

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**TRANSPLANTE SUBCUTÂNEO HOMÓLOGO DE TESTÍCULO EM RATOS**

**ANTÔNIO AZAMBUJA MIRAGEM**

Orientador: Prof. Dr. Edison Capp

Co-orientadora: Profa. Dra. Helena von Eye Corleta

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Porto Alegre, agosto de 2005

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a valiosa colaboração das seguintes pessoas:

Ao meu orientador, Prof<sup>o</sup>. Dr. Edison Capp, pelo incentivo constante, pelas diversas oportunidades de aprendizado que me proporcionou e pela gentileza e disponibilidade em todos os momentos.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Poli Mara Spritzer pela gentil acolhida em seu laboratório, o que proporcionou o aprendizado de diversas técnicas de biologia molecular.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilma Simoni Brum da Silva pelo seu incentivo constante, exemplo profissional, além das diversas oportunidades de aprendizado que me proporcionou e pela gentileza e disponibilidade para responder meus questionamentos.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Flávia Marques Ribeiro, pelo seu incentivo constante, exemplo profissional, além das inúmeras horas de discussões em prol do conhecimento científico e humano.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Beatriz Kohek por compartilhar seus conhecimentos, fundamentais para a realização deste trabalho, bem como a adorável convivência.

Aos colegas de laboratório, em especial a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora Martinho Morsch, Rafael Orcy, Vanderlei Biolchi, Fernando Benetti e todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

A Miriam e Idelma pelo carinho e dedicação com que sempre dedicaram a mim, além de toda a colaboração logística imprescindível para o funcionamento do laboratório

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia pelo agradável convívio e colaboração.

Aos meus amigos, pelo, carinho, apoio, paciência e incentivo sempre demonstrados.

A todos aqueles que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho.

E agradeço principalmente a minha família, meus pais e a Catarina, pelo amor, carinho, apoio e incentivo incondicionais sempre demonstrados.

A todos, muito obrigado.

## SUMÁRIO

Introdução .....	5
1 Embriologia e anatomia do testículo .....	7
1.1 Formação das gônadas indiferenciadas .....	10
1.2 A gônada masculina .....	11
2 Preservação da fertilidade em pacientes oncogênicos .....	14
3 Alteração da função gonadal por quimioterapia e radioterapia .....	18
4 Transplante de testículo .....	21
5 Outros modelos animais.....	23
Objetivos .....	25
Aspectos éticos e de biossegurança .....	26
Referências .....	27
Artigo em inglês.....	34
Artigo em português .....	54

## INTRODUÇÃO

Crianças submetidas a terapias para o tratamento de tumores sofrem comprometimento futuro da função reprodutiva, ou seja, fertilidade, devido á doença ou ao tratamento (Grundy et al., 2001). Com os avanços dos tratamentos para o câncer, tais como, quimioterapia e radioterapia, a taxa de sobrevivência, de crianças com distúrbios oncológicos é cerca de 70 % (Stiller, 1994). Além disso, este grupo de pacientes está aumentando rapidamente a cada ano (Aslam et al., 2000). Infelizmente, a maioria das terapias oncológicas afetam diferentes sistemas orgânicos, incluindo o eixo hipotálamo-hipofise-testículo (Bramswig et al., 1990; Howell e Shalet, 2002).

O objetivo primário do tratamento do câncer é a cura, porém o bem-estar da criança geralmente inclui o futuro reprodutivo. A infertilidade apresenta conseqüências fisiológicas significativas na vida adulta, assim, novas estratégias para a preservação desta função tornou-se o foco de investigação de diferentes áreas profissionais (Grundy et al., 2001; Thomson et al., 2002).

O tecido testicular é particularmente susceptível aos efeitos da radiação e da quimioterapia. Recentemente, os avanços na manutenção da fertilidade têm objetivado a preservação de tecido gonadal para utilização futura. Por exemplo, crianças em estágio pré-puberal, nas quais a criopreservação não é possível, o

tecido testicular pode ser removido e armazenado para ser utilizado em auto-transplante futuramente (Thomson et al., 2002).

Os efeitos adversos do tratamento oncológico geralmente terminam com a vida fértil do paciente ou causam lesões das células germinativas que impedem a reprodução. Pode ocorrer declínio abrupto de androgênios causando sintomas de função sexual reduzida, perda de energia, e ter efeito negativo sobre a massa óssea (Davis e Burger, 1996). As alterações decorrentes de quimioterapia ou radioterapia são desconsideradas face ao argumento que suplementação medicamentosa é feita com facilidade. Contudo, deve-se considerar a baixa aderência a hormônio terapia e o efeito do uso diário da medicação, e seus potenciais efeitos adversos sobre níveis de lipoproteínas, risco de doenças cardíacas, e osteoporose (Eraker et al., 1984).

A viabilidade de transplantes gonadais, foi previamente demonstrado em ovários, onde transplante subcutâneo sem anastomose vascular em ratos, pode preservar funções endócrinas. Esta técnica não apresenta dificuldades, e pode ser usada para preservar a fertilidade ou minimizar os efeitos indesejáveis da ovariectomia perimenopausica (von Eye Corleta et al., 1998). Semelhante ao que foi feito com tecido ovariano, bancos testiculares oferecem uma possibilidade de conservação da fertilidade se o órgão for transplantado com sucesso (Yin et al., 2003).

## 1 EMBRIOLOGIA E ANATOMIA DO TESTÍCULO

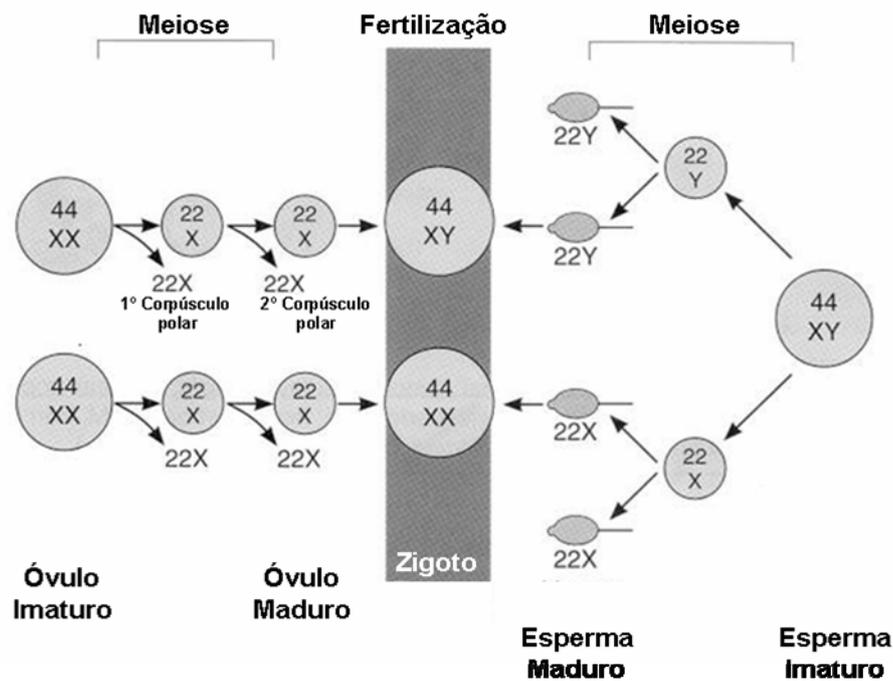
O aparelho reprodutor masculino em mamíferos se desenvolve a partir de um processo embrionário de diferenciação sexual. A diferenciação sexual em mamíferos está amplamente descrita na literatura, e está dividida em 4 estágios (Dubin e Ostrer, 1994): determinação genética do sexo; formação de gônadas bipotenciais ou estruturas neurais; determinação das gônadas; e diferenciação dos ductos sexuais acessórios com genitálias externas.

A determinação gênica sexual, ou seja, se o embrião possui cariótipo XX ou XY, não é suficiente para determinar o desenvolvimento de testículos ou ovários. Neste ponto ocorre um processo de divisão celular, a meiose. Quando isto acontece, a divisão celular de uma célula diplóide ( $2n$ ) dá origem a quatro células haplóides ( $n$ ). Porém, para formar quatro células, ocorrem em duas etapas consecutivas denominadas meiose I e meiose II.

A primeira, também é chamada fase reducional, pois uma célula diplóide ( $2n$ ) dará origem a duas células haplóides ( $n$ ). Enquanto na segunda, chamada divisão equacional, as duas células haplóides ( $n$ ) formadas durante a primeira etapa (meiose I) dão continuidade à divisão, dando origem, cada uma delas, a mais duas células também haplóides ( $n$ ) o que dará, no fim das 2 etapas, um total de quatro células haplóides ( $n$ ).

Assim, a meiose permite que em células de linhagem germinativa, o número de cromossomos seja reduzido à metade nos gametas, o que permite após a fecundação, a formação de um zigoto que mantém o número característico da espécie constante (Griffiths, 2000).

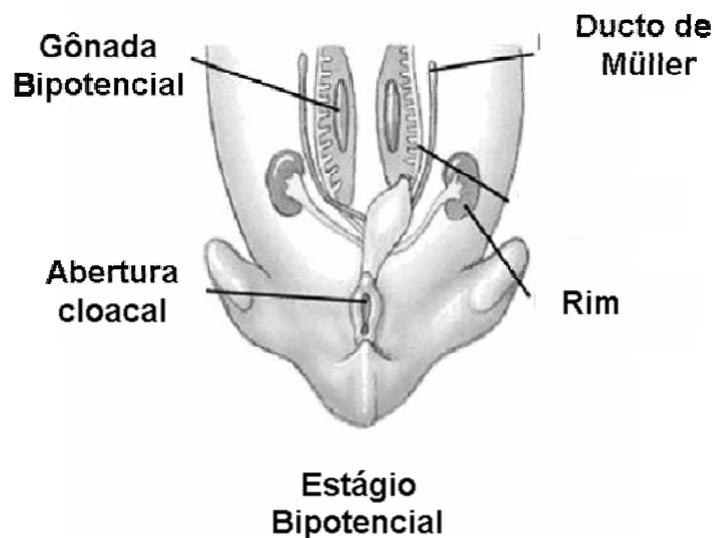
Figura 1 – Determinação genética do sexo (Adaptado de Garcia e Fernandéz: Embriologia, 2ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2001).



Uma vez que os órgãos sexuais são constituídos de gônadas primordiais indiferenciadas e bipotenciais, outros fatores irão conduzir o processo de diferenciação. Ao passo que, estruturas acessórias serão ativadas para que a diferenciação sexual se complete. Estas estruturas são constituídas por ductos

acessórios e genitália externa neutra. Os ductos de Wolff e de Müller (figura 2) irão originar os sistemas genitais internos de machos e fêmeas, respectivamente.

Figura 2 – Ductos de Wolff e Muller (Adaptado de Garcia e Fernández: Embriologia, 2ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2001).



Para que ocorra diferenciação para testículo, as células de Sertoli secretam o hormônio anti-Mülleriano (AMH). Este provoca a regressão dos ductos de Müller, que originariam o sistema interno feminino.

A secreção de testosterona pelas células de Leydig resulta na proliferação dos ductos masculinos, com posterior masculinização da genitália externa. Mas se durante o processo de diferenciação, ocorrer a ausência do AMH, esta se encaminhará para a formação da genitália feminina (Carrillo e Berkovitz, 2004).

Assim, em mamíferos, como em humanos, pode-se considerar que o sexo feminino é o sexo estabelecido, enquanto o sexo masculino é o sexo induzido geneticamente (Freitas, 2001).

### **1.1 Formação das gônadas indiferenciadas**

A localização do gene determinante de testículo está no braço curto do cromossomo Y. Este gene é denominado de SRY (região determinante do sexo do cromossomo Y) (Freitas, 2001). Ele codifica um fator de transcrição que permite a determinação dos testículos em mamíferos. Apresenta um domínio de ligação no DNA (Ácido Desoxirribonucléico) chamado de *HMG box*, por sua homologia com a região de ligação do DNA da família das proteínas HMG (High Mobility Group – Grupo de Alta Mobilidade) (Dubin e Ostrer, 1994).

