

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KATLYN BARP MEYER

**EFEITOS DO ANTIVIRAL GANCICLOVIR SOBRE O DESENVOLVIMENTO E
FUNÇÃO GONADAL DE RATOS MACHOS EXPOSTOS *IN UTERO***

CURITIBA

2017

KATLYN BARP MEYER

**EFEITOS DO ANTIVIRAL GANCICLOVIR SOBRE O DESENVOLVIMENTO E
FUNÇÃO GONADAL DE RATOS MACHOS EXPOSTOS *IN UTERO***

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutorado em Fisiologia,
ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia,
Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Rosana Nogueira de
Morais.

Coorientador: Prof. Dr. Anderson Joel Martino
Andrade

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Meyer, Katlyn Barp

Efeitos do antiviral ganciclovir sobre o desenvolvimento e função gonadal de ratos machos expostos *in utero*. / Katlyn Barp Meyer. – Curitiba, 2017.

81 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Rosana Nogueira de Moraes

Coorientador: Anderson Joel Martino Andrade

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Toxicologia 2. Agentes antivirais 3. Saúde reprodutiva 4. Testículos 5. Gonadas I. Título II. Moraes, Rosana Nogueira de III. Andrade, Anderson Joel Martino IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 612.61



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado, a qual se submeteu **KATLYN BARP MEYER** para fins de obter o título de Doutor em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à APROVAÇÃO da acadêmica.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

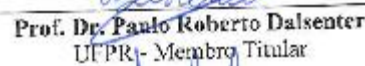
Curitiba, 31 de agosto de 2017.


Prof. Dra. Taiza Stumpp Teixeira

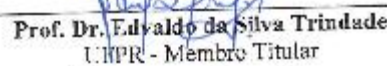
UNIFESP - Membro Titular


Prof. Dra. Flávia Sant'Anna Rios

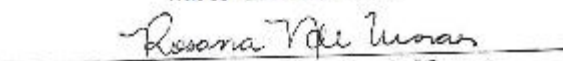
UFPR - Membro Titular


Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter

UFPR - Membro Titular


Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade

UFPR - Membro Titular


Prof. Dra. Rosana Nogueira de Moraes
UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

AGRADECIMENTOS

À minha família, aonde encontro suporte para seguir essa jornada.

À minha orientadora, mãe e amiga, *Profa. Dra. Rosana Nogueira de Moraes*, com quem aprendi não somente sobre a pesquisa científica, mas também a como lidar com a vida.

Ao meu co-orientador, *Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade*, pelas discussões e indicações dos caminhos a seguir.

Aos meus colegas de laboratório, *Amanda, Andrei, Diogo, Evaldo, Paulo, Rafaela e Dária*, pelo suporte nos experimentos, por terem tornado meus dias mais divertidos, pelos conselhos e por compartilharem meus anseios e alegrias.

Ao Programa de pós-graduação em fisiologia da UFPR, pelo suporte financeiro para a compra do ganciclovir.

Ao *Dr. Davyson Moreira*, da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, pela dosagem da concentração plasmática de ganciclovir.

Ao *Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior*, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, por ter propiciado a execução da morfometria testicular deste estudo. E aos colegas *Alluanan, Jéssica e Fabiana*, por terem me recebido tão bem e tornarem a estadia em Recife uma das melhores experiências da minha vida.

À *Profa. Dra. Taiza Stumpp*, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) por ter fornecido os meios e o conhecimento para a execução da imunofluorescência. E às brilhantes colegas *Isabelle, Letícia, Marina, Helena e Gabriela*, que me auxiliaram e torceram junto pelo sucesso desta etapa do trabalho.

Aos técnicos da Universidade Federal do Paraná: *Gilmara e Luana* (Biotério central); *Lisandra e Israel* (Laboratório multiusuário de microscopia de fluorescência convencional e confocal); *Fábio e Hely* (Departamento de fisiologia); e ao secretário *Roberto* (Programa de pós-graduação em fisiologia).

Aos demais professores do departamento de Fisiologia da UFPR que auxiliaram na minha formação acadêmica e discutiram este estudo.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente participaram da execução deste estudo, meus mais sinceros agradecimentos!

RESUMO

Malformações e disfunções do sistema reprodutor masculino observadas no indivíduo adulto podem resultar de disfunções da gônada fetal. Um dos fatores que modifica a função testicular fetal é a exposição a xenobióticos, dentre os quais, o antiviral ganciclovir (GCV). A exposição ao GCV no dia 10 de gestação (DG10) causa o desenvolvimento de túbulos seminíferos contendo apenas células de Sertoli (TACS). Como o mecanismo de ação do GCV está relacionado com o metabolismo do DNA e inibição da proliferação celular, aventa-se que os TACS ocorrem por efeito citotóxico do GCV sobre as células germinativas. Para testar esta hipótese, expusemos ratas gestantes a 300 mg/kg de GCV (três injeções subcutâneas de 100 mg/kg) no DG10, 14 e 19, quando as células germinativas apresentam, respectivamente, taxas elevadas de migração, proliferação ou estão mitoticamente quiescentes. Os descendentes masculinos expostos ao GCV no DG 10 e 14 foram avaliados para marcadores de androgenização, andrógenos fecais e séricos e histomorfometria testicular, quando adultos. Nos testículos fetais (DG15 e 20), utilizamos a imunofluorescência de dupla marcação para DAZL (marcador específico de células germinativas) e Ki67 (marcador de proliferação celular) para investigar o número de gonócitos e a atividade proliferativa de células germinativas e somáticas, 24 h após a primeira injeção do GCV. Os ratos adultos expostos no DG14 apresentaram redução de 50% no peso testicular, resultado da redução nos volumes do espaço intersticial e dos túbulos seminíferos, dos quais em torno de 30% eram TACS. Apresentaram, ainda, atraso na puberdade, apesar dos níveis normais de androgênios. Nos animais expostos no DG10 os efeitos foram menos pronunciados, com redução de 30% do peso testicular e 12% de ocorrência de TACS. Em ambos os grupos, a população de células de Sertoli foi reduzida, com aumento no índice de células de Sertoli (razão entre o número de espermátides redondas por célula de Sertoli) nos animais expostos no DG14. Nos testículos fetais, o número de células germinativas foi reduzido em 50% nos ratos expostos no DG14, enquanto permaneceu inalterado naqueles expostos no DG19. No entanto, a exposição ao GCV no DG 19 reduziu a imunomarcação do Ki67 das células de Sertoli, o que indica que o GCV reduziu a proliferação num período da gestação em que normalmente as células de Sertoli apresentam alta taxa de proliferação. Em conclusão, a exposição ao GCV durante a gestação parece apresentar efeitos tóxicos sobre células somáticas e germinativas testiculares. No entanto, a toxicidade do GCV sobre as células germinativas é mais pronunciada e está diretamente relacionada com a taxa de proliferação. Esse efeito é tempo-dependente e, em ratos, o DG 14 é uma janela crítica de sensibilidade ao GCV, já que a exposição nesse dia causou uma perda maciça aguda das células germinativas, a qual persistiu até a idade adulta.

Palavras-chave: Toxicologia. Células germinativas. Desordens reprodutivas masculinas. Antiviral.

ABSTRACT

Impairment of fetal gonadal development can lead to malformations and dysfunction of the male reproductive system in adult life. Several factors are potentially disruptors of the fetal testicular function, including exposure to xenobiotics such as the antiviral ganciclovir (GCV). Exposure to GCV at day 10 of gestation (GD10) causes the development of seminiferous tubules containing only Sertoli cells (SCOT). As the mechanism of action of GCV is related to DNA metabolism and inhibition of cell proliferation, SCOT could be a consequence of the cytotoxic effect of GCV on germ cells migration and proliferation. To test this hypothesis, we treated pregnant rats with 300 mg/kg of GCV (three subcutaneous injections of 100 mg/kg) at GD10, 14 and 19, when germ cells show high rates of migration, proliferation or are mitotically quiescent, respectively. Male offspring exposed to GCV at GD10 and 14 were evaluated for androgenic markers, fecal and serum androgens and testicular histomorphometry when adults. In the fetal testis (GD15 and 20), we used double-label immunofluorescence for DAZL (germ cell specific marker) and Ki67 (cell proliferation marker) to investigate the number of gonocytes and the proliferative activity of germ cells and somatic cells, 24 h after the first injection of GCV. The adult rats exposed at GD14 presented a 50% reduction in the testicular weight, as a result of a volume reduction of the seminiferous tubules (30% were SCOT) and of the interstitial space. GD14 animals had also delayed puberty, despite normal levels of androgens. In the animals exposed at GD10, the effects were less pronounced, with a reduction of 30% in testicular weight and 12% of SCOT. In both groups, the Sertoli cell population was reduced, with an increase in the Sertoli cell index (ratio of the number of round spermatids per Sertoli cell) in the animals exposed in GD14. In the fetal testis, the number of germ cells was reduced by 50% in the rats exposed in GD14, while it remained unchanged in GD19 testes. However, exposure to GCV in GD19 reduced Ki67's immunostaining, indicating that GCV reduced the proliferation of Sertoli cells in a period of the gestation when Sertoli cells are expected to have a high proliferation rate. In conclusion, exposure to GCV during gestation causes toxic effects on somatic and testicular germinative cells. However, the toxicity of GCV on germ cells is more pronounced and is directly related to the rate of proliferation. This effect is time-dependent and, in rats, GD14 is a critical window of sensitivity to GCV, since exposure at GD14 caused a massive acute loss of germ cells, which persisted into adulthood.

Key-words: Toxicology. Germ cell. Male reproductive disorders. Antiviral.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Síndrome da disgenesia testicular.....18
- Figura 2 - Linha temporal da diferenciação testicular em ratos.....19
- Figura 3 - Trajetória de migração das células germinativas primordiais.....21
- Figura 4 - Aspecto morfológico de túbulos seminíferos normais e contendo apenas células de Sertoli de ratos adultos.....25
- Figura 5 - Estrutura química do antiviral ganciclovir e da guanosina.....30
- Figura 6 - Ganho de peso corporal das ratas gestantes expostas a 1 mL/kg de salina 0,9% (controle) ou 300 mg/kg de ganciclovir nos dias de gestação 10 (GCV10) ou 14 (GCV14).....48
- Figura 7 - Ganho de peso corporal de ratos machos expostos ao veículo (controle; n = 13) ou 300 mg/kg de ganciclovir nos dias de gestação 10 (GCV10; n = 9) ou 14 (GCV14; n = 11).....50
- Figura 8 - Índice da distância anogenital (IAG = AGD/peso corporal^{1/3}) de ratos machos após exposição ao veículo (controle; n = 13) ou 300 mg/kg de ganciclovir no dia de gestação 10 (GCV10; n = 9) ou 14 (GCV14; n = 11). a e b p<0,05, significativamente diferente do controle (ANOVA/Tukey).....51
- Figura 9 - Percentual de ratos machos que atingiram a separação prepucial por períodos de dia pós-natal (DPN 45-47, 48-50, 51-53, 54-76), expostos ao veículo (controle; n = 13) ou 300 mg/kg de GCV nos dias de gestação 10 (GCV10; n = 9) ou 14 (GCV14; n = 11).....51
- Figura 10 - Aspecto histológico testicular de ratos no dia pós-natal 90, após exposição ao veículo (controle; A, C, E e G) ou 300mg/kg de ganciclovir, no dia de gestação 10 ou 14 (GCV; B, D, F e H).....53
- Figura 11 - Percentual de túbulos seminíferos normais em ratos machos expostos ao veículo (controle; n = 13) ou 300mg/kg de ganciclovir, nos dias de gestação 10 (GCV10; n = 9) ou 14 (GCV14; n = 8). * p<0,05 significativamente diferente dos grupos controle e GCV10 (ANOVA/Tukey).....54
- Figura 12 - Concentração de metabólitos fecais de testosterona (ng/g de fezes) de ratos machos expostos à 1 mL/kg de salina (controle; n = 10) ou 300 mg/kg de ganciclovir nos dias de gestação 10 (GCV10; n = 7) ou 14 (GCV14; n = 11).....57
- Figura 13 - Reação de imunofluorescência das proteínas DAZL (vermelho) e Ki67 (verde) e coloração com DAPI (azul) do parênquima testicular de ratos, 24h após a exposição a 1ml/kg de veículo (C14, a – d) ou 300 mg/kg de ganciclovir (GCV14, e – h) no DG 14.....58

- Figura 14 - Reação de imunofluorescência das proteínas DAZL (vermelho) e Ki67 (verde) e coloração com DAPI (azul) do parênquima testicular de ratos, 24h após a exposição a 1ml/kg de veículo (C19, a – d) ou 300 mg/kg de ganciclovir (G19, e – h) no DG 19..... 59
- Figura 15 - Densidade numérica de gonócitos marcados por DAZL em testículo fetal de ratos machos no dia de gestação 15 e 20 após exposição ao veículo (C14 e C19) ou 300mg/kg de ganciclovir nos dias de gestação 14 (GCV14) e 19 (GCV19).....59

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Resultados reprodutivos (Média \pm EPM) de ratas expostas ao veículo (controle) ou 300 mg/kg de ganciclovir nos dias de gestação 10 (GCV10) ou 14 (GCV14).....49
- Tabela 2 - Peso absoluto (g) e relativo (g%) de órgãos de ratos machos adultos (Média \pm EPM) expostos ao veículo ou 300 mg/kg de ganciclovir nos dias de gestação 10 ou 14.....51
- Tabela 3 - Morfometria de túbulos seminíferos (Média \pm EPM) e composição volumétrica do parênquima testicular de ratos machos adultos expostos ao veículo ou 300 mg/kg de ganciclovir nos dias de gestação 10 ou 14.....55
- Tabela 4 - Número de células contadas em túbulos seminíferos normais em estágio VII e em túbulos seminíferos apenas com células de Sertoli (TACS) (Média \pm EPM) de ratos machos adultos expostos ao veículo ou 300 mg/kg de ganciclovir no dia de gestação 10 (GCV10) ou 14 (GCV14).....56
- Tabela 5 - Morfometria de células de Leydig (Média \pm EPM) de ratos machos adultos expostos ao veículo ou 300 mg/kg de ganciclovir nos dias de gestação 10 ou 14.....56

LISTA DE ABREVIATURAS

ACV – Aciclovir

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida

AMH – Hormônio anti-mülleriano

CGP – Células germinativas primordiais

CL – Células de Leydig

Cmax – Concentração máxima

CMV - Citomegalovirus

CS – Células de Sertoli

DAG – Distância anogenital

DEHP – Di(2-etilhexil) ftalato

DG – Dia de gestação

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPN – Dia pós-natal

Esptg – Espermatogônias

FSH – Hormônio folículo estimulante

GCV – Ganciclovir

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

IL-2 – Interleucina - 2

Insl3 – Hormônio semelhante à insulina 3

LH – Hormônio luteinizante

PCV – Penciclovir

SDT – Síndrome da disgenesia testicular

T – Testosterona

TACS – Túbulos seminíferos apenas com células de Sertoli

TC – Timidina cinase

TS – Túbulos seminíferos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 PROGRAMAÇÃO FETAL.....	17
2.2 DIFERENCIAÇÃO E DESENVOLVIMENTO TESTICULAR EMBRIONÁRIO EM RATOS	19
2.3 TÚBULOS SEMINÍFEROS APENAS COM CÉLULAS DE SERTOLI.....	25
2.4 GANCICLOVIR.....	29
2.4.1 Toxicidade	32
2.4.2 Toxicidade testicular.....	35
3 HIPÓTESES E PREDIÇÕES	38
4 OBJETIVOS	39
4.1 OBJETIVO GERAL.....	39
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
5 MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1 ANIMAIS.....	40
5.2 EXPOSIÇÃO AO GANCICLOVIR.....	40
5.3 EXPERIMENTO 1: DOSAGEM DE GANCICLOVIR NO PLASMA DE RATAS GESTANTES.....	41
5.4 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES MASCULINOS ADULTOS	41
5.4.1 Perfusão intracardíaca e processamento histológico dos testículos....	43
5.4.2 Avaliação da morfologia testicular.....	43
5.4.2.1 Quantificação de túbulos seminíferos afetados pela exposição ao GCV.....	43
5.4.2.2 Avaliação morfométrica do parênquima testicular.....	44
5.4.2.3 Contagem e estimativa das populações celulares no epitélio seminífero.....	45
5.4.2.4 Morfometria das células de Leydig.....	46

5.4.3. Processamento de amostras fecais e quantificação de metabólitos fecais de testosterona e de testosterona sérica	46
5.5 EXPERIMENTO 3: IMUNOMARCAÇÃO PARA KI67 E DAZL E DENSIDADE DE GONÓCITOS	47
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
6 RESULTADOS	49
6.1 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE GCV NAS RATAS GESTANTES.....	49
6.2 RESULTADOS DA GESTAÇÃO.....	49
6.3 DESENVOLVIMENTO DOS DESCENDENTES MASCULINOS.....	50
6.4 EFEITOS DO GANCICLOVIR SOBRE A MORFOLOGIA TESTICULAR.....	53
6.4.1 Morfometria testicular.....	55
6.5 CONCENTRAÇÃO DE TESTOSTERONA SÉRICA E DE METABÓLITOS FECAIS DE TESTOSTERONA	57
6.6 DENSIDADE NUMÉRICA DOS GONÓCITOS E ANÁLISE DESCRITIVA DA IMUNOMARCAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO.....	58
7. DISCUSSÃO	61
8. CONCLUSÕES	67
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento pré-natal é considerado um período crítico na etiologia de diversas doenças. Alterações induzidas no ambiente intrauterino, incluindo a exposição a determinadas substâncias químicas, pode levar a uma série de modificações no feto, as quais podem se manifestar na forma de doenças ou disfunções orgânicas na vida pós-natal (MARCINIAK et al., 2017). Este tipo de efeito já foi demonstrado sobre diversos sistemas orgânicos, incluindo o sistema reprodutor. Nos machos, estudos experimentais e epidemiológicos já demonstraram que danos causados sobre as células testiculares durante o desenvolvimento gonadal fetal resulta em malformações e disfunções do sistema reprodutor masculino, tanto em animais como no homem, comprometendo a fertilidade.

Em humanos, a exposição pré-natal aos xenobióticos e fatores associados ao estilo de vida vem sendo relacionados com a queda na contagem espermática, com o aumento na incidência de câncer testicular, na frequência de criptorquidismo e hipospadias e com o aparente aumento na demanda por reprodução assistida (CARLSEN et al., 1992; SHARPE; SKAKKEBAEK, 1993; SKAKKEBAEK; RAJPERT-DE MEYTS; MAIN, 2001; MCGLYNN; COOK, 2009; LEVINE et al., 2017). Modificações da função das células somáticas e germinativas durante o período de organogênese testicular podem levar a alterações do sistema reprodutor masculino, incluindo alterações mais discretas na morfologia testicular como a presença de túbulos seminíferos apenas com células de Sertoli (TACS), hiperplasia de células de Leydig e microcalcificações no interior dos túbulos seminíferos (microlitíase) (JUUL et al., 2014; SKAKKEBAEK et al., 2003). Estudos experimentais em animais (AKINGBEMI et al., 2004; ANDRADE et al., 2006; KITA et al., 2016) e epidemiológicos em humanos, sustentam a relação entre disfunção das células testiculares durante a organogênese e as desordens do sistema reprodutor masculino na vida pós-natal que deram origem à hipótese da síndrome da disgenesia testicular (SDT) (SKAKKEBAEK; RAJPERT-DE MEYTS; MAIN, 2001; SKAKKEBAEK, 2004; SHARPE; SKAKKEBAEK, 2008; TOPPARI et al., 2010)

Diversos contaminantes ambientais, como plastificantes, metais pesados (PIZENT; TARIBA; ŽIVKOVIĆ, 2012), resíduos da agroindústria (JOSHI; SHARMA, 2011) e de processos industriais (QUEIROZ; WAISSMANN, 2006), têm a capacidade

de interferir no desenvolvimento e função testicular. Além destes, até mesmo alguns medicamentos tem sido relacionados com o desenvolvimento de disfunções testiculares, como anti-inflamatórios (DUMORTIER et al., 2011; VYAS et al., 2016), analgésicos (DEAN et al., 2016; HOLM et al., 2016), e antivirais (BAIRY; KUMAR; RAO, 2009; MOVAHED et al., 2013), como o ganciclovir (GCV) (FAQI et al., 1997; KLUG et al., 1991; NIHI et al., 2014; QIU et al., 2016), que é o objeto do nosso estudo.

O GCV é utilizado para tratar a citomegalovirose, uma doença oportunista causada pelo citomegalovirus (CMV), a qual atinge, principalmente, pessoas com o sistema imunológico comprometido, como é o caso de receptores de transplante de órgão, pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) ou pacientes sob terapia com imunossupressores (LANDOLFO et al., 2003). Os sintomas da citomegalovirose são amplos e genéricos como dores de cabeça e muscular e febre, podendo incluir também pneumonia, retinite, miocardite, anemia hemolítica, dentre outros (VANCÍKOVÁ; DVORÁK, 2001). O diagnóstico pode ser realizado a partir da detecção do DNA viral através da reação em cadeia da polimerase (PCR) no sangue ou outros fluidos corporais, mas também por meio de imuno-histoquímica em biópsias de fígado ou pulmão, por exemplo (LANDOLFO et al., 2003). O quadro mais grave da citomegalovirose ocorre em neonatos que podem ser infectados via transplacentária, no parto ou durante a amamentação. Nestes a citomegalovirose pode evoluir para quadros de déficit sensorial, cognitivo e motor relacionados com a infecção do sistema nervoso central (SWANSON; SCHLEISS, 2013).

O tratamento de mulheres gestantes com o GCV é considerado de risco para o desenvolvimento de teratogenia, embora ainda não existam relatos científicos do desenvolvimento de teratogenia após o tratamento de mulheres gestantes com o GCV (BRIGGS; FREEMAN; YAFFE, 2001; PESCOVITZ, 1999; PULIYANDA et al., 2005), alterações no desenvolvimento fetal já foram descritas em modelos experimentais (BRIGGS; FREEMAN; YAFFE, 2001; KLUG et al., 1991). Isso reforça a atenção que deve ser tomada quando há necessidade de tratamento de gestantes com o GCV. Nos modelos experimentais expostos *in utero* a doses elevadas de GCV (da ordem de 100x a dose de tratamento utilizada em humanos), houveram alterações no número de somitos, no desenvolvimento da cabeça e do pericárdio dos fetos (KLUG et al., 1991). Além disso, dependendo do momento da gestação em que a exposição de modelos experimentais ocorre, foram observadas também alterações testiculares nos

descendentes, com comprometimento da espermatogênese e, potencialmente, da fertilidade dos animais (HARTMANN et al., 1991; NIHI et al., 2014).

A exposição de ratas gestantes a 300 mg/kg de GCV no dia de gestação (DG) 10 causou redução do peso testicular nos descendentes adultos e a ocorrência de cordões/túbulos seminíferos contendo apenas células de Sertoli (TACS) nos fetos no DG 20, bem como nos descendentes adultos, indicando efeitos permanentes da exposição ao GCV durante a gestação (NIHI et al., 2014). O período de exposição escolhido pelos autores (DG10) é considerada uma janela temporal crítica para a organogênese testicular de ratos, quando há migração e início da proliferação de células germinativas (ENCINAS; ZOGBI; STUMPP, 2012; KEMPER; PETERS, 1987).

Os efeitos testiculares da exposição ao GCV também são observados quando a exposição ocorre apenas na fase adulta. FAQI et al. (1997) expuseram ratos adultos a 300 mg/kg de GCV e observaram redução progressiva do peso testicular e do número de espermatozoides, com valores mínimos registrados depois de oito semanas do tratamento. Entretanto, diferente do que ocorre nos ratos expostos ao GCV *in utero*, nos quais o efeito sobre o epitélio seminífero pode ser observado já no 20 DG e perdura até o dia pós-natal (DPN) 90, nos ratos adultos ocorre recuperação gradual do epitélio seminífero. Os níveis normais de peso testicular e produção espermática são restaurados 24 semanas após a exposição ao GCV, evidenciando um efeito temporário do GCV sobre o testículo do animal adulto. Assim, aparentemente, nos ratos adultos, o efeito citotóxico do GCV ocorreria sobre as células germinativas nos estágios iniciais da espermatogênese, mas não sobre as espermatogônias-tronco (FAQI et al., 1997).

Apesar dos achados descritos anteriormente, ainda não estão esclarecidos os mecanismos pelos quais o GCV induz as alterações testiculares. Os resultados obtidos por Nihi et al. (2014) sugerem que o GCV pode interferir na colonização dos testículos pelas células germinativas, provavelmente por alterar a migração ou a sobrevivência destas células, resultando em disfunção testicular permanente. Já os resultados de Faqi et al. (1997) demonstram haver maior susceptibilidade de alguns tipos celulares da linhagem germinativa do que em outros.

