

MARCOS ANTONIO SANTANA CASTRO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CISPLATINA
COM E SEM USO DE ANTIOXIDANTES
SOBRE A ESPERMATOGÊNESE DE RATOS ADULTOS**

CAMPINAS

2005

MARCOS ANTONIO SANTANA CASTRO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CISPLATINA
COM E SEM USO DE ANTIOXIDANTES
SOBRE A ESPERMATOGÊNESE DE RATOS ADULTOS**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título de
Doutor em Cirurgia, área de concentração em Cirurgia*

Orientador: Prof. Dr. Ubirajara Ferreira

Co-Orientador: Prof. Dr. Sidney Glina

CAMPINAS

2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C279a

Castro, Marcos Antonio Santana

Avaliação dos efeitos da cisplatina com e sem uso de antioxidantes sobre a espermatogênese de ratos adultos. / Marcos Antonio Santana Castro. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientadores : Ubirajara Ferreira, Sidney Glina

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cisplatino. 2. Espermatogênese. 3. Quimioterapia. 4. Antioxidantes. I. Ferreira, Ubirajara. II. Glina, Sidney. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

(slp/fcm)

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Ubirajara Ferreira

Membros:

1. Prof. Dr. Ubirajara Ferreira

2. Prof. Dr. Limirio Leal Fonseca Filho

3. Prof. Dr. Marcus Vinicius Sadi

4. Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D'Ancona

5. Prof. Dr. Fernandes Denardi

Curso de pós-graduação em Cirurgia, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 16/12/2005

*Aos meus pais, irmãos e cunhados,
meu agradecimento pela vida, pelo estímulo constante ao estudo e
pelos primeiros ensinamentos na paixão pelo conhecimento;*

*À minha esposa Izabel,
meu agradecimento pelo amor, companheirismo, estímulo, apoio e suporte familiar,
sem os quais, dificilmente teria chegado ao final deste trabalho;*

*À minha filha Laís e ao meu filho Caio,
minhas desculpas pelo tempo não compartilhado,
que, com certeza, iremos recuperar juntos nos próximos anos.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ubirajara Ferreira, a quem admiro muito, agradeço pelos ensinamentos, confiança e oportunidade de crescimento profissional;

Ao Prof. Dr. Sidney Glina, pela disponibilidade, apoio, sugestões e por ter se colocado à inteira disposição na realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos S. Castro, pela indispensável colaboração, apoio e inteira dedicação na realização deste experimento;

Ao Prof. Dr. Nelson Rodrigues Netto, cujo espírito científico contagiante me serviu de exemplo;

Ao Prof. Ms. Nilton Jose de Oliveira, Dr. Celso Lepéra, Dr. Denis Wilson Ramos, pela amizade e companheirismo nas etapas deste experimento;

À Profa. Jane M. Q. Alves, pelo auxílio na realização deste trabalho e análise histológica;

Aos amigos da Pós-graduação, Drs. Élcio Dias Silva e Rubens Peixoto Oliveira e Profa. Dra. Miriam Dambros pelo apoio e trocas de ensinamentos;

Ao Prof. Dr. Fernandes Denardi, pelas sugestões, personalidade profissional, humana e Íntegra demonstrada em nosso convívio;

Aos Profs. Drs. Paulo Augusto Neves e Marcelo Lopes Lima pelas valiosas sugestões oferecidas;

Ao Prof. Dr. Luiz Renato de França, por ter se colocado à disposição e fornecido material de apoio;

À Sra. Vera Maria Barbosa, pelo apoio durante toda a Pós-graduação;

À Sra. Alice Adelaide A. Garcia, secretária da Disciplina de Urologia, pela colaboração e atenção dedicadas em meu auxílio;

Meu especial agradecimento às Coordenações do Curso de Pós-graduação em Cirurgia da UNICAMP e aos professores da Disciplina de Urologia, pela acolhida durante esta jornada;

À Universidade São Francisco, pelo estímulo na realização desta etapa da minha trajetória profissional;

À Denise Baptista Gonçalves, pelo incentivo e valiosas sugestões nas árduas dificuldades de digitação;

Ao Serviço de Urologia do Hospital do Servidor Público Estadual, por minha formação nesta área.

*“A verdadeira medida de um homem
não é como ele se comporta em momentos de conforto e conveniência,
mas como ele se mantém em tempos de controvérsia e desafio.”*

Martin Luther King Jr.

| | <i>Pág.</i> |
|---|---------------|
| RESUMO | <i>xxxvii</i> |
| ABSTRACT | <i>xli</i> |
| 1- INTRODUÇÃO | 45 |
| 2- OBJETIVOS | 51 |
| 3- REVISÃO DE LITERATURA | 55 |
| 3.1- Radicais Livres | 57 |
| 3.2- Estresse Oxidativo | 58 |
| 3.3- Peroxidação Lipídica e Antioxidantes | 59 |
| 3.3.1- Antioxidantes preventivos que sequestram íons metálicos..... | 60 |
| 3.3.2- Antioxidantes decompositores..... | 60 |
| 3.3.3- Enzimas antioxidantes..... | 60 |
| 3.3.4- Cisplatina: forma molecular, distribuição tecidual e complicações de seu uso..... | 61 |
| 3.3.5- Cisplatina: associação com estresse oxidativo e antioxidante..... | 68 |
| 3.3.6- Estrutura do testículo e espermatogênese..... | 72 |
| 3.3.7- Espermatogênese..... | 73 |
| 3.3.8- Espermatogênese: estresse oxidativo e antioxidantes..... | 75 |
| 4- MATERIAL E MÉTODOS | 79 |
| 4.1- Animais de Experimentação | 81 |
| 4.2- Realização do Experimento | 81 |

| | |
|---|------------|
| 4.2.1- Preparo anestésico..... | 81 |
| 4.2.2- Posicionamento do animal..... | 81 |
| 4.2.3- Tratamento e procedimento cirúrgico..... | 82 |
| 4.3- Duração do Experimento..... | 83 |
| 4.4- Sacrifício dos Animais..... | 84 |
| 4.5- Preparo do Material Coletado..... | 85 |
| 4.6- Processamento Histológico..... | 86 |
| 4.7- Análise Histológica Quantitativa dos Testículos..... | 89 |
| 4.7.1- Proporções volumétricas dos componentes do parênquima testicular..... | 89 |
| 4.7.2- Diâmetro dos túbulos seminíferos..... | 90 |
| 4.7.3- Diâmetro nuclear e nucleolar das células do epitélio do túbulo seminífero..... | 90 |
| 4.7.4- População celular dos túbulos seminíferos..... | 91 |
| 4.7.5- Razões entre células germinativas e células de Sertoli (Índices de células de Sertoli (ICS)..... | 92 |
| 4.8- Estimativa das Reservas Espermática Testicular e Epididimária..... | 92 |
| 4.9- Leitura das Lâminas..... | 92 |
| 4.10- Análise Estatística..... | 93 |
| 5- RESULTADOS..... | 95 |
| 6- DISCUSSÃO..... | 113 |
| 7- CONCLUSÕES..... | 125 |
| 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 129 |
| 9- FONTES CONSULTADAS..... | 149 |
| 10- ANEXO..... | 153 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| % | Porcento |
| µm | Micrometro |
| + | mais |
| α | Alfa |
| CA | Califórnia |
| Cu | Cobre |
| DM | Diâmetro nuclear médio |
| DNA | Ácido desoxiribonucléico |
| E | Epidídimo |
| E.R.T.O. | Espécies reativas tóxicas de oxigênio |
| Ec | Extracelular |
| FSH | Hormônio folículo estimulante |
| g | grama |
| G1 | Grupo I - Controle |
| G2 | Grupo II - Cisplatina |
| G3 | Grupo III - Cisplatina + antioxidante |
| Gy | Gray |
| H₂O | Hidróxido de oxigênio |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrogênio |
| ICS | Índice de células de Sertoli |
| ICSI | Intracitoplasmatic sperm injection |
| IP | Intraperitoneal |

| | |
|-----------------------------------|---|
| kg | quilograma |
| LD | Dose letal |
| M | Molar |
| m² | Metro quadrado |
| mg | miligrama |
| ml | mililitro |
| Mn | Mitocôndria |
| n | Número |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| ° | Grau |
| O₂ | Oxigênio |
| O₂^{•-} | Radical superóxido |
| °C | Grau Celsius |
| OH[•] | Radical hidroxila |
| p | Nível de rejeição de hipótese de nulidade |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| PV | Complexo próstata ventral |
| RE | Reserva total de epidídimo |
| RE/g | Reserva por grama de epidídimo |
| RG | Reserva espermática total testicular |
| RG/g | Reserva espermática por grama testicular |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| S.T.M. | Solução salina triton mertiolate |

| | |
|------------------|---|
| SF | Soro fisiológico |
| SOD | Superóxido de dismutase |
| T | Testicular |
| TCG | Tumores de células germinativas |
| ui | Unidade internacional |
| VSGC | Vesícula seminal e glândula coaguladora |
| $\bar{x} \pm dp$ | Média mais ou menos desvio padrão |
| X | Veze |
| Zn | Zinco |

| | | <i>Pág.</i> |
|-----------------|--|-------------|
| Tabela 1 | Peso corporal, testicular e índice gonadossomático dos animais sacrificados ($\bar{x} \pm dp$)..... | 97 |
| Tabela 2 | Pesos* do complexo próstata ventral (PV), vesícula seminal e glândula coaguladora (VSGC) de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3). ($\bar{x} \pm dp$)..... | 98 |
| Tabela 3 | Proporção volumétrica (%) do lume dos túbulos seminíferos dos testículos de ratos Wistar adultos* controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 98 |
| Tabela 4 | Proporção volumétrica (%) do epitélio seminífero dos testículos de ratos Wistar adultos* controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 99 |
| Tabela 5 | Proporção volumétrica (%) da túnica própria dos testículos de ratos Wistar adultos* controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 100 |
| Tabela 6 | Proporção volumétrica (%) do estroma* dos testículos de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 100 |
| Tabela 7 | Proporção volumétrica (%) dos núcleos das células de Leydig dos testículos de ratos Wistar adultos* controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 101 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| Tabela 8 | Pesos* ($\bar{x} \pm dp$) testicular (T) e epididimário (E) utilizados nos cálculos das respectivas reservas em ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 102 |
| Tabela 9 | Reserva ($\bar{x} \pm dp$) total e por grama de parênquima testicular de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 102 |
| Tabela 10 | Reserva ($\bar{x} \pm dp$) total (RE) e por grama (RE/g) de epidídimo de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 103 |
| Tabela 11 | Diâmetro médio (μm) de secções transversais em túbulos seminíferos de ratos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 103 |
| Tabela 12 | Diâmetro (μm) nuclear médio ($\bar{x} \pm dp$) de espermatogônias em secções transversais de túbulos seminíferos de ratos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 104 |
| Tabela 13 | Diâmetro (μm) nuclear médio ($\bar{x} \pm dp$) de espermatócitos primários em preleptótenos em secções transversais de túbulos seminíferos de ratos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 105 |
| Tabela 14 | Diâmetro (μm) nuclear médio ($\bar{x} \pm dp$) de espermatócitos primários em paquítenos em secções transversais de túbulos seminíferos de ratos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 105 |
| Tabela 15 | Diâmetro (μm) nuclear médio ($\bar{x} \pm dp$) de espermátides arredondadas em secções transversais de túbulos seminíferos de ratos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 106 |

| | | |
|------------------|---|-----|
| Tabela 16 | Diâmetro (μm) nucleolar médio ($\bar{x} \pm dp$) de células de Sertoli em secções transversais de túbulos seminíferos de ratos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 107 |
| Tabela 17 | Número* de espermatogônias ($\bar{x} \pm dp$) em secções transversais de túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 107 |
| Tabela 18 | Número* de espermatócitos primários em pré-leptóteno ($\bar{x} \pm dp$) em secções transversais de túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 108 |
| Tabela 19 | Número* de espermatócitos primários em paquíteno ($\bar{x} \pm dp$) em secções transversais de túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 109 |
| Tabela 20 | Número* de espermátides arredondadas ($\bar{x} \pm dp$) em secções transversais de túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 109 |
| Tabela 21 | Número* de células de Sertoli ($\bar{x} \pm dp$) em secções transversais de túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 110 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| Tabela 22 | Razão* de espermátides arredondadas por células de Sertoli em secções transversais de túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 111 |
| Tabela 23 | Razão* de espermátócitos primários em paquíteno por células de Sertoli em secções transversais de túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 111 |
| Tabela 24 | Razão* de espermátócitos primários em pré-leptóteno por células de Sertoli em secções transversais de túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 112 |
| Tabela 25 | Razão* de espermatogônias em por células de Sertoli em secções transversais de túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)..... | 112 |

| | <i>Pág.</i> |
|---|-------------|
| Figura 1 Molécula da cisplatina acoplada ao DNA..... | 62 |
| Figura 2 Desenho esquemático dos compartimentos testiculares: tubular e intertubular..... | 72 |
| Figura 3 Desenho esquemático das fases da espermatogênese..... | 74 |
| Figura 4 Abordagem da região inguinal com dissecção, identificação e injeção de SF a 0,9% através da veia femoral..... | 83 |
| Figura 5 Posicionamento do animal após o sacrifício sob magnificação submetido à toracolaparotomia..... | 84 |
| Figura 6 Após dissecção do ventrículo esquerdo, realiza-se a cateterização deste para a perfusão..... | 85 |
| Figura 7 Orquiectomia unilateral prévia à perfusão para posterior estimativa da reserva testicular e epididimária..... | 85 |
| Figura 8 Imagens de testículo, epidídimo e glândulas anexas após a perfusão, dissecção e secção testicular..... | 86 |
| Figura 9 Aspecto histológico de testículo de animal do Grupo IIIa1 (PAS, 27x). Ênfase aos túbulos seminíferos. Observa-se setas: A- Epitélio germinativo e B- Lume com espermátides alongadas..... | 87 |
| Figura 10 Corte histológico do testículo de animal do Grupo IIa6 (PAS, 27x). Observa-se setas: A- Espaço intertubular; B- Lume do túbulo seminífero e C- Epitélio germinativo..... | 87 |

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 11 | Aspecto histológico de túbulos seminíferos de testículo de animal do Grupo IIIa4 (PAS, 108x). Constata-se setas: A- Células de Sertoli; B- Espermátócito primário em paquíteno; C- Espermátide arredondada e D- Espermátide alongada..... | 88 |
| Figura 12 | 1- Corte histológico com ênfase no espaço intertubular do testículo de animal do Grupo IIa1 (PAS, 108x). Observa-se setas: A- Túnica própria, B- Vaso e C- Núcleos de células Leydig. 2- Corte histológico do testículo de animal do Grupo IIIa1 (PAS, 108x). Observa-se setas: A- Espermátócito em paquíteno, B- Célula mióide e C- Célula de Sertoli..... | 88 |
| Figura 13 | Esquematização da morfometria testicular com retículo de pontos para estimativa da proporção volumétrica..... | 89 |
| Figura 14 | Esquematização da mensuração do diâmetro do túbulo seminífero em corte transversal..... | 90 |

RESUMO

INTRODUÇÃO: A cisplatina é uma droga amplamente utilizada no tratamento do câncer e seu efeito antineoplásico deve-se à habilidade de inibir a síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA). O grau de lesão testicular induzido por este quimioterápico é variável, podendo afetar tanto o epitélio seminífero como as estruturas do tecido intertubular. Sabe-se ainda, que a cisplatina induz à queda dos níveis de antioxidantes séricos, que pode resultar em falência do mecanismo de defesa contra a lesão oxidativa ocorrida. **OBJETIVO:** Verificar os efeitos da administração isolada da cisplatina ou associada a superóxido de dismutase (SOD) e catalase na quantificação da produção espermática através de contagens das células da linhagem espermatogênica e das reservas espermáticas testicular e epididimária, e nas proporções volumétricas dos componentes testiculares de ratos adultos. **MATERIAL E MÉTODOS:** Vinte e quatro ratos Wistar adultos foram divididos casualmente em três grupos: Grupo I - Controle: submetidos à injeção intraperitoneal (IP) de soro fisiológico (SF) a 0,9% e também, através da veia femoral (n = 8); Grupo II: submetidos à injeção IP de cisplatina na dose de 4 mg/kg de peso corporal e a SF 0,9%, através da veia femoral (n = 8) e Grupo III: submetidos à injeção IP de cisplatina na mesma dose e a SOD + catalase, na dose de 2,5 mg/ml cada, através da veia femoral (n = 8). Todos os animais foram sacrificados 13 dias após injeção intraperitoneal. **RESULTADOS:** O tratamento com cisplatina com ou sem uso de antioxidantes não afetou os seguintes parâmetros: (1) pesos testicular, epididimário e das glândulas anexas; (2) número de células da linhagem espermatogênica assim como nas razões destas células com as células de Sertoli; (3) reservas espermáticas testicular e epididimária totais ou por grama de parênquima; e (4) diâmetro nuclear/nucleolar médio das espermatogônias, espermátocitos primários em preleptóteno, em paquíteno e das células de Sertoli. Entretanto, o tratamento afetou significativamente os seguintes parâmetros: (1) peso corporal de ratos tratados com cisplatina e cisplatina + antioxidantes reduzidos; (2) proporção volumétrica que se mostrou diminuída no epitélio seminífero testicular nos animais tratados com cisplatina sugestivo de possível proteção pelos antioxidantes; (3) percentual da túnica própria dos testículos de ratos tratados com cisplatina + antioxidantes que se mostrou aumentado em relação aos tratados com cisplatina; (4) percentual do estroma testicular dos animais tratados com cisplatina aumentado em relação aos tratados com cisplatina + antioxidantes; (5) percentual de

núcleos das células de Leydig dos testículos de ratos tratados com cisplatina e cisplatina + antioxidantes que se evidenciou reduzido; e (6) diâmetro nuclear médio de espermatídes arredondadas nos animais tratados com cisplatina e cisplatina + antioxidantes que se mostrou reduzido. **CONCLUSÕES:** a proporção volumétrica dos componentes testiculares, principalmente o epitélio seminífero, foi o parâmetro mais afetado pela cisplatina, sendo este efeito redutor minimizado pelo uso de antioxidantes.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cisplatin is a common widely used antineoplastic drug with the ability to inhibit DNA synthesis. The extent of testicular lesion induced by cisplatin is variable affecting both the seminiferous epithelium and the structures of the intertubular spaces. Cisplatin is also known to lead to a reduction of the serum levels of antioxidants which could result in the failure of the defense mechanism against oxidative lesion.

OBJECTIVE: To evaluate the effects of the administration of cisplatin alone or in association with superoxide dismutase (SOD) and catalase in the quantification of sperm production through the analysis of germ cell counts, of testicular and epididymal sperm reserves as well as of the volumetric densities of the testicular components of adult rats.

MATERIAL AND METHODS: Twenty-four adults Wistar rats were randomly assigned to either of three groups: Group I- Control: submitted to i.p. injection of 0,9% saline solution as well as through the femoral vein (n=8); Group II: submitted to i.p. injection of cisplatin (4mg/kg body weight) and 0,9% saline solution through the femoral vein (n=8) and Group III: submitted to i.p. injection of cisplatin (4mg/kg body weight) and SOD + catalase (2,5mg/ml each) injection through the femoral vein (n=8). All animals were killed 13 days following i.p injection.

RESULTS: Treatment with cisplatin or cisplatin plus antioxidants did not affect the following parameters: (1) testicular, epididymal and the accessory complex glands; (2) number of germ cells as well as their ratios to the Sertoli cells; (3) testicular and epididymal sperm reserves (total or per gram) and (4) nuclear/nucleolar mean diameter of spermatogonia, primary spermatocytes at preleptotene and pachytene stages and the Sertoli cells. However, the treatment significantly affected the following parameters to a variable extent: (1) reduced body weight of rats treated with cisplatin and cisplatin plus antioxidants; (2) reduced volume density of testicular seminiferous epithelium in animals treated with cisplatin but protected with antioxidants; (3) increased percentage of the testicular tunica propria of the rats treated with cisplatin plus antioxidants in comparison with the cisplatin treated animals; (4) increased percentage of testicular stroma in animals treated with cisplatin as compared to the cisplatin plus antioxidants treated rats; (5) reduced percentage of the Leydig cell nuclei of rats treated both with cisplatin and cisplatin plus antioxidants and (6) reduced mean nuclear diameter of round spermatids of rats treated both with cisplatin and cisplatin

plus antioxidants. **CONCLUSION:** volume density of the testicular components, mainly that of the seminiferous epithelium, was the most important parameter affected by cisplatin, its effect being ameliorated by the use of antioxidants.

1- INTRODUÇÃO

Os tumores de células germinativas (TCG) de testículo são as neoplasias sólidas mais frequentes em homens dos 20 aos 35 anos de idade na Europa e no Brasil, estimulando, interesse de inúmeros estudos na área (BERGSTROM et al., 1996 e Instituto Nacional do Câncer).

Essas neoplasias são classificadas em seminomatosas e não seminomatosas, sendo a última subdividida em carcinoma embrionário, coriocarcinoma, teratoma, tumores do saco vitelino e combinadas (MOSTOFI et al., 1998).

O tratamento dos TCG consiste na realização de orquiectomia, associada ou não a radioterapia nos seminomas puros em estágio clínico inicial e, em alguns casos, a linfadenectomia retroperitoneal e em pacientes com doença disseminada, no uso de quimioterapia à base de cisplatina (EINHORN, 2002).

A mortalidade de pacientes com tumores de testículo era maior que 50% antes de 1970, tendo diminuído para menos que 5% no ano de 1997 (BOSL et al., 1997). Essa melhora acentuada na sobrevida desses doentes deve-se ao aprimoramento da terapêutica multimodal e multidisciplinar, por meio da efetiva combinação de novas técnicas diagnósticas, marcadores tumorais, modificações de abordagens cirúrgicas e regimes de múltiplas drogas quimioterápicas (EINHORN, 2002).

Com o aumento da sobrevida, grande interesse tem sido dedicado na redução da morbidade decorrente dessa terapêutica multimodal.

A função sexual e a fertilidade constituem as principais preocupações na vida da maioria dos indivíduos recuperados de tratamentos contra o câncer de testículo (BERTHELSEN, 1987).

Infelizmente a maioria dos pacientes tratados com agentes antineoplásicos é afligida por períodos agudos ou crônicos de azoospermia, diminuição da libido e disfunção erétil (DeVITA, 1981; DRASGO et al., 1983; LANGE et al., 1983; FOSSA et al., 1985; LEITNER et al., 1986; ROTH et al., 1988). O grau de lesão testicular associado a cada tratamento depende de algumas variáveis, tais como a classe do agente, a via de administração, a dosagem, a frequência do tratamento e o uso de múltiplas drogas.

Agentes quimioterápicos manifestam seus efeitos citotóxicos por meio da interrupção obrigatória de processos celulares, tais como a síntese de ácido desoxiribonucléico e o metabolismo de folato nas células malignas que estão em rápida divisão. As elevadas taxas de atividade mitótica e meiótica das células germinativas tornam a gônada masculina altamente susceptível aos efeitos tóxicos da quimioterapia, em comparação com outros tecidos do corpo (BENNETT, 1991).

