



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CULTURA DE TÚBULOS
SEMINÍFEROS E A SUA UTILIZAÇÃO NOS ESTUDOS TOXICOLÓGICOS
DO CÁDMIO**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato a) *Christiane Bertachini Lombello*
e aprovada pela Comissão Julgadora.

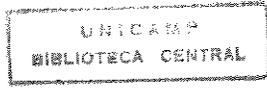
2/2/96
H. Dolder

Christiane Bertachini Lombello

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular.

Orientadora: Prof.a. Dra. Mary Anne Heidi Dolder
Campinas - SP
1996

9611817



UNIDADE BC
N.º CHAMADA: UNICAMP
L838p
V. 838p
TOMBO BC/ 28176
PROC. 66.7/96
C D
PREÇO R\$ 11,00
DATA 10/08/96
N.º CPD C.M.0009.20.45-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

L838p

Lombello, Christiane Bertachini

Padronização das técnicas de cultura de túbulo seminíferos e sua utilização nos estudos toxicológicos do cádmio / Christiane Bertachini Lombello. Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Mary Anne Heidi Dolder.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Espermatogenese. 2. Cultura e meios de cultura (Biologia). 3. Toxicologia experimental. I. Dolder, Mary Anne Heidi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 02 de julho, de 1996.

BANCA EXAMINADORA:

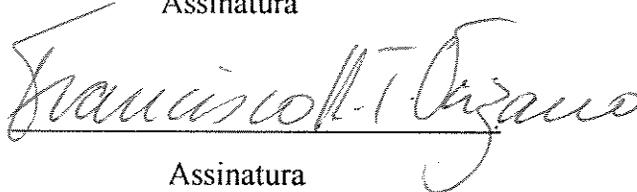
TITULARES:

Prof.^a Dr.^a Mary Anne Heidi Dolder (Orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. Francisco Antônio T. Fazano



Assinatura

Prof.^a Dr.^a Maria Lúcia Furlan Wada



Assinatura

SUPLENTE:

Prof.^a Dr.^a Shirley Maria Recco-Pimentel



Assinatura

**Aos meus pais, Leonel e
Eliana, ao meu marido
Ricardo Augusto e à
memória da sempre
querida Vó Mira.**

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi concluído graças ao apoio e dedicação de várias pessoas, que contribuíram direta ou indiretamente para a sua realização. Dentre estas pessoas, faço um agradecimento especial:

À Prof.a. Dra. Mary Anne Heidi Dolder pela orientação, amizade, incentivo e dedicação, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP pelo apoio, especialmente a Prof.a. Dra. Maria Lúcia Furlan Wada pelo auxílio no desenvolvimento desta tese, incluindo o acesso ao seu laboratório, e pela participação na pré-banca e banca examinadora e a Prof.a. Dra. Shirley Maria Recco-Pimentel, pelo apoio, convivência agradável e por ter participado da pré-banca e banca examinadora desta tese.

Ao Prof. Dr. Francisco Antônio T. Fazano - chefe do laboratório de reprodução humana do CAISM, UNICAMP, pelas valiosas sugestões e pela participação na pré-banca e banca examinadora desta tese.

Ao Prof. Dr. Urbano M. Ferraz Meirelles, do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, por ceder o cádmio, e especialmente por sua simpatia e experiência que auxiliaram na confecção desta tese.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular por sua colaboração durante o desenvolvimento desta tese.

Ao Sr. Otávio Cardoso Oliveira, Taxidermista do Departamento de Zoologia da UNICAMP, e seu auxiliar Paulo César pela paciência, simpatia e ajuda, sem os quais a realização desta tese não seria possível.

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP, especialmente a Antônia M. Ferreira Lima, pela simpatia e auxílio nas preparações do material para Microscopia Eletrônica de Varredura.

À Lúcia Helena Carvalho do Instituto de Química da UNICAMP, por sua ajuda com as preparações de Microscopia Eletrônica de Varredura

Aos colegas do Departamento de Biologia Celular pela convivência alegre e apoio durante a realização deste trabalho, em especial às colegas de laboratório Estela S. Rossetto, Flávia Helena Costa Cabral, Tatiana Montanari e Cristiana N. Begnami.

Às minhas irmãs Danielle e Giselle pelo apoio nos momentos difíceis e pela amizade, sem os quais seria impossível a realização desta tese.

ÍNDICE

I. Introdução.....	1
I.1. Espermatogênese.....	1
I.2. Natureza sincicial das células germinativas.....	6
I.3. Onda seminífera.....	6
I.4. Ciclo seminífero.....	7
I.5. Epitélio germinativo.....	7
I.6. Células de Sertoli.....	8
I.7. Túbulo seminífero.....	11
I.8. Testículo.....	11
I.9. Regulação hormonal.....	12
I.10. Estudo da espermatogênese in vitro.....	15
I.11. Cultura de túbulos seminíferos	18
I.12. Toxicidade de metais pesados com ênfase para o efeito do cádmio sobre o testículo.....	20
II. Objetivos.....	29
III. Materiais e Métodos.....	30
III.1. Animais.....	30
III.2. Coleta do material.....	30
III.3. Isolamento dos túbulos seminíferos.....	30
III.4. Cultura de túbulos seminíferos.....	31
III.5. Preparação para microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	35
III.6. Preparação para microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	36
IV. Resultados.....	38
IV.1. Fragmentos analisados antes de serem cultivados.....	38
IV.2. Experimento 1	39
IV.3. Experimento 2.....	39
IV.4. Experimento 3.....	40
IV.5. Experimentos 4 e 5.....	40
IV.6. Experimentos 6 e 7.....	42
IV.7. Experimentos 8 e 9.....	44
IV.8. Figuras.....	47
V. Discussão.....	67
VI. Conclusão.....	77
VI. Resumo.....	79
VII. Abstract.....	80
IX. Referências bibliográficas.....	81

I. INTRODUÇÃO

Para a realização da cultura de túbulos seminíferos é necessário que se entenda as particularidades da espermatogênese e dos fatores que poderiam interferir no desenvolvimento do sistema *in vitro*. Para o estudo dos efeitos do cádmio sobre a cultura dos túbulos seminíferos é necessário o entendimento de suas propriedades toxicológicas.

A seguir são feitas considerações sobre a espermatogênese começando com as diferentes populações celulares que participam do processo, abordando as interações entre estas populações celulares, a organização estrutural do testículo, a regulação hormonal do processo, a importância do sistema *in vitro*, especialmente dos túbulos seminíferos, e finalizando com a toxicologia do cádmio.

I.1. Espermatogênese

A espermatogênese em mamíferos é um processo contínuo, a partir da maturidade sexual do animal, que acontece no interior de túbulos finos, longos e convolutos, os túbulos seminíferos, localizados nos testículos (FIGURA 1). As células germinativas imaturas, as espermatogônias, estão localizadas na periferia destes túbulos, adjacentes à parede tubular. Estas células se dividem continuamente por mitose, sendo que algumas de suas células filhas se diferenciam em espermatócitos primários. Estes sofrem divisão meiótica originando os espermatócitos secundários que ao completarem a segunda fase da meiose originam espermatídes haplóides. Através de diferenciação morfológica as espermatídes dão origem aos espermatozóides, liberados no lúmen do túbulo seminífero, passando pelo epidídimo, onde são armazenados e sofrem maturação, tornando-os capacitados para a fertilização (Alberts *et al.*, 1989).

Em roedores as espermatogônias podem ser classificadas em diferentes tipos: A-0, são "células de reserva" que raramente se dividem ou têm um ciclo celular muito longo; A-1, A-2, A-3, A-4 e A-intermediária, são aquelas células que sofrem diferenciação; células B, originarão os espermatócitos, também através de diferenciação (Clermont & Bustos-Obregon, 1968). Outra forma de classificação

proposta para as espermatogônias: "A-stem", são células de reserva que raramente entram em divisão, são encontradas separadas umas das outras e ao acaso ao longo do túbulo (A-s); A-proliferativas, podem ser "A-pairs" quando resultam da divisão de células A-s e está presente um par de células filhas (A-pr), ou "A-aligned" quando resultam de mais divisões de A-s e aparecem várias células filhas alinhadas (A-al); as células diferenciadas são as espermatogônias A-1, A-2, A-3, A-4, A-intermediária e células B, resultantes de divisões sucessivas a partir de A-al (Huckins, 1971).

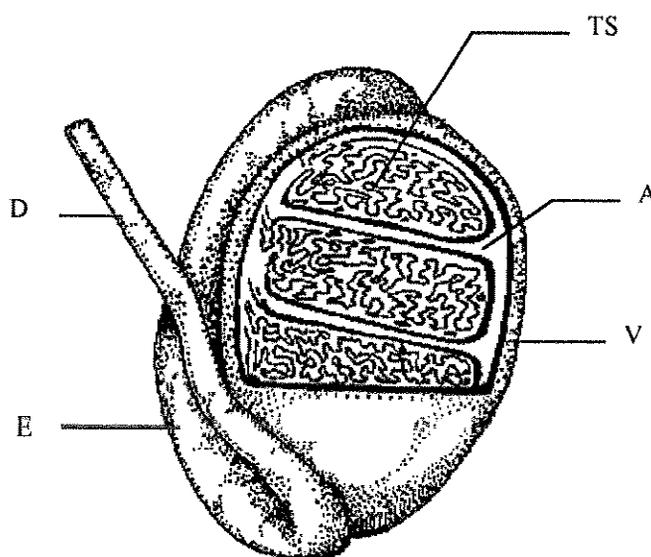


FIGURA 1: Esquema de testículo em corte. Estão esquematizados os túbulos seminíferos (TS), túnica vaginalis (V), túnica albugínea (A), epidídimo (E) e ducto deferente (D).

Para garantir a continuidade da espermatogênese é necessário um suprimento constante de precursores das células germinativas, através de um processo de renovação das populações celulares. Portanto as espermatogônias teriam por função a proliferação através de mitoses para garantir a diferenciação de alguns descendentes (espermatogônias B) em espermatócitos. Assim, é necessário que algumas destas células não entrem neste processo, permanecendo com potencial para manter uma certa população de reserva celular. Esta é a teoria de renovação celular que controvertidamente propõe alguns modelos de células reserva e como estas seriam mantidas no interior do túbulo de modo a repor a população de espermatogônias. Este papel seria desempenhado pelas células A0 ou As (Clermont & Leblond, 1953;

Clermont & Bustos-Obregon, 1968; Clermont, 1969; Huckins, 1971; Clermont & Hermo, 1975; Steinberger & Steinberger, 1975).

As espermatogônias são células relativamente grandes, tendo aproximadamente 12 μ m de diâmetro no homem, com núcleo redondo ou levemente ovóide cujo diâmetro é de aproximadamente 6-7 μ m no homem. O aspecto das células varia conforme o tipo em questão, podendo o núcleo variar em seu grau de compactação cromatínica. As espermatogônias do tipo B possuem núcleo redondo com cromatina condensada em áreas próximas ao envoltório nuclear e na região central do nucléolo. O citoplasma da espermatogônia cora-se fracamente, é finamente granular e pode conter uma estrutura denominada de cristal de Lubarsch (Burgos *et al.*, 1970).

Os espermatócitos primários entram em divisão meiótica. Ao fim da meiose I são formados os espermatócitos secundários que prosseguem na meiose II para a formação das espermátides (Courot *et al.*, 1970).

