

MARCELO ALVES ARANHA

**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DO USO DE TACROLIMUS E
MICOFENOLATO MOFETIL SOBRE A ESPERMATOGÊNESE DE RATOS:
ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E DE APOPTOSE CELULAR**

Tese a ser apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Renato Tambara Filho
Coordenador: Prof. Dr. Jorge Matias Fouto

CURITIBA

2015

A662 Aranha, Marcelo Alves

Estudo comparativo dos efeitos do uso de tacrolimus e micofenolato mofetil sobre a espermatogênese de ratos: análise histomorfométrica e de apoptose celular / Marcelo Alves Aranha. – Curitiba, 2015.

62 f.: il.; color.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Renato Tambara Filho

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Tacrolimo. 2. Ácido micofenólico. 3. Espermatogênese.
4. Apoptose. 5. Avaliação de resultados. 6. Ratos. I. Título. II. Tambara Filho, Renato

NLMC: WO 100

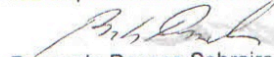


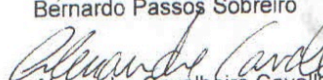
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL - MESTRADO E DOUTORADO


Ata do julgamento da 172ª Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno **Marcelo Alves**

Aranha sob o título ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DO USO DE TRACOLIMUS E MICOFENOLATO MOFETIL SOBRE A ESPERMATOGÊNESE DE RATOS: ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E DE APOPTOSE CELULAR na **Linha de Pesquisa**: DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DAS REPERCUSSÕES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL EM CIRURGIA
Área de Concentração: CLÍNICA CIRÚRGICA tendo como orientador Professor Doutor Renato Tambara Filho.

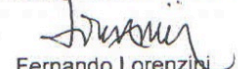
Às sete horas e trinta minutos do dia trinta e um de julho de dois mil e quinze no Auditório da CAD 7º andar – sala 701 do prédio central do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se em sessão pública, a Banca Examinadora de Avaliação composta pelos doutores Bernardo Passos Sobreiro, Rodrigo Ketzer krebs, Alexandre Cavalheiro Cavalli, Fernando Lorenzini e Luiz Sergio Santos sendo este último Presidente da Banca. Aberta a sessão, foi apresentada pelo Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, coordenador do programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da tese, como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua tese no prazo máximo de até trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Banca Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. O candidato foi **APROVADO** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à Sala de Sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para constar, eu, Regina Aparecida Sass Marques, secretária desta Pós-Graduação lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada será assinada pelos componentes da Banca Examinadora.


Bernardo Passos Sobreiro


Alexandre Cavalheiro Cavalli


Luiz Sergio Santos


Rodrigo Ketzer krebs


Fernando Lorenzini

DEDICATÓRIA

À minha esposa Flavia e à minha filha Helena.

“Tente mover o mundo – o primeiro passo será mover a si mesmo.”

Platão

AGRADECIMENTOS

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e divulgação deste trabalho.

Ao PROF. DR. JORGE FOUTO MATIAS, coordenador do curso de pós-graduação em clinica cirúrgica, pela oportunidade de fazer parte do programa de doutorado.

Ao PROF. DR. RENATO TÂMBARA FILHO, meu orientador, pelo apoio no desenvolvimento deste projeto e pelo exemplo como médico, pesquisador e pessoa, deste os tempos da graduação.

À minha esposa, FLÁVIA ALBUQUERQUE DA SILVA ARANHA, pelo carinho, pelo companheirismo, pela paciência e pelo apoio em todos os momentos.

Aos meus pais AYRTON ARANHA E JUÇARA ARANHA, pela educação privilegiada, pelos princípios, pelo carinho e pelo suporte em todos estes anos.

Ao meu irmão AYRTON ALVES ARANHA JUNIOR, pelo auxílio em todas as etapas do trabalho.

Ao Departamento de Anatomia da Universidade Federal do Paraná pelo espaço físico.

Ao funcionário do departamento de anatomia, RODRIGO SCHUH, por todo o apoio no decorrer do experimento.

Ao Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, em especial às colaboradoras GILMARA SOLANO MIRANDA, LUANA DA SILVA MAZEDA e ISELEN IVANOSKI, pelo apoio, orientações no manejo dos animais e cordialidade em todos os momentos.

Ao meu amigo, CHARLES ORTIZ MOVINSKI, doutorando do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pelas orientações e pelo auxílio no manejo dos animais.

Ao DR THOMAS BATTAGLIA, pelo auxílio durante desenvolvimento do projeto.

Aos meus colegas, RICARDO CAVALHEIRO CAVALLI, EDUARDO RAMOS e DENISE SBRISIA E SILVA GOUVEIA, pelo auxílio no momento do procedimento cirúrgico.

Ao Sr. NINO, departamento de biologia celular, pela confecção das lâminas.

Ao pesquisador CLEBER RAFAEL VIEIRA DA COSTA, Departamento de Biologia Celular e Molecular, pela coloração das lâminas.

À PROF.^a DEJANIRA VERONEZ, Departamento de Anatomia, pela análise das lâminas (morfometria) e pelo incessante apoio à pesquisa, desde o primeiro projeto desenvolvido no programa de mestrado.

Ao DR. LUIZ KOTZE, pela análise das lâminas (estudo de apoptose) e pelas orientações sobre o tema.

A DEUS, por tudo.

RESUMO

Introdução: a produção espermática é um processo delicado. Embora ocorra em um ambiente isolado, pode sofrer influência de inúmeros fatores, entre eles medicamentos imunossupressores. Como estas drogas são utilizadas por pacientes em idade reprodutiva, é essencial o conhecimento de seus efeitos sobre a espermatogênese. **Objetivos:** comparar os efeitos de dois imunossupressores, Tacrolimus (TCL) e Micofenolato Mofetil (MMF), na espermatogênese de ratos em idade reprodutiva. **Material e métodos:** foram utilizados 40 animais, divididos em quatro grupos. Grupo Tacrolimus (TCL) recebeu 1mg/Kg/peso de Tacrolimus, Grupo Micofenolato recebeu 30mg/Kg/peso de Micofenolato Mofetil (MMF), Grupo Sham recebeu SF 0,9%, Grupo Controle, não recebeu qualquer tipo de intervenção. O estudo teve duração de 100 dias, ao final foram realizadas análises morfométrica, histomorfométrica e de apoptose do tecido germinativo. **Resultados:** Observou-se uma diminuição da área tubular no grupo tratado com TCL quando comparado com aos demais grupos, bem como redução no grupo MMF, quando comparado com os grupos sham e controle. Houve redução da altura do epitélio germinativo do grupo TCL, quando comparado aos demais, bem como diminuição no grupo MMF, em relação aos grupos sham e controle. A análise de apoptose demonstrou aumento da porcentagem de células apoptóticas nos grupos tratados com imunossupressores, sendo mais significativa no grupo TCL. **Conclusões:** O uso de TCL e MMF por ratos, em idade reprodutiva, por um período longo de tempo, ocasionou redução da área tubular total e da altura do epitélio germinativo; aumento do índice de apoptose de células germinativas. As alterações foram mais significativas nos animais tratados com TCL em relação àqueles tratados com MMF.

Palavras-chave: Espermatogênese. Imunossupressores. Tacrolimus. Micofenolato.

ABSTRACT

Introduction: sperm production is a delicate process, governed by a strict endocrine control. Although it occurs in an isolated environment, can suffer influence of multiple factors, including medications such as immunosuppressants. As these drugs are used by patients of reproductive age, it is essential to know its effects on spermatogenesis. **Objectives:** to compare the effects of two immunosuppressants, tacrolimus (TCL) and Mycophenolate mofetil (MMF) in spermatogenesis of rats on reproductive age. **Material and methods:** the study was done in 40 animals, divided into four groups. Group tacrolimus received 1 mg/kg weight of tacrolimus (TCL), Group mycophenolate received 30mg/kg mycophenolate mofetil (MMF), Group SHAM received the same volume of 0.9% saline, Group control did not receive any intervention. The experiment lasted 100 days, at the end was held morphometric analysis, histomorphometric analysis and apoptosis of germinal tissue. **Results:** On histomorphometric analysis, a decrease in tubular area was observed in the group treated with TCL compared with MMF, sham and control groups, and reduction in MMF group compared with sham and control groups. There was a reduction of the height of the germinal epithelium of the TCL group, when compared to MMF, sham and control groups, and decrease in the MMF group compared to sham and control groups. Apoptosis analysis showed increased in Apoptotic cells counts in the groups treated with immunosuppressants, more pronounced on TCL group. **Conclusions:** Use of TCL and MMF by mice in reproductive age for a long period of time caused decrease in total tube area and the height of the germinal epithelium; increased germ cell apoptosis index. The changes were more significant in animals treated with TCL compared those treated with MMF.

Key-words: Spermatogenesis. Immunosuppressant. Tacrolimus. Mycophenolate.

LISTA DE SIGLAS

BK – Bacilo De Koch

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

DAG – diacilglicerol

DM – Diabetes Mellitus

HE – Hematoxilina-Eosina

FK-506 – Tacrolimus

FSH – hormônio folículo estimulante

GnRH – Gonadotropin-Releasing Hormone

IL 1 – Interleucina 1

IL 2 – Interleucina 2

IL 6 – Interleucina 6

IMPDH – inosina monofosfato desidrogenase

IP3 – inositol trifosfato

LH – hormônio luteinizante

MTOR – Mammalin Target Of Rapamycin (Receptor da Rapamicina)

PKC – proteinacinase C

PLC – fosfolipase C

SHAM – Simulação em inglês

TKs – proteínas tirosinaquinases

TRC – Receptor da célula T

TUNEL – Terminal dioxynucleotidyl transferase mediated digoxigenin-Utp-Nick-End-Label

UFPR – Universidade Federal do Paraná

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – SECÇÃO LONGITUDINAL DO TESTÍCULO.....	16
QUADRO 1 – DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS POR GRUPOS.....	27
FIGURA 2 – MODELO DE PEGA DO ANIMAL.....	28
FIGURA 3 – TÉCNICA DE GAVAGEM.....	28
FIGURA 4 – TÉCNICA DE ANESTESIA INTRAPERITONEAL.....	29
FIGURA 5 – LAPAROTOMIA MEDIANA.....	30
FIGURA 6 – TÉCNICA DE EXTERIORIZAÇÃO TESTICULAR.....	30
FIGURA 7 – PEÇA CIRÚRGICA (TESTÍCULO E EPIDÍDIMO).....	30
FIGURA 8 – TESTÍCULO	31
FIGURA 9 – TÉCNICA DE PESAGEM (BALANÇA DE PRECISÃO).....	31
FIGURA 10 – MEDIDA DO MENOR EIXO TESTICULAR.....	31
FIGURA 11 – MEDIDA DO MAIOR EIXO TESTICULAR	31
FIGURA 12 – SISTEMA DE CAPTURA DE IMAGENS.....	33
FIGURA 13 – EXEMPLO DE IMAGEM CAPTURADA COM AUXÍLIO DO SOFTWARE TSVIEW.....	34
FIGURA 14 – CORTE TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO (RATO 1 GRUPO CONTROLE).....	34
FIGURA 15 – MEDIDA DA ÁREA TUBULAR TOTAL (RATO 1 GRUPO CONTROLE).....	35
FIGURA 16 – MEDIDA DA ALTURA DO EPITÉLIO GERMINATIVO (RATO 1 GRUPO CONTROLE).....	35
FIGURA 17 – EXEMPLO DE IMAGEM CAPTURADA COM SOFTWARE TMARKER V 1.20614.....	36
FIGURA 18 – CORTE TRANVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO, CÉLULAS	

COM CASPASE 3 ATIVADA EM MARROM (RATO 9 – GRUPO CONTROLE).....	37
FIGURA 19 – CORTE TRANVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO, CÉLULAS COM CASPASE 3 ATIVADA EM MARROM (RATO 9 – GRUPO SHAM).....	37
FIGURA 20 – CORTE TRANVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO, CÉLULAS COM CASPASE 3 ATIVADA EM MARROM (RATO 9 – GRUPO MMF).....	37
FIGURA 21 – CORTE TRANVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO, CÉLULAS COM CASPASE 3 ATIVADA EM MARRON (RATO 9 – GRUPO TCL).....	38
TABELA 1 – COMPARAÇÃO DA MÉDIA DE PESO DOS RATOS DE ACORDO COM OS GRUPOS.....	39
GRÁFICO 1 – COMPARAÇÃO DA MÉDIA DE PESO DOS RATOS DE ACORDO COM OS GRUPOS.....	39
TABELA 2 – MÉDIA DE PESO TESTICULAR TOTAL DE ACORDO COM OS GRUPOS.....	40
GRÁFICO 2 – MÉDIA DE PESO TESTICULAR TOTAL DE ACORDO COM OS GRUPOS.....	40
TABELA 3 – MÉDIA DO VOLUME DO TESTÍCULO DIREITO DE ACORDO COM OS GRUPOS.....	41
GRÁFICO 3 – MÉDIA DO VOLUME DO TESTÍCULO DIREITO DE ACORDO COM OS GRUPOS.....	41
TABELA 4 – MÉDIA DO VOLUME DO TESTÍCULO ESQUERDO DE ACORDO COM OS GRUPOS.....	42
GRÁFICO 4 – MÉDIA DO VOLUME DO TESTÍCULO ESQUERDO DE ACORDO COM OS GRUPOS.....	42

TABELA 5 – MÉDIA DA ÁREA TUBULAR DE ACORDO COM OS GRUPOS.....	43
GRAFICO 5 – MÉDIA DA ÁREA TUBULAR DE ACORDO COM OS GRUPOS.....	43
TABELA 6 – MÉDIA DA ALTURA DO EPITÉLIO GERMINATIVO DE ACORDO COM OS GRUPOS.....	44
GRÁFICO 6 – MÉDIA DA ALTURA DO EPITÉLIO GERMINATIVO DE ACORDO COM OS GRUPOS.....	44
TABELA 7 – COMPARAÇÃO DA MÉDIA DE APOPTOSE CELULAR (EM %) DE ACORDO COM OS GRUPOS.....	45
GRÁFICO 7 – COMPARAÇÃO DA MÉDIA DE APOPTOSE CELULAR (EM %) DE ACORDO COM OS GRUPOS.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

Ad libitum – Expressão em latim para “à vontade”

Ca – calcio

ed. – Edition (Edição em inglês)

et. Al – *Et alli* (e outros)

g – grama

Kg – Quilograma

MMF – micofenolato mofetil

n. – número

p. – página

S.F. – Solução salina isotônica a 0,9%

TCL – tacrolimus

v. – volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 HISTOLOGIA TESTICULAR E ESPERMATOGÊNESE.....	15
2.2 IMUNOSSUPRESSÃO.....	18
2.3 TACROLIMUS.....	19
2.4 MICOFENOLATO MOFETIL.....	21
2.5 IMUNOSSUPRESSORES E SISTEMA REPRODUTIVO.....	22
2.6 APOPTOSE CELULAR E MECANISMOS DE AVALIAÇÃO DA APOPTOSE..	24
3 MATERIAL E MÉTODO	27
3.1 DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO EXPERIMENTAL.....	27
3.2 ADMINISTRAÇÃO DOS MEDICAMENTOS.....	28
3.3 RETIRADA DO MATERIAL PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	29
3.3.1 Procedimento cirúrgico	30
3.4. PREPARO DO MATERIAL	32
3.5 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	33
3.6 ANÁLISE DE APOPTOSE CELULAR.....	35
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4 RESULTADOS	39
4.1 PESO DOS RATOS.....	39
4.2 PESO TESTICULAR TOTAL.....	40
4.3 VOLUME TESTICULAR.....	41
4.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA ÁREA TUBULAR.....	42
4.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA ALTURA DO EPITÉLIO GERMINATIVO.....	43
4.6 ANÁLISE DE APOPTOSE DO TECIDO GERMINATIVO.....	45
5 DISCUSSÃO	46
6 CONCLUSÕES	50
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1 INTRODUÇÃO

Drogas imunossupressoras desempenham papel importante na prática médica. Sua utilização é notória em situações, como no transplante de órgãos, onde estas viabilizam a manutenção das funções do enxerto através do controle resposta imunológica do hospedeiro. Seu uso vai além dos transplantes, está presente no controle de doenças autoimunes, como enfermidades crônicas de trato digestivo, de doenças neurológicas, oftalmológicas, dermatológicas. Enfim, são drogas utilizadas em diversas especialidades, viabilizando o controle adequado do sistema imunológico(LAURENCE, 2012).

