect a response to cryptorchidism.

Orchidopexy reversed the damage induced by cryptorchidism after 8 weeks of recovery. The animals from these groups showed resumption of spermatogenesis, decrease in the incidence of vacuoles, recovery of the MSTD, increase of the testicular and epididymides weights, although some differences from the control groups remained. The only significant difference to control group found was the MSTD in the group ORC5+8. The ANOVA test was also applied and showed no difference among the others 8-week recovery groups (ORC3+8, ORC9+8), indicating that all the animals from these groups had similar reestablishment of the seminiferous tubule diameter. The reversibility of testicular damage as demonstrated by our orchidopexy model was also observed in other studies, proving the success of the surgical model for orchidopexy used (Jégou et al., 1984; Quinn et al., 1991; Mizuno et al., 2008).

Several studies indicated that orchidopexy performed before puberty can decrease the risk for testicular cancer and infertility (Engeler et al., 2000; Lee, 2005; Petterson et al., 2007; Walsh et al., 2007). However, some studies did not associate the age at orchidopexy to decreased risk for testicular tumors (Pike et al., 1986; Swerdlow et al., 1997; Herrinton et al., 2003). In rats, no relationship was observed between the age at orchidopexy and risk for testicular cancer once this testicular malignancy has not been recorded in rodents (Hutson et al., 2013). In the present study, some evidences like the incidence of vacuoles in 3-week recovery groups, that showed that more time

the testis remained in the abdominal cavity, more was the incidence of vacuoles, suggest that the ideal moment to perform the cryptorchidism reversion is before the puberty.

In summary, this study documents the damage induced by cryptorchidism, and shows the reversibility after orchidopexy. These findings suggest that cryptorchidism damages germ and Sertoli cells, what explain the infertility observed in this condition. Furthermore, it was also possible to observe that the most intense testicular damage was documented in the testis of the animals that remained more time cryptorchid. This suggests that, the longer the testis remain ectopic, longer will be its recuperation, probably due to the great loss and damage of the critical germ and Sertoli cells.

## REFERENCES

- AbouZeid, A.A., Mousa, M.H., Soliman, H.A., Hamza, A.F., Hay, S.A. 2011. Intra-abdominal testis: histological alterations and significance of biopsy. *Urology*. 185, 269-274.
- Aumuller, G., Schulze, C., Viebahn, C. 1992. Intermediate filaments in Sertoli cells. *Microscopy Research Technique*. 20, 50–72.
- Bergh, A., Soder, O. 2007. Studies of cryptorchidism in experimental animal models. *Acta Paediatr* 96(5): 617-21.
- Bergh, A. 1983. Early morphological changes in the abdominal testes in immature unilaterally cryptorchid rats. *Int J Androl*. 6, 73-90.
- Capel, B. 2000. The battle of the sexes. *Mech. Dev*. 92(1), 89–103.
- Creasy, D., Bube, A., de Rijk, E., Kandori, H., Kuwahara, M., Masson, R., Nolte, T., Reams, R., Regan, K., Rehm, S., Rogerson, P., Whitney, K. 2012. Proliferative and non proliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system. *Toxicol Pathol*. 40, 40S-121S.
- Cupp, A.S., Skinner, M.K. 2005. Embryonic Sertoli cell differentiation. In “Sertoli Cell Biology” (M. K. Skinner and M. D. Griswold), p. 43-70. Elsevier Science, USA.
- Dutta, S., Joshi, K.R., Sengupta, P., Bhattacharya, K. 2013. Unilateral and bilateral cryptorchidism and its effect on the testicular morphology, histology, accessory sex organs, and sperm count in laboratory mice. *J Hum Reprod Sci*. 6(2), 106-110.
- Engeler, D.S., Hosli, P.O., John, H., Bannwart, F., Sulser, T., Amin, M.B. 2000. Early orchiopexy: prepubertal intratubular germ cell neoplasia and fertility outcome. *Urology*. 56, 144.
- Ferguson, L., Agoulnik, A.I. 2013. Testicular cancer and cryptorchidism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 20, 4-32.
- Fisher, J.S., Macpherson, S., Marchetti, N., Sharpe, R.M. 2003. Human ‘testicular dysgenesis syndrome’: a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Human Reproduction*. 18, 1383-1394.
- Hadziselimovic, F., Herzog, B., Seguchi, H. 1975. Surgical correction of cryptorchidism at 2 years: electron microscopic and morphometric investigations. *J Paediatr Surg*. 10,19-26.
- Herrinton, L.J., Zhao, W., Husson, G. 2003. Management of Cryptorchism and Risk of Testicular Cancer. *Am. J. Epidemiol*. 157 (7). 602-605.
- Hild, S.A., Reel, J.R., Larener, J.M., Blye, R.P. 2001. Disruption of spermatogenesis and Sertoli cell structure and function by the Indenopyridine CDB-4022 in rats. *Biol Reprod*. 65, 1771-79.
- Hutchison, G.R., Scott, H.M., Walker, M., McKinnell, C., Ferrara, D.I., Mahood, K., Sharpe, R.M. 2008. Sertoli Cell Development and Function in an Animal Model of Testicular Dysgenesis Syndrome. *Biology of Reproduction*. 78, 352–360.
- Hutson, J.M., Southwell, B.R., Li, R., Lie, G., Ismail, K., Harisis, G., Chen, N. 2013. The regulation of testicular descent and the effects of cryptorchidism. *Endocr. Rev*. 34(5):725-52.
- Hutson, J.M., Balic, A., Nation, T., Southwell, B. 2010. Cryptorchidism. *Semin. Paediatr. Surg*. 19, 215–224.
- Jégou, B., Laws, A.O., Kretser, D.M. 1983. The effect of cryptorchidism and subsequent orchidopexy on testicular function in adult rats. *J Reprod Fert*. 69, 137-145.
- Jégou, B., Peake, R.A., Irby, D.C., Kretser, D.M. 1984. Effects of the induction of experimental cryptorchidism and subsequent orchidopexy on testicular function in

immature rats. *Biol Reprod.* 30(1); 179-187.