O fato de a exposição *in utero* ao GCV causar efeitos permanentes sobre o epitélio seminífero de ratos é bastante preocupante. Ainda que não se possa extrapolar diretamente esses dados para humanos, existe o potencial para esse mesmo efeito em mulheres gestantes, já que as mesmas podem ser tratadas com o

GCV quando desenvolvem infecção por citomegalovírus. Nessa condição, os fetos do sexo masculino poderiam potencialmente sofrer alteração no desenvolvimento testicular por ação do GCV. Frente a este cenário, nós investigamos os efeitos da exposição pré-natal ao GCV em diferentes janelas do desenvolvimento testicular de ratos, buscando esclarecer os mecanismos envolvidos. Considerando que o GCV tem efeito sobre o metabolismo do DNA e que as células germinativas são, aparentemente, mais sensíveis ao efeito citotóxico do antiviral (FAQI et al., 1997; NIHI et al., 2014), nós expusemos ratas gestantes ao GCV em momentos do desenvolvimento testicular em que as células germinativas estão passando por diferentes processos: migração e proliferação, somente proliferação e em fase estacionária. Nossa hipótese é a de que os efeitos da exposição ao GCV sobre o desenvolvimento testicular dependem do momento da exposição em relação aos diferentes processos pelos quais as células germinativas e somáticas passam durante as etapas de organização dos túbulos seminíferos.

Sendo assim, nós expusemos ratas gestantes ao GCV nos dias 10, 14 ou 19 da gestação, quando, nos fetos masculinos, as células germinativas têm altas taxas de migração, proliferação ou estão em fase estacionária, respectivamente. Nos descendentes machos adultos expostos ao GCV no DG 10 ou 14 avaliamos a função testicular por análise morfométrica detalhada do parênquima testicular, medida de testosterona em amostras séricas e fecais e parâmetros andrógeno-dependentes. Adicionalmente, para avaliar se o GCV interfere na proliferação ou na densidade de gonócitos e na proliferação das células somáticas testiculares, avaliamos as gônadas fetais de animais expostos no DG 14 ou 19 através do uso de anticorpos específicos para as proteínas de proliferação, Ki67, e de gonócitos, DAZL, associado com a visualização em microscopia de imunofluorescência.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROGRAMAÇÃO FETAL

Diversos estudos epidemiológicos e experimentais demonstram que alterações no estado imunológico, nutricional e psicológico da gestante, assim como a exposição a substâncias tóxicas, contaminantes ambientais e até mesmo a alguns medicamentos, podem estar relacionados com o desenvolvimento de disfunções orgânicas nos descendentes. As mudanças no ambiente intrauterino podem induzir adaptações genômicas ou da comunicação e sinalização intercelular do feto resultando em modificações estruturais, fisiológicas e metabólicas permanentes. Estas modificações podem predispor o indivíduo a doenças cardiovasculares, metabólicas, endócrinas e reprodutivas durante a vida pós-natal (GODFREY; BARKER, 2001; HÉLÈNE, 2002; ALEXANDER; DASINGER; INTAPAD, 2015; NANDI; MISHRA, 2015; LUCCHESI et al., 2017; MARCINIAK et al., 2017). Esta é a hipótese da programação fetal discutida pela primeira vez pelo epidemiologista britânico David Baker (1992), o qual reporta o desenvolvimento de diabetes do tipo 2 na vida pós-natal relacionado com a má nutrição do indivíduo na vida intrauterina e perinatal (HALES; BARKER, 1992).

A relação entre danos causados durante o desenvolvimento fetal e consequências de longo prazo foi também discutida em relação à função reprodutiva pelos pesquisadores Skakkebaek, Meyts e Main (SKAKKEBAEK; RAJPERT-DE MEYTS; MAIN, 2001), os quais sugerem que o aumento na incidência de câncer testicular, criptorquidismo e hipospadias em homens, assim como a queda na qualidade do sêmen, são sinais de um efeito não explícito da síndrome de disgenesia testicular (SDT). A SDT seria resultado de alterações na função das células somáticas (células de Leydig e de Sertoli) e germinativas, durante o período de organogênese testicular e de diferenciação fenotípica fetal, causando disfunções do sistema reprodutor masculino (FIGURA 1) (CARLSEN et al., 1992; SHARPE; SKAKKEBAEK, 1993; TOPPARI et al., 2010).

Estudos experimentais em roedores expostos *in utero* a substâncias com ação anti-androgênica, como o desregulador endócrino di(2-etilhexil) ftalato (DEHP), demonstraram que ocorre disfunção testicular, malformação do sistema reprodutor e

alteração das características fenotípicas masculinas sustentando a hipótese da SDT. Entretanto diversas outras substâncias químicas podem interferir no desenvolvimento testicular causando malformações e disfunções como metais pesados (PIZENT; TARIBA; ŽIVKOVIĆ, 2012), resíduos da agroindústria (JOSHI; SHARMA, 2011) e de processos industriais (QUEIROZ; WAISSMANN, 2006). Mais recentemente, também vem crescendo as investigações sobre os efeitos da exposição a medicamentos sobre a função testicular. Vários compostos já foram relacionados com disfunções testiculares, como anti-inflamatórios (VYAS et al., 2016), analgésicos (DEAN et al., 2016), e antivirais (BAIRY; KUMAR; RAO, 2009; MOVAHED et al., 2013), como o ganciclovir (GCV), foco deste estudo, o qual tem sido relacionado com o desenvolvimento de malformações embrionárias e alterações testiculares *in vivo* e *in vitro* (FAQI et al., 1997; KLUG et al., 1991; NIHI et al., 2014; QIU et al., 2016).

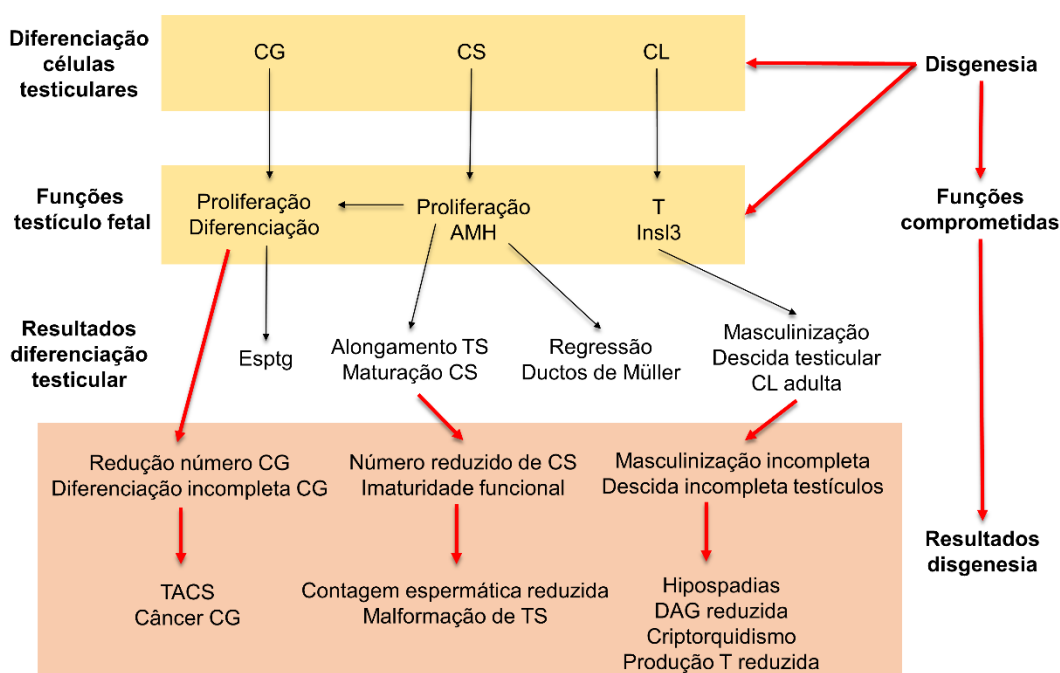


Figura 1 – Síndrome da disgenesia testicular

FONTE: Adaptado de Sharpe e Skakkebaek, 2008.

NOTA: Diagrama esquemático que ilustra como a disgenesia sobre o testículo fetal pode levar a alteração das funções das células somáticas e germinativas, resultando nas desordens que compõe a Síndrome da disgenesia testicular (SDT). A disgenesia pode ser causada por fatores ambientais, como a exposição ambiental aos desreguladores endócrinos, ou por fatores genéticos, como a microdeleções do cromossomo Y e os polimorfismos.

LEGENDA: CG = células germinativas; CS = células de Sertoli; CL = células de Leydig; AMH = hormônio anti-Mülleriano; T = testosterona; InsI3 = hormônio semelhante à insulina 3; Esptg = espermatogônias; TS = túbulos seminíferos; TACS = túbulos apenas com células de Sertoli; DAG = distância anogenital.

2.2 DIFERENCIAÇÃO E DESENVOLVIMENTO TESTICULAR EMBRIONÁRIO EM RATOS

O desenvolvimento gonadal em mamíferos é bastante similar entre as espécies, divergindo muitas vezes, apenas no período da gestação em que cada estágio ocorre (BUEHR, 1997). Como esta tese foi desenvolvida com ratos como modelo experimental, os eventos do desenvolvimento testicular aqui descritos têm como base a linha temporal para esta espécie (FIGURA 2), embora algumas vezes seja apresentado o período correspondente ao evento da organogênese testicular em humanos.

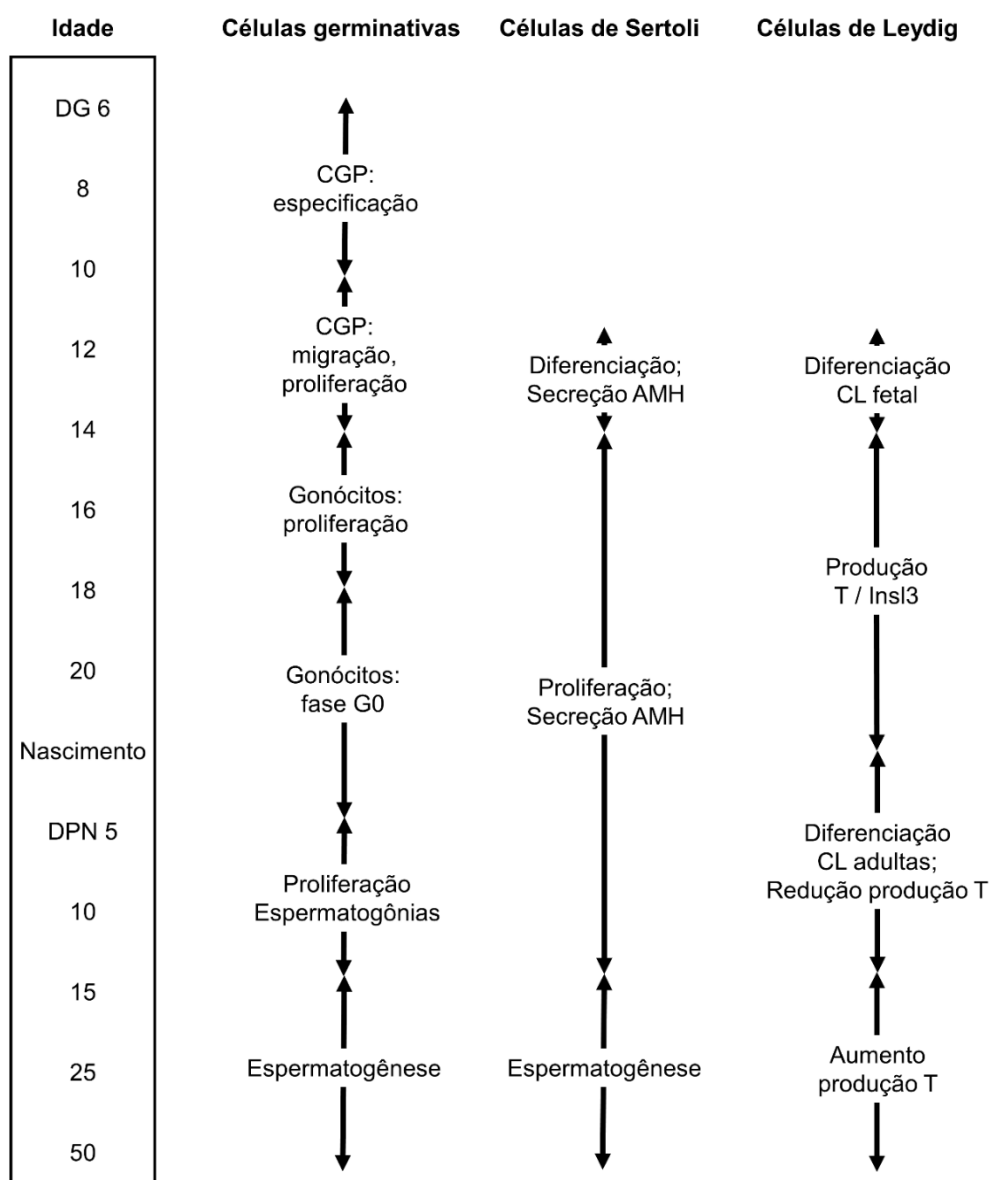


Figura 2 – Linha temporal da diferenciação testicular em ratos

FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: CL = célula de Leydig; DG = dia de gestação; CGP = células germinativas primordiais; AMH = hormônio anti-mülleriano; T = testosterona; InsI3 = fator semelhante à insulina 3; DPN = dia pós-natal.

A determinação do sexo cromossômico do indivíduo ocorre no momento da fecundação, pelos cromossomos sexuais parentais. O desenvolvimento gonadal ocorre a partir de uma gônada bipotencial, a qual pode diferenciar para ovário ou testículo, dependendo da expressão gênica. Caso o embrião tenha no seu DNA o gene *Sry*, normalmente contido no braço curto do cromossomo Y, e a sua expressão ocorra normalmente, isso levará à diferenciação masculina da genitália. A expressão do gene *Sry* desencadeia a diferenciação das células de Sertoli e de Leydig, a produção de androgênios e a diferenciação gonadal e fenotípica do sexo masculino (SWAIN, 2006; EWEN; KOOPMAN, 2010). Nos casos em que a expressão do gene *Sry* não ocorra ou em que a síntese ou a ação da testosterona não ocorram normalmente, como resultado de mutações genéticas nas enzimas esteroidogênicas ou nos receptores de testosterona, independente do sexo cromossômico, haverá diferenciação sexual para um indivíduo do sexo feminino.

As células germinativas primordiais (CGP, FIGURA 2), precursoras dos espermatozoides e ovócitos, são especificadas na região posterior do epiblasto por volta do DG 6-8 em ratos (ZHAO; GARBERS, 2002; MARLOW, 2015), o que equivale aproximadamente a terceira semana de gestação em humanos (KAVOUSSI; COSTABILE; SALONIA, 2013). A especificação depende de moléculas sinalizadoras secretadas pelo ectoderma extraembrionário e endoderma visceral, as quais desencadeiam a expressão de genes específicos das CGP, como o gene *Stella*, ao mesmo tempo que reprimem a expressão de genes específicos das células somáticas (SAGA, 2008). As CGP já determinadas podem ser identificadas pela alta atividade de fosfatase alcalina, na membrana celular e no citoplasma, a partir dos DG 7-8 em ratos (KEMPER; PETERS, 1987; GINSBURG; SNOW; MCLAREN, 1990; SAITOU, 2009; MANKU; CULTY, 2015).

A migração das CGP inicia por volta do DG 8 – 10 em ratos e ocorre, inicialmente, de forma passiva, pois são levadas por meio do movimento de dobramento da endoderme até a parte ventral do intestino posterior (MOLYNEAUX et al., 2001, 2003). Na sequência, elas migram ativamente através do mesentério dorsal do intestino posterior, alcançando as cristas genitais por volta do DG 14 (FIGURA 3) (BUEHR, 1997; MOLYNEAUX et al., 2001; BANDYOPADHYAY et al., 2003; RAZ, 2004; ENCINAS; ZOGBI; STUMPP, 2012). Em humanos, as células germinativas primordiais alcançam as cristas genitais e começam a formar os cordões seminíferos em conjunto com as células de Sertoli por volta da 5^a – 7^a semana de gestação

(WARTENBERG, 1989 *apud* KURIHARA et al., 2010; O'SHAUGHNESSY; FOWLER, 2011; KAVOUSSI; COSTABILE; SALONIA, 2013).

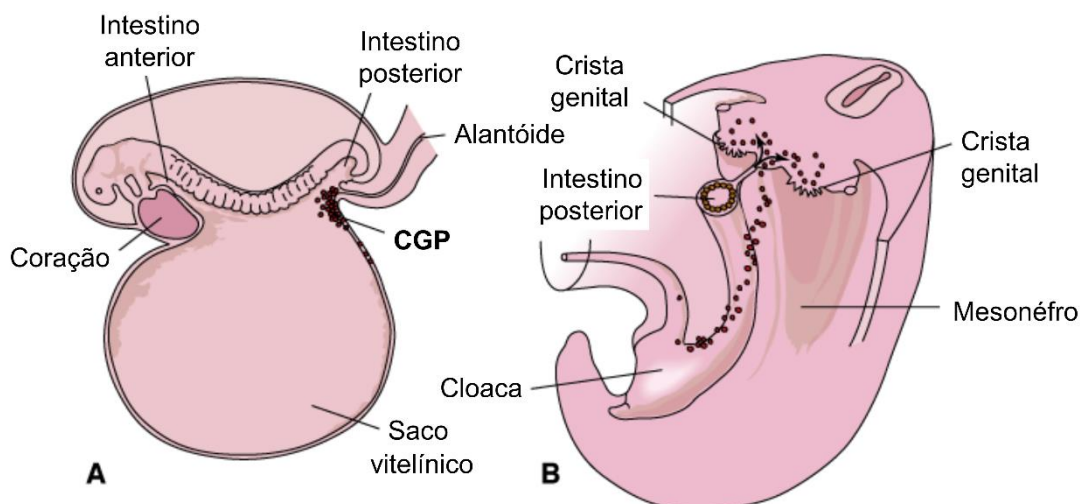


Figura 3 – Trajetória de migração das células germinativas primordiais

FONTE: adaptado de Gardner D.G., Shoback D. *Endocrinology*, 9ª edição. Domínio público, disponível em: <http://www.accessmedicine.com>

NOTA: Desenho esquemático de embrião de mamífero mostrando (A) as células germinativas primordiais (CGP) na parede do saco vitelínico, próximo ao alantóide. (B) Trajetória de migração das CGP a partir do endoderma do intestino posterior e mesentério dorsal do intestino posterior, até as cristas genitais.

Durante a migração, a população de CGP passa pelos processos de mitose, reprogramação epigenética e apoptose. As CGP apresentam um período de duplicação bastante uniforme de, aproximadamente, 16 h e o número de CGP aumenta de poucas células determinadas no DG 6 para uma população de mais de 25.000 por volta do DG 14 na gônada fetal (BEAUMONT; MANDL, 1963; TAM; SNOW, 1981; OHINATA et al., 2005; CULTY, 2009). A extensa reprogramação das informações epigenéticas das CGP através da metilação/demetilação de DNA e da modificação do padrão de histonas tem por objetivo inibir a via de diferenciação das CGP em células somáticas, estabelecer a rede regulatória de transcrição necessária para manter a plasticidade de diferenciação das CGP e deletar parte das informações epigenéticas oriundas dos progenitores (DE FELICI, 2011; GUERRERO-BOSAGNA et al., 2013; CHEN; YAN; DUAN, 2016). A apoptose ocorre em células que apresentam migração errônea e para a eliminação de células germinativas anômalas (BOULOGNE et al., 1999; HERMO et al., 2010).

Quando as CGP se tornam residentes nas cristas genitais e são envolvidas pelas células de Sertoli elas passam a ser denominadas gonócitos. Em ratos, os gonócitos continuam a proliferar até o DG 18, quando entram em fase estacionária,

sem atividade proliferativa, até por volta do DPN 5 em ratos (BOULOGNE et al., 1999; CULTY, 2009; ENCINAS; ZOGBI; STUMPP, 2012). Em humanos, os gonócitos proliferam até por volta da 7ª semana de gestação e voltam a proliferar somente na puberdade (KAVOUSSI; COSTABILE; SALONIA, 2013). Entre os DPN 5 e 8 em ratos (CULTY, 2009; ENCINAS; ZOGBI; STUMPP, 2012; MANKU; CULTY, 2015) e por volta da 14ª semana de gestação em humanos (GONDOS; HOBEL, 1971), os gonócitos migram do centro para próximo da membrana basal dos cordões seminíferos. Em ratos, entram novamente em proliferação até que as primeiras espermatogônias são observadas por volta do DPN 15 (FIGURA 2), as quais permanecem no estado indiferenciado de espermatogônias-tronco ou se diferenciam em espermatogônias do tipo A. Essas últimas irão protagonizar a primeira onda espermatogênica (MEACHEM et al., 2005), quando há também intensa atividade apoptótica das células germinativas, provavelmente para a manutenção de uma razão ideal de células germinativas por células de Sertoli (BOULOGNE et al., 1999; OLASO; HABERT, 2000; RUWANPURA; MCLACHLAN; MEACHEM, 2010; MANKU; CULTY, 2015). Finalmente, por volta do DPN 50 os primeiros espermatozoides podem ser observados na cauda do epidídimo de ratos (ROBB; AMANN; KILLIAN, 1978).

Quanto as células somáticas, as células de Sertoli são as primeiras a se diferenciar nas cristas genitais a partir de células do epitélio celômico, por volta do DG 11 – 12 em ratos (FIGURA 2) (KARL; CAPEL, 1998; OLASO; HABERT, 2000) e por volta da 7ª semana de gestação em humanos (WARTENBERG, 1989 *apud* KURIHARA et al., 2010). As células precursoras das células de Sertoli expressam o gene *Sry*, resultando na proteína SRY, também conhecida por fator determinante testicular, que estimula a expressão de SOX9. Em conjunto, as proteínas SOX9 e SRY induzem a diferenciação da gônada indiferenciada em testículo (OLASO; HABERT, 2000; SWAIN, 2006). São as células de Sertoli que coordenam a diferenciação de outros tipos de células testiculares e organizam o desenvolvimento gonadal (AUHAREK et al., 2010).

Um dos primeiros produtos secretados pelas células de Sertoli é o hormônio anti-Mülleriano (AMH). A principal função do AMH é induzir a regressão dos ductos de Müller no embrião do sexo masculino, os quais dariam origem aos órgãos reprodutores femininos. A sua secreção perdura até o período peripuberal, quando há elevação dos níveis de hormônio folículo estimulante (FSH) e de testosterona (KURODA et al., 1990; WALKER; CHENG, 2005). Neste período, além de cessar a

expressão de AMH, as células de Sertoli também perdem a capacidade de proliferar, o que caracteriza a mudança do estado imaturo para o maduro das células de Sertoli (CARMONA et al., 1998; SHARPE et al., 2003; GERBER; HEINRICH; BREHM, 2016;).

Em diversas espécies são identificados dois momentos distintos em que as células de Sertoli proliferam: o período neonatal e o peripuberal (SHARPE *et al.*, 2003). Em ratos e camundongos estes períodos quase se sobrepõem e, aparentemente, a proliferação das células de Sertoli ocorre de forma contínua. Entretanto, a proliferação das células de Sertoli nos ratos ocorre entre o DG 14 e o DPN 21 (FIGURA 2) (ORTH, 1982; SHARPE et al., 2003; SKINNER, 2005; ANGELOPOULOU et al., 2008; SCOTT et al., 2008; CUPP; PITETTI et al., 2013;), sendo identificados dois momentos de pico de proliferação, um no DG 18 e outro no DPN 7 (ANGELOPOULOU et al., 2008).

Durante os períodos de proliferação estabelece-se o número de células de Sertoli que irão compor o testículo no indivíduo adulto (ORTH; GUNSALUS; LAMPERTI, 1988; RUSSELL et al., 1990), o qual, por sua vez, está intrinsecamente relacionado com o comprimento dos túbulos seminíferos e com a capacidade de produção espermática do indivíduo. Sabe-se que em cada espécie existe um número definido de células germinativas suportadas por cada célula de Sertoli (RUSSELL; PETERSON, 1984; ORTH; GUNSALUS; LAMPERTI, 1988; NEUBAUER et al., 2004) e, portanto, se houver redução do número de células de Sertoli haverá consequente redução do volume testicular e da produção espermática (AUHAREK et al., 2010).