Os espermatócitos primários são semelhantes às espermatogônias do tipo B, apesar de seu núcleo ser menor. Sua localização ainda é externa sendo que freqüentemente entram em contato com a parede do túbulo (Burgos *et al.*, 1970).

Os espermatócitos secundários são menores e seu núcleo é esférico com cromatina granular e "clara". Rapidamente entram em meiose II, sendo seu tempo de duração no interior dos túbulos seminíferos bastante curto. Esse fato explica a relativa dificuldade de observação de células neste estágio de diferenciação (Burgos *et al.*, 1970).

As espermátides recém formadas são semelhantes aos espermatócitos secundários, com citoplasma fracamente corado e complexo de Golgi próximo ao núcleo. Também estão presentes mitocôndrias, ribossomos, retículo endoplasmático, centríolos e gotículas de lipídios no citoplasma (Burgos *et al.*, 1970; Courot *et al.* 1970).

A espermiogênese é um processo complexo de diferenciação das espermátides que se estende até a liberação dos espermatozóides no lúmen do túbulo (Steinberger & Steinberger, 1975).

A seguir são descritas as diferentes fases da espermiogênese.

Na fase do Golgi são formados grânulos pró-acrossomais na região do complexo de Golgi, ricos em glicoproteínas, que se fundem numa grande vesícula acrossomal. Esta, por sua vez, migra em direção ao núcleo e se posiciona próxima ao envelope nuclear. Este evento define a polaridade da espermátide. Concomitantemente há migração das mitocôndrias para a periferia celular e o posicionamento dos centríolos, opostos ao acrossomo em formação. O centríolo proximal se liga ao núcleo (fossa de implantação) enquanto que o distal induz a produção do flagelo.

Na próxima fase de "cap", a cobertura acrossômica chega a envolver metade do núcleo. Nesta região o envelope nuclear se apresenta denso e sem poros.

Na fase acrossomal há alongamento e condensação nuclear, ao mesmo tempo em que ocorre orientação da espermátide que se posiciona paralelamente ao eixo do túbulo seminífero. O núcleo continua em processo de alongamento e assume aparência progressivamente escura, até tornar-se homogêneo. O acrossomo para de crescer e o Golgi migra livremente para o citoplasma. Forma-se a manchete, uma associação de microtúbulos na porção posterior do núcleo. Após o final do alongamento nuclear esta estrutura desaparece. Na região da fossa de implantação é formada a peça intermediária do espermatozóide. O ânulus, estrutura em forma de anel próxima ao centríolo, migra em direção ao flagelo. As mitocôndrias associam-se na região da peça intermediária.

A fase final, fase de maturação, envolve a eliminação do citoplasma através de corpos residuais e a liberação dos espermatozóides no lúmen do túbulo, sendo que outras alterações podem ocorrer posteriormente completando a maturação do espermatozóide (Fawcett, 1975a).

O espermatozóide é a célula resultante de todas as transformações ocorridas durante a espermatogênese, sendo o responsável pelo processo de fertilização do óvulo. Sua estrutura consta de 2 regiões básicas: a cabeça, contendo acrossomo e núcleo, e a cauda que é subdividida em 4 segmentos: pescoço, peça intermediária, peça principal e peça terminal (Burgos *et al.*, 1970) (FIGURA 2). O núcleo é caracterizado por uma massa compacta de cromatina condensada, de aparência densa e homogênea, devido à presença de protaminas. Em várias espécies estas proteínas substituem as histonas no processo de empacotamento do DNA nos espermatozóides alterando a estrutura de solenóide do DNA presente nas células somáticas. Desta

forma é atingida uma estrutura cromatínica neutra, insolúvel, conservando determinado volume e protegendo o DNA de influências externas (Balhorn, 1982; Risley *et al.*, 1986). O acrossomo chega a ocupar 2/3 anteriores do núcleo, e a região da cabeça apresenta áreas especializadas de membrana relacionadas à capacidade de fertilização (Fawcett, 1975a).

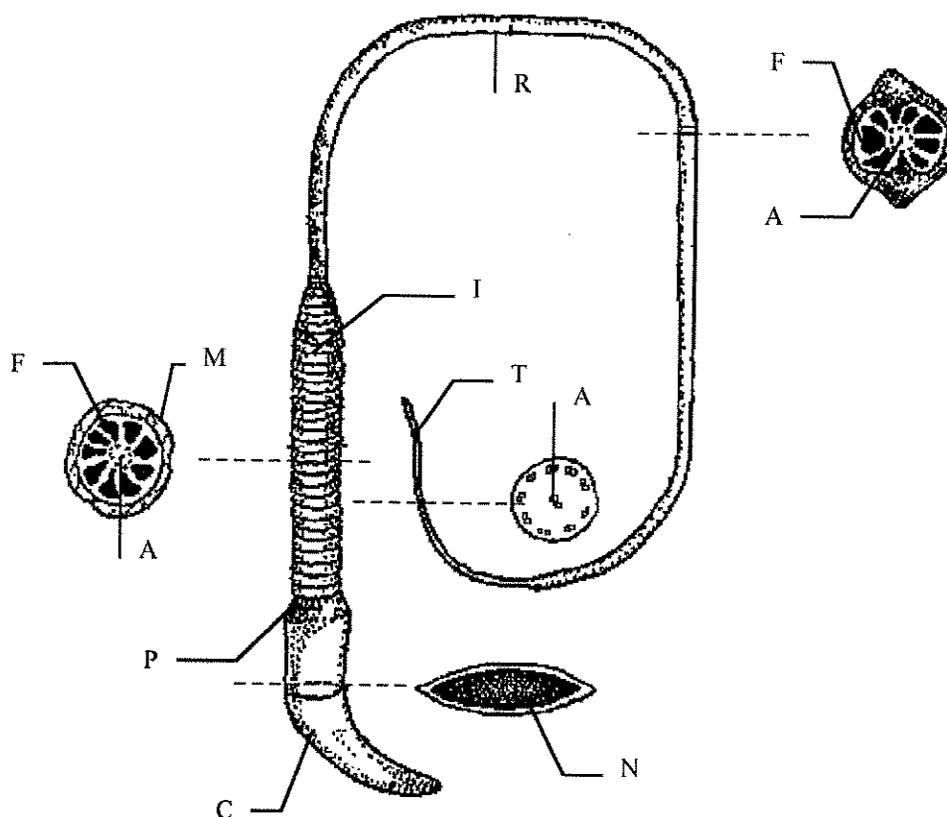


FIGURA 2: Esquema de espermatozoide com cortes transversais de suas partes principais. Estão esquematizados a cabeça (C), pescoço (P), peça intermediária (I), peça principal (R) e peça terminal (T). No cortes transversais pode ser observado núcleo (N), axonema (A), fibras externas (F), mitocôndrias (M).

O pescoço possui 2 centríolos, 9 colunas segmentadas que compõe a peça de conexão e uma placa basal.

A peça intermediária apresenta axonema com conformação típica 9+2, 9 fibras externas e as mitocôndrias modificadas orientadas circunferencialmente ao redor das outras estruturas.

A peça principal é formada por axonema, fibras externas e uma camada fibrosa que afinam progressivamente em direção à peça terminal.

A peça terminal é formada por um complexo microtubular central, de forma desorganizada, coberto por plasmalema.

A espermatogênese não termina com a liberação dos espermatozóides no lúmen tubular. Em algumas espécies ocorrem modificações nestas células ao longo do epidídimo, havendo variação no padrão de motilidade e aquisição de capacidade fertilizante (Fawcett, 1975a).

I.2. Natureza sincicial das células germinativas

A espermatogênese em mamíferos de um modo geral é caracterizada pela existência de pontes citoplasmáticas entre células germinativas em um mesmo estágio de desenvolvimento. Estas associações resultam de citocinese incompleta, sendo a base da sincronia existente no processo de diferenciação (a coordenação geral do processo depende também das associações entre células germinativas e células de Sertoli, via nexos atípicos em complexos juncionais únicos). Este sincício pode ser caracterizado como um clone de células até o estágio de espermátócitos, quando ocorrem as recombinações, passando então a heterocarionte (Fawcett, 1975a).

A extensão desta associação é bastante reduzida durante a diferenciação uma vez que há degeneração de aproximadamente 30% - 50% de espermatogônias e espermátócitos (Fawcett, 1975a; Johnson *et al.*, 1983).

I.3. Onda seminífera

As células germinativas não estão arranjasdas ao acaso, mas em associações celulares definidas ao longo do túbulo (Von Ebner, 1871). Uma classificação destas associações, segundo Leblond e Clermont (1952a,b) permitiu a identificação de 14 tipos, sendo que alguns ainda podem ser subdivididos em segmentos. Cada associação celular sempre é seguida de outra adjacente, garantindo continuidade da ordem segmental. Esta seqüência de associações não ocorre necessariamente em ordem segmental descendente, o que constitui o fenômeno de modulação, presente em 80% das ondas seminíferas (Perey *et al.*, 1961). Em cada túbulo seminífero são desenvolvidas várias ondas seminíferas, sendo que o comprimento destas é inconstante, o que pode ser facilmente entendido devido à presença de modulações.

Cada uma das fases da onda seminífera pode ser reconhecida através do padrão de transiluminação, uma vez que em cada estágio estão presentes diferentes associações celulares conferindo padrão de absorção de luz típico. A característica mais marcante refere-se à presença de espermatídes em diferentes graus de maturação, as quais devido à condensação nuclear que apresentam conferem padrão escuro crescente. Outra forma de identificar estes estágios é através de testes bioquímicos devido à presença de enzimas envolvidas na maturação das espermatídes e na destruição dos corpos residuais, como por exemplo a detecção de fosfatase ácida (Parvinen & Vanha-Pertula, 1972)

A onda seminífera corresponde à cinética do processo de espermatogênese (Steinberger & Steinberger, 1975).

I.4. Ciclo seminífero

Este é um conceito temporal que se refere à sucessão das 14 associações entre os diferentes tipos celulares presentes no epitélio germinativo, cada uma destas associações sendo compreendida como um estágio do ciclo. A duração do ciclo corresponde ao tempo decorrido entre o aparecimento de duas associações celulares iguais em determinada área do túbulo (Percy *et al.*, 1961). O uso de autoradiografia demonstra que o ciclo seminífero em ratos corresponde a 12 dias, (com erro de 0,2) (Clermont *et al.*, 1959).

I.5. Epitélio germinativo

O epitélio germinativo é composto por duas populações celulares: as células germinativas, que são as espermatogônias, os espermatócitos, as espermatídes e os espermatozóides; e as células somáticas, denominadas de células de Sertoli (Fawcett, 1975a) (FIGURA 3).