As lesões testiculares provocadas por quimioterápicos afetam tanto o epitélio germinativo como, em menor grau, as células de Leydig, responsáveis pela esteroidogênese. No epitélio germinativo, vários agentes quimioterápicos danificam tanto as células espermatogênicas mais avançadas como também as suas células tronco. Como conseqüência, ocorre azoospermia logo após o início do tratamento, seguida por um período de recuperação variável, dependente do processo de regeneração a partir das espermatogônias sobreviventes (THACHIL et al., 1981; KUHAJDA et al., 1982; SELBY et al., 1990). Entretanto, a lesão do sistema endócrino-testicular deve-se aos efeitos tóxicos diretos da quimioterapia sobre as células de Leydig e, ou, à interrupção no eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular (CHAPMAN et al., 1981; WAXMAN et al., 1982).

Os achados histopatológicos decorrentes da quimioterapia no testículo variam de leve hipo-espermatogênese até fibrose, com eliminação de células germinativas e de Leydig (DeVITA, 1981; FOSSA et al., 1985; LEITNER et al., 1986).

Entre os agentes quimioterápicos mais utilizados no tratamento de neoplasias, destaca-se a cisplatina (cis-diamino-dicloroplatinum), o qual é um metal pesado complexo, com um átomo central de platina cercado por dois átomos de cloro e duas moléculas de amônia na posição cis. A cisplatina tem apresentado seu maior êxito na terapêutica de tumores de células germinativas do testículo, formando a base de quase todos os tratamentos quimioterápicos para o carcinoma testicular (LOEHERER e EINHORN, 1984). Taxas de cura superiores a 90%, com o uso desse quimioterápico, têm sido obtidas para tumores não seminomatosos de células germinativas, mesmo em casos de doença disseminada. Entretanto, a maioria dos indivíduos tratados encontra-se em idade fértil e, assim, a quimioterapia pode ter efeito significativo na função reprodutiva (KINKEAD et al., 1992).

A utilização de cisplatina proporciona queda dos níveis de antioxidantes séricos, que podem refletir falência do mecanismo de defesa contra a lesão oxidativa induzida por drogas antineoplásicas (WEIJL et al., 1998)

Oxigênio, embora essencial, é substância tóxica em níveis excessivos, podendo acarretar mudanças funcionais e estruturais em células normais e disfunções clínicas de órgãos (HALLIWELL, 1996). Os radicais livres, também denominados espécies reativas tóxicas de oxigênio (E. R.T. O.), são substâncias com um ou mais elétrons não pareados formados como consequência de processo metabólico, principalmente na mitocôndria. (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1993)

O corpo humano apresenta várias moléculas que podem protegê-lo da ação deletéria dos radicais livres e estas são divididas em três grupos principais de antioxidantes: enzimas celulares, quelantes de ions metálicos e uma variedade de outras pequenas moléculas (WEIJL et al., 1997).

Os radicais livres surgem de várias formas, incluindo radiações eletromagnéticas, acidentes químicos, como mecanismo de defesa à infecção ou para regular as funções fisiológicas (FRIDOVICH, 1986; BABIOR e WOODMAN, 1990; MONCADA e HIGGS, 1993).

A dieta pode prevenir ou diminuir o estresse oxidativo em alguma extensão, com destaque ao tocoferol, principalmente da Vitamina E, ácido ascórbico e licopeno (Di MASCTO et al., 1989).

Até o presente momento não existem estudos experimentais visando analisar parâmetros importantes da avaliação quantitativa da espermatogênese pela cisplatina, ademais, não se tem conhecimento do emprego da associação de antioxidantes e desse quimioterápico nesse contexto sobre a espermatogênese. Por essas razões e pelo grande interesse despertado, decidiu-se estudar essas possíveis alterações.

2- OBJETIVOS

Avaliar, em ratos tratados com cisplatina com e sem antioxidantes, os seguintes parâmetros:

- 1- repercussões ponderais corporais, testiculares, epididimárias e de glândulas anexas;
- 2- quantitativamente, a produção espermática;
- 3- proporções volumétricas dos vários componentes dos testículos.

3- REVISÃO DE LITERATURA

Em razão dos múltiplos assuntos a serem abordados neste estudo e dos numerosos trabalhos a eles referentes, optou-se por dividir este capítulo conforme se segue: radicais livres, estresse oxidativo, peroxidação lipídica e antioxidantes, cisplatina: forma molecular, distribuição tecidual, complicações de seu uso; cisplatina: associação com estresse oxidativo e antioxidantes; estrutura do testículo e espermatogênese; espermatogênese: estresse oxidativo e antioxidantes.

3.1- Radicais livres

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie que em sua molécula ou átomo contenham um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; HALLIWELL, 1996 e MONTEIRO, 1996).

Os principais radicais livres formados no corpo humano são peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\bullet) e o radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) (WEIJL et al., 1997).

Essas moléculas reagem facilmente com estruturas biológicas, em particular com membranas lipídicas polinsaturadas, ácido desoxirribonucleico (DNA) e aminoácidos. Essas reações resultam em desintegração das biomembranas, lesões no DNA e desativação de enzimas que freqüentemente acarretam lesão celular ou apoptose (KONG e LILLEHEI, 1998).

No campo da medicina preventiva, E.R.T.O. geradas após exposição à radiação ou drogas têm sido associadas a transformação e lesão tecidual. Os antioxidantes que decompõem os radicais livres são considerados agentes profiláticos.

A situação em que o elétron cria um campo magnético é considerada instável energeticamente e com meia vida curta de potencial capaz de oxidar compostos inorgânicos e orgânicos, como: carboidratos, proteínas, lipídios, material genético, organelas citoplasmáticas, e assim, induzindo sua destruição (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). A estabilidade pode ser obtida através de remoção de elétrons das moléculas adjacentes

para produzir um par de elétrons. Entretanto, as moléculas atacadas possuem elétrons não pareados tornando-se um radical livre. Assim, a presença de um único radical pode iniciar uma seqüência em cadeia de reações de transferência.

O oxigênio é a principal substância atuante na formação de radicais livres, de rápida reação de oxiredução, também denominados de E.R.T.O. (BAST et al., 1991; GATÉ et al., 1999 e HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

A redução completa da molécula de trifosfato de O_2 (oxigênio) através da fosforilação oxidativa e conseqüente produção de adenosina, que ocorre no interior da mitocôndria, necessita de quebra de quatro elétrons, acarretando a formação de água como produto final (redução tetravalente) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Esta ocorre em aproximadamente 95% das moléculas de O_2 . A desativação deste sistema induz à redução inadequada do O_2 , o qual receberia menos de quatro elétrons, formando conjuntos intermediários com destaque ao O_2^{\bullet} e ao H_2O_2 , que são deletérios ao próprio organismo.

3.2- Estresse oxidativo

FRIDOVICH (1975) e BAST et al. (1991) descreveram estresse oxidativo como alterações na estrutura e função celular, que induzem ao sofrimento e, ou, à apoptose.

Estresse oxidativo ocorre usualmente devido à desnutrição ou dieta inadequada de antioxidantes tais como: alfa tocoferol, ácido ascórbico e aminoácidos (GOLDEN, 1994); ou à produção excessiva de O_2^{\bullet} e de H_2O_2 através da exposição a toxinas ou drogas que são metabolizadas e produzem radicais livres (HALLIWELL, 1997). IQBAL et al. (1989), estudando o sistema de defesa e síntese de antioxidantes, observavam que as células toleram situações de estresse oxidativo leve através de regulações do equilíbrio. Entretanto, de acordo com HALLIWELL e GUTTERIDGE (1989), HALLIWELL e GUTTERIDGE (1992) e ORRENIUS et al. (1989), o estresse oxidativo severo induz a lesões no DNA, aumento do ferro e cálcio livres intracelulares, alterações protéicas, peroxidação lipídica e conseqüente lesão e morte celular.

Diversas linhas de pesquisa a respeito da formação de radicais livres e seus efeitos na fisiopatologia das lesões celulares foram e continuam sendo conduzidas na tentativa de identificar as modificações ocorridas e evitá-las. Nesse contexto, sobressai o trabalho de PRILLAMAN e TURNER (1997). Esses autores observaram que a utilização de substâncias antioxidantes do tipo superóxido de dismutase e catalase induz a significativa recuperação da função testicular após a torção aguda experimental.

3.3- Peroxidação lipídica e antioxidantes

Os principais constituintes das membranas biológicas (celulares e de organelas) são lípidos e proteínas, sendo que a quantidade de proteínas aumenta com o número de funções que a membrana realiza (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1993).

O ácido graxo insaturado presente na dupla camada lipídica da membrana celular é alvo predileto dos radicais livres. Essa reação em cadeia junto à estrutura da membrana denomina-se peroxidação lipídica, sendo deletéria ao organismo (ARUOMA, 1994). Um dos indicadores mais utilizados para a avaliação do estresse oxidativo é a reação de peroxidação lipídica (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1990; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1993; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

HALLIWELL e GUTTERIDGE (1993) relataram que antioxidantes são substâncias presentes em concentrações baixas comparadas ao substrato oxidável e que retardam significativamente, ou inibem, a oxidação deste substrato. Assim, no que se refere à peroxidação lipídica, os antioxidantes podem agir por: diminuição da concentração localizada de O_2 , prevenindo a iniciação de reações em cadeia, unindo íons metálicos, decompondo peróxidos e quebrando cadeias (HALLIWELL, 1997).

Dentro de cada grupo de antioxidantes encontram-se: aqueles que previnem a participação de íons metálicos de transição, os decompositores de radicais livres e enzimas que catalisam a quebra de radicais livres.

3.3.1- Antioxidantes preventivos que seqüestram íons metálicos

Íons metálicos de transição, tais como cobre e ferro, contêm elétrons não pareados e participam rapidamente em reações de radicais livres, agindo como uma placa para a formação do radical hidroxila altamente destrutivo (MAXWELL, 1995).

STOCKER e FREI (1991), descreveram que os íons metálicos de transição usualmente encontram-se ligados a proteínas, mas quando livres, durante a morte celular ou durante a transformação (turn-over), são rapidamente seqüestrados para prevenir atividade de redução. Observaram, ainda, que esta situação pode ser obtida através de proteínas ligadas ao ferro, como a transferrina, lactoferrina e deferoxamina; ou ligadas no cobre como a ceruloplasmina.

3.3.2- Antioxidantes decompositores

Agem preferencialmente com radicais livres antes que mais estruturas vitais sejam atacadas, sendo eles mesmos sacrificados (oxidados) (HALLIWELL, 1990). Estas moléculas de antioxidantes de “quebra de cadeia” são oxidadas a produtos com reatividade insuficientes para propagar reações em cadeia.

PACKER et al. (1979) verificaram que essas moléculas de “quebra de cadeia” são freqüentemente divididas em hidrosolúveis, que incluem uratos e ascorbatos e as liposolúveis, tais como carotenóides e tocoferóis. Estas ações não são mutuamente exclusivas, pois o ascorbato pode regenerar o tocoferol de sua forma oxidada e, indiretamente contribuir para a defesa antioxidante lipídica.

3.3.3- Enzimas antioxidantes

Superóxido de dismutase, catalase e glutathione peroxidase catalisam a redução primária de oxidantes no meio intracelular (GREENWALD, 1990). A suplementação de selênio pode aumentar a atividade de glutathione peroxidase (TAKAHASHI, 1986 e HALLIWELL, 1997).

GROOTVELD et al. (1987) observaram que inibidores da xantina oxidase, tais como alopurinol e oxipurinol, têm sido utilizados com sucesso em modelos de lesões de reperfusão. No entanto, dúvidas ainda existem sobre a relevância da xantina oxidase no miocárdio humano (JONG et al., 1990).

Catalase é uma enzima tetramérica presente em todos os tipos de células de mamíferos, e é localizada em organelas subcelulares, tais como os peroxissomas ou microcorpos (DE DUVE, 1973; DE DUVE e BAULDHWIN, 1966; NOVIKOFF et al., 1973). O principal mecanismo de ação dessa enzima consiste na decomposição de peróxido de hidrogênio em água (SCHONBAUM e CHANCE, 1979; Di GIULIO, 1991 e FRIDOVICH, 1986).

O ânion superóxido de dismutase apresenta-se amplamente distribuído e, diferentemente da catalase, existe de várias formas, dependendo do metal do centro catalítico (FRIDOVICH, 1986), podendo ser do tipo Zn.Cu - SOD citosólica; Mn - SOD mitocondrial e a Ec - Sod extracelular (CHANCE et al., 1979 e MARKLUND, 1984).

FRIDOVICH (1986) descreveu que a SOD apresenta como ação enzimática a dismutação do ânion superóxido, formando H₂O e O₂ (peróxido de hidrogênio). Assim, SOD e catalase compartilham caminhos seqüenciais em que duas moléculas de substratos idênticos dismutam para estados de oxidação superiores e inferiores (CHANCE et al., 1979).

3.3.4- Cisplatina: forma molecular, distribuição tecidual e complicações de seu uso

Em 1844, REISET e PEYRONE (1845), descreveram inicialmente dois sais de platinum-clórico. O mecanismo de ação destes compostos (Fig.1) foi amplamente estudado e caracterizado como sendo as bases de purina e pirimidina do DNA que servem como alvo para a ação intracelular da platina (REISET e PEYRONE, 1845 apud ZWELLING e KHON, 1979). Esses autores propuseram que a explicação para toxicidades diferentes de células normais em relação a tumorais deve-se à proliferação mais rápida e maior síntese de DNA destas. Assim, a inibição da síntese de DNA por cisplatina seria mais tóxica às células tumorais em divisão.

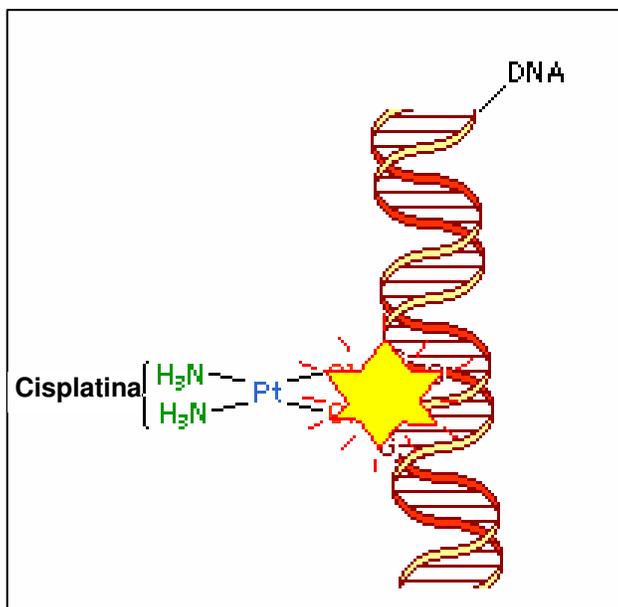


Figura 1- Molécula da cisplatina acoplada ao DNA.

Em 1965, ROSENBERG e VANCAMP, descreveram inicialmente a atividade de inibição da divisão celular pela platina em cepas de *Escherichia coli*. De maneira semelhante, esta ação foi confirmada experimentalmente em ratos, e com dose letal de 12mg/kg (KOCIBA e SLEIGHT, 1971).

A associação da cisplatina afetava principalmente tecidos com alto índice de multiplicação celular como intestinos, medula óssea, tecidos linfóides e testículos, assim como aqueles com ação principalmente de excreção como os rins e intestinos (SCHAEPPPI et al., 1973).

EINHORN e DONOHUE (1977) descreveram, pela primeira vez, estudo clínico da ação da cisplatina associada a vinblastina e bleomicina no câncer de testículo metastático.

Anos depois de sua utilização, a comunidade médica tomou consciência das complicações advindas da cisplatina, dentre elas, destacam-se, neurotoxicidade, lesões intestinais, da medula óssea, renais e, de maior relevância e interesse nosso, o aparecimento de alterações na função reprodutiva.

A infertilidade após o tratamento do câncer de testículo pode ser secundário à perda da ereção, diminuição da ejaculação ou emissão do sêmen, assim como espermatogênese inadequada. A criopreservação do sêmen após orquiectomia unilateral, antes de outras terapias para o câncer de testículo, foi considerada inútil no tratamento da infertilidade após o tratamento dessa neoplasia (BRACKEN and SMITH, 1980). No ano seguinte, TACHIL et al. (1981), em ampla revisão sobre a fertilidade relacionada ao câncer de testículo e terapia deste, verificaram que o câncer por si só apresenta efeito adverso na fertilidade, antes de qualquer forma de tratamento.

Numerosos são os trabalhos experimentais referentes aos efeitos deletérios de drogas quimioterápicas nos testículos. Uma das investigações pioneiras nas lesões testiculares foi a de MEISTRICH et al. (1982), em que estudando camundongos submetidos a administração de 14 drogas quimioterápicas diferentes, constataram que, dentre todas, a cisplatina foi a única a destruir espermátides.

DRASGO et al. (1983) observaram pacientes portadores de câncer de testículo disseminado, tratados com quimioterapia combinada, apresentaram efeitos substanciais na função gonadal, entretanto, com recuperação satisfatória da espermatogênese, após 2 a 3 anos do início do tratamento. Resultados semelhantes foram constatados em pacientes com câncer de testículo não seminomatosos por LANGE et al. (1983).

No que concerne a ação intraperitoneal da cisplatina e tentativas de diminuir sua nefrotoxicidade, HOWELL et al. (1983) verificaram, em pacientes portadores de ascite neoplásica, que essa via de administração apresentava boa fármaco cinética e que a utilização de tiosulfato de sódio diminuía a toxicidade renal.

Em investigação clínica de neoplasia germinativa de testículo, constatou-se que a contagem de espermatozóides eram baixas e os níveis séricos de hormônio folículo estimulante (FSH) eram elevados após orquiectomia unilateral e imediatamente antes e após rádio e quimioterapia. Em 1 a 5 anos de tratamento, os níveis de esperma e FSH permaneciam alterados (BERTHELSEN, 1984).

LOEHRER e EINHORN (1984), em seus trabalhos de revisão sobre o uso de cisplatina, salientaram a importância da posição "cis" ao invés da "trans" dos grupos de amônia e clorídrico que permitem a ação rápida e bifuncional no DNA, além da significativa

capacidade sinérgica com outros agentes neoplásicos. Enfatizaram ainda que efeitos tóxicos rápidos como náuseas, vômitos podem ser aliviados com novos antieméticos e nefrotoxicidade com histamina. No entanto, efeitos tardios, tais como a neuropatia periférica e esterilidade se tornariam reversíveis após anos de descontinuação do tratamento.

Em 1985, FOSSA et al. relataram que 50% a 60% dos pacientes submetidos a tratamento multimodal para câncer de testículo em 1 a 3 anos apresentam algum grau de espermatogênese. Ainda no mesmo ano, GUAZZIERI et al. (1985) descreveram que a grande presença de anticorpos antiespermatozóides, em pacientes com neoplasia de testículo com oligo e azoospermia e padrões inférteis poderia sugerir hipótese autoimune.

MAINES e MAYER (1985) verificaram que o tratamento com cisplatina em ratos induz à diminuição de 70% a 80% do citocromo P-450 microsomal no testículo, assim como redução na atividade esteróide de 17 alfa hidroxilase e níveis de testosterona, entretanto, o tratamento com gonadotrofina corionica humana restaurou essas alterações parcialmente. Sugeriram que a cisplatina ocasiona uma disfunção na associação do heme com apoproteínas, as quais, através de citocromo P-450 se conjugam com hormônios pituitários.

A associação de disfunção gonadal em pacientes com tumores de células germinativas, prévia a qualquer tratamento e de que a quimioterapia induziria lesões adicionais tanto nas células de Leydig como no epitélio germinativo foi encontrado por LEITNER et al. (1986).

VAWDA e DAVIES (1986) observaram redução significativa de espermátócitos primários em 3 a 6 dias após injeção intraperitoneal de dose única de cisplatina em camundongos e, sugeriram que, como não houve lesão de espermatogônia, não haveria esterilidade permanente.

BERTHELSEN (1987), em revisão de pacientes portadores de câncer de testículo, salienta os altos índices de cura com cirurgia, quimioterapia e radioterapia e, conseqüente preocupação com a fertilidade. Sugere a criopreservação do sêmen antes de qualquer tratamento com eventual fertilização *in vitro*.

Em outra revisão de complicações a longo prazo por quimioterapia à base de cisplatina, em pacientes com câncer de testículo, ROTH et al. (1988), ressaltam a infertilidade e disfunção das células de Leydig que se recuperam parcialmente em 12 a 24 meses após o tratamento.

CARREAU et al. (1988) observaram, após injeção única de cisplatina em ratos, diminuição do peso corporal e testicular e, com significativa alteração da produção de testosterona pelas células de Leydig.

RATNASOORIYA e SHARPE (1989) constataram que ratos tratados com altas doses de ácido pentoxiacético apresentaram depleção no estágio VII do ciclo espermatogênico, isto é, perda específica de paquíteno e espermatócitos, no entanto, a espermatogênese restante é mantida mesmo com diminuição do volume do sêmem ejaculado.

Um estudo efetuado em ratos submetidos a injeção intraperitoneal de cisplatina, constatou que tanto alterações morfológicas como bioquímicas ocorrem, sejam na espermatogênese ou por lesões na barreira hemato-testicular (POGACH et al., 1989b).

POGACH et al. (1989a) em estudo utilizando cisplatina e acetato de zinco e sulfato de cobre concomitantemente, concluíram que houve melhora da função de células de Sertoli com a primeira droga.

Outra investigação conduzida por POGACH et al. (1989b) em ratos submetidos à administração de cisplatina intraperitoneal em dose única ou diárias, avaliou as alterações na células de Sertoli. Os resultados por eles obtidos demonstraram que a degeneração de células espermatogênicas ocorrem em até cinco dias após o término da última administração e a recuperação parcial após 40 dias.

HUANG et al. (1990) observaram modificações a curto e longo prazo, de injeções diárias de cisplatina intraperitoneal em testículos de ratos. Constataram redução importante da função das células de Sertoli e de Leydig, e sugeriram que essas alterações do epitélio germinativo eram progressivas, mas reversíveis. A função gonadal normal prévia ao tratamento por neoplasia de testículo, diminuiria o risco de toxicidade permanente após a terapêutica padrão. AASS et al. (1991) encontraram menor média de contagem de espermatozóide em consequência de radioterapia infradiafragmática.

Uma pesquisa que se destaca no uso de cisplatina é a de KINKEAD et al. (1992), em que detectou alterações precoces no peso do órgão reprodutivo, contagem e motilidade espermática, fertilidade e níveis hormonais de ratos submetidos à exposição dessa droga.

De acordo com ARAI et al. (1997), em estudo de análise de qualidade de vida, a disfunção sexual e a infertilidade, constituem os principais efeitos adversos após o tratamento moderno para o câncer de testículo. Nesse mesmo ano, LAMPE et al. (1997), pesquisando contagem de espermatozóides pré quimioterapia em neoplasia germinativa de testículo, encontraram situações que podem prever a recuperação da espermatogênese após terapêutica. Ressaltaram, ainda, que esquemas com carboplatina apresentavam redução na toxicidade, mas aparentemente eram menos efetivos.

Um estudo transversal da função gonadal de pacientes portadores de câncer de testículo, submetidos a quimioterapia à base de cisplatina, evidenciou que alterações germinativas eram mais severas do que as endócrinas (BRENNEMANN et al., 1997).

MONSEES et al. (2000), examinando resposta *in vitro* de células de Sertoli imaturas, de ratos a vários poluentes, constataram que a secreção de inibina encontrava-se fortemente reduzida por metais pesados como o mercúrio e platínum.