Concomitantemente com a diferenciação das células de Sertoli, ocorre a diferenciação das células de Leydig. Duas populações de células de Leydig se sucedem ao longo da vida do indivíduo, as células de Leydig fetais e as adultas (LORDING; DE KRETZER, 1972). Em ratos, as células de Leydig fetais diferenciam por volta do DG 12 e, entre os DG 14 e 15 (GANGNERAU; PICON, 1987; SCOTT; MASON; SHARPE, 2009), iniciam a produção de testosterona de forma independente de estímulo de hormônios hipofisários (hormônio luteinizante – LH) ou placentários (gonadotrofina coriônica – GC), a qual mantém-se elevada até o DPN 8 (LEE et al., 1975; HARDY; ZIRKIN; EWING, 1989). Em humanos, as células de Leydig diferenciam entre a 7^a e a 8^a semana de gestação, quando iniciam a produção de testosterona estimuladas pela GC secretada pela placenta (KAVOUSSI; COSTABILE; SALONIA, 2013; O'SHAUGHNESSY; FOWLER, 2011) e, por volta da 16^a semana de

gestação, a produção de testosterona começa a ocorrer em resposta ao estímulo do LH fetal (SCOTT; MASON; SHARPE, 2009; KAVOUSSI; COSTABILE; SALONIA, 2013).

O período entre os DG 15 e 19 em ratos (equivalente ao período entre a 8ª e 14ª semanas em humanos) é um período crítico no qual estruturas dependentes de androgênios se desenvolvem como resultado da exposição às concentrações crescentes de testosterona secretada pelas células de Leydig fetais, sendo este período conhecido como janela de masculinização fetal (SCOTT et al., 2008; VAN DEN DRIESCHE et al., 2012; JUUL et al., 2014). Os androgênios secretados pelas células de Leydig fetais promovem a manutenção e a diferenciação dos ductos de Wolff em epidídimos, vasos deferentes e vesículas seminais e influenciam o tamanho de órgãos do sistema reprodutor masculino, como testículo, próstata, vesículas seminais, pênis, glândulas bulbouretrais (JOUBERT; TOBIN; LEBART, 1994). Além disso, a conversão da testosterona em di-hidrotestosterona e estradiol induz a masculinização da genitália externa e do sistema nervoso central, respectivamente (MCCARTHY, 2008; SHARPE, 1998; VAN DEN DRIESCHE et al., 2012).

As células de Leydig fetais também produzem o hormônio semelhante à insulina-3 (Insl3), o qual induz a diferenciação do ligamento do gubernáculo que controla a fase transabdominal de descida testicular para o escroto (ADHAM; EMMEN; ENGEL, 2000). Na ausência deste fator, os testículos não descem para a bolsa escrotal e permanecem na cavidade abdominal, condição à qual se denomina clinicamente de criptorquidismo (HUTSON; HASTHORPE, 2005; TOPPARI et al., 2010). A descida transabdominal dos testículos para a região inguinal ocorre entre a 10ª e a 15ª semana em humanos (KAVOUSSI; COSTABILE; SALONIA, 2013).

Após o nascimento, ocorre a mudança da população de células de Leydig fetais para as células de Leydig adultas, as quais se diferenciam a partir de células-tronco mesenquimais por volta da segunda semana pós-natal em ratos (MENDIS-HANDAGAMA; ARIYARATNE, 2001). Devido à troca da população de células de Leydig a concentração de testosterona declina ao nascimento, tanto em ratos quanto em humanos, mas volta a aumentar gradativamente até a puberdade (LEE et al., 1975; HARDY; ZIRKIN; EWING, 1989).

2.3 TÚBULOS SEMINÍFEROS APENAS COM CÉLULAS DE SERTOLI

Os túbulos seminíferos contendo apenas células de Sertoli (TACS), também denominados túbulos com aplasia das células germinativas, foram descritos pela primeira vez por del Castillo et al. (1947), referindo-se apenas ao achado histológico caracterizado pela presença de túbulos seminíferos depletados de células germinativas (FIGURA 4) (CASTILLO; TRABUCCO; DE LA BALZE, 1947). Na avaliação do parênquima testicular os TACS podem ocorrer na forma completa (total), quando todos os túbulos seminíferos são afetados, ou incompleta (focal, atrofia mista testicular), quando ao exame histológico é detectado um percentual variável de túbulos seminíferos com células germinativas e espermatogênese normal (STEGER et al., 1999; MAYMON, 2000). A etiologia desta malformação, no entanto, tem origem diversa e ainda não foi completamente elucidada.

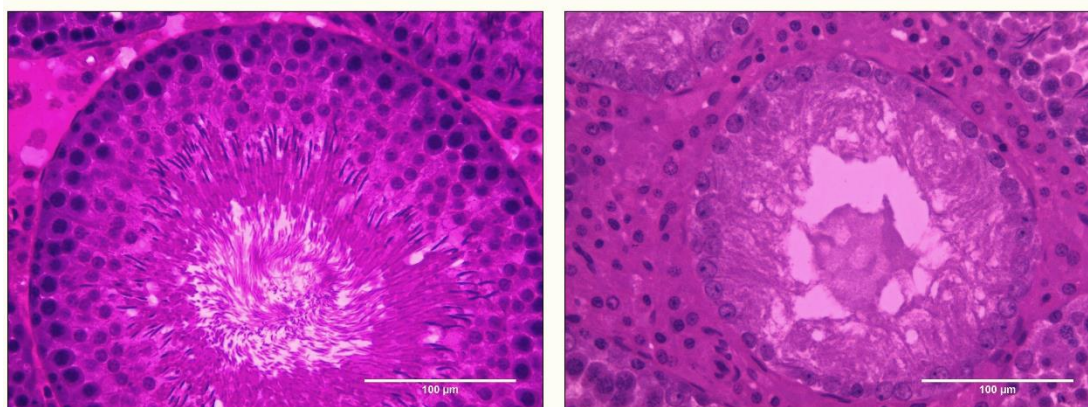


Figura 4 – Aspecto morfológico de túbulos seminíferos normais e de túbulos contendo apenas células de Sertoli de ratos adultos.

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Secções transversais de túbulos seminíferos de rato apresentando aspecto normal (esquerda) ou contendo apenas células de Sertoli (direita). Coloração hematoxilina-floxina.

A síndrome de TACS é normalmente identificada em homens com idade entre 20 e 40 anos ao procurarem por auxílio médico após tentativas infrutíferas de concepção. O achado clínico mais comum nestes pacientes é a oligo ou azoospermia não-obstrutiva, denominações para a baixa concentração de espermatozoides no ejaculado ($< 15 \times 10^6$ espermatozoides/ml) ou a ausência de espermatozoides no ejaculado, respectivamente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). O diagnóstico da síndrome só é possível por meio da análise histológica de biópsias do testículo, quando os TACS são observados (BEHRE et al., 2015). Acredita-se que seja uma síndrome subnotificada em homens, visto que o seu diagnóstico só é realizado

naqueles indivíduos que procuram clínicas de fertilidade e se submetem a técnica de diagnóstico mais invasiva.

Dentre as principais causas do desenvolvimento de TACS em homens estão as alterações de cariótipo, especialmente aquelas relacionadas com os cromossomos sexuais. A Síndrome de Klinefelter, caracterizada pela presença de um cromossomo X a mais no homem (47, XXY), é a principal anormalidade genética causadora de azoospermia não-obstrutiva com TACS. Outras anormalidades incluem as microdeleções no cromossomo Y e variações cromossomais como mosaicismo (46, XY, 47, XXY; STOUFFS et al., 2016). Não se sabe o mecanismo pelo qual os TACS se desenvolvem nos pacientes, embora seja sugerido que a perda de células germinativas ocorra previamente ao nascimento, desencadeando a manifestação da síndrome (WERLER et al., 2014). Além disso, sabe-se que a probabilidade de encontrar espermatozoides em pacientes com a síndrome de Klinefelter é maior quanto mais jovem for o indivíduo e que a perda de um cromossomo X em determinadas espermatogônias diploides as torna capazes de progredir e, eventualmente, completar a espermatogênese (SELICE et al., 2010; KLEIMAN et al., 2016).

Além dos fatores genéticos, fatores ambientais também podem desencadear a degeneração progressiva do epitélio seminífero, tal como agentes antineoplásicos (radiação ou quimioterapia), trauma testicular, criptorquidismo, varicocele e infecção (LIU; DING; LIU, 2014; STOUFFS et al., 2016). Pacientes submetidos ao tratamento de neoplasias com busulfan, por exemplo, sofrem depleção de células germinativas devido a toxicidade do busulfan sobre células em proliferação, o que torna as espermatogônias sensíveis a este agente. Após algumas semanas do tratamento com busulfan ocorre depleção total das células germinativas do epitélio seminífero (CHOI et al., 2004; SMITH; O'SHAUGHNESSY; REBOURCET, 2015), sendo que a recuperação ou não do epitélio seminífero após o término do tratamento, depende da idade do indivíduo e da dose utilizada. Um mesmo regime de tratamento pode ser seguido de recuperação do epitélio germinativo em pacientes tratados após a puberdade, mas pode induzir azoospermia permanente em homens em idade pré-púbere (JIANG, 1998; MEISTRICH, 2009). Nos casos de criptorquidismo e varicocele, a perda das células germinativas é consequência do aumento da temperatura testicular, e a correção cirúrgica pode restabelecer a espermatogênese.

A formação de TACS pode também ser resultado da perda de CGP durante o desenvolvimento fetal, seja por falha no processo de migração do saco vitelínico para as cristas genitais ou pela morte de células germinativas no epitélio seminífero. Para a migração das CGP ser efetiva são necessárias sinalizações de células somáticas, por meio da secreção de lipídios e proteínas, que podem tanto atrair como repelir as CGP, além de uma estrutura intrínseca funcional para realização da motilidade ativa das CGP (RICHARDSON; LEHMANN, 2010). Na situação de migração anômala ou de perda de viabilidade das CGP, as mesmas sofrem apoptose (RUCKER et al., 2000; ZHENG, 2006; SHAHA; TRIPATHI; MISHRA, 2010).

Como todo o processo de desenvolvimento das gônadas está na dependência de fatores endócrinos altamente complexos e regulados, as alterações hormonais podem também levar ao aparecimento de TACS. Por exemplo, a regulação da sobrevivência das células germinativas nos cordões e túbulos seminíferos depende dos hormônios folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH), gonadotrofina coriônica e testosterona. As células de Sertoli participam diretamente desse processo, sendo regulada pelo FSH e testosterona, os dois principais hormônios reguladores da espermatogênese. Durante a maturação dos cordões seminíferos estes dois hormônios suportam a sobrevivência das células germinativas por inibir a sinalização de morte celular (WALKER; CHENG, 2005; SHAHA; TRIPATHI; MISHRA, 2010). Tanto a exposição ao excesso como a privação destes hormônios pode levar a apoptose das células germinativas (TAPANAINEN et al., 1993; ZIRKIN, 1998).

A estreita relação entre as células germinativas e as células de Sertoli suscita uma questão importante relacionada com os possíveis efeitos da ausência de células germinativas sobre a função das células de Sertoli na síndrome dos TACS. Muitos autores têm investigado esse tema, principalmente no que diz respeito ao processo de maturação das células de Sertoli e identificaram que na ausência de células germinativas as células de Sertoli expressam AMH e citoqueratina, ambas proteínas marcadoras de imaturidade das células de Sertoli, uma vez que a expressão dessas proteínas é ausente na célula adulta. Adicionalmente, concentrações séricas baixas de inibina B e altas de FSH estão associadas ao estado imaturo das células de Sertoli (ANNIBALLO; BREHM; STEGER, 2011). Entretanto, células de Sertoli imaturas não ocorrem em todos os casos de TACS, seja em pacientes ou em animais experimentais (STEGER et al., 1996; MAYMON, 2000; ANNIBALLO; BREHM; STEGER, 2011).

As alterações tubulares que levam a ocorrência dos TACS podem resultar também em alterações na morfometria testicular, sendo que é normal que os TACS apresentem diâmetro tubular menor (CASTILLO; TRABUCCO; DE LA BALZE, 1947), embora existam descrições na literatura de TACS com diâmetro normal e lúmen aparente (ANNIBALLO; BREHM; STEGER, 2011). Um outro achado histológico na síndrome de TACS é a aglomeração de células de Leydig ao redor dos TACS, comumente encontrada em pacientes tanto com a forma completa ou focal de TACS. Além disso, existe uma correlação positiva entre o tamanho dos *clusters* e a severidade da deficiência na produção espermatogênica. Este aumento nos aglomerados de células de Leydig pode decorrer da reestruturação do compartimento intertubular, devido à redução do volume ocupado pelos TACS ou ser resultado da hiperplasia das células de Leydig em resposta a secreção elevada de LH (LARDONE et al., 2013).

Em roedores, diversos modelos de depleção de células germinativas foram propostos para estudar a interferência que esta condição causa sobre a função das células somáticas. Alguns dos modelos utilizados são indução cirúrgica de criptorquidismo, exposição ao busulfan em diferentes estágios do desenvolvimento (fetal, pré-pubertal e adulto), exposição à radiação bem como o cultivo de células testiculares isoladas (SHAHA; TRIPATHI; MISHRA, 2010). Existem desvantagens em todos esses métodos, tais como o aumento da temperatura testicular, o que pode alterar a função das células somáticas testiculares; a depleção total das células germinativas, tornando o modelo pouco representativo de alterações mais discretas, as quais podem estar relacionadas à redução da qualidade do sêmen na população; ou incapacidade de mimetizar a relação de interdependência entre as células testiculares nos modelos *in vitro* (SMITH; O'SHAUGHNESSY; REBOURCET, 2015).

Animais com criptorquidismo unilateral induzido cirurgicamente apresentam redução marcante do peso testicular associado com a degeneração do epitélio seminífero e o desenvolvimento de TACS em quantidade variável, bilateralmente (HUTCHISON et al., 2008). As células de Sertoli passam a expressar marcadores de células imaturas, o que pode resultar do processo de desdiferenciação causado pela ausência das células germinativas ou do aumento da temperatura testicular (HUTCHISON et al., 2008). A produção de testosterona não é afetada nessa condição experimental, embora ocorra aumento na secreção de LH e hipertrofia das células de

Leydig nas regiões em torno dos túbulos seminíferos com espermatogênese prejudicada (RISBRIDGER; KERR; DEKRETSER, 1981).

A exposição de camundongos e ratos adultos a 30 mg/kg busulfan causa degeneração das células germinativas 30 dias após a exposição. Neste modelo, a ausência de células germinativas não altera a secreção de testosterona nem a expressão de genes relacionados à esteroidogênese nas células de Leydig (O'SHAUGHNESSY; HU; BAKER, 2008; ZOHNI et al., 2012). No entanto, quando a ablação das células germinativas pelo busulfan ocorre durante os períodos pré-pubertal ou fetal em ratos, ocorre aumento da secreção de testosterona pelas células de Leydig, já que apesar da redução da população de células de Leydig, a concentração de testosterona sérica é normal (BOUJRAD; REVIERS; CARREAU, 1995).

O tratamento com busulfan afeta também as células de Sertoli. Em camundongos adultos, a expressão proteica das células de Sertoli é alterada quando da depleção de células germinativas pelo busulfan, principalmente quando as espermatídes são eliminadas do epitélio seminífero (O'SHAUGHNESSY; HU; BAKER, 2008). Já em ratos expostos *in utero*, há redução do número de células de Sertoli, o que leva a redução do comprimento de túbulos seminíferos e da produção espermiática (VIGUIER-MARTINEZ et al., 1984; BOUJRAD; REVIERS; CARREAU, 1995). Aparentemente, a exposição *in utero* ao busulfan no DG 20 causa redução no número de todas as células testiculares (VIGUIER-MARTINEZ et al., 1984).

A exposição a doses altas de radiação (> 6 Gy) em ratos causa apoptose das células em mitose e leva à infertilidade, associada à falha persistente no reestabelecimento da espermatogênese. Em doses menores, no entanto, pode ocorrer o reestabelecimento da espermatogênese em até 20 semanas após a exposição (ABUELHIJA et al., 2013).

2.4 GANCICLOVIR

O GCV, ou di-hidroxiopropoximetil guanina, é um composto polar hidrofílico, com apresentação farmacêutica na forma de sal sódico liofilizado que deve ser reconstituído para utilização endovenosa ou na forma de cápsulas para administração oral. O GCV foi desenvolvido a partir da busca de agentes antivirais que

interrompessem a multiplicação do DNA viral sem afetar a divisão celular, já que geralmente os agentes que afetavam a multiplicação viral também afetavam a replicação de células não-infectadas (ELION et al., 1977). Foi desenvolvida, então, uma classe de antivirais análogos de nucleosídeos seletivamente ativados em células infectadas porque apresentavam maior afinidade de fosforilação pela TC viral (ELION et al., 1977; ASHTON et al., 1982). O GCV é um nucleosídeo análogo da guanosina (FIGURA 5) que apresenta ação contra o citomegalovírus (CMV), os herpes simples vírus 1 e 2, o Epstein-Barr vírus e o vírus da varicela-zoster (MATTHEWS; BOEHME, 1988).

O GCV é o antiviral de escolha para o tratamento e prevenção da citomegalovirose, doença que atinge principalmente pessoas imunocomprometidas, com AIDS e receptores de transplante de órgãos (LANDOLFO et al., 2003; SWANSON; SCHLEISS, 2013). Gestantes sob tratamento imunossupressor formam um grupo de alto risco para o desenvolvimento de citomegalovirose. Adicionalmente, nesses casos, o feto pode ser infectado via transplacentária com consequências deletérias para o sistema nervoso central. Fetos expostos ao CMV desenvolvem problemas cognitivos, auditivos e locomotores (ADLER; NIGRO; PEREIRA, 2007). A citomegalovirose congênita ocorre em aproximadamente 1% dos recém-nascidos e é a principal causa infecciosa de nascidos com defeitos congênitos (PULIYANDA et al., 2005). Se a primeira exposição ao CMV ocorre nesta situação, as gestantes podem ser tratadas com GCV para diminuir o risco de transmissão congênita da doença (KIMBERLIN, 2002; PULIYANDA et al., 2005; ADLER; NIGRO; PEREIRA, 2007). Entretanto, devido ao conhecido potencial teratogênico do GCV, o mesmo foi categorizado no grupo C de medicamentos usados na gravidez pela agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, FDA (*Food & Drug Administration*), o que significa que deve ser avaliado o benefício do tratamento frente ao risco de desenvolvimento de teratogenia, já que não foram observados efeitos teratogênicos em humanos, embora tenham ocorrido em modelos experimentais.

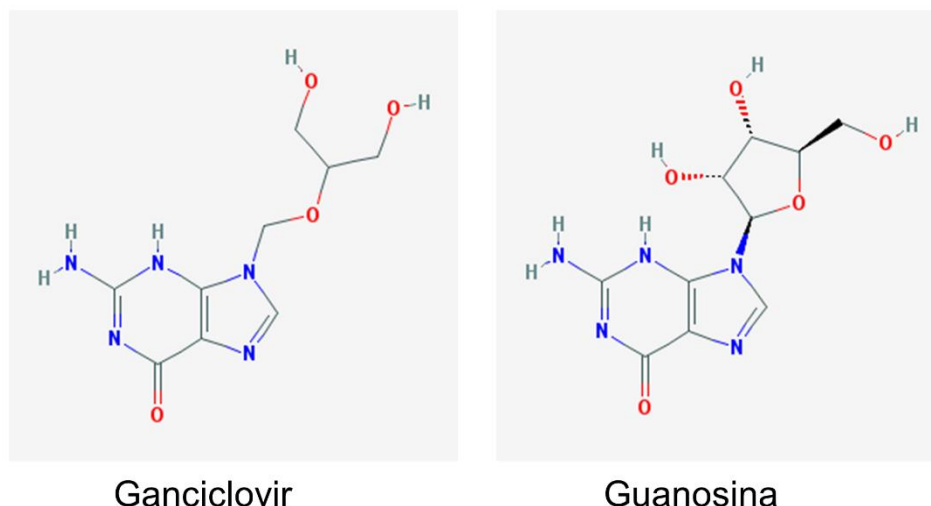


Figura 5 – Estrutura química do antiviral ganciclovir e da guanosina

FONTE: domínio público (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

NOTA: As duas moléculas se assemelham em estrutura e função e, por isso, o ganciclovir é considerado um análogo da guanosina.

O potencial teratogênico do GCV se dá pelo seu mecanismo de ação estar relacionado com o metabolismo de DNA. Para exercer seu efeito antiviral o GCV deve ser convertido para a forma trifosfatada. A primeira fosforilação do GCV é realizada, preferencialmente, em células infectadas, que expressam a TC viral, sendo este o principal fator que atribui seletividade ao antiviral. Na sequência, cinases da célula hospedeira convertem o monofosfato de GCV nas formas di- e trifosfatada. O trifosfato de ganciclovir bloqueia a síntese de DNA viral por dois mecanismos: mimetizando os nucleotídeos naturais e inibindo competitivamente a DNA polimerase viral, impedindo a replicação do DNA viral; ou através da incorporação ao DNA levando a terminação da replicação por mecanismo ainda não esclarecido (CHEN; BEARDSLEY; COEN, 2014; BOUJEMLA et al., 2016).

A via de administração do GCV é comumente a endovenosa, mas também pode ser administrado pela via oral, sendo a via endovenosa preferível à oral por aumentar a biodisponibilidade do GCV. Além disso, utilizando a via endovenosa, sob infusão contínua, consegue-se manter a concentração sanguínea desejada, já que sua meia-vida em circulação é curta. Em indivíduos sem alteração renal, a meia-vida do GCV é de $2,7 \pm 1,3$ h, sendo $89,6 \pm 5\%$ do medicamento eliminado pela urina (WINSTON et al., 2006). A dose de GCV utilizada pela via endovenosa é, normalmente, de 5 mg/kg, a cada 12 h, em pacientes HIV e CMV positivo. Desta forma, atinge-se uma concentração plasmática máxima (C_{max}) de 12,2 µg/mL, 1 h

após a administração. Já a administração de 1 g de GCV, via oral, três vezes ao dia, atinge C_{max} de 1,46 $\mu\text{g/mL}$, em 14 h após as três doses (PESCOVITZ et al., 2000). A concentração das diferentes formas de GCV intracelular foi avaliada por cromatografia líquida e espectrometria de massas em pacientes transplantados renais sob tratamento com 450 mg de valganciclovir, um éster valínico de GCV (BILLAT et al., 2015). As concentrações máximas plasmática e intracelular de GCV, GCV-monofosfato e trifosfato foram de $5,8 \pm 3,7$, $1,8 \pm 1,3$, $2,1 \pm 2,1$ e $6,4 \pm 4,7$ $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

Ratos e camundongos adultos expostos a 100 mg/kg de GCV via intraperitoneal, uma vez ao dia, durante cinco dias, apresentaram C_{max} de 0,8 e 3,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, após 1h da última aplicação, com níveis indetectáveis após 2 h da última administração (BOUJEMLA et al., 2016). Em camundongos recém-nascidos, no DPN 5, sob o mesmo regime de exposição, foi observado pico de GCV no sangue 2 h após a última administração, quando atingiu o C_{max} de 6,6 $\mu\text{g/mL}$ (BOUJEMLA et al., 2016). Ratas gestantes, expostas a três aplicações de 100 mg/kg de GCV, com intervalo de 4 h entre as aplicações, no DG 10, apresentaram $42,8 \pm 4,9$ $\mu\text{g/mL}$ uma hora após a última aplicação (NIHI et al., 2014).

2.4.1. Toxicidade

A presença da timidina cinase viral em células infectadas, faz com que a concentração de GCV trifosfato seja dez vezes maior em células infectadas do que em células não infectadas (ADLER; NIGRO; PEREIRA, 2007). Utilizando-se deste conhecimento, buscou-se associar o efeito do GCV com a manipulação genética, de forma a desenvolver terapias gênicas para impedir a replicação de células cancerígenas ou células infectadas por HIV (CARUSO; KLATZMANN, 1992; CARUSO et al., 1993; BUURSMA et al., 2004), além de modelos experimentais transgênicos (FURMAN et al., 1980; HEYMAN et al., 1989; DZIERZAK et al., 1993; MINASI et al., 1993). A modelagem genética permite que o DNA da TC viral seja inserido ao DNA celular em conjunto com uma região promotora que é ativada somente quando ocorre estímulo específico para a expressão do promotor. Se ativada, a TC viral é expressa e a célula torna-se mais sensível aos efeitos tóxicos do GCV. A possibilidade de transferir o gene da TC viral para células tumorais possibilitaria o uso do GCV como

agente terapêutico (CARUSO et al., 1993; HERRSTRO; ERIKSSON, 2001 BUURSMA et al., 2004). Em modelos experimentais a inserção do gene da TC viral associada ao uso do GCV em diferentes tipos celulares permite a ablação de tipos celulares específicos. Por exemplo, para compreender o papel da interleucina-2 (IL-2) na resposta imunológica, Minasi *et al.*, (1993) desenvolveram um camundongo no qual a expressão da IL-2 e da TC viral estão associadas e, quando estes animais são expostos ao GCV, as células produtoras de IL-2 são eliminadas.