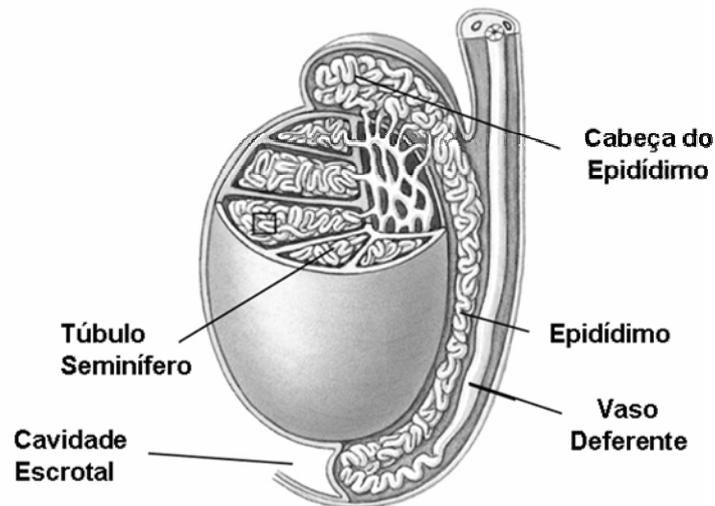
Embora a *HMG box* do gene SRY seja altamente conservada em mamíferos, outras porções do gene não são. Por exemplo, o gene SRY de camundongos contém um domínio de ativação transcricional que não está presente no gene SRY em humanos (Dubin e Ostrer, 1994). Este gene também codifica seqüências que são necessárias para ativações nucleares, fundamentais na transcrição gênica (Carrillo e Berkovitz, 2004; Harley et al., 2003).

## 1.2 A gônada masculina

Anatomicamente os testículos humanos, são órgãos ovóides, localizados na bolsa escrotal, e estão suspensos pelo cordão espermático. Apresentam dimensões e peso similares, com diâmetro longitudinal médio de 4,5 cm, transversal de 3 cm e espessura de 2,5 cm, e em média 12 g de peso.

Cada testículo é coberto por uma túnica, denominada vaginal e encapsulado por uma segunda, denominada albugínea, a qual se invagina na sua porção posterior, de onde partem os septos fibrosos verticais que subdividem cada testículo em aproximadamente 250 a 400 lóbulos. Estes lóbulos convergem seus túbulos para o ápice da pirâmide lobular para formar ductos de calibre maior até chegarem aos ductos eferentes. Estes são entre 10 e 12 canais, destinados ao transporte de espermatozóides até o epidídimo (figura 3).

Figura 3 – Anatomia do testículo (Adaptado de Netter e Vissocky: Atlas de Anatomia Humana, 3ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2003).



No epidídimo ocorre a maturação dos espermatozóides, em um período aproximado de 12 dias. A integridade funcional do epidídimo e o amadurecimento dos gametas dependem diretamente da ação de androgênios produzidos pelas células de Leydig.

O processo de maturação iniciado no epidídimo pode se completar nos canais deferentes, que funcionam como uma bomba transportadora de espermatozóides da cauda do epidídimo até sua porção apolar. Após este processamento, o produto final da ejaculação é um sêmen composto além de espermatozóides maduros, de outras substâncias fornecidas por glândulas acessórias.

As vesículas seminais fornecem aproximadamente 70% do conteúdo ejaculado, tendo como principal substrato frutose. Mas também produzem prostaglandinas e outras substâncias como citrato, sorbitol, inositol e colinesterase.

Já a próstata contribui com 25% do conteúdo ejaculado, serve como esfíncter da uretra e além do ácido cítrico, a secreção prostática contém fosfatase ácida, cátions bivalentes ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ ) e poliaminas (espermina, putrecina, espermidina e transferrina).

As glândulas de Cowper ou bulbouretrais fornecem fração mucosa secretada na ejaculação e as glândulas uretrais, são um conjunto de glândulas ao longo da uretra que fornecem a secreção durante o processo de ereção pré-ejaculatório (Souza, 1991).

## **2 PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE EM PACIENTES ONCOGÊNICOS**

O câncer durante a infância tem apresentando uma incidência elevada. Uma a cada 600 crianças irá desenvolver câncer antes de completar 15 anos de vida (Hawkins e Stevens, 1996).

Avanços no campo da terapia continuada para tratamento tumores malignos na infância permitem, para a maioria das crianças, realmente uma sobrevida a longo-prazo. Na década de 90, um em cada 1000 adultos na faixa etária dos 20 aos 30 anos, desenvolveu câncer infantil. Como a taxa de sobrevivência está excedendo 70 %, estima-se que em 2010, um a cada 250 adultos da população seja um sobrevivente de câncer infantil (Bleyer, 1990).

O sucesso do tratamento do câncer infantil com quimioterapia ou radioterapia está associado a uma significativa morbidade em fases tardias da vida. Dos traumas encontrados na vida adulta, decorrente do tratamento para câncer infantil, a infertilidade é o mais freqüente (Bleyer, 1990; Wallace et al., 2001).

Na vida adulta, após a cura de um câncer, a infertilidade torna-se um problema. Por definição, infertilidade é a incapacidade completa, tanto masculina quanto feminina, de contribuir biologicamente para uma gestação pelo período de um ano ou mais (Pflieger-Bruss et al., 2004).

A perspectiva de sobrevivência e cura para pacientes jovens de câncer continua aumentando, e a proteção de sua fertilidade deve também ser considerada de alta prioridade (Apperley e Reddy, 1995; Blumenfeld e Haim, 1997; Gosden e Nagano, 2002). Estudos demonstram que a utilização de técnicas para a extração de esperma para a obtenção de células germinativas haplóides antes das terapias citotóxicas de pacientes com câncer torna-se cada vez mais usual (Schrader et al., 2003).

Nos últimos anos, a preservação da fertilidade está evoluindo rapidamente, como resultado de avanços clínicos e tecnológicos. Do ponto de vista biológico, cada indivíduo deve sobreviver e manter-se fértil por um longo período, suficiente para constituir uma família e passar seus genes. As gônadas são os órgãos mais importantes para este fim (Gosden e Nagano, 2002).

Como decorrência do aumento da expectativa de vida de pacientes oncológicos, a preservação do potencial progenitor dos pacientes infantis e o estoque de tecido testicular pré-puberal é atualmente uma solução potencial emergente (Aslam et al., 2000; Bahadur, 2000; Bahadur e Hindmarsh, 2000; Hovatta, 2000; Hovatta, 2001; Schlatt et al., 1999).

Após a cura ou neutralização da doença, o tecido estocado pode teoricamente ser transplantado (Schlatt et al., 1999), xenotransplantado (Honaramooz et al., 2002) ou cultivado *in vitro* (Nagano et al., 1998). Não obstante, o transplante de células indiferenciadas testiculares tem promovido resultados promissores em modelos animais. Também, do ponto de vista ético, o transplante homólogo de células testiculares pode ser mais aceitável do que as estratégias de

xenotransplante (Frederickx et al., 2004; Goossens et al., 2003; Tournaye et al., 2004).

Mesmo com avançados recursos tecnológicos, alguns tipos de células apresentam muita dificuldade para a criopreservação. Nas últimas décadas, conseguiram-se muitos avanços na preservação de espermatozóides de camundongo, embriões de drosófila e óvulos humanos. Porém, a criopreservação de sêmen não está automaticamente efetivada. Atribui-se esta dificuldade parcialmente a razões técnicas, mas também à heterogeneidade da espécie humana.

Para pacientes oncológicos adultos, um “banco de sêmen” é bem aceito como estratégia preventiva para a preservação da fertilidade, porém, o mesmo pode não ser verdadeiro para pacientes adolescentes. Evidências sugerem que pacientes adolescentes, com idade entre 14 e 17 anos, são candidatos para “bancos de sêmen” e que sujeitos com idade superior a 19 anos mais de 80% pode produzir sêmen para criopreservação (Bahadur e Hindmarsh, 2000; Kliesch et al., 1996). Já, outro estudo realizado a partir de uma retrospectiva de 231 pacientes de câncer jovens, mostrou que a metade produziu amostra de sêmen sub-fértil ( $< 10^7$  espermatozóides móveis por ejaculação), e 17 % não produziu espermatozóides suficientes para o armazenamento congelado (Lass et al., 1998).

Um estudo realizado com 45 adolescentes mostrou que 20 (44,5 %), não foram aptos a ejaculação por não estarem maturados o suficiente para disponibilizar amostra de sêmen por masturbação. Existem outros métodos alternativos para a coleta de sêmen, como por exemplo, vibro-estimulação peniana ou eletro-ejaculação, ambos realizados sob anestesia geral (Muller et al., 2000; Schmiegelow

et al., 1998). Contudo, estes métodos apresentam possíveis riscos decorrentes da condição sob anestesia.

A preservação da fertilidade está em destaque não somente por sua relevância clínica, mas também pelo impacto psicológico causado pela destruição do aparelho reprodutor. Isto acaba não permitindo a continuação do desenvolvimento natural dos seres vivos, que consiste em: nascer, crescer e se reproduzir.

### **3 ALTERAÇÃO DA FUNÇÃO GONADAL POR QUIMIOTERAPIA E RADIOTERAPIA**

Os testículos são altamente suscetíveis aos efeitos tóxicos das terapias para o câncer em todas as faixas etárias da vida. Embora o exato mecanismo seja incerto, aparentemente envolve a combinação de destruição da proliferação de células germinativas com a inibição de futuras diferenciações das células sobreviventes (Kangasniemi et al., 1996).

A quimioterapia e a radioterapia podem destruir tecido gonadal e resultar em esterilidade parcial ou permanente. Já está estabelecido que terapias contra o câncer prejudicam o desenvolvimento gonadal em crianças (Thomson et al., 2002). Entretanto, o impacto apresenta-se de forma latente na infância, se manifestando na forma de infertilidade na vida adulta (Howell e Shalet, 2001; Howell e Shalet, 2002; Wallace et al., 1989).

Quimioterapia citotóxica é uma das terapias mais comuns para o tratamento de tumores malignos. Esta terapia aumenta as chances, a longo prazo, de regressão e cura de pacientes com tumores de células germinativas testiculares e linfomas malignos. Dependendo do estágio clínico e do perfil do fator de risco, alguns destes pacientes apresentam a taxa de cura aumentada para 80 % a 90 % (Larson, 2000; Schmoll et al., 2004).

Os efeitos adversos da radioterapia são semelhantes aos da quimioterapia, prejudicando de forma direta as estruturas do sistema reprodutor e também levando a infertilidade. As possíveis causas para os efeitos adversos do tratamento, discutidos na literatura, incluem diversos parâmetros responsáveis por desordens severas de fertilidade, por exemplo, altos níveis plasmáticos de interleucina-1, interleucina-6 e gonadotrofina coriônica humana- $\beta$  (Schrader et al., 2003; Schrader et al., 2001).

O grau e duração dos prejuízos testiculares induzidos pela radioterapia dependem da área da aplicação do tratamento, e do planejamento das doses, tanto totais quanto fracionadas da aplicação (Howell e Shalet, 1998; Thomson et al., 2002). Por exemplo, baixas doses de irradiação (1,0 – 1,2 Gy), prejudicam a morfologia celular da espermatogônia, resultando em oligospermia (Thomson et al., 2002). Os efeitos decorrentes de aplicação única podem ser detectados durante 5 anos após a aplicação. O epitélio germinativo parece ser muito suscetível a qualquer dosagem de irradiação, freqüentemente apresentando azoospermia permanente. Já as células de Leydig são mais resistentes aos danos causados por esta terapia, pois na puberdade apresenta potencial celular preservado. A irradiação testicular, com doses elevadas (20 Gy), está associada a disfunções das células de Leydig em meninos pré-púberes, enquanto as mesmas células se mantêm preservadas em adultos sexualmente maduros, quando ocorre o acréscimo de até 50% destas doses (30 Gy) (Shalet et al., 1989; Thomson et al., 2002).

Na prática, o tratamento radioterápico com fracionamento da irradiação corporal total acima de 14,4 Gy é suficiente para tornar homens estéreis

permanentemente. Desta forma, a administração de altas doses resulta além de esterilidade, prejuízo na produção de androgênios, que estão relacionados com outras funções orgânicas e não somente com a reprodução.

A tabela 1 mostra a relação entre os locais de aplicação durante o tratamento, e seus conseqüentes efeitos, expressando as faixas de valores de irradiação necessários para o desenvolvimento de tais prejuízos.

Tabela 1. Prejuízo causado ao trato reprodutivo, induzido por aplicações de radioterapia em diferentes partes do corpo (Modificado de Thomson *et al.*, 2002).