SCHRADER et al. (2002) e HOWELL e SHALET (2001), em seus trabalhos de revisão clínica sobre função testicular após quimioterapia, salientaram a presença de lesões de células germinativas e de células de Leydig, sendo que os índices de recuperação se aproximavam de 80% em 5 anos. A proteção hormonal através de agonistas de liberação de gonadotrofinas foi verificado apenas em estudos experimentais. Reconheceram que a criopreservação de células germinativas testiculares deve ser recomendada e, em alguns casos, extração testicular de espermatozóide.

Estudo experimental, utilizando a cisplatina para introduzir apoptose em células germinativas, foi conduzido por ZHANG et al. (2001). Segundo eles, a apoptose foi observada em espermatogônia, espermátócitos e espermatídes, sendo que, quanto maior a dose de cisplatina, mais tardiamente ocorreria morte celular.

Em se tratando dos efeitos da terapia antineoplásica no eixo testículo pituitário, HOWELL e SHALET (2002) enfatizaram que tratamento à base de cisplatina para tumores de células germinativas induzem a azoospermia temporária e, que a melhora da espermatogênese ocorre em 50%, em 2 anos e, em 80% após 5 anos. Descreveram ainda a alta sensibilidade das células germinativas (0,1 gy) em relação as de Leydig (20 gy) à radioterapia.

WOZNIAK e BLASIAK (2002), constataram que o mecanismo de ação da cisplatina deve-se à provável ligação ao DNA, originando os adutos de DNA (DNA-ADDUCTS). Estes últimos, reconhecidos por proteínas nucleares podem se tornar parte do sistema de reparação celular. No ano seguinte, MASTERS e KÖBERLE (2003), revisaram ação da cisplatina nas células germinativas e, constataram que a sensibilidade à droga deve-se à reduzida capacidade de reparar a lesão no DNA, causada pela cisplatina e a tendência a apoptose.

SEAMAN et al. (2003) utilizaram-se de camundongos para estudo de apoptose induzida por cisplatina nas células germinativas. Observaram rápida morte predominantemente no espermátócito, seguida de elevada taxa apoptótica, refletindo lesão a longo prazo ou permanente nos túbulos seminíferos.

Estudo clínico relacionado a hormônios gonadais a longo prazo após tratamento de câncer de testículo foi conduzido por NORD et al. (2003). Segundo eles, esses pacientes têm maior risco de desenvolver disfunção das células de Leydig pré-maturas e hipogonadismo, assim, ficariam sob maior risco de desenvolver síndrome da deficiência androgênica de homens (ADAM).

GAFFAN et al. (2003), TAKSEY et al. (2003) e CHAUDHARI e HALDAS (2003) em seus trabalhos de revisão a longo prazo, após quimioterapia para tumores de células germinativas, salientaram que a infertilidade ocorrida é melhor tratada com criopreservação prévio à orquiectomia e posterior fertilização *in vitro*. Não houve concordância entre os autores se a infertilidade deve-se à dose cumulativa de cisplatina. Aproximadamente 70% dos pacientes diagnosticados com tumores de células germinativas de testículo apresentam desejo de obter filhos (FOSSA, 2004).

Enfatiza, ainda, que a paternidade pode ser obtida em 50% dos doentes submetidos a quimioterapia e linfadenectomia retroperitoneal.

Em se tratando da avaliação da integridade do DNA em espermatozoides de pacientes tratados com tumores de células germinativas de testículo, STAHL et al. (2004) observaram não haver diferença nas frações de espermatozoides com índice de fragmentação de DNA entre controles e doentes.

Vários estudos relacionados a criopreservação do sêmen prévia ao tratamento de câncer foram realizados. COLPI et al. (2004) e CHUNG et al. (2004) ressaltam esse método como a melhor proteção contra a infertilidade atual e, que menos de 5% dos pacientes utilizaram-na.

Diversas linhas de pesquisa com novas drogas derivadas da cisplatina, tais como a carboplatina e oxaliplatina foram e continuam sendo conduzidas em casos de quimiorresistência por cisplatina. Nesse contexto KOLLMANNNSBERGER et al. (2004) observaram atividade antitumoral e toxicidade aceitáveis com oxaliplatina associado à gemcitabina, no entanto, efeitos sobre a fertilidade ainda não estão disponíveis.

3.3.5- Cisplatina: associação com estresse oxidativo e antioxidantes

Após vários anos de uso, a comunidade médica constatou graves complicações que se seguiam à cisplatina. Assim, inúmeros foram os trabalhos na tentativa de minimizar ou evitar os efeitos adversos a essa.

McGINNESS et al. (1978) utilizando cisplatina intraperitoneal e orgoteina (superóxido de dismutase) subcutâneo em ratos, observaram redução da perda de peso e da nefrotoxicidade em relação ao controle.

BORCH e PLEASANTS (1979) constataram que após injeção intraperitoneal de cisplatina e dietilditiocarbamato (disulfiram) houve redução da perda de peso, toxicidade renal e gastrointestinal em ratos. No ano seguinte, autores desse serviço demonstraram a mesma inibição da toxicidade renal por cisplatina com dietilcarbamato sem

alterar a ação antineoplásica em ratos inoculados com tumores mamários (BORCH et al., 1980). De maneira semelhante, KHANDEKAR (1983) descreveu a proteção da nefrotoxicidade por cisplatina em ratos que receberam ditiocarbamato, assim como aumento da dose letal (LD50). Para ele, o mecanismo de ação ainda era desconhecido, sugeriu ação decompositora de radicais livres em tecidos neurais.

Em sete pacientes portadores de ascite de origem carcinomatosa, HOWELL et al. (1983) encontraram vantagens da via intraperitoneal em relação à intravenosa de cisplatina. De acordo com esses pesquisadores, o uso concomitante de tiosulfato reduziu a toxicidade renal.

NAGANUMA et al. (1984) relataram que em camundongos, o uso de selênio minimizou os efeitos da nefrotoxicidade, diarreia e inibiu o crescimento de células tumorais cooperativamente com a cisplatina.

A proteção seletiva por dietilditiocarbamato contra a toxicidade induzida pela cisplatina foi estudada por BODENNER et al. (1986). Estes autores verificaram não haver inibição da resposta tumoral em ratos e camundongos e redução do efeito emético em cães.

SUGIHARA e GEMBA (1986) observaram que a administração de decompositores de radicais livres como α tocoferol e fenilenediamine a ratos em uso de cisplatina, reduziu a perda de peso e níveis de uréia plasmática desses. Sugeriram a participação de radicais livres nas lesões celulares induzidas pela cisplatina.

OHKAWA et al. (1988) verificaram que a co-administração de selênio e cisplatina em camundongos, diminuiu a toxicidade da última e não interferiu na atividade tumoral.

Em estudo de cultura de células renais expostas ao ácido ascórbico e cisplatina, GEMBA e FUKUSHI (1991) observaram que essa aumenta a perda de enzimas celulares e o nível de peroxidase lipídica. De acordo com esses pesquisadores, o antioxidante minimizou esses efeitos.

SPITZ et al. (1993) observaram que o estresse oxidativo associa-se à resistência celular à cisplatina. Sugeriram que a atividade total de glutathione peroxidase e não catalase estaria aumentada.

De maneira semelhante, HIDAHA et al. (1995) descreveram atividade reduzida de glutathione, superóxido de dismutase e catalase e aumento da peroxidação lipídica em ratos que receberam cisplatina. Para eles, o uso de ditio-carbamato minimiza os efeitos deletérios dessa droga.

KIM et al. (1997) relataram que a lesão celular em coelhos que a cisplatina induzia era por peroxidação lipídica e dependente de ferro. Esses autores defendem a idéia de que o uso de decompositores de radicais hidroxila preveniria essa reação.

WEIJL et al. (1997) e KONG e LILLEHEI (1998) em seus trabalhos de revisão clínica sobre radicais livres e antioxidantes após terapêutica quimioterápica, enfatizaram as evidências de que a lesão renal tem origem do estresse oxidativo e peroxidação lipídica ferro dependente. Salientaram que os antioxidantes têm papel preventivo nas lesões renais por metais pesados, existindo dúvidas em relação ao seu mecanismo de ação.

Estudo clínico, avaliando os níveis de antioxidantes em pacientes utilizando cisplatina, foi conduzido por WEIJL et al. (1998). Segundo esses autores, ocorre queda nos níveis plasmáticos de antioxidantes por provável estresse oxidativo.

TOKUNAGA et al. (1998) utilizaram-se de ratos Wistar e observaram aumento na peroxidação lipídica, diminuição dos níveis de glutathione e catalase após o uso de cisplatina e que a administração de betamipron minimiza a nefrotoxicidade dessa.

No que concerne à interação de antioxidantes e terapêutica antineoplásica, LAMSON e BRIGNALL (1999) e CONKLIN (2000), em revisões clínicas, encontraram evidências de melhora terapêutica, redução de efeitos adversos quando antioxidantes eram administrados.

Em estudo experimental utilizando camundongos, SENER et al. (2000) verificaram que a melatonina inibia a peroxidação lipídica, restaurava os níveis de glutathione renal e diminuía a nefrotoxicidade por cisplatina.

A administração de superóxido de dismutase catiônica, que acumula rapidamente nas células dos túbulos contorcidos proximais permitiu o uso de altas doses de cisplatina e mínima lesão renal (NISHIKAWA et al., 2001).

No Brasil, MARTINIS e BIANCHI (2001) constataram possível papel oxidativo em lesões de DNA na nefrotoxicidade induzida por cisplatina em ratos.

O uso de alimentação granulada, do tipo antioxidante, minimizou os efeitos deletérios da cisplatina em ratos (MINAMIYAMA et al., 2002). Estes pesquisadores sugeriram ações benéficas de alimentos que contenham biofatores antioxidantes.

CHOUDHURY e JAGDALE (2002) observaram em estudo de toxicidade citogenética de cisplatina e interação com vitamina E que, em pequenas doses diminuía e em dose maior aumentaria lesões de espermatogônia a espermátócitos em camundongos.

LEONETTI et al. (2003) evidenciaram que o uso de α -tocoferol combinado à cisplatina diminuía os efeitos tóxicos dessa última sem alterar o efeito antitumoral.

Estudo experimental em que se utilizaram de ácido acetil salicílico (AAS) como decompositor de radicais livres produzidos por cisplatina foram efetuados por ULUBAS et al. (2003). Eles verificaram que AAS diminui os níveis de uréia e creatinina, reduz a necrose tubular, assim como aumenta as atividades de enzimas antioxidantes. No mesmo ano, BAEK et al. (2003) constataram que necrose induzida por cisplatina estava associada ao H_2O_2 e pode ser evitada por decompositores de peróxido de hidrogênio. No entanto, a apoptose estaria relacionada à formação de radicais hidroxila.

A peroxidação lipídica e nefrotoxicidade induzida por cisplatina não foram preveníveis com desferrioxamine em ratos. No que concerne a efeitos antioxidantes, KADIKOYLU et al. (2004) observaram maior atividade com vitamina C e E nesses animais.

O valor do estudo da administração oral de substâncias com propriedades antioxidantes foi evidenciado por PREMKUMAR et al. (2004). Eles encontraram atividade antimutagênica e antioxidante enzimática e não enzimática em camundongos ministrados com spirulina fusiformes e cisplatina.

3.3.6- Estrutura do testículo e espermatogênese

O testículo é um órgão de forma ovalada com funções exócrina e endócrina e usualmente envolvido pela túnica albugínea (Fig. 2). Esta é contínua com trabéculas de tecido conjuntivo, denominados septos que são convergentes para o interior do mediastino testicular (FRANÇA e RUSSELL, 1998). Apresenta dois compartimentos: o intertubular ou intertiscial e os túbulos seminíferos. No intertubular localizam-se vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células do tipo macrófagos, fibroblastos, mastócitos e células de Leydig (RUSSELL et al., 1990). Usualmente a célula de Leydig é, quanto à proporção volumétrica, o tipo celular mais abundante neste compartimento (GODINHO, 1999).

A maior parte do testículo é constituída pelo compartimento dos túbulos seminíferos. Estes se dividem em três partes: túbulo contorcido, sendo intermediária e muito desenvolvida; e duas periféricas menores e retas, as quais, conectam-se à rede testicular. Esta rede continua-se com os ductos eferentes que desembocam no ducto epididimário (ILIO e HESS, 1994).

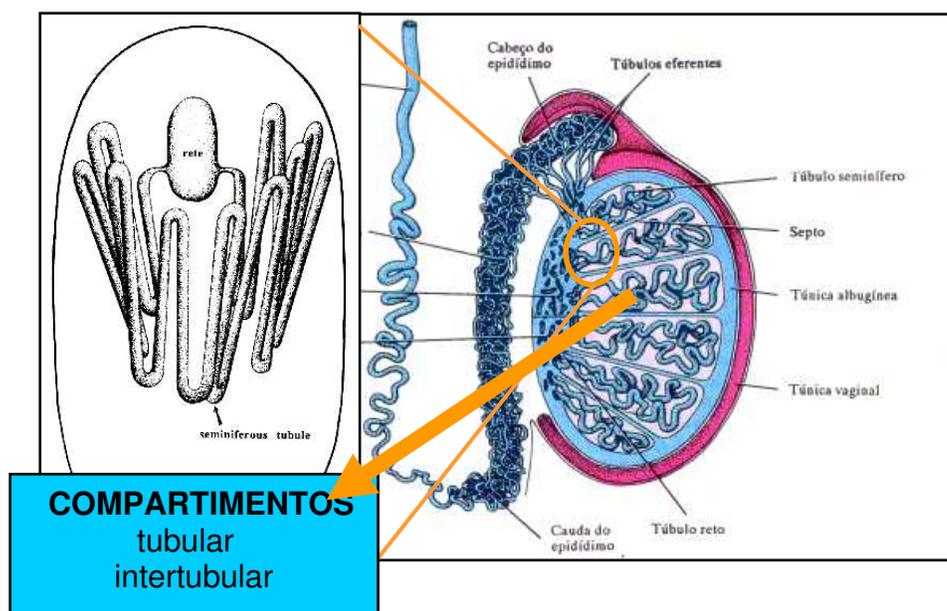


Figura 2- Desenho esquemático dos compartimentos testiculares: tubular e intertubular.

No rato e camundongo, aproximadamente 20-30 túbulos seminíferos estão presentes em cada testículo e usualmente entre 10 e 15 metros desses túbulos estão presentes por grama de testículo (FRANÇA e RUSSELL, 1998).

No que tange ao diâmetro tubular de mamíferos, estes variam de 180 a 350 µm. De maneira geral, os túbulos seminíferos são constituídos de túnica própria, epitélio seminífero e lume, não apresentando vascularização ou inervação. Externamente, o epitélio é revestido pela túnica própria constituída por células mióides ou peritubulares e elementos celulares (fibras colágenas e membrana basal), formando uma membrana limitante do túbulo seminífero (RUSSELL et al., 1990).

KARL e CAPEL (1998), em seus trabalhos, enfatizaram a contratilidade das células mióides, consideradas responsáveis pela movimentação de fluidos e propulsão dos espermatozóides através do lume.

Dois tipos celulares de origem embriológicas diferentes constituem o epitélio seminífero: as de Sertoli oriundas do epitélio celomático e as germinativas, procedentes do epiblasto adjacente ao mesoderma extra-embrionário (CAPEL, 2000).

As células de Sertoli, associadas às mióides, sintetizam a membrana basal que serve de suporte estrutural para as células germinativas e as próprias células de Sertoli, que se localizam no compartimento basal dos túbulos seminíferos (DYM, 1994). Os animais sexualmente maduros apresentam, em seu lume tubular, os espermatozóides e fluidos secretados pelas células de Sertoli (SETCHELL, 1991).

3.3.7- Espermatogênese

Trata-se de processo cíclico organizado que ocorre nos túbulos seminíferos, onde espermatogônias diplóides diferenciam-se no espermatozóides, células haplóides maduras.

É composto por associações celulares diferentes, denominadas estágios, sendo considerado um dos mais produtivos sistemas de auto-renovação, com duração aproximada de 30 a 80 dias em mamíferos (RUSSELL et al., 1990).

Utilizando considerações morfofuncionais, a espermatogênese pode ser dividida em três fases: proliferativa ou espermatogonial, em que as espermatogônias passam por rápidas e sucessivas divisões mitóticas; fase espermatocitogênica ou meiótica, ocorrendo a duplicação, recombinação e segregação do material genético dos espermatócitos; fase de diferenciação ou espermiogênica, em que células haplóides (espermátides), se transformam em células altamente especializadas e estruturalmente adequadas para atingir e fertilizar os oócitos (RUSSELL et al., 1990) (Fig.3).

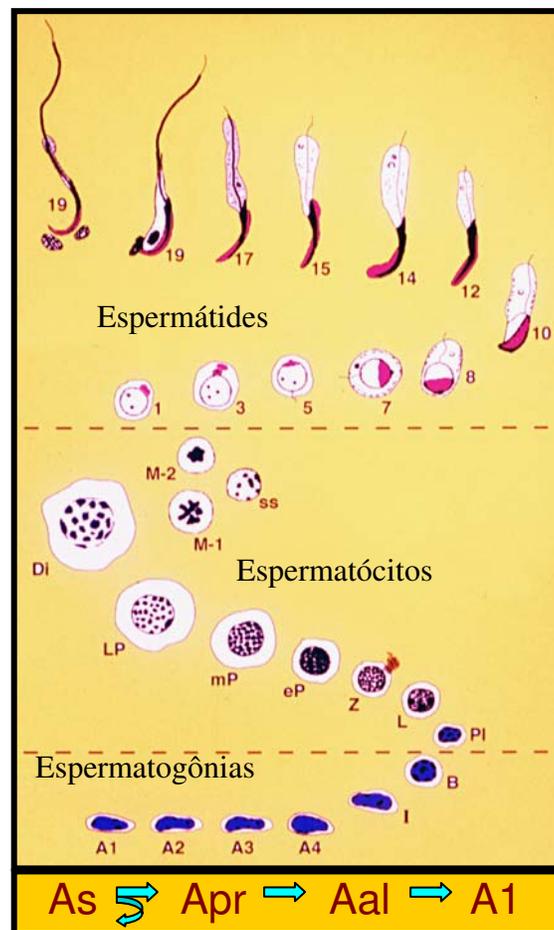


Figura 3- Desenho esquemático das fases da espermatogênese.

As células germinativas estão organizadas em associações celulares distintas denominadas estágios. A seqüência que ocorre entre o desaparecimento de uma determinada associação celular até seu reaparecimento constitui o ciclo do epitélio seminífero (LEBLOND e CLERMONT, 1952). Usualmente, para que o processo espermatogênico se complete, são necessários aproximadamente 4,5 ciclos desde a espermatogônia do tipo A até a liberação das espermátides no lume tubular (FRANÇA e RUSSELL, 1998).

Existem dois métodos básicos para a classificação dos estágios do ciclo do epitélio seminífero, métodos esses denominados de morfologia tubular e do sistema acrossômico por BERNDSTON (1977). Através do primeiro método, oito estágios do ciclo são sempre obtidos para todas as espécies. O segundo método amplamente empregado na classificação dos estágios e ainda um pouco mais refinado do que o anterior é o do sistema acrossômico que se baseia no desenvolvimento do acrossoma e na morfologia das espermátides. Por esse método, no rato são identificados 16 estágios. O estágio mais comumente utilizado para contagens celulares pelo método acrossômico é o VII; este caracteriza-se pela predominância das seguintes células no epitélio: células de Sertoli, espermatogônias do tipo A, espermátocitos primários nas fases de preleptóteno/leptóteno, espermátocitos primários em fase de paquíteno, espermátides arredondadas e espermátides alongadas próximas à borda do lume. O ângulo delimitado pelo acrossoma no núcleo da espermátide arredondada varia de 120 no início a 140⁰ no final deste estágio, ou seja, o acrossoma ocupa cerca de um quarto à metade do núcleo da espermátide.

De grande importância é a necessidade da interação das células germinativas com componentes somáticos testiculares, em especial, as células de Sertoli, Leydig e mióides para que o processo da espermatogênese ocorra de maneira eficiente e normal (FRANÇA e RUSSELL, 1998).

3.3.8- Espermatogênese: estresse oxidativo e antioxidantes

A divisão do processo contínuo da espermatogênese de ratos foi descrita inicialmente por LEBLOND e CLERMONT (1952). Estes autores descreveram 19 estágios diferentes, sendo que os primeiros 14 corresponderiam à extensão de um ciclo no epitélio seminífero.

SHARPE et al. (1988) constataram que após a destruição das células de Leydig com etano dimetano sulfonato em ratos e posterior reposição hormonal com testosterona, a espermatogênese e fertilidade eram mantidas. Esses resultados sugerem que outros produtos celulares produzidos pelas células de Leydig que não a testosterona, não são essenciais a fertilidade e a espermatogênese.

A depleção de células germinativas em ratos com ácido metoxiacético induziu a perda de paquíteno e espermatócitos (RATNASOORIYA e SHARPE, 1989), entretanto, a maior fonte da espermatogênese é mantida.

Em se tratando da participação de antioxidantes na motilidade espermática, WU et al. (1973) constataram em ratos submetidos à privação de selênio que apenas esse preveniu a disfunção da motilidade espermática, não sendo observado com outros antioxidantes.

Níveis elevados da relação do superóxido de dismutase e catalase mais glutathionperoxidase no testículo em relação ao fígado de ratos foram verificados por PELTOLA et al. (1992). Esses autores sugeriram por esse motivo, a maior vulnerabilidade dos efeitos de espécies reativas tóxicas de oxigênio do testículo em relação ao fígado.

Estudo experimental utilizando hibridização no desenvolvimento testicular foi conduzido por JOW et al. (1993). Segundo estes, o acúmulo de RNA de superóxido de dismutase no túbulo seminífero é importante e específico de cada estágio da espermatogênese.

Diversos estudos demonstraram ações enzimáticas antioxidantes em espermatozoides por superóxido de dismutase e glutathion peroxidase. No entanto, a atividade da catalase foi mais atuante no plasma seminal. Segundo ALKAN et al. (1997), observaram em pacientes com infertilidade idiopática diminuição da atividade antioxidante plasmática e aumento da produção de espécies reativas tóxicas de oxigênio.

KOLETTIS et al. (1999) observaram aumento do estresse oxidativo seminal em pacientes submetidos a reversão de vasectomia. Esses autores propuseram que o escore da capacidade total de antioxidantes associado a E.R.T.O. poderia prever a infertilidade após reversão.

A criopreservação de espermatozóide prévio ao tratamento permanece o padrão para a manutenção da fertilidade em pacientes com câncer. No entanto, aproximadamente 50% dos pacientes tratados com cisplatina em doses cumulativas altas encontra-se azoospermicos. A extração de esperma testicular após (CHAN et al., 2001) e prévio a poliquimioterapia têm obtido bons resultados (SCHRADER et al., 2002).

AITKEN e SAWYER (2004) em seu trabalho de revisão sobre a diminuição da espermatogênese em humanos, salientaram o papel do estresse oxidativo, oriundo da excessiva produção de E.R.T.O. e alterações dos mecanismos de defesa antioxidante. Esses autores atribuem a perda da função espermática devido peroxidação lipídica de membranas plasmáticas.

GHOSH et al. (2002), em trabalho utilizando ciclofosfamida em ratos, constataram através da quantificação da espermatogênese e avaliação do estresse oxidativo que a administração de gonadotrofina coriônica protege o testículo desse estresse e da atividade esteróide, assim como a espermatogênese no estágio VII aos níveis do grupo Controle.