Entre os diversos efeitos colaterais atrelados aos imunossupressores, está o dano à produção espermática, com conseqüente redução da capacidade reprodutiva dos indivíduos que os utilizam. Levando-se em consideração que estas drogas são utilizadas por pacientes durante a infância e/ou em idade reprodutiva, fica clara a necessidade do conhecimento desses efeitos para podermos oferecer aos indivíduos medicamentos com o menor potencial deletério à função reprodutiva. Desta forma, além de oferecer um controle adequado da patologia, poderemos fazê-lo de forma que estes indivíduos mantenham sua capacidade de gerar descendentes (CANEGUIM, 2008).

Assim fica evidente a importância de estudos onde sejam avaliadas alterações vinculadas à produção espermática decorrentes de distintos imunossupressores.

1.1 OBJETIVOS

A) Analisar as alterações na espermatogênese em ratos submetidos ao uso de drogas imunossupressoras, por meio de análise histomorfométrica.

B) Analisar as alterações na espermatogênese em ratos submetidos ao uso de drogas imunossupressoras, por meio da avaliação de apoptose do tecido germinativo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTOLOGIA TESTICULAR E ESPERMATOGÊNESE

As gônadas masculinas, denominadas testículos, compreendem dois órgãos ovalados, situados no escroto, em uma posição que lhes proporciona a temperatura ideal para o desempenho de suas funções: gametogênese e esteroidogênese.

Espermatogênese inclui todo o processo de produção dos gametas masculinos, enquanto a esteroidogênese se refere à série de reações enzimáticas que culminam na produção dos esteroides sexuais masculinos. Estes processos ocorrem em dois compartimentos distintos anatômica e fisiologicamente: compartimento tubular, responsável pela produção espermática; compartimento intersticial, situado entre os túbulos seminíferos, encarregado da síntese dos hormônios sexuais. Embora separados anatomicamente, são intimamente conectados e suas atividades são reguladas por um estrito controle neuroendócrino (NIESCHLAG, 2009; WEIN, 2010).

Os testículos são recobertos por uma cápsula esbranquiçada denominada túnica albugínea, onde células mioídes intercalam com células de tecido conjuntivo, o que confere a ela certa capacidade contrátil que regula o suprimento arterial testicular, bem como auxilia no fluxo do fluido dos túbulos seminíferos para o exterior do testículo. A partir da albugínea, partem septos de tecido fibroso no sentido radial, que dividem o testículos em cerca de 250 lóbulos. Cada lóbulo contém de 1 a 4 túbulos, longos e convolutos, que confluem em uma região denominada *rete testes*, que dará origem a cerca de 6 a 12 dutos eferentes, que irão confluir na cabeça do epidídimo para formar um único túbulo (ARENAS, 1997; NIESCHLAG, 2009; WEIN, 2010) (Figura 1).

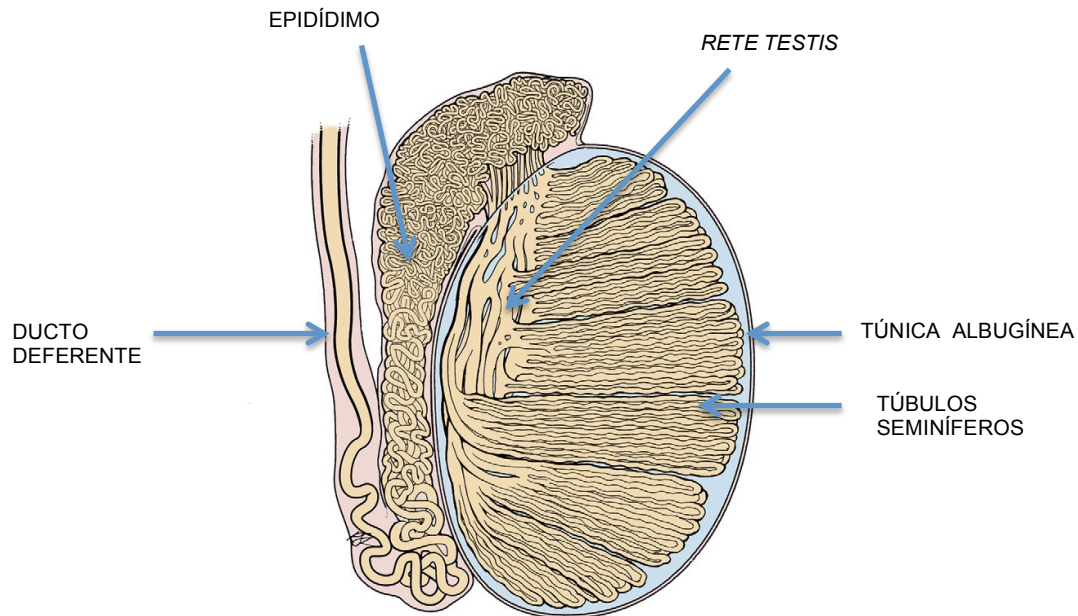


FIGURA 1 – SECÇÃO TRANSVERSAL DO TESTÍCULO
 FONTE: WEIN, 2010

Os túbulos seminíferos são entremeados pelo interstício testicular, que corresponde a cerca de 10 a 20% do volume, nele estão contidos vasos sanguíneos, linfáticos, macrófagos, fibroblastos, mastócitos e células de Leydig. Estas são as responsáveis pela síntese de testosterona, o principal hormônio sexual masculino, e o fazem a partir do colesterol, graças ao estímulo do hormônio luteinizante (LH), secretado pela glândula hipófise. Acredita-se que a produção de testosterona a partir das células de Leydig seja responsável por 95% do volume total em um homem adulto e estima-se que existam cerca de 700 milhões destas células em um testículo (WEIN, 2010; COLLETA E CARVALHO, 2005; HALES, 2005).

Devido à sua organização estrutural, um corte transversal ao maior eixo testicular, proporciona a visualização de túbulos seccionados transversalmente, onde observamos suas camadas. Da superfície externa para a interna, são identificados o tecido peritubular de revestimento, o epitélio germinativo (células de Sertoli e células germinativas) e a luz tubular (RUSSEL, 1990).

O tecido peritubular é formado por uma membrana basal, elementos acelulares (principalmente fibras colágenas) e células mioides. O número de camadas de células musculares varia segundo a espécie (HERMO, 1977). Por exemplo, em roedores existe apenas uma camada, enquanto animais de maior porte passam a exibir um número maior de camadas, que pode chegar a 4 a 6 camadas (HAIDER, 1998; RUSSEL, 1990, NIESCHLAG, 2009). As células mioides são

contráteis e assim responsáveis pela movimentação do fluido e propulsão dos espermatozoides através do túbulo seminífero (RUSSEL, 1989), além disso, secretam matriz extracelular e fatores de tecido conectivo (ALBRECHT, 2006; SCHELL, 2008).

Outro componente estrutural no compartimento tubular são as células de Sertoli. Estão situadas junto a membrana basal e se estendem até a luz dos túbulos seminíferos sendo consideradas o arcabouço estrutural do epitélio germinativo. (NIESCHLAG, 2009). Possuem junções intercelulares que criam a chamada barreira hematotesticular, proporcionando um ambiente isolado às células germinativas. Mais que isso, secretam fluido para luz tubular, promovem a fagocitose de células germinativas inaptas, fornecem nutrientes às células germinativas, movimentam células dentro do epitélio germinativo e secretam proteínas (RUSSEL, 1990; NIESCHLAG, 2009).

A espermatogênese é um dos mais fascinantes e complexos processos que ocorrem entre os mamíferos, onde as espermatogônias dão origem aos espermatozoides. Pode ser dividida em 3 fases: fase proliferativa, onde espermatogônias A passam por um processo de divisão celular e diferenciação, originando espermatogônias B, estas, por sua vez, irão diferenciar-se em espermatócitos preloptenos, que duplicam seu DNA e passam a ser denominados espermatócitos primários; fase meiótica, onde os espermatócitos primários passam pela primeira fase da meiose e originam os espermatócitos secundários, que dividem-se (segunda fase da meiose) originando as espermátides; espermiogênese, onde as espermátides passam por um processo de diferenciação celular originando os espermatozoides, células completamente diferenciadas (RUSSEL, 1990; NIESCHLAG, 2009; SKINNER, 2005).

O processo de produção espermática é controlado pela ação da glândula hipófise, que estimulada pelo GnRH secretado pelo hipotálamo, libera na corrente sanguínea o hormônio luteinizante (LH), que estimula a produção de testosterona pelas células de Leydig. Esta, por sua vez, é difundida para o espaço tubular, onde atinge uma concentração 15 a 20 vezes mais alta que na circulação, necessária para a manutenção da espermatogênese. Uma segunda gonadotrofina, o hormônio folículo-estimulante (FSH), atua em receptores situados nas células de Sertoli e provavelmente nas espermatogônias, estimulando a iniciação e manutenção da espermatogênese. Criando um mecanismo de feedback negativo, a testosterona

inibe a secreção de GnRH e outra substância produzida pelas células de Sertoli, denominada inibina, inibe a secreção de FSH. Desta forma, para a iniciação e manutenção da espermatogênese, são necessários níveis fisiológicos de testosterona e gonadotrofinas (RUSSEL, 1990; NIESCHLAG, 2009).

2.2 IMUNOSSUPRESSÃO

Drogas imunossupressoras são utilizadas para atenuar a resposta imune em pacientes que receberam órgãos transplantados e nos portadores de doenças autoimunes (LAURENCE, 2012). Sua utilização teve início nos anos 1950 com o uso de glicocorticoides associados à azatioprina e/ou globulina antilinfocítica que permaneceram como principais drogas imunossupressoras até o início dos anos 1980, com a introdução da ciclosporina no mercado norte-americano (ABBUD-FILHO, 1997). A partir dos anos 1990 surgiram novos agentes químicos, como tacrolimus, micofenolato mofetil, sirolimus, mizoribina, brequinar, gusperimus deoxiespergualina e feftunomide (ABBUD-FILHO, 1997; HARTONO, 2013; GUERRA, 2011).

A resposta imunológica é um processo dependente da célula T, que, após se encontrar com os antígenos, pode apresentar respostas diversas, tais como a apoptose, anergia, ativação parcial e/ou total com expansão clonal e proliferação de células efetoras governadas por diferentes citocinas. A sequência completa de eventos que levam à ativação completa do linfócito T requer, necessariamente, três sinais externos em receptores localizados na membrana dessas células. O primeiro sinal ocorre com o reconhecimento das moléculas MHC ou de seus peptídeos pelo receptor da célula T (TCR). Essa interação física ativa uma série de proteínas tirosinacinasas (TKs) que, por sua vez, ativam vias bioquímicas efetoras como a via da fosfolipase C (PLC), via do inositol trifosfato (IP-3) calcineurina e diacilglicerol (DAG) e proteínacina C (PKC). Apenas o primeiro sinal não é suficiente para ativação das células T, sendo necessário que os co-receptores CD4 e CD8 também devem se acoplar ao TCR para completar a ligação. Além disso, quando a célula T encontra o aloantígeno pela primeira vez, um segundo sinal é também necessário para que o processo de ativação prossiga. Esse segundo sinal ocorre através da

interação de moléculas de adesão e seus respectivos “encaixes”, por exemplo, CD28 com B7-1 ou B7-2, CD2 com CD58 (LFA-3), LFA-1 com ICAM-1 (ABBUD-FILHO, 1997).

Os dois primeiros sinais de transdução ligam os eventos da membrana citoplasmática aos eventos nucleares que acarretam ativação dos genes, produção de proteínas regulatórias (citocinas) tipo IL- 2. Com a produção de citocinas, a célula T passa da fase G0 do ciclo celular para a sua fase ativado G1, mas não está pronta para prosseguir no ciclo e proliferar. Para que isso ocorra é necessário o terceiro sinal que acontece quando as citocinas “encaixam” nos seus receptores e emitem sinais de transdução para o núcleo da célula através de PTKs (p 7056) e/ou fatores de transcrição (STATS). Esses sinais passam por uma proteína chamada mTOR (*mammalian target of Rapamycin*) e ativam enzimas do tipo ciclinas E/ CDK2 e D/CDK4 e a proteína retinoblastoma que são essenciais para a passagem das células da fase G1 para a fase S da síntese de DNA (ABBUD-FILHO , 1997).

Com isso as drogas imunossupressoras podem ser classificadas conforme seu local de ação e seus efeitos nos linfócitos em drogas que afetam a estrutura da membrana celular (anticorpos policlonais e monoclonais, anticorpos anti-receptores da IL-2, CTLA4); drogas que afetam a síntese das citocinas (glicocorticoides, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus e leflunomide) e drogas que afetam a síntese de nucleotídeos (purinas como azatioprina e micofenolato mofetil e pirimidinas, como brequinar) (ABBUD-FILHO , 1997; LAURENCE, 2012; HARTONO, 2013).

2.3 TACROLIMUS

Tacrolimus é um potente imunossupressor macrolídeo desenvolvido a partir da fermentação do fungo *Streptomyces tsukubaensis*, inicialmente descrito em 1987 (KINO, 1987, KINO, 1987). Os primeiros estudos *in vitro*, demonstraram sua importante capacidade de inibição da síntese de IL-2 (OCHIAI, 1987; KINO, 1987), o que levou à sua utilização em protocolos de imunossupressão em pacientes transplantados (WALLEMACQ, 1993).

Durante o processo de ativação dos linfócitos T, o contato com o antígeno leva ao influxo de cálcio para o meio intracelular, este, liga-se ao calmodulina e, juntos, ativam a calicreína, que pode desfosforilar a (NF-ATc). Esta, por sua vez, ganha núcleo celular e juntamente com sua unidade nuclear, leva a síntese de citocinas, entre elas a IL-2, crucial para a ativação e recrutamento de linfócitos T (PERRY, 2005; CANEGUIM, 2008).

Tacrolimus atravessa a membrana plasmática do linfócito-T e liga-se ao seu receptor intracelular (FKBP12), formando um complexo (tacrolimus–FKBP12) que bloqueia a função desfosforilativa da calcineurina sobre o NF-ATc, resultando na supressão deste fator e na consequente inibição da transcrição de IL-2 para a ativação dos linfócitos-T (CANEGUIM, 2008).