Josso, N. 1990. Anti-mullerian hormone: Hormone or growth factor? *Prog Growth Factor Res.* 2(3), 169–179.

Kerr, J.B., Rich, K.A., Kretser, D.M. 1979. Effects of experimental cryptorchidism on the ultrastructure and function of the Sertoli cell and peritubular tissue of the rat testis. *Bio of Reprod.* 21; 823-838.

Kerr, J.B., Millar, M., Maddocks, S., Sharpe, R.M. 1993. Stage dependent changes in spermatogenesis and Sertoli cells in relation to the onset of spermatogenic failure following withdrawal of testosterone. *Anat Rec* 235, 547–59.

Kittel, B., Ruehl-Fehlert, C., Morawietz, G., Klapwijk, J., Elwell, M.R., Lenz, B., O'Sullivan, M.G., Roth, D.R., Wadsworth, P.F. 2004. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice - Part 2 - A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exper and Toxicol Pathol.* 55, 413-431.

Kollin, C., Stukenborg, J.B., Nurmio, M., Sundqvist, E., Gustafsson, T., Soder, O., Toppari, J., Nordenskjold, A., Ritzén, E.M. 2012. Boys with undescended testes: endocrine, volumetric and morphometric studies on testicular function before and after orchidopexy at nine months or three years of age. *J Clin Endocrinol Metab*, 97(12):4588–4595.

Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature.* 351, 117–121.

Lanning, L.L., Creasy, D.M., Chapin, R.E., Mann, P.C., Barlow, N.J., Regan, K.S., Goodman, D.G. 2002. Recommended Approaches for the Evaluation of Testicular and Epididymal Toxicity. *Toxicol Pathol.* 30(4), 507-520.

Latendresse, J.R., Warbritton, A.R., Jonassen, H., Creasy, D.M. 2002. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: Comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol Pathol.* 30, 524-533.

Lee, P.A. 2005. Fertility after cryptorchidism: epidemiology and other outcome studies. *Urology.* 66, 427.

Lipshultz, L.I. 1976. Cryptorchidism in the subfertile male. *Fertil Steril.* 27: 609.

Liu, F., Huang, H., Xu, Z., Qian, X., Qiu, W. 2012. Germ cell removal after induction of cryptorchidism in adult rats. *Tissue and Cell.* 44, 281– 287.

Mackay, S. 2000. Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels. *International Review of Cytology.* 200; 47–99.

Markelewicz, R.J., Hall, S.J., Boekelheide, K. 2004. 2,5-hexanedione and carbendazim coexposure synergistically disrupts rat spermatogenesis despite opposing molecular effects on microtubules. *Toxicol Sci.* 80, 92–100.

Mieusset, R., Fonda, P.J., Vaysse, P., Guitard, J., Moscovia, J., Juskiewenski, S. 1993. Increase in testicular temperature in cases of cryptorchidism in boys. *Fertil Steril.* 59, 1319–1321.

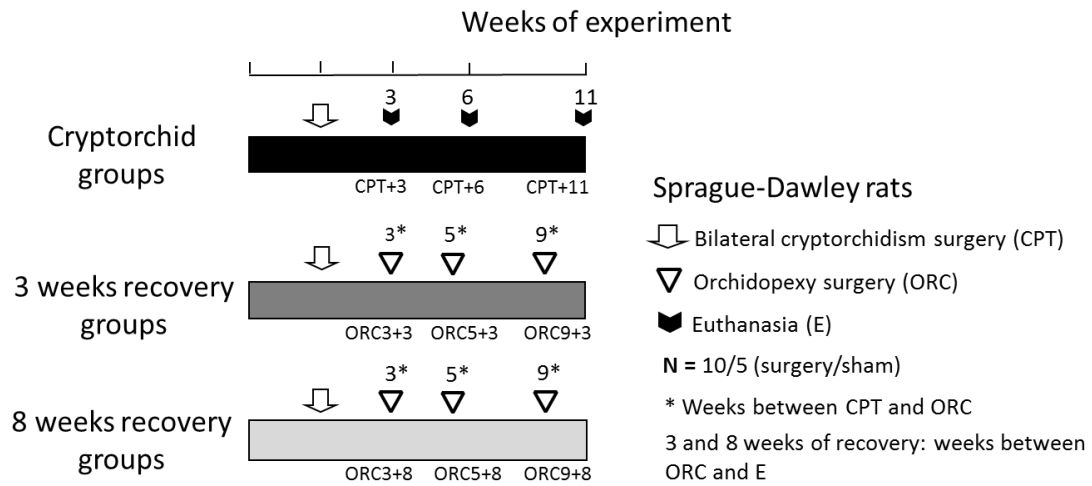
Mizuno, K., Hayashi, Y., Kojima, Y., Kurokawa, S., Sasaki, S, Kohri, K. 2008. Early orchiopexy improves subsequent testicular development and spermatogenesis in the experimental cryptorchid rat model. *J Urol.* 179, 1195-1199.

Nistal, M., Gonzalez-Peramato, P., de Miguel, M.P. 2013. Sertoli cell dedifferentiation in human cryptorchidism and gender reassignment shows similarities between fetal environmental and adult medical treatment estrogen and antiandrogen exposure. *Reproductive Toxicology.* 42, 172– 179.