<b>Local</b>	<b>Efeitos</b>
Crânio e Irradiação corporal total	Destruição do eixo endócrino
Pelve, Testículos e Irradiação corporal total	Células de Leydig > 20 Gy – pré-puberdade > 30 Gy – pós-pberdade
	Epitélio germinativo 1,0 – 1,1 Gy – oligospermia > 1,2 Gy – azoospermia

#### 4 TRANSPLANTE DE TESTÍCULO

Em diferentes situações o transplante de testículo pode ser uma alternativa efetiva para a manutenção da fertilidade, quando a aplicação de terapias agressivas torna-se inevitável. Para muitos homens que possuem diagnóstico para câncer, o sucesso do tratamento com estratégias tóxicas para o sistema reprodutor, tem feito da infertilidade um importante problema. Nos Estados Unidos, cerca de 17000 homens entre 15 e 45 anos são diagnosticados por anos com doença de Hodgkin, linfoma, sarcoma ósseo ou de tecidos moles, câncer testicular e leucemia. Destes homens, mais de 3000 são tratados com terapias, das quais suas doses são suficiente para induzir um quadro de azoospermia prolongado (Shetty e Meistrich, 2005).

Diferentes estudos, apontam que no câncer testicular a taxa de oligospermia encontra-se superior a 50 % antes do início do tratamento (Hendry et al., 1983; Meiorow e Schenker, 1995). Várias causas são sugeridas, primeiramente a alteração patológica local, com 24 a 60 % dos casos demonstrando fibrose dos túbulos seminíferos, células de Sertoli em apenas 8 % e carcinoma *in situ* em 5 a 8 %. Dentre os efeitos localizados do tumor, incluem o aumento da temperatura escrotal, alterações no fluxo sanguíneo testicular. Contudo, a reposição testicular, a partir de um órgão íntegro, possibilitaria a redução destas conseqüências adversas (Bramswig et al., 1990; Howell e Shalet, 2002).

Para realização de um transplante, o tecido implantado necessita de condições adequadas para sua adaptação ao novo meio. Em muitos casos, faz-se necessárias adaptações orgânicas para que haja um ambiente adequado para sua permanência (Frederickx et al., 2004). Yin e colaboradores (2003) realizaram transplantes de testículo com anastomose vascular, na bolsa escrotal, onde todos os testículos atrofiaram 6 semana após a cirurgia, além de peso testicular e níveis de testosterona abaixo dos valores controle (Yin et al., 2003). Testículos também podem ser transplantados sem anastomose vascular, mantendo atividade funcional, tanto em iso-transplantes, quanto em xenotransplantes (Carreau et al., 2003).

## **5 OUTROS MODELOS ANIMAIS**

Os testículos de mamíferos em geral, assim como, nos humanos, são complexos órgãos caracterizados por duas funções principais: síntese de hormônios esteróides e espermatogênese. Está bem estabelecido que desenvolvimento testicular normal e a manutenção da espermatogênese são controlados pelas gonadotrofinas e pela testosterona, enquanto seus efeitos são modulados por fatores produzidos localmente (Carreau et al., 2003).

Os primeiros ensaios em criobiologia reprodutiva iniciaram na década de 50, com a descoberta que o glicerol poderia preservar espermatozóides de galo e búfalo durante o processo de armazenamento e descongelamento (Amorim et al., 2003)

Foram descritos modelos de transplantes homólogos e autólogos em bovinos. Os animais foram submetidos a sessões de radioterapia para tratamento de tumor testicular. As células germinativas foram preservadas e posteriormente re-implantadas utilizando solução de contraste para ultra-som, apresentando resultados favoráveis (Izadyar et al., 2003)

Modelos semelhantes a estes estão descritos na literatura para diversas espécies animais. Em camundongos, submetidos à irradiação durante o período de um mês, células testiculares foram preservadas e posteriormente transplantadas para a preservação da fertilidade e função endócrina (Creemers et al., 2002).

Em ratos também foram desenvolvidos modelos de transplante de gônadas intactas com a realização de anastomose vascular, onde foram demonstrados efeitos da criopreservação. Foram encontrados, decorrentes do transplante, o quadro de trombose em alguns casos, e níveis hormonais séricos abaixo dos níveis do grupo controle (Frederickx et al., 2004; Yin et al., 2003).

Cães foram submetidos a autotransplante homólogo, após tratamento com quimioterápicos associados. Foi administrado ciclosporina-A associada prednisona. Estes experimentos demonstraram que além da sobrevivência, em longo prazo pode ser viável a manutenção de células germinativas com o uso associado destas drogas (Barten et al., 1997).

Existem diversos modelos que demonstram a aplicabilidade desta técnica. Assim, um melhor entendimento dos mecanismos que inviabilizam o sistema reprodutor, quando submetido a terapias agressivas contra o câncer, faz-se necessário para a preservação da fertilidade nos seres vivos.

## **OBJETIVOS**

Verificar a capacidade de secreção de testosterona de testículos transplantados em fatias e em gônada inteira sem anastomose.

Verificar a viabilidade do tecido testicular transplantado.

Verificar se a resposta a estímulo sexual é preservada após autotransplante do testículo.

## **ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA**

Este trabalho foi realizado de acordo com as recomendações das Normas Internacionais de Proteção aos Animais (Hoff, 1980), e do Código Brasileiro de Experimentação Animal - 1988, concordando com o Guia de Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório do *National Institutes of Health* (NIH). Foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS. Os animais foram mortos por deslocamento cervical, tendo sido observados cuidados éticos para minimizar riscos e sofrimentos dos animais.

Cálculo do tamanho da amostra foi realizado para utilização do menor número possível de animais. Após a obtenção dos tecidos destinados para exames histológicos as carcaças dos animais foram armazenadas a -20°C e posteriormente foram retiradas pela coleta seletiva do Departamento Municipal de Limpeza Urbana.

## REFERÊNCIAS

- Amorim CA, Goncalves PB, et al. (2003). Cryopreservation of oocytes from pre-antral follicles. *Hum Reprod Update*, 9 (2): 119-29.
- Apperley JF e Reddy N (1995). Mechanism and management of treatment-related gonadal failure in recipients of high dose chemoradiotherapy. *Blood Rev*, 9 (2): 93-116.
- Aslam I, Fishel S, et al. (2000). Fertility preservation of boys undergoing anti-cancer therapy: a review of the existing situation and prospects for the future. *Hum Reprod*, 15 (10): 2154-9.
- Bahadur G (2000). Fertility issues for cancer patients. *Mol Cell Endocrinol*, 169 (1-2): 117-22.
- Bahadur G e Hindmarsh P (2000). Age definitions, childhood and adolescent cancers in relation to reproductive issues. *Hum Reprod*, 15 (1): 227.
- Barten EJ, Garybian H, et al. (1997). Homologous testis transplantation in dogs. *Transpl Int*, 10 (5): 362-8.
- Bleyer WA (1990). The impact of childhood cancer on the United States and the world. *CA Cancer J Clin*, 40 (6): 355-67.
- Blumenfeld Z e Haim N (1997). Prevention of gonadal damage during cytotoxic therapy. *Ann Med*, 29 (3): 199-206.
- Bramswig JH, Heimes U, et al. (1990). The effects of different cumulative doses of chemotherapy on testicular function. Results in 75 patients treated for Hodgkin's disease during childhood or adolescence. *Cancer*, 65 (6): 1298-302.

- Breigeiron MK, Morris M, et al. (2002). Effects of angiotensin II microinjected into medial amygdala on male sexual behavior in rats. *Horm Behav*, 41 (3): 267-74.
- Carreau S, Lambard S, et al. (2003). Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. *Reprod Biol Endocrinol*, 1 (1): 35.
- Carrillo AA e Berkovitz GD (2004). Genetic mechanisms that regulate testis determination. *Rev Endocr Metab Disord*, 5 (1): 77-82.
- Creemers LB, Meng X, et al. (2002). Transplantation of germ cells from glial cell line-derived neurotrophic factor-overexpressing mice to host testes depleted of endogenous spermatogenesis by fractionated irradiation. *Biol Reprod*, 66 (6): 1579-84.
- Davis SR e Burger HG (1996). Clinical review 82: Androgens and the postmenopausal woman. *J Clin Endocrinol Metab*, 81 (8): 2759-63.
- Dubin RA e Ostrer H (1994). Sry is a transcriptional activator. *Mol Endocrinol*, 8 (9): 1182-92.
- Eraker SA, Kirscht JP, et al. (1984). Understanding and improving patient compliance. *Ann Intern Med*, 100 (2): 258-68.
- Frederickx V, Michiels A, et al. (2004). Recovery, survival and functional evaluation by transplantation of frozen-thawed mouse germ cells. *Hum Reprod*, 19 (4): 948-53.
- Freitas FS, C. A. B.; Wender, M. C. O.; Salazar, C. (2001). Diferenciação Sexual. *Rotinas em Ginecologia*. Sul AM. Porto Alegre: 496.
- Goossens E, Frederickx V, et al. (2003). Reproductive capacity of sperm obtained after germ cell transplantation in a mouse model. *Hum Reprod*, 18 (9): 1874-80.

- Gosden R e Nagano M (2002). Preservation of fertility in nature and ART. *Reproduction*, 123 (1): 3-11.
- Grundy R, Gosden RG, et al. (2001). Fertility preservation for children treated for cancer (1): scientific advances and research dilemmas. *Arch Dis Child*, 84 (4): 355-9.
- Harley VR, Layfield S, et al. (2003). Defective importin beta recognition and nuclear import of the sex-determining factor SRY are associated with XY sex-reversing mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (12): 7045-50.
- Hawkins MM e Stevens MC (1996). The long-term survivors. *Br Med Bull*, 52 (4): 898-923.
- Hendry WF, Stedronska J, et al. (1983). Semen analysis in testicular cancer and Hodgkin's disease: pre- and post-treatment findings and implications for cryopreservation. *Br J Urol*, 55 (6): 769-73.
- Hoff C (1980). Sounding board. Immoral and moral uses of animals. *N Engl J Med*, 302 (2): 115-8.
- Honaramooz A, Snedaker A, et al. (2002). Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature*, 418 (6899): 778-81.
- Hovatta O (2000). Cryopreservation of testicular tissue. *Mol Cell Endocrinol*, 169 (1-2): 113-5.
- Hovatta O (2001). Cryopreservation of testicular tissue in young cancer patients. *Hum Reprod Update*, 7 (4): 378-83.
- Hovatta O (2003). Cryobiology of ovarian and testicular tissue. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 17 (2): 331-42.
- Howell S e Shalet S (1998). Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 27 (4): 927-43.

- Howell SJ e Shalet SM (2001). Testicular function following chemotherapy. *Hum Reprod Update*, 7 (4): 363-9.
- Howell SJ e Shalet SM (2002). Effect of cancer therapy on pituitary-testicular axis. *Int J Androl*, 25 (5): 269-76.
- Izadyar F, Den Ouden K, et al. (2003). Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. *Reproduction*, 126 (6): 765-74.
- Kangasniemi M, Huhtaniemi I, et al. (1996). Failure of spermatogenesis to recover despite the presence of a spermatogonia in the irradiated LBNF1 rat. *Biol Reprod*, 54 (6): 1200-8.
- Kliesch S, Behre HM, et al. (1996). Cryopreservation of semen from adolescent patients with malignancies. *Med Pediatr Oncol*, 26 (1): 20-7.
- Larson RA (2000). Myeloid leukemia after cytotoxic therapy and other hematotoxins. *J Toxicol Environ Health A*, 61 (5-6): 381-6.
- Lass A, Akagbosu F, et al. (1998). A programme of semen cryopreservation for patients with malignant disease in a tertiary infertility centre: lessons from 8 years' experience. *Hum Reprod*, 13 (11): 3256-61.
- Lima AP, Lunardi LO, et al. (2000). Effects of castration and testosterone replacement on peritoneal histamine concentration and lung histamine concentration in pubertal male rats. *J Endocrinol*, 167 (1): 71-5.
- Meirow D e Schenker JG (1995). Cancer and male infertility. *Hum Reprod*, 10 (8): 2017-22.
- Muller J, Sonksen J, et al. (2000). Cryopreservation of semen from pubertal boys with cancer. *Med Pediatr Oncol*, 34 (3): 191-4.
- Nagano M, Avarbock MR, et al. (1998). Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue Cell*, 30 (4): 389-97.