Desta forma, o FK506 exerce um adequado controle da atividade imunológica, característica que o levou a ser empregado no controle de pacientes submetidos a transplante renal (GUERRA, 2011; HARDINGER, 2013; RATH, 2013), hepático (RODRÍGUEZ-PERÁLVAREZ, 2012; RATH, 2013), pancreático (GUERRA, 2011; KIMELMAN, 2013; SINGH, 2013; GRUESSNER, 2013), pulmonar (SNELL, 2007; ALIABADI 2012) e cardíaco (ALIABADI 2012). Mais que isso, sua utilização está descrita no tratamento de doenças autoimunes (SÁDABA, 2004), como doença inflamatória intestinal (TRANTAFILLIDIS, 2011), artrite reumatoide (LEE, 2010), hepatite autoimune (MOURA, 2014), lúpus (YONN, 2010), nefropatias (HEN, 2013), patologias cutâneas (MADAN, 2007; RODRIGUEZ-CERDEIRA, 2012) e oftalmológicas (LARSON, 2011).

Não obstante às suas características terapêuticas, a utilização da droga tem sido vinculada a efeitos colaterais. Talvez o mais prevalente desses seja a nefrotoxicidade, característica importante dos inibidores da calcineurina. Esta pode se manifestar pela redução do ritmo de filtração glomerular, elevação evidente da creatinina plasmática e alteração de eletrólitos, como hipercalemia (FUNG, 1991). Acredita-se que os efeitos nefrotóxicos sejam decorrentes da contração da arteríola eferente ou de fibrose intersticial (VAN SANDWIJK, 2011). Outro efeito colateral importante se refere às alterações no mecanismo da glicose com tendência à hiperglicemia. Além disso, estão associadas à substância alterações neurológicas como tremores, cefaleia, insônia, parestesias, encefalopatia; alterações gastrointestinais, como diarreia, náuseas, constipação e dispepsia; hipertensão e

aumento da incidência de neoplasias (VAN SANDWIJK, 2011; ASTELLAS, 2005; TOLOU-GHAMARI, 2012; APURI, 2014).

2.4 MICOFENOLATO MOFETIL

O micofenolato mofetil, pró-droga do ácido micofenólico pertence à classe dos imunossupressores antimetabólicos (LAURENCE, 2012). Foi isolado em 1896 a partir de cultura de *Penicillium* e purificado em 1913. Na década de 1940 foi reconhecida sua atividade antibacteriana e antifúngica. No entanto, o ácido micofenólico ficou praticamente esquecido até o final dos anos 1960, quando foi utilizado como droga antitumoral, devido aos seus efeitos antiproliferativos demonstrados *in vitro*. As pesquisas sobre sua atividade imunossupressora ocorreram na década de 1980 e sua utilização clínica nos anos 1990, sendo aprovado pelo FDA em 1995 (LAURENCE, 2012; NORONHA, 1997).

O ácido micofenólico é uma droga antiproliferativa que age na biossíntese das purinas através da inibição da enzima inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH), que é uma enzima-chave da via de novo da biossíntese das purinas. A inibição do IMPDH pelo ácido micofenólico leva ao bloqueio da síntese de nucleotídeos de guanosina (GTP e dGTP), que são substratos para a síntese de DNA e RNA. Desta forma, ocorre inibição da síntese de DNA e RNA e conseqüentemente da proliferação celular. Um aspecto importante é que linfócitos T e B dependem predominantemente da via de novo da síntese de purinas para sua proliferação. Com isso, o ácido micofenólico exerce uma potente inibição da proliferação linfocitária (LAURENCE, 2012; 48. NORONHA, 1997).

Após sua absorção oral, o MMF é rapidamente convertido em ácido micofenólico (AMF), este é metabolizado principalmente no fígado, formando o glucoronídeo do ácido micofenólico (MPAG), que é farmacologicamente inativo (NORONHA, 1997. ATCHESON, 2005).

Os primeiros resultados da utilização de MMF em transplante renal, são do início dos anos 1990 (SOLLINGER, 1992), seguidos por estudos multicêntricos (EUROPEAN MYCOPHENOLATE MOFETIL COOPERATIVE STUDY GROUP, 1995). Também tem sido utilizado no tratamento da rejeição em pacientes

submetidos a transplante hepático (SCHREM, 2013; CANTAROVICH, 2011; VILLARROEL, 2005), cardíaco (ALIABADI, 2012; NAKATANI, 2009), pulmonar (HOPKINS, 2008) e pancreático (KIMELMAN, 2008), bem como no tratamento de doenças autoimunes.

Embora não apresente a nefrotoxicidade dos inibidores da calcineurina, o uso de MMF pode estar relacionado à hipercolesterolemia, DM, sintomas gastrointestinais, nefropatia associada à BK, leucopenia, infecções oportunistas (ROCHE, 1998; NORONHA, 1997). Mais que isso, possui efeitos teratogênicos, sendo contraindicada sua utilização no período gestacional (ROCHE, 1998; MCKAY, 2005).

2.5 IMUNOSSUPRESSORES E SISTEMA REPRODUTIVO

Vários estudos buscam verificar efeitos negativos do uso de imunossupressores no sistema reprodutor.

Quanto ao uso de sirolimus, em um estudo com pacientes transplantados, foi observada amenorreia em mulheres, bem como alterações da produção espermática em homens (BOOBES, 2010). Em outra análise, foram observadas redução da contagem e morfologia de espermáticas, com diminuição da taxa de gestação em homens transplantados que receberam a medicação (ZUBER, 2008). Um paciente desenvolveu azoospermia, com recuperação da produção espermática após cessar o uso (BOOBES, 2007) e foram observadas alterações dos níveis de testosterona e gonadotrofinas em indivíduos submetidos ao tratamento referido (KACZMAREK, 2004). Através de estudo experimental, verificou-se redução do peso testicular, elevação de gonadotrofinas e estradiol, redução dos níveis séricos de testosterona, bem como alterações histológicas significativas em ratos submetidos ao uso de sirolimus (CHEN, 2013).

No que se refere aos inibidores da síntese de citocinas, foram observadas alterações nos parâmetros seminais de pacientes que utilizaram ciclosporina, apresentando relação direta com a dose utilizada (XU, 2003). Analisando a motilidade espermática *in vitro*, foi observado que o sêmen de voluntários, quando incubado com ciclosporina, apresentava redução da motilidade espermática

(MISRO, 1999). Estudos experimentais com utilização de ciclosporina em ratos, demonstraram redução do peso testicular (SEETHALAKSHMI, 1987; SRINIVAS, 1995; CHEN, 2013) e diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos (SRINIVAS, 1995; SEETHALAKSHMI, 1987; IWASAKI, 1995; MASUDA, 2003). Redução do número de espermatozoides e espermátides por túbulo seminífero (SEETHALAKSHMI, 1987; IWASAKI, 1995; CHEN, 2013), alterações morfológicas em espermatozoides (SEETHALAKSHMI, 1987; SRINIVAS, 1995), redução da motilidade espermática em testículo (SEETHALAKSHMI, 1987) e epididimário (IWASAKI, 1995). Mais que isso, foram constatadas alterações hormonais, como redução dos níveis séricos de testosterona (SRINIVAS, 1995; CHEN, 2013) e elevação de gonadotrofinas (SEETHALAKSHMI, 1987; IWASAKI, 1995; CHEN, 2013).

Quanto ao tacrolimus, em estudos iniciais onde foi realizada a análise histológica de túbulos seminíferos de ratos que utilizaram a droga por períodos de 14 dias, não houve diferenças em comparação aos controles (HISATOMI, 1996). O mesmo ocorreu em relação ao tecido prostático, vesículas seminais e epidídimo. Mais que isso, não foram houve diferença nos níveis séricos de testosterona e LH, bem como redução da quantidade de células de Leydig (TAI, 1994).

Por outro lado, foi observada redução da quantidade e motilidade espermática em nível epididimário nos ratos tratados com FK 506. Além disso, quando estes animais acasalaram com fêmeas, que não receberam tratamento, ocorreu uma redução no número de filhotes vivos (HISATOMI, 1996), o que levou o autor a questionar uma possível alteração que um possível dano à função reprodutiva decorrente do uso da medicação poderia ocorrer no epidídimo. Posteriormente o mesmo autor avaliou marcadores bioquímicos em epidídimo, constatando a redução dos níveis de L-carnitina, que possui efeitos antioxidantes. Com isso, concluiu que esta alteração seria responsável pelas alterações na contagem e motilidade espermática (HISATOMI, 2008).

Recentemente, foram observadas, em ratos tratados com tacrolimus por períodos de 30 e 60 dias, alterações no arranjo de células peritubulares, redução da quantidade de células de Sertoli e células germinativas, com aumento da expressão de marcadores de apoptose das mesmas; redução da área total de tecido germinativo e de túbulos seminíferos (CANEGUIM, 2009). Além disso, foram constatadas reduções da quantidade de células peritubulares, com elevação de

marcadores de apoptose entre elas, bem como alterações estruturais do tecido peritubular através de microscopia eletrônica (CANEGUIM, 2011). Outro estudo, onde a droga foi fornecida por um período de 8 semanas, a ratos previamente nefrectomizados, foi observada redução dos níveis séricos de testosterona, FSH e LH, bem como alterações histológicas no tecido germinativo (CHEN, 2013).

No que se refere ao micofenolato mofetil, a literatura é parca. Segundo informações do fabricante, o uso da droga não está vinculado a alterações da função reprodutiva (ROCHE, 1998). Por outro lado, através de um sistema de notificação da FDA, em um total de 1461 indivíduos que relataram efeitos adversos referentes ao uso da droga, 11 pacientes relataram infertilidade e dois deles azoospermia. Além disso, em um estudo com pacientes que utilizavam imunossupressores, a redução dos níveis de testosterona sérica e a elevação dos níveis de gonadotrofinas foram mais importantes no grupo onde sirulimus foi associado ao MMF do que na associação de sirulimus com outros imunossupressores (KACZMAREK, 2004).

2.6 APOPTOSE CELULAR E MECANISMOS DE AVALIAÇÃO DA APOPTOSE

O termo apoptose, morte celular programada, foi utilizado pela primeira vez em 1972, em referência ao termo grego que significa perda das folhas pelas árvores, para descrever uma maneira distinta de morte celular (KERR, 1972). Consiste em um processo necessário ao desenvolvimento e homeostase do organismo, sendo importante para eliminar células supérfluas e/ou defeituosas (GRIVICICH, 2007). Pode ocorrer normalmente durante o desenvolvimento e envelhecimento tecidual, como forma de controle da população celular ou pode ocorrer como mecanismo de defesa em situações como reações imunológicas ou quando células são danificadas por fatores extrínsecos (ELMORE, 2007; NORBURY, 2001).

A apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas. De um modo geral, a apoptose é um fenômeno bastante rápido: ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à

membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos (*blebs*) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas com conteúdo celular. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório (GRIVICICH, 2007; ZIEGLER, 2004). Assim pode ser diferenciada do processo de necrose, marcado por edema celular, formação de vacúolos citoplasmáticos, edema de retículo endoplasmático, rotura mitocondrial e de lisossomos, seguidos do rompimento da membrana plasmática com liberação de componentes celulares, desencadeando recrutamento de células inflamatórias (ELMORE, 2007). O processo de apoptose envolve uma série de eventos bioquímicos mediados por diversas substâncias, entre estas, destacam-se as caspases, proteases que possuem papéis iniciadores e efetores no processo apoptótico.

Diversos fatores podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, deprivação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio (GRIVICICH, 2007).

Sua ativação pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca decorre da ativação de receptores de membrana, pertencentes à família dos receptores de necrose tumoral, por exemplo, FasL. A ligação com estes receptores resulta em sua trimerização e conseqüente ativação dos receptores de morte específicos. A sinalização a seguir é mediada pela porção citoplasmática desses receptores interagindo com moléculas conhecidas como FADD/ MORT-1. Essas moléculas têm a capacidade de recrutarem a caspase-8, que irá ativar a caspase-3, uma protease efetora do processo de apoptose. A via intrínseca decorre da ativação mitocondrial por fatores pró-apoptóticos, com alterações na permeabilidade de sua membrana, com a conseqüente liberação do citocromo c. Uma vez no citosol, o citocromo c forma um complexo com a APAF-1 (*Apoptotic protease-activating factor 1*) e a caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-

caspase-9, liberando a caspase-9 ativa. Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 (CANEGUIM, 2008; GRIVICICH, 2007, ELMORE, 2007).

Após a ativação da caspase 3 (efetora), segue-se a parte executora do processo, marcada pela condensação de cromatina, ativação de proteases com degradação e reorganização do citoesqueleto, formação dos prolongamentos de membrana (*belds*), fragmentação nuclear e, por fim, formação dos vacúolos apoptóticos (GRIVICICH, 2007; ELMORE, 2007; PORTER, 1999).

Para avaliação da apoptose em determinado tecido, existem basicamente seis métodos: avaliação citomorfológica, fragmentação de DNA, detecção de caspases, ensaios com mitocôndrias, detecção de *whole mounts* e alterações de membrana (ELMOR, 2007). Entre os métodos de detecção de caspases, pode-se citar a marcação de caspase 3 ativada, a qual pode ser utilizada em testículos (LI, 2009; BITGUL , 2013).

3 MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi desenvolvido através de análise histomorfométrica e avaliação de apoptose celular do tecido germinativo de ratos submetidos à imunossupressão.

3.1 DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO EXPERIMENTAL

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*), com idade de 70 dias, com maturidade sexual completa, adquiridos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, com peso variando entre 300 e 350 gramas.

Os animais foram mantidos em gaiolas próprias para a espécie com as mesmas condições ambientais, ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração *ad libidum* durante todo o período do experimento. Os mesmos foram mantidos em grupos de 5 animais por gaiola. O estudo foi desenvolvido no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de 10 animais, organizados da seguinte forma:

CONTROLE	Não recebeu medicação
SHAM	Recebeu SF 0,9% (0,5 ml de volume)
MICOFENOLATO MOFETIL (MMF)	Recebeu dose diária de MMF (30mg/kg/peso) diluído em SF 0,9%
TACROLIMUS (TCL)	Recebeu dose diária de TACROLIMUS (1mg/kg/peso) diluído em SF 0,9%

QUADRO 1 – DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS POR GRUPOS

3.2 ADMINISTRAÇÃO DOS MEDICAMENTOS

Os medicamentos, tacrolimus e micofenolato mofetil, eram diluídos em SF 0,9%, imediatamente antes de sua utilização. Para fins de padronização, as diluições foram realizadas sempre da mesma forma, onde o volume oferecido aos animais era semelhante entre os grupos, bem como no grupo SHAM, nunca ultrapassando 0,5 ml de volume, sempre menor que a capacidade gástrica, evitando a possibilidade de refluxo do material instilado.

Os medicamentos e/ou placebo foram administrados via gavagem. Para tanto, os animais eram imobilizados, através da preensão manual de sua região dorso cranial e cauda, garantindo assim que os mesmos permanecessem imóveis durante o procedimento. A sonda de gavagem, acoplada a uma seringa de 1 ml (que continha o material a ser injetado) era introduzida delicadamente via cavidade oral, alcançando o esôfago e posteriormente o estômago. Após verificar a passagem da sonda ao trato digestivo, a solução era delicadamente injetada, evitando assim o refluxo da mesma, bem como desconforto importante ao animal. Sempre que havia qualquer resistência à passagem da sonda, ela era imediatamente retirada, o animal era novamente imobilizado e a sonda era então reintroduzida.



FIGURA 2 – MODELO DE PEGA DO ANIMAL FIGURA 3 – TÉCNICA DE GAVAGEM

Os animais receberam o tratamento por um período de 100 dias. Durante este período foram semanalmente pesados para que a dose dos medicamentos utilizados fosse ajustada conforme o peso. Durante o processo, os animais receberam identificação em sua cauda, com isso foi possível individualizar a dose adequada a cada um deles.

Ao final deste período, os animais foram submetidos ao procedimento de retirada de material para análise.