Entretanto, em alguns desses modelos experimentais, os machos transgênicos para a expressão de TC viral também se tornaram estéreis devido a citotoxicidade proteica da TC viral expressa em altos níveis nas células germinativas (AL-SHAWI et al., 1991; SALOMON et al., 1995; CAI et al., 2012, 2009;). Em ratos e camundongos, a expressão desta proteína nas espermátides redondas e alongadas resulta em disfunção da espermiogênese e na formação de espermatozoides com cabeça malformada e cauda dobrada. Adicionalmente, com a maturidade sexual, há perda das células germinativas por toda a extensão dos túbulos seminíferos (BRAUN et al., 1990; CAI et al., 2009) como decorrência da desorganização das junções de adesão entre células de Sertoli e células germinativas (CAI et al., 2012).

Não se sabe exatamente o mecanismo que leva as células germinativas pós-meióticas a expressarem a TC viral em altos níveis nos animais transgênicos. Aparentemente, as espermátides apresentam promotores específicos que identificam uma região localizada no gene da TC viral induzindo a expressão de polipeptídeos menores do que a proteína completa da TC viral (AL-SHAWI et al., 1991; SALOMON et al., 1995). Aparentemente, as células germinativas mesmo de animais não transgênicos (NIHI et al., 2014), apresentam alguma particularidade na expressão da timidina cinase celular, o que promoveria a fosforilação do GCV em taxas maiores do que as encontradas em outros tipos celulares na ausência de infecção viral. Isso tornaria as células germinativas mais sensíveis à toxicidade do GCV.

Naturalmente, qualquer célula em proliferação expressa TC endógenas para replicação do DNA (SHERLEY; KELLY, 1988; CHEN et al., 2015) e, portanto, mesmo células normais, não infectadas, podem promover a ativação do GCV. A ativação do GCV em células não infectadas leva aos seus efeitos colaterais, sendo o principal deles a toxicidade hematológica, particularmente, a trombocitopenia e a leucopenia que atingem entre 5-41% e 7-68% dos pacientes, respectivamente (MORETTI et al., 1998; HARTMANN et al., 2008; KELES et al., 2010; SALEH et al., 2010; VENTON et

al., 2014; MATSUMOTO et al., 2015). Estas alterações hematológicas levam à diminuição da dose ou, até mesmo, à descontinuação do tratamento, o que pode causar resistência do vírus ao antiviral e colocar em risco a vida do paciente. Neste sentido, estudos tem investigado a relação entre a concentração plasmática e intracelular de GCV e suas formas fosfatadas e a ocorrência de toxicidade não somente das células sanguíneas, mas também de outros tecidos (BILLAT et al., 2016).

Em uma população de pacientes com transplante renal foi encontrada associação entre a diminuição da contagem de neutrófilos durante os primeiros três meses de tratamento e a concentração intracelular de GCV trifosfato. Ratos e camundongos saudáveis também apresentam queda do número de neutrófilos, eritrócitos e plaquetas após a exposição via intraperitoneal à 50 mg/kg de GCV, duas vezes ao dia, durante três dias (BOUJEMLA et al., 2016). Células da linhagem linfoblástica B são também alvo da toxicidade *in vivo* e *in vitro* do GCV, sendo que a concentração citotóxica diminui à medida que o tempo de exposição aumenta. Assim, os tratamentos com GCV podem se tornar mais eficazes e menos tóxicos para células sanguíneas quando se utiliza uma maior dose em menor intervalo de tempo (JANOLY-DUMENIL et al., 2009). De modo geral, esses estudos demonstraram que o GCV é particularmente tóxico para populações de células sanguíneas com alta atividade proliferativa, como é o caso das células-tronco hematopoiéticas.

A citotoxicidade ao GCV ocorre mesmo em pacientes com baixa carga viral ou em células não infectadas (BILLAT et al., 2016). Células não infectadas, em cultivo, também convertem GCV até a sua forma trifosfatada, mas a concentração intracelular é cerca de dez vezes mais baixa do que aquela encontrada em células infectadas (FREITAS et al., 1985; SMEE et al., 1985). Além disso, a concentração de GCV necessária para impedir a proliferação de células não infectadas é maior do que aquela para inibir a replicação viral em células infectadas (SMEE et al., 1985). Por exemplo, células linfoblásticas B em cultivo tem seu crescimento diminuído em 50% quando expostas à 20 mg/L de GCV, concentração que inibiu completamente a replicação viral em células linfoblásticas B infectadas (JANOLY-DUMENIL et al., 2012). Há também diferença na sensibilidade dependendo do tipo celular, sendo que as concentrações de GCV necessárias para inibir a proliferação *in vitro* de células progenitoras de macrófagos (4,8 mg/L) e eritrócitos (7,4 mg/L) não infectadas, foram comparativamente menores (SOMMADOSSI; CARLISLE, 1987).

A variação da sensibilidade celular ao GCV pode estar associada a vários fatores, tal como o tipo de transportador de GCV trifosfato presente na membrana das células. Por exemplo, a proteína de resistência multidrogas MRP4 está envolvida no efluxo de GCV intracelular. Células que expressam grande quantidade desta proteína tem resistência aumentada à citotoxicidade do GCV, já que o efluxo dos seus metabolitos é aumentado, com menor taxa de acumulação intracelular (SMEE et al., 1985; ADACHI et al., 2002).

Estudos com ratos demonstram que o GCV causa malformações no desenvolvimento embrionário *in vivo* e *in vitro* e alertam também para o seu potencial teratogênico (KLUG et al., 1991). Um estudo comparou a toxicidade pré-natal induzida por cinco análogos de nucleosídeos, sendo que o GCV foi o segundo mais potente em interferir no desenvolvimento embrionário, causando diminuição do comprimento embrionário, do número de somitos e da concentração total de proteínas/embrião. Foi possível observar alterações no formato da cabeça, microcefalia e alterações do pericárdio em dois terços dos embriões de ratos expostos *in utero* à 600 mg/kg de GCV no DG 10 (KLUG et al., 1991).

2.4.2. Toxicidade testicular

Não existem relatos na literatura sobre a toxicidade testicular causada em pacientes sob tratamento com GCV. Em animais experimentais, o GCV causa alterações testiculares permanentes ou transitórias dependendo do momento e da dose de exposição (NEYTS et al., 1995; FAQI et al., 1997; NIHI et al., 2014). Ratos machos adultos expostos a 300 mg/kg apresentam diminuição do peso testicular e epididimário, da contagem espermática e aumento do número de espermatozoides morfologicamente anormais (FAQI et al., 1997). A histologia testicular evidencia alterações principalmente na periferia dos túbulos seminíferos aonde podem ser observadas inclusões gordurosas, debri celular e nuclear e aumento de volume das células de Sertoli (FAQI et al., 1997).

Os efeitos reportados por FAQI et al. (1997), foram mais pronunciados na oitava semana após o tratamento quando a produção espermática foi reduzida em mais de 90%. O período de 8 semanas é o tempo necessário para que uma espermatogônia passe pelo processo completo de espermatogênese até a formação

dos espermatozoides (LEBLOND; CLERMONT, 1952; RUSSELL et al., 1990). Isso indica que o GCV, provavelmente, danificou células jovens da linhagem espermatogênica, como as espermatogônias em diferenciação, e não as espermatogônias-tronco ou células de Sertoli. Isso permitiu que o epitélio seminífero se recuperasse completamente 24 semanas após o fim da exposição (FAQI et al., 1997). Também camundongos, saudáveis ou infectados com vírus herpes simples e tratados com 100 mg/kg/dia de GCV durante 14 dias, apresentaram baixo peso testicular, atrofia do epitélio seminífero dos túbulos seminíferos e TACS. Estas avaliações foram realizadas 4 semanas após o final do tratamento e não foram observadas alterações histológicas em outros órgãos (NEYTS et al., 1995).

Os achados referentes a animais adultos diferem do que se observa quando a exposição ao GCV acontece *in utero*, no período de desenvolvimento gonadal. Descendentes masculinos de ratas gestantes expostas à três aplicações de 100 mg/kg de GCV no DG 10 apresentaram menor peso testicular e epididimário no DPN 90 (HARTMANN et al., 1991; NIHI et al., 2014). A histologia testicular evidenciou a presença de TACS nos fetos, no DG 20, bem como nos descendentes adultos, nesse caso sugerindo um efeito permanente (NIHI et al., 2014).

Nihi et al. (2014) também expuseram ratas gestantes ao aciclovir, um antiviral nucleosídeo análogo da guanosina, como o ganciclovir, mas não foi observada nenhuma alteração na função testicular dos descendentes. Parece que o GCV é mais susceptível a fosforilação por quinases próprias das células não infectadas do que o aciclovir, resultando na incorporação ao DNA e morte celular, principalmente em células com alta taxa de proliferação (HAYNES; LAMBERT; MITCHELL, 1996). Isso poderia explicar a deficiência de células germinativas após a exposição ao GCV *in utero* (NIHI et al., 2014) ou na idade adulta (FAQI et al., 1997). Além disso, parece que a exposição ao GCV no DG 10 impactou sobre a migração e a sobrevivência das CGP (NIHI et al., 2014).

O GCV pode afetar também células somáticas testiculares, mas os estudos são muito limitados. Por exemplo, a linhagem SerW3 de células de Sertoli imaturas de rato, quando cultivadas *in vitro* e expostas a diferentes concentrações de GCV, ACV e penciclovir (PCV), apresentaram a expressão de conexina 43 diminuída (QIU; HORVATH; STAHLMANN, 2016). A conexina 43 é uma das 15 proteínas que formam as junções do tipo *gap* e é a mais abundante no testículo, compondo as junções entre as células de Sertoli adjacentes e entre células de Sertoli e células germinativas

(GERBER; HEINRICH; BREHM, 2016). As junções do tipo *gap*, as junções de oclusão e os desmossomos constituem a base anatômica da barreira hemato-testicular, além de auxiliar na manutenção estrutural, organizacional e na comunicação intercelular do epitélio seminífero (PELLETIER, 2011). A conexina 43 é essencial no período de desenvolvimento testicular porque está envolvida no processo de parada da proliferação e maturação das células de Sertoli (BREHM et al., 2007) e também com a migração, proliferação e sobrevivência das células germinativas no período fetal (JUNEJA et al., 1999).

3. HIPÓTESES E PREDIÇÕES

Nós propomos que a exposição de ratas gestantes ao GCV no DG 14, que é uma fase de diferenciação das células germinativas e com a maior taxa de proliferação destas células, irá acarretar em maior disfunção testicular do que a exposição no DG10, levando a redução do número de células germinativas na vida fetal, e por consequência, ao desenvolvimento dos TACS nos descendentes adultos. Além disso, aventamos a hipótese de que o GCV induz o desenvolvimento de TACS nos ratos por impedir a proliferação das células germinativas na vida fetal.

Para testar estas hipóteses, nós optamos por expor ratas gestantes ao GCV em diferentes janelas de acordo com os processos de diferenciação das células germinativas: (1) DG 10, quando há migração e baixa taxa de proliferação das células germinativas; (2) DG 14, quando ocorre maior taxa de proliferação das células germinativas; e (3) DG 19, quando as células germinativas estão em fase estacionária.

Primeiramente, avaliamos o efeito da exposição ao GCV nos DG 10 e 14 sobre os descendentes masculinos adultos para verificar através da histomorfologia testicular e de parâmetros de androgenização pré- e pós-natais (medida da distância anogenital, dia da separação prepucial e dosagem de testosterona sérica e de metabólitos fecais de testosterona) a ocorrência de maior efeito nos descendentes expostos no DG 14.

Posteriormente, para verificar a indução de efeito citotóxico do GCV sobre as células germinativas em proliferação, os descendentes masculinos expostos ao GCV nos DG 14 e 19 foram avaliados para o número e proliferação das células germinativas, 24h após a exposição ao GCV, através de imunofluorescência de dupla marcação para as proteínas específicas de células germinativas (DAZL) e de proliferação celular (Ki67). A nossa hipótese é a de que o número de células germinativas, identificadas a partir da marcação da proteína DAZL, assim como a marcação de Ki67, seriam menores nos animais expostos ao GCV no DG 14.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da exposição ao GCV em janelas críticas do desenvolvimento embrionário sobre a formação e função testicular dos ratos machos e investigar possíveis causas para a formação dos TACS.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar se o período da gestação altera o nível de exposição dos descendentes ao GCV;
2. Avaliar se o GCV causa toxicidade geral e reprodutiva nas ratas gestantes;
3. Investigar os seguintes parâmetros nos descendentes masculinos adultos após a exposição *in utero* ao GCV nos DG 10 ou 14:
 - a) O crescimento ponderal e o peso de órgãos como marcadores da toxicidade geral;
 - b) A androgenização intrauterina e pós-natal;
 - c) A produção pós-natal de testosterona;
 - d) A morfologia testicular.
4. Investigar os seguintes parâmetros nos descendentes masculinos 24h após a exposição *in utero* ao GCV nos DG 14 ou 19:
 - a) A marcação de proliferação para a proteína Ki67 de gonócitos e células somáticas testiculares 24h após a exposição;
 - b) A colonização testicular pelos gonócitos 24h após a exposição.
5. Comparar os efeitos da exposição ao GCV no DG 10, 14 ou 19 de forma a ampliar o conhecimento sobre possíveis fatores da organogênese testicular associados com o desenvolvimento das desordens testiculares causadas pela exposição *in utero* ao GCV.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*) adultos da variedade Wistar, criados no biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (Curitiba). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) e receberam água e ração (Nuvilab, Colombo, Brasil) *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná (número de consentimento 793) e estão de acordo com as orientações nacionais e internacionais de bem-estar animal.

Para a obtenção das progenitoras, as ratas foram acasaladas com ratos machos adultos durante a fase escura do ciclo de luz (3 horas), na proporção de um macho para três fêmeas. Foi realizado lavado vaginal para verificar a presença de espermatozoides e confirmar a cópula. O dia de detecção dos espermatozoides foi considerado como dia zero da gestação (CHAHOUUD e KWASIGROCH, 1977).

5.2 EXPOSIÇÃO AO GANCICLOVIR

Foi utilizado GCV sódico (500 mg, Novafarma, Anápolis, Brasil) para uso injetável, diluído para 100 mg/mL em água destilada. O conteúdo diluído foi mantido protegido da luz, em temperatura ambiente e utilizado em menos de 12 horas, de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a confirmação de espermatozoides no lavado vaginal (DG 0), as ratas gestantes foram distribuídas aleatoriamente entre os grupos controle e ganciclovir. De acordo com o grupo, as ratas gestantes receberam três aplicações às 8:00; 13:00 e 18:00 h de 100 mg/kg de GCV ou de 1 mL/kg de salina 0,9%, via subcutânea, nos DG 10, 14 ou 19. As doses, bem como a via e os intervalos de administração foram baseados em estudos prévios (STAHLMANN et al., 1988; FAQI et al., 1997; NIHI et al., 2014).

Três experimentos foram desenvolvidos utilizando o mesmo protocolo de exposição. No experimento 1, as ratas expostas nos DG 10 (n=8) ou 14 (n=7) foram

eutanasiadas 1 h após a última aplicação de GCV. O sangue foi coletado e o plasma utilizado para dosar a concentração de GCV. No experimento 2, as ratas gestantes expostas nos DG 10 ou 14 (C, n = 13; GCV10, n = 9; GCV14, n = 8) pariram e os descendentes masculinos foram acompanhados ao longo do seu crescimento até o DPN 90. No experimento 3, as ratas gestantes (n = 3 por grupo) expostas nos DG 14 ou 19 foram eutanasiadas nos DG 15 e 20, respectivamente, e os testículos dos fetos masculinos avaliados para proliferação e densidade de gonócitos.

5.3 EXPERIMENTO 1: DOSAGEM DE GANCICLOVIR NO PLASMA DE RATAS GESTANTES

A concentração plasmática de GCV das ratas gestante foi determinada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), conforme descrito por BOULIEU, GALLANT e SILBERSTEIN (1997). Os padrões de GCV (> 99% de pureza) foram obtidos da Sigma (Schnelldorf, Alemanha) e as análises realizadas em uma coluna de fase reversa LiChrospher-100 RP-18 (Merck), equipada com uma pré-coluna (Merck). Como fase móvel foi utilizada uma mistura de fosfato de potássio monobásico (10 Mm, pH 3,4) e aceto nitrila, na razão de 98:2 (v:v), previamente filtrada (0,45 mm, Millipore, Bedford, Estados Unidos) e desgaseificada. A taxa de fluxo foi de 1,5 mL/min e a detecção realizada a 254 nm. Para a preparação das amostras, uma alíquota de 100 µL de plasma foi precipitada com 50 µL de solução de sulfato de zinco 25% em água (m:v). Após ser misturada, a amostra foi centrifugada (15.000 g x 15 min) e 20 µL do sobrenadante foi injetado automaticamente na coluna.

5.4 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES MASCULINOS ADULTOS

Ratas gestantes expostas ao GCV ou à solução salina 0,9% nos DG 10 ou 14 tiveram sua massa corporal registrada a cada 3 dias. As progenitoras foram mantidas com as suas ninhadas até o desmame, quando foram, juntamente com as descendentes femininas, eutanasiadas por decapitação. De forma a avaliar algum efeito do GCV sobre os resultados reprodutivos das ratas gestantes foram registrados o número de implantes uterinos, o número de filhotes ao nascimento, no DPN 4 e no

desmame, e o número de descendentes masculinos. Estes resultados foram utilizados para calcular os índices de perdas pós-implante ($[(n^{\circ} \text{ implantes} - n^{\circ} \text{ descendentes nascidos}] \times 100 / n^{\circ} \text{ implantes}$), de viabilidade ($[(n^{\circ} \text{ descendentes vivos no dia pós-natal 4} / n^{\circ} \text{ descendentes nascidos vivos}] \times 100$), de desmame ($[(n^{\circ} \text{ descendentes vivos no dia pós-natal 21} / n^{\circ} \text{ descendentes nascidos vivo}] \times 100$) e de machos ($[(n^{\circ} \text{ descendentes do sexo masculino} / n^{\circ} \text{ descendentes}] \times 100$).

Os descendentes masculinos foram mantidos em, no máximo, 4 ratos por caixa, todos da mesma ninhada. Ao longo do desenvolvimento foi registrada a massa corporal dos descendentes masculinos a cada 5 dias e medida a distância anogenital (DAG) nos DPN 5, 35 e 90 com auxílio de paquímetro digital (Carrera Precision, Guangdong, China). Para normalizar as diferenças do tamanho corporal calculou-se, a seguir, o índice anogenital (IAG), dividindo-se o valor da DAG pela raiz cúbica da massa corporal (GALLAVAN et al., 1999). Também foi registrado o dia da separação prepucial, como um indicador externo da puberdade (KORENBROT; HUHTANIEMI; WEINER, 1977). Para quantificação de metabólitos fecais de androgênios amostras semanais de fezes foram coletadas diretamente da caixa de manutenção do DPN 37 ao 90. Foram coletadas todas as fezes da caixa, 24 h após a troca do substrato representando o “pool” dos animais da caixa. As amostras foram mantidas congeladas (-20°C) até o processamento.

No DPN 90, os animais foram eutanasiados para coleta de tecidos. Até três descendentes de cada ninhada foram selecionados aleatoriamente e submetidos a perfusão intracardíaca, enquanto os demais foram eutanasiados por decapitação. A perfusão intracardíaca foi usada por ser recomendada para fixação de alta qualidade do parênquima testicular para análises morfométricas (LANNING et al., 2002). Nos animais decapitados procedeu-se a coleta de sangue e de órgãos, registrando-se o peso de fígado, rins, adrenais, baço, testículos, epidídimos, vesículas seminais (sem conteúdo), próstata ventral (sem a cápsula), pênis, músculo levantador do ânus e glândulas bulbouretrais. O sangue foi centrifugado (2.500 rpm x 15 min) e o soro recuperado foi mantido a -20°C para posterior quantificação de testosterona.

5.4.1. Perfusão intracardíaca e processamento histológico dos testículos

Todos os animais foram submetidos a perfusão intracardíaca com glutaraldeído 4%, conforme TENORIO et al (2011). Este procedimento garante melhor preservação da estrutura testicular, o que é uma prerrogativa importante para a morfometria. Resumidamente, os ratos foram tratados com heparina (150 UI/ 100g de peso corporal, i.p.), anestesiados com xilazina (1,5 mg/kg, i.p.) e cloridrato de cetamina (75 mg/kg, i.p.) e submetidos à toracotomia. Com uma agulha inserida no ventrículo esquerdo e uma incisão no átrio direito, os animais foram perfundidos (bomba peristáltica, EL 500, Insight; 30 rpm) com salina 0,9% contendo heparina 0,1% (v:v), por 15 min e, então, com glutaraldeído 4% (v:v, em PBS, pH 7,2), por 45 min. Os testículos foram, então, coletados e mantidos em glutaraldeído 4% por 24 h, antes de serem cortados perpendicularmente em seções de 2 – 3 mm de espessura as quais permaneceram imersas em glutaraldeído 4% até o processamento. As seções foram lavadas em PBS (pH 7,2; 24 h, 4°C) e mantidas em álcool 70% (48 h, 4°C), quando uma seção representativa da porção central do testículo foi escolhida. Desta seção foi retirada uma amostra retangular a qual foi desidratada e emblocada em glicol metacrilato (Leica Historesin Embedding Kit). Seções histológicas de 4 µm de espessura foram coradas com hematoxilina-floxina e analisadas histomorfometricamente.

5.4.2. Avaliação da morfologia testicular

5.4.2.1. Quantificação de túbulos seminíferos afetados pela exposição ao GCV

Duas seções histológicas de cada animal foram avaliadas sob microscópio de luz (CarlZeiss, Standart 20, Alemanha) com objetiva de 100x. Todos os túbulos seminíferos com contorno circular foram classificados como normais ou anormais e quantificados para calcular as suas proporções. Os túbulos seminíferos classificados como anormais eram diferenciados por apresentarem somente células de Sertoli ou a espermatogênese incompleta.

5.4.2.2. Avaliação morfométrica do parênquima testicular

A morfometria testicular foi realizada em fotografias captadas por uma câmera fotográfica (Olympus DP-72, Tóquio, Japão), acoplada a um microscópio (Olympus BX-51, Tóquio, Japão) e conectada ao programa Cell[^]F (Olympus Europe, version 5.2). Posteriormente, as fotografias foram analisadas no programa Image J (versão 1.46r, domínio público).

Para cada animal, foram registradas duas medidas diametralmente opostas de 15 túbulos seminíferos normais e com seção circular dos seguintes parâmetros: diâmetro do túbulo seminífero, altura do epitélio seminífero e diâmetro do lúmen. Estas medidas foram mensuradas em fotografias tiradas com objetiva de 100x. As duas medidas diametralmente opostas foram utilizadas para calcular a média de cada parâmetro (TENORIO et al., 2011). Adicionalmente, para os animais expostos ao GCV, foi registrado o diâmetro de, pelo menos, 5 túbulos seminíferos anormais. Para os animais expostos ao GCV, as médias do diâmetro dos túbulos seminíferos normais e anormais, em conjunto com o percentual de túbulos normais e anormais, foram utilizados para calcular a média ponderada do diâmetro dos túbulos seminíferos.

A média ponderada do diâmetro dos túbulos seminíferos é uma adaptação da morfometria testicular padrão necessária neste estudo por existirem duas populações distintas de túbulos seminíferos. Este parâmetro influencia os valores estimados de comprimento de túbulos seminíferos (CTS) e da população de células de Sertoli (PCS).

Para cada animal, a densidade volumétrica dos componentes do parênquima testicular foi avaliada em fotografias de 15 campos aleatórios, incluindo áreas com túbulos seminíferos anormais, tiradas com objetiva de 400x. Com auxílio do programa Image J foi projetada uma grade contendo 441 pontos igualmente espaçados sobre cada fotografia e os pontos sobre cada componente do parênquima testicular (túbulo seminífero, epitélio seminífero, lúmen, células de Leydig, e espaço intersticial) foram contados, resultando na densidade volumétrica (%). Conforme descrito por VALENÇA et al. (2013), o volume de cada componente do parênquima testicular (mL) é calculado a partir do produto entre a densidade volumétrica (%) e o peso testicular líquido (mg). O peso testicular líquido é obtido a partir da subtração de 6,5% do peso testicular bruto, correspondente ao peso da túnica albugínea (RUSSELL; DE FRANÇA, 1995).