- Nugent D, Meirrow D, et al. (1997). Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. *Hum Reprod Update*, 3 (3): 267-80.
- Okoye BO, Spooner D, et al. (2002). Radioprotective reverse orchidopexy. *J Pediatr Surg*, 37 (2): 236-9.
- Orwig KE e Schlatt S (2005). Cryopreservation and transplantation of spermatogonia and testicular tissue for preservation of male fertility. *J Natl Cancer Inst Monogr* (34): 51-6.
- Padoin MJ e Lucion AB (1995). The effect of testosterone and DOI (1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane) on male sexual behavior of rats. *Eur J Pharmacol*, 277 (1): 1-6.
- Pflieger-Bruss S, Schuppe HC, et al. (2004). The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals. *Andrologia*, 36 (6): 337-45.
- Rasia-Filho AA e Lucion AB (1996). Effects of 8-OH-DPAT on sexual behavior of male rats castrated at different ages. *Horm Behav*, 30 (3): 251-8.
- Res U, Res P, et al. (2000). Birth after treatment of a male with seminoma and azoospermia with cryopreserved-thawed testicular tissue. *Hum Reprod*, 15 (4): 861-4.
- Schlatt S, Rosiepen G, et al. (1999). Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes. *Hum Reprod*, 14 (1): 144-50.
- Schmiegelow ML, Sommer P, et al. (1998). Penile vibratory stimulation and electroejaculation before anticancer therapy in two pubertal boys. *J Pediatr Hematol Oncol*, 20 (5): 429-30.
- Schmoll HJ, Souchon R, et al. (2004). European consensus on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG). *Ann Oncol*, 15 (9): 1377-99.

- Schrader M, Muller M, et al. (2003). "Onco-tese": testicular sperm extraction in azoospermic cancer patients before chemotherapy-new guidelines? *Urology*, 61 (2): 421-5.
- Schrader M, Muller M, et al. (2001). The impact of chemotherapy on male fertility: a survey of the biologic basis and clinical aspects. *Reprod Toxicol*, 15 (6): 611-7.
- Shalet SM, Tsatsoulis A, et al. (1989). Vulnerability of the human Leydig cell to radiation damage is dependent upon age. *J Endocrinol*, 120 (1): 161-5.
- Shetty G e Meistrich ML (2005). Hormonal approaches to preservation and restoration of male fertility after cancer treatment. *J Natl Cancer Inst Monogr* (34): 36-9.
- Souza WLMG, S. A. P. (1991). Fator Masculino. *Esterilidade Conjugal*. Ltda LR. São Paulo: 434.
- Stiller CA (1994). Population based survival rates for childhood cancer in Britain, 1980-91. *Bmj*, 309 (6969): 1612-6.
- Thomson AB, Critchley HO, et al. (2002). Late reproductive sequelae following treatment of childhood cancer and options for fertility preservation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 16 (2): 311-34.
- Tournaye H, Goossens E, et al. (2004). Preserving the reproductive potential of men and boys with cancer: current concepts and future prospects. *Hum Reprod Update*, 10 (6): 525-32.
- von Eye Corleta H, Corleta O, et al. (1998). Subcutaneous autologous ovarian transplantation in Wistar rats maintains hormone secretion. *Fertil Steril*, 70 (1): 16-9.
- Wallace WH, Blacklay A, et al. (2001). Developing strategies for long term follow up of survivors of childhood cancer. *Bmj*, 323 (7307): 271-4.

Wallace WH, Shalet SM, et al. (1989). Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood: the radiosensitivity of the human oocyte. *Br J Radiol*, 62 (743): 995-8.

Yin H, Wang X, et al. (2003). Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype. *Hum Reprod*, 18 (6): 1165-72.

**Artigo em inglês**

## SUBCUTANEOUS AUTOLOGOUS TESTICLE TRANSPLANTATION IN WISTAR RATS

Miragem AA<sup>1</sup>, Silva Neto B<sup>2</sup>, Reche M<sup>3</sup>, Kliemann LM<sup>4</sup>, Corleta HvE<sup>2,3,5</sup>, Capp E<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde; <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>3</sup>Depto. de Ginecologia e Obstetrícia, e <sup>4</sup>Depto. de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>5</sup>Núcleo Gerar de Reprodução Assistida, Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, RS, Brasil

Endereço para correspondência:

Edison Capp

Rua Dr. Barros Cassal, 411/22

CEP 90035 003 - Porto Alegre, RS

edcapp@ufrgs.br

FAX: (051) 3311 6588

## Abstract

The testicular tissue is particularly susceptible to the effects of radiation and chemotherapy. Recently, advances in maintaining fertility have focused in preserving gonadal tissue for future use. In this study, we performed autotransplantation of total and sliced testicles without anastomosis in Wistar rats. Hormone secretion capacity and viability of the transplanted testicle were assessed by serum testosterone levels and analysis of the effects on sexual behavior.

**Methods:** sixteen male Wistar rats (240g – 280g) approximately 60 days of age were used in this study. The rats were randomly divided into 4 groups: sham (group I, n = 4), bilateral orchidectomy (group II, n = 4), testicle autotransplantation group (group IV, n = 4), testicle slices autotransplantation group (group III, n = 4). Sexual behavior (genital sniffing, thrusting intromissions, mounts with pelvic thrusting frequencies), serum testosterone levels, body weight were assessed eight weeks after procedures.

**Results:** subcutaneous autotransplantation elicited an increase in the number of mounts ( $P < 0.007$ ) and intromissions ( $P < 0.009$ ) and a significant reduction in the latency to these two behaviors ( $P < 0.034$ ) compared to animals castrated. The frequency of sniffing the body of sexually receptive females was not affected by castration ( $P = 0.326$ ). Serum testosterone in the subcutaneous transplant (total and sliced) group presented a higher plasma testosterone concentration compared to castrated group (0.039 [0.033 – 0.141], 0.041 [0.032 - 0.047], 0.026 [0.024 - 0.028], respectively;  $P < 0.05$ ). Data from this study showed that testicles transplanted without vascular anastomosis maintain

their hormone secretion and exert neuroendocrine function in sexual behavior in rats. Autotransplantation could be an important alternative for patients considering prophylactic orchidectomy.

**Keywords:** testicular transplantation, fertility, testis

## Introduction

Children treated for cancer may have future fertility compromised by their disease or its treatment (Grundy et al., 2001). In modern cancer approaches with radiation and chemotherapy, about 70% of children with oncological diseases survive their malignancies (Stiller, 1994). Moreover, this group of survivors is expanding very rapidly each year (Aslam et al., 2000). Unfortunately, most oncological therapies affect different organ systems including the hypothalamic-pituitary-testicular axis (Bramswig et al., 1990; Howell e Shalet, 2002).

The primary objective of treating cancer is cure, however child's overall wellbeing, may include future fertility. Infertility may have significant psychological consequences in adulthood, and new strategies to preserve it are challenges to professionals of different disciplines (Grundy et al., 2001; Thomson et al., 2002).

The testicular tissue is particularly susceptible to the effects of radiation and chemotherapy. Recently, advances in maintaining fertility have focused in preserving gonadal tissue for future use. For example, in pre-pubertal boys in which cryopreservation is not a possibility, testicular tissue may be removed and stored and autotransplanted in a later date (Thomson et al., 2002).

Previously, it was demonstrated that ovaries transplanted subcutaneously without vascular anastomosis in rats may preserve endocrine functions. This technique is not difficult and could be used to preserve fertility or to minimize the undesired effects of perimenopausal oophorectomy (von Eye Corleta et al., 1998).

Similar to ovary tissue, testicular banking offers a possibility of fertility conservation if the organ can be successfully transplanted (Yin et al., 2003).

In this study, we performed autotransplantation of total and sliced testicles without anastomosis in Wistar rats. Hormone secretion capacity and viability of the transplanted testicle were assessed by serum testosterone levels and analysis of the effects on sexual behavior.

## **Materials and Methods**

Sixteen male Wistar rats (240g – 280g) approximately 60 days of age were used in this study. The procedures were performed under anesthesia with ether. During the period after the surgery and before the test, the animals were housed individually in 60 X 50 X 30-cm cage and maintained on a 12:12 light:dark cycle. The temperature was kept at 22°C and the animals had free access to food and water.

The sample size of 4 rats in each group was determined according to the paper of Lima, Lunardi et al. (Lima et al., 2000) considering a sample power of 80%, and  $p < 0,05$ , using the software Pepi 3.0.

The rats were randomly divided into 4 groups. In the sham group (group I, n = 4), a sham operation was done, which consisted of opening of the scrotum and visualization of the testicles. In the orchidectomy group (group II, n = 4), bilateral orchidectomy was performed. In the testicle autotransplantation group (group IV, n

= 4), bilateral orchidectomy was done and one testicle was autotransplanted. Briefly, a 1 cm incision was made dorsally and the subcutaneous tissue was divulged in a small bag (0.5 cm<sup>2</sup>) to receive the graft. No medium was transplanted into the pockets with the grafts. In the testicle slices autotransplantation group (group III, n = 4), the procedure was the same as in group IV, but before the testicle was placed in the dorsal subcutaneous pocket, they were cut in transverse slices approximately 3 mm thick.

After surgery, the animals were observed daily and showed no signs of local irritation or abnormal behavior.

Eight weeks after the operation, sexual behavior was recorded. Animals were maintained in cages, size 70 x 70 x 35 cm, with steel walls, except for the front wall that was glass, which allowed complete viewing of the animals. Behavior recording was performed 1-2 h after the beginning of the dark phase, with light from a 40-Watts red lamp. Initially, the male was placed in the observation cage 20 min before the female for adaptation to the environment. After this period, the behaviors of the male were videotaped during a 20 min session. Frequency (number of times each behavior occurred during a recording session), latency (time to first mount) were analyzed (Breigeiron et al., 2002; Padoin e Lucion, 1995).

Female Wistar rats, 3 months old in the beginning of the experiment, were used to record male sexual behavior, as previously described (Rasia-Filho e Lucion, 1996). They were oophorectomized and induced to sexual receptiveness by a sequential subcutaneous injection of 2 µg of estradiol (Benzoginoestril, Sarsa,

Rio de Janeiro, Brazil) 48 h before testing and 500 µg of progesterone (Ginecoside, Darrow, Rio de Janeiro, Brazil) 6 h before testing. Only sexually receptive lordotic females were used as subjects.

Plasma testosterone levels were determined in duplicate by radioimmunoassay. The animals were killed by cervical dislocation. Blood was collected from portal vein. Samples were centrifuged for 10 min at 3000 rpm; the serum was separated and stored frozen  $-20^{\circ}$  C until estimation of testosterone (Kit DPC, MedLab, intra-assay coefficient = 9.15%, and sensitivity = 0.15 pg/mL).

This study was approved by the Ethics Committee of Universidade Federal do Rio Grande do Sul and was carried out in accordance with the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

## **Statistics**

Sexual behavior frequencies and latency parameters during the 20 min period session were expressed as median (interquartile interval). Frequency of mount, and intromission, and sniffing were compared among the groups by Kruskal–Wallis test followed by test of Tukey. The testosterone concentration (pg/mL), expressed as median (interquartile interval) was compared by the Kruskal-Wallis followed by test of Tukey.

## Results

### *Serum levels of testosterone*

As shown in figure 1, the animals in the subcutaneous transplant (total and sliced) group presented a higher plasma testosterone concentration compared to castrated group ( $P < 0.05$ ).

### *Sexual behavior*

Subcutaneous autotransplantation elicited an increase in the number of mounts ( $P < 0.007$ ) and intromissions ( $P < 0.009$ ) and a significant reduction in the latency to these two behaviors ( $P < 0.034$ ) compared to animals castrated (see fig. 2, 3 and 4). The frequency of sniffing the body of sexually receptive females was similar among the groups ( $P = 0.326$ ) (fig. 5). The frequency of intromission in the autotransplanted groups was higher than in castrated animals, but lower than in the sham group.

### *Total body weight*

Total body weight of all groups are shown in figure 6. The mean weight variations were not significantly different among the groups.

### *Histologic Findings*

Morphologic study of the total and sliced testicles showed degenerative, ischemic or inflammatory alterations in different degrees (table 1).

## Discussion

Fertility issues are often negligible at the time of cancer diagnosis and therapy in presence of a life-threatening disease, but infertility may negatively affect the quality of life of cancer survivors (Orwig e Schlatt, 2005; Wallace et al., 2001). The testicular tissue of the prepubertal boy seems to be more sensitive to chemotherapy and radiotherapy than in the postpubertal period. In addition, there remains a theoretical risk of mutagenicity affecting the offspring of affected patients (Howell e Shalet, 2001; Okoye et al., 2002).