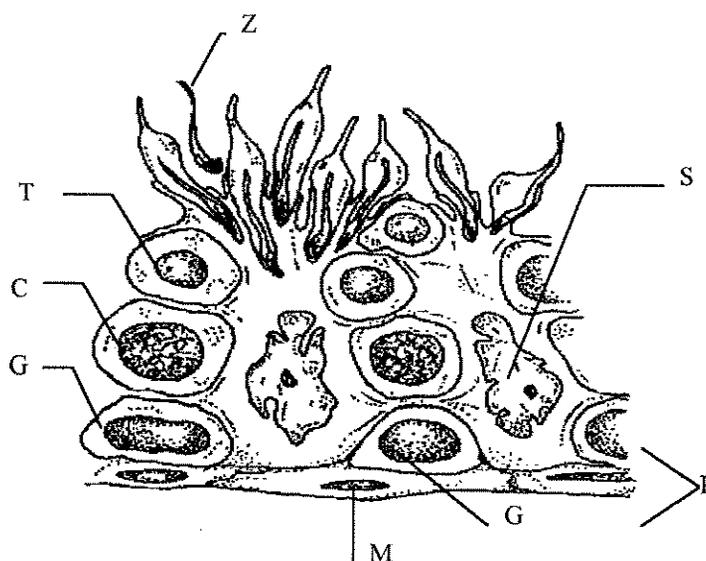


FIGURA 3: Esquema de epitélio seminífero. Podem ser observadas as células de Sertoli (S), e as diferentes populações germinativas (G - espermatogônias, C - espermatócitos, T - espermatídeos e Z - espermatozóides). A parede tubular (P) e as células mióides (M) também estão representados.

I.6. Células de Sertoli

As células de Sertoli constituem uma população de células suporte, não proliferativas. Sua forma é basicamente colunar com vários processos ramificados. A base da célula, mais volumosa e contendo núcleo e organelas se localiza na base do túbulo. As ramificações da célula atingem o lúmen do túbulo. Sua forma elaborada permite associação íntima com as células germinativas (Fawcett, 1975a; Ritzén *et al.*, 1989; Griswold, 1995) (FIGURA3), além de mediar a movimentação destas últimas (Russell, 1977b; Russell *et al.*, 1989).

O núcleo destas células caracteriza-se por sua forma ovóide e a presença de nucléolo desenvolvido tripartido (núcleolo e dois corpos justanucleolares). São encontradas algumas organelas com características típicas nestas células. Apresentam mitocôndrias numerosas de forma alongada e configuração ortodoxa, sendo que as basais não possuem orientação aparente, enquanto que as colunares estão paralelas ao eixo da célula. O complexo de Golgi apresenta-se na forma de vários elementos

separados (Fawcett, 1975b). A localização do complexo de Golgi varia de acordo com o ciclo epitelial, sendo preferencialmente basal, tornando-se média a apical nos estágios VII-IX do ciclo epitelial (Ueno, 1991). A alteração da localização do Complexo de Golgi nas células de Sertoli ao longo do ciclo seminífero deve estar diretamente relacionada a função desta célula. Nestes estágios (VII - VIII) ocorre secreção do ativador plasminogênico, espermição e movimento dos processos citoplasmáticos ao redor dos espermátocitos em leptóteno (Lacroix *et al.*, 1977;1981 e Vihko *et al.*, 1984).

Também estão presentes lisossomos, retículo endoplasmático rugoso (basal) e liso (especialmente abundante, relacionado às atividades secretoras). A matriz citoplasmática é filamentososa, composta por filamentos e microtúbulos, podendo conter inclusões como gotículas de lipídio, glicogênio e outras (Fawcett, 1975b).

As células de Sertoli estão associadas às adjacentes por meio de junções "occludens", caracterizadas por estreitamento do espaço intercelular, condensação de filamentos no citoplasma adjacente e orientação paralela de cisternas de retículo endoplasmático liso (Fawcett, 1975b). Estas junções delimitam o epitélio germinativo em dois compartimentos: compartimento basal, contendo espermatogônias e espermátocitos em pré-leptóteno e leptóteno; compartimento adluminal, contendo espermátocitos mais maduros e espermátides. Desta forma o compartimento adluminal fica isolado das proteínas circulantes no plasma, sendo as células de Sertoli responsáveis pela nutrição das células germinativas aí presentes. Estes complexos juncionais formam um sítio morfológico denominado barreira hemato-testicular (Dym & Fawcett, 1970; Ritzén *et al.*, 1989; Griswold, 1995).

Outro tipo de associação envolvendo as células de Sertoli são junções tipo desmossomo entre as células de Sertoli e as células germinativas, espermatogônias, espermátocitos e espermátides não-alongadas. Nestas junções o citoplasma da célula de Sertoli adjacente apresenta convergência de fibrilas, o mesmo não acontecendo com a célula germinativa relacionada. Estes sítios de junção caracterizam áreas extremamente adesivas entre estas populações celulares (Russell, 1977a).

Por meio destas diferentes associações celulares ocorre o movimento das células germinativas através dos compartimentos basal e adluminal do túbulo seminífero. As espermatogônias mantêm-se no compartimento basal, fortemente ligadas à membrana basal por hemi-desmossomos, enquanto que os espermátocitos

em pré-leptóteno são os primeiros tipos celulares a perderem contato com esta membrana. O contato com as células de Sertoli é mantido de forma intensa e variada, direcionando o transporte das células germinativas, através de diferentes sítios de ligação. Não há movimento amebóide das células germinativas, que assumem um papel passivo no processo. Já as células de Sertoli participam ativamente lançando expansões entre as células em leptóteno e a membrana, empurrando-as. Estes movimentos envolvem certos elementos citoplasmáticos das células de Sertoli, como microtúbulos e microfilamentos (Russell, 1977b; Russell *et al.*, 1989; Ritzén *et al.*, 1989).

Da mesma forma, a espermiacção está sujeita à interferência da célula de Sertoli. Através de microtúbulos citoplasmáticos ocorrem tanto o movimento das espermatídes em direção ao lúmen do túbulo, quanto o movimento dos corpos residuais em direção à porção basal das células de Sertoli, permitindo a degradação dos fragmentos celulares fagocitados pelos lisossomos aí presentes. A característica de contratibilidade das células mióides auxilia no transporte dos espermatozóides (Clermont, 1958; Ritzén *et al.*, 1989).

As células de Sertoli são responsáveis por várias funções fundamentais à espermatogênese (Fawcett, 1975b; Ritzén *et al.*, 1989; Griswold, 1995):

- Compartimentalização em seus processos laterais das células germinativas e proteção através da barreira hemato-testicular, fornecendo um micro-ambiente favorável;

- Nutrição das células germinativas;

- Influência no processo de diferenciação, devido ao controle hormonal (sua influência é basicamente local);

- Função esteroidogênica, pela conversão de pregnonelona e progesterona em testosterona, sob condições especiais;

- Função secretória, secreção fluida, secreção de proteína ABP (proteínas que se ligam a andrógenos), calmodulina, ativador plasminogênico e inibina;

- Movimentação das células germinativas em direção ao lúmen;

- Liberação de espermatídes maduras na luz do lúmen;

- Fagocitose de corpos residuais.

- Síntese de glicoproteínas

I.7. Túbulo seminífero

O túbulo seminífero é limitado por um complexo membranoso de 1 μm de espessura, composto por duas lamelas concêntricas constituídas de matriz extracelular homogênea, que envolve uma camada única de células achatadas. A lamela externa é simples, composta por material homogêneo e algumas fibras colagênicas. Já a lamela interna é composta por três camadas: interna, material homogêneo de densidade moderada; intermediária, com fibras colagênicas mais ou menos paralelas em relação ao eixo do túbulo; externa, similar à interna (Clermont, 1958).

O espaço entre as duas lamelas é ocupado pelo citoplasma de células mióides, caracterizadas por localização central das organelas, invaginações na superfície e capacidade contrátil. A presença destas células permite a movimentação da parede do túbulo, que se estende por grandes áreas em direção a rede testicular, podendo estar relacionado à liberação de espermatozóides. São células mióides peritubulares, assim denominadas por se localizarem externamente ao túbulo e possuírem contratibilidade (Clermont, 1958).

I.8. Testículo

Os túbulos seminíferos no interior dos testículos são arranjados na forma de arcos localizados lado a lado, sendo que podem estar mais internos ou externos, bastante convolutos e geralmente com duas ligações com a rede testicular (Clermont & Huckins, 1961) (FIGURA 1).

O tecido intertubular dos testículos de mamíferos, apesar de algumas variações específicas, é composto de tecido conjuntivo frouxo, rede de vasos linfáticos e sanguíneos e algumas populações celulares (Burgos *et al.*, 1970).

Os vasos sanguíneos (capilares, arteríolas e vênulas) aparecem apenas ocasionalmente em contato com as células do tecido intersticial. Os vasos linfáticos aparecem próximos à parede dos túbulos, às vezes próximos aos vasos sanguíneos.

As células de Leydig são células grandes, poligonais, localizadas em espaços angulares entre os túbulos, freqüentemente associadas a vasos linfáticos e sanguíneos. Seu núcleo é esférico e a superfície apresenta várias microvilosidades. A característica citoplasmática que mais se destaca é a abundância de retículo

endoplasmático liso, característico de células secretoras de esteróides. Sua principal função sobre a espermatogênese diz respeito ao controle hormonal, através da secreção de testosterona.

Células fusiformes localizam-se em contato com a parede tubular ou túnica adventícia dos vasos sangüíneos. Seu núcleo possui forma ovóide e apresenta grânulos periféricos. Acredita-se serem predecessoras das células de Leydig.

Células claras são pequenas células de forma cubóide irregular ou levemente oblonga. Sua localização ao acaso deve relacionar-se a outras populações celulares facultativas no testículo, como é o caso de plasmócitos, macrófagos, leucócitos e mastócitos.

A lâmina basal do túbulo possui elementos colagênicos, componentes fibrosos e material amorfo, sendo que a matriz regula a função celular, daí sua importância.

O conjunto dos túbulos seminíferos convolutos e tecido intersticial compõem o parênquima testicular. O testículo é externamente revestido por uma cápsula composta por três camadas distintas: a camada externa que é uma membrana serosa, denominada túnica vaginalis; a camada intermediária que é uma estrutura fibrosa, denominada túnica albugínea; a camada interna que é formada por tecido conjuntivo frouxo e vasos sangüíneos, denominada túnica vascular ou testicular. A parte posterior da túnica vascular se espessa formando o mediastino, que divide o interior do testículo em vários lóbulos (Davis *et al.*; 1970; Setchell & Pilsworth, 1989).

1.9. Regulação hormonal

Todo o processo de espermatogênese está sob controle hormonal. São vários os hormônios que agem sobre diferentes populações celulares influenciando direta ou indiretamente as células germinativas (Fawcett, 1975a; Mather, 1984; Sharpe, 1987; Matsumoto, 1989).

A regulação hormonal parácrina é fundamentada em dois hormônios hipofisários : o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH).

O LH age sobre as células de Leydig estimulando a produção de andrógenos, principalmente de testosterona (Steinberger & Steinberger, 1970; Steinberger *et al.*, 1970; Mather, 1980; Mather *et al.*, 1982; Mather, 1984; Matsumoto, 1989; Toppari *et al.*, 1989). Os andrógenos têm função sobre a manutenção qualitativa da

espermatogênese (age sobre as células de Sertoli, ativando a produção de ABP e sobre as células peritubulares) (Sharpe, 1987), sobre a manutenção das glândulas secundárias e a sustentação da libido, além de provocarem controle negativo sobre a hipófise (Adashi & Hseuh, 1981). A localização destas células no tecido intersticial do testículo garante concentração hormonal elevada no local e baixa na circulação, o necessário para o desempenho de sua função (Matsomoto, 1989).