3.3 RETIRADA DO MATERIAL PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para a realização do procedimento do procedimento cirúrgico os animais foram anestesiados com uma associação de Xilazina (5mg/kg) e Ketamina (100mg/Kg) intraperitoneal.

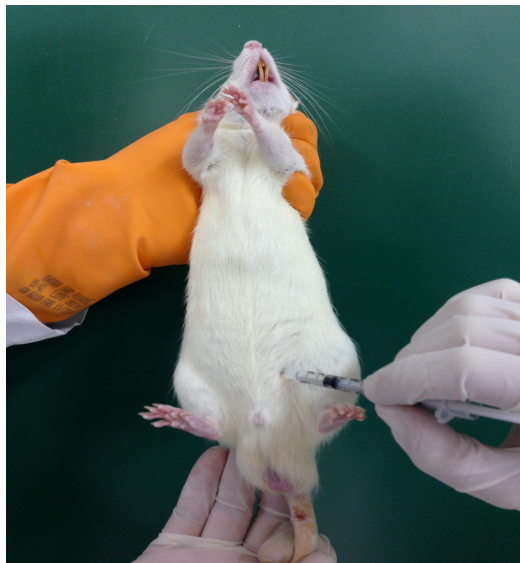


FIGURA 4 – TÉCNICA DE ANESTESIA INTRAPERITONEAL

Após anestesiados, foi realizada tricotomia em toda a parede abdominal. Os animais foram então imobilizados em mesas cirúrgicas próprias para a espécie, onde ocorreu o procedimento cirúrgico. O procedimento foi realizado nas instalações do Departamento de Anatomia da UFPR.

3.3.1 Procedimento cirúrgico

Foi realizado acesso à cavidade abdominal através de incisão mediana infraumbilical. Os testículos foram exteriorizados por via abdominal, seguindo a ligadura e secção do cordão espermático com posterior retirada da peça em bloco, contendo testículo e epidídimo.

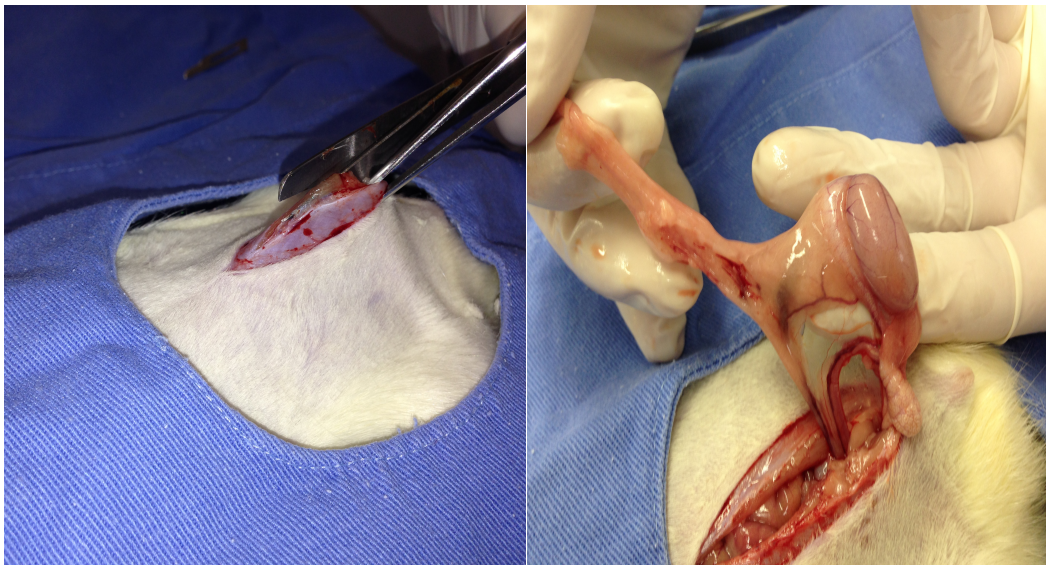


FIGURA 5 – LAPAROTOMIA MEDIANA FIGURA 6 – EXTERIORIZAÇÃO TESTICULAR

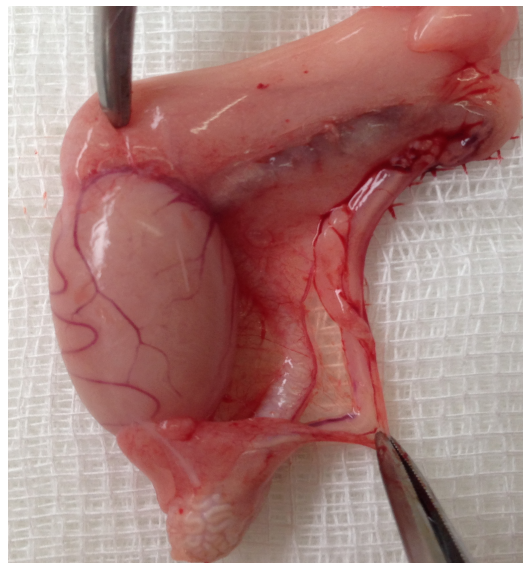


FIGURA 7 – PEÇA CIRÚRGICA (TESTÍCULO E EPIDÍDIMO)

Os testículos foram cuidadosamente dissecados e isolados do epidídimo adjacente. Tiveram seu peso imediatamente aferido usando balança de precisão¹. Seu volume foi verificado através da tomada de duas medidas com de paquímetro, utilizando a fórmula: $VT = 4/3 \pi ab^2$, onde "a" é o semieixo maior e "b" é o semieixo menor (HAYASHI, CEDENHO, 1980; MIRAGLIA, HAYASHI, 1993).



FIGURA 8 – TESTÍCULO



FIGURA 9 – TÉCNICA DE PESAGEM
(BALANÇA DE PRECISÃO)

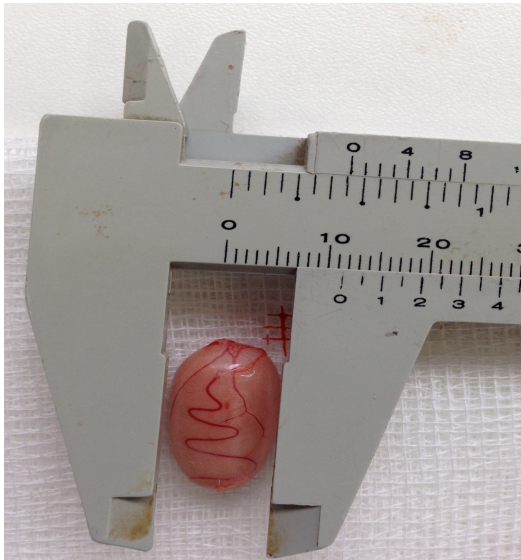


FIGURA 10 – MEDIDA DO MENOR
EIXO TESTICULAR

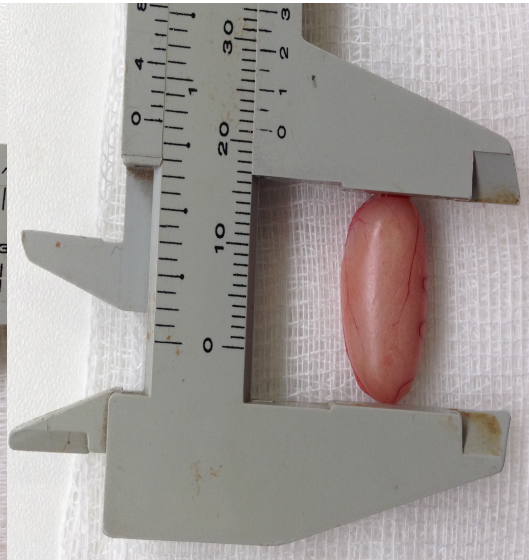


FIGURA 11 – MEDIDA DO MAIOR
EIXO TESTICULAR

¹ Balança de precisão 510x0,01 – Adventurer.

3.4 PREPARO DO MATERIAL

Os testículos retirados foram processados de duas maneiras distintas:

O testículo direito foi fixado em solução de ALFAC (85% álcool a 80%, 10% formol a 10% e 5% ácido acético glacial) por um período de 16 horas, sendo então transferido para solução de álcool 70%, onde foi preservado. Posteriormente as amostras foram diafanizadas em Xilol e incluídas em parafina. Foram realizados cortes de 3 μ m no eixo longitudinal do testículo. Os cortes foram depositados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (H.E.) (anexo II). As lâminas foram então montadas com uso da resina Entellan (Merck®).

O testículo esquerdo foi fixado em formaldeído 10%. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foram cortes de 3 μ m no eixo longitudinal do testículo, os quais foram posteriormente depositados em lâminas carregadas positivamente (Imunnoslide, Easypath®). Posteriormente, os cortes foram desparafinizados em xilol, reidratados em concentrações decrescentes de etanol, e processados para a imunohistoquímica. Cortes reidratados foram incubados com 3% H₂O₂ em metanol para o bloqueio da peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi realizada em tampão Citrato de Sódio 10 mM, pH 6.0, a 95°C, por 40 minutos. Possíveis ligações não específicas, bem como radicais aldeídicos livres, foram bloqueadas pela incubação de 5 minutos com PBS contendo 1% de BSA e por PBS contendo 0,1M de Glicina, respectivamente. Posteriormente, os cortes foram incubados por 12 horas a 4°C com o anticorpo primário anti-Caspase-3 clivada (Biocare CP229, IgG de coelho, diluído 1:100). Posteriormente foi incubado por 30 minutos o anticorpo secundário biotinilado de cabra contra IgG de coelho (Vector Laboratories, BA-1000, diluído 1:300), após a incubação com os respectivos anticorpos secundários, foi realizada a incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase por 30 minutos. A revelação da ligação do anticorpo primário foi realizada com DAB (“3,3’-diaminobenzidine tetrahydrochloride”) (*DAB substrate Kit, BD Pharmigen*), então foi realizada a contra coloração com hematoxilina de Harris. A seguir, os cortes foram desidratados em bateria crescente de etanol. Após incubação em xilol, as lâminas permanentes foram montadas com Entellan (Merck®).

3.5 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Para análise histomorfométrica, foram escolhidas aleatoriamente 40 secções transversais de túbulos seminíferos por animal, sendo analisados os túbulos mais arredondados, e com sua estrutura preservada, buscando identificar túbulos onde as figuras de espermatogênese estivessem todas presentes, evitando assim diferenças entre as amostras analisadas. Para fins de padronização, também foram analisadas 400 secções do grupo MMF.

Para captura de imagens, foi utilizado microscópio biológico trinocular plano 0,1 – Polaris – B.photonics – vinculado ao computador B-Xtreme, processador Intel G2030 Dual Core, com sistema de captura de imagem Home Mirage I. Para foto documentação foi utilizada câmera digital CMOS acoplada ao microscópio.



FIGURA 12 – SISTEMA DE CAPTURA DE IMAGENS

Foram obtidas a morfometria do epitélio germinativo e a área tubular com auxílio do Software TsView. O programa permite a determinação da área a ser aferida, através a demarcação da mesma. Da mesma forma, foram escolhidos dois pontos, na base e no ápice do epitélio germinativo e, o próprio programa calculou sua altura.



FIGURA 13: EXEMPLO DE IMAGEM CAPTURADA COM AUXÍLIO DO SOFTWARE TSVIEW

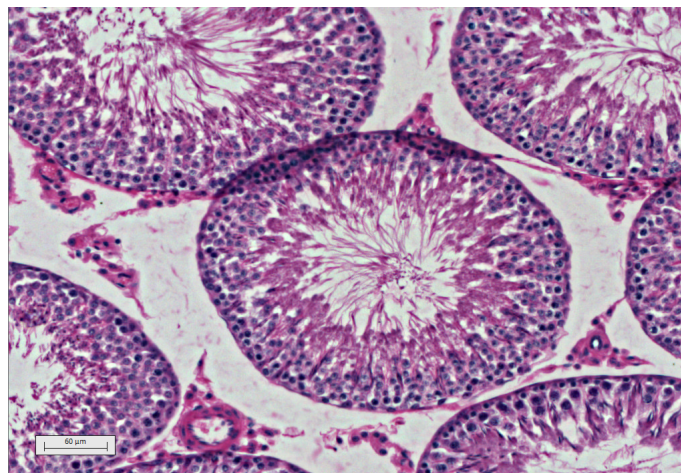


FIGURA 14 – CORTE TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO (RATO 1 GRUPO CONTROLE)

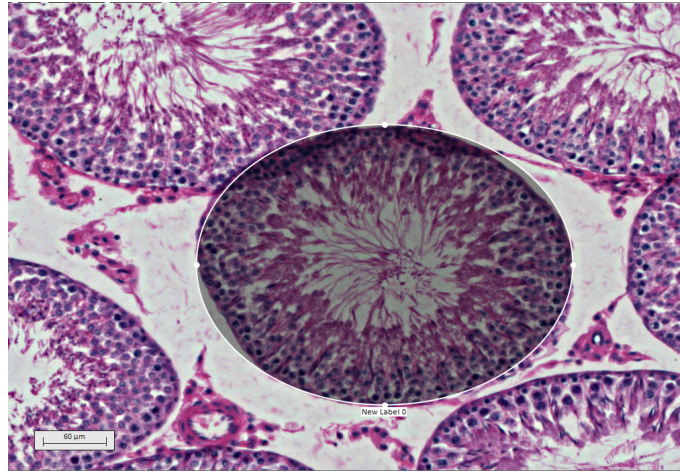


FIGURA 15 – MEDIDA DA ÁREA TUBULAR TOTAL (RATO 1 GRUPO CONTROLE)

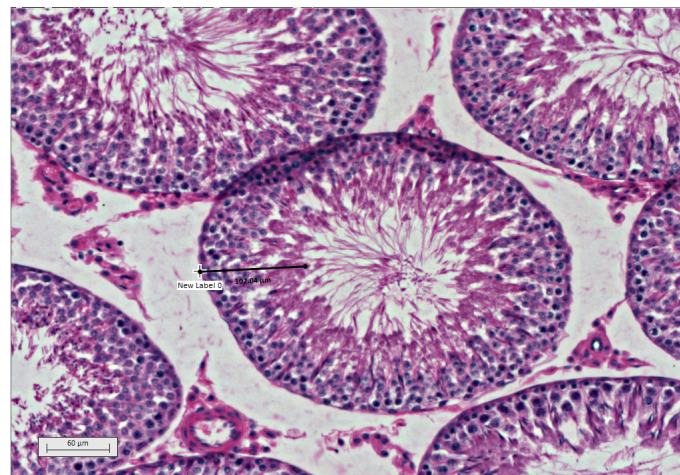


FIGURA 16 – MEDIDA DA ALTURA DO EPITÉLIO GERMINATIVO (RATO 1 GRUPO CONTROLE)

3.6 ANÁLISE DE APOPTOSE CELULAR

As lâminas de imunohistoquímica foram analisadas em microscópio óptico Olympus CX31 trinocular. Foram obtidas cinco fotomicrografias representativas de túbulos seminíferos, cortados transversalmente, de cada lâmina analisada. As fotomicrografias foram analisadas no software de avaliação de imagens TMARKER

V 1.20614 (NEXUS Personalized Health Technologies, Suíça), segundo o protocolo que se segue.

De cada fotomicrografia, o túbulo a ser analisado foi selecionado. Cinco núcleos marcados positivamente (marrons) foram marcados para calibração positiva e cinco núcleos negativos (roxos) foram selecionados para marcação negativa. O software então procedeu à contagem de todos os núcleos positivos e negativos na área selecionada. Parâmetros de tolerância foram fixados entre os tipos de reações. Os valores da desconstrução de cores utilizados foram para o padrão Hematoxilina – Diaminobenzidina. Os resultados obtidos foram tabulados para análise estatística.