Testicle grafts are usually nonvascularized, but the results have been generally disappointing. Some success has been reported in different animal models with the use of intact gonads with microvascular anastomosis (Barten et al., 1997; Yin et al., 2003). The results in this study suggest that (whole or sliced) testicles autotransplanted subcutaneously maintain some hormone production. Hormone production was characterized by maintenance of sexual behavior and serum testosterone levels. Circulating levels of testosterone have been previously associated to frequency of mounts and intromission (Rasia-Filho e Lucion, 1996), as well as to latency and sexual potency (Breigeiron et al., 2002). All the intact and sliced transplanted testicle animals maintained sexual interest.

Similar to previous study with ovaries (von Eye Corleta et al., 1998), testicles transplanted subcutaneously without vascular anastomosis in rats may preserve endocrine functions. This technique is not difficult and could be used to

minimize the undesired effects of male infertility. Recent publications have shown that the testicular tissue is tolerant to freezing and thawing (Hovatta, 2003; Orwig e Schlatt, 2005; Res et al., 2000). The application of testicle cryopreservation to preserve human gonadal function associated with the possibility of sliced testicle subcutaneous auto-transplantation has enormous potential (Nugent et al., 1997). Subcutaneous transplantation of autologous, cryopreserved, sliced testicle grafts may be an alternative to those submitted to gonadal destructive therapy.

An additional role for this therapy could be cryostorage of testicular stem cells before cancer treatment (Gosden e Nagano, 2002; Tournaye et al., 2004). Testicular banking can be used as an alternative to young men who might need to postpone reproduction in the years to come because of diminished testicular function.

Data from this study showed that testicles transplanted without vascular anastomosis maintain their hormone secretion and exert neuroendocrine function in sexual behavior in rats. The results concerning testosterone levels, however, shall be considered with caution since they are below the sensitivity of the kit (sensitivity = 0.15 pg/mL). Autotransplantation could be an important alternative for patients considering prophylactic orchidectomy. These men could maintain their quality of life while avoiding the use of artificial hormones. However, further studies are needed before we can indicate testicle autotransplantation to humans.

## References

- Aslam I, Fishel S, et al. (2000). Fertility preservation of boys undergoing anti-cancer therapy: a review of the existing situation and prospects for the future. *Hum Reprod*, 15 (10): 2154-9.
- Barten EJ, Garybian H, et al. (1997). Homologous testis transplantation in dogs. *Transpl Int*, 10 (5): 362-8.
- Bramswig JH, Heimes U, et al. (1990). The effects of different cumulative doses of chemotherapy on testicular function. Results in 75 patients treated for Hodgkin's disease during childhood or adolescence. *Cancer*, 65 (6): 1298-302.
- Breigeiron MK, Morris M, et al. (2002). Effects of angiotensin II microinjected into medial amygdala on male sexual behavior in rats. *Horm Behav*, 41 (3): 267-74.
- Gosden R e Nagano M (2002). Preservation of fertility in nature and ART. *Reproduction*, 123 (1): 3-11.
- Grundy R, Gosden RG, et al. (2001). Fertility preservation for children treated for cancer (1): scientific advances and research dilemmas. *Arch Dis Child*, 84 (4): 355-9.
- Hovatta O (2003). Cryobiology of ovarian and testicular tissue. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 17 (2): 331-42.
- Howell SJ e Shalet SM (2001). Testicular function following chemotherapy. *Hum Reprod Update*, 7 (4): 363-9.
- Howell SJ e Shalet SM (2002). Effect of cancer therapy on pituitary-testicular axis. *Int J Androl*, 25 (5): 269-76.

- Lima AP, Lunardi LO, et al. (2000). Effects of castration and testosterone replacement on peritoneal histamine concentration and lung histamine concentration in pubertal male rats. *J Endocrinol*, 167 (1): 71-5.
- Nugent D, Meirow D, et al. (1997). Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. *Hum Reprod Update*, 3 (3): 267-80.
- Okoye BO, Spooner D, et al. (2002). Radioprotective reverse orchidopexy. *J Pediatr Surg*, 37 (2): 236-9.
- Orwig KE e Schlatt S (2005). Cryopreservation and transplantation of spermatogonia and testicular tissue for preservation of male fertility. *J Natl Cancer Inst Monogr* (34): 51-6.
- Padoin MJ e Lucion AB (1995). The effect of testosterone and DOI (1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane) on male sexual behavior of rats. *Eur J Pharmacol*, 277 (1): 1-6.
- Rasia-Filho AA e Lucion AB (1996). Effects of 8-OH-DPAT on sexual behavior of male rats castrated at different ages. *Horm Behav*, 30 (3): 251-8.
- Res U, Res P, et al. (2000). Birth after treatment of a male with seminoma and azoospermia with cryopreserved-thawed testicular tissue. *Hum Reprod*, 15 (4): 861-4.
- Stillier CA (1994). Population based survival rates for childhood cancer in Britain, 1980-91. *Bmj*, 309 (6969): 1612-6.
- Thomson AB, Critchley HO, et al. (2002). Late reproductive sequelae following treatment of childhood cancer and options for fertility preservation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 16 (2): 311-34.

- Tournaye H, Goossens E, et al. (2004). Preserving the reproductive potential of men and boys with cancer: current concepts and future prospects. *Hum Reprod Update*, 10 (6): 525-32.
- von Eye Corleta H, Corleta O, et al. (1998). Subcutaneous autologous ovarian transplantation in Wistar rats maintains hormone secretion. *Fertil Steril*, 70 (1): 16-9.
- Wallace WH, Blacklay A, et al. (2001). Developing strategies for long term follow up of survivors of childhood cancer. *Bmj*, 323 (7307): 271-4.
- Yin H, Wang X, et al. (2003). Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype. *Hum Reprod*, 18 (6): 1165-72.