O comprimento dos túbulos seminíferos (CTS; m) foi estimado a partir da fórmula abaixo (JOHNSON e NEAVES, 1981):

$$CTS = (VTS / \pi R^2) / 10^6$$

VTS = volume de túbulos seminíferos (mL); πR^2 = a área da seção transversal dos túbulos seminíferos e R = raio (μm) é a média do diâmetro dos túbulos seminíferos/ 2.

5.4.2.3. Contagem e estimativa das populações celulares no epitélio seminífero

Espermatogônias, espermatócitos pré-leptóteno e paquíteno, espermatídes redondas e células de Sertoli foram contadas em 5 túbulos seminíferos em estágio VII sob microscópio (CarlZeiss, Standard 20, Alemanha) para cada animal. Para corrigir a contagem bruta das células (CB), o diâmetro de 10 núcleos de cada tipo celular ou de nucléolos das células de Sertoli foram medidos no Image J em fotografias tiradas com objetiva de 1000x. Os nucléolos das células de Sertoli foram mensurados por apresentarem formato circular, diferente do seu núcleo que tem formato irregular. A média foi utilizada em conjunto com a espessura da seção histológica conforme a fórmula a seguir (ABERCROMBIE, 1946; AMANN; ALMQUIST, 1962):

$$CC = CB \times (\text{espessura do corte} / [\text{espessura do corte} + \{ \sqrt{(DN^2/2) - (DN^2/4)} \}])$$

CC = contagem corrigida; DN = média do diâmetro de núcleos ou nucléolos.

O índice de célula de Sertoli (ICS), foi estimado a partir da razão entre a CC de células de Sertoli e de espermatídes redondas por secção transversal de túbulos seminíferos em estágio VII (RUSSELL et al., 1990).

Nos animais expostos ao GCV, as células de Sertoli também foram quantificadas nas secções transversais de túbulos seminíferos anormais. Para estes animais, a contagem corrigida de células de Sertoli (CCS) foi calculada utilizando a média ponderada da contagem corrigida (CC) entre os túbulos seminíferos normais e anormais, como mostra a fórmula a seguir:

$$CCS = (CC \text{ TS normais} \times \% \text{TS normais}) + (CC \text{ TS anormais} \times \% \text{TS anormais})$$

A CCS foi utilizada para calcular a população de células de Sertoli (PCS), conforme a fórmula (ABERCROMBIE M., 1946; DA SILVA JR. et al., 2006):

$$\text{PCS/testículo} = \text{CTS} \times \text{CCS/espessura do corte}$$

5.4.2.4. Morfometria das células de Leydig

O volume individual das células de Leydig foi estimado a partir do volume nuclear e da proporção entre núcleo e citoplasma (FRANÇA et al., 2000). Para isso, foi mensurado o diâmetro nuclear de 30 células de Leydig no Image J em fotografias tiradas com objetiva de 1000x. O volume nuclear das células de Leydig foi calculado através da fórmula:

$$\text{Volume do núcleo da célula de Leydig} = \frac{4}{3} \times \pi \times R^3$$

$$R = \text{diâmetro nuclear médio} / 2$$

Para calcular a proporção entre núcleo e citoplasma, uma grade contendo 441 pontos igualmente espaçados, foi projetada sobre as fotografias. Foram contados 1.000 pontos posicionados sobre o núcleo ou o citoplasma das células de Leydig. O volume do citoplasma foi estimado através da fórmula a seguir:

$$\text{Volume de citoplasma das células de Leydig} = \frac{(\% \text{ de citoplasma} \times \text{volume nuclear})}{\% \text{ de núcleo}}$$

O número de células de Leydig por testículo foi estimado através da razão entre a proporção volumétrica das células de Leydig e o seu volume individual (FRANÇA et al., 2000).

5.4.3. Processamento de amostras fecais e quantificação de metabólitos fecais de testosterona e de testosterona sérica

Para dosagem dos metabólitos fecais de testosterona, as fezes foram processadas para extração de hormônios esteroidais (BROWN et al., 2004). Para

tanto, as fezes foram secas em estufa (60°C, 10 h), maceradas e uma alíquota de ~0,5g foi adicionada em tubo de vidro contendo 5 mL de álcool 80% (v:v, água destilada) e agitada vigorosamente (agitador Multi-PulseVortexer, modelo 099^a, 50/60Hz – Glass-Coll, EUA) por 30 min. Cada amostra foi centrifugada (1000 x g, 15 min) e o sobrenadante foi recuperado e mantidos a - 20°C.

As concentrações de testosterona sérica e de metabólitos fecais de testosterona foram determinadas por meio de enzima imunoensaio (MUNRO et al., 1991). O anticorpo anti-testosterona (R156/7) e a testosterona conjugada com peroxidase (Horseradishperoxidase - HRP) foram obtidos de Coralie Munro (University of California, Davis, EUA). O ensaio foi previamente validado em nosso laboratório (FERNANDES et al., 2015). O limite de detecção do ensaio foi de 46 pg/mL de testosterona e o coeficiente de variação intra- e interensaios foi <10%. Os resultados são expressos em ng/g de fezes ou ng/mL de soro.

5.5 EXPERIMENTO 3: IMUNOMARCAÇÃO PARA KI67 E DAZL E DENSIDADE DE GONÓCITOS

Os testículos de 2 machos de cada 3 ratas gestantes por grupo foram fixados em Carnoy (6:3:1, v:v:v, etanol P.A., clorofórmio e ácido acético glacial), desidratados em concentrações crescentes de álcool e xilol e emblocados em paraplast (Sigma Aldrich). Seções da gônada inteira foram submetidas a reação de imunofluorescência para a dupla marcação das proteínas DAZL (sigla em inglês para *deleted in azoospermia-like*), específica de citoplasma de células germinativas, e Ki67, expressa no núcleo de células em proliferação.

A reação de imunofluorescência foi realizada conforme descrito por ZOGBI et al. (2012). Resumidamente, 4 seções testiculares de 5 µm de espessura foram lavadas em xileno para remoção do paraplast, hidratadas e submetidas a recuperação de antígeno por aquecimento em tampão citrato (citrato de sódio 116 mM, ácido cítrico 109 mM, pH 6,0), por 10 min. Após o resfriamento, foram bloqueadas com albumina sérica bovina 5%, por 45 min, e incubadas com os anticorpos primários anti-DAZL (IgG de camundongo, 1:50, Serotec, MCA2336) e anti-Ki-67 (IgG de coelho, 1:150, ABCAM, ab16667), por 12 h, em câmara úmida, a 4°C. Então, foram lavadas em tampão Tris (TBS; 25 mM, pH 7.4) três vezes e incubadas com os anticorpos

secundários conjugados com FITC (IgG de ovelha anti-IgG de coelho, 1:100, ABCAM, ab6791) e Alexa Fluor 546 (IgG de jumento anti-IgG de camundongo, 1:100, Invitrogen, A10036), por 1 h. Na sequência, foram lavadas em TBS e incubadas com DAPI por 15 min, sendo, logo em seguida, fotografadas com objetiva de 400x em microscópio (Nikon Eclipse Ci-S, Tóquio, Japão) acoplado à câmera fotográfica (Nikon DS-Qi1Mc, Tóquio, Japão) e conectado ao programa analisador de imagens (Nis Elements Advanced Research Nikon, versão 4.0, Japão). Para cada animal, os gonócitos foram contados em 5 fotografias do parênquima testicular e a densidade dos gonócitos calculada pela razão entre o número de gonócitos e a área analisada (número de gonócitos/ μm^2). Além disso, foi descrita a marcação da proteína de proliferação, Ki-67, nas células testiculares.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados para normalidade e comparados através de ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey ou pelo teste *t* de Student. Os percentuais de ratos que tiveram a separação prepuccial dentro das categorias de idade estipuladas foram avaliados por Qui-quadrado. A concentração de metabólitos fecais de testosterona foi analisada para a área sob a curva de concentração de metabólitos fecais de testosterona por DPN, através da média de cada dia entre os diferentes grupos e através dos diferentes dias para o mesmo grupo. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o $p \leq 0,05$. A ninhada foi considerada a unidade estatística (FESTING, 2006).

O experimento 2 no qual foram avaliados os efeitos da exposição ao GCV nos descendentes masculinos adultos, os resultados dos dois grupos controle foram analisados separadamente para os DG 10 e 14. Contudo, como não foram encontradas diferenças significativas entre eles, nós optamos por combinar os dados, formando apenas um grupo controle para as análises subsequentes. Isso causou o aumento do número amostral no grupo controle, tendo como vantagem o fato de aumentar a força das análises estatísticas.

6. RESULTADOS

6.1 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE GCV NAS RATAS GESTANTES

A concentração plasmática de GCV nas ratas gestantes, 1 h após a última aplicação nos DG 10 e 14, não diferiu entre os grupos. A concentração plasmática média foi de $41,9 \pm 3,9 \mu\text{g/mL}$ nas progenitoras expostas no DG 10 ($n = 8$) e de $37,3 \pm 2,6 \mu\text{g/mL}$ nas progenitoras expostas no DG 14 ($n = 7$).

6.2 RESULTADOS DA GESTAÇÃO

Foram avaliados os possíveis efeitos da toxicidade reprodutiva do GCV em relação ao crescimento ponderal das gestantes e a sobrevivência dos recém-natos. O ganho de peso corporal das gestantes (FIGURA 6), o número de implantes uterinos, o tamanho da ninhada e a sobrevivência dos recém-natos foram investigados, mas nenhuma diferença significativa foi encontrada (TABELA 1).

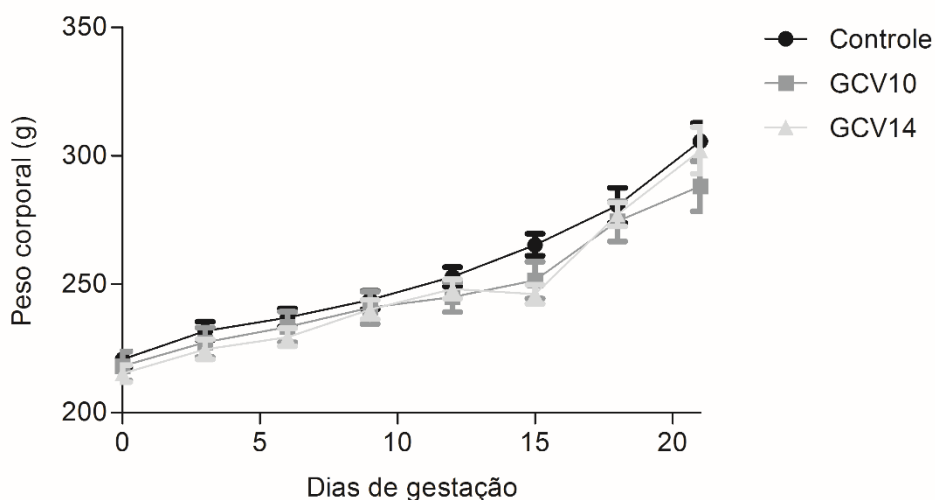


Figura 6 – Ganho de peso corporal das ratas gestantes expostas a 1 mL/kg de salina 0,9% (controle) ou 300 mg/kg de ganciclovir nos dias de gestação 10 (GCV10) ou 14 (GCV14).

TABELA 1 – RESULTADOS REPRODUTIVOS (MÉDIA ± EPM) DE RATAS EXPOSTAS AO VEÍCULO (CONTROLE) OU 300 mg/kg DE GANCICLOVIR NOS DIAS DE GESTAÇÃO 10 (GCV10) OU 14 (GCV14).

	Controle	GCV10	GCV14
Implantes uterinos (n)	10,69 ± 0,75	10,22 ± 1,04	11,36 ± 0,49
Tamanho de ninhada (n)	9,54 ± 0,90	8,89 ± 0,93	10,55 ± 0,36
Perdas pós-implante¹ (%)	13,21 ± 4,51	11,44 ± 6,02	6,75 ± 2,17
Índice de viabilidade² (%)	98,72 ± 1,28	93,43 ± 5,52	100
Índice de desmame³ (%)	98,72 ± 1,28	93,43 ± 5,52	99,17 ± 0,83
Índice de machos⁴ (%)	49,77 ± 4,61	46,67 ± 7,52	45,83 ± 5,12

¹ [(n° implantes – n° descendentes nascidos) x 100/ n° implantes]

² (n° descendentes vivos no dia pós-natal 4/ n° descendentes nascidos vivos) x 100

³ (n° descendentes vivos no dia pós-natal 21/ n° descendentes nascidos vivo) x 100

⁴ (n° descendentes do sexo masculino/ n° descendentes) x 100

6.3 DESENVOLVIMENTO DOS DESCENDENTES MASCULINOS

A exposição ao GCV no DG 10 ou 14 não influenciou o ganho de peso corporal dos descendentes masculinos (FIGURA 7). Entretanto, a distância anogenital, expressa como índice da distância anogenital (IAG) e a idade de separação prepucial, dois fatores associados a produção e exposição à testosterona, foram alterados pela exposição ao GCV. O IAG foi menor nos animais expostos ao GCV quando a medida foi avaliada no DPN 5 e permaneceu reduzida, mas no DPN 90 foi estatisticamente diferente somente no grupo GCV10, em relação ao controle (FIGURA 8). Os ratos do grupo GCV14 tiveram a separação prepucial atrasada, em relação aos grupos controle e GCV10 (FIGURA 9).

Quanto ao peso dos órgãos, somente o peso de testículos e epidídimos foi reduzido nos animais expostos ao GCV nos DG 10 e 14, sendo a redução mais pronunciada nos animais expostos no DG 14. O peso de fígado, baço, rins e adrenais, assim como de órgãos andrógeno-dependentes, como próstata, vesículas seminais e músculo levantador do ânus não sofreu alteração (TABELA 2).

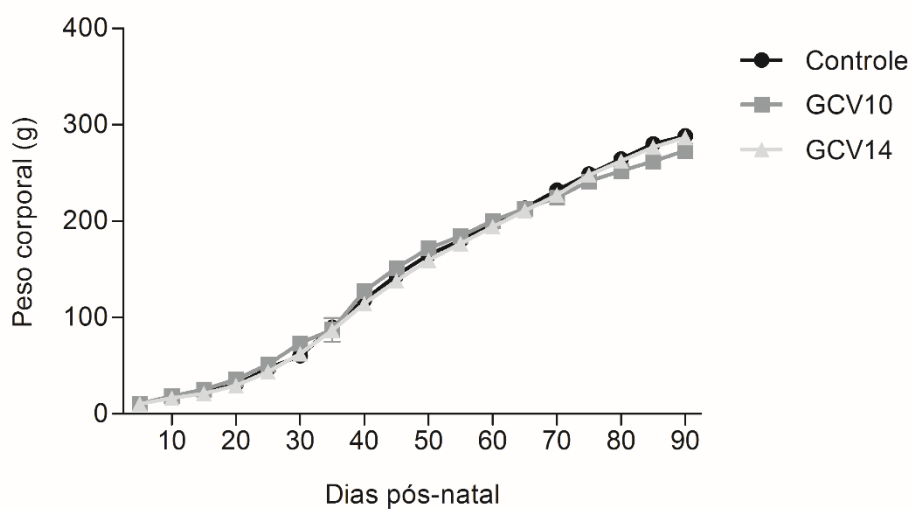


Figura 7 – Ganho de peso corporal de ratos machos expostos ao veículo (controle; n = 13) ou 300 mg/kg de ganciclovir nos dias de gestação 10 (GCV10; n = 9) ou 14 (GCV14; n = 11).

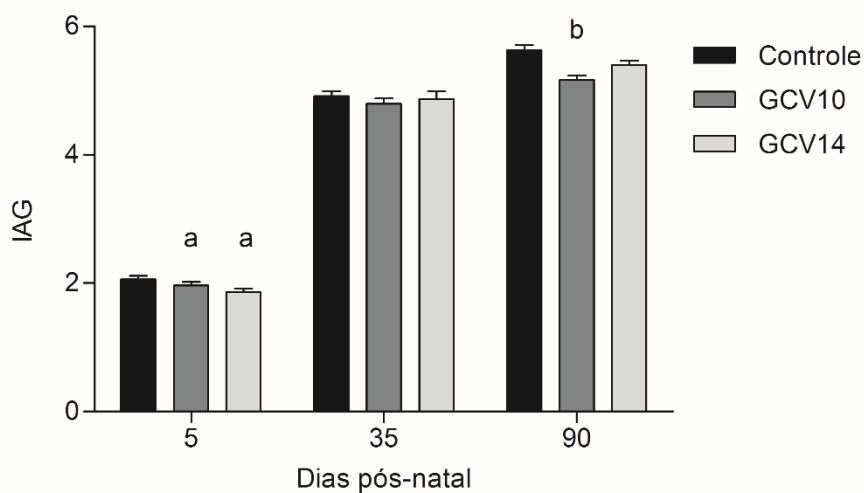


Figura 8 – Índice da distância anogenital ($IAG = AGD/\text{peso corporal}^{1/3}$) de ratos machos após exposição ao veículo (controle; n = 13) ou 300 mg/kg de ganciclovir no dia de gestação 10 (GCV10; n = 9) ou 14 (GCV14; n = 11). ^a e ^b $p < 0,05$, significativamente diferente do controle (ANOVA/Tukey).

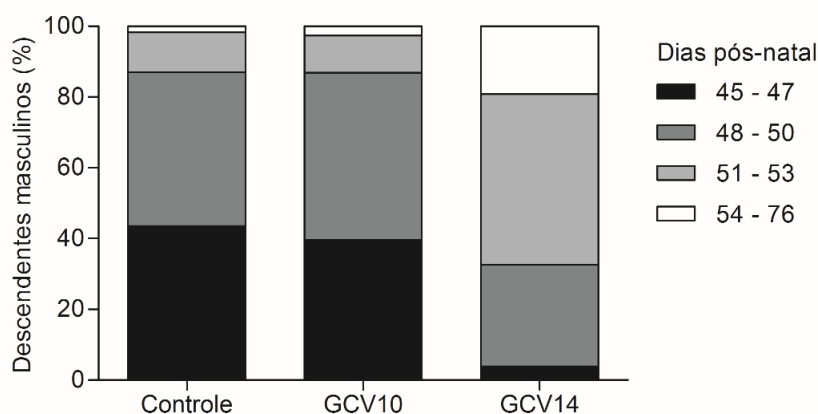


Figura 9 – Percentual de ratos machos que atingiram a separação prepucial por períodos de dia pós-natal (DPN 45-47, 48-50, 51-53, 54-76), expostos ao veículo (controle; n = 13) ou 300 mg/kg de GCV nos dias de gestação 10 (GCV10; n = 9) ou 14 (GCV14; n = 11).

NOTA: O grupo GCV14 apresentou atraso na separação prepucial em relação aos grupos GCV10 e controle.

TABELA 2 – PESO ABSOLUTO (g) E RELATIVO (g%) DE ÓRGÃOS DE RATOS MACHOS ADULTOS (MÉDIA \pm EPM) EXPOSTOS AO VEÍCULO OU 300 mg/kg DE GANCICLOVIR NOS DIAS DE GESTAÇÃO 10 OU 14.

	Controle (n = 10)	GCV10 (n = 4)	GCV14 (n = 9)
Testículos	1,52 \pm 0,02 † (0,51 \pm 0,01) †	1,09 \pm 0,09 † (0,39 \pm 0,03) †	0,76 \pm 0,07 † (0,26 \pm 0,03) †
Epidídimos	0,42 \pm 0,01 (0,14 \pm 0,01) †	0,31 \pm 0,05 * (0,12 \pm 0,01) †	0,27 \pm 0,02 * (0,09 \pm 0,01) †
Próstata	0,21 \pm 0,02 (0,07 \pm 0,01)	0,23 \pm 0,01 (0,07 \pm 0,01)	0,19 \pm 0,01 (0,06 \pm 0,01)
Vesícula seminal	0,46 \pm 0,02 (0,16 \pm 0,01)	0,45 \pm 0,02 (0,15 \pm 0,01)	0,44 \pm 0,01 (0,15 \pm 0,01)
Músculo levantador do ânus	0,82 \pm 0,03 (0,28 \pm 0,01)	0,71 \pm 0,16 (0,24 \pm 0,05)	0,74 \pm 0,04 (0,25 \pm 0,01)
Fígado	10,35 \pm 0,27 (3,47 \pm 0,06)	9,82 \pm 0,66 (3,55 \pm 0,17)	10,39 \pm 0,28 (3,37 \pm 0,07)
Baço	0,68 \pm 0,01 (0,23 \pm 0,01)	0,42 \pm 0,16 (0,22 \pm 0,01)	0,74 \pm 0,02 (0,24 \pm 0,02)
Rins	0,96 \pm 0,02 (0,32 \pm 0,01)	0,92 \pm 0,06 (0,36 \pm 0,02)	0,98 \pm 0,03 (0,32 \pm 0,01)
Adrenais	0,02 \pm 0,01 (0,007 \pm 0,0002)	0,02 \pm 0,01 (0,008 \pm 0,0002)	0,02 \pm 0,01 (0,007 \pm 0,0004)

Peso relativo = [peso do órgão (g)/peso corporal (g)*100]

† p<0,05, significativamente diferente entre todos os grupos (ANOVA/Tukey)

* p<0,05, significativamente diferente do controle (ANOVA/Tukey)

n número de ninhadas.

6.4 EFEITOS DO GANCICLOVIR SOBRE A MORFOLOGIA TESTICULAR

No total, foi avaliada a morfologia testicular de 76 ratos machos adultos, provenientes de 30 ninhadas diferentes. Dos 76 animais, 43 foram expostos *in utero* ao GCV, tanto no DG 10 quanto no 14, e somente 5 animais, expostos ao GCV no DG 10, apresentaram morfologia testicular inalterada.

A principal alteração observada na histologia testicular dos animais expostos ao GCV foi a presença de TACS. Estes túbulos apresentavam-se em grupos e dispersos pelo parênquima testicular, possuíam diâmetro tubular reduzido e, na maioria das vezes, ausência de lúmen. Em menor proporção, foram observados túbulos seminíferos com a espermatogênese prejudicada, nos quais foram observadas algumas células de estágios iniciais da espermatogênese (FIGURA 10).

Embora a alteração da morfologia testicular induzida nos animais expostos ao GCV tenha sido a mesma, ou seja, o desenvolvimento de TACS e com a espermatogênese prejudicada, aqueles expostos no DG 14 apresentaram maior percentual de túbulos seminíferos anormais, em média (\pm EPM) de $31,9 \pm 6,3\%$, enquanto que aqueles expostos no DG 10 apresentaram $12,7 \pm 5,4\%$ (FIGURA 11). O efeito testicular da exposição ao GCV não foi homogêneo entre os descendentes, sendo que os percentis 25 e 75% do percentual de túbulos seminíferos anormais para os ratos expostos ao GCV nos DG 10 e 14 de 0 e 18,7% e de 7,3 e 41,4%.