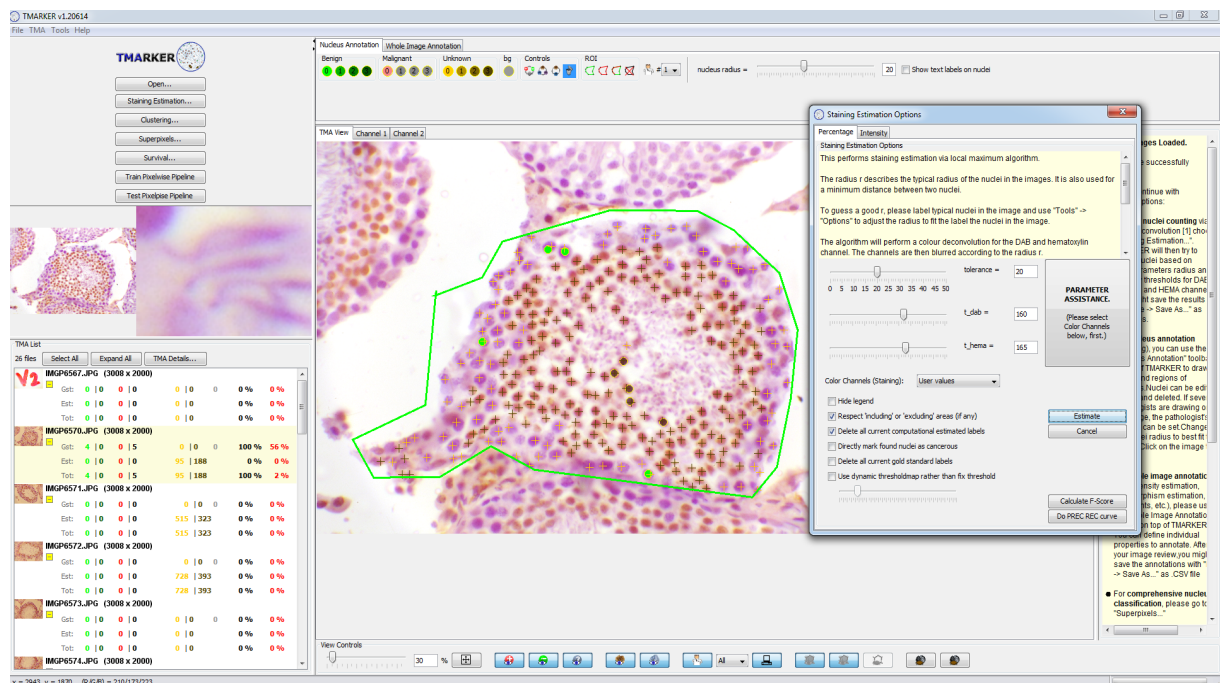


FIGURA 17 – EXEMPLO DE IMAGEM CAPTURADA COM SOFTWARE TMARKER V 1.20614

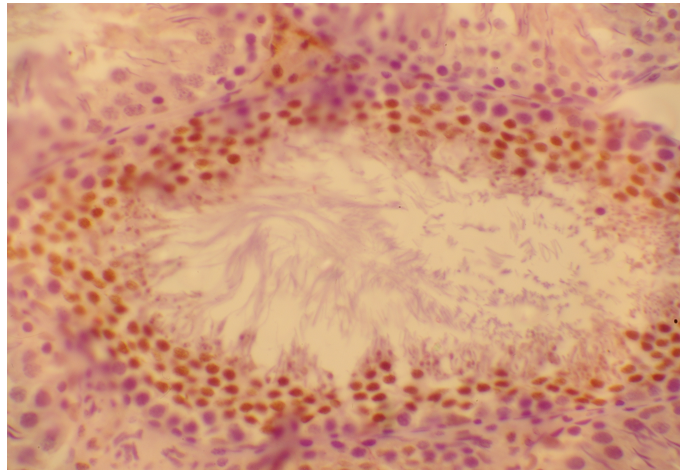


FIGURA 18 – CORTE TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO, CÉLULAS COM CASPASE 3 ATIVADA EM MARROM (RATO 9 – GRUPO CONTROLE)

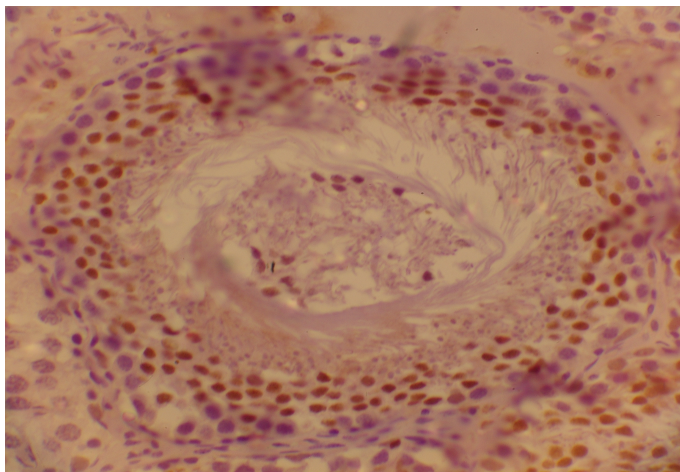


FIGURA 19 – CORTE TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO, CÉLULAS COM CASPASE 3 ATIVADA EM MARROM (RATO 9 – GRUPO SHAM)

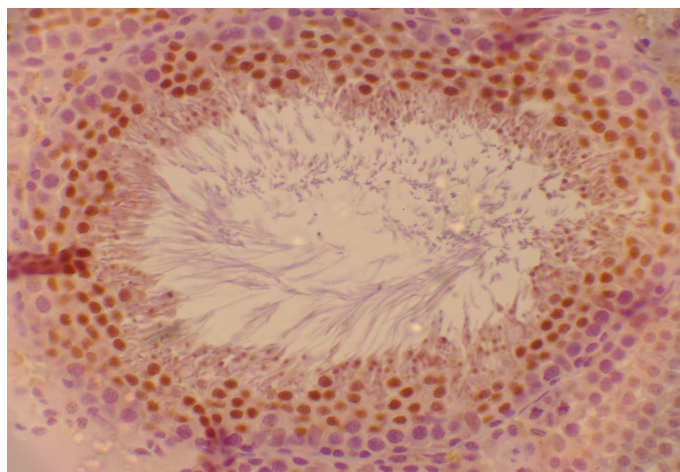


FIGURA 20 – CORTE TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO, CÉLULAS COM CASPASE 3 ATIVADA EM MARROM (RATO 9 – GRUPO MMF)

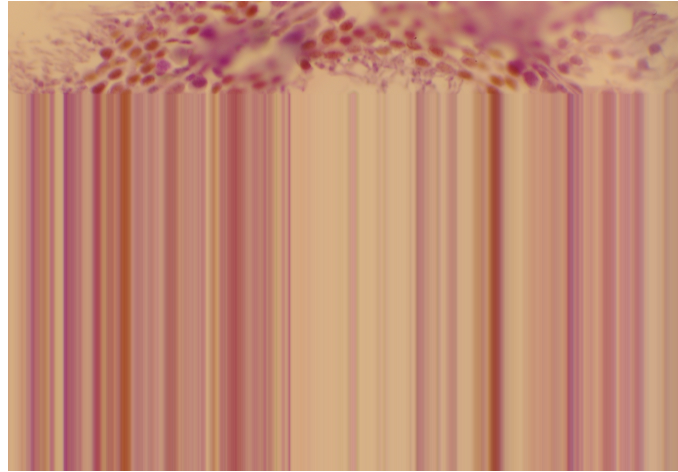


FIGURA 21 – CORTE TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO, CÉLULAS COM CASPASE 3 ATIVADA EM MARROM (RATO 9 – GRUPO TCL)

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as informações foram armazenadas em um arquivo estruturado com auxílio do programa EPI INFO versão 7 (*Centers for Disease Control and Prevention e World Health Organization, 2014*). Na comparação entre médias de grupos, foi utilizada análise de Kruskal-Wallis (*Centers for Disease Control and Prevention e World Health Organization, 1994*). Para avaliação das diferenças entre pares de grupos foi utilizada análise de variância com teste de Tukey (SPSS para Windows). O nível de significância estatística estabelecido foi de 5% (APÊNDICE 1).

4 RESULTADOS

4.1 PESO DOS RATOS

Durante o experimento foi observado ganho de peso em todos os animais, independente do grupo.

Ao final do experimento, comparamos os pesos dos animais, observando menor peso entre os animais do grupo tratado com micofenolato mofetil.

TABELA 1 – COMPARAÇÃO DA MÉDIA DE PESO DOS RATOS DE ACORDO COM OS GRUPOS

Grupo	N	Média	Variância	Desvio-padrão
CONTROLE	10	439,40 g	495,37	22,25
SHAM	10	419,70 g	388,90	19,72
MMF	9	390,55 g	1149,27	33,90
TCL	10	418,70 g	567,78	23,82

Kruskal-Wallis test $p < 0,01$

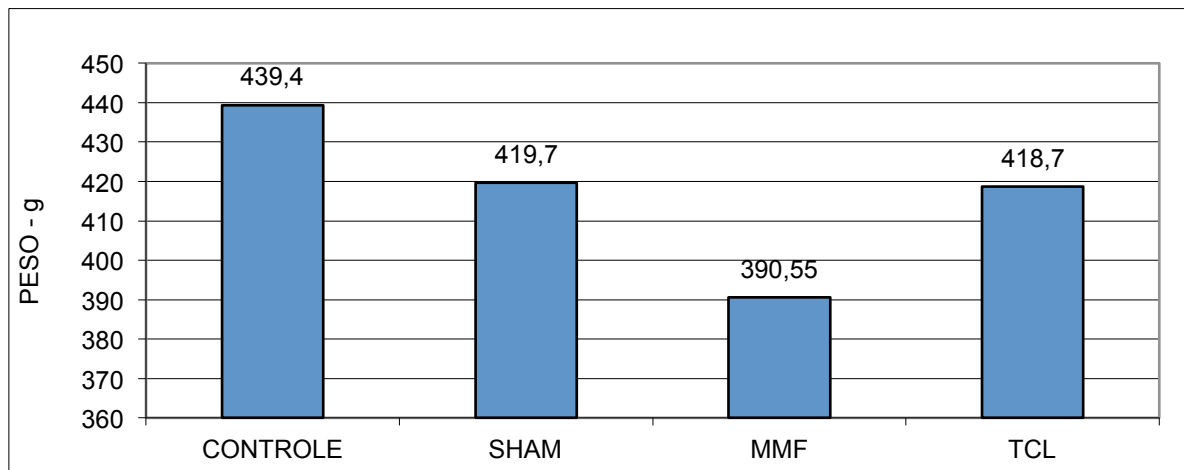


GRÁFICO 1 – COMPARAÇÃO DA MÉDIA DE PESO DOS RATOS DE ACORDO COM OS GRUPOS

4.2 PESO TESTICULAR TOTAL

A comparação entre os grupos demonstrou menor peso testicular total entre os animais tratados com tacrolimus. A diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa quando comparados os grupos TCL X SHAM e MMF X SHAM.

TABELA 2 – MÉDIA DE PESO TESTICULAR TOTAL DE ACORDO COM OS GRUPOS

Grupo	n	Média	Variância	Desvio-padrão
CONTROLE	10	3,71 g	0,04	0,21
SHAM	10	3,84 g	0,07	0,26
MMF	9	3,58 g	0,06	0,25
TCL	10	3,57 g	0,07	0,08

Kruskal-Wallis test $p < 0,01$

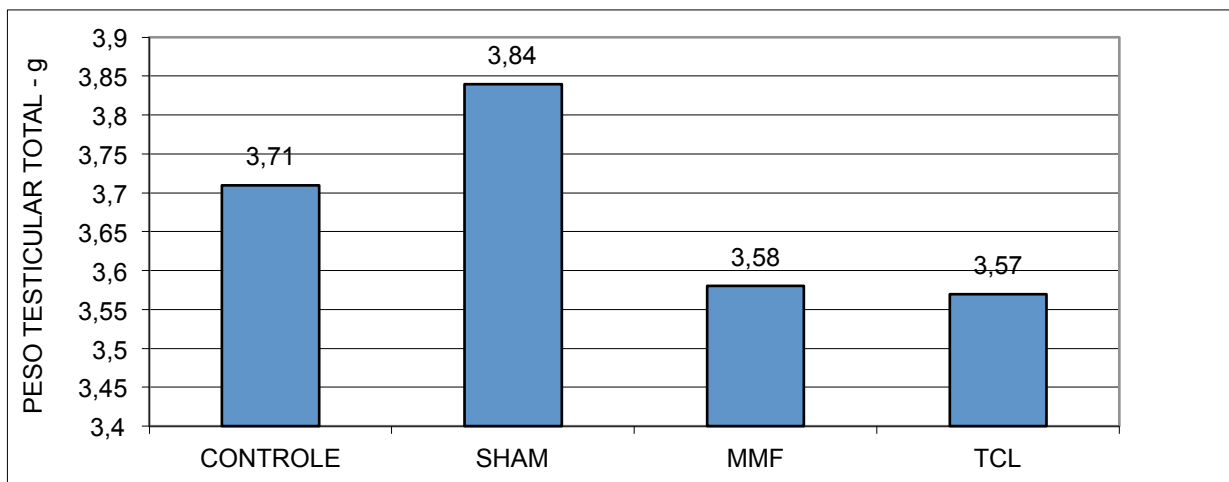


GRÁFICO 2 – MÉDIA DE PESO TESTICULAR TOTAL DE ACORDO COM OS GRUPOS

4.3 VOLUME TESTICULAR

A análise do volume testicular concluiu menor volume no grupo tratado com tacrolimus. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa quando comparamos os grupos CONTROLE X TCL e SHAM X TCL nos dois testículos. Houve diferença significativa quando comparamos os grupos CONTROLE X MMF e SHAM X MMF no testículo esquerdo.