O papel do FSH na espermatogênese é bastante controverso (Steinberger *et al.*, 1969; 1970, Fawcett, 1975a; Chemes *et al.*, 1979; Louis & Fritz, 1979; Mather, 1980; Lacroix, 1981; Mather *et al.*, 1982; Parvinen *et al.*, 1983; Mather, 1984; Sharpe, 1987; Matsumoto, 1989; Toppari *et al.*, 1989; Kangasniemi *et al.*, 1990a,b). A atuação deste hormônio na iniciação da espermatogênese é bem aceita, inclusive sua ação sobre as células de Sertoli para dirigir sua diferenciação (Steinberger *et al.*, 1969; Matsumoto, 1989).

No animal adulto, o FSH é essencial para a manutenção da espermatogênese quantitativa (Kangasniemi *et al.*, 1990a) ou qualitativa (Steinberger *et al.*, 1970). Outros experimentos dispensam a presença do FSH para a manutenção da espermatogênese (Chemes *et al.*, 1979; Parvinen *et al.*, 1983), ou ainda atribuem a este hormônio a função de induzir o metabolismo e não o ciclo celular (Welch *et al.*, 1979), sendo improvável seu papel sobre a proliferação (Kangasniemi *et al.*, 1990a; Steinberger *et al.*, 1970).

A ação do FSH sobre o metabolismo é realizada através de sinais citoplasmáticos desencadeados pela ligação do hormônio com o receptor de membrana nas células de Sertoli. Esta ligação estimula a síntese de AMPc, em seguida de quinase e por fim a síntese de proteínas. A ligação do hormônio com os receptores é máxima nos estágios XIII, XIV e I do ciclo seminífero, sendo a produção de AMPc dependente de FSH máxima nos estágios seguintes, II-IV (Parvinen *et al.*, 1980; Lacroix & Fritz, 1982; Ritzén *et al.*, 1982; 1989; Kangasniemi *et al.*, 1990a,b).

As células de Sertoli possuem número constante de receptores para FSH, sendo que as variações cíclicas de ação deste hormônio devem estar relacionadas a processos de modulação. Uma forma de regulação da resposta ao FSH ocorre através da síntese de glicoproteínas (Wright *et al.*, 1981; Griswold, 1995) e outros fatores (Lacroix *et al.*, 1981) de forma cíclica que parece resultar na ligação diferencial do FSH com a membrana da célula de Sertoli (Parvinen *et al.*, 1980).

Kangasniemi e colaboradores (1990a) demonstraram que as células de Sertoli apresentam resposta ao FSH de forma cíclica devido a associações celulares específicas de cada estágio do ciclo seminífero em questão. Assim, a presença de determinadas células germinativas influenciariam na resposta das células de Sertoli ao hormônio, constituindo uma forma de regulação parácrina. Nas células de Sertoli a resposta ao FSH deve ser mediada através de proteínas das espermatogônias. Parte do AMPc encontrado no interior dos túbulos seminíferos em resposta ao FSH é produzido por espermátides estimuladas por algum fator dependente de FSH produzido nas células de Sertoli (Kangasniemi *et al.*, 1990a). Outra forma de regulação cíclica da resposta ao hormônio seria realizada através da proteína Gi, que inibiria a transdução do sinal dos receptores de FSH para AMPc em determinados estágios do ciclo seminífero (VII-VIII) (Hughtaniemi *et al.*, 1989). Também foi constatada a presença de receptores deste hormônio nas espermatogônias (Kangasniemi *et al.*, 1990a).

Outra ação do FSH sobre as células de Sertoli é a indução à produção da proteína ABP (“androgen protein binding”), responsável pela manutenção da concentração de andrógenos e também servindo como veículo para estes (Fawcett, 1975a). A produção desta proteína é máxima nos estágios VII-XII do ciclo seminífero (Lacroix *et al.*, 1981; Ritzén *et al.*, 1982; Tung & Fritz, 1986).

A progesterona é um outro hormônio que tem certa influência na espermatogênese. Este atua sobre a membrana dos espermatozóides, elevando os níveis de cálcio livre no citosol e desencadeando a reação acrossômica (Meizel & Turner, 1991).

Ainda sobre substâncias que não são sintetizados no testículo mas que influenciam as células germinativas, temos a ação da hidrocortisona, da insulina, de fatores de crescimento (EGF), do lactato, do piruvato, do mioinositol e das sulfoproteínas (condroitina e heparina) sobre as células de Sertoli. Ênfase especial deve ser dada às vitaminas A, C e E, bem como à glutamina. Estes elementos são essenciais para a espermatogênese (Steinberger & Steinberger, 1966; Steinberger *et al.*, 1969; Steinberger & Steinberger, 1970; Steinberger *et al.*, 1970; Mather, 1980; Blaner *et al.*, 1987; Huang *et al.*, 1989; Rajan *et al.*, 1990; Van Pelt & Rooij, 1991). No caso da vitamina A (retinóides), seu envolvimento acontece ao nível de regulação da proliferação e da diferenciação (Blomhoff *et al.*, 1990).

Com relação à regulação autócrina as células de Sertoli, estas respondem à testosterona e às prostaglandinas secretadas pelas células de Leydig. As células de Leydig, por sua vez, respondem a gonadotrofinas e prostaglandinas, além de produzir estrógenos a partir da testosterona, ativando a secreção de ABP (Steinberger & Steinberger, 1970; Toppari *et al.*, 1989). Recentemente foi proposto que as células de Leydig podem ser induzidas a produzir testosterona devido a ação de fatores ainda não determinados, modulados por FSH e secretados pelos túbulos seminíferos (MacFarlane *et al.*, 1994). São produzidas pelas células de Sertoli transferina, ceruloplasmina e ativador de plasminogênio. O ativador de plasminogênio pode estar envolvido em diferentes funções como a liberação de espermátocitos em pré-leptóteno (Russell, 1977b), reestruturação do epitélio seminífero (Lacroix *et al.*, 1977), proteólise, fagocitose de corpos residuais e espermição (Vihko *et al.*, 1984). Outras funções das células de Sertoli, mas dependentes de FSH, incluem proliferação das espermatogônias, maturação final das espermátides e desencadeamento do processo de meiose (Kangasniemi *et al.*, 1990a).

I.10. Estudo da espermatogênese *in vitro*

A espermatogênese é um processo complexo envolvendo interações celulares específicas e pode ser vista como amplo campo de estudos envolvendo ação hormonal, meiose, expressão gênica, morfogênese e diferenciação, entre outros.

A idéia de individualização do processo espermatogênico através da aplicação de sistemas de cultura mostra-se atraente quando consideramos o isolamento de fatores externos indesejáveis que dificultam ou confundem a análise dos resultados obtidos com experimentos *in vivo*. A redução no tempo do experimento, diminuição dos custos e objetividade dos resultados constituem algumas das vantagens dos sistemas de cultura. É possível a descrição do processo espermatogênico, o entendimento de suas fases e relações morfológicas e bioquímicas e estudos específicos de agentes externos como para estudos toxicológicos (Abé, 1987).

No entanto, por ser um processo complexo, dependente de diversos fatores externos e interações celulares, é susceptível a alterações estruturais e de seus componentes. O sistema de cultura implica em extensa perturbação estrutural e uma condição artificial, sendo necessária interpretação cuidadosa dos resultados obtidos

através desta técnica. É indispensável a confirmação dos resultados com testes realizados *in vivo*.

A intenção ao se aplicar qualquer sistema de cultura é de reproduzir da melhor maneira possível as condições encontradas no organismo, para o sucesso da técnica. É fundamental que se estabeleça as diferenças entre os sistemas *in vivo* e *in vitro* para que seja possível relacionar estrutura e função a partir das possibilidades apresentadas pelo sistema de cultura (Russell & Steinberger, 1989). As condições oferecidas na cultura devem permitir que as células em questão se acomodem à esta nova situação, evitando o máximo possível de degeneração celular (Seidl & Holstein, 1990).

A primeira tentativa de cultura primária de gônadas masculinas de mamíferos foi realizada por Champy (1920) que utilizou testículos de coelhos embrionários e adultos, mas as células germinais desapareciam.

As técnicas de culturas espermatogênicas foram se aprimorando na tentativa de reduzir as perturbações introduzidas e de fornecer as condições para o desenvolvimento das células envolvidas (Abé, 1987).

A cultura de células isoladas representa um sistema que, apesar de envolver um alto grau de desorganização estrutural, possibilita o controle das condições nutricionais de um tipo celular específico, bem como a ampliação *in vitro* de determinada população celular. Há facilidade de obtenção dos nutrientes oferecidos através do meio de cultura pelo contato direto das células. A técnica de cultura de células pode ser empregada para o estudo da resposta celular à ação de hormônios ou proteínas, podendo-se estudar mais objetivamente respostas metabólicas que mediam a interação entre os diferentes tipos celulares do epitélio seminífero, agentes tóxicos ou condições do meio (como variações de temperatura). Esta técnica de cultura direcionada para a espermatogênese emprega principalmente células de Leydig (Mather, 1980; Mather *et al.*, 1982; Mather, 1984; Centol *et al.*, 1988) e células de Sertoli (Lacroix *et al.*, 1977; Welch *et al.*, 1979; Mather, 1980; Mather *et al.*, 1982; Mather, 1984; Anthony & Skinner, 1989; Russell & Steinberger, 1989; Davis *et al.*, 1990; Handelsman *et al.*, 1990; Faraonio *et al.*, 1993). Para a cultura de células de Sertoli foi desenvolvido um método de duas câmaras que permite o crescimento celular em monocamada aproximando-se a tal ponto das condições *in vitro* que é possível reproduzir a formação da barreira hemato-testicular (Janecki *et al.*, 1992). Pode ser realizada também cultura de células mióides (Tung & Fritz, 1990).

Outra técnica empregada é a de co-cultura de células. A espermatogênese é um processo que envolve diferentes interações celulares, e assim muitas respostas celulares estão relacionadas a mais de um tipo celular. São realizadas co-culturas de células de Sertoli e células mióides (Tung & Fritz, 1986; Sang *et al.*, 1990; Raychowdhury *et al.*, 1993), células de Sertoli e células de Leydig (Lejeune *et al.*, 1993) e de células de Sertoli e células germinativas (Fujisawa *et al.*, 1992).

Na tentativa de se manter a integridade estrutural durante a cultura pode-se optar pela técnica de cultura de órgãos. Neste sistema pequenos fragmentos de testículo são cultivados em meio de cultura específico. Além das relações estruturais entre os elementos germinativos, também são mantidos os elementos intersticiais, fundamentais para a regulação hormonal. Mesmo cultivando pequenos fragmentos de testículo, a estruturação tridimensional do órgão dificulta a difusão de nutrientes por todo o explante, principalmente nas áreas centrais. Mas esta técnica permite uma avaliação mais ampla das respostas celulares se comparada à cultura de células, justamente por manter todas as relações estruturais presentes no organismo do animal. A complementação do meio de cultura deve ser rigorosa de forma a suprir as alterações causadas ao explante pela técnica da cultura, evitando a degeneração celular (Steinberger & Steinberger, 1966; 1969; Boitani *et al.*, 1993).