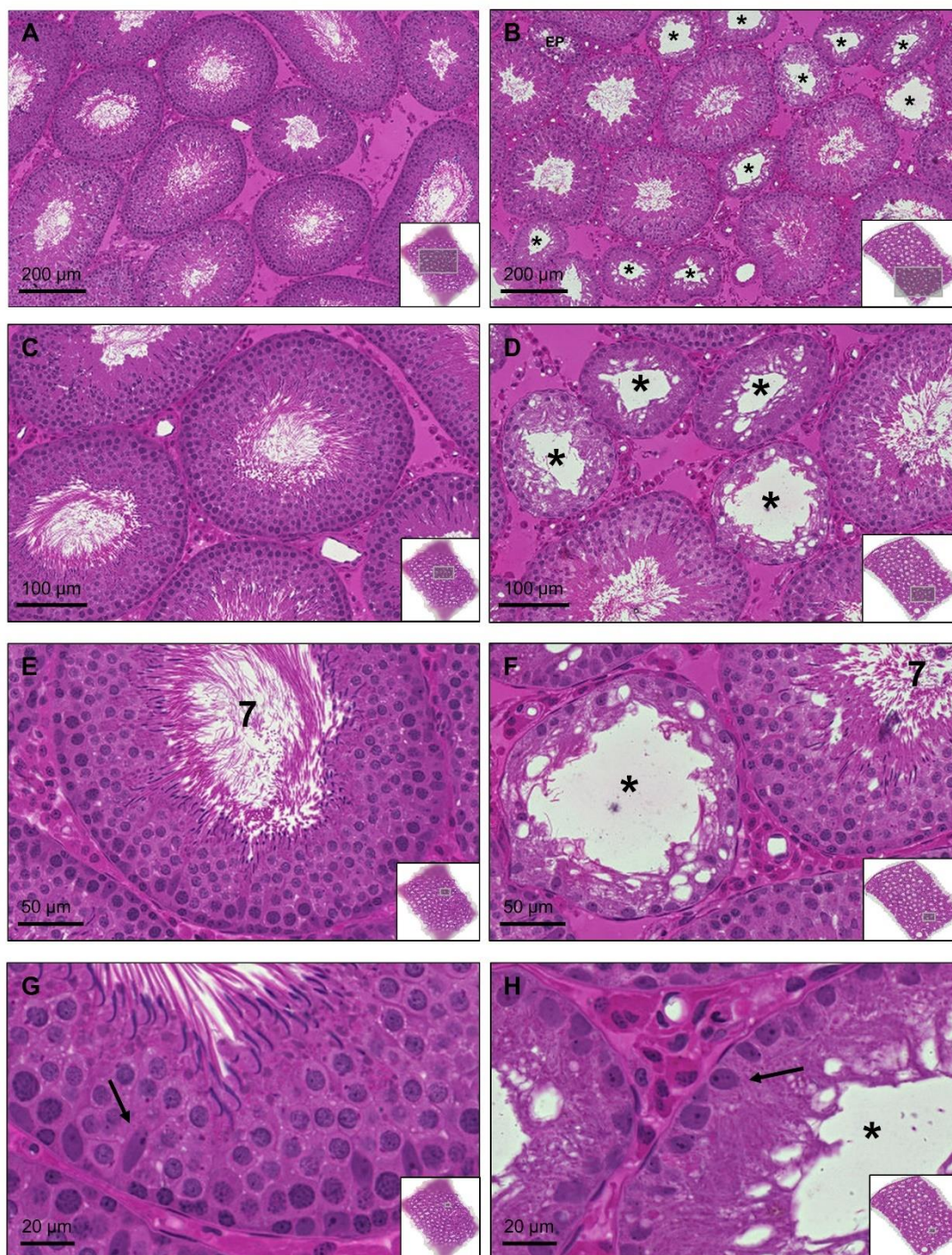


FIGURA 10 – Aspecto histológico testicular de ratos no dia pós-natal 90, após exposição ao veículo (controle; A, C, E e G) ou 300mg/kg de ganciclovir, no dia de gestação 10 ou 14 (GCV; B, D, F e H). NOTA: Os animais do grupo controle apresentaram todos os túbulos seminíferos com aspecto normal. Os animais expostos ao GCV apresentaram túbulos seminíferos apenas com células de Sertoli (TACS; *) e túbulos seminíferos com a espermatogênese prejudicada (EP) ao lado de túbulos seminíferos normais. Estas alterações foram observadas em ambos os grupos expostos ao GCV. Túbulos seminíferos em estágio VII (7) do ciclo do epitélio seminífero de ratos estão presentes nos controles (E e G) e nos animais expostos ao GCV (F e H). As setas indicam núcleos de células de Sertoli com nucléolo evidente. Estas imagens foram geradas a partir do escaneamento de uma seção histológica, com objetiva de 630x, utilizando o microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE), equipado com software de captura automatizada Metafer 4/VSlide (Metasystems, Altlusheim, DE), acoplado a câmera CoolCube 1 (Metasystems, Altlusheim, DE).

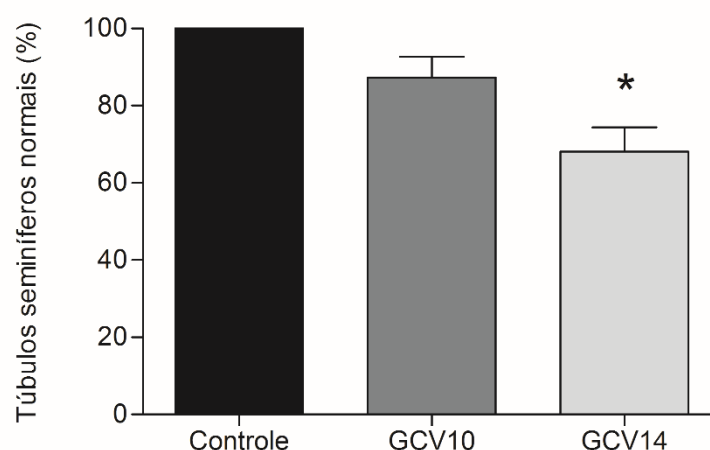


Figura 11 – Percentual de túbulos seminíferos normais em ratos machos expostos ao veículo (controle; n = 13) ou 300mg/kg de ganciclovir, nos dias de gestação 10 (GCV10; n = 9) ou 14 (GCV14; n = 8). NOTA: Os túbulos seminíferos foram quantificados em todo o parênquima testicular de duas seções histológicas por animal. * $p < 0,05$ significativamente diferente dos grupos controle e GCV10 (ANOVA/Tukey).

6.4.1. Morfometria testicular

O diâmetro dos túbulos seminíferos normais foi maior nos animais expostos ao GCV no DG 14 em relação aos animais do grupo controle. Isso é resultado do maior diâmetro de lúmen dos túbulos seminíferos e do maior número de células germinativas no epitélio seminífero (TABELA 4) e não da maior altura de epitélio seminífero (TABELA 3). Embora os animais expostos ao GCV no DG 10 também tenham apresentado maior diâmetro de lúmen, isso não refletiu no diâmetro tubular. O diâmetro dos túbulos seminíferos anormais é menor do que os túbulos seminíferos normais e a média ponderada do diâmetro dos túbulos seminíferos nos animais expostos ao GCV é menor no grupo GCV14 quando comparado ao controle (TABELA 3).

O comprimento dos túbulos seminíferos e o volume dos componentes do parênquima testicular como volume tubular e de tecido conjuntivo, estão reduzidos nos grupos expostos ao GCV, exceto o volume ocupado pelas células de Leydig. No grupo GCV14, o volume tubular está reduzido em torno de 30% e 20% em relação aos grupos controle e GCV10, respectivamente (TABELA 3).

TABELA 3 – MORFOMETRIA DE TÚBULOS SEMINÍFEROS E COMPOSIÇÃO VOLUMÉTRICA DO PARÊNQUIMA TESTICULAR DE RATOS MACHOS ADULTOS EXPOSTOS AO VEÍCULO OU 300 mg/kg DE GANCICLOVIR NOS DIAS DE GESTAÇÃO 10 OU 14. OS DADOS SÃO MÉDIA ± EPM.

	Controle (n = 13)	GCV10 (n = 9)	GCV14 (n = 7)
Altura do epitélio seminífero (µm)	96,6 ± 1,5	96,8 ± 1,3	94,5 ± 2,0
Diâmetro do lúmen tubular (µm)	122,7 ± 2,7	134,7 ± 3,1*	138,1 ± 3,8 *
Diâmetro do túbulo normal (µm)	317,8 ± 3,0	327,2 ± 2,9	331,7 ± 3,9 *
Diâmetro do túbulo anormal (µm)		190,3 ± 9,4**	194,3 ± 5,1 **
MP do diâmetro túbulo (µm) ^a	317,8 ± 3,0	305,3 ± 8,4	290,8 ± 10,5 *
Comprimento do túbulo (m)	16,2 ± 0,8	13,6 ± 0,7*	11,6 ± 0,6 *
Volume tubular (ml)	1,3 ± 0,02 †	1,0 ± 0,08 †	0,8 ± 0,06 †
Volume da célula Leydig (ml)	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Volume do tecido conjuntivo (ml) ^b	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,01 *	0,08 ± 0,01 *

^a MP = média ponderada do diâmetro dos túbulos seminíferos, corrigida pelo percentual de túbulos seminíferos normais e anormais para cada animal.

^b Tecido conectivo composto pelos vasos e espaço intersticial.

* p<0,05 significativamente diferente do controle (ANOVA/Tukey).

** p<0,01 significativamente diferente do diâmetro de túbulos normais entre os grupos GCV10 e GCV14 (Teste *t* Student).

† p<0,05, significativamente diferente entre todos os grupos (ANOVA/Tukey).

n número de ninhadas.

A contagem de células por secção transversal de túbulos seminíferos em estágio VII demonstrou que a espermatogênese está ocorrendo sem perda de células germinativas nos animais expostos ao GCV. No entanto, foi encontrado aumento de espermatócitos pré-leptóteno e no índice de células de Sertoli (número de espermatídes redondas por célula de Sertoli) no grupo GCV14 em relação ao controle (TABELA 4) o que pode explicar o aumento no diâmetro dos túbulos seminíferos normais nos animais expostos ao GCV. O número de células de Sertoli por secção transversal é maior em túbulos seminíferos anormais do que nos túbulos seminíferos em estágio VII e a PTCS foi reduzida nos animais expostos ao GCV (TABELA 4).

As células de Leydig apresentaram volume reduzido apenas no grupo GCV10, embora os valores sejam menores também no GCV14 em relação ao controle (TABELA 5). A população de células de Leydig por testículo não foi alterada pela a exposição ao GCV (TABELA 5), embora na análise da histologia testicular seja evidente a aglomeração de células de Leydig entre os TACS.

TABELA 4 – NÚMERO DE CÉLULAS CONTADAS EM TÚBULOS SEMINÍFEROS NORMAIS EM ESTÁGIO VII E EM TÚBULOS SEMINÍFEROS APENAS COM CÉLULAS DE SERTOLI (TACS) (MÉDIA±EPM) DE RATOS MACHOS ADULTOS EXPOSTOS AO VEÍCULO OU 300 mg/kg DE GANCICLOVIR NO DIA DE GESTAÇÃO 10 (GCV10) OU 14 (GCV14).

	Controle (n = 12)	GCV10 (n = 9)	GCV14 (n = 7)
Espermatogônia	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,3 ± 0,2
Espermatócito pré-leptóteno	28,8 ± 0,6	29,2 ± 0,7	31,7 ± 0,8*
Espermatócito paquíteno	28,4 ± 0,4	27,9 ± 0,8	29,2 ± 1,0
Espermátides redondas	76,7 ± 1,5	80,4 ± 1,9	82,1 ± 1,9
Células de Sertoli (túbulos normais)	9,9 ± 0,3	9,6 ± 0,4	9,1 ± 0,4
Células de Sertoli (TACS)		15,2 ± 1,1**	16,8 ± 0,8**
Índice de células de Sertoli ^a	7,9 ± 0,2	8,6 ± 0,5	9,5 ± 0,7*
População células Sertoli/ testículo (x10⁶)	41,8 ± 1,8	33,3 ± 1,6*	32,3 ± 2,6*

Nota. A população de células de Sertoli foi calculada com base na média ponderada entre de células de Sertoli em túbulos seminíferos normais e TACS.

^a Número de espermátides redondas/ célula de Sertoli em túbulos seminíferos em estágio VII

* p<0,05, significativamente diferente do controle (ANOVA/Tukey)

** p<0,01, significativamente diferente do número de células de Sertoli em túbulos normais.

n número de ninhadas.

TABELA 5 – MORFOMETRIA DE CÉLULAS DE LEYDIG (MÉDIA±EPM) DE RATOS MACHOS ADULTOS EXPOSTOS AO VEÍCULO OU 300 MG/KG DE GANCICLOVIR NOS DIAS DE GESTAÇÃO 10 OU 14.

	Controle (n = 10)	GCV10 (n = 5)	GCV14 (n = 5)
Volume nuclear (µm³)	221,9 ± 7,4	196,2 ± 6,7	196,5 ± 6,7
Volume citoplasmático (µm³)	418,4 ± 19,9	334,3 ± 12,5*	351,3 ± 21,8
Volume total (µm³)	640,2 ± 26,3	530,5 ± 18,4*	547,7 ± 28,1
Número/ testículo (x 10⁶)	26,9 ± 2,1	24,1 ± 0,9	27,6 ± 2,4

* p<0,05 significativamente diferente do controle (ANOVA/Tukey)

n número de ninhadas.

6.5 CONCENTRAÇÃO DE TESTOSTERONA SÉRICA E DE METABÓLITOS FECAIS DE TESTOSTERONA

A exposição ao GCV não alterou a concentração de testosterona sérica de ratos machos adultos, ao DPN 90. A concentração média (±EPM) de testosterona sérica foi de 2,32 ± 0,46, 2,18 ± 0,47 e 2,46 ± 0,51 ng/mL para os grupos controle

(n=10), GCV10 (n=3) e GCV14 (n=9), respectivamente. Embora o número de ninhadas avaliadas tenha sido baixo para o grupo GCV10, é importante ressaltar que o número de indivíduos avaliados foi de 29, 12 e 20 para os grupos controle, GCV10 e GCV14, respectivamente.

A concentração de metabólitos fecais de testosterona também não foi influenciada pela exposição ao GCV (FIGURA 12).

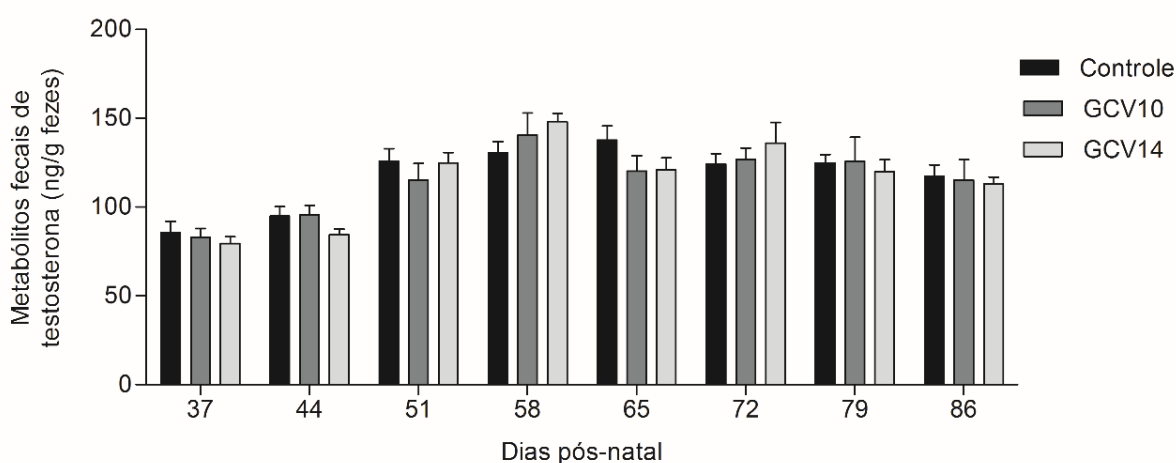


Figura 12 – Concentração de metabólitos fecais de testosterona (ng/g de fezes) de ratos machos expostos à 1 mL/kg de salina (controle; n = 10) ou 300 mg/kg de ganciclovir nos dias de gestação 10 (GCV10; n = 7) ou 14 (GCV14; n = 11).

6.6 DENSIDADE NUMÉRICA DOS GONÓCITOS E ANÁLISE DESCRITIVA DA IMUNOMARCAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO

A expressão de DAZL pode ser identificada pela fluorescência vermelha no citoplasma dos gonócitos com marcação mais intensa em torno do núcleo (FIGURAS 13 e 14). Esta marcação foi utilizada para identificar e contar os gonócitos para, então, calcular a sua densidade numérica (número de gonócitos/ μm^2). A densidade numérica dos gonócitos foi reduzida em 50% nos animais do CGV14, enquanto que os animais expostos do GCV19 não sofreram alteração, em relação aos seus respectivos grupos controle (FIGURA 15).

Já a expressão de Ki67 pode ser identificada pela fluorescência verde no núcleo dos gonócitos e das células somáticas testiculares. A exposição ao GCV no DG14 não alterou a expressão de Ki67 nas células somáticas ou nos gonócitos que resistiram ao efeito tóxico do GCV (FIGURA 13). Nos grupos C19 e GCV19 todos os gonócitos foram negativos para marcação de Ki67 (FIGURA 14). Entretanto, foi encontrada diferença na marcação das células somáticas localizadas na periferia dos cordões seminíferos. O Ki67 foi marcado nas células somáticas nos animais do grupo C19, mas não nos animais do grupo GCV19. Considerando a sua localização, estas células somáticas são, provavelmente, células de Sertoli negativas para Ki67 (FIGURA 14).

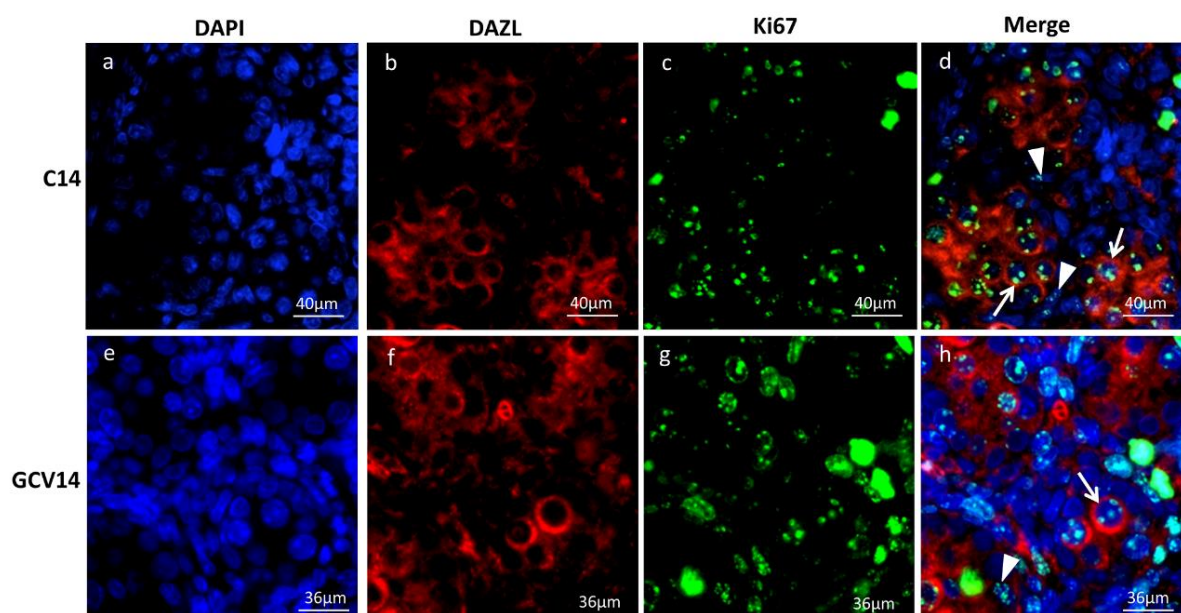


Figura 13 – Reação de imunofluorescência das proteínas DAZL (vermelho) e Ki67 (verde) e coloração com DAPI (azul) do parênquima testicular de ratos, 24h após a exposição a 1ml/kg de veículo (C14, a – d) ou 300 mg/kg de ganciclovir (GCV14, e – h) no DG 14.

NOTA: Foram processados os testículos de dois fetos masculinos provenientes de três progenitoras diferentes para cada grupo (n= 3/ grupo), sendo que de cada feto foram avaliadas cinco imagens do parênquima testicular para descrição da marcação da proteína de proliferação Ki67. A marcação de Ki67 foi observada nas células germinativas (setas) e nas células de Sertoli (cabeças de setas) nos grupos C14 e GCV14.

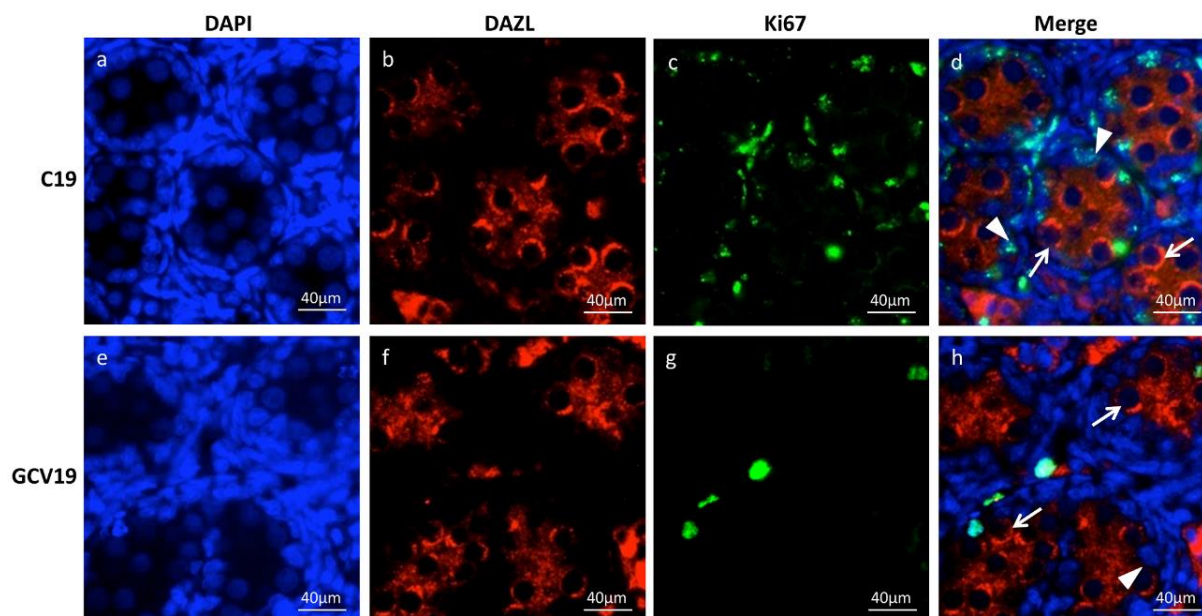


Figura 14 – Reação de imunofluorescência das proteínas DAZL (vermelho) e Ki67 (verde) e coloração com DAPI (azul) do parênquima testicular de ratos, 24h após a exposição a 1ml/kg de veículo (C19, a – d) ou 300 mg/kg de ganciclovir (G19, e – h) no DG 19.

NOTA: Foram processados testículos de dois fetos masculinos oriundos de três progenitoras diferentes para cada grupo (n= 3/ grupo), sendo que de cada feto foram avaliadas cinco imagens do parênquima testicular para descrição da marcação da proteína de proliferação Ki67. A marcação de Ki67 não foi observada nas células germinativas (setas) nos ratos do grupo C19 ou GCV19. Entretanto, as células de Sertoli (cabeças de setas) foram positivas para a marcação de Ki67 no C19 (d) e negativas no GCV19 (h).

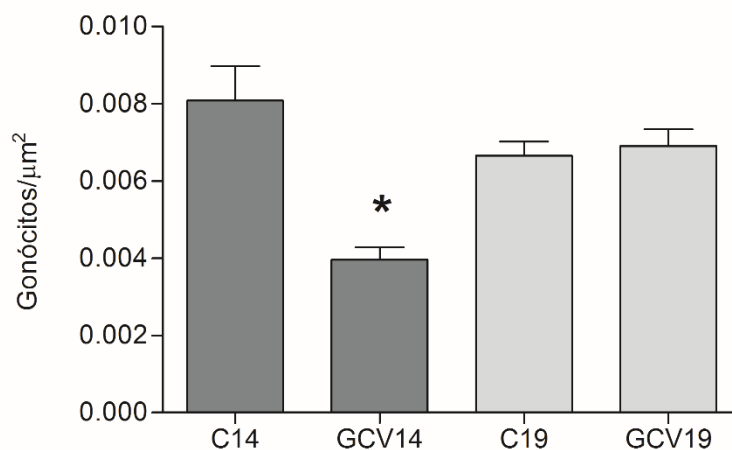


Figura 15 – Densidade numérica de gonócitos em testículo de ratos no DG 15 e 20, 24h após a exposição a 1 ml/kg de veículo (C14 e C19) ou 300mg/kg de ganciclovir (GCV14 e GCV19).

NOTA: Os testículos de dois fetos masculinos provenientes de três progenitoras diferentes de cada grupo (n= 3/ grupo) foram submetidos a reação de imunofluorescência para a proteína DAZL e os gonócitos foram quantificados em cinco fotografias do parênquima testicular de cada rato. * p<0,05 significativamente diferente do controle (teste *t* de Student).

7. DISCUSSÃO

Em estudo anterior do nosso laboratório, foram investigados os efeitos do GCV sobre o testículo de ratos machos no DG 20 e no DPN 90 após exposição materna no DG 10, dia que corresponde ao início da diferenciação gonadal em ratos. A exposição *in utero* a 300 mg/kg de GCV induziu redução do peso testicular e epididimário nos animais adultos e no número de células germinativas nos testículos fetais e adultos. Os ratos adultos apresentavam TACS entremeados com túbulos seminíferos normais, característica histológica semelhante a da síndrome focal dos TACS que afeta homens. Foi aventada a hipótese de que o GCV estaria interferindo na colonização dos cordões seminíferos nos estágios iniciais do desenvolvimento gonadal por afetar a migração ou a sobrevivência das CGP (NIHI et al., 2014).