MRUK et al. (2002), em seus trabalhos de revisão clínica sobre a fertilidade, salientaram o papel dos antioxidantes e a necessidade de estudos futuros, inclusive com dosagens de E.R.T.O.

Diversas linhas de pesquisa a respeito da torção testicular e sua associação com estresse oxidativo, foram e continuam sendo conduzidas na tentativa de elucidar as modificações ocorridas. Nesse contexto, sobressai o trabalho de OZKAN et al. (2004). Estes verificaram que a terapêutica prévia com aspartato de zinco reduzia as lesões induzidas por torção, através de suas ações antioxidantes.

Vários estudos experimentais têm sido realizados na tentativa de elucidar os mecanismos do estresse oxidativo e espermatogênese. Segundo SÖNMEZ et al. (2005), a suplementação com ácido ascórbico melhora os padrões reprodutivos em ratos e associa-se a altas taxas de fertilidade.

Outra pesquisa inovadora e de grande repercussão é a de ATESSAHIM et al. (2005) que, utilizando cisplatina e licopeno em ratos, observaram efeito protetor na espermiotoxicidade da primeira, principalmente quando o antioxidante foi administrado posterior ao uso do quimioterápico.

Importante passo no que concerne às investigações de estresse oxidativo é a fertilização assistida, foi o trabalho de GRECO et al. (2005), em que utilizou vitaminas E e C em pacientes submetidos a I.C.S.I. (intracytoplasmatic Sperm Injection) e verificaram melhores resultados naqueles com lesões de DNA espermático.

Revisão bem elaborada sobre lesões e recuperações da espermatogênese após terapêutica oncológica foi publicada por HOWELL e SHALET (2005). Esses autores enfatizam que quimioterapia à base de cisplatina para câncer testicular induz à azoospermia temporária na maioria, com recuperação da espermatogênese em aproximadamente 50% dos casos após 2 anos e 80% em 5 anos.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Animais de experimentação

Na realização deste estudo obedeceu-se às orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e a Lei Federal 6.638*.

Foram utilizados 24 ratos machos adultos da raça Wistar (*Rattus norvegicus berkenhout*), obtidos do Biotério da Universidade Estadual de Campinas, com 20 semanas de idade e peso corporal médio de 370,5 g, variando de 320 a 430 g. Os ratos foram transportados com 15 semanas de vida ao Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Centro de Estudos da Espermatogênese em Veterinária), onde foram aclimatados nas semanas seguintes e mantidos em gaiolas, quatro a quatro, recebendo ração balanceada e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos à temperatura e luz ambientes, obedecendo ao ciclo diurno-noturno.

4.2- Realização do experimento

4.2.1- Preparo Anestésico

O procedimento anestésico constou de duas fases: Na primeira fase, ministrou-se tiopental sódico por via intraperitoneal, na dose de 4 mg para cada 100 g de massa corporal, como preconizado por WHITE e FIELD (1987). Na segunda fase, já hipnotizados, após o posicionamento do animal, ministrou-se lidocaína a 2% sob a pele e tecido subcutâneo da região inguinal.

4.2.2- Posicionamento do Animal

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre mesa de madeira, na qual fitas elásticas fixavam-nos pelos membros. A tricotomia da região inguinal direita foi realizada por depilação dos pelos regionais. A antisepsia foi feita pela aplicação de polivinil pirrolidona-iodo a 10% e colocação de campo fenestrado estéril sobre a região inguinal.

*Anexo.

4.2.3- Tratamento e Procedimento Cirúrgico

Um total de 24 ratos foram tratados e operados, e divididos aleatoriamente em três grupos, cada um composto por 8 animais. Todos os ratos foram pesados antes do tratamento e ato cirúrgico.

O instrumental cirúrgico estéril utilizado foi o empregado habitualmente em microcirurgia e constou de: porta agulha, tesoura, tesoura de Íris e pinças. Uma lupa com magnitude de três vezes e, por vezes, microscópio serviram como instrumento auxiliar na dissecação da veia femoral.

Os ratos de todos os grupos foram submetidos, uma hora antes do tratamento, à injeção intraperitoneal de 20 ml de solução salina a 0,9% no sentido de hidratar os animais devido a náuseas e vômitos induzidos pela cisplatina (HUANG et al., 1990; POGACH et al., 1989).

Os animais do Grupo I (Controle) foram submetidos à abertura da região inguinal direita, por incisão oblíqua. Efetuou-se a abertura por planos: pele, subcutânea, divulsão dos tecidos da região femoral. A seguir, realizou-se a identificação e dissecação dos vasos femorais com isolamento da veia femoral; puncionou-se a veia femoral direita com agulha de 20 x 6,25 gauge e injetou-se, por meio de seringa de 3 ml, 2 ml de SF a 0,9%, após a qual a pele foi fechada com fio de algodão 000 intradérmico, com agulha cortante, em sutura separada (Fig. 4). A estes ratos injetou-se, por seringa de 3 ml e agulha 25x7,22 gauge, 3 ml de solução salina a 0,9% intraperitoneal.

Os animais do Grupo II foram submetidos a abordagem da região inguinal, à semelhança do realizado no Grupo I. A seguir, injetou-se, intraperitonealmente, por seringa e agulha semelhante à utilizada no Grupo I, cisplatina na dose única de 4 mg/kg de peso corporal, diluído em solução salina a 0,9%. (FREIREICH et al., 1966; KOCIBA et al., 1971 e KINKEAD et al., 1992)

Os animais do Grupo III foram submetidos a abordagem da região inguinal, à semelhança do realizado nos Grupos I e II, entretanto, injetou-se, por meio de seringa de 3 ml, 1 ml de superóxido de dismutase (2,5 mg/ml) e 1 ml de catalase (2,5 mg/ml) diluídos

em solução salina , de modo que a dose fosse constante (PRILLAMAN et al., 1997). Posteriormente, semelhante ao procedimento utilizado no Grupo II, injetou-se, intraperitonealmente, cisplatina na dose de 4 mg/kg de peso corporal, diluída em solução salina a 0,9%, totalizando 3 ml.

Efetuiu-se a limpeza da ferida operatória com polivinil pirrolidona-iodo a 10% e os animais foram colocados, em decúbito dorsal e proclive, em suas gaiolas, até plena recuperação anestésica. Ração e água foram fornecidas logo após o tratamento.

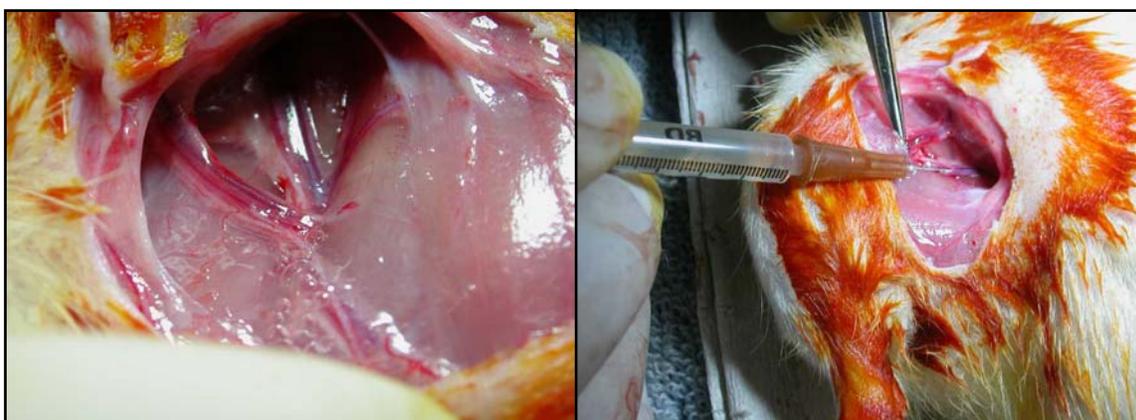


Figura 4- Abordagem da região inguinal com dissecção, identificação e injeção de SF a 0,9% através da veia femoral.

4.3- Duração do experimento

Com base no trabalho de CLERMONT (1972) e nas observações de POGACH et al. (1989), HUANG et al. (1990) e KINKEAD et al. (1992), foi determinado o período de 13 dias, ou seja, um ciclo da espermatogênese, para o sacrifício dos animais após injeção intraperitoneal de soro fisiológico ou de cisplatina. Período este considerado adequado em estudo de toxicologia testicular.

4.4- Sacrifício dos animais

Os animais foram pesados e sacrificados entre 8:00 e 10:00h, utilizando-se tiopental na dose de 4 mg/kg de peso corporal como hipnótico. Em seguida, abriu-se o abdome e o tórax pela laparotomia mediana anterior ampliada e toracotomia mediana (esternal), observando-se cuidadosamente todas as vísceras.

Em todos os animais de cada grupo realizou-se a cateterização do ventrículo com cateter intravenoso número 22 gauge e efetuou-se a perfusão com 100-120 ml de solução salina a 0,9% (NaCl 0,9%), contendo 1% de nitrato sódico e heparina sódica na dose de 140 ui/Kg de peso, seguido de fixação com 20-30 ml de glutaraldeído a 2,5%; 0,2 M de tampão fosfato em pH 7,4, e posterior exeresse dos testículos (FAWCETT et al., 1970 e RUSSELL et al., 1990) (Fig. 5 e 6).



Figura 5- Posicionamento do animal após o sacrifício sob magnificação submetido à toracolaparotomia.

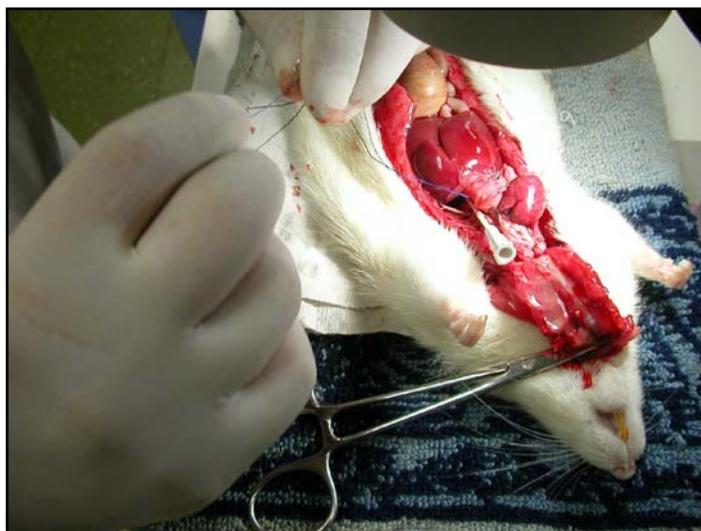


Figura 6- Após dissecção do ventrículo esquerdo, realiza-se a cateterização deste para a perfusão.

4.5- Preparo do material coletado

Dos testículos, congelou-se alternadamente um, a menos 18 °C, para posterior processamento e estimativa da reserva espermática testicular e, no outro, realizou-se processamento histológico (Fig. 7).



Figura7- Orquiectomia unilateral prévia à perfusão para posterior estimativa da reserva testicular e epididimária.

Os testículos e epidídimos foram dissecados e pesados em balança eletrônica, utilizando-se o valor da média dos órgãos direito e esquerdo para cada animal. Posteriormente, obteve-se o índice gonadossomático utilizando a fórmula seguinte (RUSSELL et al; 1990):

$$\text{Índice gonadossomático (\%)} = \frac{\text{testículo direito + esquerdo (g)} \times 100}{\text{Peso corporal (g)}}$$

4.6- Processamento histológico

Amostras de parênquima testicular foram colhidas de várias regiões do testículo. Os fragmentos foram fixados por imersão em glutaraldeído a 4% e lavados em solução tampão fosfato a 0,2 M, a 4 °C. Subseqüentemente, efetuou-se a desidratação em concentrações crescentes de etanol, infiltração e inclusão em glicol metacrilato (Tecnovit), de acordo com POGACH et al. (1989) e RUSSELL et al. (1990). Após a inclusão dos blocos foram obtidas secções de 3 µm de espessura, montadas em lâminas histológicas e coradas pelo ácido periódico de Schiff e hematoxilina e eosina, conforme técnica de rotina (Figs. 8, 9, 10, 11 e 12).

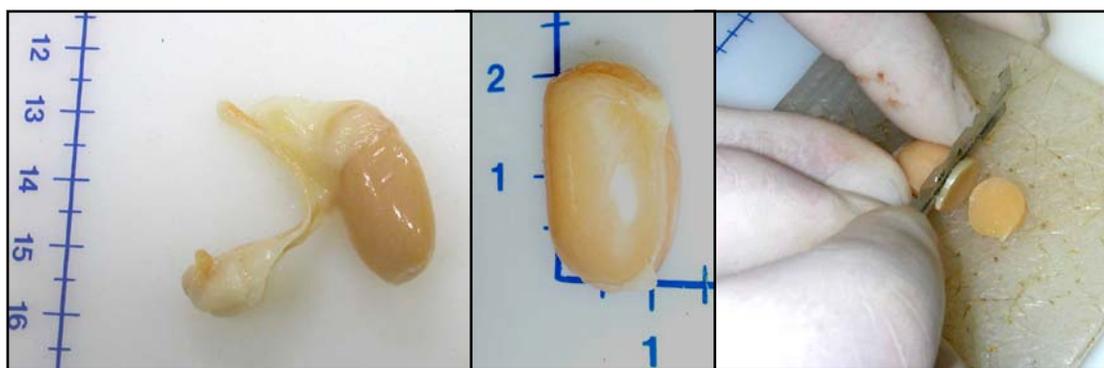


Figura 8- Imagens de testículo, epidídimo e glândulas anexas após a perfusão, dissecção e secção testicular.

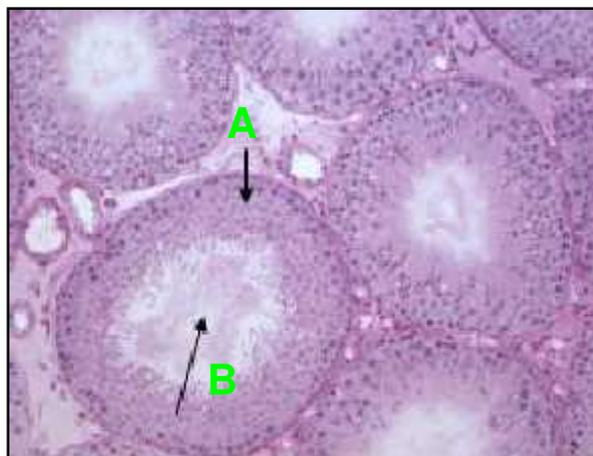


Figura 9- Aspecto histológico de testículo de animal do Grupo IIIa1 (PAS, 27x). Ênfase aos túbulos seminíferos. Observa-se setas: **A-** Epitélio germinativo e **B-** Lume com espermátides alongadas.

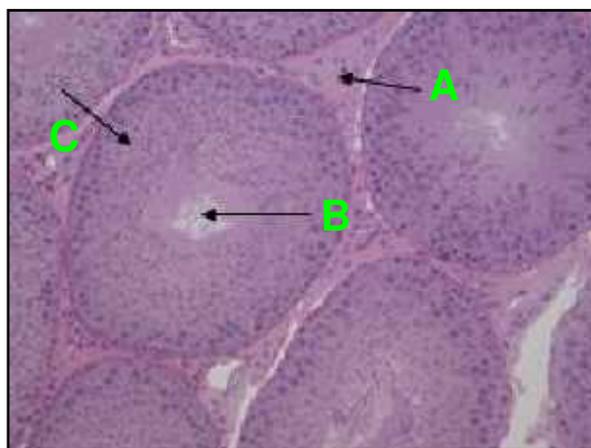


Figura 10- Corte histológico do testículo de animal do Grupo IIa6 (PAS, 27x). Observa-se setas: **A-** Espaço intertubular; **B-** Lume do túbulo seminífero e **C-** Epitélio germinativo.

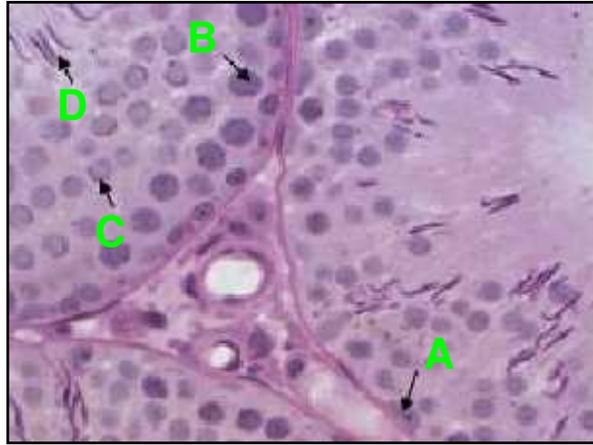


Figura 11- Aspecto histológico de túbulos seminíferos de testículo de animal do Grupo IIIa4 (PAS, 108x). Constata-se setas: **A-** Células de Sertoli; **B-** Espermatócito primário em paquíteno; **C-** Espermátide arredondada e **D-** Espermátide alongada.

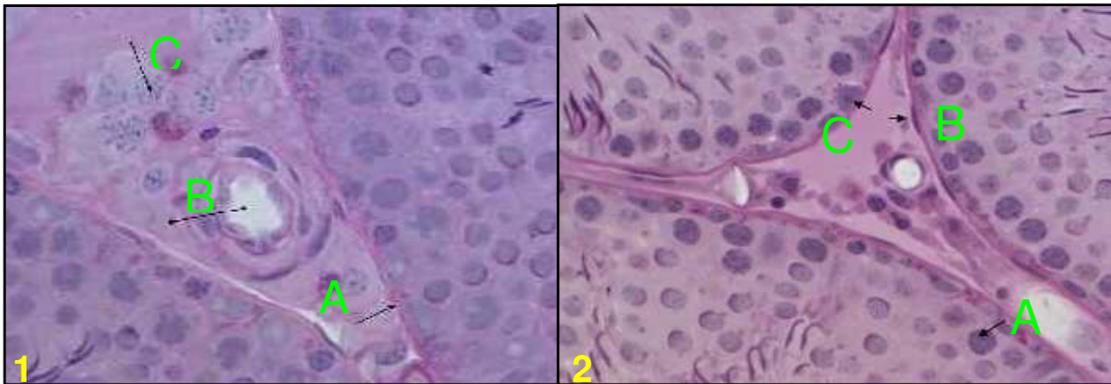


Figura 12- 1- Corte histológico com ênfase no espaço intertubular do testículo de animal do Grupo IIa1 (PAS, 108x). Observa-se setas: **A-** Túnica própria, **B-** Vaso e **C-** Núcleos de células Leydig.

2- Corte histológico do testículo de animal do Grupo IIIa1 (PAS, 108x). Observa-se setas: **A-** Espermatócito em paquíteno, **B-** Célula mióide e **C-** Célula de Sertoli.

4.7- Análise histológica quantitativa dos testículos

4.7.1- Proporções volumétricas dos componentes do parênquima testicular

Utilizou-se o volume percentual de cada elemento presente no parênquima do testículo, determinadas pelo método estereométrico (morfométrico), segundo ELIAS et al. (1971). Para isto, empregou-se ocular integradora Zeiss Kpl-8x, com graticula de 410 pontos equidistantes, acoplada a objetiva de 40 e 100x. Foram computados, para cada testículo, 15 campos, totalizando 6.615 pontos. Estimou-se o volume percentual dos seguintes elementos: (a) estroma, compreendendo células e fibras do conjuntivo (b) núcleos células de Leydig; (c) túnica própria dos túbulos seminíferos; (d) epitélio seminífero (núcleos e citoplasma de células espermatogênicas) e (e) lume tubular (Fig. 13).

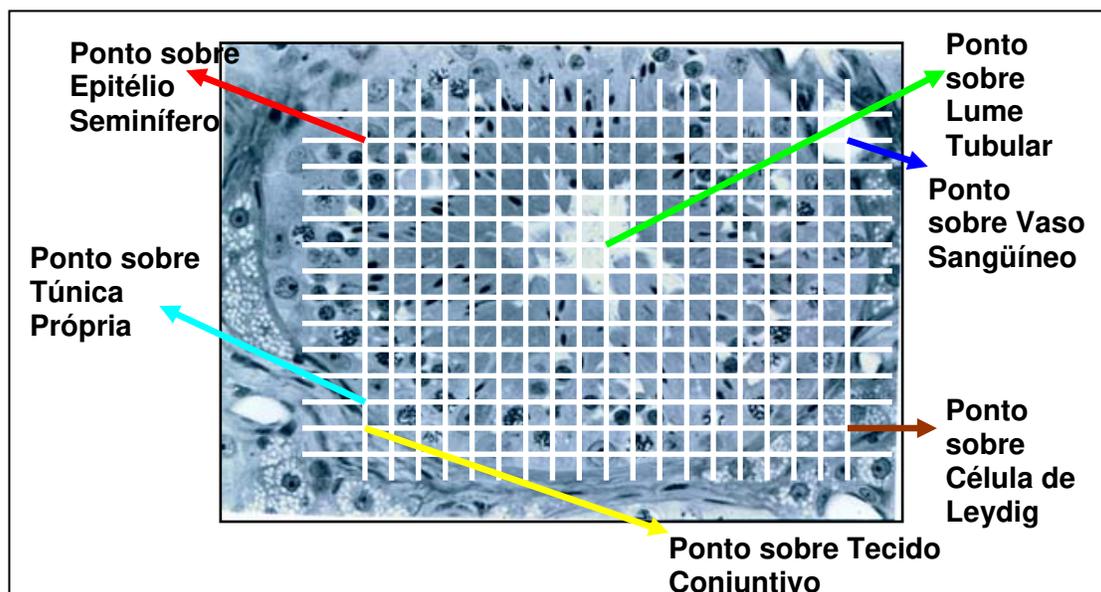


Figura 13- Esquemática da morfometria testicular com retículo de pontos para estimativa da proporção volumétrica.

4.7.2- Diâmetro dos túbulos seminíferos:

Mediu-se esse diâmetro por meio de 100 secções transversais de túbulo, escolhidas ao acaso e apresentando contorno o mais circular possível, em cada testículo. Considerou-se sempre, em cada secção transversal, seu menor diâmetro, conforme recomendado por BERNDTSON et al. (1989). As medidas foram feitas com auxílio de ocular micrométrica Olympus WF 10x e objetiva de 40x (Fig. 14).

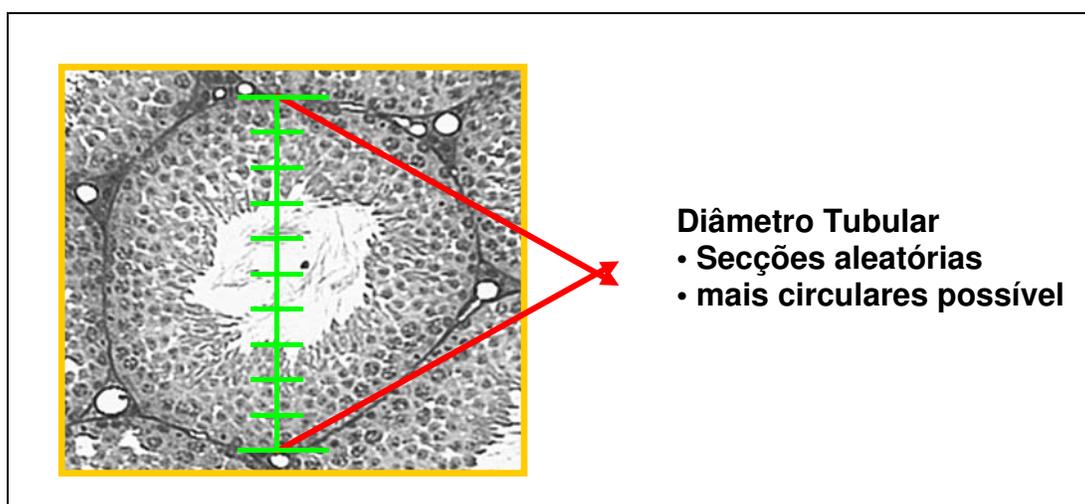


Figura 14- Esquemática da mensuração do diâmetro do túbulo seminífero em corte transversal.