Uma variação da técnica de cultura de órgãos é a cultura de fragmentos de túbulos seminíferos. Nesta técnica são mantidas as relações estruturais entre as células germinativas, as células suporte (Sertoli) e as células da parede do túbulo seminífero (mióides). As dimensões dos fragmentos empregados são reduzidas em relação a fragmentos de testículo, facilitando a nutrição das células encontradas no interior dos túbulos seminíferos (Perez-Ramirez & Castells, 1991). Para o acompanhamento dos fragmentos em cultura pode ser utilizada a técnica de transiluminação (Parvinen & Vanha-Pertula, 1972) ou microscopia de fase, permitindo a análise dos materiais *a fresco*, sendo que fragmentos de testículos requerem técnicas histológicas para seu acompanhamento (Abé, 1987). Na técnica de transiluminação o material é observado ao microscópio invertido, possibilitando a análise dos tipos celulares presentes por diferenças de absorção de luz, principalmente no caso das espermátides devido ao grau de condensação nuclear que estas células exibem. Já o microscópio de fase permite observar as diferenças de índice de refração entre o material observado e o meio em que este está embebido.

Pelo fato da técnica de cultura de túbulos seminíferos manter as relações estruturais, esta permite o acompanhamento do processo da espermatogênese, desde que a cultura seja realizada com sucesso. Novamente é fundamental a complementação nutricional do meio de cultura para o bom desenvolvimento celular, evitando degenerações (Abé, 1987).

I.11. Cultura de túbulos seminíferos

Ellingson & Yao (1970) cultivaram pedaços de túbulos seminíferos de hamster Chinês, conseguindo observar a divisão meiótica dos espermatócitos num período de até 72 horas.

Para que seja possível o acompanhamento do desenvolvimento e diferenciação celular é necessário que sejam empregadas técnicas que permitam a identificação dos tipos celulares em cultura desde o seu início. Para isto podem ser usados testículos de animais que sofreram criptorquidismo, resultando na presença de apenas espermatogônias tipo A nos túbulos seminíferos, uma vez que todos os outros tipos celulares não resistem a esta condição (Abé, 1987). Outra forma de controle do processo da espermatogênese é feita por meio de autoradiografia (Ghatnekar *et al.*, 1974; Curtis, 1981; Parvinen *et al.*, 1983).

Também pode-se irradiar o túbulo com raio-X, eliminando as espermatogônias (Vihko *et al.*, 1984). É possível estudar a relação entre as diferentes populações celulares presentes ou restantes no túbulo. À medida em que a espermatogênese é retomada temos populações se restabelecendo, assim como as interações entre estas e as células de Sertoli (Kangasniemi *et al.*, 1990a).

Um método mais simples de se determinar se houve diferenciação e qual sua extensão, além de permitir a escolha de determinado estágio do ciclo celular para o acompanhamento pode ser realizado através da identificação dos estágios da espermatogênese por transiluminação. Cada estágio do ciclo seminífero possui características de absorção de luz, além de outras, que permitem sua identificação (Parvinen & Vanha-Perttula, 1972). Como cada estágio apresenta interações celulares características e metabolismo específico é possível estudar o efeito de uma substância em cada um deles (Kangasniemi *et al.*, 1990b).

Foram obtidos resultados encorajadores com a técnica de cultura de túbulos seminíferos apesar das dificuldades da técnica (Seidl & Holstein, 1990). É o caso do trabalho de Parvinen e colaboradores (1983) que observaram diferenciação do estágio XIII, chegando à espermatíde. Este estudo também traz outro dado importante quando relata que para a diferenciação deste estágio a utilização de hormônios no meio de cultura não têm influencia alguma, simplificando bastante a técnica. Em oposição temos o exemplo da cultura de segmentos do estágio VIII que requer complementação com FSH e do estágio VI que requer complementação com testosterona, FSH, insulina e ácido retinóico.

A aplicação de hormônios à cultura substituindo o soro fetal bovino, comumente utilizado como suplemento hormonal aos meios de cultura, vem sendo amplamente investigada após a primeira tentativa realizada por Trowell (1959) (Steinberger & Steinberger, 1966; 1969; Steinberger *et al.*, 1970; Hayashi & Sato, 1976; Lacroix *et al.*, 1977; 1981; Mather *et al.*, 1982; Parvinen *et al.*, 1983; Toppari *et al.*, 1986; Kangasniemi *et al.*, 1990a,b; Seidl & Holstein, 1990; Boitani *et al.*, 1993). A cultura livre de soro complementada com hormônios e outros nutrientes específicos permite a avaliação mais correta da ação destas substâncias sobre o material. Quando complementamos com o soro não estamos reproduzindo a mesma situação encontrada *in vivo*.

No caso dos túbulos seminíferos, o meio circundante é bastante seletivo, a presença do soro acaba por ativar populações celulares inespecíficas, como células mióides, sendo esta condição nem sempre desejada. A dificuldade do emprego da técnica de complementação ocorre devido à complexidade de fatores que agem sobre as células em estudo (Maurer, 1986).

Outro trabalho bem sucedido utilizando cultura de túbulos seminíferos permitiu a observação de atividade biosintética das células em cultura, sendo que o acompanhamento da síntese de polipeptídeos se bascou em autoradiografia (Perez-Ramirez & Castells, 1991).

I.12. Toxicidade de metais pesados, com ênfase para o efeito do cádmio sobre o testículo

Com a expansão industrial, houve a necessidade da exploração de certos metais como matéria-prima em processos de refinaria e metalurgia. Desta forma, mesmo metais raros presentes em baixíssima concentração no meio ambiente tal como cádmio, que é o 67º elemento em abundância na crosta terrestre, com 0,1 - 0,2ppm, passaram a ser explorados e expostos ao ambiente com mais frequência. Com o aumento das concentrações que estes metais atingem no meio ambiente, devido a sua exploração, aumenta a probabilidade de exposição de diferentes formas de vida a estes metais (Waalkes *et al.*, 1992a).

As fontes de exposição do homem a estes metais não se restringem às áreas industriais, que são as principais fontes de contaminação, onde pode ocorrer contato direto dos metais com os trabalhadores. Através da contaminação ambiental estes metais atingem as mais diversas populações, mesmo aquelas que não têm contato direto com as áreas industriais. Os resíduos industriais de processos de refinaria e metalurgia, que são muito pouco reciclados, bem como a utilização de combustíveis fósseis, incineração de lixo municipal e o uso de certos fertilizantes agrícolas, causam contaminação do solo, ar e água. A longa meia-vida destes metais faz com que estes se acumulem também em plantas e animais. Sabe-se que as plantas têm grande capacidade de acumular metais, podendo ser uma porta de entrada para a cadeia alimentar. Carne bovina, peixes e frutos do mar são importantes fontes de contaminação. Os produtos industriais que possuem metais em sua composição constituem outra fonte de contato, apesar de menos significativa (Waalkes *et al.*, 1992a).

Esta preocupação com relação ao contato do homem com estes metais se deve ao fato dos metais pesados constituírem uma classe emergente de carcinógenos (Waalkes *et al.*, 1992a), entre outros efeitos tóxicos que provocam, como a teratogênese (Earl & Theodore, 1979). As indústrias têm tomado medidas de proteção nos últimos 10-15 anos contra a contaminação de seus trabalhadores por metais (Fishbein, 1981), mas a poluição ambiental é uma fonte importante de contaminação humana (Waalkes *et al.*, 1992a, b).

Alguns metais são necessários para o metabolismo normal das células. São os metais essenciais, como zinco, cromo, cobre e ferro. De aproximadamente 80 metais conhecidos, pelo menos 20 possuem potencialidade tóxica. Mesmo os metais essenciais, em casos de absorção excessiva, podem tornar-se tóxicos, pois há capacidade limitada de armazenamento destes no organismo.

Não se sabe ao certo qual o mecanismo de ação tóxica dos metais. Por serem moléculas simples, em geral não necessitam de ativação, ou seja, as próprias formas iônicas seriam reativas. Isto não significa que seu mecanismo de ação seja simples (Jennette, 1981).

A seguir são citadas algumas das características da toxicidade dos metais.

A concentração dos metais no organismo é um fator primordial de sua ação, daí a preocupação com o acúmulo ao longo de anos de exposição (Gunn & Gould, 1970; Waalkes *et al.*, 1992a, b).

Existe uma relação entre toxicidade e a espécie ou mesmo a linhagem animal atingida (Gunn & Gould, 1970; Waalkes *et al.*, 1992a, b).

Outra característica é a resposta específica de cada órgão ou tecido ao metal. Existe relação com a concentração local do metal ou com a forma de exposição ao metal, como através do contato com a pele, ingestão ou inalação. Esta característica está ligada à capacidade de captação do metal pelas células em questão (Oldereid *et al.*, 1993) e a susceptibilidade dos órgãos e tecidos afetados (Waalkes *et al.*, 1992a). Existem mecanismos de proteção do organismo contra os efeitos tóxicos dos metais, como por exemplo a existência de proteínas capazes de se ligarem aos metais, as quais participam das vias metabólicas dos mesmos. Estas proteínas são capazes de seqüestrar metais e bloquear sua ação. A metalotionina é uma proteína que possui afinidade por cádmio. Em órgãos onde esta proteína está ausente, como no testículo e na próstata, há maior susceptibilidade à toxicidade deste metal (De *et al.*, 1991).

A interação entre metais, por sinergismo ou antagonismo, também constitui uma característica de sua toxicidade (Nordberg & Andersen, 1981; Waalkes *et al.*, 1992a, b). Este fenômeno acontece preferencialmente com metais de propriedades físico-químicas semelhantes, como é o caso do cádmio e do zinco. Em geral estes dois metais são encontrados na natureza associados, na proporção de 1:445 (Earl & Theodore, 1979). O zinco é um metal essencial e o cádmio constitui um tóxico em potencial. Estes dois metais podem atuar de forma competitiva, com relação aos sítios

de ligação, o que caracteriza antagonismo. Mas em determinadas situações pode haver cooperação, de forma que o zinco amplia o efeito tóxico do cádmio, ocorrendo sinergismo (Wahba *et al.*, 1990; Kaji *et al.*, 1993). Além deste exemplo existem várias possibilidades de interação entre metais de natureza semelhante (Nordberg & Andersen, 1981; Waalkes *et al.*, 1992a).

Não é conhecido o mecanismo de ação dos metais tóxicos. Pode ser que estes metais se aproveitem das vias metabólicas utilizadas pelos metais essenciais, como os mecanismos de transporte e os sítios de ligação (Nordberg, 1988). Neste caso nem mesmo os mecanismos de defesa do organismo são capazes de reconhecer o metal tóxico (Jennette, 1981).

O mecanismo de ação parece seguir uma via comum, através de duas formas básicas: genotóxica e não genotóxica. No primeiro caso sua ação é direta sobre o DNA, seja através de danos ou alterações, podendo incluir a ação de enzimas de reparo (Rossman, 1981; Zakour *et al.*, 1981). Quando sua ação não está diretamente relacionada ao genoma pode incluir processos imunossupressivos ou toxicidade crônica, neste caso induzindo indiretamente à formação de tumores (Waalkes *et al.*, 1992a).

A relativa falta de informações sobre a ação dos metais em geral, pode ser entendida a partir das dificuldades do estudo de seus efeitos sobre o organismo (Waalkes *et al.*, 1992a). Podemos começar pela dificuldade em se estabelecer as condições de exposição, já que fontes prováveis de contaminação podem ser variadas. O efeito interativo entre os metais, dificultando ainda mais o estabelecimento destas condições, também prejudica a análise dos resultados obtidos. Além disso temos que considerar a especificidade de ação dos metais com relação ao tecido, órgão, espécie animal, linhagem e indivíduo (Waalkes *et al.*, 1992a) e ainda situações em que o efeito tóxico dos metais pode ser revertido com a interação com outros metais (Nordberg & Andersen, 1981; Waalkes *et al.*, 1991; 1992a).