Figure 1 – Serum levels of testosterone

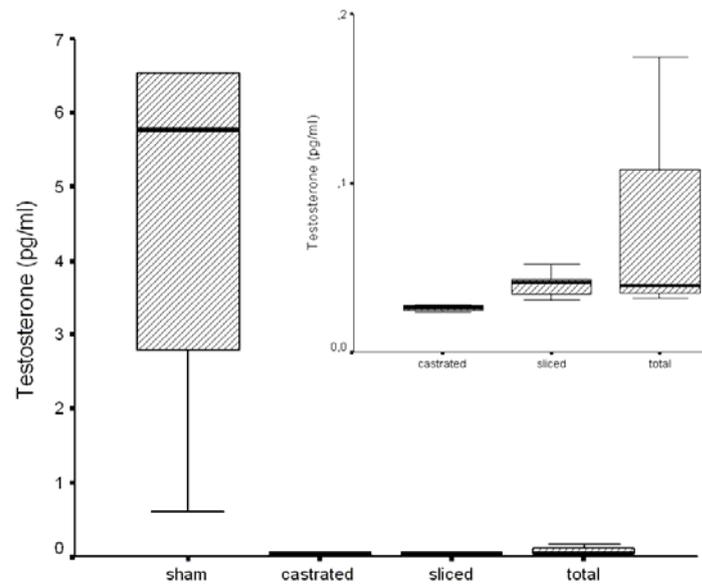


Figure 2 – Frequency of mounts with pelvic thrusting

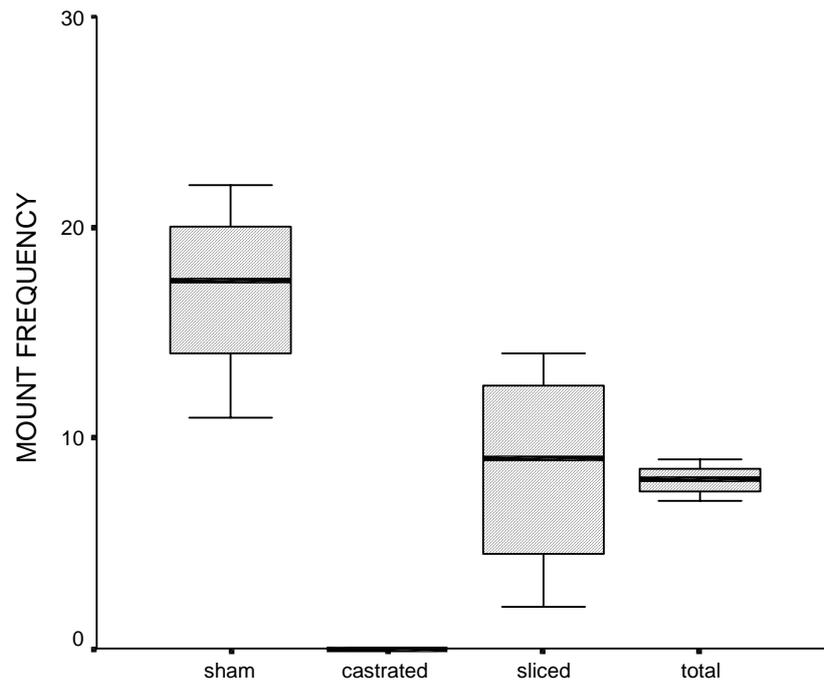


Figure 3 – Frequency of intrusions

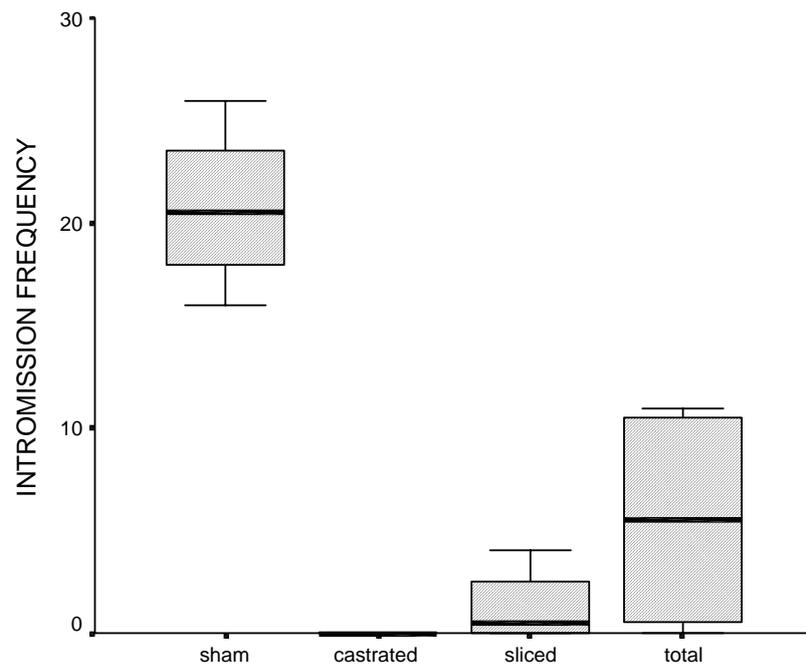


Figure 4 – Thrusting latency

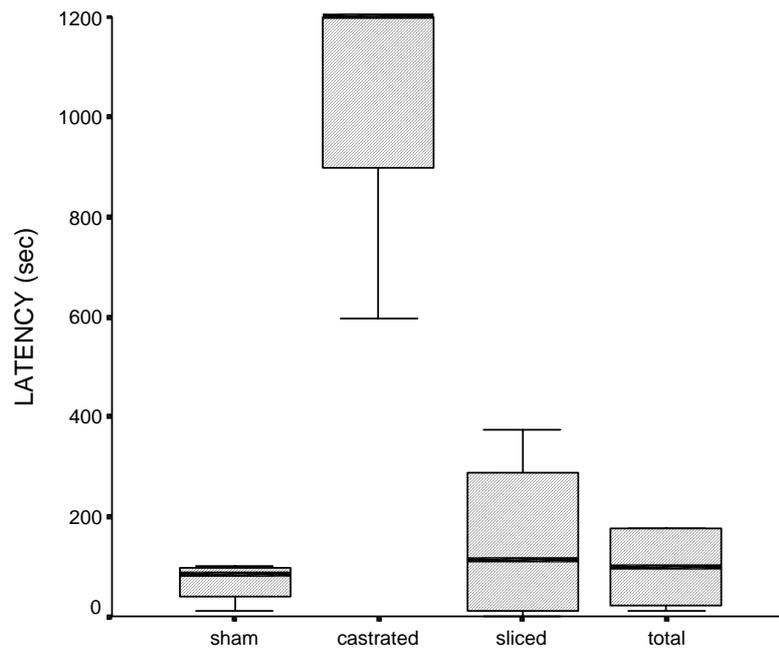


Figure 5 – Genital sniffing frequency

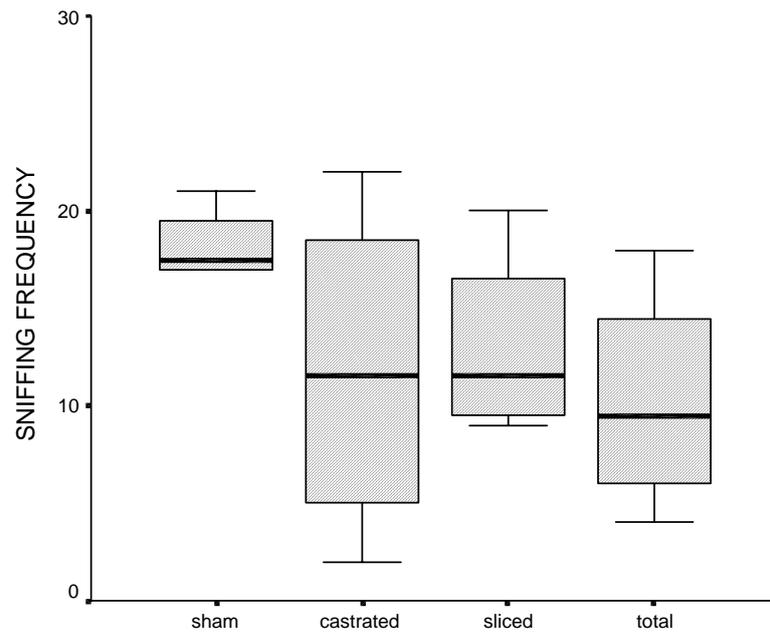


Figure 6 – Body weight variation

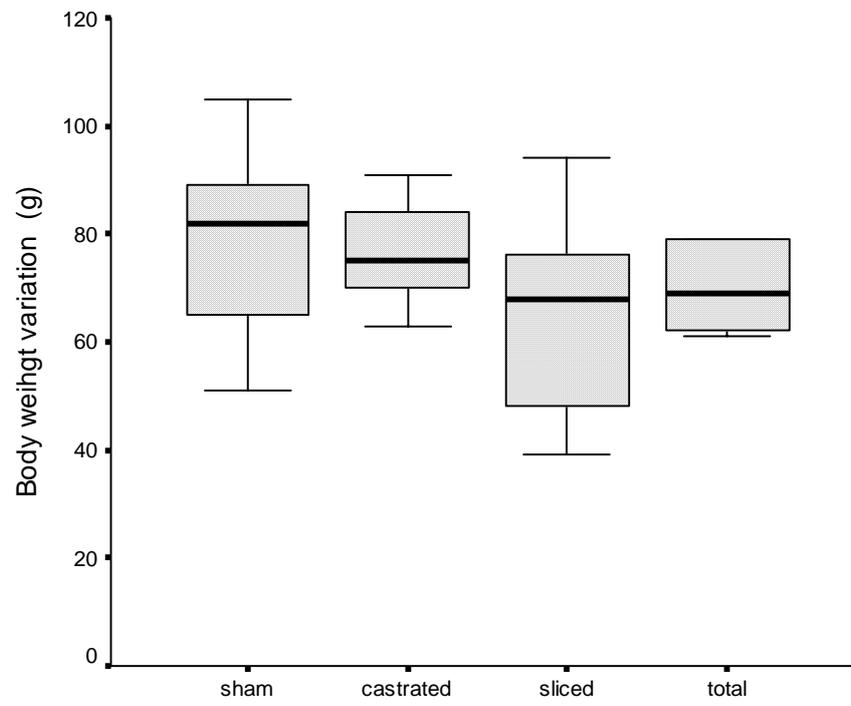


Table 1 – Morphologic characteristics of the auto-transplanted testicle

	Before transplant	Total testicle	Sliced testicle
Viable	15	0	0
Degeneration of parenchyma	0	4	1
Necrosis of parenchyma	0	1	1
Absence of parenchyma	0	0	3

**Artigo em português****AUTOTRANSPLANTE SUBCUTÂNEO DE TESTÍCULO EM RATOS WISTAR**

Miragem AA<sup>1</sup>, Silva Neto B<sup>2</sup>, Reche M<sup>3</sup>, Kliemann LM<sup>4</sup>, Corleta HvE<sup>2,3,5</sup>, Capp E<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde; <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>3</sup>Depto. de Ginecologia e Obstetrícia, e <sup>4</sup>Depto. de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>5</sup>Núcleo Gerar de Reprodução Assistida, Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, RS, Brasil

Endereço para correspondência:

Edison Capp

Rua Dr. Barros Cassal, 411/22

CEP 90035 003 - Porto Alegre, RS

edcapp@ufrgs.br

FAX: (051) 3311 6588

## Abstract

The testicular tissue is particularly susceptible to the effects of radiation and chemotherapy. Recently, advances in maintaining fertility have focused in preserving gonadal tissue for future use. In this study, we performed autotransplantation of total and sliced testicles without anastomosis in Wistar rats. Hormone secretion capacity and viability of the transplanted testicle were assessed by serum testosterone levels and analysis of the effects on sexual behavior. **Methods:** sixteen male Wistar rats (240g – 280g) approximately 60 days of age were used in this study. The rats were randomly divided into 4 groups: sham (group I, n = 4), bilateral orchidectomy (group II, n = 4), testicle autotransplantation group (group IV, n = 4), testicle slices autotransplantation group (group III, n = 4). Sexual behavior (genital sniffing, latency, thrusting intromissions, mounts with pelvic thrusting frequencies), serum testosterone levels, body weight were assessed eight weeks after procedures. **Results:** subcutaneous autotransplantation elicited an increase in the number of mounts ( $P < 0.007$ ) and intromissions ( $P < 0.009$ ) and a significant reduction in the latency to these two behaviors ( $P < 0.034$ ) compared to animals castrated. The frequency of sniffing the body of sexually receptive females was not affected by castration ( $P = 0.326$ ). Serum testosterone in the subcutaneous transplant (total and sliced) group presented a higher plasma testosterone concentration compared to castrated group (0.039 [0.033 – 0.141], 0.041 [0.032 - 0.047], 0.026 [0.024 - 0.028], respectively;  $P < 0.05$ ). Data from this study showed that testicles transplanted without vascular anastomosis maintain their hormone secretion and exert neuroendocrine function in sexual behavior in rats. Autotransplantation could be an important alternative for patients considering prophylactic orchidectomy.

**Keywords:** testicular transplantation, fertility, testis

## Resumo

O tecido testicular é particularmente susceptível aos efeitos da radiação e da quimioterapia. Recentemente, avanços na manutenção da fertilidade têm como um dos objetivos, preservar tecido gonadal para uma utilização futura. Neste estudo foi realizado autotransplante de testículo inteiro e em fatia sem anastomose vascular em ratos Wistar. A capacidade de secreção hormonal e a viabilidade do tecido transplantado foram avaliadas através dos níveis de testosterona e da análise dos efeitos no comportamento sexual destes animais. **Métodos:** Foram usados para este estudo, 16 ratos da raça Wistar (240g – 280g), com aproximadamente 60 dias. Os ratos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: sham (grupo I, n = 4), orquidectomia bilateral (grupo II, n = 4), testículo inteiro (grupo IV, n = 4), testículo fatiado (grupo III, n = 4). O comportamento sexual (cheirar genitálias, montas com e sem intromissão peniana), níveis de testosterona e peso corporal foram avaliados 8 semanas após a realização do implante. **Resultados:** os grupos autotransplantados apresentaram um maior número de montas ( $P < 0.007$ ) e intromissões ( $P < 0.009$ ) com significativa redução na latência destes comportamentos ( $P < 0.034$ ) quando comparados aos animais castrados. A frequência de cheirar o corpo de uma fêmea sexualmente receptiva não foi afetada pela castração ( $P = 0.326$ ). Os níveis de testosterona (pg/mL) nos grupos transplantados (inteiro e fatia), apresentaram um aumento plasmático na concentração comparado ao grupo castrado (0.039 [0.033 – 0.141], 0.041 [0.032 - 0.047], 0.026 [0.024 - 0.028], respectivamente;  $P < 0.05$ ). Estes resultados sugerem que os testículos transplantados sem anastomose vascular mantêm sua secreção hormonal e exercem suas funções neuroendócrinas no comportamento sexual em ratos. O autotransplante pode ser uma importante alternativa para pacientes, considerando orquidectomia profilática.

**Palavras-chaves:** transplante testicular, fertilidade, testículos

## **Introdução**

Crianças tratadas para o câncer, podem ter a fertilidade comprometida pela doença ou pelo tratamento (Grundy et al., 2001). Atualmente 70 % das crianças com distúrbios oncológicos sobrevivem aos tumores após tratamentos radio e quimioterápicos (Stiller, 1994). Este grupo de sobreviventes está aumentando rapidamente a cada ano (Aslam et al., 2000), entretanto, as terapias oncológicas afetam diretamente órgãos e sistemas, incluindo o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Bramswig et al., 1990; Howell et al., 2002).

O objetivo primário do tratamento do câncer é a cura, porém, a longo prazo, preservar a capacidade reprodutiva é importante. A infertilidade pode acarretar alterações psicológicas significativas na vida adulta e novas estratégias para preservá-la são os interesses de profissionais de diferentes áreas (Grundy et al., 2001; Thomson et al., 2002).

O tecido testicular é particularmente suscetível aos efeitos da radiação e quimioterapia. Além do desenvolvimento de drogas menos gonadotóxicas, a preservação de tecido gonadal para futura utilização têm sido preconizada. Por exemplo, em meninos pré-púberes, que ainda não produzem espermatozoides, mas tem o testículo rico em espermatogônias,, o tecido testicular pode ser removido, estocado e, após o tratamento citotóxico, as espermatogônias retiradas podem ser reinjetadas repovoando o testículo de células germinativas (Thomson et al., 2002).

Previamente foi demonstrado que ovários transplantados subcutaneamente, sem anastomose vascular, em ratos, pode preservar funções endócrinas. Esta técnica não apresenta dificuldade, podendo ser utilizada, para preservar a fertilidade ou para minimizar os efeitos indesejáveis da ooforectomia precoce (von Eye Corleta et al., 1998). Semelhante ao tecido ovariano, um banco testicular possibilitaria a conservação da fertilidade se o órgão for transplantado com sucesso (Yin et al., 2003).

Neste estudo foram realizados autotransplantes de testículos inteiros e fatiados sem anastomose vascular em ratos Wistar. A capacidade e viabilidade de secreção hormonal dos testículos transplantados foram avaliadas pelos níveis de testosterona e análise de seus efeitos no comportamento sexual.

## **Materiais e Métodos**

Foram usados para este estudo 16 ratos da raça Wistar (240g – 280g) com aproximadamente 60 dias. Os procedimentos foram realizados com os animais submetidos a anestesia com éter. Durante o período posterior a cirurgia e anterior ao teste, os animais foram acondicionados em caixas acrílicas com dimensões de 60 X 50 X 30-cm e ciclo claro:escuro de 12 hora. A temperatura foi mantida constante em 22°C e os animais tinham livre acesso a comida e água.

O tamanho da amostra de 4 ratos por grupo foi determinado de acordo com o trabalho de Lima, Lunardi et al. (Lima et al., 2000) considerando um poder de amostra de 80%, e  $p < 0,05$ , utilizando o software Pepi 3.0.

Os ratos foram aleatoriamente divididos em 4 grupos. No grupo sham (grupo I,  $n = 4$ ), uma operação simulada foi realizada, a qual consistia da abertura da bolsa escrotal e visualização dos testículos. No grupo castrado (grupo II,  $n = 4$ ), foi realizada orquidectomia bilateral. No grupo transplantado testículo inteiro (grupo IV,  $n = 4$ ), após orquidectomia bilateral, um dos testículos foi autotransplantado. Resumidamente, uma incisão de 1 cm foi feita dorsalmente e o tecido subcutâneo divulgado em uma pequena bolsa ( $0,5 \text{ cm}^2$ ) para receber o implante. Nenhum meio foi colocado na bolsa juntamente com o implante. No grupo transplantado fatia de testículo (grupo III,  $n = 4$ ), o procedimento foi o mesmo do grupo IV, mas antes do testículo ser colocado na bolsa subcutâneo dorsal, ele foi cortado em fatias transversais de aproximadamente 3 mm de espessura.

Após a cirurgia os animais foram observados diariamente e não mostraram sinais de irritação local ou comportamento anormal.