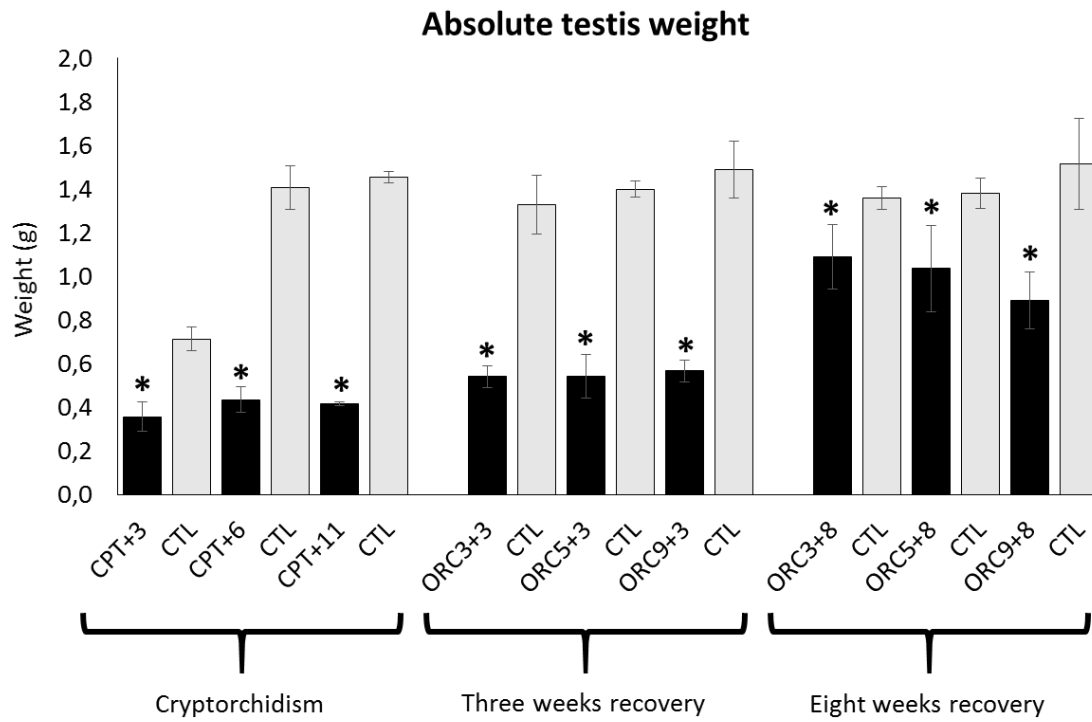
Orth, J.M., Gunsalus, G.L., Lamperti, A.A. 1988. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology.* 122, 787–794.

- Petterson, A., Richiardi, L., Nordenskjold, A., Kaijser, M., Akre, O. 2007. Age at surgery for undescended testis and risk of testicular cancer. *N Engl J Med.* 356, 1835-41.
- Pike, M.C., Chilvers, C., Peckham, M.J. 1986. Effect of age at orchidopexy on risk of testicular cancer. *Lancet.* 1, 1246.
- Quinn, F.M., Crockard, A.D., Brown, S. 1991. Reversal of degenerative changes in the scrotal testis after orchidopexy in experimental unilateral cryptorchidism. *J Pediatr Surg.* 26: 451-4.
- Rogatsch, H., Jezek, D., Hittmair, A., Mikuz, G., Feichtinger, H. 1996. Expression of vimentin, cytokeratin, and desmin in Sertoli cells of human fetal, cryptorchid, and tumour-adjacent testicular tissue. *Virchows Arch.* 427, 497-502.
- Salman, F.T., Adkins, E.S., Fonkalsrud, E.W. 1988. Morphologic effects of unilateral cryptorchidism on the contralateral descended testis. *J Pediatr Surg.* 23(5), 439-43.
- Sharpe, R.M. 1994. Regulation of spermatogenesis. In: *The physiology of reproduction* (Knobil E, Neill JD, eds). New York: Raven Press. 1-72.
- Sharpe, R.M., Skakkebaek, N.E. 2008. Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertil Steril.* 89, 33-8.
- Skakkebaek, N.E., Rajpert de Meyts, E., Main, K.M. 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects *Human Reproduction.* 16; 972-978.
- Stosiek, P., Kasper, M., Karsten, U. 1990. Expression of cytokeratins 8 and 18 in human Sertoli cells of immature and atrophic seminiferous tubules. *Differentiation.* 43, 66-70.
- Swerdlow, A.J., Higgins, C.D., Pike, M.C. 1997. Risk of testicular cancer in cohort of boys with cryptorchidism. *BMJ.* 314.
- Tenorio, B.M., Jimenez, G.C., Morais, R.N., Torres, S.M., Nogueira, R.A., Silva, W.A. 2010. Testicular development evaluation in rats exposed to 60 Hz and 1mTelectromagnetic field. *J Appl Toxicol.* 31, 223-230.
- Toppari, J., Viartanen, H E., Main, K.M., Skakkebaek, N.E. 2010. Cryptorchidism and Hypospadias as a Sign of Testicular Dysgenesis Syndrome (TDS): Environmental Connection. *Birth Defects Research (Part A): Clinical and Molecular Teratology.* 88, 910-919.
- Vogl, A.W., Vaid, K.S., Guttman, J.A. 2008. The Sertoli cell cytoskeleton. *Molecular mechanisms of spermatogenesis.* Chapter 11. 186-211.
- Walsh, T. J., Dall'Era, M.A., Croughan, M.S., Carroll, P.R., Turek, P.J. 2007. Prepubertal orchiopexy for cryptorchidism may be associated with lower risk of testicular cancer. *The Journal of Urology.* 178, 1440-46.
- Zhang, Z., Hu, Z., Song, X., Xiao, L., Zou, R., Han, C., Liu, Y. 2004. Disrupted expression of intermediate filaments in the testis of rhesus monkey after experimental cryptorchidism. *Int J Androl.* 27, 234-239.
- Zorgniotti, A.A. 1991. *Temperature and environmental effects on the testis.* Plenum Press. 1-335.
- Patkowski, D., Czernik, J., Jelen, M. 1992. The natural course of cryptorchidism in rats and the efficacy of orchidopexy or orchiectomy in its treatment before and after puberty. *J Pediatr Surg.* 7, 870-873.