4.7.3- Diâmetro nuclear e nucleolar das células do epitélio do túbulo seminífero

Este foi estimado pela contagem de núcleos de células em 10 secções transversais de túbulo no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero, de acordo com LEBLOND e CLERMONT (1952), RUSSEL e CLERMONT (1977). O diâmetro nuclear médio (DM) representa a média das medidas dos diâmetros de 10 núcleos no estágio VII (baseado no sistema acrossômico) do ciclo do epitélio seminífero, por testículo. Foram mensurados os seguintes tipos celulares: espermatogônias A, espermatócitos primários jovens em préleptóteno, espermatócitos primários

velhos em paquíteno, espermatídes arredondadas e, células de Sertoli. Nas células de Sertoli, devido à conformação irregular de seu núcleo, a correção foi feita utilizando-se o diâmetro nucleolar.

Esses diâmetros foram medidos com auxílio de régua micrométrica Olympus, adaptada a uma das oculares de 10X e acoplada à objetiva de 100X, propiciando aumento final de 1000X.

4.7.4- População celular dos túbulos seminíferos

Esta população foi estimada pela contagem de núcleos de células em 10 secções transversais de túbulo no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero para cada animal, de acordo com LEBLOND e CLERMONT (1952) e RUSSELL e CLERMONT (1977). Foram contados os seguintes tipos celulares: espermatogônias A, espermatócitos primários jovens em préleptóteno, espermatócitos primários em paquíteno, espermatídes arredondadas, células de Sertoli. Estas contagens brutas representam núcleos inteiros ou fragmentos de núcleos sendo o número real de núcleos inflacionados pela presença destes fragmentos. Assim, com a finalidade de corrigir essas distorções devidas à variação no diâmetro nuclear, estas contagens foram corrigidas para contagens reais utilizando-se a seguinte fórmula de Abercrombie (1946) modificada por AMANN et al. (1962):

$$\text{Número corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{espessura do corte}}{\text{espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{\text{DM}}{2}\right)^2 - \left(\frac{\text{DM}}{4}\right)^2}}$$

Esta fórmula é aplicável apenas a estruturas esféricas ou ovais, onde “DM” significa diâmetro nuclear ou nucleolar médio. Como os núcleos das células de Sertoli possuem conformação irregular, a correção foi feita utilizando-se o diâmetro nucleolar que é ovóide.

As contagens obtidas foram realizadas em aumento de 1000X.

4.7.5- Razões entre células germinativas e células de Sertoli (Índices de células de Sertoli (ICS))

Com o objetivo de se estimar a eficiência do processo espermatogênico e da célula de Sertoli, foi calculada a razão entre os números corrigidos de espermátides arredondadas, espermatócitos primários em paquíteno e em preleptóteno/leptóteno, espermatogônias com o número de células de Sertoli (RUSSELL et al., 1990; FRANÇA e RUSSELL, 1998). Estes índices de células de Sertoli se baseiam em dois princípios: (a) o número de células de Sertoli mantém-se estável no animal adulto e (b) as células de Sertoli são extremamente resistentes a tratamentos drásticos afetando os testículos. As vantagens desses índices incluem a eliminação da retração tecidual como um agente de interferência no cálculo dos números celulares e também a correção de possíveis alterações nas próprias dimensões tubulares, sejam naturais ou induzidas pelo tratamento.

4.8- Estimativa das reservas espermática testicular e epididimária

Estimou-se pela contagem de espermátides alongadas e espermatozóides em homogeneizados diluídos do parênquima testicular e epididimário, conforme ROBB et al. (1978) e CASTRO e CARDOSO (2001). Realizou-se a homogeneização em liquidificador comercial, utilizando-se como diluidor a solução S.T.M. (Salina + Triton X-100 + Mertiolate) e a contagem foi efetuada em câmaras hemocitométricas do tipo Neubauer.

4.9- Leitura das lâminas

As lâminas foram analisadas globalmente por dois professores do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Antonio Carlos S. Castro e Jane M. Q. Alves). A leitura foi concomitante e houve concordância diagnóstica entre os dois que desconheciam o grupo do material estudado.

A análise morfométrica foi realizada com a utilização de microscópio Olympus BX-40, com aumentos finais de 100, 400 e 1000 vezes.

4.10- Análise estatística

Todos os parâmetros abordados foram analisados pelo pacote estatístico SigmaStat (Jandel Scientific, 1995, CA, USA), com ênfase em análise de variância e teste múltiplo de Kruskal-Wallis. Em todos os testes, fixou-se em 0,05 ou 5% (alfa menor ou igual a 0,05) o nível para rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se os valores de significância estatística.

5- RESULTADOS

No que se refere a análise dos pesos, observou-se redução significativa nos animais do Grupo II e III em relação aos do Grupo I ($p < 0,05$) (Tabela 1).

A média dos pesos testiculares (média \pm desvio padrão [$\bar{x} \pm dp$]) dos animais utilizados na análise histológica foi menor nos Grupos III e II em relação ao Controle, no entanto, sem diferença estatística em relação ao Grupo I (Tabela 1).

Tabela 1- Peso corporal, testicular e índice gonadossomático dos animais sacrificados ($\bar{x} \pm dp$)

| Parâmetro | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|-------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Peso Corporal (g) | 398,8 \pm 36,2a | 351,8 \pm 32,8b | 346,1 \pm 25,2b |
| Peso Testicular (g) (p/ Histologia) | 1,58 \pm 0,11 | 1,49 \pm 0,15 | 1,39 \pm 0,18 |
| Índice gonadossomático (D + E) (%) | 0,84 \pm 0,09 | 0,86 \pm 0,05 | 0,84 \pm 0,10 |

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença entre grupos ($P < 0,05$)

Em relação ao índice gonadossomático, não se verificaram diferenças entre os grupos avaliados (Tabela 1).

Não se constataram alterações nas médias ponderais no complexo da próstata ventral, da vesícula seminal e glândula coaguladora dos animais entre os grupos estudados (Tabela 2).

Tabela 2- Pesos* do complexo próstata ventral (PV), vesícula seminal e glândula coaguladora (VSGC) de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3). ($\bar{x} \pm dp$)

| Animal | Grupo I | | Grupo II | | Grupo III | |
|------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | PV | VSGC | PV | VSGC | PV | VSGC |
| A1 | 0,32 | 0,96 | 0,35 | 1,89 | 0,33 | 0,94 |
| A2 | 0,32 | 0,93 | 0,38 | 1,36 | 0,44 | 1,13 |
| A3 | 0,42 | 0,90 | 0,33 | 0,91 | 0,46 | 1,20 |
| A4 | 0,40 | 0,96 | 0,50 | 1,47 | 0,52 | 1,34 |
| A5 | 0,27 | 0,87 | 0,37 | 1,33 | 0,51 | 1,05 |
| A6 | 0,38 | 0,87 | 0,34 | 1,06 | 0,51 | 1,77 |
| A7 | 0,56 | 1,31 | 0,35 | 1,41 | 0,30 | 0,78 |
| A8 | 0,58 | 1,40 | 0,54 | 1,03 | 0,22 | 0,91 |
| $\bar{x} \pm dp$ | 0,41±0,11 | 1,03±0,21 | 0,39±0,08 | 1,31±0,31 | 0,41±0,12 | 1,14±0,31 |

* Valores em gramas

Em relação aos componentes testiculares, não foram detectadas alterações no lume dos túbulos seminíferos entre os grupos de estudo (Tabela 3).

Tabela 3- Proporção volumétrica (%) do lume dos túbulos seminíferos dos testículos de ratos Wistar adultos* controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)

| Animal | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|------------------|-----------|------------|------------|
| A1 | 5,5 | 9,1 | 13,6 |
| A2 | 9,2 | 9,5 | 12,8 |
| A3 | 8,5 | 9,8 | 9,2 |
| A4 | 8,6 | 9,4 | 11,5 |
| A5 | 8,0 | 12,2 | 10,0 |
| A6 | 10,7 | 11,1 | 8,8 |
| A7 | 11,4 | 13,5 | 9,2 |
| A8 | 12,3 | 11,0 | 10,9 |
| $\bar{x} \pm dp$ | 9,2 ± 2,1 | 10,7 ± 1,5 | 10,8 ± 1,8 |

* Valores referentes à $\bar{x} \pm dp$

A proporção volumétrica do epitélio seminífero foi menor no Grupo II em relação ao Grupo I ($p < 0,05$). No entanto, o estudo estatístico não detectou diferenças significantes entre os Grupos I e III (Tabela 4).

Tabela 4- Proporção volumétrica (%) do epitélio seminífero dos testículos de ratos Wistar adultos* controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)

| Animal | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| A1 | 73,3 | 72,1 | 69,7 |
| A2 | 72,6 | 68,0 | 71,4 |
| A3 | 72,2 | 67,8 | 69,7 |
| A4 | 74,2 | 68,8 | 70,9 |
| A5 | 71,3 | 69,7 | 70,2 |
| A6 | 70,5 | 68,8 | 66,9 |
| A7 | 72,0 | 65,7 | 75,1 |
| A8 | 71,2 | 69,9 | 72,4 |
| $\bar{x} \pm dp$ | $72,1 \pm 1,2a$ | $68,8 \pm 1,8a$ | $70,7 \pm 2,3$ |

*Valores referentes à $\bar{x} \pm dp$; **a**, na mesma linha indica diferença entre os grupos G1 e G2 ($p < 0,05$)

Na Tabela 5 são apresentadas os valores das proporções volumétricas da túnica própria. Não houve diferença entre o Grupo Controle (G1) e os Grupos II e III. Entretanto, verificou-se menor ($p < 0,05$) proporção no Grupo II em relação ao Grupo III.

Tabela 5- Proporção volumétrica (%) da túnica própria dos testículos de ratos Wistar adultos* controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)

| Animal | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|------------------|----------------|----------------------------|------------------|
| A1 | 4,3 | 5,2 | 4,7 |
| A2 | 4,0 | 3,3 | 4,7 |
| A3 | 4,2 | 4,4 | 5,3 |
| A4 | 4,9 | 3,9 | 4,9 |
| A5 | 5,0 | 3,3 | 5,4 |
| A6 | 4,3 | 4,4 | 5,4 |
| A7 | 4,8 | 4,0 | 4,6 |
| A8 | 4,2 | 4,8 | 4,4 |
| $\bar{x} \pm dp$ | 4,4 \pm 0,3 | 4,1 \pm 0,6 ^a | 4,9 \pm 0,3a |

*Valores referentes à $\bar{x} \pm dp$; **a**, na mesma linha indica diferença entre os grupos G2 e G3 (P<0,05)

Nos animais do Grupo II, o estroma foi maior quando comparados os animais do Grupo I e III (p < 0,05) (Tabela 6).

Tabela 6- Proporção volumétrica (%) do estroma* dos testículos de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)

| Animal | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|------------------|-----------------|------------------------------|------------------|
| A1 | 16,1 | 13,1 | 11,7 |
| A2 | 13,7 | 18,9 | 10,7 |
| A3 | 14,6 | 17,7 | 15,4 |
| A4 | 11,6 | 17,5 | 12,3 |
| A5 | 15,2 | 14,3 | 14,1 |
| A6 | 14,0 | 15,3 | 18,5 |
| A7 | 11,3 | 16,4 | 10,9 |
| A8 | 11,9 | 14,0 | 12,1 |
| $\bar{x} \pm dp$ | 13,5 \pm 1,7b | 15,9 \pm 2,0 ^{ab} | 13,2 \pm 2,6a |

*Estroma inclui vasos e conjuntivo; **a**, na mesma linha indica diferença entre os grupos G2 e G3 (p < 0,05); **b**, na mesma linha indica diferença entre grupos G1 e G2 (p < 0,05).

Observou-se nos animais do Grupo I nitidamente maiores ($p < 0,05$) proporções de núcleos de células de Leydig, quando comparados aos animais do Grupo II e III (Tabela 7).

Tabela 7- Proporção volumétrica (%) dos núcleos das células de Leydig dos testículos de ratos Wistar adultos* controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)

| Animal | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| A1 | 0,8 | 0,5 | 0,3 |
| A2 | 0,5 | 0,3 | 0,4 |
| A3 | 0,5 | 0,3 | 0,4 |
| A4 | 0,7 | 0,4 | 0,4 |
| A5 | 0,5 | 0,5 | 0,3 |
| A6 | 0,5 | 0,4 | 0,4 |
| A7 | 0,5 | 0,4 | 0,2 |
| A8 | 0,4 | 0,3 | 0,2 |
| $\bar{x} \pm dp$ | $0,55 \pm 0,13ab$ | $0,38 \pm 0,08a$ | $0,32 \pm 0,08b$ |

*Valores referentes à $\bar{x} \pm dp$; **a**, na mesma linha indica diferença entre os grupos G1 e G2 ($p < 0,05$); **b**, na mesma linha indica diferença entre grupos G1 e G3 ($p < 0,05$).

Na Tabela 8 encontram-se as médias de peso testicular e epididimário utilizadas na estimativa das reservas destes respectivos órgãos. Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os grupos para estes parâmetros.

Tabela 8- Pesos* ($\bar{x} \pm dp$) testicular (T) e epididimário (E) utilizados nos cálculos das respectivas reservas em ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)

| Animal | Grupo I | | Grupo II | | Grupo III | |
|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | T | E | T | E | T | E |
| A1 | 1,35 | 0,70 | 1,65 | 1,25 | 1,50 | 1,15 |
| A2 | 1,65 | 0,95 | 1,60 | 1,55 | 1,50 | 1,05 |
| A3 | 1,70 | 1,05 | 1,50 | 1,35 | 1,50 | 1,00 |
| A4 | 1,80 | 1,05 | 1,65 | 1,10 | 1,60 | 1,40 |
| A5 | 1,70 | 1,00 | 1,60 | 1,00 | 1,30 | 1,05 |
| A6 | 1,45 | 1,40 | 1,60 | 1,10 | 1,50 | 1,15 |
| A7 | 1,70 | 1,20 | 1,70 | 1,20 | 1,70 | 1,00 |
| A8 | 1,60 | 1,25 | 1,65 | 1,40 | 1,45 | 1,60 |
| $\bar{x} \pm dp$ | 1,62 \pm 0,15 | 1,08 \pm 0,21 | 1,62 \pm 0,06 | 1,24 \pm 0,18 | 1,51 \pm 0,12 | 1,18 \pm 0,21 |

*Valores em gramas

Os valores das reservas espermáticas testicular total (RG total) e por grama (RG/g) de parênquima foram semelhantes ($p > 0,05$) entre os três grupos analisados (Tabela 9).

Tabela 9- Reserva ($\bar{x} \pm dp$) total e por grama de parênquima testicular de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)

| Animal | Grupo I | | Grupo II | | Grupo III | |
|------------------|----------------------------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| | RG total (x 10 ⁶) | RG/g (x 10 ⁶) | RG total (x 10 ⁶) | RG/g (x 10 ⁶) | RG total (x 10 ⁶) | RG/g (x 10 ⁶) |
| A1 | 153,9 | 171,0 | 136,5 | 96,1 | 201,5 | 148,2 |
| A2 | 121,7 | 86,9 | 166,4 | 125,1 | 206,7 | 156,6 |
| A3 | 102,3 | 81,2 | 218,4 | 173,3 | 187,7 | 150,2 |
| A4 | 154,2 | 107,8 | 183,5 | 127,4 | 186,7 | 127,8 |
| A5 | 121,2 | 87,8 | 211,9 | 152,4 | 156,0 | 138,1 |
| A6 | 134,7 | 117,1 | 197,1 | 129,6 | 365,3 | 278,8 |
| A7 | 197,1 | 132,3 | 175,5 | 111,1 | 165,9 | 114,5 |
| A8 | 198,9 | 141,1 | 208,8 | 145,0 | 144,3 | 106,8 |
| $\bar{x} \pm dp$ | 148,0 \pm 35,4 | 115,7 \pm 31,3 | 187,3 \pm 27,5 | 132,5 \pm 24,2 | 201,8 \pm 69,6 | 152,6 \pm 53,9 |

Os valores das reservas espermáticas epididimárias total ou por grama não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos (Tabela 10).

Tabela 10- Reserva ($\bar{x} \pm dp$) total (RE) e por grama (RE/g) de epidídimo de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)

| Animal | Grupo I | | Grupo II | | Grupo III | |
|------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| | RE (x 10 ⁶) | RE/g (x 10 ⁶) | RE total (x 10 ⁶) | RE/g (x 10 ⁶) | RE total (x 10 ⁶) | RE/g (x 10 ⁶) |
| A1 | 205,4 | 622,4 | 361,4 | 657,1 | 301,6 | 548,4 |
| A2 | 247,0 | 494,0 | 305,5 | 535,9 | 176,8 | 327,4 |
| A3 | 178,1 | 539,7 | 250,9 | 512,0 | 219,7 | 422,5 |
| A4 | 284,7 | 632,6 | 278,2 | 618,2 | 173,7 | 321,6 |
| A5 | 140,1 | 326,5 | 205,4 | 456,4 | 262,6 | 709,7 |
| A6 | 22,3 | 570,0 | 227,5 | 413,6 | 230,1 | 403,7 |
| A7 | 154,7 | 309,4 | 98,8 | 197,6 | 197,6 | 387,5 |
| A8 | 336,7 | 647,5 | 400,4 | 800,8 | 191,1 | 398,1 |
| $\bar{x} \pm dp$ | 196,1 ± 96,95 | 517,8 ± 133,5 | 266,0 ± 94,3 | 524,0 ± 180,0 | 219,2 ± 44,6 | 439,9 ± 129,5 |

No que se refere ao diâmetro médio dos túbulos seminíferos, não houve diferença ($p > 0,05$) entre os três grupos (Tabela 11).

Tabela 11- Diâmetro médio (μm) de secções transversais em túbulos seminíferos de ratos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)

| Animal | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|------------------|--------------|--------------|-------------|
| A1 | 372,4 ± 13,0 | 385,9 ± 5,6 | 388,8 ± 6,3 |
| A2 | 400,7 ± 12,2 | 385,6 ± 7,6 | 389,7 ± 9,5 |
| A3 | 387,2 ± 11,2 | 378,1 ± 5,6 | 374,7 ± 5,6 |
| A4 | 398,9 ± 10,7 | 382,6 ± 9,0 | 377,4 ± 6,0 |
| A5 | 390,3 ± 11,4 | 386,4 ± 7,4 | 371,3 ± 5,3 |
| A6 | 402,9 ± 12,8 | 364,7 ± 4,5 | 367,7 ± 6,5 |
| A7 | 376,9 ± 11,1 | 383,3 ± 10,6 | 379,4 ± 8,0 |
| A8 | 384,5 ± 9,4 | 371,0 ± 6,3 | 389,6 ± 7,7 |
| $\bar{x} \pm dp$ | 389,2 ± 11,2 | 379,7 ± 8,0 | 379,8 ± 8,7 |

Com relação ao diâmetro nuclear médio de espermatogônias, não foram observadas diferenças ($p>0,05$) nos animais dos três grupos (Tabela 12).

Tabela 12- Diâmetro (μm) nuclear médio ($\bar{x} \pm dp$) de espermatogônias em secções transversais de túbulos seminíferos de ratos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)

| Animal | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|------------------|----------------|-----------------|------------------|
| A1 | 10,5 \pm 1,1 | 9,3 \pm 0,6 | 8,9 \pm 0,6 |
| A2 | 10,1 \pm 0,8 | 9,0 \pm 0,3 | 9,3 \pm 0,7 |
| A3 | 9,8 \pm 1,0 | 9,1 \pm 0,9 | 9,2 \pm 0,7 |
| A4 | 9,3 \pm 1,1 | 9,3 \pm 1,1 | 9,4 \pm 0,4 |
| A5 | 9,2 \pm 1,1 | 9,3 \pm 0,9 | 9,4 \pm 0,6 |
| A6 | 9,9 \pm 1,1 | 8,6 \pm 0,5 | 9,6 \pm 0,7 |
| A7 | 8,5 \pm 0,8 | 9,8 \pm 1,7 | 9,7 \pm 0,5 |
| A8 | 9,2 \pm 0,9 | 8,6 \pm 0,7 | 9,9 \pm 0,4 |
| $\bar{x} \pm dp$ | 9,6 \pm 0,6 | 9,1 \pm 0,4 | 9,4 \pm 0,3 |

A média dos diâmetros nucleares de espermatócitos primários em preleptóteno/leptóteno (Tabela 13) e em paquíteno (Tabela 14) foi também semelhante ($p>0,05$) entre os grupos.

Tabela 13- Diâmetro (μm) nuclear médio ($\bar{x} \pm dp$) de espermátocitos primários em preleptótenos em secções transversais de túbulos seminíferos de ratos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)

| Animal | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|------------------|----------------|-----------------|------------------|
| A1 | 7,8 \pm 0,4 | 6,7 \pm 0,2 | 6,5 \pm 0,3 |
| A2 | 6,8 \pm 0,3 | 7,1 \pm 0,2 | 9,9 \pm 0,1 |
| A3 | 7,3 \pm 0,2 | 7,1 \pm 0,2 | 6,7 \pm 0,2 |
| A4 | 7,7 \pm 0,3 | 7,0 \pm 0,2 | 6,7 \pm 0,2 |
| A5 | 7,4 \pm 0,2 | 7,2 \pm 0,3 | 7,0 \pm 0,3 |
| A6 | 7,2 \pm 0,2 | 7,1 \pm 0,3 | 6,7 \pm 0,3 |
| A7 | 7,2 \pm 0,3 | 6,6 \pm 0,2 | 7,3 \pm 0,3 |
| A8 | 6,9 \pm 0,2 | 6,9 \pm 0,3 | 7,0 \pm 0,3 |
| $\bar{x} \pm dp$ | 7,3 \pm 0,35 | 7,0 \pm 0,21 | 7,2 \pm 1,11 |

Tabela 14- Diâmetro (μm) nuclear médio ($\bar{x} \pm dp$) de espermátocitos primários em paquítenos em secções transversais de túbulos seminíferos de ratos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)

| Animal | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|------------------|----------------|-----------------|------------------|
| A1 | 11,2 \pm 0,5 | 10,0 \pm 0,3 | 9,6 \pm 0,2 |
| A2 | 11,3 \pm 0,3 | 9,8 \pm 0,3 | 11,3 \pm 0,5 |
| A3 | 10,9 \pm 0,4 | 9,3 \pm 0,3 | 10,1 \pm 0,3 |
| A4 | 12,8 \pm 0,4 | 9,6 \pm 0,4 | 10,0 \pm 0,4 |
| A5 | 11,2 \pm 0,4 | 11,6 \pm 0,4 | 11,2 \pm 0,3 |
| A6 | 11,0 \pm 0,3 | 10,5 \pm 0,4 | 10,4 \pm 0,4 |
| A7 | 10,2 \pm 0,3 | 10,3 \pm 0,3 | 10,5 \pm 0,3 |
| A8 | 10,3 \pm 0,3 | 10,6 \pm 0,4 | 10,8 \pm 0,3 |
| $\bar{x} \pm dp$ | 11,1 \pm 0,8 | 10,2 \pm 0,7 | 10,5 \pm 0,6 |

A média do diâmetro nuclear de espermátides arredondadas (Tabela 15) apresentou redução significativa ($p < 0,05$) nos animais dos Grupos II e III em relação ao Grupo I.