Oito semanas após a operação, o comportamento sexual foi gravado. Os animais foram mantidos em caixas de  $70 \times 70 \times 35 \text{ cm}$ , com paredes de aço, a exceção da frontal que era de vidro, a qual proporcionou completa visualização dos animais. A gravação dos comportamentos foi realizada 1-2 h depois do início da fase escura, com luz proveniente de lâmpada vermelha de 40 Watts.

Inicialmente o macho foi colocado na caixa em observação por 20 minutos antes da fêmea para adaptação com o ambiente. Após este período, os comportamentos dos machos foram capturados em fitas VHS durante uma sessão de 20 minutos. A frequência (número de vezes que cada comportamento ocorreu no período da gravação), latência (o tempo decorrido até o primeiro comportamento de monta), foram analisados (Breigeiron et al., 2002; Padoin et al., 1995).

Ratas Wistar fêmeas, de 3 meses de vida no período do experimento foram utilizadas para a gravação do comportamento sexual dos machos, como descrito previamente (Rasia-Filho et al., 1996). Estas foram ooforectomizadas e induzidas a receptividade sexual por injeções subcutâneas seqüenciais de 2 µg de estradiol (Benzoginoestril, Sarsa, Rio de Janeiro, Brazil) 48 h antes do teste e 500 µg de progesterona (Ginecoside, Darrow, Rio de Janeiro, Brazil) 6 h antes do início. Somente fêmeas sexualmente receptivas, apresentando comportamento lordótico, foram utilizadas neste estudo.

Os níveis plasmáticos de testosterona foram determinados em duplicata por radioimunoensaio. Os animais foram mortos por deslocamento cervical. O sangue foi coletado através da veia porta. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm, o soro foi separado e estocado congelado a -20°C até a dosagem de testosterona (Kit DPC, MedLab, coeficiente intra-ensaio = 9,15%, e sensibilidade = 0,15 pg/mL).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e está de acordo com o *National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.

## **Estatística**

Os parâmetros de comportamento sexual, frequência e latência, durante o período da sessão de 20 minutos foram expressos em mediana (intervalo interquartil). Frequência de monta, intromissão e cheirar foram comparados entre os grupos pelo teste de Kruskal–Wallis seguido por teste de Tukey. As concentrações de testosterona (pg/mL), expressas em mediana (intervalo interquartil) foram comparadas por Kruskal-Wallis seguido de teste de Tukey.

## **Resultados**

### *Níveis séricos de testosterona*

Como é mostrado na figura 1, os animais dos grupos com transplante subcutâneo (inteiro e fatia), apresentaram um aumento na concentração plasmática de testosterona quando comparados ao grupo castrado ( $P < 0,05$ ). O grupo sham foi diferente dos demais grupos.

### *Comportamento Sexual*

Os autotransplantes subcutâneos proporcionaram um número de montas ( $P < 0,007$ ) e intromissões ( $P < 0,009$ ) maior que no grupo castrado, além de uma significativa redução na latência destes dois comportamentos ( $P < 0,034$ ) quando comparado aos animais castrados ( fig. 2, 3 e 4). A frequência de cheirar o corpo da fêmea sexualmente receptiva foi semelhante entre os grupos ( $P = 0,326$ ) (fig. 5). Os grupos com autotransplante não diferiram do grupo sham quanto a latência da primeira monta e a frequência de cheirar. A frequência de intromissão no grupo com autotransplante foi maior que no grupo castrado, mas menor que no grupo sham.

#### *Peso corporal total*

O peso corporal total de todos os grupos é mostrado na figura 6. A variação das médias dos pesos corporais não foi diferente significativamente entre os grupos.

#### *Análise Histológica*

Estudos morfológicos dos testículos inteiros e fatiados mostram: degeneração, isquemia ou alterações inflamatórias em diferentes graus (tabela 1).

### **Discussão**

A fertilidade é muitas vezes negligenciada, frente ao tempo entre o diagnóstico e a terapia. Porém, a infertilidade pode afetar negativamente a

qualidade de vida dos sobreviventes de câncer (Orwig et al., 2005; Wallace et al., 2001). O tecido testicular de meninos pré-púberes demonstra ser mais sensível à quimioterapia e radioterapia, quanto no período pós-puberal. Além disso, permanece um risco teórico da mutagênese afetar os descendentes do paciente tratado (Howell et al., 2001; Okoye et al., 2002).

Implantes de testículos são usualmente não vascularizados, mas seus resultados são geralmente insatisfatórios. Estudos bem sucedidos foram descritos em diferentes modelos animais, com o uso de gônadas intactas com anastomose microvascular (Barten et al., 1997; Yin et al., 2003). Os resultados deste estudo sugerem que os testículos (inteiro ou fatia) autotransplantados subcutaneamente mantêm alguma produção hormonal. A produção hormonal foi caracterizada pela manutenção do comportamento sexual e os níveis de testosterona. Os níveis de testosterona circulante foram previamente associados com a freqüência de monta e intromissão (Rasia-Filho et al., 1996), bem como, a latência e potência sexual (Breigeiron et al., 2002). Todos os animais transplantados com testículos inteiros e fatiados mantiveram o interesse sexual.

Apesar da análise histológica mostrar degeneração ou ausência de parênquima nos grupos autotransplantados, os testículos transplantados subcutaneamente sem anastomose vascular em ratos, têm sua função endócrina preservada. Esta técnica não apresenta dificuldades e pode ser usada para minimizar os efeitos indesejáveis do hipogonadismo. Publicações recentes mostram que o tecido testicular é tolerante ao congelamento e descongelamento (Hovatta, 2003; Orwig et al., 2005; Res et al., 2000). A aplicação da

criopreservação testicular para preservar células germinativas testiculares, associada a possibilidade de fatias de testículo autotransplantado subcutaneamente possui enorme potencial (Nugent et al., 1997). Transplantes subcutâneos, autólogos e criopreservados, e implantes de fatias de testículo podem ser alternativas para homens jovens submetidos a terapias gonadotóxicas (Gosden et al., 2002; Tournaye et al., 2004).

Os dados deste estudo mostraram que testículos transplantados sem anastomose vascular mantêm sua secreção hormonal e exercem função neuroendócrina no comportamento sexual de ratos. Os resultados a cerca dos níveis de testosterona, entretanto, devem ser considerados com cuidado, uma vez que, eles estão abaixo da sensibilidade do kit (sensibilidade = 0,15 pg/mL).

O autotransplante pode ser uma alternativa interessante para pacientes que necessitam tratamentos gonadotóxicos, podem manter a qualidade de vida. Outros estudos são necessários antes que possamos indicar o autotransplante de testículo para humanos.

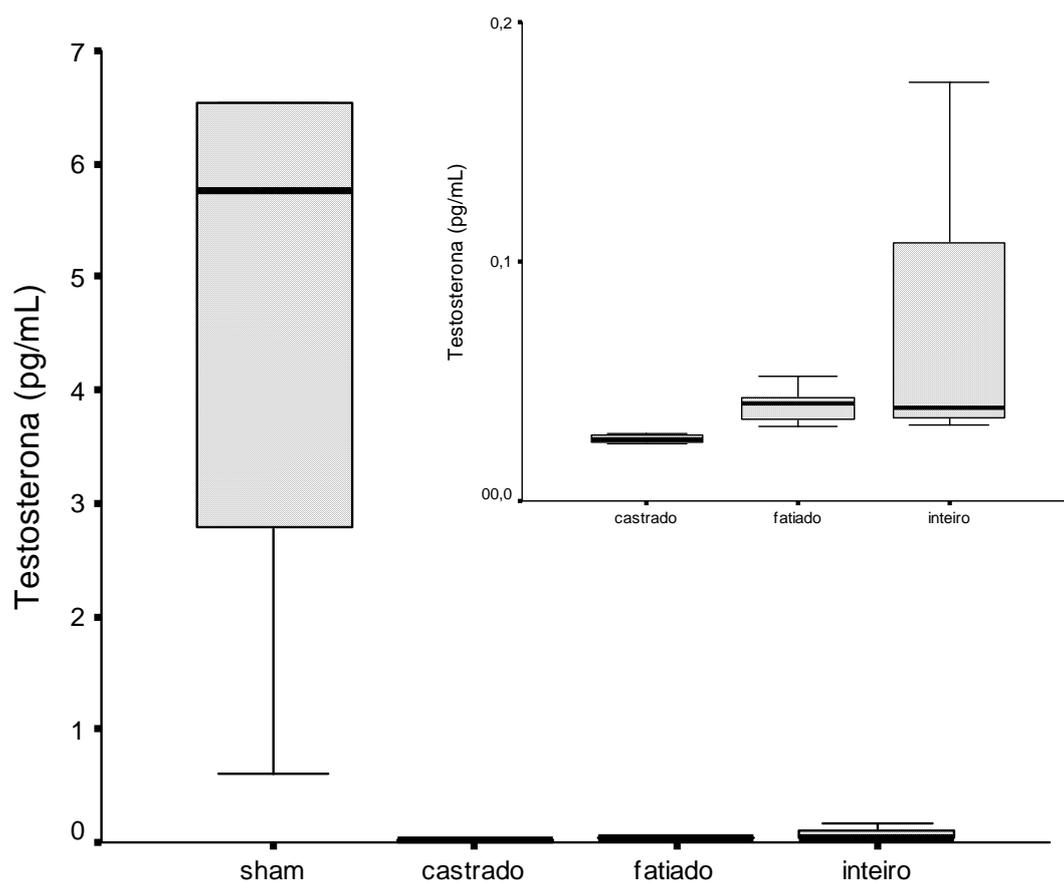
## Referências

- Aslam I, Fishel S, et al. (2000). Fertility preservation of boys undergoing anti-cancer therapy: a review of the existing situation and prospects for the future. *Hum Reprod*, 15 (10): 2154-9.
- Barten EJ, Garybian H, et al. (1997). Homologous testis transplantation in dogs. *Transpl Int*, 10 (5): 362-8.
- Bramswig JH, Heimes U, et al. (1990). The effects of different cumulative doses of chemotherapy on testicular function. Results in 75 patients treated for Hodgkin's disease during childhood or adolescence. *Cancer*, 65 (6): 1298-302.
- Breigeiron MK, Morris M, et al. (2002). Effects of angiotensin II microinjected into medial amygdala on male sexual behavior in rats. *Horm Behav*, 41 (3): 267-74.
- Gosden R & Nagano M (2002). Preservation of fertility in nature and ART. *Reproduction*, 123 (1): 3-11.
- Grundy R, Gosden RG, et al. (2001). Fertility preservation for children treated for cancer (1): scientific advances and research dilemmas. *Arch Dis Child*, 84 (4): 355-9.
- Hovatta O (2003). Cryobiology of ovarian and testicular tissue. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 17 (2): 331-42.
- Howell SJ & Shalet SM (2001). Testicular function following chemotherapy. *Hum Reprod Update*, 7 (4): 363-9.

- Howell SJ & Shalet SM (2002). Effect of cancer therapy on pituitary-testicular axis. *Int J Androl*, 25 (5): 269-76.
- Lima AP, Lunardi LO, et al. (2000). Effects of castration and testosterone replacement on peritoneal histamine concentration and lung histamine concentration in pubertal male rats. *J Endocrinol*, 167 (1): 71-5.
- Nugent D, Meirow D, et al. (1997). Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. *Hum Reprod Update*, 3 (3): 267-80.
- Okoye BO, Spooner D, et al. (2002). Radioprotective reverse orchidopexy. *J Pediatr Surg*, 37 (2): 236-9.
- Orwig KE & Schlatt S (2005). Cryopreservation and transplantation of spermatogonia and testicular tissue for preservation of male fertility. *J Natl Cancer Inst Monogr* (34): 51-6.
- Padoin MJ & Lucion AB (1995). The effect of testosterone and DOI (1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane) on male sexual behavior of rats. *Eur J Pharmacol*, 277 (1): 1-6.
- Rasia-Filho AA & Lucion AB (1996). Effects of 8-OH-DPAT on sexual behavior of male rats castrated at different ages. *Horm Behav*, 30 (3): 251-8.
- Res U, Res P, et al. (2000). Birth after treatment of a male with seminoma and azoospermia with cryopreserved-thawed testicular tissue. *Hum Reprod*, 15 (4): 861-4.
- Stiller CA (1994). Population based survival rates for childhood cancer in Britain, 1980-91. *Bmj*, 309 (6969): 1612-6.