Com base nestes achados, nós delineamos o presente estudo para investigar os efeitos do GCV sobre o testículo de ratos quando a exposição ocorre em diferentes janelas do desenvolvimento testicular. Inicialmente, nós acompanhamos o desenvolvimento reprodutivo e avaliamos os testículos dos descendentes masculinos adultos expostos ao GCV em dois estágios: (1) de migração, com baixa proliferação e (2) de alta proliferação das células germinativas, DG 10 e 14, respectivamente. Com esta abordagem, nós identificamos o DG 14, um período fetal de intensa proliferação das células germinativas, como uma janela crítica para os efeitos do GCV. Animais expostos no DG 14, atingiram a puberdade tardiamente e, quando adultos, apresentaram redução de 50% no peso testicular em relação ao grupo controle. Túbulos seminíferos com morfologia anormal foram encontrados em todos os testículos de animais expostos ao GCV no DG 14, com uma média de, aproximadamente, 30% dos túbulos seminífero com ausência de células germinativas. A proliferação das células germinativas é menos intensa no DG 10, e, possivelmente por isso, os efeitos do GCV foram menos pronunciados nos animais expostos neste dia. O peso testicular foi reduzido em 30% e a ocorrência de TACS foi menor do que 12%, com 22% dos animais apresentando morfologia testicular normal.

Posteriormente, nós expusemos fetos no DG 14 e 19 ao GCV e avaliamos o número de células germinativas nos testículos no DG 15 e 20, aproximadamente 24 h após a primeira exposição ao GCV. Confirmando os resultados dos animais adultos, nós encontramos redução de 50% no número de células germinativas nos testículos dos animais expostos no DG 14, mas nenhuma alteração nos testículos de animais

expostos no DG 19. Ratos no DG 19 não apresentam mais proliferação das células germinativas, as quais permanecem na fase estacionária até, aproximadamente, o DPN 5 (BOULOGNE et al., 1999; NAGANO et al., 2000; ENCINAS; ZOGBI; STUMPP, 2012). O fato de ratos machos expostos ao GCV nesta idade não apresentarem redução no número de células germinativas sugere que a toxicidade do GCV está relacionada com a taxa de proliferação destas células.

O percentual de túbulos seminíferos afetados pelo GCV teve grande variação entre animais da mesma ninhada, embora a concentração de GCV no plasma das progenitoras não tenha apresentado diferença estatística. Os mecanismos envolvidos neste efeito não são conhecidos. Diferenças genéticas, como no nível de expressão de proteínas de resistência multidrogas (ADACHI et al., 2002) podem determinar a resposta celular ao GCV. Além disso, a população de células germinativas em cada estágio do desenvolvimento testicular não é homogênea. Diferenças na taxa de mitose, no comportamento migratório, na morfologia, na expressão de diferentes marcadores, assim como no tempo em que as células germinativas alcançam as cristas genitais foram descritos (MERCHANT, 1975; NAGANO et al., 2000; ORWIG et al., 2002; ENCINAS; ZOGBI; STUMPP, 2012; ZOGBI et al., 2012). A sensibilidade aos efeitos tóxicos do GCV pode ser dependente do estágio de desenvolvimento de cada célula germinativa. A variação no número de túbulos seminíferos anormais nos animais adultos expostos no DG 10 e 14 também pode ser resultado do número total de células germinativas afetadas, combinado com o tempo restante para a recuperação da população celular. O número de células germinativas nos testículos difere de um pouco mais de uma dezena para milhares, entre os DG 10 e 14, e a proliferação cessa por volta do DG 18. Então, animais expostos no DG 10 podem ter mais tempo para recuperar o número de células germinativas após a exposição ao GCV e apresentar menor número de TACS.

Os efeitos citotóxicos do GCV, principalmente sobre as células germinativas, estão relacionados ao mecanismo de ação do antiviral. Análogos de nucleosídeos fosforilados, como o trifosfato de GCV, são incorporados à cadeia de DNA em replicação pela DNA polimerase celular induzindo a terminação da corrente e, eventualmente, a morte celular. A atividade antiviral do GCV depende da conversão inicial ao monofosfato, reação catalisada pela TC viral expressa em células infectadas, seguido pela conversão às formas di- e trifosfatadas pelas cinases da célula hospedeira (MATTHEWS; BOEHME, 1988; SMEE et al., 1985; ADLER; NIGRO;

PEREIRA, 2007; BOUJEMLA et al., 2016). Esta toxicidade condicionada à expressão da TC viral tem sido utilizada para, seletivamente, eliminar células indesejáveis em terapia genética para o tratamento de câncer e de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (BUURSMA et al., 2004; CARUSO et al., 1993; CARUSO; KLATZMANN, 1992), assim como, para remover tipos celulares específicos em camundongos transgênicos (DZIERZAK et al., 1993; HEYMAN et al., 1989; MINASI et al., 1993). A eliminação de um tipo celular específico ocorre pela expressão da TC viral, inserida no DNA celular, em conjunto com um promotor específico da célula, seguido pela administração de um análogo de nucleosídeo, como o GCV. Entretanto, os camundongos machos que expressam a TC viral também são estéreis (IWAKURA et al., 1988; AL-SHAWI et al., 1991; DZIERZAK et al., 1993; CAI et al., 2012, 2009), devido a presença de um indutor específico testicular, que estimula expressão da enzima viral nos testículos (AL-SHAWI et al., 1991). Nestes animais, as células germinativas são completamente eliminadas, restando somente as células de Sertoli. Pacientes infectados com herpes podem se tornar inférteis, devido à expressão da TC viral que, por si só, causa a apoptose das células germinativas (SALOMON et al., 1995; CAI et al., 2012, 2009; MIRZAEI; ERIKSSON; ALBERTIONI, 2010). Os mecanismos de regulação intrínsecos da expressão da TC nas células germinativas podem explicar porque a exposição ao GCV em ratos não infectados tem efeito tóxico tão evidente nas células germinativas. Aparentemente, durante a proliferação, pode haver alta expressão de TC nestas células, levando à formação de níveis elevados de GCV trifosfato.

Embora outros tipos celulares, que não expressam a TC viral, também possam ativar o GCV (FREITAS et al., 1985; SMEE et al., 1985; HAYNES; LAMBERT; MITCHELL, 1996; JANOLY-DUMENIL et al., 2012), as células germinativas parecem ser particularmente sensíveis aos seus efeitos. Durante o desenvolvimento embrionário, particularmente em janelas críticas do desenvolvimento testicular, como o que observamos nos animais expostos no DG 14, o GCV induziu a morte das células germinativas, causando redução do seu número e desenvolvimento de TACS na vida adulta. Neste estudo, nós não avaliamos em detalhes os efeitos do GCV sobre a proliferação e diferenciação de outros tecidos. Entretanto, não foram observadas alterações estruturais macroscópicas ou no peso de outros órgãos, como fígado, baço, rins e adrenais, sugerindo ausência de efeito tóxico do GCV sobre estes órgãos.

Os efeitos da exposição pré-natal ao GCV sobre os testículos dos descendentes masculinos adultos não ficaram limitados a ocorrência de túbulos seminíferos anormais, mas também ocorreram alterações na morfometria e no número de células nos túbulos seminíferos com espermatogênese normal. A exposição ao GCV nos DG 10 e 14 causou aumento no diâmetro do lúmen e do túbulo seminífero, acompanhado por uma redução no comprimento total dos túbulos seminíferos, como uma evidência de que a exposição ao GCV perturbou a arquitetura normal testicular em decorrência dos TACS.

Além disso, houve redução no número de células de Sertoli por testículo, em ambos os grupos, aumento do índice de células de Sertoli (a proporção entre o número de espermátides redondas por célula de Sertoli) nos animais expostos no DG 14. Em ratos, as células de Sertoli já diferenciaram por volta do DG 14, quando circundam as CGP (denominadas de gonócitos neste estágio) para formar os cordões seminíferos (ORTH, 1982; ANGELOPOULOU et al., 2008; CULTY, 2013). Os períodos peri- e pós-natal são marcados por intensa proliferação das células de Sertoli (ORTH, 1982). No experimento fetal, nós observamos que a exposição ao GCV no DG 19, mas não no DG 14, reduziu a marcação de Ki67 nas células somáticas localizadas em torno dos gonócitos nos cordões seminíferos. Embora não tenhamos utilizado um marcador específico de células de Sertoli, estas células são, provavelmente, células de Sertoli devido a sua localização. Em conjunto, a redução no número de células de Sertoli nos animais adultos e a redução da marcação de proliferação das células de Sertoli no testículo fetal, sugere que a redução significativa no comprimento dos túbulos seminíferos e no tamanho dos testículos em ambos os grupos possa ser consequência da toxicidade ao GCV não apenas em células germinativas, mas também nas células somáticas.

Devido a intensa relação entre as células germinativas e as células de Sertoli, a alteração da proliferação ou da função das células de Sertoli induzida pelo GCV pode implicar em alteração da estrutura dos túbulos seminíferos, da taxa de sobrevivência das células germinativas e da taxa espermatogênica. Como foi demonstrado por Qiu e colaboradores (2016), células de Sertoli imaturas expostas ao GCV *in vitro* não sofrem alteração da proliferação nas doses analisadas, embora apresentem redução da expressão de conexina 43, uma proteína essencial para o desenvolvimento das junções tipo *gap* entre células de Sertoli adjacentes e entre estas e as células germinativas (PELLETIER, 2011). A expressão reduzida desta proteína

nas células de Sertoli impacta a maturação destas células e também a espermatogênese em animais adultos (BREHM et al., 2007; GERBER; HEINRICH; BREHM, 2016). Além disso, a redução no número de células de Sertoli reduz a produção espermática por afetar diretamente o comprimento dos túbulos seminíferos e a capacidade espermatogênica testicular, já que cada célula de Sertoli suporta a espermatogênese de um número definido de células germinativas para cada espécie animal (RUSSELL; PETERSON, 1984; NEUBAUER et al., 2004; AUHAREK et al., 2010).

Os efeitos do GCV sobre as células de Leydig foram mínimos. Nós não encontramos alteração no número de células de Leydig, embora tenha ocorrido redução do volume celular individual nos animais expostos no DG 10, e aglomerações de células de Leydig tenham sido observadas entre os TACS. Esta aglomeração das células de Leydig em torno de TACS é um fator comum em homens com a síndrome dos TACS e em camundongos modelo para a síndrome de Klinefelter. Acredita-se que isso ocorra como resultado da hiperplasia das células de Leydig induzida pelos altos níveis séricos de LH, embora os níveis de T nessas condições possam estar normais (HOLM et al., 2003; WERLER et al., 2014). Da mesma forma, apesar das pequenas modificações nas células de Leydig observadas no nosso estudo, a produção de testosterona não foi afetada, sendo a concentração média sérica e fecal similar entre os grupos. O perfil de androgênios fecais foi normal ao longo da puberdade, evidenciando um pico de secreção por volta dos DPN 51 e 58, como demonstrado previamente (LEE et al., 1975). Entretanto, o atraso na separação prepucial nos animais expostos no DG 14 e a DAG ligeiramente reduzida nos animais expostos pode indicar uma redução na androgenização dos tecidos. Como já foi demonstrado em humanos (SWAN et al., 2015) e em animais experimentais (KITA et al., 2016), a DAG é influenciada pela exposição aos androgênios durante a vida pré-natal, assim como o peso e desenvolvimento de órgãos andrógeno-dependentes (JOUBERT; TOBIN; LEBART, 1994).

Este estudo demonstra que o efeito testicular causado pela exposição de ratos *in utero* ao GCV é influenciado pelo momento do desenvolvimento fetal no qual a exposição ocorre, já que ratos expostos ao GCV no DG 14 apresentaram efeitos testiculares mais acentuados em relação àqueles expostos no DG 10 ou 19. Aparentemente, o GCV não está interferindo na migração das células germinativas, como foi sugerido em estudo prévio do nosso laboratório (NIHI et al., 2014), mas sim

na proliferação das células germinativas, pois os animais expostos no DG 10, quando o número de células germinativas migrando é alta e a taxa de proliferação é baixa, apresentaram menor efeito testicular do que aqueles animais expostos no DG 14, quando a taxa de proliferação é mais alta. Somando-se com a ausência de efeito citotóxico sobre as células germinativas nos animais expostos no DG 19, quando não há mais proliferação das células germinativas.

8. CONCLUSÕES

- O período da gestação não alterou o nível de exposição dos descendentes ao GCV;
- A exposição ao GCV não alterou parâmetros reprodutivos das ratas gestantes, nem mesmo a sobrevivência dos descendentes;
- Não houve indícios de indução de toxicidade geral nos descendentes expostos ao GCV;
- Houve redução da DAG nos animais expostos ao GCV nos DG 10 e 14 e atraso da puberdade nos animais expostos ao GCV no DG 14, indicando possível redução da exposição à androgênios na vida intra-uterina e pós-natal;
- A produção de testosterona após a puberdade não foi afetada nos descendentes expostos ao GCV nos DG 10 e 14;
- Os principais achados alterados na morfologia testicular foram: a ocorrência de TACS, que apresentam menor diâmetro tubular; a redução do volume tubular e do tecido conjuntivo testicular; a redução do comprimento dos túbulos seminíferos e do número de células de Sertoli; estas alterações foram mais pronunciadas nos animais expostos ao GCV no DG 14;
- A marcação da proteína Ki67 de proliferação não foi alterada nos gonócitos dos descendentes expostos ao GCV nos DG 14 ou 19, entretanto houve redução na marcação de Ki67 nas células de Sertoli nos animais expostos no DG 19;
- Houve redução da colonização testicular pelos gonócitos nos descendentes expostos ao GCV no DG 14, mas não houve alteração naqueles expostos no DG 19.
- Comparando os efeitos testiculares causados pela exposição ao GCV no DG 10, 14 ou 19, fica demonstrado que o DG 14 de ratos é um momento crítico para a exposição ao GCV. Possivelmente, os efeitos testiculares da exposição in utero ao GCV foram mais pronunciados nos descendentes masculinos expostos no DG 14 porque o GCV impactou a proliferação e consequente, colonização do testículo fetal pelas células germinativas, resultando nos TACS nos animais adulto.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERCROMBIE M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. **Anat Rec**, v. 94, p. 238–248, 1946.

ABUELHIJA, M. et al. Rat models of post-irradiation recovery of spermatogenesis: interstrain differences. **Andrology**, v. 1, n. 2, p. 206–215, 2013.

ADACHI, M. et al. Expression of MRP4 confers resistance to ganciclovir and compromises bystander cell killing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 41, p. 38998–39004, 2002.

ADHAM, I. M.; EMMEN, J. M. A.; ENGEL, W. The role of the testicular factor INSL3 in establishing the gonadal position. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 160, n. 1–2, p. 11–16, 2000.

ADLER, S. P.; NIGRO, G.; PEREIRA, L. Recent Advances in the Prevention and Treatment of Congenital Cytomegalovirus Infections. **Seminars in Perinatology**, v. 31, n. 1, p. 10–18, 2007.

AKINGBEMI, B. T. et al. Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 3, p. 775–780, 2004.

AL-SHAWI, R. et al. The herpes simplex virus type 1 thymidine kinase is expressed in the testes of transgenic mice under the control of a cryptic promoter. **Molecular and cellular biology**, v. 11, n. 8, p. 4207–4216, 1991.

ALEXANDER, B. T.; DASINGER, J. H.; INTAPAD, S. Fetal Programming and Cardiovascular Pathology. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2015. v. 2p. 997–1025.

AMANN, R. P.; ALMQUIST, J. O. Reproductive Capacity of Dairy Bulls. VIII. Direct and Indirect Measurement of Testicular Sperm Production. **Journal of Dairy Science**, v. 45, n. 6, p. 774–781, 1962.

ANDRADE, A. J. M. et al. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): non-monotonic dose-response and low dose effects on rat brain aromatase activity. **Toxicology**, v. 227, n. 3, p. 185–92, 29 out. 2006.

ANGELOPOULOU, R. et al. Sertoli cell proliferation in the fetal and neonatal rat testis: A continuous phenomenon? **Acta Histochemica**, v. 110, n. 4, p. 341–347, 2008.

ANNIBALLO, R.; BREHM, R.; STEGER, K. Recognising the Sertoli-cell-only (SCO) syndrome: a case study. **Andrologia**, v. 43, n. 1, p. 78–83, fev. 2011.

ASHTON, W. T. et al. Activation by thymidine kinase and potent antiherpetic activity of 2'-nor-2'-deoxyguanosine (2'NDG). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 108, n. 4, p. 1716–1721, out. 1982.

AUHAREK, S. A et al. Prenatal plus postnatal exposure to Di(n-Butyl) phthalate and/or flutamide markedly reduces final sertoli cell number in the rat. **Endocrinology**, v. 151,

n. 6, p. 2868–75, jun. 2010.

BAIRY, K. L.; KUMAR, G.; RAO, Y. Effect of acyclovir on the sperm parameters of albino mice. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 327–333, 2009.

BANDYOPADHYAY, S. et al. Prenatal exposure to high galactose adversely affects initial gonadal pool of germ cells in rats. **Human Reproduction**, v. 18, n. 2, p. 276–282, 2003.

BEAUMONT, H. M.; MANDL, A. M. A Quantitative Study of Primordial Germ Cells in the Male Rat. **J Embryol Exp Morphol**, v. 11, n. December, p. 715–740, 1963.

BEHRE, H. M. et al. Primary Testicular Failure. **Endotext [Internet]**, p. 2000-, 2015.

BILLAT, P. et al. Liquid chromatography tandem mass spectrometry quantitation of intracellular concentrations of ganciclovir and its phosphorylated forms. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 12, p. 3449–3456, 22 maio 2015.

BILLAT, P.-A. et al. Plasma and intracellular exposure to ganciclovir in adult renal transplant recipients: is there an association with haematological toxicity? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 2, p. 484–489, fev. 2016.

BOUJEMLA, I. et al. Pharmacokinetics and tissue diffusion of ganciclovir in mice and rats. **Antiviral Research**, v. 132, p. 111–115, 2016.

BOUJRAD, N.; REVIERS, M. T. H.; CARREAU, S. Evidence for Germ Cell Control of Sertoli Cell Function in Three Models of Germ Cell Depletion in Adult Rat. v. 1352, p. 1345–1352, 1995.

BOULIEU, R.; GALLANT, C.; SILBERSTEIN, N. Determination of acyclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications**, v. 693, n. 1, p. 233–6, 23 maio 1997.

BOULOGNE, B. et al. Apoptosis and mitosis in gonocytes of the rat testis during foetal and neonatal development. **International journal of andrology**, v. 22, n. 6, p. 356–65, dez. 1999.

BRAUN, R. E. et al. Infertility in Male Transgenic Mice : Disruption Expression in Postmeiotic of Sperm Development Germ Cells¹ by HSV-tk. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 684–693, 1990.

BREHM, R. et al. A Sertoli Cell-Specific Knockout of Connexin43 Prevents Initiation of Spermatogenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 171, n. 1, p. 19–31, 2007.

BRIGGS, G. G.; FREEMAN, R. K.; YAFFE, S. J. **Drugs in Pregnancy and Lactation**. 6th. ed. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001.

BROWN, J. L. et al. Endocrine Manual for Reproductive Non-Domestic Species. **Smithsonian's National Zoological Park Conservation & Research Center Endocrine Workbook**, p. 69, 2004.

BUEHR, M. The primordial germ cells of mammals: some current perspectives. **Exp Cell Res**, v. 232, n. 2, p. 194–207, 1997.

BUURSMA, A R. et al. Monitoring HSVtk suicide gene therapy: the role of [(18)F]FHPG membrane transport. **British journal of cancer**, v. 91, p. 2079–2085, 2004.

CAI, L.-Y. et al. Accumulated HSV1-TK proteins interfere with spermatogenesis through a disruption of the integrity of Sertoli-germ cell junctions. **The Journal of reproduction and development**, v. 58, n. 5, p. 544–51, 2012.

CAI, L. YI et al. HSV type 1 thymidine kinase protein accumulation in round spermatids induces male infertility by spermatogenesis disruption and apoptotic loss of germ cells. **Reproductive Toxicology**, v. 27, n. 1, p. 14–21, 2009.

CARLSEN, E. et al. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. **Bmj**, v. 305, p. 609–613, 1992.

CARMONA, S. et al. Effect of Anti-Mullerian Hormone on Sertoli and Leydig Cell Functions in Fetal and Immature Rats *. v. 139, n. 3, 1998.

CARUSO, M. et al. Regression of established macroscopic liver metastases after in situ transduction of a suicide gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 15, p. 7024–7028, 1993.

CARUSO, M.; KLATZMANN, D. Selective killing of CD4+ cells harboring a human immunodeficiency virus-inducible suicide gene prevents viral spread in an infected cell population. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 1, p. 182–186, 1 jan. 1992.

CASTILLO, E. B. DEL; TRABUCCO, A.; DE LA BALZE, F. A. Syndrome Produced By Absence of the Germinal Epithelium Without Impairment of the Sertoli or Leydig Cells. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 7, n. 7, p. 493–502, 1947.

CHEN, H.; BEARDSLEY, G. P.; COEN, D. M. Mechanism of ganciclovir-induced chain termination revealed by resistant viral polymerase mutants with reduced exonuclease activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 49, p. 17462–17467, 2014.

CHEN, Q.; YAN, W.; DUAN, E. Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 12, p. 733–743, 2016.

CHEN, Z. et al. Serum thymidine kinase 1 is a reliable maker for the assessment of the risk of developing malignancy: A case report. **Oncology Letters**, v. 10, n. 3, p. 1669–1673, 2015.

CHOI, Y. J. et al. Murine male germ cell apoptosis induced by busulfan treatment correlates with loss of c-kit-expression in a Fas/FasL- and p53-independent manner. **FEBS Letters**, v. 575, n. 1–3, p. 41–51, 2004.

CULTY, M. Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. **Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews**, v. 87, n. 1, p. 1–26, mar. 2009.

CULTY, M. Gonocytes, from the fifties to the present: is there a reason to change the name? **Biology of reproduction**, v. 89, n. 2, p. 46, ago. 2013.

CUPP, A. S.; SKINNER, M. K. **Embryonic Sertoli cell differentiation.Sertoli Cell**

Biology, 2005.

DA SILVA JR., V. A. et al. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. **Reproduction Nutrition Development**, v. 46, n. 2, p. 157–166, 6 mar. 2006.

DE FELICI, M. Nuclear reprogramming in mouse primordial germ cells: epigenetic contribution. **Stem cells international**, v. 2011, p. 425863, 2011.

DEAN, A. et al. Analgesic exposure in pregnant rats affects fetal germ cell development with inter-generational reproductive consequences. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 19789, 2016.

DUMORTIER, O. et al. Impairment of rat fetal beta-cell development by maternal exposure to dexamethasone during different time-windows. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.

DZIERZAK, E. et al. Thy-1 tk transgenic mice with a conditional lymphocyte deficiency. **International Immunology**, v. 5, n. 8, p. 975–984, 1993.

ELION, G. B. et al. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5716–5720, 1977.

ENCINAS, G.; ZOGBI, C.; STUMPP, T. Detection of four germ cell markers in rats during testis morphogenesis: Differences and similarities with mice. **Cells Tissues Organs**, v. 195, n. 5, p. 443–455, 2012.

EWEN, K. A.; KOOPMAN, P. Mouse germ cell development: From specification to sex determination. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 323, n. 1, p. 76–93, 8 jul. 2010.

FAQI, A. S. et al. Ganciclovir induces reproductive hazards in male rats after short-term exposure. **Hum Exp Toxicol**, v. 16, n. 9, p. 505–511, 1997.

FERNANDES, N. F. et al. Supplementation with *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen does not affect androgenic-anabolic parameters in male rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, n. December, p. 46–52, 2015.

FESTING, M. F. W. Design and statistical methods in studies using animal models of development. **ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources**, v. 47, n. 1, p. 5–14, jan. 2006.

FRANÇA, L. R. et al. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. **Biology of reproduction**, v. 63, n. 6, p. 1629–1636, 2000.

FREITAS, V. R. et al. Activity of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine compared with that of acyclovir against human, monkey, and rodent cytomegaloviruses. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 28, n. 2, p. 240–245, 1985.

FURMAN, P. A. et al. Inhibition by acyclovir of cell growth and DNA synthesis of cells biochemically transformed with herpesvirus genetic information. **Virology**, v. 102, n. 2, p. 420–30, 30 abr. 1980.