Tabela 15- Diâmetro (μm) nuclear médio ($\bar{x} \pm dp$) de espermátides arredondadas em secções transversais de túbulos seminíferos de ratos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)

| Animal | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|------------------|----------------|-----------------|------------------|
| A1 | 8,3 \pm 0,3 | 7,5 \pm 0,3 | 7,4 \pm 0,3 |
| A2 | 8,1 \pm 0,3 | 7,4 \pm 0,3 | 7,9 \pm 0,2 |
| A3 | 8,0 \pm 0,3 | 7,7 \pm 0,3 | 7,4 \pm 0,2 |
| A4 | 8,7 \pm 0,3 | 7,8 \pm 0,2 | 8,1 \pm 0,2 |
| A5 | 8,4 \pm 0,3 | 8,6 \pm 0,3 | 8,1 \pm 0,3 |
| A6 | 8,6 \pm 0,3 | 7,8 \pm 0,3 | 7,5 \pm 0,3 |
| A7 | 7,5 \pm 0,3 | 7,3 \pm 0,3 | 7,9 \pm 0,2 |
| A8 | 8,2 \pm 0,2 | 7,6 \pm 0,3 | 8,1 \pm 0,2 |
| $\bar{x} \pm dp$ | 8,2a \pm 0,4 | 7,7b \pm 0,4 | 7,8b \pm 0,3 |

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença entre os grupos ($p < 0,05$)

No que tange ao diâmetro médio nucleolar das células de Sertoli, não houve diferença ($p>0,05$) entre os grupos estudados (Tabela 16).

Tabela 16- Diâmetro (μm) nucleolar médio ($\bar{x} \pm dp$) de células de Sertoli em secções transversais de túbulos seminíferos de ratos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)

| Animal | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|------------------|----------------|-----------------|------------------|
| A1 | 3,1 \pm 0,2 | 3,0 \pm 0,2 | 3,2 \pm 0,1 |
| A2 | 3,1 \pm 0,1 | 3,0 \pm 0,2 | 3,1 \pm 0,2 |
| A3 | 3,0 \pm 0,2 | 3,0 \pm 0,2 | 3,1 \pm 0,2 |
| A4 | 3,2 \pm 0,2 | 3,0 \pm 0,2 | 3,1 \pm 0,2 |
| A5 | 3,0 \pm 0,2 | 3,1 \pm 0,2 | 3,1 \pm 0,2 |
| A6 | 3,1 \pm 0,2 | 3,2 \pm 0,2 | 3,0 \pm 0,2 |
| A7 | 3,1 \pm 0,2 | 3,0 \pm 0,2 | 3,1 \pm 0,2 |
| A8 | 3,0 \pm 0,2 | 3,0 \pm 0,2 | 3,1 \pm 0,2 |
| $\bar{x} \pm dp$ | 3,1 \pm 0,1 | 3,0 \pm 0,1 | 3,1 \pm 0,1 |

Tabela 17- Número* de espermatogônias ($\bar{x} \pm dp$) em secções transversais de túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)

| Animal | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| A1 | 0,90 \pm 0,44 | 0,64 \pm 0,35 | 0,96 \pm 0,23 |
| A2 | 1,06 \pm 0,39 | 0,83 \pm 0,22 | 0,94 \pm 0,30 |
| A3 | 0,79 \pm 0,50 | 0,82 \pm 0,27 | 0,86 \pm 0,22 |
| A4 | 0,85 \pm 0,45 | 0,90 \pm 0,29 | 0,81 \pm 0,22 |
| A5 | 1,03 \pm 0,46 | 0,77 \pm 0,22 | 0,89 \pm 0,22 |
| A6 | 0,95 \pm 0,55 | 0,80 \pm 0,28 | 0,84 \pm 0,21 |
| A7 | 1,02 \pm 0,64 | 0,67 \pm 0,22 | 0,93 \pm 0,22 |
| A8 | 0,60 \pm 0,33 | 0,94 \pm 0,41 | 0,78 \pm 0,21 |
| $\bar{x} \pm dp$ | 0,90 \pm 0,15 | 0,80 \pm 0,10 | 0,88 \pm 0,07 |

*Número corrigido segundo fórmula de ABERCROMBIE (1946), modificada por AMANN (1962).

No que se refere à população celular nos túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero, os números corrigidos de espermatogônias, espermatócitos primários em leptóteno, espermatócitos primários em paquíteno, espermatídes arredondadas e de células de Sertoli não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) entre os três grupos analisados (Tabelas 17, 18, 19, 20 e 21, respectivamente).

Tabela 18- Número* de espermatócitos primários em pré-leptóteno ($\bar{x} \pm dp$) em secções transversais de túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3).

| Animal | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|------------------|------------------|-------------------|------------------|
| A1 | 23,00 \pm 2,23 | 27,96 \pm 12,37 | 27,19 \pm 3,49 |
| A2 | 26,82 \pm 4,22 | 24,56 \pm 4,23 | 19,20 \pm 2,78 |
| A3 | 26,25 \pm 4,75 | 23,05 \pm 2,90 | 26,10 \pm 5,08 |
| A4 | 26,53 \pm 4,36 | 29,20 \pm 4,62 | 28,94 \pm 3,31 |
| A5 | 27,88 \pm 3,65 | 22,69 \pm 2,94 | 24,25 \pm 2,46 |
| A6 | 24,63 \pm 3,11 | 24,42 \pm 2,63 | 26,46 \pm 3,00 |
| A7 | 23,85 \pm 2,75 | 28,15 \pm 2,57 | 24,20 \pm 3,71 |
| A8 | 26,23 \pm 3,62 | 25,84 \pm 5,37 | 24,76 \pm 2,72 |
| $\bar{x} \pm dp$ | 25,65 \pm 1,65 | 25,73 \pm 2,46 | 25,14 \pm 2,89 |

*Número corrigido segundo fórmula de ABERCROMBIE (1946), modificada por AMANN (1962).

Tabela 19- Número* de espermátocitos primários em paquíteno ($\bar{x} \pm dp$) em secções transversais de túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)

| Animal | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|------------------|----------------|-----------------|------------------|
| A1 | 22,35 ± 2,12 | 30,40 ± 4,93 | 28,71 ± 3,51 |
| A2 | 29,65 ± 4,25 | 28,25 ± 5,25 | 25,18 ± 3,00 |
| A3 | 28,66 ± 2,67 | 29,93 ± 3,15 | 25,84 ± 3,50 |
| A4 | 24,87 ± 3,35 | 35,25 ± 4,87 | 31,03 ± 3,93 |
| A5 | 27,81 ± 4,03 | 24,38 ± 3,87 | 26,39 ± 3,22 |
| A6 | 26,17 ± 3,47 | 24,96 ± 2,83 | 26,37 ± 3,70 |
| A7 | 25,05 ± 3,07 | 27,65 ± 2,98 | 27,73 ± 2,52 |
| A8 | 29,86 ± 4,08 | 25,61 ± 3,41 | 25,98 ± 2,85 |
| $\bar{x} \pm dp$ | 26,80 ± 2,64 | 28,30 ± 3,58 | 27,15 ± 1,93 |

*Número corrigido segundo fórmula de ABERCROMBIE (1946), modificada por AMANN (1962).

Tabela 20- Número* de espermátides arredondadas ($\bar{x} \pm dp$) em secções transversais de túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)

| Animal | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|------------------|----------------|-----------------|------------------|
| A1 | 70,78 ± 9,58 | 94,6 ± 7,74 | 95,74 ± 16,35 |
| A2 | 87,87 ± 11,33 | 84,52 ± 10,53 | 86,71 ± 5,90 |
| A3 | 91,98 ± 10,94 | 76,54 ± 6,60 | 90,18 ± 17,91 |
| A4 | 80,44 ± 8,91 | 109,41 ± 11,90 | 94,46 ± 9,46 |
| A5 | 82,28 ± 15,21 | 77,86 ± 9,00 | 87,13 ± 10,05 |
| A6 | 73,62 ± 10,08 | 82,23 ± 7,81 | 95,56 ± 13,54 |
| A7 | 85,48 ± 8,54 | 89,11 ± 11,48 | 93,60 ± 11,79 |
| A8 | 85,16 ± 8,87 | 92,13 ± 12,33 | 85,56 ± 6,97 |
| $\bar{x} \pm dp$ | 82,20 ± 7,12 | 88,30 ± 10,68 | 91,12 ± 4,23 |

*Número corrigido segundo fórmula de ABERCROMBIE (1946), modificada por AMANN (1962).

Tabela 21- Número* de células de Sertoli ($\bar{x} \pm dp$) em secções transversais de túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)

| Animal | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|------------------|----------------|-----------------|------------------|
| A1 | 7,83 ± 1,50 | 9,12 ± 1,74 | 8,31 ± 1,50 |
| A2 | 8,14 ± 1,70 | 7,48 ± 2,36 | 8,26 ± 1,81 |
| A3 | 8,42 ± 1,30 | 7,36 ± 1,11 | 8,77 ± 0,95 |
| A4 | 8,00 ± 1,50 | 10,51 ± 1,93 | 8,53 ± 1,85 |
| A5 | 8,70 ± 2,10 | 8,68 ± 1,77 | 8,50 ± 2,32 |
| A6 | 7,57 ± 1,70 | 8,50 ± 1,03 | 8,11 ± 0,94 |
| A7 | 7,95 ± 1,40 | 8,13 ± 2,71 | 10,02 ± 1,10 |
| A8 | 8,54 ± 1,60 | 8,57 ± 1,31 | 8,05 ± 1,77 |
| $\bar{x} \pm dp$ | 8,14 ± 0,38 | 8,54 ± 0,99 | 8,57 ± 0,63 |

*Número corrigido segundo fórmula de ABERCROMBIE (1946), modificada por AMANN (1962).

Com relação às razões das células germinativas com as células de Sertoli ou índices de células de Sertoli, estas (espermatídes arredondadas, espermatócitos primários em paquíteno, espermatócitos primários em pré-leptóteno e espermatogônias) não diferiram ($p > 0,05$) entre os três grupos analisados (Tabelas 22, 23, 24 e 25, respectivamente).

Tabela 22- Razão* de espermatídes arredondadas por células de Sertoli em secções transversais de túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)

| Animal | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|------------------|------------------|------------------|------------------|
| A1 | 9,04 | 10,37 | 11,52 |
| A2 | 10,79 | 11,30 | 10,50 |
| A3 | 10,92 | 10,40 | 10,28 |
| A4 | 10,06 | 10,41 | 11,07 |
| A5 | 9,46 | 8,97 | 10,25 |
| A6 | 9,72 | 9,67 | 11,78 |
| A7 | 10,75 | 10,96 | 9,34 |
| A8 | 9,97 | 10,75 | 10,63 |
| $\bar{x} \pm dp$ | 10,09 \pm 0,69 | 10,36 \pm 0,74 | 10,67 \pm 0,78 |

*Número corrigido segundo fórmula de ABERCROMBIE (1946), modificada por AMANN (1962).

Tabela 23- Razão* de espermátócitos primários em paquíteno por células de Sertoli em secções transversais de túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)

| Animal | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| A1 | 2,85 | 3,33 | 3,45 |
| A2 | 3,64 | 3,78 | 3,05 |
| A3 | 3,40 | 4,07 | 2,95 |
| A4 | 3,11 | 3,35 | 3,64 |
| A5 | 3,20 | 2,81 | 3,10 |
| A6 | 3,46 | 2,94 | 2,08 |
| A7 | 3,15 | 3,40 | 3,25 |
| A8 | 3,50 | 2,99 | 3,23 |
| $\bar{x} \pm dp$ | 3,30 \pm 0,26 | 3,33 \pm 0,43 | 3,18 \pm 0,28 |

*Número corrigido segundo fórmula de ABERCROMBIE (1946), modificada por AMANN (1962).

Tabela 24- Razão* de espermatoócitos primários em pré-leptóteno por células de Sertoli em secções transversais de túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)

| Animal | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| A1 | 2,94 | 3,07 | 3,27 |
| A2 | 3,29 | 3,28 | 2,32 |
| A3 | 3,12 | 3,13 | 2,98 |
| A4 | 3,32 | 2,78 | 3,39 |
| A5 | 3,20 | 2,61 | 2,85 |
| A6 | 3,25 | 2,87 | 3,26 |
| A7 | 3,00 | 3,46 | 2,42 |
| A8 | 3,07 | 3,02 | 3,08 |
| $\bar{x} \pm dp$ | $3,15 \pm 0,14$ | $3,03 \pm 0,27$ | $2,95 \pm 0,40$ |

*Número corrigido segundo fórmula de ABERCROMBIE (1946), modificada por AMANN (1962).

Tabela 25- Razão* de espermatogônias em por células de Sertoli em secções transversais de túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar adultos controle (G1), tratados com cisplatina (G2) e com cisplatina mais antioxidantes (G3)

| Animal | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| A1 | 0,11 | 0,07 | 0,11 |
| A2 | 0,13 | 0,11 | 0,11 |
| A3 | 0,09 | 0,11 | 0,10 |
| A4 | 0,11 | 0,09 | 0,09 |
| A5 | 0,12 | 0,09 | 0,10 |
| A6 | 0,13 | 0,09 | 0,10 |
| A7 | 0,13 | 0,08 | 0,09 |
| A8 | 0,07 | 0,11 | 0,10 |
| $\bar{x} \pm dp$ | $0,11 \pm 0,02$ | $0,09 \pm 0,01$ | $0,10 \pm 0,01$ |

*Número corrigido segundo fórmula de ABERCROMBIE (1946), modificada por AMANN (1962).

6- DISCUSSÃO

A utilização de quimioterapia à base de cisplatina, cirurgia e radioterapia aumentou as chances de cura de câncer de testículo para aproximadamente 80% ou mais dos pacientes, assim grande ênfase tem sido dada às complicações oriundas desse tratamento. O impacto real da quimioterapia sobre a infertilidade nos homens ainda permanece incerto. Outro problema deve-se ao fato de que apenas um terço desses pacientes tentam a paternidade após tratamento (HOWELL e SHALET, 2005). Ademais, fatores de esterilidade feminina não são considerados, bem como a influência do câncer por si sobre a infertilidade.

Os resultados do presente estudo revelaram modificações significantes no peso corporal dos animais tratados em relação ao controle. Tais achados são compatíveis aos encontrados por POGACH et al. (1989), que verificaram redução significativa do peso corporal de ratos adultos que receberam cisplatina. A utilização de acetato ou sulfato de cobre por esses autores não preveniu essa perda corporal.

Não constatamos alterações ponderais no testículo, índice gonadossomático, complexo da próstata ventral, vesícula seminal e glândula coaguladora. Acreditamos que, embora haja forte relação entre peso testicular e produção espermática, há evidência de que substâncias tóxicas diminuem a espermiogênese antes de acometer o peso testicular. Achados semelhantes foram observados por KINKEAD et al. (1992), com relação ao peso testicular, entretanto, esses autores constataram diferença significativa no peso da vesícula seminal e da próstata, nos animais tratados com cisplatina, com doses iguais e período de observação semelhante ao do presente estudo. Talvez essas diferenças devam-se ao fato da raça de ratos utilizada e a idade dos mesmos. Vale ressaltar que o aumento da dose de cisplatina, utilizando modelo experimental semelhante ao presente experimento, induziu a perda ponderal testicular, das vesículas seminais e epidídimo (HUANG et al., 1990; POGACH et al., 1989 e ATESSAHIN et al., 2005).

A maioria dos autores utilizou ratos da raça Sprague-Dawley (POGACH et al., 1989; HUANG et al., 1990; KINKEAD et al., 1992 e ATESSAHIN et al., 2005). A escolha de ratos da raça Wistar foi feita pela maior facilidade de aquisição, pela suscetibilidade de padronização quanto à idade, raça, peso e sexo da mesma linhagem, assim como permitir maior número de observações ao acaso.

As estimativas percentuais morfométricas no lume do túbulo seminífero, conservou-se semelhante entre os grupos. Esses resultados provavelmente devem-se a fatores tais como a localização mais profunda desse em relação aos outros componentes testiculares.

No componente testicular que representa a maior proporção volumétrica do testículo, o epitélio seminífero, o qual inclui as células de linhagem espermatogênica, observou-se efeito negativo significativo da cisplatina (Grupo II) em relação ao controle (Grupo I). Vale ressaltar que os animais submetidos a associação cisplatina e SOD + catalase apresentaram diminuição volumétrica, sem no entanto, diferença estatística. Acreditamos ter ocorrido possível efeito protetor dos antioxidantes nesse epitélio.

Houve significativa redução da túnica própria dos animais do Grupo II, em relação aos do Grupo I, e, principalmente, aos do Grupo III. Esses resultados sugerem lesão da cisplatina na túnica própria e papel protetor do SOD+ catalase nessa.

Dos componentes intersticiais do testículo, a proporção de núcleos das células de Leydig foi inferior nos grupos tratados com cisplatina (Grupos II e III) em relação ao Grupo Controle. Apesar das proporções volumétricas dos grupos II e III corresponderem, respectivamente, à cerca de 69,1 e 58,2% do grupo I controle (0,58, 0,38 e 0,32%), acreditamos que o nível de testosterona não esteja comprometido nos grupos tratados devido ao peso das glândulas anexas hormônio-dependentes não ter sido alterado. Ademais em ratos, sabe-se que são necessários apenas 25-45% dos níveis totais intratesticulares de testosterona para a manutenção da espermatogênese (SHARPE et al. 1988a).

A ocorrência de lesões do epitélio germinativo induzindo oligo ou azoospermia definitiva ou transitória como consequência do uso da cisplatina é reconhecida, assim como disfunção das células de Leydig. Existem evidências de que lesões no epitélio germinativo podem afetar indiretamente, ou a cisplatina pode lesar diretamente a função das células de Leydig (HUANG et al., 1990). Sabidamente a cisplatina pode, a curto ou longo prazo, afetar a produção de testosterona no testículo ou, em doses mais elevadas e prolongadas, no plasma sanguíneo (POGACH et al., 1989; HUANG et al., 1990 e KINKEAD et al., 1992).

Apesar de nenhuma explicação aparente, a proporção do estroma apresentou-se maior no Grupo II, quando comparados aos Grupos I e III. A variação encontrada nesse parâmetro pode sugerir que o volume do seio linfático seja um artefato decorrente da pressão de perfusão.

A homogeneização ou medida das reservas espermáticas é um dos procedimentos mais comumente usados para se detectarem alterações absolutas e relativas na produção espermática (CASTRO e CARDOSO, 2001). As médias de pesos testicular e epididimário, não foram significativamente diferente entre os grupos. O princípio da técnica baseia-se no fato de que em alguma etapa da espermiogênese os núcleos das espermátides em desenvolvimento e em alongamento tornam-se resistentes à destruição física, não ocorrendo com núcleos de outros tipos celulares. As histonas nucleares das espermátides alongadas ou em alongamento tornam-se mais básicas aumentando seu conteúdo de arginina, indicando assim, aumento na ligação da proteína nuclear à molécula de DNA, sendo a ocorrência desta ligação atípica e mais forte, uma possível explicação para a resistência dos núcleos das espermátides maduras à técnica de homogeneização (CASTRO e CARDOSO, 2001).

No presente estudo nenhuma alteração significativa na estimativa das reservas testiculares entre os grupos foi observada, tanto na reserva total como naquela por grama de parênquima testicular, apesar das mesmas, aparentemente estarem mais elevadas nos Grupos II (cisplatina) e III (cisplatina + antioxidantes) em relação ao Controle. A reserva espermática testicular por grama de parênquima é uma medida um pouco mais eficiente do que a reserva total, pois elimina o fator peso testicular que pode contribuir para uma variação ainda maior. É nossa hipótese de que a cisplatina por ser uma droga que altera a conformação do DNA das células, possa tornar a ligação da proteína nuclear à molécula de DNA ainda mais intensa, permitindo assim, que um número maior de espermátides seja detectado em homogeneizados testiculares. Dessa forma, acreditamos que esse método não deva ser utilizado rotineiramente para avaliar toxicidade por cisplatina ou por qualquer outra droga que venha a interferir na conformação do DNA das células. Com relação à reserva epididimária total ou por grama, de maneira semelhante à reserva testicular, não houve diferença significativa entre os grupos. Os valores das reservas

epididimárias são mais elevados do que aqueles das testiculares, pois os epidídimos são capazes de armazenar o equivalente a alguns dias de produção espermática dos testículos. Além disso, na análise da reserva epididimária, deve-se levar em consideração algumas variáveis envolvidas como masturbação, repouso sexual e eventuais perdas de espermatozóides na urina.

O modelo deste experimento demonstrou ser eficaz para o objetivo do trabalho, na medida em que proporcionou condições anatômicas e cirúrgicas semelhantes a situações clínicas de quimioterapia. Entretanto, deve ser ressaltado que esse modelo difere da situação real, pois efetua-se o tratamento antineoplásico em dose única e usualmente existe doença maligna associada.

Avaliou-se resultados de um ciclo da espermatogênese. Períodos de observações semelhantes ao do presente estudo foram efetuados por POGACH et al. (1989), HUANG et al. (1990), KINKEAD et al. (1992) e ATESSAHIN et al. (2005). No presente experimento e nesses estudos, nos amparamos nos trabalhos de CLERMONT (1972), sobre cinética da espermatogênese, o qual define um ciclo do epitélio seminífero em ratos Wistar 12,8 a 13 dias. A duração desse ciclo é constante para mesmas espécies e raramente sofre influências externas. Assim, o processo da espermatogênese compreende 4 a 4,5 ciclos do epitélio seminífero, podendo apresentar início definido com a mitose espermatogonial e final aproximado com a liberação do espermatozóide do epitélio ao lume. Em ratos da raça Wistar, a espermatogênese tem duração estimada em 52 dias (CLERMONT, 1972).

O mecanismo real da ação da cisplatina, ainda que em alguns pontos obscuros sugere ser multifatorial; em relação à chemosensibilidade única em tumores de células germinativas. A inabilidade de detoxificar a cisplatina, reparo de DNA lesado, a deficiência no sistema celular de bombas de exportação e uma cascata apoptótica intacta são as atividades potenciais (MAYER et al., 2003).

Alterações endócrinas testiculares através da disfunção a longo prazo das células de Leydig no testículo contralateral podem ocorrer proporcionando hipogonadismo dose dependente a cisplatina em até 27% dos pacientes (FOSSA et al., 2004).

Felizmente, a diminuição da produção de testosterona é usualmente compensada pelo aumento da secreção pituitária de LH e permanece subclínica na maioria dos casos (NORD et al., 2003).