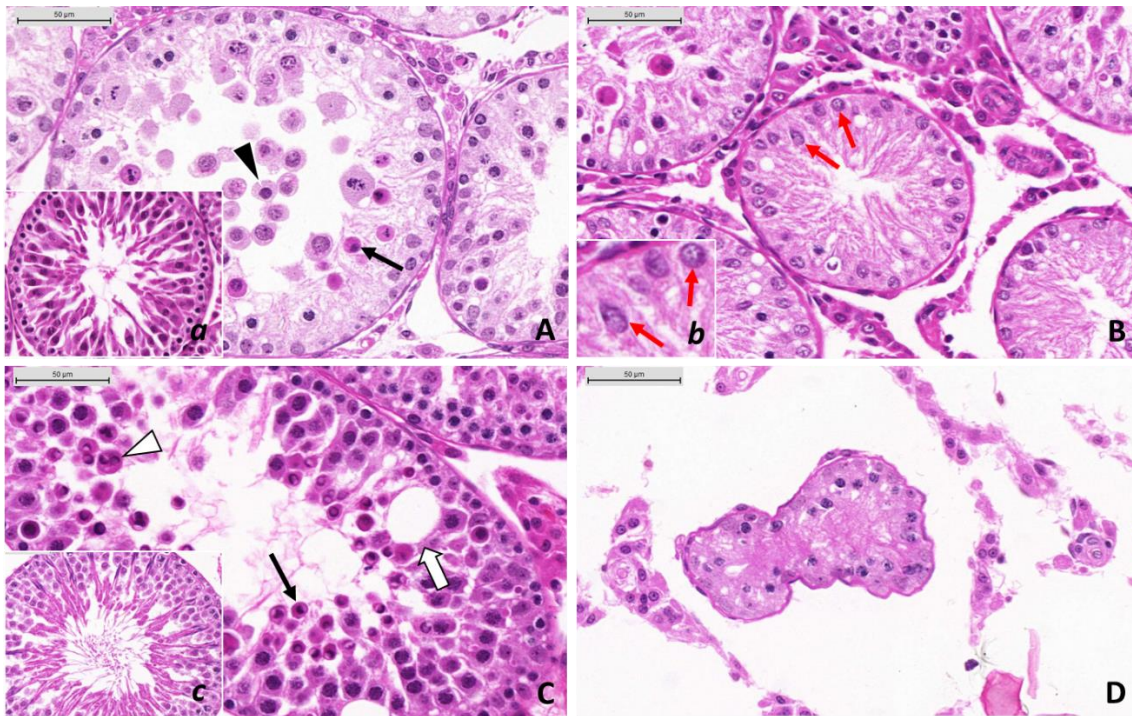
FIGURES



**Figure 1.** Experimental design. CPT: Cryptorchidism with 3 weeks old. ORC3, ORC5 and ORC9: Orchidopexy 3, 5 and 9 weeks after cryptorchidism, respectively.

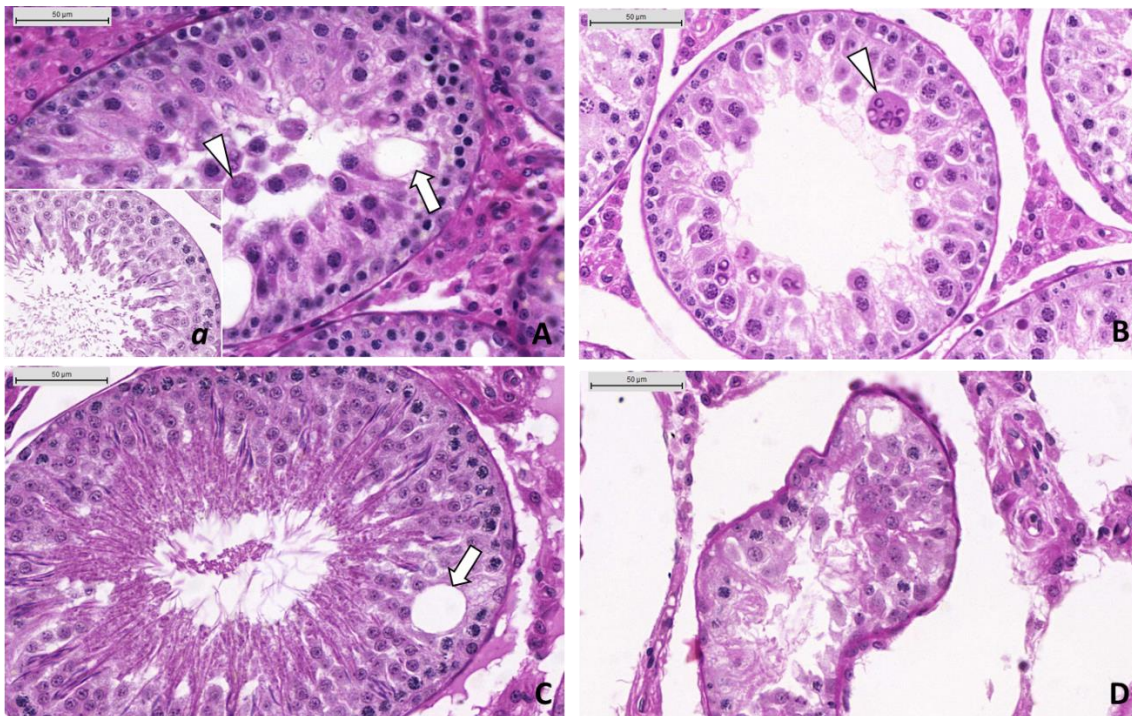


**Figure 2.** Absolute testis weight (g). All groups showed reduction in testis weight. Significance test was T test, \* $p < 0.05$ . Values are presented as mean  $\pm$  SD. CTL: Control group, CPT: cryptorchidism group, ORC3, ORC5 and ORC9: Orchidopexy 3, 5 and 9 weeks after cryptorchidism, respectively.