Por estes fatores pode-se compreender a dificuldade das análises dos dados obtidos em seres humanos, onde nenhuma destas condições pode ser estabelecida com precisão (Oldereid *et al.*, 1993). No entanto, alguns metais são reconhecidamente carcinógenos para seres humanos, como o arsênio, o crômio e o níquel (Waalkes *et al.*, 1991). Apesar da especificidade de ação dos metais em relação à espécie, as dificuldades envolvendo seu estudo em seres humanos levam ao emprego de

experimentos com animais de laboratório para testes de carcinógenos em potencial, podendo estes oferecer maior disponibilidade, redução de tempo e de custos de experimentação (Nordberg, 1988).

Resultados consistentes em laboratório podem levar ao entendimento das condições naturais de exposição e do mecanismo de toxicidade. No entanto, as vias de aplicação em laboratório são invariavelmente artificiais, sendo que por si só podem constituir uma patologia (Waalkes *et al.*, 1992a). Além da via de aplicação, a concentração utilizada também é artificial. Em geral são poucas aplicações de altas doses do metal, e na natureza, o contato ocorre através de pequenas doses ao longo de anos (Waalkes *et al.*, 1992a,b). Mesmo assim os modelos animais servem como um dado adicional da ação destes carcinógenos (Nordberg, 1988; Waalkes *et al.*, 1991,1992a).

Uma alternativa para o estudo da ação específica dos metais de maneira monitorada e envolvendo tecidos e células específicas é o estudo *in vitro* através das técnicas de cultura. Contudo, não podemos tomar este tipo de experimento como regra pois o mesmo possui uma série de limitações, começando pela falta de interação com mecanismos de proteção oferecidos pelo organismo durante o metabolismo do metal, como os mecanismos físicos estabelecidos pelo organismo, por exemplo a barreira hemato-testicular (Dym & Fawcett, 1970; Ritzén *et al.*, 1989) e hemato-cerebral (Walker & Coleman, 1995). Há também mecanismos de proteção metabólicos, como a desintoxicação praticada pelo fígado, por exemplo através da presença de proteínas como as metalotioninas. Por estes fatores, é difícil se identificar as concentrações específicas a que determinada população celular está exposta nas condições *in vivo*. Portanto, este tipo de experimento não pode ser considerado sem o entendimento do conjunto de interações presentes no organismo como um todo. Mas os estudos *in vitro* têm a vantagem de serem rápidos, permitindo que se faça rastreamento de carcinógenos em potencial. Também permitem a identificação das formas ativas dos metais, quanto à toxicidade, uma vez que esta está relacionada com a forma física e química do metal (Gunn & Gould, 1970; Lucis *et al.*, 1970; Sangalang & O'Halloran, 1973; Sirover, 1981; Espevik *et al.*, 1982; Suzuki *et al.*, 1989; Wahba *et al.*, 1990; Janecki *et al.*, 1992; Waalkes *et al.*, 1992a; Von Zieglinicky *et al.*, 1992).

Dentre os metais conhecidos como carcinógenos em potencial para o homem e presentes na natureza, muitas vezes como poluentes ambientais, o cádmio desperta especial interesse. Este fato é justificado pela ação tóxica deste metal sobre os órgãos reprodutores masculinos, afetando profundamente o processo de espermatogênese (Gunn & Gould, 1970). As particularidades deste metal serão descritas a seguir.

O cádmio é um dos elementos raros. Não se conhece a função deste metal no metabolismo, mas sabe-se que ele é capaz de produzir efeitos tóxicos e, por ser pouco excretado, ocorre seu acúmulo no organismo (Lucis *et al.*, 1970; Earl & Theodore, 1979). Encontra-se na natureza na forma de depósitos de sulfatos e óxidos, sendo um dos principais contaminantes do zinco (Waalkes *et al.*, 1992a).

As maiores fontes de contaminação pelo cádmio são provocadas pelo homem na indústria, na agricultura, através de resíduos e por seu uso deliberado, introduzindo maiores concentrações do metal no meio. Sua aplicação na indústria é ampla. Pode ser empregado em processos de galvanização, serve de proteção contra ferrugem, é encontrado em pigmentos (tintas, esmaltes e plásticos), é utilizado como estabilizante de polivinil, em soldas (prata), em ligas (cobre) e em eletrodos de baterias Ni-Cd (Waalkes *et al.*, 1992a, b).

A principal fonte de contaminação do homem pelo cádmio é através da cadeia alimentar. A poluição ambiental possibilita a entrada do cádmio nos diferentes ecossistemas, onde este é translocado e acumulado, antes de haver contaminação direta do homem pela dieta (Rader & Spaulding, 1979). Ocorre também exposição direta nos locais de trabalho, mas as medidas de prevenção têm diminuído este tipo de contaminação (Fishbein, 1981).

O efeito carcinógeno e teratogênico do cádmio em animais tem sido bastante explorado (Nordberg, 1988; Earl & Theodore, 1979). Sua ação em seres humanos também tem sido investigada (Oldercid *et al.*, 1993).

A ação citotóxica do cádmio está relacionada com sua afinidade por grupamentos sulfato, por óxidos e por ligantes contendo nitrogênio. Também é um potente inibidor de sistemas enzimáticos (Earl & Theodore, 1979; Von Zieglinicki *et al.*, 1992; Waalkes *et al.*, 1992a).

Apesar da cadeia alimentar representar a principal via de contaminação, apenas 5% do cádmio ingerido é absorvido pelo trato gastrointestinal (Waalkes *et al.*, 1992b). No entanto é um metal cuja meia-vida é de 25-30 anos (Nordberg, 1988) e

sua excreção se faz em limites estreitos, sendo que qualquer absorção resulta em acúmulo ao longo dos anos (Earl & Theodore, 1979). Com o aumento do contato com o cádmio causado pela expansão industrial, uma pessoa absorve em média 2 μ g de cádmio por dia. Os fumantes estão mais expostos à contaminação, devido ao acúmulo de cádmio nas plantas. Um cigarro contém 1 - 2 μ g de cádmio (Lucis *et al.*, 1970; Waalkes *et al.*, 1992a).

Sabe-se que o cádmio se acumula em vários órgãos, entre eles pulmão, rim, baço, coração, timo, glândula salivar, músculo esquelético, epidídimo, testículo e próstata. Entre 50 - 75% do cádmio absorvido tem como destino fígado e rins. Os órgãos afetados estão diretamente relacionados com as vias de exposição. Estudos envolvendo os efeitos tóxicos do cádmio abrangem um grande número de populações celulares e processos biológicos. Alguns exemplos da toxicidade por cádmio são: inibição da ovulação (Saksena & Salmnsen, 1983), interferência nas junções celulares de populações de células renais (Proziaeck & Lamar, 1993), redução de viabilidade de macrófagos pulmonares (Waseem *et al.*, 1993), inibição da formação e da reabsorção óssea (Iwami & Moriyama, 1993).

Os primeiros detalhes da toxicidade do cádmio nos testículos de animais foram revelados por Parizek & Zahor (1956). Quando injetado na forma de sal solúvel (CdCl₂) em uma única dose parenteral, causa necrose testicular na maioria das espécies de mamíferos estudada. O efeito do cádmio no testículo é dito seletivo, pois dosagens muito baixas que não chegam a afetar outros órgãos causam danos testiculares. Para ratos e camundongos doses de 10 μ M/Kg são capazes de provocar este efeito (Gunn & Gould, 1970).

A necrose testicular causada por cádmio é resultante de várias alterações morfológicas. Doses efetivas (20-40M/Kg) causam hiperemia nas primeiras horas após a administração. A permeabilidade aumenta chegando a ser massiva 2 horas após a aplicação. Sabe-se que o sistema vascular é permeável a várias substâncias, inclusive de alto peso molecular. Normalmente a rede vascular age como barreira seletiva, garantindo um balanço de fluxo de substâncias para o tecido intersticial. Com o aumento da permeabilidade provocado pelo cádmio, a drenagem linfática no local torna-se insuficiente, ocasionando turgescência e aumento de massa testicular (Gunn & Gould, 1970).

A isquemia do testículo é entendida a partir da obstrução vascular. Os fatores sanguíneos envolvidos na normalização do fluxo, como as plaquetas, cooperam para o desequilíbrio local, levando à coagulação intravascular massiva. Assim o fluxo sanguíneo é retardado, há aumento da viscosidade do sangue e aglutinação de eritrócitos, resultando na formação de trombo (Aoki & Hoffer, 1978).

A especificidade de ação do cádmio na rede vascular testicular (plexo pampiniforme) pode ser entendida a partir de suas características estruturais. A artéria espermática interna é convoluta e envolvida por veias para a manutenção da temperatura testicular, resultando em fluxo sanguíneo arterial não-pulsativo. Este efeito do cádmio sobre a rede vascular é portanto característico de animais com testículo escrotal, sensível a temperatura, com vascularização do tipo artéria espermática interna e plexo pampiniforme (Aoki & Hoffer, 1978).

Os efeitos sobre os elementos germinativos seriam resultantes das alterações causadas pela isquemia testicular (Gunn & Gould, 1970; Espevik *et al.*, 1982; Waalkes *et al.*, 1992a).

Em relação aos elementos dos túbulos seminíferos observa-se degeneração das células de Sertoli, diminuição no número de espermatócitos e espermátides, bem como aumento das aberrações cromossômicas em espermatócitos, sugerindo ação do cádmio sobre os microtúbulos do fuso ou sobre ligação destes ao cinetócoro, esfoliação intraluminal das células germinativas e presença de células gigantes multinucleadas (Selyes *et al.*, 1992).

Quando doses pequenas são administradas (10-40 μ M/Kg), pode haver regeneração dos tecidos de forma que 6 meses após a administração não apareça qualquer alteração histológica (Selyes *et al.*, 1992). O reparo também é gradual. Enquanto as partes centrais dos testículos permanecem necrosadas, ocorre a reposição de vasos e a migração de fibroblastos para a proximidade da túnica albugínea. Mastócitos migram para o tecido intersticial. Pode ocorrer, dependendo da dosagem, deposição de tecido fibroso no interstício e nos túbulos seminíferos, levando à sua calcificação. As células sobreviventes após a administração de cádmio podem recuperar-se e desenvolver tumores, principalmente as células de Leydig e as células de Sertoli (Gunn & Gould, 1970; Wahba *et al.*, 1990; Waalkes *et al.*, 1992a).

A localização do cádmio no testículo parece restringir-se aos elementos não germinativos (Gunn & Gould, 1970; Wahba *et al.*, 1990; Janecki *et al.*, 1992; Waalkes *et al.*, 1992a).

Vários fatores influenciam na intensidade da resposta testicular ao cádmio. Podemos começar pelas dosagens administradas. Dosagens entre 10-20 μ M/Kg causam alterações testiculares, mas são subletais. Não parece haver variação de dosagens efetivas entre espécies e linhagens diferentes (Gunn & Gould, 1970; Waalkes *et al.*, 1992a). Dosagens 4 ordens de grandeza abaixo desta apresentada, que possui efeito inibitório e citotóxico, podem ser estimulatórias sobre a síntese de DNA e o crescimento celular (Von Ziginicki *et al.*, 1992).