Grande preocupação é a ocorrência de disfunção exócrina testicular após quimioterapia à base de cisplatina. A constatação de oligo ou azoospermia é freqüente e preocupante. A probabilidade de recuperação a uma contagem espermática dentro dos padrões de referência são maiores para pacientes com contagens pré tratamento normais, naqueles que receberam quimioterapia à base de carboplatina ao invés de cisplatina e submetidos a menos de cinco ciclos de quimioterapia (< 400 mg/m² dose total) a recuperação da espermatogênese continua por mais de dois anos com chances calculadas de 48% e em cinco anos de 80% (LAMPE et al., 1997; CHAUDARY e SHALET, 2003; FOSSA, 2004; HOWELL e SHALET, 2005). Um fator preditivo adicional desfavorável à recuperação espermática é a idade maior ou igual a 35 anos (AASS et al., 1991).

A criopreservação do sêmen tornou-se terapêutica padrão e deve ser oferecida a todos os pacientes que serão submetidos a tratamento potencialmente esterilizante (HOWELL et al., 2001; HOWELL e SHALET, 2005).

O desenvolvimento e evolução nas técnicas utilizadas no armazenamento do sêmen e avanços na reprodução assistida com I.C.S.I., aumentaram as chances de gravidez utilizando espermatozóide criopreservado. Entretanto, existem algumas limitações desse método, como em pacientes pré puberais. Ademais, a função testicular em homens com doença maligna encontra-se usualmente deprimida antes do tratamento, resultando em baixa qualidade ou dificuldade em prover sêmem adequado para armazenamento (CHAPMAN et al., 1981; HOWELL e SHALET, 2001 e TAKSEY et al., 2003). Além disso, o processo de congelamento e posterior descongelamento do sêmem reduz a qualidade espermática e conseqüente chance de fertilização. Assim, métodos para proteger ou melhorar a recuperação da espermatogênese normal após terapêutica gonadotóxica têm sido perseguidos (HOWELL e SHALET, 2001 e GRECO et al., 2005).

O conhecimento, através de estudos experimentais, de que lesões renais e cromossômiais por cisplatina e outros metais pesados podem ser prevenidos por suplementação de altas doses de antioxidantes, estimulou inúmeros estudos pertinentes.

A comprovação de que a quimioterapia à base de cisplatina induz à queda dos níveis plasmáticos de antioxidantes por provável consumo desses oriundos de estresse oxidativo, assim como a perda renal de moléculas antioxidantes de baixo peso molecular, foi inicialmente demonstrada em pacientes com câncer por WEIJL et al. (1997).

No entanto, dúvidas ainda persistem referentes à utilização de enzimas decompositoras de radicais livres como a SOD + catalase não interferem na ação antitumoral de drogas antineoplásicas (KONG e LILLEHEI, 1998).

No presente estudo, utilizou-se a dose de cisplatina de 4 mg/kg de peso corporal intraperitoneal. Acreditamos que essa seja suficiente para induzir estresse oxidativo, pois aproxima-se à utilizada e comprovada por CHOUDHURY e JAGDALE (2002) e MINAMIYAMA et al. (2002).

Com referência ao momento da administração do antioxidante em relação à cisplatina, CHOUDHURY e JAGDALE (2002) fizeram-no prévio com vitamina E, MINAMIYAMA et al. (2002) usaram biofatores em grãos com propriedades antioxidantes à base de α tocoferol e vitamina C durante todo experimento. Já ATESSAHIN et al. (2005) forneceram licopeno antes e após o quimioterápico e sugeriram melhores resultados após a administração de cisplatina.

No estudo atual, optou-se por aplicar o superóxido de dismutase e catalase no mesmo ato endovenoso, para que não houvesse dúvidas quanto a possíveis distúrbios abortivos, à semelhança de PRILLAMAN et al. (1997).

A mensuração do diâmetro médio dos túbulos seminíferos dos animais tratados em relação ao controle não resultou ($p > 0,05$) em nenhuma diferença significativa entre os grupos. Essas medidas não levaram em consideração o estágio do ciclo do epitélio seminífero. Resultados semelhantes foram encontrados por ATESSAHIN et al. (2005) em que não observaram diferença no diâmetro nos túbulos seminíferos de ratos tratados com cisplatina e licopeno pré e pós administração desse quimioterápico.

A medida em secções transversais dos túbulos seminíferos dos diâmetros nucleares médios de espermatogônias, espermátocitos primários em préleptótenos, espermátocitos primários em paquíteno, de espermátides arredondadas e diâmetro

nucleolar das células de Sertoli é um pré-requisito para o cálculo da contagem dessas células em secções transversais no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero (sistema acrossômico). Com exceção das espermatídes arredondadas, não houve diferença ($p>0,05$) no diâmetro nuclear e/ou nucleolar dessas células entre os grupos tratados (GII e GIII) e o controle (GI). As espermatídes arredondadas dos grupos tratados (GII e GIII) apresentaram uma pequena redução ($p<0,05$) em seu diâmetro nuclear em relação ao controle, cerca de 5 a 6%, o que como será mostrado mais adiante, não interferiu no número dessas células no testículo. Diferença no volume nuclear de espermatídes arredondadas foi relatada por FRANÇA et al. (1995) em ratos Sprague-Dawley entre estágios do ciclo do epitélio seminífero pelo método acrossômico. Ademais, ratos Wistar expostos a um regime constante de luz durante os primeiros 25 dias de idade apresentaram redução significativa no diâmetro das espermatídes arredondadas no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero (ROCHA et al., 1999).

Os números corrigidos de espermatogônias nos animais tratados (Grupos II e III) foram semelhantes ($p>0,05$) àqueles dos animais do Grupo I. Resultados semelhantes foram encontrados por KINKEAD et al. (1992), que não constataram diferença estatística nas espermatogônias entre os grupos em doses de cisplatina inferiores, iguais e superiores aos do presente estudo. Segundo BERNDTSON et al. (1989), como o número de espermatogônias por secção transversal é muito baixo, o coeficiente de variabilidade desse parâmetro é muito elevado, o que dificulta a detecção de diferenças entre grupos quando a diferença entre os mesmos é pequena.

Os números corrigidos de espermatócitos primários em pré-leptóteno não diferiram entre os grupos de animais. Resultados diferentes do presente experimento foram observados por KINKEAD et al. (1992), os quais verificaram redução significante nesses em doses semelhantes ao do nosso trabalho. Contudo, parte da metodologia utilizada por esses autores foi diferente daquela empregada no presente experimento, pois utilizaram-se de análise de imagem computadorizada para medir diâmetros nucleares. Vale ressaltar que VAWDA e DAVIES (1986) observaram redução de espermatócitos primários em préleptóteno, porém, usaram camundongos e cisplatina na dose de 8 mg/kg de peso corporal.

Semelhante aos dados de pré-leptóteno, também não houve diferença ($p>0,05$) no número de espermátócitos primários em paquítenos entre os grupos. VAWDA e DAVIES (1986) encontraram resultados semelhantes ao nosso em relação a essas células. No entanto, KINKEAD et al. (1992) e HUANG et al. (1990) verificaram redução significativa dessas em relação ao controle, sendo que os últimos autores utilizaram-se de cinco injeções diárias de cisplatina de 2 mg/kg de peso corporal. É importante salientar que, em condições normais (grupo controle), espera-se que o número de espermátócitos primários em preleptótenos seja semelhante àquele de paquítenos, pois apesar do diâmetro entre estas serem diferentes (paquíteno maior que preleptóteno), a razão de um para o outro deve ser de aproximadamente 1,0, pois não há divisão de pré-leptóteno em paquíteno. No presente experimento, essa razão ficou próxima de 1,06, o que denota boa precisão nas contagens dessas células.

Por se tratar de experimento com características ímpares, os dados dos trabalhos comparativos geralmente diferem em algum modo do presente estudo.

Os resultados constatados dos números corrigidos de espermátides arredondadas nos túbulos seminíferos não demonstraram diferenças ($p>0,05$) entre os Grupos II e III em relação aos do Grupo I, observações estas semelhantes àquelas de VAWDA e DAVIES (1986) em camundongos. Outros achados, no entanto, com redução significativa dessas células foram verificadas por KINKEAD et al. (1992). De todas as células da linhagem espermatogênicas, normalmente as primeiras células a serem comprometidas quando há um efeito de uma droga ou agente são as espermátides arredondadas ou alongadas, por serem estas as células mais diferenciadas dos túbulos seminíferos.

A espermatogênese é regulada e mantida pelas células de Sertoli. Uma das principais funções dessas células é a de formar barreiras hemato-testiculares, que propiciam ambientes estáveis intratubulares para a diferenciação das células germinativas (SETCHELL, 1991).

O número corrigido de células de Sertoli nos túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero não foi diferente ($p>0,05$) nos animais tratados (Grupos II e III) em relação aos do grupo controle. Em nosso conhecimento,

não existem informações na literatura sobre o número de células de Sertoli por secções transversais de túbulos seminíferos em animais tratados com cisplatina. As células de Sertoli são também as mais resistentes aos mais variados tipos de tratamentos, mantendo-se funcionais quando as demais células do túbulo seminífero apresentam-se acometidas. Dessa forma, elas servem como um marcador (índice) de eficiência da espermatogênese (BERNDTSON, 1977). Caso houvesse algum tipo de comprometimento dessas células no presente experimento, haveria de se esperar uma desestruturação completa ou parcial do epitélio seminífero, uma provável ruptura da barreira de célula de Sertoli, o que não ficou constatado.

Com o objetivo de constatar quaisquer alterações nas contagens das células da linhagem espermatogênica que pudessem ocorrer em virtude de alterações causadas pela retração tecidual decorrente do processamento histológico ou pelo tratamento, avaliou-se as razões das células espermatogênicas em relação às células de Sertoli (índice de célula de Sertoli). Em relação aos índices de células de Sertoli, que são os melhores indicativos da eficiência das células de Sertoli e, por conseqüência, da eficiência espermatogênica (RUSSELL et al, 1990; FRANÇA e RUSSELL, 1998), os valores encontrados no presente estudo não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) nos animais tratados (Grupos II e III) em relação aos do Grupo I.

Os resultados obtidos pelas razões celulares (espermátides arredondadas, espermatócitos primários em pré-leptóteno e em paquíteno e espermatogônias) com as células de Sertoli vêm corroborar com a principal constatação deste experimento, de que a cisplatina na dosagem única i.p. de 4mg/kg de peso corporal não alterou o número de nenhuma dessas células avaliadas. Como não houve alteração nesses parâmetros, o uso de antioxidantes no presente estudo, demonstrou-se de pouca valia neste contexto. É de extrema importância salientar, que até o momento, em nenhum dos estudos envolvendo o uso de cisplatina no testículo foram utilizados os índices de células de Sertoli para comprovação da eficiência da espermatogênese.

Estudos de múltiplos grupos com variações na doses, tanto do agente tóxico, como do antioxidante, assim como o momento de administração deste, devem ser exercitados para obtenção de novas informações na compreensão dos dados aqui discutidos.

Acredita-se que essa linha de pesquisa sobre cinética e quantificação da espermatogênese, toxicologia de drogas e, principalmente, a participação do estresse oxidativo com quantificação deste, tanto sérico como tecidual, através de marcadores de danos oxidativos ao DNA, deve continuar sendo investigada para aquisição de mais subsídios no que se refere ao entendimento dos fenômenos citados.

Ressalta-se o papel da criopreservação de esperma prévio à terapêutica neoplásica com drogas, cirurgia ou radioterapia potencialmente esterilizantes. No entanto, a Medicina evolui e exalta a prevenção; assim, a elaboração de futuros ensaios experimentais e clínicos, auxiliados pela engenharia genética e moderna biologia molecular, as quais talvez permitam afirmações estimulantes e inovadoras sobre o tema.

7- CONCLUSÕES

O tratamento de ratos adultos com cisplatina i.p. na dosagem única de 4 mg/kg de peso corporal com ou sem uso de antioxidantes e sacrificados após 13 dias da injeção resultou em:

- 1- Diminuição do peso corporal de ratos tratados com cisplatina e cisplatina + SOD + catalase; nenhuma alteração no peso das glândulas anexas;
- 2.a- Não houve alteração nas reservas espermáticas testicular e epididimária, no número de células e nas razões da linhagem espermatogênica, (células de Sertoli, espermatogônias, espermatócitos primários em pré-leptóteno e em paquíteno e espermátides arredondadas);
 - b- Redução do diâmetro nuclear médio de espermátides arredondadas nos animais tratados com cisplatina e cisplatina + SOD + catalase;
- 3.a- Diminuição no percentual do epitélio seminífero dos testículos nos animais tratados com cisplatina e sugere possível proteção, neste nível, por SOD + catalase;
 - b- Aumento no percentual da túnica própria dos testículos de ratos tratados com cisplatina + SOD + catalase em relação aos tratados com cisplatina;
 - c- Aumento no percentual do estroma dos testículos dos animais tratados com cisplatina em relação aos tratados com cisplatina + SOD + catalase;
 - d- Redução no percentual de núcleos das células de Leydig dos testículos de ratos tratados com cisplatina e cisplatina + SOD + catalase;

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASS, N.; FOSSA, S.D.; THEODORSEN, L.; NORMAN, N. Prediction of long-term gonadal toxicity after standard treatment for testicular cancer. **Eur J Cancer**, 27:1087-1091, 1991.

ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear population from microtome sections. **Anal Rec**, 94:238,1946.

AITKEN, R.J.; SAWYER, D. The human spermatozoon - not waving but drowning. **Kluwer Acad**, 518:85-98, 2004.

ALKAN, I.; SIMSEK, F.; HAKLAR, G.; KERVANCIOGLU, E.; OZVERI, H.; YALCIN, S.; AKDAS, A. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. **J Urol**, 157:140-143, 1997.

AMANN, R.P. Reproductive capacity of dairy bulls: III. The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy, and age on spermatogenesis. **Am J Anat**, 110:49-67, 1962.

ARAI, Y.; KAWAKITA, M.; OKADA, Y.; YOSHIDA, O. Sexuality and Fertility in long-term survivors of testicular cancer. **J Clin Oncol**, 15(4):1444-1448, 1997.

ARUOMA, O.I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. **Food Chem Toxic**, 32:671-83, 1994.

ATESSAHIN, A.; KARAHAN, I.; TÜRK, G.; GÜR, S.; YILMAZ, S.; ÇERIBASI, A.O. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. **Reprod Toxicol**, 23: xxx-xxx, 2005.

BABIOR, B.M.; WOODMAN, R.C. Chronic granulomatous disease. **Semin Hematol**, 27:247-259, 1990.

BAEK, S.M.; KWON, C.H.; KIM, J.H.; WOO, J.S.; JUNG, J.S.; KIM, Y.K. Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. **J Lab Clin Med**, 142(3):178-186, 2003.

BAST, A.; HAENEN, G.R.; DOELMAN, C.J. Oxidants and antioxidants: state of the art. **Am J Med**, 91:2S-13S, 1991.

BENNETT, DR. Drugs used in cancer chemotherapy. Em: **Drug evaluations Annual 1991**. Milwaukee, Wisconsin: American Medical Association, Cap. 77, pp. 1737-1809, 1991.

BERGSTROM, R.; ADAMI, H.O.; MOHNER M.; ZATONSKI, W.; STORM, H.; EKBOM, A.; TRETLI, S.; TEPPON, L., AKRE, O.; HAKULINEN, T. Increase in testicular cancer incidence in six European countries: a birth cohort phenomenon. **J Natl Cancer Inst**, 88(11):727-33, 1996.

BERNDTSON, W.E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. **J Anim Sci**, 44(5):818-833, 1977.

BERNDTSON, WE; NEEFLAS, C; FOOTE, RH; AMANN, RP. Optimal replication for histometric analyses of testicular function in rats or rabbits. **Fundam Appl Toxicol**, 12: 291,1989.

BERTHELSEN, J.G. Sperm counts and serum follicle-stimulating hormone levels before and after radiotherapy and chemotherapy in men with testicular germ cell cancer. **Fertil Steril**, 41:281-286, 1984.

BERTHELSEN, J.G.. Testicular cancer and infertility. **Int J Androl**, 10: 371-380, 1987.

BODENNER, D.L.; DEDON, P.C.; KENG, P.C.; KATZ, J.C.; BORCH, R.F. Selective protection against cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced toxicity in Kidney, Gut and Bone Marrow by diethyldithiocarbamate. **Cancer Res**, 46:2751-2751, 1986.

BORCH, B.F; PLEASANTS, M.E. Inhibition of cis-platinum nephrotoxicity by diethyldithiocarbamate rescue in a rat model. **Proc Natl Acad Sci USA**, 76(12): 6611-6614, 1979.

BOSL, G.J.; MOTZER, R.J. Testicular germ-cell cancer. **N Engl J Med**, 337:242-253, 1997.

BRACKEN, M.D.; SMITH, K.D. Is semen cryopreservation helpful in testicular cancer? **Urology**, 15(6):581-583, 1980.

BRENNEMANN, W.; STOFFEL-WAGNER, B.; HELMERS A.; MEZGER, J.; JÄGER, N.; KLINGMÜLLER, D. Gonadal function of patients treated with cisplatin based chemotherapy for germ cell cancer. **J Urol**, 158:844-850, 1997.

CAPEL, B. The battle of the sexes. **Mech Dev**, 92(1):89-103, 2000.

CARREAU, S.; PAPADOPOULOS, V.; BOUJRAD, N.; DROSDOWSKY, M.A. Effects of cisplatin and bleomycin on mature rat Leydig cell testosterone production. **J Steroid Biochem**, 30:449-450, 1988.

CASTRO, A.C.S.; CARDOSO, F.M. Avaliação dos métodos de quantificação da produção espermática em estudos experimentais em animais domésticos. **Cad Tec Vet Zootec**, 35:31-40, 2001.

CHAN, P.T.; PALERMO, G.D.; VEECK, L.L.; ROSENWAKS, Z.; SCHLEGEL, P.N. Testicular sperm extraction combined with intracytoplasmic sperm injection in the treatment of men with persistent azoospermia postchemotherapy. **Cancer**, 92:1632-7, 2001.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Rev**, 59(3):527-605, 1979.

CHAPMAN, RM; SUTCLIFFE, SB; MALPAS, JS. Male gonadal dysfunction in Hodgkin's disease. A prospective study. **J M M A**, 245: 1323,1981.

CHAUDHARY, U.B.; HALDAS, J.R. Long-term complications of chemotherapy for germ cell tumours. **Drugs**, 63(15):1565-1577, 2003.

CHOUDHURY, R.C.; JAGDALE, M.B. Vitamin E protection from/ potentiation of the cytogenetic toxicity of cisplatin in swiss mice. **J Chemotherapy**, 14(4):397-405, 2002.

CHUNG, K.; IRANI, J.; KNEE, G.; EFYMOW, B.; BLASCO, L.; PATRIZIO, P. Sperm cryopreservation for male patients with cancer: an epidemiological analysis at the

University of Pennsylvania. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, 5(113)Supl.1:S7-S11, 2004.

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiol Rev**, 52(1):198-236, 1972.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Princípios éticos na experimentação animal**. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br/etica.htm#3>> Acesso em:20 jan. 2004.

COLPI, G.M.; CONTALBI, G.F.; NERVA, F.; SAGONE, P.; PIEDIFERRO, G. Testicular function following chemo-radiotherapy. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, 5(113)Supl.1:S2-S6, 2004.

CONKLIN, K.A. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. **Nutrition and Cancer**, 37(1): 1-18, 2000.

DE DUVE, C. Biochemical studies on the occurrence, biogenesis and life history of mammalian peroxisomes. **J Histochem Cytochem**, 21:941-948, 1973.

DE DUVE, C.; BAUDHUIN, P. Peroxisomes (microbodies and related particles). **Physiol Rev**, 46:323-357, 1966.

DeVITA Jr, VT. The consequences of chemotherapy of Hodgkin's disease: the 10th David A. Karnofsky Memorial Lecture. **Cancer**, 47: 1, 1981.

DI GIULIO, T.T. **Rna aquatic toxicology and risk assessment**. 14th vol. ASTM STP 1124, M.A. Mayes y M.G. Barren (eds.). Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 1991.

DI MASCTO, P; KAISER, S & SIES. II. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch Biochem Biophys**. 274: 532-538, 1989.

DRASGO, R.E.; EINHORN, L.H.; WILLIAMS, S.D.; PATEL, D.N.; STEVENS, E.E. Fertility after chemotherapy for testicular cancer. **J Clin Oncol.**, 1(3): 179-183, 1983.

DYM, M. Basement membrane regulation of Sertoli cells. **Endocr Rev**, 15(1):102-115, 1994.

EINHORN, L.H. Chemotherapeutic and surgical strategies for germ cell tumors. **Chest Surg Clin N Am**, 12:695-706, 2002.

EINHORN, L.H.; DONOHUE, J.P. Improved chemotherapy in disseminated testicular cancer. **J Urol**, 117:65-69, 1977.

ELIAS, H; HENNIG, A; SCHWARTZ, DE. Stereology applications to biomedical research. **Physiolol Rev**, 51: 15 8, 1971.

FAWCETT, D.W.; LEAK, L.V.; HEIDGER, P.M. Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. **J Reprod Fert**, Suppl. 10:105-122, 1970.

FOSSA, S.D. Long-term sequelae after cancer therapy. **Acta Oncol**, 43(2):134-41, 2004.

FOSSA, S.D.; OUS, S.; ABYHOLM, T.; LOEB, M. Post-treatment fertility in patients with testicular cancer. I. Influence of retroperitoneal lymph node dissection on ejaculatory potency. **Brit J Urol**, 57: 210, 1985.

FOSSA, S.D.; OUS, S.; ABYHOLM, T.; NORMAN, N.; LOEB, M. Post-treatment - fertility in patients with testicular cancer. II. Influence of cis-platin-bases combination chemotherapy and of retroperitoneal surgery on hormone and sperm cell production. **Br J Urol** , 57: 210-214, 1985.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic animals. In: MARTÍNEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J. (Eds.) **Male reproduction: a multidisciplinary overview**. Espanha: Churchill Comm. Europe España, 1998, p. 197-219.

FRANÇA, L.R.; YE, S.; YING, L.; SANDBERG, M.; RUSSELL, L. Morphometry of rat germ cells during spermatogenesis. **The Anatomical Record**, 241:181-204, 1995.

FREIREICH, E.J.; GEHAN, E.A.; RALL, D.P.; SCHMIDT, L.H.; SKIPPER, H.E. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey and man. **Cancer Chem Rep**, 50(4): 219-244, 1966.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. **Annu Rev Biochem**, 44:147-59, 1975.

FRIDOVICH, I. Biological effects of the superoxide radical. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 247(1):1-11, 1986.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. **Methods Enzymol**, 58:61-97, 1986.

GAFFAN, J.; HOLDEN, L.; NEWLANDS, E.S.; SHORT, D.; FULLER, S.; BEGENT, R.H.J.; RUSTIN, G.J.S.; SECKL, M.J. Infertility rates following POMB/ACE chemotherapy for male and female germ cell tumours - a retrospective long-term follow-up study. **BR J Cancer**, 89(10):1849-1854, 2003.

GATÉ, L.; PAUL, J.; NGUYEN BA, G.; TEW, K.D.; TAPIERO, H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomed Pharmacother**, 53:169-180, 1999.

GEMBA, M.; FUKUISHI, N. Amelioration by ascorbic acid of cisplatin-induced injury in cultured renal epithelial cells. **Contrib Nephrol**, 95:138-142, 1991.