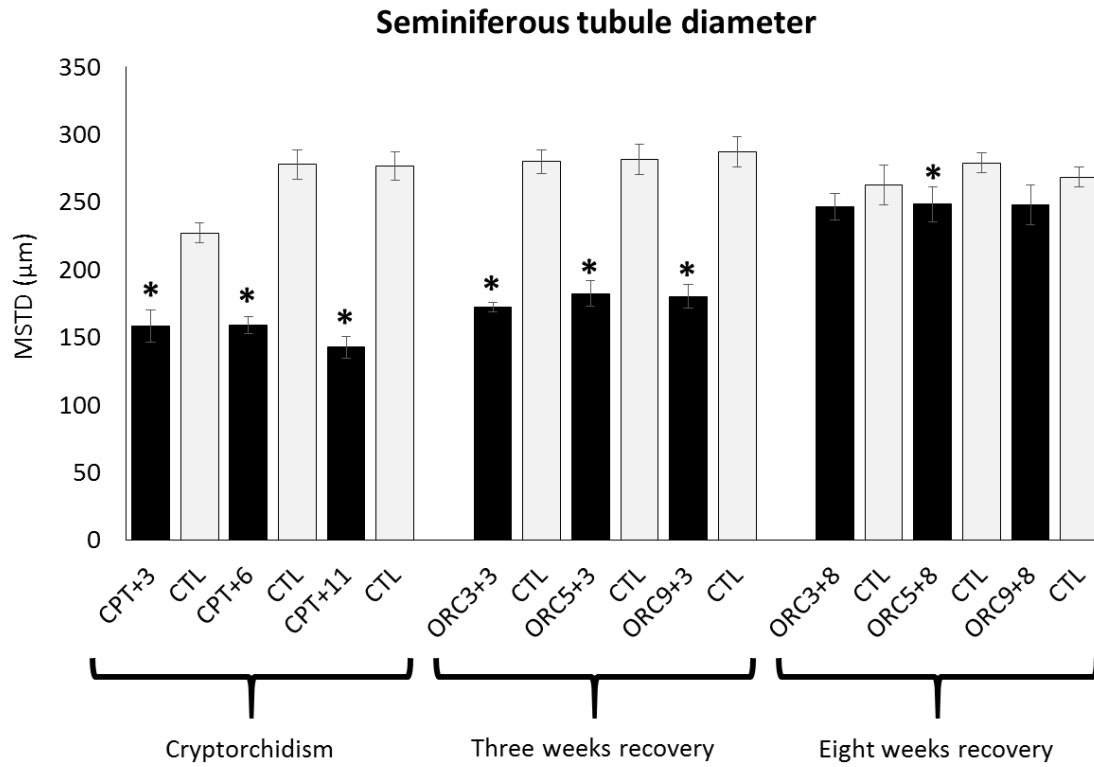


**Figure 3.** Histological alterations after cryptorchidism surgery. **A.** Seminiferous epithelium of an animal of CPT+3 group. Several germ cells are in apoptosis (black arrow) and some of them detached from epithelium and appear in the center of the tubule, characterizing exfoliation (tip of black arrow). **a.** Seminiferous tubule of control animal of the CPT+3 group. **B.** SCO tubule of an animal of CPT+3 group. Sertoli cells showed round nucleus; some of them seen to be fixed in the epithelium base, showing possible dysfunctions in this cell (red arrows). **b.** SCO tubule showing immature Sertoli cell (red arrows). **C.** Seminiferous epithelium of an animal of CPT+6 group showing vacuoles (white arrow), multinucleated giant cells (tip of white arrow) and apoptosis cells (black arrow). **c.** Seminiferous tubule of a control animal of CPT+6 group. **D.** Atrophic tubule in an animal of CPT+11 group. This tubule present deformation its normal conformation; impaired spermatogenesis, SCO tubule.