A rota de administração do metal também deve ser considerada. A via parenteral é a mais rápida. Pode ser aplicado via oral ou por inalação também. Podem ser realizadas aplicações diretamente no testículo ou via escrotal. Quando a aplicação é feita diretamente no testículo são necessárias dosagens maiores do que aquelas empregadas em administração via parenteral para se obter o mesmo efeito (Gunn & Gould, 1970; Waalkes *et al.*, 1992a).

Como foi descrito anteriormente, a susceptibilidade aos efeitos do cádmio é específica até mesmo ao nível de linhagem. A idade do animal também influencia na sua resposta ao metal, sendo vinculada à espécie em questão. Os animais imaturos são menos susceptíveis por não possuírem ainda receptores para o cádmio (Gunn & Gould, 1970).

O cádmio e outros metais induzem a síntese de proteínas de captura, as metalotioninas (MT). Estas proteínas têm a função de seqüestrar metais, atuando na desintoxicação (Gunn & Gould, 1970; Lucis *et al.*, 1970; Waalkes *et al.*, 1992a; Von Ziginicki *et al.*, 1992). A susceptibilidade de determinados órgãos ou tecidos pode estar relacionada a ausência deste tipo de proteína (Shaik & Tewari, 1990).

As metalotioninas são proteínas induzíveis em resposta a íons bivalentes, sintetizadas no fígado e nos rins de mamíferos. Contém alto teor de cisteína (32%). O pré-tratamento com zinco ou cádmio pode prevenir o efeito tóxico do cádmio nos órgãos que sintetizam metalotionina através de sua indução. A presença de metalotionina no testículo é bastante discutida. A hipótese mais aceita é de que no testículo há outra proteína de captura do cádmio com característica de peso molecular e carga muito semelhantes às da metalotionina. No entanto esta proteína difere no

conteúdo de cisteína, que é bem menor. Por esta razão esta proteína semelhante à metalotionina tem menor afinidade por cádmio. Esta proteína está presente nas células de Leydig, de Sertoli e nas células germinativas. (Webb, 1975.; Nishimura *et al.*, 1989). Apesar de ser induzível por zinco e cádmio esta proteína semelhante à metalotionina não está relacionada a resistência seletiva de determinadas linhagens ao cádmio (Waalkes *et al.*, 1988).

Uma outra proteína, a glutathiona, presente no testículo, oferece proteção contra a ação tóxica do cádmio, podendo estar relacionada com a proliferação, diferenciação ou proteção contra mutações induzíveis. A glutathiona protege os testículos da ação oxidativa do cádmio, mas com menos eficiência do que a metalotionina (Wahba *et al.*, 1990).

Experimentos *in vitro* podem comprovar a ação deste metal diretamente sobre o epitélio seminífero ou as células de Leydig (Aoki & Hoffer, 1978; Wahba *et al.*, 1990; Janecki *et al.*, 1992). Janecki e colaboradores (1992) descreveram as alterações causadas pelo cádmio sobre as junções das células de Sertoli, responsáveis pela barreira hemato-testicular, como precedendo as alterações vasculares *in vivo*. As células de Sertoli seriam o primeiro alvo do cádmio. Foram observadas alterações no padrão de produção de microfilamentos na região basal das células de Sertoli, correspondentes às junções entre elas (Hew *et al.*, 1993). Nos experimentos *in vivo* é difícil de se distinguir os efeitos provocados por isquemia testicular ou por ação direta do cádmio nos túbulos seminíferos ou células intersticiais (Aoki & Hoffer, 1978).

II. OBJETIVOS

Considerando que este estudo teve como objetivo geral a padronização das condições para cultura de túbulos seminíferos de ratos adultos, com o mínimo possível de alterações na estrutura do epitélio seminífero, permitindo que fosse testada a ação do cádmio sobre neste sistema *in vitro*, os objetivos específicos foram:

- 1- Aprimorar as técnicas de manipulação dos túbulos seminíferos para minimizar os danos causados ao tecido;
- 2- Definir qual o meio de cultura que preserva melhor as características do epitélio seminífero;
- 3- Determinar qual é a ação do soro fetal bovino sobre os túbulos seminíferos em cultura, testando diferentes concentrações (15% e 30%);
- 4- Determinar qual é a influência do hormônio folículo estimulante sobre os túbulos seminíferos em cultura, testando diferentes concentrações (0,1, 0,2, 0,4 e 0,8 μ g/ml);
- 5- Determinar qual o tempo ideal de cultura dos túbulos seminíferos para o estudo toxicológico do cádmio;
- 6- Determinar qual é o efeito do cádmio sobre o epitélio seminífero numa condição de sistema de cultura, em diferentes concentrações (1, 10 e 100 μ M) e em diferentes períodos de exposição (1 hora - com cada concentração diferente; 1, 2 ou 3 dias - 1 μ M).

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. Animais

Os animais utilizados nestes experimentos foram ratos adultos da linhagem Wistar com 3 a 5 meses de idade, criados no Biotério Central da Unicamp.

III.2. Coleta do material

Os animais foram sacrificados por traumatismo craniano evitando-se o uso de agentes anestésicos que poderiam interferir na cultura. O testículo foi removido logo após a morte do animal em ambiente asséptico. A coleta foi feita em meio de cultura, HAM F10 ou em solução tampão (PBS) com de antibiótico gentamicina na concentração de 300 µg/ml.

III.3. Isolamento dos túbulos seminíferos

O testículo foi manipulado em capela de fluxo laminar na presença de meio HAMF10 ou PBS. Foi retirado a cápsula externa e os túbulos seminíferos foram isolados. Cada segmento colocado em cultura com 2-3mm de comprimento foi identificado por transiluminação segundo os critérios de Parvinen & Vanha-Pertula (1972). Os segmentos foram lavados em meio de cultura com concentração decrescente de antibiótico para finalmente chegar em meio de cultura com concentração de 100 µg/ml.

Nos últimos experimentos (6 e 7), foi realizado o fechamento das extremidades dos túbulos seminíferos, para impedir o fluxo intenso de células para fora dos túbulos (Seidl & Holstein, 1990). A intensa extrusão de células foi um dos fatores de perda de túbulos lançados em cultura, devido à impossibilidade de prosseguir o seu processamento (Tabela 1).

III.4. Cultura dos túbulos seminíferos

A cultura dos túbulos seminíferos foi realizada em placas de 96 poços, onde os segmentos identificados permaneceram individualizados. O monitoramento da cultura foi realizado em microscópio invertido (Zeiss) utilizando-se o padrão de transiluminação.

Foram aplicadas diferentes condições de cultura para padronização desta técnica (tabela 1, esquema 1).

Numa primeira fase, correspondendo aos experimentos 1, 2, 3, 4 e 5, a cultura primária foi mantida por períodos variando de 6-15 dias, como sugerido por Anthony & Skinner (1989) e por Seidl & Holstein (1990), sendo que as fixações foram realizadas apenas no último dia de cultura. Foram efetuadas trocas de meio a cada 2 ou 3 dias, como sugerido por Steinberger e colaboradores (1969) e por Espevik e colaboradores (1982). Como meio de cultura foi utilizado inicialmente meio HAMF10 (Nutricell) com gentamicina (100 µg/ml), para evitar contaminações devido à intensa manipulação dos túbulos. Como complemento foi utilizado soro fetal bovino (SFB), com concentrações de 15% e 30%, e/ou hormônio foliculo estimulante (FSH - NIH, oFSH-S14, Sigma), em concentrações de 0,1, 0,2, 0,4 e 0,8 µg/ml. Este meio foi determinado a partir de uma variação do meio descrito por Parvinen e colaboradores (1983). Os primeiros experimentos foram realizados a temperatura ambiente, variando entre 28,2°C e 30°C, sendo que em seguida os experimentos foram realizados em estufa de esterilização, com temperatura estável em 32°C, como sugerido por Wright e colaboradores (1981).

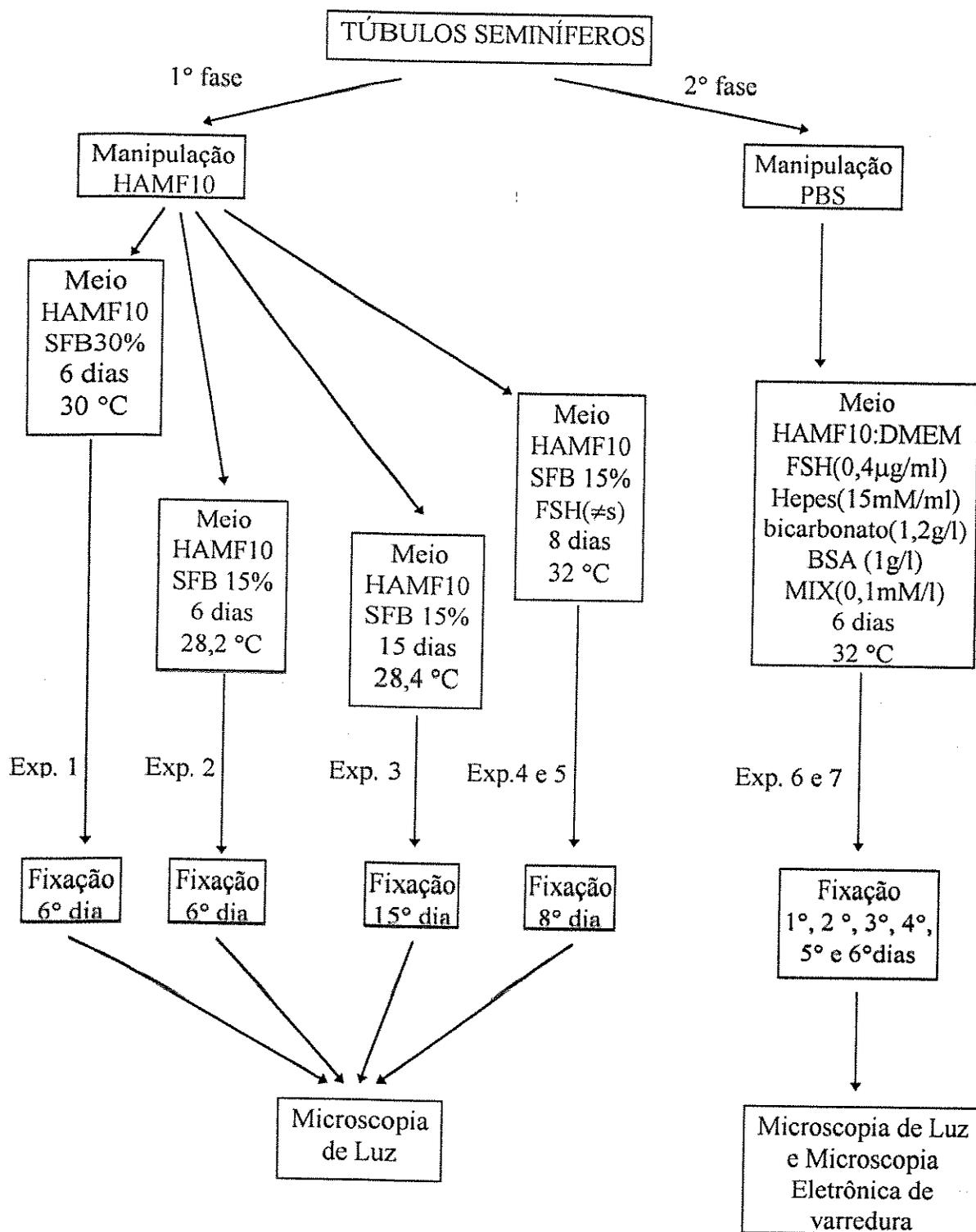
Numa segunda fase, correspondendo aos experimentos 6 e 7, foi utilizado o meio de cultura descrito por Boitani e colaboradores (1993), meio HAMF10:DubelcoMEM (v:v) (Nutricell) contendo 100 µg/ml de gentamicina, 15mM/ml HEPES, 1,2 g/l de bicarbonato de sódio, 1 g/l de soro albumina bovina (BSA) e 0,1 mmol/l de 1-metil 3-isobutilxantina (MIX). Como complemento foi empregado 0,4 µg/ml de FSH. As culturas foram mantidas por 6 dias, com troca de meio a cada 2 dias. Foram realizadas fixações diárias dos túbulos em cultura. Os experimentos foram realizados em estufa de cultura (002CB, Fanem), a uma

temperatura de 32°C. Estas condições foram estabelecidas como condições ideais de cultura. O período de 3 dias foi determinado como o período ideal de cultura.