GHOSH, D.; DAS, U.B.; GHOSH, S.; MALLICK, M.; DEBNATH, J. Testicular Gametogenic and steroidogenic activities in cyclophosphamide treated rat: a correlative study with testicular oxidative stress. **Drug Chem Toxicol**, 25(3):281-292, 2002.

GODINHO, C.L. **Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros**. 1999. 80p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte.

GOLDEN, M. Free radicals and the aectiology of Kwashiorkor. **Biochemist**, june/july: 12-17, 1994.

GRECO, E.; ROMANO, S.; IACOBELLI, M.; FERRERO, S.; BARONI, E.; MINASI, M.G.; UBALDI, F.; RIENZI, L.; TESARIK, J. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. **Human Reprod**, 20(9):2590-2594, 2005.

GREENWALD, R.A. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases: a critical review. **Free Radic Biol Med**, 8:201-9, 1990.

GROOTVELD, M; HALLIWELL, B.; MOCINEUSE, C.P. et al. Action of uric acid, allopurinol and oxypurinol on the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid. **Free Radix Res Commun**, 4:69-76, 1987.

GUAZZIERI, S.; LEMBO, A.; FERRO, G.; ARTIBANI, W.; MERLO, F.; ZANCHETTA, R.; PAGANO, F. Sperm antibodies and infertility in patients with testicular cancer. **Urology**, 26:139-142, 1985.

GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends Biochem Sci**, 15(4):129-35, 1990.

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free Radic Res Commun**, 9:1-32, 1990.

HALLIWELL, B. Antioxidants. In: E. Ziegler and J. Filler Jr. (ed) **Present Knowledge in Nutrition**. 7. ed. Washington D.C.: International Life Sciences Institute Press, 1996.

HALLIWELL, B. Mechanisms involved in the generation of free radicals. **Path Biol**, 44:6-13, 1996.

HALLIWELL, B. Antioxidants: the basics - what they are and how to evaluate them. **Advances in Pharmacology**, 38:3-20, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? **J Lab Clin Med**, 119:598-620, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radical in Biology and Medicine**, 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Lipid peroxidation: a radical chain reaction**. Oxford: University Press, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radical in biology and medicine**. 3rd. ed. Oxford: Clarendon Press, 2000.

HIDAKA, S.; FUNAKOSHI, T.; SHIMADA, H.; TSURUOKA, M.; KOJIMA, S. Protective effect of N-benzyl-D-glucamine dithiocarbamate against renal toxicity in rats during repeated cis-diamminedichloroplatinum administrations. **Renal Failure**, 17(5):539-550, 1995.

HOWELL, S.B.; PFEIFLE, C.E.; WUNG, W.E.; OLSHEN, R.A. Intraperitoneal cis-diamminedichloroplatinum with systemic thiosulfate protection. **Cancer Res**, 43:1426-1431, 1983.

HOWELL, S.J.; SHALET, S.M. Testicular function following chemotherapy. **Hum Reprod Update**, 7(4):363-369, 2001.

HOWELL, S.J.; SHALET, S.M. Effect of cancer therapy on pituitary-testicular axis. **Int J Androl**, 25(5):269-76, 2002.

HOWELL, S.J.; SHALET, S.M. Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. **J Natl Center Institute Monographs**, 24, 2005.

HUANG, H.F.S.; POGACH, L.M.; NATHAN, E.; GIGLIO, W. Acute and chronic effects of cisplatin upon testicular function in the rat. **J Androl**, 11(5): 436, 1990.

ILIO, K.Y.; HESS, R.A. Structure and function of the ductuli efferentes: a review. **Microsc Res Tech**, 29(6):432-467, 1994.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=342>. Acesso em: 01 jun, 2005.

IQBAL, J.; CLERCH, L.B.; HASS, M.A.; FRANK, L.; MASSARO, D. Endotoxin increases lung Cu, Zn superoxide dismutase mRNA: O₂ raises enzyme synthesis. **Am J Physiol**, 257:L61-64, 1989.

JONG, J.W.; van der MEER, P.; NIEUKOOP, A.S. et al. Xanthine oxidoreductase activity in perfused hearts of various species including humans. **Circ Res**, 67:770-3, 1990.

JOW, W.W.; SCHLEGEL, P.N.; CICHON, Z.; PHILLIPS, D. Identification and localization of Copper-zinc superoxide dismutase gene expression in rat testicular development. **J Androl**, 14:439-447, 1993.

KADIKOYLU, G.; BOLAMAN, Z.; DEMIR, S.; BALKAYA, M.; AKALIN, N.; ENLI, Y. The effects of desferrioxamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. **Human & Experimental Toxicology**, 23:29-34, 2004.

KARL, J.; CAPEL, B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. **Dev Biol**, 203(2):323-333, 1998.

KHANDEKAR, J.D. Improved therapeutic index of cis-diammine dichloro platinum by diethyldithiocarbamate in rodents. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, 40(1): 55-66, 1983.

KIM, Y.K.; JUNG, J.S.; LEE, S.H.; KIM, Y.W. Effects of antioxidants and Ca^{2+} in cisplatin-induced cell injury in rabbit renal cortical slices. **Toxicol Appl Pharmacol**, 146(2):261-269, 1997.

KINKEAD, T.; FLORES, C.; CARBONI, A.A.; MENON, M.; SEETHALAKSHMI, L. Short term effects of cis-platinum on male reproduction, fertility and pregnancy outcome. **J Urol**, 147:201-206, 1992.

KOCIBA, R.J.; SLEIGHT, S.D. Acute toxicologic and pathologic effects of cis-diamminedichloroplatinum (NSC-119875) in the male rat. **Cancer Chemother Rep**, 55:1-8, 1971.

KOLETTIS, P.N.; SHARMA, R.K.; PASQUALOTTO, F.F.; NELSON, D.; THOMAS, A.J.; AGARWAL, A. Effect of seminal oxidative stress on fertility after vasectomy reversal. **Fertil Steril**, 71(2):249-255, 1999.

KOLLMANNBERGER, C.; BEYER, J.; LIERSCH, R.; SCHOEFFSKI, P.; METZNER, B.; RICK, O.; HARTMANN, J.T.; STENGELE, K.; HOHLOCH, K.; SPOTT, C.; KANZ, L.; BOKEMEYER, C. Combination Chemotherapy with gemcitabine plus oxaliplatin in patients with intensively pretreated or refractory germ cell cancer: a study of the German testicular cancer study group. **J Clin Oncol**, 22(1):108-114, 2004.

KONG, Q.; LILLEHEI, K.O. Antioxidant inhibitors for cancer therapy. **Medical Hypotheses**, 51:405-409, 1998.

KUHAJDA, F.P.; HAUPT, H.M.; MOORE, G.W.; HUTCHKINS, G.M. Gonadal morphology in patients receiving chemotherapy for leukemia. Evidence for reproductive potential and against a testicular tumor sanctuary. **Am J Med**, 72: 759, 1982.

LAMPE, H.; HARWICH, A.; NORMAN, A.; NICHOLLS, J.; DEARNALEY, D.P. Fertility after chemotherapy for testicular germ cell cancers. **J Clin Oncol**, 15(1):239-245, 1997.

LAMSON, D.W.; BRIGNALL, M.S. Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies. **Alternative Medicine Rev**, 4(5):304-329, 1999.

LANGE, P.H.; NARAYAN, P.; VOGELZANG, N.J.; SHAFER, R.B.; KENNEDY, B.J.; FRALEY, E.E. Return of fertility after treatment for nonseminomatous testicular cancer: changing concepts. **J Urol**, 129: 1131-1135, 1983.

LEBLOND, C.P.; CLERMONT, Y. Definitions of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Ann N Y Acad Sci**, 55:548-573, 1952.

LEBLOND, C.P.; CLERMONT, Y. Spermatogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the "periodic acid-fuchsin sulfurous acid" technique. **Am J Anat**, 90:167-215, 1952.

LEITNER, S.P.; BOSL, G.J.; BAJORUNAS, D. Gonadal dysfunction in patients treated for metastatic germ-cell tumors. **J Clin Oncol**, 4: 1500-1505, 1986.

LEONETTI, C.; BIROCCIO, A.; GABELLINI, C.; SCARSELLA, M.; MARESCA, V.; FLORI, E.; BOVE, L.; PACE, A.; STOPPACCIARO, A.; ZUPI, G.; COGNETTI, F.; PICARDO, M. α -Tocopherol protects against cisplatin-induced toxicity without interfering with antitumor efficacy. **Int J Cancer**, 104:243-250, 2003.

LOEHRER, P.J.; EINHORN, L.H. Diagnosis and treatment. Drugs five years later. **Ann Intern Med.**, 100: 704, 1984.

MAINES, M.D.; MAYER, R.D. Inhibition of testicular cytochrome P-450-dependent steroid biosynthesis by cis-platinum. **J Biol Chem**, 250:6063-6068, 1985.

MARKLUND, S.L. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. **Biochem J**, 222:649-655, 1984.

MARTINIS, B.S.; BIANCHI, M.L.P. Effect of vitamin C supplementation against cisplatin-induced toxicity and oxidative DNA damage in rats. **Pharmacol Res**, 44(4):317-320, 2001.

MASTERS, J.R.W.; KÖBERLE, B. Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. **Nature Rev Cancer**, 3:517-525, 2003.

MAXWELL, S.R.J. Prospects for the use of antioxidant therapies. **Drugs**, 49(3):345-361, 1995.

MAYER, F.; HONECKER, F.; LOOIJENGA, L.H.J.; BOKEMEYER, C. Towards an understanding of the biological basis of response to cisplatin-based chemotherapy in germ-cell tumours. **Ann Oncol**, 14(6):825-832, 2003.

McGINNESS, J.E.; PROCTOR, P.H.; DEMOPOULOS, H.B.; HOKANSON, J.A.; KIRKPATRICK, D.S. Amelioration of cis-platinum nephrotoxicity by orgotein (superoxide dismutase). **Physiol Chem Phys**, 10: 267-277, 1978.

MEISTRICH, M.L.; FINCH, M.; CUNHA, M.F.; HACKER, U.; AU, W.W. Damaging effects of fourteen chemotherapeutic drugs on mouse testis cells. **Cancer Res**, 42(1):122-131, 1982.

MINAMIYAMA, Y.; TAKEMURA, S.; TOYOKUNI, S.; NISHINO, Y.; YAMASAKI, K.; HAI, S.; YAMAMOTO, S.; OKADA, S. Amelioration of cisplatin toxicity by a fermented grain food product. **Biofactors**, 16:105-115, 2002.

MONCADA, S and HIGGS, H. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, 329:2002-2011, 1993.

MONSEES, T.K.; FRANZ, M.; GEBHARDT, S.; WINTERSTEIN, U.; SCHILL, W.B.; HAYATPOUR, J. Sertoli cells as a target for reproductive hazards. **Andrologia**, 32(4-5):239-246, 2000.

MONTEIRO, M. Los radicales libres y las defensas antioxidantes. Revisión. **Anales de la Facultad de Medicina**, 57(4):278-281, 1996.

MOSTOFI, F.K., SESTERHENN, I.A.; SOBIN, L.H. **Histological typing of testes tumor in world health organization: international histological typing of tumors**. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 1998.

MRUK, D.D.; SILVESTRINI, B.; MO, M.; CHENG, C.Y. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis and role in male fertility. **Contraception**, 65(4):305-311, 2002.

NAGANUMA, A.; SATOH, M.; IMURA, N. Effect of selenite on renal toxicity and antitumor activity of cis-diamminedichloroplatinum in mice inoculated with ehrlich ascites tumor cell. **J Pharm Dyn**, 7:217-220, 1984.

NISHIKAWA, M.; NAGATOMI, H.; NISHIJIMA, M.; OHIRA, G.; CHANG, B.; SATO, E.; INOUE, M. Targeting superoxide dismutase to renal proximal tubule cells inhibits nephrotoxicity of cisplatin and increases the survival of cancer-bearing mice. **Cancer Lett**, 171(2):133-138, 2001.

NORD, C.; BJØRO, T.; ELLINGSEN, D.; MYKLETUN, A.; DAHL, O.; KLEPP, O.; BREMMES, R.M.; WIST, E.; FOSSA, S.D. Gonadal hormones in long-term survivors 10 years after treatment for unilateral testicular cancer. **Eur Urol**, 44:322-328, 2003.

NOVIKOFF, A.B.; NOVIKOFF, P.N.; QUINTANA, N. **Studies on microperoxisomes IV.** Inter-relations of microperoxisomes, endoplasmatic reticulum and lipofuscin granules, 1973.

OHKAWA, K.; TSUKADA, Y.; DOHZONO, H.; KOIKE, K.; TERASHIMA, Y. The effects of co-administration of selenium and cis-platin (CDDP) on CDDP-induced toxicity and antitumor activity. **Br J Cancer**, 58:38-41, 1988.

ORRENIUS, S.; McCONKEY, D.J.; BELLOMO, G.; NICOTERA, P. Role of CA^{2+} in toxic cell killing. **Trends Pharm Sci**, 10:281-85, 1989;

OZKAN, K.U.; KILINÇ, M.; GARIPARDIÇ, M.; KURUTAS, E.B. The effect of zinc aspartate pretreatment on ischemia-reperfusion injury and early changes of blood and tissue antioxidant enzyme activities after unilateral testicular torsion-detorsion. **J Pediatr Surg**, 39(1):91-95, 2004.

PACKER, J.E.; SLATER, T.F.; WILSON, R.L. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. **Nature**, 278:737, 1979.

PELTOLA, V.; HUHTANIEMI, I.; AHOTUPA, M. Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. **J Androl**, 13:450-455, 1992.

POGACH, L.M.; LEE, Y.; GIGLIO, W.; NAUMOFF, M.; HUANG, H.F.S. Zinc acetate pretreatment ameliorates cisplatin-induced Sertoli cell dysfunction in Sprague-Dawley rats. **Cancer Chemoter Pharmacol**, 24:177-180, 1989a.

POGACH, L.M.; LEE, Y.; GOULD, S.; GIGLIO, W.; MEYENHOFFER, M.; HUANG, H.F.S. Characterization of cis-platinum-induced Sertoli cell dysfunction in rodents. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 98:350-361, 1989b.

PREMKUMAR, K.; ABRAHAM, S.K.; SANTHIYA, S.T.; RAMESH, A. Protective effect of spirulina fusiforms on chemical-induced genotoxicity in mice. **Fitoterapia**, 75:24-31, 2004.

PRILLAMAN, H.M.; TURNER, T.T. Rescue of testicular function after acute experimental torsion. **J Urol**, 157:340-345, 1997.

RATNASOORIYA, W.D.; SHARPE, R.M. Evaluation of the effect of selective germ cell depletion on subsequent spermatogenesis and fertility in the rat. **Int J Androl**, 12:44-57, 1989.

ROBB, GW; ARNANN, RP; KILLIAN, GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **J Reprod Fertil**, 54: 103, 1978.

ROCHA, D.C.M.; DEBELJUK, L.; FRANÇA, L.R. Exposure to constant light during testis development increases daily sperm production in adult Wistar rats. **Tissue & Cell**, 31(3): 372-379, 1999.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, 205:698-699, 1965.

ROTH, B.J.; EINHORN, L.H.; GREIST, A. Long-term complications of cisplatin-based chemotherapy for testis cancer. **Sem Oncol**, 15: 345-350, 1988.

RUSSELL, L.D.; CLERMONT, Y. Degeneration of germ cells in normal hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. **Anat Rec**, 187:347, 1977.

RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Clearwater, Fla: Cache River Press, 1990.

SCHAEPI, U.; HEYMAN, I.A.; FLEISCHMAN, R.W.; ROSENKRANTZ, H.; ILIEVSKI, V.; PHELAN, R.; COONEY, D.A.; DAVIS, R.D. cis-Dichlorodiammineplatinum (II) (NSC-119875): preclinical toxicologic Evaluation of intravenous injection in dogs, monkeys and mice. **Toxicol Appl Pharmacol**, 25:230-241, 1973.

SCHONBAUM, G.R.; CHANCE, B. Catalase. In: **The enzymes** (2nd ed.), edited by P.D. Boyer. New York: Academic, v. XIII, 1979.

SCHRADER, M.; MULLER, M.; STRAUB, B.; MILLER, K. Testicular sperm extraction in azoospermic patients with gonadal germ cell tumors prior to chemotherapy - a new therapy option. **Asian J Androl**, 4(10):9-15, 2002.

SEAMAN, F.; SAWHNEY, P.; GIAMMONA, C.J.; RICHBURG, J.H. Cisplatin-induced pulse of germ cell apoptosis precedes long-term elevated apoptotic rates in C57/BL/6 mouse testis. **Apoptosis**, 8:101-108, 2003.

SELBY, P; PATEL, P; MILAN, S; MELDRUM, M; MANSI, J; MBIDDE, E; BRADA, M; PERREN, T; SWIERSTRA, EE; FOOTE, RH. Duration of spermatogenesis and spermatozoan transport in the rabbit based on cytological changes, DNA synthesis and labeling with tritiated thymidine. **Am J Anat**, 116: 401, 1990.

SENER, G.; SATIROGLU, H.; KABASAKAL, L.; ARBAK, S.; ÖNER, S.; ERCAN, F.; KEYER-UYSAL, M. The protective effect of melatonin on cisplatin nephrotoxicity. **Fundam Clin Pharmacol**, 14(6):553-560, 2000.

SETCHELL, B.P. Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P.T. (Ed.) **Reproduction in domestic animals**. San Diego, CL: Academic Press, 1991.

SHARPE, R.M.; DONACHIE, K.; COOPER, I. Re-evaluation of the intratesticular level of testosterone required for quantitative maintenance of spermatogenesis in the rat. **Journal of Endocrinology**, 117: 19-26, 1988a.

SHARPE, R.M.; FRASER, H.M.; RATNASOORIYA, W.D. Assessment of the role of Leydig cell products other than testosterone in spermatogenesis and fertility in adult rats. **Int J Androl**, 11:507-523, 1988.

SÖNMEZ, M.; TÜRK, G.; YÜCE, A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. **Theriogenology**, 63:2063-2072, 2005.

SPITZ, D.R.; PHILLIPS, J.W.; ADAMS, D.T.; SHERMAN, C.M.; DEEN, D.F.; LI, G.C. Cellular resistance to oxidative stress is accompanied by resistance to cisplatin: the significance of increases catalase activity and total glutathione in hydrogen peroxide-resistant fibroblasts. **J Cel Physiol**, 156(1):72-79. 1993.

STAHL, O.; EBERHARD, J.; JEPSON, K.; SPANO, M.; CWIKIEL, M.; CAVALLIN-STAHL, E.; GIWERCMAN, A. The impact of testicular carcinoma and its treatment on sperm DNA Integrity. **Cancer**, 100(6):1137-1144, 2004.

STOCKER, R.; FREI, B. Endogenous antioxidant defenses in human blood plasma. In Sies, H., editor. **Oxidative stress:oxidants and antioxidants**. London: Academic Press, 1991.

SUGIHARA, K; GEMBA, M. Modification of cisplatin toxicity by antioxidants. **Jpn J Pharmacol**, 40(2): 353-355, 1986.

TAKAHASHI, K.; NEWBERGER, P.E.; COHEN, H.J. Glutathione peroxidase protein: absence in selenium deficiency states and correlation with enzymatic activity. **J Clin Invest**, 77:1402, 1986.

TAKSEY, J.; BISSADA, N.K.; CHAUDHARY, U.B. Fertility after chemotherapy for testicular cancer. **Arch Androl**, 49(5):389-95, 2003.

THACHIL, J.V.; JEWETT, M.A.S.; RIDER, W.D. The effects of cancer and cancer therapy on male fertility. **J Urol**, 126: 141, 1981.

TOKUNAGA, J.; KOBAYASHI, M.; KITAGAWA, A.; MAKAMURA, C.; ARIMORI, K.; NAKANO, M. Protective effects of betamipron on renal toxicity during repeated cisplatin administration in rats and protective mechanism. **Renal Failure**, 20(1):27-38, 1998.

ULUBAS, B.; BURAK CIMEN, M.Y.; APA, D.D.; SARITAS, E.; MUSLU, N.; CIMEN, O.B. The protective effects of acetylsalicylic acid on free radical production in cisplatin induced nephrotoxicity: na experimental rat model. **Drug and Chemical Toxicology**, 26(4):259-271, 2003.

VAWDA, A.I.; DAVIES, A.G. Effects of cisplatin on the mouse testis. **Acta Endocrinologica**, 112: 436-441, 1986.

WAXMAN, JH; TERRY, Y; A., WRIGLEY, PF; MALPAS, JS; REES, LH; BESSER, GM; VIGERSKY, RA; CHAPMAN, RM; BERENBERG, J; GLASS, AR. Testicular dysfunction in untreated Hodgkin's disease. **Amer J Med**, 73: 482, 1982.

WEIJL, N.I.; CLETON, F.J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treat Rev**, 23:209-240, 1997.

WEIJL, N.I.; HOPMAN, G.D.; WIPKINK-BAKKER, A.; LENTJES, E.G.W.M.; BERGER, H.M.; CLETON, F.J.; OSANTO, S. Cisplatin combination chemotherapy induces a fall in plasma antioxidants of cancer patients. **Annals of Oncology**, 9:1331-1337, 1998.

WHITE, W.J.; FIELD, H.J. Anesthesia and surgery of laboratorie animals. **Vet Clin North Am**, 17:989-1017, 1987.

WOZNIAK, K.; BLASIAK, J. Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts. **Acta Biochim Pol**, 49(3):583-596, 2002.

WU, S.H.; OLDFIELD, J.E.; WHANGER, P.D.; WESWIG, P.H. Effect of selenium, vitamin E and antioxidants on testicular function in rats. **Biol Reprod**, 8: 625-629, 1973.

ZHANG, X.; YAMAMOTO, N.; SORAMOTO, S.; TAKENAKA, I. Cisplatin-induced germ cell apoptosis in mouse testes. **Arch Androl**, 46(1):43-9, 2001.

ZWELLING, L.A.; KOHN, K.W. Mechanism of action of cis-dichlorodiammineplatinum (II). **Cancer Treat Rep**, 63(9-10):1439-1444, 1979.

9- FONTES CONSULTADAS

AYRES, M. **BioEstat**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Manaus: Sociedade Civil Mamirauá, 1998.

FERREIRA, A.B.H. **Novo Dicionário Aurélio da Língua Portuguesa**. 2. ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1986.

GLANTZ, S.A. **Primer of biostatitics**. 4. ed. U.S.A.: McGraw-Hill, 1996.

UNICAMP. Faculdade de Ciências Médicas. Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Campinas, 2004. Disponível em: http://www.fcm.unicamp.br/administracao/areas/dadcc/normas_teses/normatizacao_padron.htm. Acesso em: 4 abr. 2005.

10- ANEXO



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 320-1, sobre "Avaliação dos efeitos do anti-neoplásico Cisplatinum (cis-diamino-dicloro-platinum) com e sem uso de antioxidantes sobre a espermatogênese de ratos Wistar" sob a responsabilidade de Ulirajara Ferreira / Marcos Antonio Santana Castro está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 8.11.2001. Este certificado expira em 7.11.2002.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 320-1, entitled "....."
....."
is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on 8.11.2001. This certificate expires on 7.11.2002
(d) (m) (y)

Campinas, 8 de novembro de 2001.

Alba R. M. Souza Brito
Profa. Dra. Alba R. M. Souza Brito
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Armando Ferreira Lima
Prof. Dr. Armando Ferreira Lima
Secretário - CEEA/IB/UNICAMP