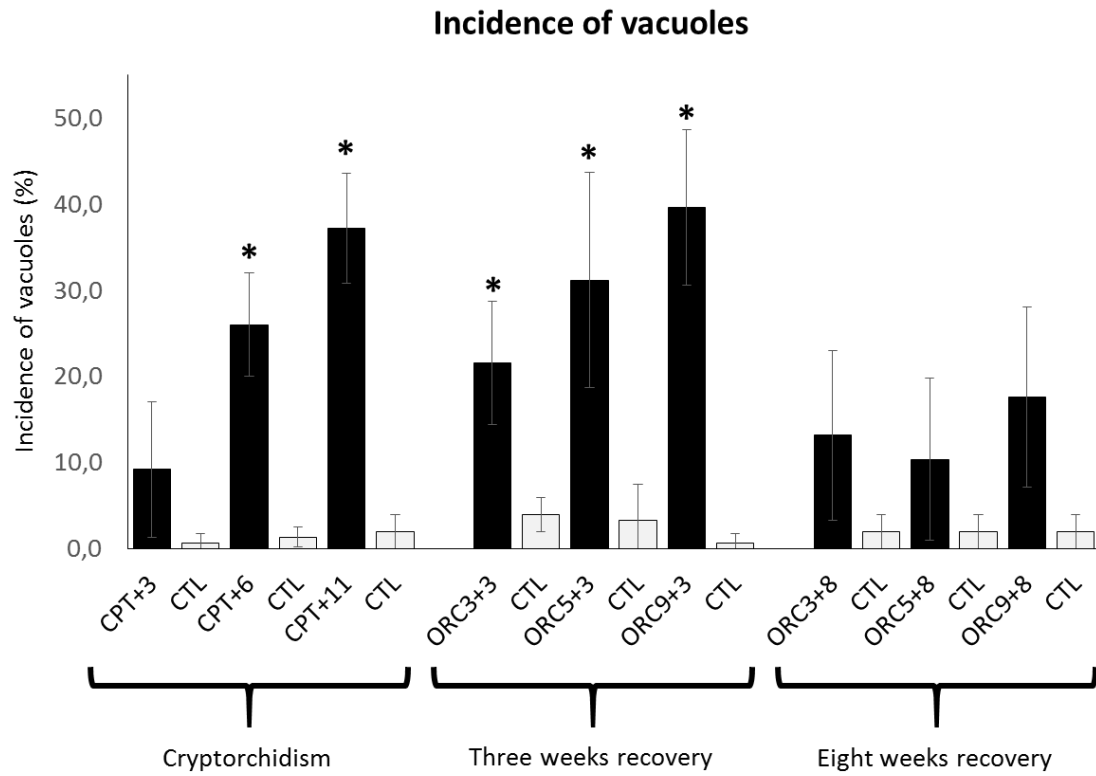




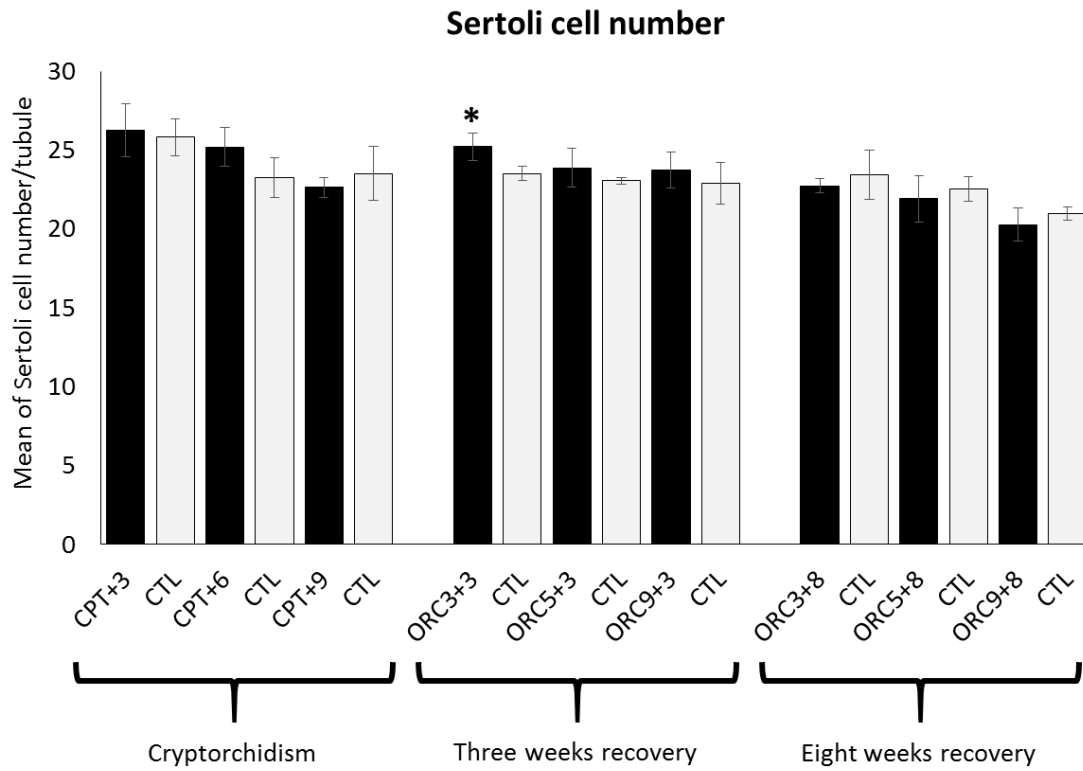
**Figure 4.** Histological alterations after orchidopexy surgery. **A.** Seminiferous tubule of an animal of ORC3+3 group showing vacuole in seminiferous epithelium (white arrow) and multinucleated giant cells (tip of white arrow). **a.** Control animal of ORC3+3 group. **B.** Multinucleated giant cell (tip of white arrow) of an animal of ORC9+3. **C.** Seminiferous tubule of an animal of the ORC3+8 group. Although spermatogenesis is complete, vacuoles are observed in some tubules of these animals (white arrow). **D.** Atrophic seminiferous tubule of an animal of ORC9+8 group.



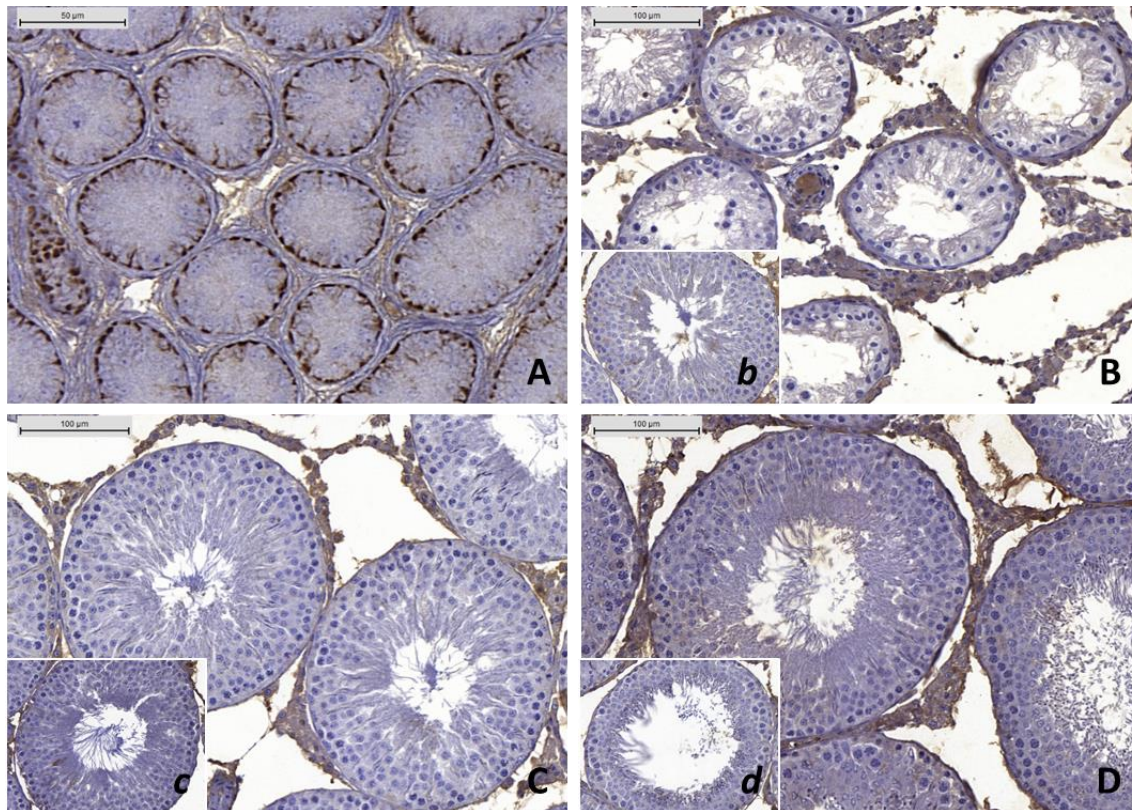
**Figure 5.** Mean of seminiferous tubule diameter (MSTD). Cryptorchidism group and 3-week recovery groups showed decrease in MSTD. Just the ORC5+8 group presented decrease in MSTD. ANOVA test showed no difference between the three 8-week recovery groups. Significance test was T test,  $*p < 0.05$ . Values are presented as mean  $\pm$  SD. MSTD = Mean of seminiferous tubule diameter. CTL: Control group, CPT: cryptorchidism group, ORC3, ORC5 and ORC9: Orchidopexy 3, 5 and 9 weeks after cryptorchidism, respectively.