TABELA 3 – MÉDIA DO VOLUME DO TESTÍCULO DIREITO DE ACORDO COM OS GRUPOS

Grupo	n	Média	Variância	Desvio-padrão
CONTROLE	10	9,30	1,12	1,06
SHAM	10	9,41	1,61	1,27
MMF	9	8,25	0,51	0,72
TCL	10	7,39	0,85	0,92

Kruskal-Wallis test $p < 0,01$

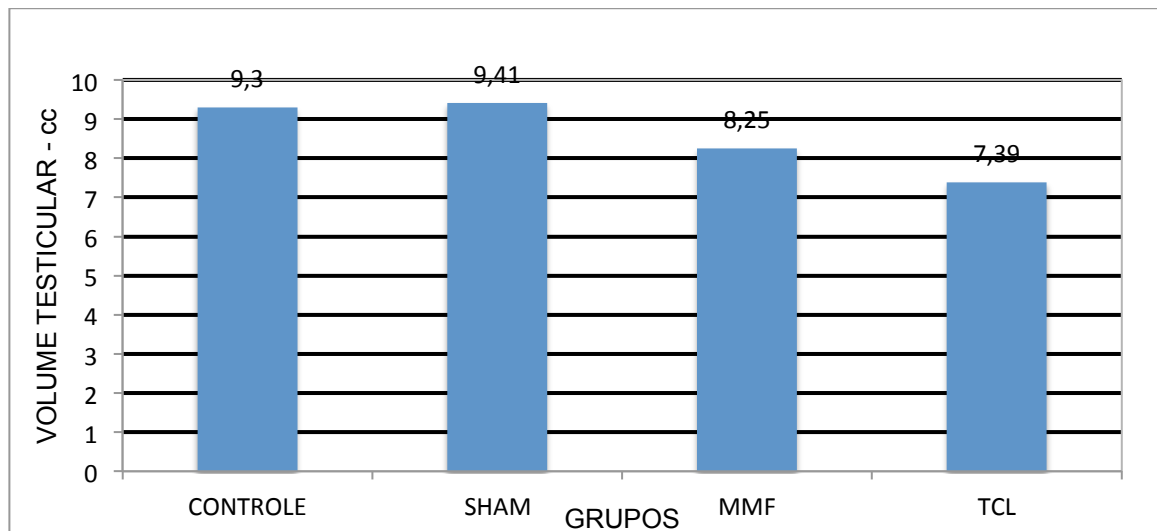


GRÁFICO 3 – MÉDIA DO VOLUME DO TESTÍCULO DIREITO DE ACORDO COM OS GRUPOS

TABELA 4 – MÉDIA DO VOLUME DO TESTÍCULO ESQUERDO DE ACORDO COM OS GRUPOS

Grupo	n	Média	Variância	Desvio-padrão
CONTROLE	10	9,21	0,81	0,9
SHAM	10	9,76	0,82	0,9
MMF	9	7,64	0,99	0,99
TCL	10	7,16	0,58	0,76

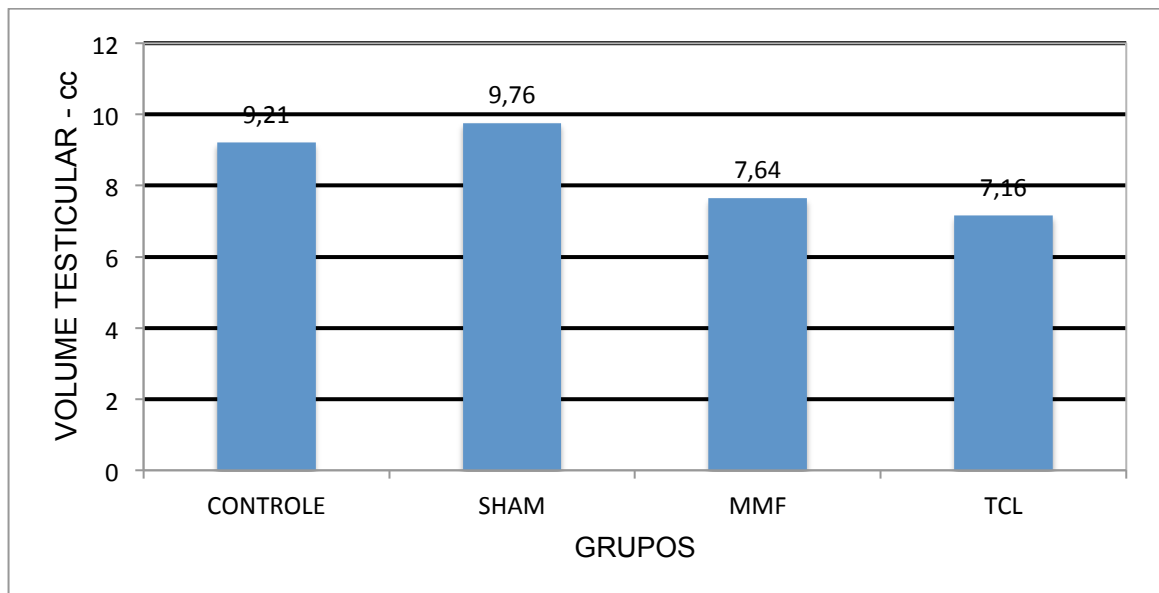
Kruskal-Wallis test $p < 0,01$ 

GRAFICO 4 – MÉDIA DO VOLUME DO TESTÍCULO ESQUERDO DE ACORDO COM OS GRUPOS

4.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA ÁREA TUBULAR

Comparadas as medidas de área de túbulos seminíferos, foi verificado decréscimo nas medidas dos grupos tratados com micofenolato e tacrolimus.

Quando comparados os grupos um a um, observou-se decréscimo da área tubular no grupo tratado com TCL, quando comparado com os grupos controle, MMF e SHAM.

Quando comparados com os demais grupos, o grupo MMF, demonstrou redução da área tubular quando comparado aos grupos controle e SHAM.

Quando comparados os grupos controle e SHAM, observamos diferença entre as medidas de área tubular.

TABELA 5 – MÉDIA DA ÁREA TUBULAR DE ACORDO COM OS GRUPOS

Grupo	n	Média	Variância	Desvio-padrão
Controle	400	85662,4 μm^2	5199224,4	7210,5
SHAM	400	84495,9 μm^2	4703256,2	6858,0
MMF	400	75901,3 μm^2	3385352,8	5818,3
TCL	400	67576,7 μm^2	4445693,4	6667,6

Kruskal-Wallis test $p < 0,01$

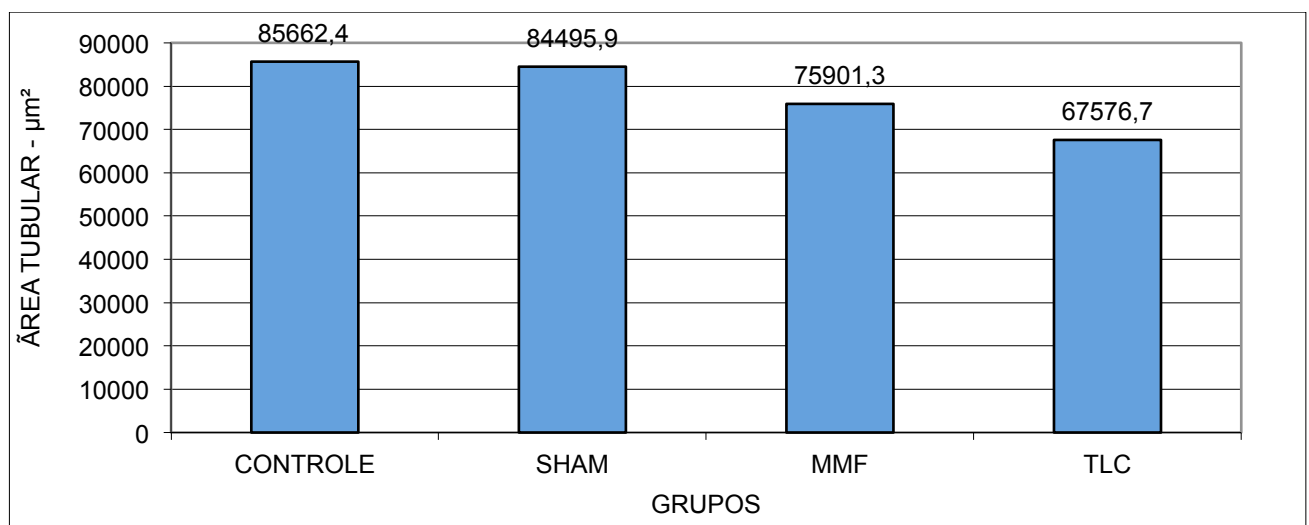


GRÁFICO 5 – MÉDIA DA ÁREA TUBULAR DE ACORDO COM OS GRUPOS

4.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA ALTURA DO EPITÉLIO GERMINATIVO

A comparação entre os grupos demonstrou redução da altura do epitélio germinativo os grupos tratados com tacrolimus e micofenolato mofetil.

Quando pareados, o grupo TCL demonstrou uma redução mais significativa quando comparado aos grupos MMF, controle e SHAM.

O grupo MMF apresentou menor altura do epitélio germinativo, quando comparado aos grupos controle e SHAM; e maior, quando comparado ao grupo tacrolimus.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e sham.

TABELA 6: MÉDIA DA ALTURA DO EPITÉLIO GERMINATIVO DE ACORDO COM OS GRUPOS

Grupo	n	Média	Variância	Desvio-padrão
Controle	400	110,13 μm	422,25	20,5490
SHAM	400	110,20 μm	423,27	20,5736
MMF	400	106,64 μm	133,39	11,5496
TCL	400	101,40 μm	240,47	15,5072

Kruskal-Wallis test $p < 0,01$

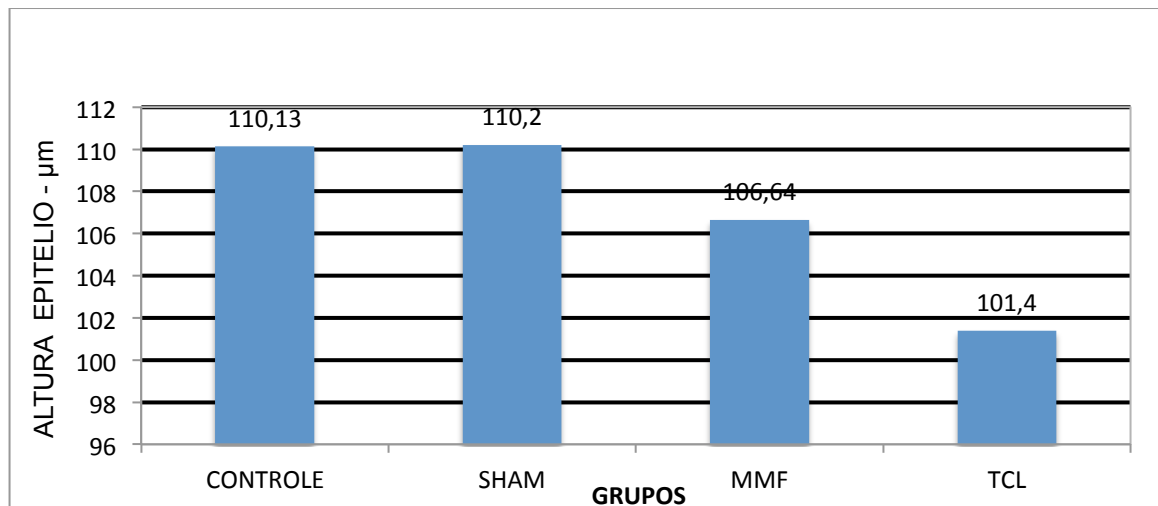


GRAFICO 6 – MÉDIA DA ALTURA DO EPITÉLIO GERMINATIVO DE ACORDO COM OS GRUPOS

4.6 ANÁLISE DE APOPTOSE DO TECIDO GERMINATIVO

A análise do índice de apoptose celular, aferida através da quantificação de células com expressão da caspase 3 ativada, demonstrou maior porcentagem de células em apoptose nos grupos tratados com imunossupressores

Quando pareados, o grupo TCL demonstrou maior porcentagem de células marcadas quando comparado com os grupos MMF, controle e SHAM.

O grupo MMF apresentou maior índice de apoptose celular quando comparado com os grupos controle e SHAM.

TABELA 7 – COMPARAÇÃO DA MÉDIA DE APOPTOSE CELULAR (EM %) DE ACORDO COM OS GRUPOS

Grupo	n	Média	Variância	Desvio-padrão
CONTROLE	45	68,30 %	16,75	4,09
SHAM	47	66,45 %	19,16	4,37
MMF	36	70,80 %	13,67	3,69
TCL	45	74,04 %	40,11	6,33

Kruskal-Wallis test $p < 0,01$

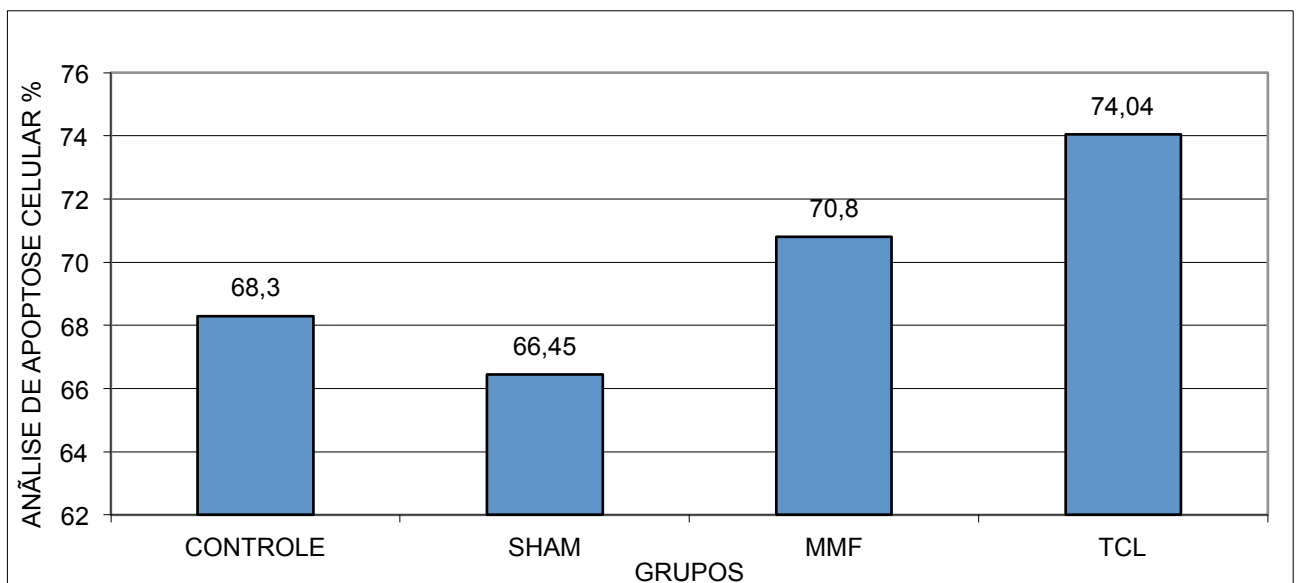


GRÁFICO 7 – COMPARAÇÃO DA MÉDIA DE APOPTOSE CELULAR (EM %) DE ACORDO COM OS GRUPOS

5 DISCUSSÃO

O propósito do presente estudo é verificar a existência de alterações na espermatogênese em ratos, decorrente do uso de dois imunossupressores, por um período prolongado, comparando-os entre si.

Devido à sua complexidade, o processo de produção espermática em humanos, dificilmente pode ser analisado *in vitro* em toda sua extensão. Assim, modelos animais proporcionam uma alternativa viável à experimentação. Ratos são mais frequentemente utilizados, pois apresentam certa familiaridade genética, facilidade na manipulação e custo baixo (JAMSAI, 2010).

Os ratos alcançam sua maturidade sexual em torno do 60 dias e permanecem em período reprodutivo até os 9 meses (ANDRADE, 2002; NEVES, 2013). Devido ao seu ciclo de vida mais curto, durante a idade adulta, acredita-se que 11,8 dias de vida de um rato, corresponderia a um ano de vida de um ser humano (ANDREOLLO, 2012). Com isso, através do protocolo proposto, poderíamos simular os efeitos sobre a produção espermática em um indivíduo que, após a maturidade sexual, utilizou imunossupressores por um longo período.

O período proposto para o estudo, 100 dias, ultrapassou o período de tempo do ciclo de espermatogênese, cerca de 52 dias. Desta forma, torna-se viável a ocorrência de efeitos sobre a produção espermática (ANDREOLLO, 2012).

No que se refere aos medicamentos utilizados, tacrolimus (FK506) e micofenolato mofetil, estes são amplamente aplicados na prática clínica. Quanto à via de administração, escolhemos a via oral pelo fato de não existir micofenolato em forma injetável (ROCHE, 1998). Mais que isso, é mais prática e apresenta baixo custo no que se refere ao tacrolimus. As doses utilizadas correspondem a doses habituais (ROCHE, 1998; ASTELLAS, 2005), bem como descritas em estudos experimentais anteriores (CHEN, 2013; SHEIKHZADEH, 2003; CANEGUIM, 2009; CANEGUIM, 2011; NELSON, 2013).