- Thomson AB, Critchley HO, et al. (2002). Late reproductive sequelae following treatment of childhood cancer and options for fertility preservation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 16 (2): 311-34.
- Tournaye H, Goossens E, et al. (2004). Preserving the reproductive potential of men and boys with cancer: current concepts and future prospects. *Hum Reprod Update*, 10 (6): 525-32.
- von Eye Corleta H, Corleta O, et al. (1998). Subcutaneous autologous ovarian transplantation in Wistar rats maintains hormone secretion. *Fertil Steril*, 70 (1): 16-9.
- Wallace WH, Blacklay A, et al. (2001). Developing strategies for long term follow up of survivors of childhood cancer. *Bmj*, 323 (7307): 271-4.
- Yin H, Wang X, et al. (2003). Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype. *Hum Reprod*, 18 (6): 1165-72.

Figura 1 – Níveis séricos de testosterona



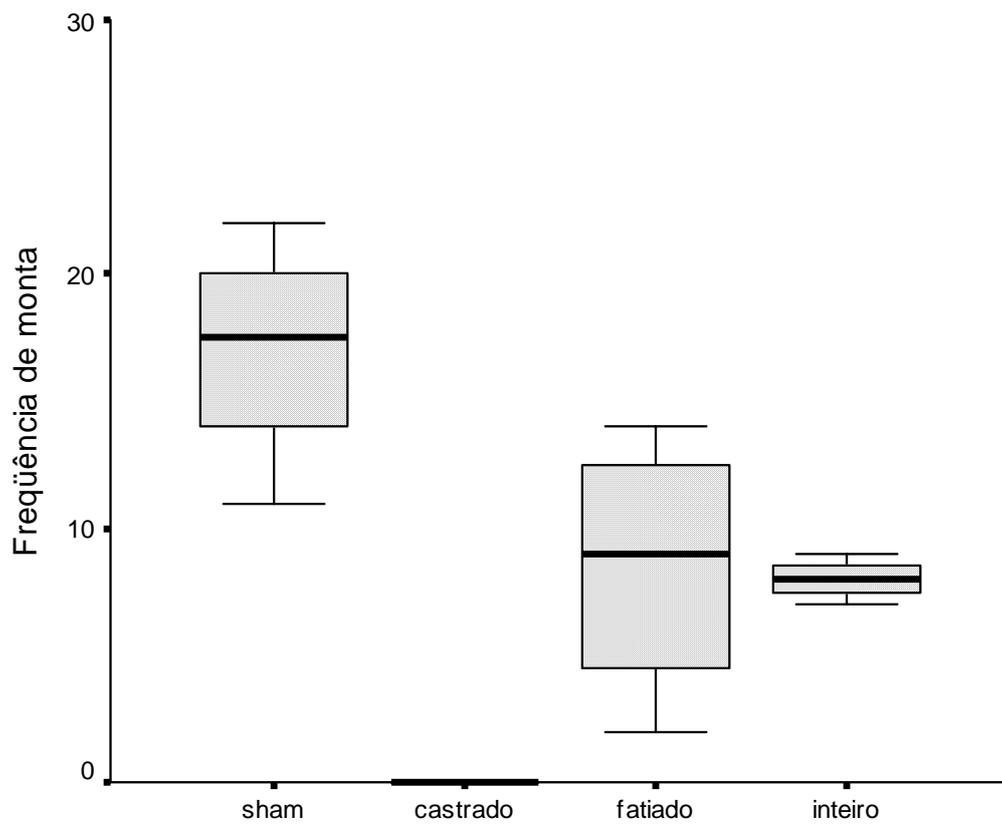


Figura 3 – Freqüência de intromissão

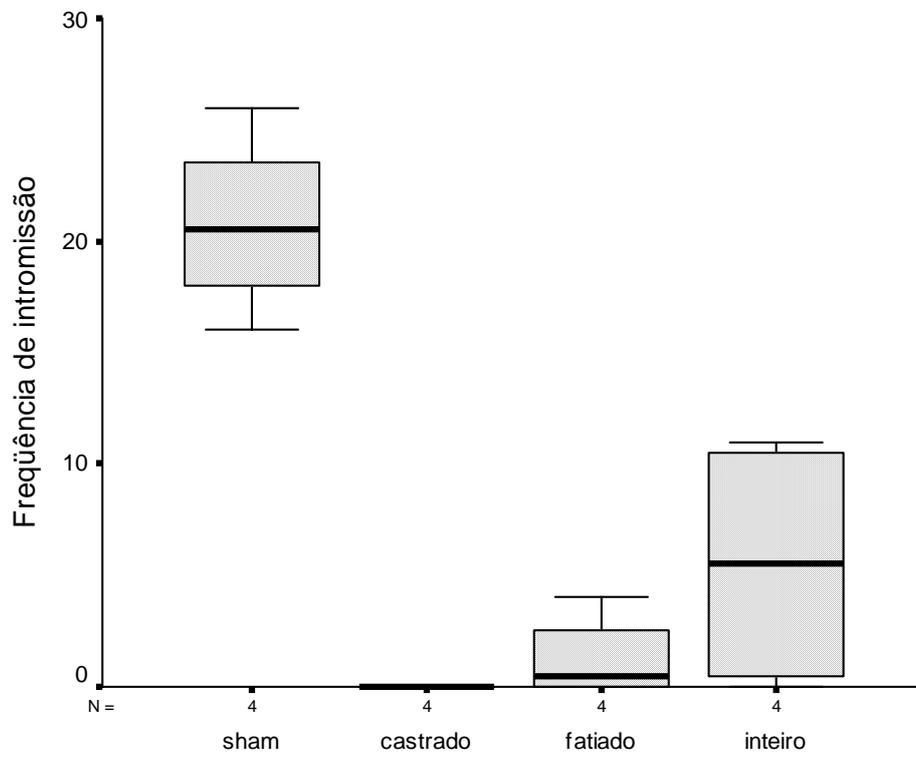


Figura 4 – Latência para primeira monta

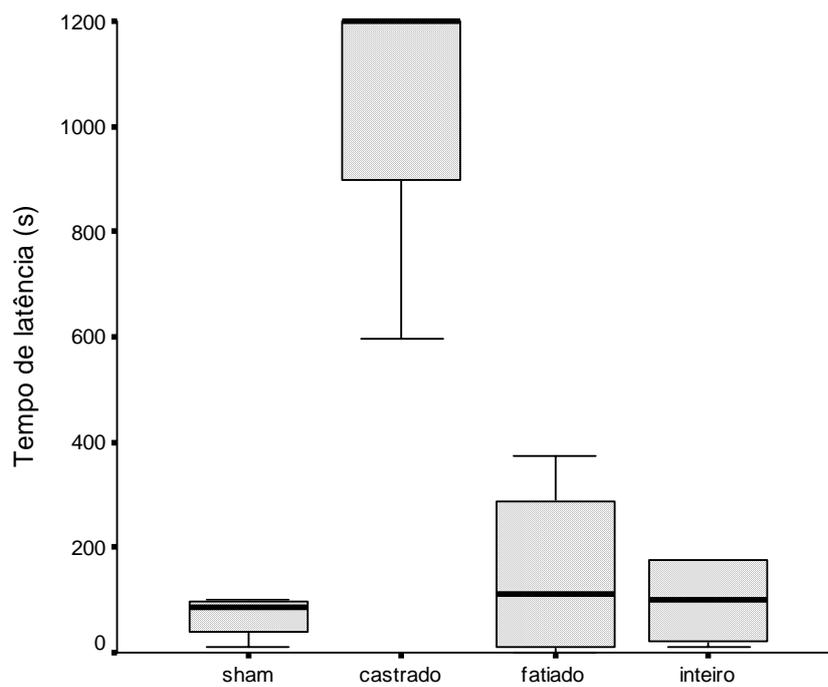


Figura 5 – Frequência de cheirar genitália

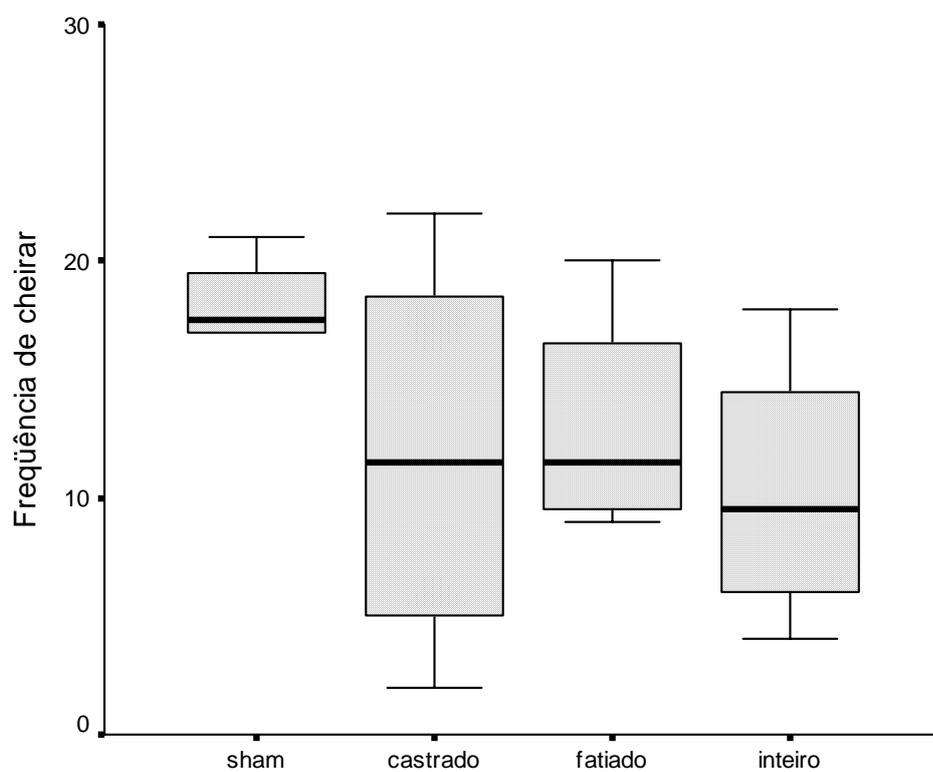


Figura 6 – Variação do peso corporal

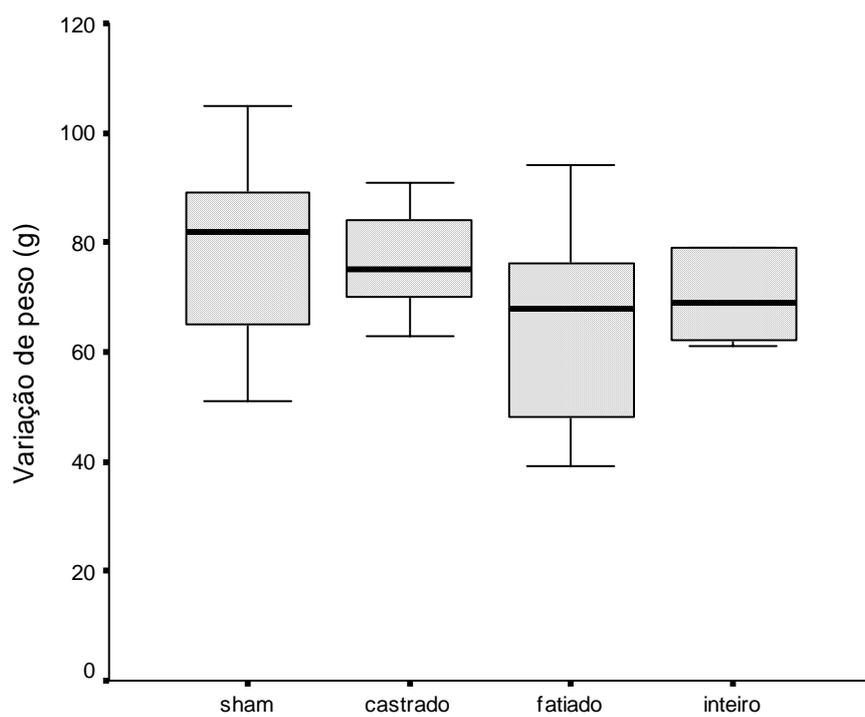


Tabela 1 – Características morfológicas dos testículos autotransplantados

	Antes do transplante	Testículo Inteiro	Testículo fatiado
Viável	15	0	0
Degeneração do parênquima	0	4	1
Necrose do parênquima	0	1	1
Ausência do parênquima	0	0	3