**Figure 6.** Incidence of vacuoles in seminiferous epithelium. CPT+6, CPT+11, ORC3+3, ORC5+3, ORC9+3 and ORC9+8 groups showed increase in the incidence of vacuoles. Significance test was T test,  $*p < 0.05$ . Values are presented as mean  $\pm$  SD. CTL: Control group, CPT: cryptorchidism group, ORC3, ORC5 and ORC9: Orchidopexy 3, 5 and 9 weeks after cryptorchidism, respectively.



**Figure 7.** Mean of number of Sertoli cells per tubule. Only the rats of the group ORC3+3 had a significant increase in number of Sertoli cells per tubule. ANOVA test showed no difference between the three 3-week recovery groups. Significance test was T test,  $*p < 0,05$ . Values are presented as mean  $\pm$  SD. CTL: Control group, CPT: cryptorchidism group, ORC3, ORC5 and ORC9: Orchidopexy 3, 5 and 9 weeks after cryptorchidism, respectively.



**Figure 8.** Immunohistochemistry for cytokeratin 18 (CK18). **A.** Immature testis of rat with 5 days old showing CK18 positive staining in the cytoplasm of Sertoli cells. **B.** Seminiferous tubules of an animal of the CPT+11 group. No staining was observed in Sertoli cells. **b.** Control animal of CPT+11 group. **C.** Testis of an animal of ORC3+8 group showing no CK18 staining for Sertoli cells. **c.** Control animal of ORC3+3 group. **D.** Seminiferous tubules of ORC9+8 group showing no staining for CK18. **d.** Control animal of ORC9+8 group.

## TABLES

**Table 1.** Prostate, seminal vesicle and epididymis relative weights.

Groups	Prostate relative weight (g)		Seminal vesicle relative weight (g)		Epididymis relative weight (g)	
	Experimental model	Control	Experimental model	Control	Experimental model	Control
<b>CPT+3</b>	0,040 ± 0,012	0,040 ± 0,007	0,020 ± 0,008	0,020 ± 0,008	<b>0,040 ± 0,008*</b>	0,050 ± 0,002
<b>CPT+6</b>	0,071 ± 0,004	0,086 ± 0,003	<b>0,151 ± 0,039*</b>	0,200 ± 0,037	<b>0,050 ± 0,011*</b>	0,090 ± 0,008
<b>CPT+11</b>	<b>0,090 ± 0,013*</b>	0,110 ± 0,005	0,220 ± 0,020	0,220 ± 0,030	<b>0,040 ± 0,006*</b>	0,110 ± 0,005
<b>ORC3+3</b>	0,104 ± 0,090	0,083 ± 0,010	0,120 ± 0,020	0,140 ± 0,010	<b>0,040 ± 0,003*</b>	0,080 ± 0,003
<b>ORC5+3</b>	<b>0,084 ± 0,020*</b>	0,117 ± 0,010	0,153 ± 0,030	0,188 ± 0,050	<b>0,040 ± 0,012*</b>	0,110 ± 0,006
<b>ORC9+3</b>	<b>0,109 ± 0,020*</b>	0,140 ± 0,020	0,179 ± 0,040	0,217 ± 0,040	<b>0,051 ± 0,006*</b>	0,136 ± 0,025
<b>ORC3+8</b>	0,120 ± 0,021	0,125 ± 0,016	0,211 ± 0,029	0,239 ± 0,007	<b>0,070 ± 0,009*</b>	0,100 ± 0,008
<b>ORC5+8</b>	0,115 ± 0,030	0,136 ± 0,030	0,216 ± 0,060	0,252 ± 0,060	<b>0,071 ± 0,013*</b>	0,115 ± 0,014
<b>ORC9+8</b>	<b>0,097 ± 0,017*</b>	0,135 ± 0,051	0,189 ± 0,040	0,221 ± 0,020	<b>0,050 ± 0,010*</b>	0,110 ± 0,005

Weight is presented as mean ± standard deviation. The significance test was T test. \*p < 0.05. CPT: cryptorchidism group, ORC3, ORC5 and ORC9: Orchidopexy 3, 5 and 9 weeks after cryptorchidism, respectively.

*Conclusão*

Este estudo documenta os danos testiculares induzidos pela criptorquidia e os efeitos da sua reversibilidade pela orquidopexia. Os resultados obtidos sugerem que a criptorquidia induz danos às células germinativas e de Sertoli, o que pode estar relacionado com a infertilidade observada nessa condição. Os animais submetidos à orquidopexia apresentaram padrão morfológico do testículo compatível com a retomada da espermatogênese. Além disso, foi também possível observar que a maior intensidade dos danos testiculares foi documentada nos testículos dos animais que permaneceram mais tempo criptorquídicos. Isto sugere que, quanto mais tempo o testículo permanece ectópico, maior será o tempo da sua recuperação, provavelmente devido à grande perda de células germinativas e danos críticos às células de Sertoli. Nesse sentido, foi possível sugerir que o melhor momento para realização da cirurgia de orquidopexia foi antes da puberdade, uma vez que a reversão precoce da criptorquidia foi capaz de prevenir o aparecimento de lesões degenerativas severas, como observado nos animais que permaneceram mais tempo criptorquídicos antes da realização da orquidopexia.