Quanto ao modo de administração, gavagem, este corresponde a uma maneira adequada de fornecimento enteral aos animais da espécie utilizada. Respeitamos a capacidade gástrica, infundindo pequenos volumes, de forma padronizada, tanto para os grupos tratados quanto para o grupo SHAM.

Durante todo o estudo, tivemos apenas um acidente durante o procedimento de gavagem, com sangramento de pequena monta oriundo da cavidade oral em um animal, o qual apresentou recuperação completa, estando apto a receber a medicação no dia seguinte. Acreditamos assim, que o método é uma opção simples e segura, tanto para os animais, quanto para os pesquisadores.

Um animal do grupo tratado com micofenolato mofetil, apresentou, a partir da segunda semana de estudo, perda ponderal, evoluindo a óbito no final da terceira semana. A causa permaneceu indefinida.

No decorrer do experimento, todos os ratos apresentaram ganho ponderal, porém, ao final do estudo, os animais tratados com micofenolato mofetil apresentaram menor ganho ponderal quando comparados com os demais grupos. Estes resultados podem ser explicados pelas alterações gastrointestinais decorrentes do uso de MMF, que podem manifestar-se clinicamente como anorexia e perda de peso (SHEIKHZADEH, 2013).

A análise do peso testicular total (PTT) mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos TCL e MMF, quando comparados ao grupo SHAM. Porém, quando comparados ao grupo controle houve diferença, mas não estatisticamente significativa. Caneguim (2008) observou uma tendência à redução do peso testicular no grupo tratado por um período de 60 dias, com isso, acreditamos que o uso dos imunossupressores por um período longo de tempo, tende a acarretar maior perda de peso testicular. Esta hipótese é corroborada por Chen (2013), em que animais tratados com tacrolimus por um período de 8 semanas apresentaram redução do peso testicular.

A análise do volume testicular demonstrou uma redução nos grupos tratados com TCL, quando comparados aos grupos SHAM e CONTROLE, em ambos os testículos. Bem como redução no grupo MMF em relação aos grupos SHAM e CONTROLE no testículo esquerdo. No mesmo lado, verificamos redução de volume no grupo TCL em relação ao grupo MMF. Acreditamos que esta alteração seja decorrente da redução do volume ocupado pelos túbulos seminíferos.

No que se refere à análise morfométrica, utilizamos dois parâmetros, área total dos túbulos seminíferos e altura do epitélio germinativo, já descritos anteriormente na literatura (CHEN, 2013; CANEGUIM, 2009; CANEGUIM, 2011; ARAUJO, 2008). Nossos resultados demonstraram redução da área tubular total e redução da altura do epitélio germinativo nos grupos tratados com

imunossupressores quando comparados aos grupos controle e SHAM. Comparados entre si, o grupo tratado com FK-506 apresentou alterações mais importantes que o grupo tratado com MMF.

Estudos anteriores verificaram redução do número e motilidade espermática nos animais tratados com tacrolimus, sem observar alterações histológicas a nível testicular, em ratos tratados por um período curto de tempo (HISATOMI, 1996), acreditando assim, que as alterações ocorriam no epidídimo. No mesmo estudo foram observados corpos eosinofílicos no epidídimo, que posteriormente foram rotulados como figuras de espermatogênese, espermatócitos e espermátides, indicando uma possível falha no processo de produção espermática (FUJIHIRA, 1999).

Recentemente, Caneguim *et al* (2009) realizou um estudo onde ratos receberam FK-506 por períodos de 30 e 60 dias. Neste foram observadas redução da área tubular total e área do epitélio germinativo, sendo mais importantes as alterações no grupo tratado por 60 dias. Mais que isso, alterações histológicas como redução do número de células germinativas, desorganização das camadas do epitélio germinativo e disjunção entre as células de Sertoli. O mesmo autor observou posteriormente, alterações do tecido peritubular, através de microscopia eletrônica e estudos de apoptose. Foram observadas diferenças nas camadas tubulares, bem como aumento do número de células mioides em apoptose (CANEGUIM, 2011). Chen *et cols.* observaram, em um experimento que comparava os efeitos de diferentes imunossupressores fornecidos a ratos previamente nefrectomizados, discretas alterações histológicas no epitélio germinativo, bem como alterações nos níveis séricos de testosterona e gonadotrofinas, nos animais que receberam doses de tacrolimus. Desta maneira, nossos dados estão de acordo com estes estudos, pois foram observadas alterações no grupo tratado com TCL, quando utilizado por um período de tempo mais longo.

Quanto ao micofenolato mofetil, não encontramos na literatura estudos experimentais que avaliassem seus efeitos sobre o epitélio germinativo, apenas a notificação de indivíduos que, em uso de MMF, referiram impossibilidade para conceber. Em outro estudo, indivíduos que utilizaram MMF associado a sirulimus evoluíram com alterações do metabolismo de testosterona e gonadotrofinas, mais significativas quando comparados a indivíduos que utilizaram sirulimus associado a outros imunossupressores (KACZMAREK, 2004). No presente estudo, foram

verificadas alterações menos significativas em relação ao tacrolimus; porém, mais significativas quando comparadas aos grupos controle e SHAM. Com isso, acreditamos que o uso prolongado de MMF interfere na produção espermática de maneira mais branda que o tacrolimus.

No que se refere à análise de apoptose celular, utilizamos marcadores de caspase 3 ativada, verificando maior porcentagem de células germinativas caspase 3 positivas, ou seja, maior índice de apoptose de células germinativas nos grupos tratados com imunossupressores, sendo mais significativo no grupo tratado com tacrolimus.

Estudos de apoptose, utilizando caspase 3 ativada, foram empregados por Bitgul (2013), observando maior expressão de apoptose em células germinativas de ratos submetidos a *stress*. Resultados semelhantes foram obtidos após o uso de bisfenol A (LI, 2009). Canegum (2011) observou, em ratos tratados com FK-506, maior incidência de células peritubulares apoptóticas, através de TUNEL.

Possíveis explicações para os efeitos do uso de tacrolimus sobre a produção espermática podem partir dos estudos sobre o tecido peritubular. Sabe-se que o tecido peritubular, em conjunto com as células de Sertoli, cria um microambiente propício para a produção espermática. Desta maneira, alterações nas células mioides, associadas ao desarranjo das células de Sertoli (CANEGUIM, 2011), acarretariam a quebra das condições necessárias para homeostase, o que poderia acarretar a apoptose de células germinativas observada no presente estudo. Outras possibilidades envolveriam alterações no metabolismo da testosterona e gonadotrofinas, vitais para manutenção da espermatogênese (CHEN, 2013), ou um possível efeito diabetogênico, decorrente da medicação, interferindo na produção espermática (CANEGUIM, 2008).

Quanto aos mecanismos que expliquem os efeitos observados no presente estudo, decorrentes do uso de MMF, são necessários estudos posteriores.

6 CONCLUSÕES

A) O uso de imunossupressores ocasionou redução da área tubular total e altura do epitélio germinativo em ratos. As alterações mais significativas foram observadas nos ratos tratados com TCL, em relação aos tratados com MMF.

B) O uso de imunossupressores desencadeou um aumento do índice de apoptose de células germinativas. A alteração mais importante foi encontrada no grupo de animais tratados com TCL em relação aos tratados com MMF.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBUD-FILHO, M. Revisão/Atualização em transplante renal. Novos agentes imunossupressores. **J. Bras. Nefrol.** J. Bras. Nefrol, São Paulo, v. 19, n. 2, p.215-223, 1997.

ALBRECHT, M. et al. Isolation and cultivation of human testicular peritubular cells: a new model for the investigation of fibrotic processes in the human testis and male infertility. **J Clin Endocrinol Metab**, Washington, v. 91, n. 5, p.1956-1960, 2006.

ALIABADI, A.; COCHRANE, A. B.; ZUCKERMANN, A. O. Current strategies and future trends in immunosuppression after heart transplantation. **Current Opinion In Organ Transplantation**, Philadelphia, v. 17, n. 5, p.540-545, 2012.

ANDRADE, A. et al. **Animais de laboratório criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002.

ANDREOLLO, N. A. et al. Idade dos ratos versus idade humana: qual a relação? **Abcd Arq Bras Cir Dig**, São Paulo, v. 25, n. 1, p.49-51, 2012.

APURI, S. et al. Tacrolimus Associated Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome – A Case Series and Review. **Mediterr J Hematol Infect Dis**, Pavia, v. 6, n. 1, p.169-177, 2 jan. 2014.

ARENAS, M. I.; BETHENCOURT, F. R.; FRAILE, B. Immunocytochemical and quantitative study of the tunica albuginea testis in young and ageing men. **Histochem Cell Biol**, Berlin, v. 10, n. 6, p.469-477, jun. 1997.

ARAUJO, B. M. **Morfometria testicular em ratos wistar adultos tratados com paracetamol (Acetaminofeno)**. 2008. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

ASTELLAS PHARMA US. Prograf. Deerfield. **Prograf package insert**. 2005.

ATCHESON, B. A. et al. Mycophenolic acid pharmacokinetics and related outcomes early after renal transplant. **British Journal Of Clinical Pharmacology**, Hoboken, v. 59, n. 3, p.271-280, mar. 2005.

BITGUL, G. et al. Protective Effects of Resveratrol against Chronic Immobilization Stress on Testis. **Isrn Urology**, Cairo, v. 2013, p.1-10, 2013.

BOOBES, J.; KRAUSE, W.. Azoospermia in a renal transplant recipient during sirolimus (rapamycin) treatment. **Andrologia**, Berlin, v. 35, n. 5, p.198-199, out. 2007.

BOOBES, Y. et al. Gonadal dysfunction and infertility in kidney transplant patients receiving sirolimus. **Int Urol Nephrol**, Amsterdam, v. 42, n. 2, p.493-498, jun. 2010.

CANEGUIM, B. H. **Apoptose nas células mioides peritubulares: uma possível relação com as alterações do epitélio seminífero em ratos imunossuprimidos com tacrolimus (FK506)**. 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Programa de Pós-graduação em Morfologia, Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 2008.

CANEGUIM, B. H. et al. Structural alterations in the seminiferous tubules of rats treated with immunosuppressor tacrolimus. **Reprod Biol Endocrinol**, Bethesda, v. 7, n. 1, p.19-28, 2009.

CANEGUIM, B. H. et al. Immunosuppressant Prograf® (Tacrolimus) Induces Histopathological Disorders in the Peritubular Tissue of Rat Testes. **Cells Tissues Organs**, Basel, v. 194, n. 5, p.421-430, 2011.

CANTAROVICH, M. et al. Mycophenolate monitoring in liver, thoracic, pancreas, and small bowel transplantation: a consensus report. **Transplantation Reviews**, Orlando, v. 25, n. 2, p.65-77, abr. 2011.

CHEN, Y. et al. Long-Term Impact of Immunosuppressants at Therapeutic Doses on Male Reproductive System in Unilateral Nephrectomized Rats: A Comparative Study. **Biomed Research International**, New York, v. 2013, p.1-9, 2013.

COLLETA H. H. M. D.; CARVALHO H. F. Células de Leydig. In: Carvalho HF, Collares-Buzato CB. **Células: uma abordagem multidisciplinar**. Barueri/SP: Manole; 2005.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, Newark, v. 35, n. 4, p.495-516, jun. 2007.

European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. Placebo-Controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. **Lancet**, London, v. 345, n. 8961, p.1321-1325, maio 1995.

FUJIHIRA, S. et al. Origin and pathogenesis of eosinophilic globules in the epididymal ducts in rats treated with cyclosporine A. **Bulletin Of The Osaka Medical College**, Osaka, v. 45, n. 1, p.5-15, 1999.

FUNG, J. J. et al. Adverse Effects Associated With the Use of FK 506. **Transplant Proc**, Amsterdam, v. 23, n. 6, p.3105-3108, 1991.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 3, p.335-343, 2007.

GRUESSNER, A. C. 2011 Update on Pancreas Transplantation: Comprehensive Trend Analysis of 25,000 Cases Followed Up Over the Course of Twenty-Four Years at the International Pancreas Transplant Registry (IPTR). **The Review Of Diabetic Studies**, Duisburg, v. 8, n. 1, p.6-16, 2011.

- GUERRA, G. et al. Randomized Trial of Immunosuppressive Regimens in Renal Transplantation. **Journal Of The American Society Of Nephrology**, Gainesville, v. 22, n. 9, p.1758-1768, 1 ago. 2011.
- HALES, D. B. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. **J Reprod Immunol**, Amsterdam, v. 57 n. 1-2, p.3-18, out. 2002.
- HAIDER, S. G.; TALATI, J.; SERVOS, G. Ultrastructure of peritubular tissue in association with tubular hyalinization in human testis. **Tissue Cell**. 1999 Feb;31(1):90-8., Edinburgh, v. 31, n. 1, p.90-98, fev. 1999.
- HARDINGER, K. L.; BRENNAN, D. C. Novel immunosuppressive agents in kidney transplantation. **World J Transplant**, Pleasanton, v. 3, n. 4, p.68-77, 2013.
- HARTONO, C.; MUTHUKUMAR, T.; SUTHANTHIRAN, S. Immunosuppressive Drug Therapy. **Cold Spring Harb Perspect Med**. Sep 1;3(9):a015487, 2013.
- HEN, Y. et al. Immunosuppression for Membranous Nephropathy: A Systematic Review and Meta-Analysis of 36 Clinical Trials. **Clinical Journal Of The American Society Of Nephrology**, Washington, D.c., v. 8, n. 5, p.787-796, 28 fev. 2013.
- HERMO, L.; LALLI, M.; CLERMONT, Y. Arrangement of connective tissue components in the walls of seminiferous tubules of man and monkey. **Am J Anat**, New York, v. 148, n. 4, p.433-445, abr. 1977.
- KIMELMAN, M.; BRANDACHER, G. Trends in immunosuppression after pancreas transplantation: what is in the pipeline? **Curr Opin Organ Transplant**, Philadelphia, v. 18, n. 1, p.76-82, fev. 2013.
- HAYASHI H.; CEDENHO, A. P. Fertilizing capacity of the cryptorchid rat: 1980 May;59(1):79-82.. **J Reprod Fertil**, Cambridge, v. 59, n. 1, p.79-82, maio 1980.
- HISATOMI, A. et al. Effect of Prograf (FK506) on spermatogenesis in rats. **Toxicology**, Amsterdam, v. 109, n. 2-3, p.75-83, maio 1996.
- HISATOMI, A. et al. Effect of tacrolimus on the cauda epididymis in rats: analysis of epididymal biochemical markers or antioxidant defense enzymes. **Toxicology**. 2008 Jan 14;243(1-2):23-30., Amsterdam, v. 243, n. 1-2, p.23-30, jan. 2008.
- HOPKINS, P. M.; MCNEIL, K. Evidence for immunosuppression in lung transplantation. **Current Opinion In Organ Transplantation**, Philadelphia, v. 13, n. 5, p.477-483, 2008.
- IWASAKI, M.; FUSE, H.; KATAYAMA, T. Histological and endocrinological investigations of cyclosporine effects on the rat testis. **Andrologia**, Berlin, v. 27, n. 3, p.185-189, maio/jun. 1995.
- IWASAKI, M.; FUSE, H.; KATAYAMA, T. The effects of cyclosporin azathioprine and mizoribine on male reproduction in rats. **Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi**, Tóquio, v. 87, n. 1, p.42-49, jan. 1996.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, London, v. 26, n. 4, p.239-257, ago. 1972.

JAMSAI, D.; O'BRYAN, M. K. Mouse models in male fertility research. **Asian Journal Of Andrology**, Beijing, v. 13, n. 1, p.139-151, 8 nov. 2010.