GALLAVAN, R. H. et al. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: Potential for confounding effects of progeny body weights. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 5, p. 383–390, 1999.

GANGNERAU, M.-N.; PICON, R. Onset of Steroidogenesis and Differentiation of Functional LH Receptors in Rat Fetal Testicular Cultures. **Archives of Andrology**, v. 18, n. 3, p. 215–224, 1987.

GERBER, J.; HEINRICH, J.; BREHM, R. Blood-testis barrier and Sertoli cell function: Lessons from SCCx43KO mice. **Reproduction**, v. 151, n. 2, p. R15–R27, 2016.

GINSBURG, M.; SNOW, M. H. L.; MCLAREN, A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. **Development**, v. 110, p. 521–528, 1990.

GODFREY, K. M.; BARKER, D. J. Fetal programming and adult health. **Public Health Nutrition**, v. 4, n. 2b, 2001.

GONDOS, B.; HOBEL, C. J. Ultrastructure of germ cell development in the human fetal testis. **Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)**, v. 20, p. 1–20, 1971.

GUERRERO-BOSAGNA, C. et al. Environmentally Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Altered Sertoli Cell Transcriptome and Epigenome: Molecular Etiology of Male Infertility. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 35, n. 7, p. 595–601, jul. 1992.

HARDY, M. P.; ZIRKIN, B. R.; EWING, L. L. Kinetic Studies on the Development of the Adult Population of Leydig Cells in Testes of the Pubertal Rat*. **Endocrinology**, v. 124, n. 2, p. 762–770, fev. 1989.

HARTMANN, E. L. et al. Management of leukopenia in kidney and pancreas transplant recipients. **Clinical Transplantation**, v. 22, n. 6, p. 822–828, 2008.

HARTMANN, J. et al. **Testis hypoplasia in rat offspring prenatally exposed to ganciclovir**. European teratology abstracts. **Anais...**1991

HAYNES, P.; LAMBERT, T. R.; MITCHELL, I. D. Comparative in-vivo genotoxicity of antiviral nucleoside analogues; penciclovir, acyclovir, ganciclovir and the xanthine analogue, caffeine, in the mouse bone marrow micronucleus assay. **Mutation research**, v. 369, n. 1–2, p. 65–74, 10 jul. 1996.

HÉLÈNE, D. Programming of chronic disease by impaired fetal nutrition Evidence and implications for policy and intervention strategies. **Who**, 2002.

HERRSTRO, A.; ERIKSSON, S. Antiviral Guanosine Analogs as Substrates for Deoxyguanosine Kinase : Implications for Chemotherapy. v. 45, n. 3, p. 739–742, 2001.

HEYMAN, R. A et al. Thymidine kinase obliteration: creation of transgenic mice with controlled immune deficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 8, p. 2698–2702, 1989.

HOLM, J. B. et al. Intrauterine Exposure to Paracetamol and Aniline Impairs Female Reproductive Development by Reducing Follicle Reserves and Fertility. **Toxicological Sciences**, v. 150, n. 1, p. 178–189, 2016.

HOLM, M. et al. Leydig cell micronodules are a common finding in testicular biopsies from men with impaired spermatogenesis and are associated with decreased testosterone/LH ratio. **Journal of Pathology**, v. 199, n. 3, p. 378–386, 2003.

HUTCHISON, G. R. et al. Sertoli Cell Development and Function in an Animal Model of Testicular Dysgenesis Syndrome 1. v. 360, n. October 2007, p. 352–360, 2008.

HUTSON, J. M.; HASTHORPE, S. Abnormalities of testicular descent. **Cell and Tissue Research**, v. 322, n. 1, p. 155–158, 2005.

IWAKURA, Y. et al. Male sterility of transgenic mice carrying exogenous mouse interferon-beta gene under the control of the metallothionein enhancer-promoter. **The EMBO journal**, v. 7, n. 12, p. 3757–62, 1 dez. 1988.

JANOLY-DUMENIL, A. et al. Effect of duration and intensity of ganciclovir exposure on lymphoblastoid cell toxicity. **Antiviral chemistry & chemotherapy**, v. 19, n. 6, p. 257–62, 2009.

JANOLY-DUMENIL, A. et al. A pharmacodynamic model of ganciclovir antiviral effect and toxicity for lymphoblastoid cells suggests a new dosing regimen to treat cytomegalovirus infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 7, p. 3732–3738, 2012.

JIANG, F. X. Behaviour of spermatogonia following recovery from busulfan treatment in the rat. **Anatomy and Embryology**, v. 198, n. 1, p. 53–61, 1998.

JOHNSON, L.; NEAVES, W. B. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. **Biology of Reproduction**, v. 24, p. 703–712, 1981.

JOSHI, S. C.; SHARMA, P. Male reproductive toxicity of organophosphorous compounds: a review. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 93, n. September 2013, p. 1486–1507, 2011.

JOUBERT, Y.; TOBIN, C.; LEBART, M. C. Testosterone-Induced Masculinization of the Rat Levator Ani Muscle during Puberty. **Developmental Biology**, v. 162, n. 1, p. 104–110, mar. 1994.

JUNEJA, S. C. et al. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. **Biol Reprod**, v. 60, n. 5, p. 1263–1270, 1999.

JUUL, A. et al. Possible fetal determinants of male infertility. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 10, n. 9, p. 553–62, 2014.

KARL, J.; CAPEL, B. Sertoli Cells of the Mouse Testis Originate from the Coelomic Epithelium. **Developmental Biology**, v. 203, n. 2, p. 323–333, 1998.

KAVOUSSI, P. K.; COSTABILE, R. A.; SALONIA, A. Clinical urologic endocrinology: Principles for men's health. **Clinical Urologic Endocrinology: Principles for Men's Health**, p. 1–143, 2013.

- KELES, M. et al. Neutropenia related to valgancyclovir and valgancyclovir in 2 renal transplant patients and treatment with granulocyte colony stimulating factor: a case report. **Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation**, v. 8, n. 2, p. 181–183, 2010.
- KEMPER, C. H.; PETERS, P. W. J. Migration and proliferation of primordial germ cells in the rat. **Teratology**, v. 36, n. 1, p. 117–124, ago. 1987.
- KIMBERLIN, D. W. Antiviral therapy for cytomegalovirus infections in pediatric patients. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 22–30, jan. 2002.
- KITA, D. H. et al. Manipulation of pre and postnatal androgen environments and anogenital distance in rats. **Toxicology**, v. 368–369, p. 152–161, 2016.
- KLEIMAN, S. E. et al. Distinctive pattern of expression of spermatogenic molecular markers in testes of azoospermic men with non-mosaic Klinefelter syndrome. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, p. 1–8, 2016.
- KLUG, S. et al. In vitro and in vivo studies on the prenatal toxicity of five virustatic nucleoside analogues in comparison to aciclovir. **Archives of toxicology**, v. 65, n. 4, p. 283–91, 1991.
- KORENBROT, C. C.; HUHTANIEMI, I. T.; WEINER, R. I. Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. **Biology of reproduction**, v. 17, n. 2, p. 298–303, 1977.
- KURIHARA, M. et al. Histological development of human testicular cords from 70 to 90 days of gestation. **Okajimas folia anatomica Japonica**, v. 87, n. 3, p. 103–8, 2010.
- KURODA, T. et al. Mullerian inhibiting substance ontogeny and its modulation by follicle stimulating hormone in the rat testes. v. 127, n. 4, p. 1825–1832, 1990.
- LANDOLFO, S. et al. The human cytomegalovirus. v. 98, p. 269–297, 2003.
- LANNING, L. L. et al. Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. **Toxicologic pathology**, v. 30, p. 507–520, 2002.
- LARDONE, M. C. et al. Histological and hormonal testicular function in oligo/azoospermic infertile men. **Andrologia**, v. 45, n. 6, p. 379–385, 2013.
- LEBLOND, C. P.; CLERMONT, Y. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfuric acid technique. **American Journal of Anatomy**, v. 90, n. 2, p. 167–215, 1952.
- LEE, V. W. et al. Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity. **Journal of reproduction and fertility**, v. 42, n. 1, p. 121–126, 1975.
- LEVINE, H. et al. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. **Human Reproduction Update**, p. 1–14, 2017.
- LIU, J.; DING, D.; LIU, J. Varicocele-Caused Progressive Damage in Bilateral Testis and Sertoli Cell-Only Syndrome in Homolateral Testis in Rats. **Medical Science Monitor**, v. 20, p. 1931–1936, 2014.

LORDING, D. W.; DE KRETZER, D. M. Comparative Ultrastructural and Histochemical Studies of the Interstitial Cells of the Rat Testis During Fetal and Postnatal Development. **Reproduction**, v. 29, n. 2, p. 261–269, 1972.

LUCCHESI, T. A. et al. Endocrine Disruptors and Fetal Programming. **Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases**, v. 7, n. 1, p. 59–76, 2017.

MANKU, G.; CULTY, M. Mammalian gonocyte and spermatogonia differentiation: recent advances and remaining challenges. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 149, n. 3, p. R139–R157, 2015.

MARCINIAK, A. et al. Fetal programming of the metabolic syndrome. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 56, n. 2, p. 133–138, abr. 2017.

MARLOW, F. Primordial Germ Cell Specification and Migration. **F1000Research**, v. 4, n. 0, p. 1–14, 2015.

MATSUMOTO, K. et al. Risk Factors for Ganciclovir-Induced Thrombocytopenia and Leukopenia. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 2, p. 235–238, 2015.

MATTHEWS, T.; BOEHME, R. Antiviral Activity and Mechanism of Action of Ganciclovir. **Clinical Infectious Diseases**, v. 10, n. Supplement 3, p. S490–S494, 1988.

MAYMON, B. B.-S. Maturation phenotype of Sertoli cells in testicular biopsies of azoospermic men. **Human Reproduction**, v. 15, n. 7, p. 1537–1542, 2000.

MCCARTHY, M. M. Estradiol and the Developing Brain. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 1, p. 91–134, 1 jan. 2008.

MCGLYNN, K. A.; COOK, M. B. Etiologic factors in testicular germ-cell tumors. **Future Oncology**, v. 5, n. 9, p. 1389–1402, nov. 2009.

MEACHEM, S. J. et al. Developmentally distinct in vivo effects of FSH on proliferation and apoptosis during testis maturation. **Journal of Endocrinology**, v. 186, n. 3, p. 429–446, 2005.

MEISTRICH, M. L. Male gonadal toxicity. **Pediatric Blood and Cancer**, v. 53, n. 2, p. 261–266, 2009.

MENDIS-HANDAGAMA, S. M.; ARIYARATNE, H. B. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 3, p. 660–671, 2001.

MERCHANT, H. Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. **Developmental Biology**, v. 44, n. 1, p. 1–21, 1975.

MINASI, L. E. et al. The selective ablation of interleukin 2-producing cells isolated from transgenic mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 177, n. 5, p. 1451–9, 1993.

MIRZAEI, S.; ERIKSSON, S.; ALBERTIONI, F. Differences in cytosolic and mitochondrial 5'-nucleotidase and deoxynucleoside kinase activities in Sprague-Dawley rat and CD-1 mouse tissues: Implication for the toxicity of nucleoside analogs

in animal models. **Toxicology**, v. 267, n. 1–3, p. 159–164, 2010.

MOLYNEAUX, K. A. et al. Time-Lapse Analysis of Living Mouse Germ Cell Migration. **Developmental Biology**, v. 240, n. 2, p. 488–498, 2001.

MOLYNEAUX, K. A. et al. The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. **Development (Cambridge, England)**, v. 130, n. 18, p. 4279–86, 15 set. 2003.

MORETTI, S. et al. Forscarnet vs ganciclovir for cytomegalovirus (CMV) antigenemia after allogeneic hemopoietic stem cell transplantation (HSCT): a randomised study. **Bone marrow transplantation**, v. 22, n. 2, p. 175–80, 1998.

MOVAHED, E. et al. Toxic effect of acyclovir on testicular tissue in rats. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 11, n. 2, p. 111–118, 2013.

MUNRO, C. J. et al. Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay. **Clinical chemistry**, v. 37, n. 6, p. 838–44, jun. 1991.

NAGANO, R. et al. Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during prespermatogenesis. **Anatomical Record**, v. 258, n. 2, p. 210–220, 2000.

NANDI, S. S.; MISHRA, P. K. Harnessing fetal and adult genetic reprogramming for therapy of heart disease. **Journal of nature and science**, v. 1, n. 4, 2015.

NEUBAUER, K. et al. Quantity rather than quality in teratospermic males: a histomorphometric and flow cytometric evaluation of spermatogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Biology of reproduction**, v. 71, n. 5, p. 1517–24, nov. 2004.

NEYTS, J. et al. In vivo antiherpesvirus activity of N-7-substituted acyclic nucleoside analog 2-amino-7-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]purine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 1, p. 56–60, 1995.

NIHI, F. et al. Testicular effects following in utero exposure to the antivirals acyclovir and ganciclovir in rats. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 139, n. 1, p. 220–33, maio 2014.

O'SHAUGHNESSY, P. J.; FOWLER, P. A. Endocrinology of the mammalian fetal testis. **Reproduction**, v. 141, n. 1, p. 37–46, 1 jan. 2011.

O'SHAUGHNESSY, P. J.; HU, L.; BAKER, P. J. Effect of germ cell depletion on levels of specific mRNA transcripts in mouse Sertoli cells and Leydig cells. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 135, n. 6, p. 839–50, 1 jun. 2008.

OHINATA, Y. et al. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. **Nature**, v. 436, n. 7048, p. 207–213, 2005.

OLASO, R.; HABERT, R. Genetic and cellular analysis of male germ cell development. **J Androl**, v. 21, n. 4, p. 497–511, 2000.

ORTH, J. M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative

autoradiographic study. **The Anatomical record**, v. 203, n. 4, p. 485–92, 1982.

ORTH, J. M.; GUNSALUS, G. L.; LAMPERTI, A. A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. **Endocrinology**, v. 122, n. 3, p. 787–94, mar. 1988.

ORWIG, K. E. et al. Male germ-line stem cell potential is predicted by morphology of cells in neonatal rat testes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 18, p. 11706–11711, 2002.

PELLETIER, R. M. The blood-testis barrier: The junctional permeability, the proteins and the lipids. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 46, n. 2, p. 49–127, 2011.

PESCOVITZ, M. D. Absence of teratogenicity of oral ganciclovir used during early pregnancy in a liver transplant recipient. **Transplantation**, v. 67, n. 5, p. 758–759, 1999.

PESCOVITZ, M. D. et al. Valganciclovir results in improved oral absorption of ganciclovir in liver transplant recipients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 10, p. 2811–2815, 2000.

PITETTI, J.-L. et al. An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating sertoli cell proliferation, testis size, and FSH action in mice. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 27, n. 5, p. 814–27, maio 2013.

PIZENT, A.; TARIBA, B.; ŽIVKOVIĆ, T. Reproductive Toxicity of Metals in Men. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 63, n. Supplement 1, p. 35–46, 2012.

PULIYANDA, D. P. et al. Successful use of oral ganciclovir for the treatment of intrauterine cytomegalovirus infection in a renal allograft recipient. **Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society**, v. 7, n. 2, p. 71–4, jun. 2005.

QIU, R.; HORVATH, A.; STAHLMANN, R. Effects of four nucleoside analogues used as antiviral agents on rat Sertoli cells (SerW3) in vitro. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 8, p. 1975–1981, 25 ago. 2016.

QUEIROZ, E. K. R. DE; WAISSMANN, W. Occupational exposure and effects on the male reproductive system. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 485–493, 2006.

RAZ, E. Guidance of primordial germ cell migration. **Current opinion in cell biology**, v. 16, n. 2, p. 169–73, abr. 2004.

RICHARDSON, B. E.; LEHMANN, R. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 1, p. 37–49, jan. 2010.

RISBRIDGER, G. P.; KERR, J. B.; DEKRETSER, D. M. Evaluation of Leydig cell function and gonadotropin binding in unilateral and bilateral cryptorchidism: Evidence for local control of Leydig cell function by the seminiferous tubule. **Biol Reprod**, v. 24, p. 534–540, 1981.

ROBB, G. W.; AMANN, R. P.; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **Journal of reproduction and fertility**, v. 54, n. 1, p. 103–107, 1978.

RUCKER, E. B. et al. Bcl-x and Bax Regulate Mouse Primordial Germ Cell Survival and Apoptosis during Embryogenesis. **Molecular Endocrinology**, v. 14, n. 7, p. 1038–1052, 2000.

RUSSELL, L. D. et al. **Histological and histopathological evaluation of the testis.** [s.l.: s.n.].

RUSSELL, L. D.; DE FRANÇA, L. R. Building a testis. **Tissue and Cell**, v. 27, n. 2, p. 129–147, 1995.

RUSSELL, L. D.; PETERSON, R. N. Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. **Journal of reproduction and fertility**, v. 70, n. 2, p. 635–641, 1984.

RUWANPURA, S. M.; MCLACHLAN, R. I.; MEACHEM, S. J. Hormonal regulation of male germ cell development. **Journal of Endocrinology**, v. 205, n. 2, p. 117–131, 2010.

SAGA, Y. Mouse germ cell development during embryogenesis. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 18, n. 4, p. 337–341, 2008.

SAITOU, M. Germ cell specification in mice. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 19, n. 4, p. 386–395, 2009.

SALEH, A. J. M. et al. High efficacy and low toxicity of short-course oral valganciclovir as pre-emptive therapy for hematopoietic stem cell transplant cytomegalovirus infection. **Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy**, v. 3, n. 3, p. 116–120, 2010.

SALOMON, B. et al. A truncated herpes simplex virus thymidine kinase phosphorylates thymidine and nucleoside analogs and does not cause sterility in transgenic mice. **Molecular and cellular biology**, v. 15, n. 10, p. 5322–8, out. 1995.

SCOTT, H. M. et al. Relationship between androgen action in the “male programming window,” fetal sertoli cell number, and adult testis size in the rat. **Endocrinology**, v. 149, n. 10, p. 5280–5287, 2008.

SCOTT, H. M.; MASON, J. I.; SHARPE, R. M. Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 7, p. 883–925, 2009.

SELICE, R. et al. Spermatogenesis in Klinefelter syndrome. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 33, n. 11, p. 789–793, 2010.

SHAHA, C.; TRIPATHI, R.; MISHRA, D. P. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1546, p. 1501–1515, 2010.

SHARPE, R. M. The roles of oestrogen in the male. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 9, n. 9, p. 371–7, nov. 1998.

SHARPE, R. M. et al. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 125, n. 6, p. 769–84, jun. 2003.

SHARPE, R. M.; SKAKKEBAEK, N. E. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? **The Lancet**, v. 341, n. 8857, p. 1392–1396, maio 1993.

SHARPE, R. M.; SKAKKEBAEK, N. E. Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. **Fertility and sterility**, v. 89, n. 2 Suppl, p. e33-8, fev. 2008.

SHERLEY, J. L.; KELLY, T. J. Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 17, p. 8350–8, 15 jun. 1988.

SKAKKEBAEK, N. E. et al. Association between testicular dysgenesis syndrome (TDS) and testicular neoplasia: evidence from 20 adult patients with signs of maldevelopment of the testis. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 111, n. 1, p. 1-9-11, 2003.

SKAKKEBAEK, N. E. Testicular dysgenesis syndrome: new epidemiological evidence. **International journal of andrology**, v. 27, n. 4, p. 189–91, ago. 2004.

SKAKKEBAEK, N. E.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; MAIN, K. M. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 16, n. 5, p. 972–978, 2001.

SMEE, D. F. et al. Intracellular metabolism and enzymatic phosphorylation of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine and acyclovir in herpes simplex virus-infected and uninfected cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 34, n. 7, p. 1049–1056, 1985.

SMITH, L. B.; O'SHAUGHNESSY, P. J.; REBOURCET, D. Cell-specific ablation in the testis: what have we learned? **Andrology**, v. 3, n. 6, p. 1035–1049, nov. 2015.

SOMMADOSSI, J.; CARLISLE, R. Toxicity of 3'-Azido-3'-Deoxythymidine and 9-(1,3-Dihydroxy-2-Propoxymethyl)Guanine for Normal Human Hematopoietic Progenitor Cells In Vitro. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 31, n. 3, p. 452–454, 19 fev. 1987.

STAHLMANN, R. et al. Prenatal toxicity of acyclovir in rats. p. 468–479, 1988.

STEGER, K. et al. Immunohistochemical detection of immature Sertoli cell markers in testicular tissue of infertile adult men: a preliminary study. **International journal of andrology**, v. 19, n. 2, p. 122–128, 1996.

STEGER, K. et al. Reversion of the differentiated phenotype and maturation block in Sertoli cells in pathological human. **Human Reproduction**, v. 14, n. 1, p. 136–143, 1999.

STOUFFS, K. et al. Sertoli Cell-Only Syndrome: Behind the Genetic Scenes. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

SWAIN, A. Sex Determination and Differentiation. 2006.

SWAN, S. H. et al. First trimester phthalate exposure and anogenital distance in newborns. **Human Reproduction**, v. 30, n. 4, p. 963–972, 2015.

SWANSON, E. C.; SCHLEISS, M. R. Congenital cytomegalovirus infection: new prospects for prevention and therapy. **Pediatric clinics of North America**, v. 60, n. 2, p. 335–49, abr. 2013.

TAM, P. P. L.; SNOW, M. H. L. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. **J. Embryol. exp. Morph.**, v. 64, p. 133–147, 1981.

TAPANAINEN, J. S. et al. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 7, n. 5, p. 643–650, 1993.

TENORIO, B. M. et al. Testicular development evaluation in rats exposed to 60 Hz and 1 mT electromagnetic field. **Journal of applied toxicology : JAT**, v. 31, n. 3, p. 223–30, 2011.

TOPPARI, J. et al. Cryptorchidism and Hypospadias as a Sign of Testicular Dysgenesis Syndrome (TDS): Environmental Connection. v. 919, n. September, p. 910–919, 2010.

VALENÇA, R. M. B. et al. Morphometry and histomorphometry of the testis in crossbred pigs fed diets with different protein levels. **Aquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1329–1338, 2013.

VAN DEN DRIESCHE, S. et al. Inter-relationship between testicular dysgenesis and Leydig cell function in the masculinization programming window in the rat. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e30111, jan. 2012.

VANČÍKOVÁ, Z.; DVORÁK, P. Cytomegalovirus infection in immunocompetent and immunocompromised individuals--a review. **Current drug targets. Immune, endocrine and metabolic disorders**, v. 1, n. 2, p. 179–87, 2001.

VENTON, G. et al. Risk factors of Ganciclovir-related neutropenia after allogeneic stem cell transplantation: a retrospective monocentre study on 547 patients. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p. 160–6, fev. 2014.

VIGUIER-MARTINEZ, M. C. et al. Effect of prenatal treatment with busulfan on the hypothalamo-pituitary axis, genital tract and testicular histology of prepubertal male rats. **Journal of reproduction and fertility**, v. 70, n. 1, p. 67–73, 1984.

VYAS, A. et al. Adverse Effects of Subchronic Dose of Aspirin on Reproductive Profile of Male Rats. **Journal of Pharmaceutics**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

WALKER, W. H.; CHENG, J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. **Reproduction**, v. 130, n. 1, p. 15–28, 2005.

WERLER, S. et al. Germ cell loss is associated with fading Lin28a expression in a mouse model for Klinefelter's syndrome. **Reproduction**, v. 147, n. 3, p. 253–264, 2014.

WINSTON, D. J. et al. Pharmacokinetics of Ganciclovir after Oral Valganciclovir versus Intravenous Ganciclovir in Allogeneic Stem Cell Transplant Patients with Graft-versus-Host Disease of the Gastrointestinal Tract. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 12, n. 6, p. 635–640, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**. Fifth ed. [s.l.] World Health Organization, 2010.

ZHAO, G. Q.; GARBERS, D. L. Male germ cell specification and differentiation. **Developmental cell**, v. 2, n. 5, p. 537–47, maio 2002.

ZHENG, S. Caspase 2 Activity Contributes to the Initial Wave of Germ Cell Apoptosis During the First Round of Spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 74, n. 6, p. 1026–1033, 2006.

ZIRKIN, B. R. Spermatogenesis: its regulation by testosterone and FSH. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 9, n. 4, p. 417–21, 1998.

ZOGBI, C. et al. Gonocyte development in rats: proliferation, distribution and death revisited. **Histochemistry and cell biology**, v. 138, n. 2, p. 305–22, ago. 2012.

ZOHNI, K. et al. The efficiency of male fertility restoration is dependent on the recovery kinetics of spermatogonial stem cells after cytotoxic treatment with busulfan in mice. **Human Reproduction**, v. 27, n. 1, p. 44–53, 2012.