*Anexos*



Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP  
 Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na  
 Área da Ciência em Animais de Laboratório - CEMIB  
 International Council For Laboratory Animal Science  
 ICLAS Network Member for Promotion of Animal Quality in Research  
[www.cemib.unicamp.br](http://www.cemib.unicamp.br)



**Prof. João Lauro Viana de Camargo**  
**CPF 513.355.738-87**  
**Distrito Rubião Jr, s/n - RUBIÃO JUNIOR**  
**BOTUCATU - SP**


### Atestado de Saúde Animal

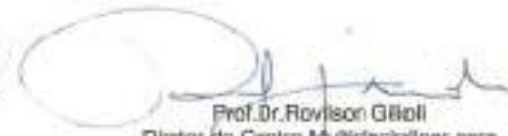
Atestamos que os ratos (30 machos e 50 fêmeas) da linhagem **NTacUnib:SD**, provenientes da Divisão de Produção de Animais S.P.F. ( Specific Pathogen Free ) deste Centro, pertencem à categoria sanitária S.P.F. e apresentam-se isentos dos agentes patogênicos pesquisados pelo laboratório de controle de qualidade sanitária. Informamos que os mesmos encontram-se livres de outros agentes infecciosos capazes de causarem riscos à saúde humana. A validade deste Atestado consta da data dos últimos testes do programa de monitorização sanitária, rotineiramente realizados pelo Laboratório de Controle de Qualidade Animal - C.Q.A. (\*).

**Observação** - O estado sanitário dos animais retirados do CEMIB nesta data será mantido se os mesmos forem acondicionados em equipamento adequado e o mesmo não for violado durante o transporte. A instituição receptora deverá oferecer infra-estrutura e condições adequadas para a manutenção de animais da Categoria Sanitária livres de agentes patogênicos especificados (S.P.F.), alojando os animais em equipamentos e/ou salas dotadas de sistema de barreiras de proteção sanitária. Toma-se necessário manejo correto e a esterilização de todo material utilizado na rotina como: ração, maravalha/cama, bebedouros, água, gaiolas, tampas, e outros.

(\* ) Data dos últimos testes de monitorização sanitária realizados em Abril de 2012.

Campinas, 04 de junho de 2012.

  
 Dr<sup>a</sup>. Sônia Cano Montsbelo Rachel  
 CRMV-SP: 4462 - Médica Veterinária  
 E-mail : [sonecmr@cemib.unicamp.br](mailto:sonecmr@cemib.unicamp.br)

  
 Prof. Dr. Rovilson Ghilfi  
 Diretor do Centro Multidisciplinar para  
 Investigação Biológica  
 CEMIB/UNICAMP  
 E-mail: [diretoria@cemib.unicamp.br](mailto:diretoria@cemib.unicamp.br)

Rua Cinco de Junho, 231 - Cidade Universitária Zeferino Vaz - Bairro Garado - CEP: 13.083-470 - Campinas - SP.  
 Fone/Fax: (19) 3521-7652 - Universidade Estadual de Campinas - CNPJ 46.088.425/000133



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE BOTULATAU  
FACULDADE DE MEDICINA



# Certificado



Comissão de Ética em Experimentação Animal  
Criada através da Portaria DFM nº 30 de 26/04/99



**Certificamos que o (Protocolo CEEA 926/2012) Estabelecimento de modelo de tumores de células germinativas em testículos de ratos Sprague-Dawley, a ser conduzido por Merielen Garcia Nascimento, orientada pelo Prof. Dr. João Lauro Vianna de Camargo, com a colaboração de Ana Paula Ferragut Cardoso, Delison Elgui de Oliveira, Samuel Cohen, Sohei Kitazawa e Wilma de Gropa Kempinas, com o apoio técnico de Paulo César Georgete e Paulo Roberto Cardoso, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.**

**Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 29/03/2012.**



Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Maria Rosa Bet Moraes Silva  
Presidente da CEEA



Alberto Santos Capelluppi  
Secretário da CEEA

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capelluppi@fmb.unesp.br



Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.

CEP: 18.618-970

Fone: (14) 3880-1608/3880-1609

e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99

Comissão de Ética no Uso de Animais

Botucatu, 06 de agosto de 2014.

Of. 29/2014-CEUA

Ilustríssimo Senhor  
Prof. Dr. João Lauro Vianna de Camargo  
Departamento de Patologia da  
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezado Prof. João Lauro,

Atendendo à solicitação de Vossa Senhoria, informo que o Sub-Projeto de Pesquisa intitulado: "Isolamento e caracterização de células germinativas testiculares de ratos Sprague-Dawley" que fazia parte do Projeto de Pesquisa (Protocolo CEEA 926-2012) Estabelecimento de modelo de tumores de células germinativas em testículos de ratos Sprague-Dawley, foi **cancelado** sua execução, haja vista, que a solicitação de auxílio junto ao órgão de fomento foi negada. Em substituição a este, abaixo especificamos como se configura a história do Protocolo em questão:

**Projeto Maior: (Protocolo CEUA 926-2012) "Estabelecimento de modelo de tumores de células germinativas em testículos de ratos Sprague-Dawley"** de autoria de Merielen Garcia Nascimento, orientada por Vossa Senhoria e colaboradores aprovado por este colegiado em 29/03/2012, conta com os seguintes **Sub-Projetos** a saber:

**Sub-Projeto I: (Protocolo CEUA 926-2012-A) "Estudo da maturação e ultraestrutura de células de Sertoli em Modelo experimental de criptorquidia e orquidopexia"** conduzido por Lígia Maria Gomide, orientada pelo Prof. Titular João Lauro Vianna de Camargo e Co-orientada por Merielen Garcia Nascimento, com objetivo de **Dissertação de Mestrado**, aprovado pela Presidência da CEUA em 22 de maio de 2014, através do ofício 14/2014.

**Sub-Projeto II: (Protocolo CEUA 926-2012-B) "CRIPTORQUIDIA E EXPOSIÇÃO IN ÚTERO AO DI(N-BUTIL) FTALATO e à ACRILAMIDA- AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS DE LEYDIG"** que será conduzido por Nathália Pereira de Souza, orientada pelo Prof. Titular João Lauro Vianna de Camargo e Co-orientada por Merielen Garcia Nascimento, e pesquisadores associados Dda Ana Paula Ferragut Cardoso, Mda Ligia Maria Gomide e Dr. Samuel Cohen, com objetivo de **Dissertação de Mestrado**, aprovado pela Presidência da CEUA em 05/08/2014.

Atenciosamente,

Prof<sup>a</sup> Adjunta Noeme Sousa Rocha  
Vice-Presidente da CEUA