KACZMAREK, I. et al. Sirolimus Impairs Gonadal Function in Heart Transplant Recipients. **Am J Transplant**, Copenhagen, v. 4, n. 7, p.1084-1088, jul. 2004.

KINO, T. et al. K 506, a novel immunosuppressant isolated from Streptomyces. I. Fermentation, isolation and physicochemical and biological characteristics.: **J Antibiot.**, Tokio, v. 40, p.1249-1255, 1987.

KINO, T. et al. K 506, a novel immunosuppressant isolated from Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK 506 in vitro. **J Antibiot.**, Tokio, v. 40, p. 1256-1265, 1987.

LARSON, T.; NUSSENBLATT, R. B.; SEN, H. N. Emerging drugs for uveitis. **Expert Opinion On Emerging Drugs**, London, v. 16, n. 2, p.309-322, jun. 2011.

LAURENCE, L. et al. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12 ed, New York: Mcgraw Hill, 2012.

LEE, Y. et al. Tacrolimus for the treatment of active rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Scand J Rheumatol**, Stockholm, v. 39, n. 4, p.271-278, ago. 2010.

LI, Y. et al. Bisphenol A Exposure Induces Apoptosis and Upregulation of Fas/FasL and Caspase-3 Expression in the Testes of Mice. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 108, n. 2, p.427-436, 4 fev. 2009.

MADAN, V.; GRIFFITHS, C. E. Systemic ciclosporin and tacrolimus in dermatology. **Dermatol Ther**, Copenhagen, v. 20, n. 4, p.239-250, 2007.

MASUDA, H. Ultrastructural study on cytotoxic effects of cyclosporine A in spermiogenesis in rats. **Med Electron Microsc**, Osaka, v. 36, n. 3, p.183-191, set. 2003.

MCKAY, D. B. et al. Reproduction and transplantation: report on the AST Consensus Conference on Reproductive Issues and Transplantation: 2005 Jul;5(7):1592-9. **Am J Transplant**, Copenhagen, v. 5, n. 7, p.1592-1599, jul. 2005.

MIRAGLIA, S. M.; HAYASHI, H. Histomorphometry of immature rat testis.

MISRO, M. M. Effect of cyclosporine on human sperm motility in vitro. **Arch Androl**, New York, v. 43, n. 3, p.215-220, 1999.

MOURA, M.C. Management of autoimmune hepatitis: Focus on pharmacologic treatments beyond corticosteroids. **World Journal Of Hepatology**, Beijing, v. 6, n. 6, p.410-418, 2014.

NAKATANI, T. Heart transplantation. **Circ J**, Kyoto, p.55-60, 2009.

NIESCHLAG. **Andrology - Male Reproductive Health and Dysfunction**. 3. ed. Berlin: Springer, 2009.

NELSON, M. et al. Tacrolimus and mycophenolate mofetil provide effective immunosuppression in rat laryngeal transplantation. **Laryngoscope**, Philadelphia, v. 5, n. 113, p.1308-1315, ago. 2003.

NEVES, S. M. P. et al. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo: Fcf-iq/usp, 2013.

NORBURY, C. J.; HICKSON, I. D. Cellular responses to DNA damage. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, Palo Alto, v. 41, p.367-401, 2001.

NORONHA, I. L. et al. Micofenolato mofetil (MMF) em transplante de órgãos. **J. Bras. Nefrol.**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p.398-406, 1997.

OCHIAI, T. et al. Effect of a new immunosuppressive agent, FK 506, on heterotopic cardiac allotransplantation in the rat. **Transplant Proc**, New York, v. 19, n. 1, p.1284-1286, 1987.

ØSTENSEN, M. et al. Anti-inflammatory and immunosuppressive drugs and reproduction. **Arthritis Res Ther**, London, v. 8, n. 3, p.209-228, 2006.

PERRY, I.; NEUBERGER, J. Immunosuppression: towards a logical approach in liver transplantation. **Clinical And Experimental Immunology**, Bethesda, v. 139, n. 1, p.2-10, jan. 2005.

PORTER, A. G.; JÄNICKE, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death Differ**, London, v. 6, n. 2, p.99-104, fev. 1999.

RATH, T. Tacrolimus in transplant rejection. **Expert Opinion On Pharmacotherapy**, London, v. 14, n. 1, p.115-122, jan. 2013.

Review: could Mycophenolate mofetil cause Infertility? Disponível em: <<http://www.ehealthme.com/ds/mycophenolate+mofetil/infertility>>.

ROCHE. CELLCEPT. **Medication guide**, 1998.

RODRIGUEZ-CERDEIRA, C.; SANCHEZ-BLANCO, E.; MOLARES-VILA, A. Clinical Application of Development of Nonantibiotic Macrolides That Correct Inflammation-Driven Immune Dysfunction in Inflammatory Skin Diseases. **Mediators of Inflammation**, Oxford, v. 2012, p.1-16, 2012.

RODRÍGUEZ-PERÁLVAREZ, M. et al. Tacrolimus Trough Levels, Rejection and Renal Impairment in Liver Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. **American Journal Of Transplantation**, Hoboken, v. 12, n. 10, p.2797-2814, 15 jun. 2012.

RUSSELL, L. D. **Histological and Histopathological Evaluation of the Testis**. Saint Louis: Cache River Pr, 1990.

RUSSEL, L. D.; SAXENA, N.K.; TURNER, T. T. Cytoskeletal involvement in spermiation and sperm transport. **Tissue Cell**, Edinburgh, v. 21, n. 3, p.361-379, 1989.

SÁDABA, B. et al. Treatment with tacrolimus in autoimmune diseases. **Rev Med Univ Navarra**., Pamplona, v. 48, n. 3, p.24-38, 2004.

SHELL, C.; et al. Exploring Human Testicular Peritubular Cells: Identification of Secretory Products and Regulation by Tumor Necrosis Factor- α . **Endocrinology**, Los Angeles, v. 149, n. 4, p.1678-1686, abr. 2008.

SCHREM, H. Mycophenolate mofetil in liver transplantation: A review. **Annals Of Transplantation**, Warsaw, v. 18, p.685-696, 2013.

SEETHALAKSHMI, L. Effect of cyclosporine A on male reproduction in rats: **J Urol**, Baltimore, v. 138, n. 4, p.991-995, out. 1987.

SEETHALAKSHMI, L. Cyclosporine: its effects on testicular function and fertility in the prepubertal rat. **J Androl**, Philadelphia, v. 11, n. 1, p.17-24, jan./fev. 1990.

SHEIKHZADEH, S.; MALEKINEJAD, H.; HOBENAGHI, R. Mycophenolate mofetil alters the antioxidant status in duodenum of rats: Implication for silymarin usage in mycophenolate mofetil-induced gastrointestinal disorders. **Vet Res Forum**, Urmia, v. 2, n. 47, p.77-83, 2013.

SINGH, R. P.; STRATTA, R. J. Advances in immunosuppression for pancreas transplantation. **Curr Opin Organ Transplant**, Philadelphia, v. 13, n. 1, p.79-84, 2008.

SKINNER, M. K.; GRISWOLD, M. D. **Sertoli Cell Biology**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.

SNELL, G.; WESTALL, G. P. Immunosuppression for lung transplantation: evidence to date. **Drugs**, New York, v. 67, n. 11, p.1531-1539, 2007.

SOLLINGER, H. W. et al. RS-61443 – a phase I clinical trial and pilot rescue study. **Transplantation**, Baltimore, v. 53, n. 2, p.428-432, 1992.

SOMMERER, C. et al. New concepts to individualize calcineurin inhibitor therapy in renal allograft recipients. **Saudi J Kidney Dis Transpl**, Riyadh, v. 21, n. 6, p.1030-1037, 2010.

SRINIVAS, M. et al. Effect of cyclosporine on fertility in male rats. **Pediatr Surg Int**, Berlin, v. 13, n. 5-6, p.388-391, jul. 1998.

TANABE, K. Calcineurin inhibitors in renal transplantation: what is the best option? **Drugs**, New York, v. 63, n. 15, p.1535-1548, 2003.

TAI, J. et al. Effect of FK506 on rat Leydig cell function – In vivo and in vitro study. **Metabolism**, Philadelphia, v. 45, n. 5, p.533-537, maio 1994.

TOLOU-GHAMARI, Z. Nephro and neurotoxicity of calcineurin inhibitors and mechanisms of rejections: A review on tacrolimus and cyclosporin in organ transplantation. **Jnp**, Isfahan, v. 1, n. 1, p.23-30, 18 mar. 2012.

TRIANAFILLIDIS, J. Current and emerging drugs for the treatment of inflammatory bowel disease. **Drug Design, Development And Therapy**, Bethesda, p.185-210, abr. 2011.

VAN SANDWIJK, M. S.; BEMELMAN, F. J.; BERGE, I. J. Ten. Immunosuppressive drugs after solid organ transplantation. **Neth J Med**, Haarlem, v. 21, n. 6, p.281-289, 2013.

VILLARROEL, M. C.; HIDALGO, M.; JIMENO, A. Mycophenolate mofetil: An update. **Drugs Today (barc)**, Barcelona, v. 45, n. 7, p.521-532, 2009.

WALLEMACQ, P.; REDING, R. FK506 (tacrolimus), a novel immunosuppressant in organ transplantation: clinical, biomedical, and analytical aspects. **Clin Chem**, Washington, v. 39, n. 11, p.2219-2228, nov. 1993.

WEIN, A. J.; KAVOUSSI, L. R. **Campbell-Walsh Urology**. 10 ed, Philadelphia: Saunders, 2010.

XU, L. G. et al. Effects of different dosages of cyclosporine A on the semen parameters of renal transplant patients. **Zhonghua Nan Ke Xue**, Nanjing, v. 9, n. 9, p.679-680, dez. 2003.

YOON, K. H. Efficacy and Cytokine Modulating Effects of Tacrolimus in Systemic Lupus Erythematosus: A Review. **Journal Of Biomedicine And Biotechnology**, Akron, v. 2010, p.1-4, 2010.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci**, Bethesda, v. 19, p.124-128, jun. 2004.

ZUBER, J. et al. Sirolimus May Reduce Fertility in Male Renal Transplant Recipients. **American Journal Of Transplantation**, Copenhagen, v. 8, n. 7, p.1471-1479, 28 jun. 2008.

ANEXOS

ANEXO 1 – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (UFPR)



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 752

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

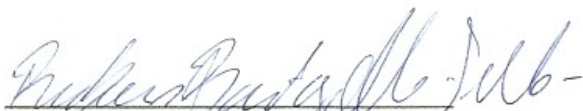
PROCESSO: 23075.049881/2013-11

APROVADO: 19/12/2013 – R.O. 11/2013

TÍTULO: Avaliação da espermatogênese em ratos submetidos à imunossupressão

AUTORES: Rogerio de Fraga, Marcelo Alves Aranha

DEPARTAMENTO: Anatomia


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador da CEUA

ANEXO 2 – TÉCNICA DE COLORAÇÃO HEMATOXILINA EOSINA (H.E.)

A técnica se processa através dos seguintes passos:

1. Desparafinar em xilol durante 10 min.
2. Hidratar em álcool.
3. Imersão em álcool absoluto.
4. Imersão em álcool absoluto.
5. Imersão em álcool 95%.
6. Imersão em álcool 95%.
7. Lavar a lâmina em água corrente durante 3 min. mais ou menos.
8. Corar pela hematoxilina (corante básico) durante 5 min.
9. Lavar a lâmina em água corrente durante 5 min. mais ou menos.
10. Corar, pela eosina (corante ácido) durante 30 segundos.

APÊNDICE 1 – COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS GRUPOS – TESTE *POST HOC*
DE

TUKEY

Tabela 1 – Média de peso dos ratos de acordo com os grupos

GRUPO	GRUPO	p
CONTROLE	SHAM	0,0505
	MICOFENOLATO	0,0016
	TACROLIMUS	0,0599
SHAM	CONTROLE	0,0505
	MICOFENOLATO	0,0329
	TACROLIMUS	0,9190
MICOFENOLATO	CONTROLE	0,0016
	SHAM	0,0329
	TACROLIMUS	0,0497
TACROLIMUS	CONTROLE	0,0599
	SHAM	0,9190
	MICOFENOLATO	0,0497

Tabela 2 – Média do peso testicular de acordo com os grupos

GRUPO	GRUPO	p
CONTROLE	SHAM	0,234
	MICOFENOLATO	0,234
	TACROLIMUS	0,06
SHAM	CONTROLE	0,234
	MICOFENOLATO	0,046
	TACROLIMUS	0,005
MICOFENOLATO	CONTROLE	0,234
	SHAM	0,046
	TACROLIMUS	0,905
TACROLIMUS	CONTROLE	0,06
	SHAM	0,005
	MICOFENOLATO	0,905

Tabela 3 – Média de volume do testículo direito de acordo com os grupos

GRUPO	GRUPO	p
CONTROLE	SHAM	0,994
	MICOFENOLATO	0,138
	TACROLIMUS	0,001
SHAM	CONTROLE	0,994
	MICOFENOLATO	0,083
	TACROLIMUS	0,001
MICOFENOLATO	CONTROLE	0,138
	SHAM	0,083
	TACROLIMUS	0,272
TACROLIMUS	CONTROLE	0,001
	SHAM	0,001
	MICOFENOLATO	0,272

Tabela 4 – Média de volume do testículo esquerdo de acordo com os grupos

GRUPO	GRUPO	p
CONTROLE	SHAM	0,518
	MICOFENOLATO	0,003
	TACROLIMUS	0,000
SHAM	CONTROLE	0,518
	MICOFENOLATO	0,000
	TACROLIMUS	0,000
MICOFENOLATO	CONTROLE	0,003
	SHAM	0,000
	TACROLIMUS	0,661
TACROLIMUS	CONTROLE	0,000
	SHAM	0,000
	MICOFENOLATO	0,661

Tabela 5 – Média da área tubular de acordo com os grupos

GRUPO	GRUPO	P
CONTROLE	SHAM	0,0193
	MICOFENOLATO	0,0000
	TACROLIMUS	0,0000
SHAM	CONTROLE	0,0193
	MICOFENOLATO	0,0000
	TACROLIMUS	0,0000
MICOFENOLATO	CONTROLE	0,0000
	SHAM	0,0000
	TACROLIMUS	0,0000
TACROLIMUS	CONTROLE	0,0000
	SHAM	0,0000
	MICOFENOLATO	0,0000

Tabela 6 – Média de altura do epitélio germinativo de acordo com os grupos

GRUPO	GRUPO	p
CONTROLE	SHAM	0,9616
	MICOFENOLATO	0,0031
	TACROLIMUS	0,0000
SHAM	CONTROLE	0,9616
	MICOFENOLATO	0,0026
	TACROLIMUS	0,0000
MICOFENOLATO	CONTROLE	0,0031
	SHAM	0,0026
	TACROLIMUS	0,0000
TACROLIMUS	CONTROLE	0,0031
	SHAM	0,0000
	MICOFENOLATO	0,0000

Tabela 7 – Média de apoptose celular (em%) de acordo com os grupos

GRUPO	GRUPO	p
CONTROLE	SHAM	0,0000
	MICOFENOLATO	0,0055
	TACROLIMUS	0,0000
SHAM	CONTROLE	0,0000
	MICOFENOLATO	0,0000
	TACROLIMUS	0,0000
MICOFENOLATO	CONTROLE	0,0055
	SHAM	0,0000
	TACROLIMUS	0,0080
TACROLIMUS	CONTROLE	0,0000
	SHAM	0,0000
	MICOFENOLATO	0,0080