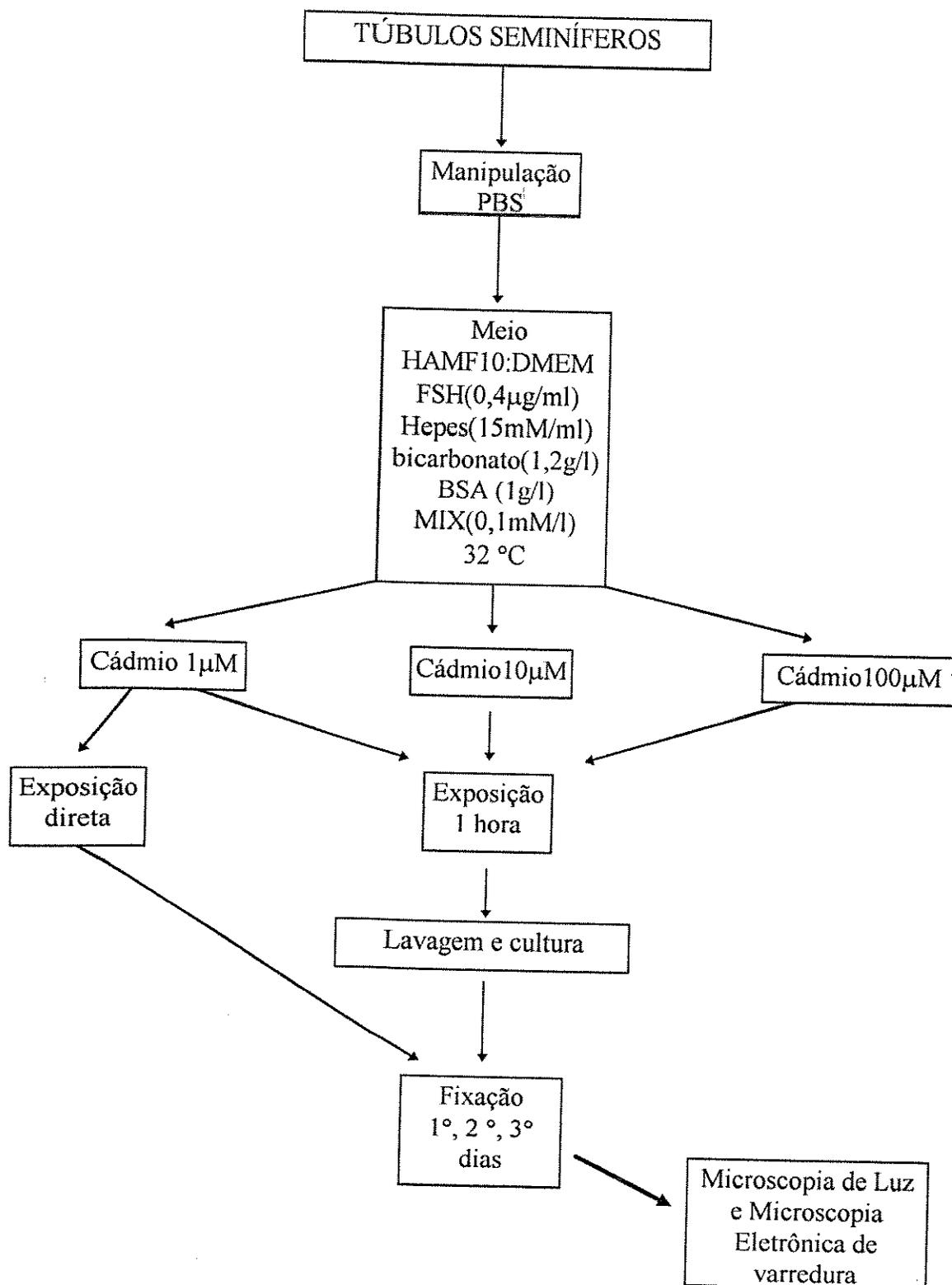
Durante a padronização ocorreu perda de túbulos seminíferos, determinada pela diferença entre a contagem dos fragmentos lançados em cultura e do total de fragmentos no final da fixação (Tabela 1). Estas perdas estavam relacionadas à extrusão celular e às várias trocas de meio e soluções fixadoras durante o processamento dos túbulos. A partir do experimento 6^o experimento foram alcançados baixos níveis de perda de fragmentos, não interferindo nas análises dos resultados.

Tabela 1: Condições de cultura aplicadas aos diferentes experimentos durante as duas fases de padronização da técnica.

Exp.	duração	fragmentação	condição	perdas	meio	complemento	temperatura
1	6 dias	meio de cultura (84 fragmentos)	7 frascos	81%	HAM F:10	30% SFB	30°C (ambiente)
2	6 dias	meio de cultura (96 fragmentos)	placa de cultura	42,7%	HAM F:10	15%SFB	28,2°C (ambiente)
3	15 dias	meio de cultura (96 fragmentos)	placa de cultura	27%	HAM F:10	15%SFB	28,4°C (ambiente)
4 e 5	8 dias	meio de cultura (96 fragmentos)	placa de cultura	46% e 40%	HAM F:10	15%SFB e/ou FSH (0,1; 0,2; 0,4; 0,8µg/ml)	32°C (estufa)
6 e 7	6 dias	PBS (96 fragmentos)	placa de cultura	21,4% e 2%	HAM F:10/ DMEM	Hepes(15mM/ml) bicarbonato de sódio(1,2 /l), BSA(1g/l), MIX(0,1mM/l), FSH(0,4µg/ml)	32°C (estufa)



Esquema 1. Padronização das técnicas de cultura de túbulos seminíferos.



Esquema 2. Aplicação de cádmio às culturas de túbulos seminíferos (Experimentos 8 e 9).

Para a aplicação de cádmio ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Riedel-De Haën A.G.) à cultura foi mantida a condição determinada na segunda fase do processo de padronização da técnica (esquema 2). Durante a aplicação do cádmio, nos experimentos 8 e 9, não foi possível o acompanhamento individual dos túbulos em placas de 96 poços devido às condições desta aplicação. Foram utilizados pequenos frascos de cultura contendo vários fragmentos de túbulos seminíferos. As culturas foram mantidas por 3 dias. De acordo com o trabalho de Aoki & Hoffer (1978) este período é suficiente para o estudo do cádmio, mesmo no sistema de cultura.

O cádmio foi testado em diferentes concentrações: $1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ e $100\mu\text{M}$, de acordo com as indicações de outros autores (Espevik *et al.*, 1982; Wahba *et al.*, 1990; Janecki *et al.*, 1992). O tempo de exposição das culturas ao metal foi de 1 hora, de acordo com a indicação de Wahba *et al.*, (1990), começando logo após o lançamento das culturas. Tanto a aplicação quanto a retirada do cádmio das culturas foi realizado em capela, utilizando material estéril.

Após a retirada do meio contendo cádmio, as culturas foram lavadas por 5 vezes com meio para retirar qualquer resíduo do metal.

Um outro grupo de túbulos seminíferos foi cultivado na presença de cádmio a $1\mu\text{M}$ durante todo o tempo de cultura, 1, 2 e 3 dias, como sugerido por Von Zigliński e colaboradores (1992). Em paralelo foram mantidos túbulos seminíferos com as mesmas condições ideais de cultura porém sem a exposição ao cádmio.

III.5. Preparação para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A observação do material envolveu técnicas para microscopia eletrônica de transmissão (MET). Foram realizados cortes ultra-finos dos túbulos seminíferos, no entanto, as dificuldades de preparação do material em cultura e de sua observação ao microscópio eletrônico de transmissão, não permitiram a obtenção de resultados satisfatórios. Assim, segue uma descrição da metodologia aplicada para MET, apesar de somente terem sido observados os cortes semi-finos, em microscopia de luz.

Todas as diluições dos fixadores, bem como as lavagens foram feitas em tampão fosfato (0,1M), tendo sua osmolaridade regulada com sacarose e íons de cálcio (Glauert, 1975).

O primeiro fixador foi o glutaraldeído 5% por duas horas, que atua principalmente sobre proteínas e carboidratos. Para retirar o excesso de fixador foi feita lavagem em solução tampão durante uma hora. Em seguida, para a fixação de lipídios, o material foi submetido ao tratamento com tetróxido de ósmio 1% (Glauert, 1975) por uma hora, este segundo tratamento visou um maior contraste para a preparação. A lavagem final do material foi feita em água bidestilada.

O segundo passo da preparação corresponde à desidratação gradativa em etanol durante duas horas. Os primeiros passos da desidratação, até a concentração de 95°, foram realizados em banho de gelo. Os passos posteriores foram feitos à temperatura ambiente para evitar a condensação de água. As últimas passagens (etanol-acetona e acetona pura) visaram substituir o etanol por um solvente da resina que será usada para a inclusão.

O material permaneceu em solução acetona-resina (Epon 812) por 18 horas. A inclusão do material foi efetuada em Epon 812 (Luft, 1961).

Os cortes semi-finos foram realizados no ultra-micrótomo LKB ultratome III. A espessura dos cortes foi avaliada através da coloração que exibem. Nos cortes semi-finos é a cor é rosa-esverdeada, que equivale a espessura de aproximadamente 1µm.

Os cortes semi-finos foram depositados sobre lâminas e corados com azul de toluidina 1% em solução de carbonato de sódio 0,5%. Usou-se araldite para a fixação da lamínula. As lâminas foram analisadas ao fotomicroscópio de luz (Zeiss MC63) e as áreas de interesse foram fotografadas.

III.6. Preparação para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para microscopia eletrônica de varredura o material foi processado da mesma forma que para microscopia eletrônica de transmissão, descrita no item III.5 de materiais e métodos.

Após todo o processo de fixação e desidratação do material, este foi submetido ao tratamento de ponto crítico (Balzers CPD030), para evitar deformações de sua estrutura durante a evaporação do álcool empregado na desidratação. As amostras foram metalizadas com ouro já nos suportes, onde foram fixadas com o auxílio de fita adesiva. Para a evaporação com ouro foi utilizado evaporador (Ytachi)

e sputtering (Balzers SCD050). Os fragmentos de túbulos seminíferos preparados por esta técnica foram observados e fotografados em microscópio eletrônico de varredura (Jeol T300).

IV. RESULTADOS

A seguir estão descritos os resultados obtidos nas análises dos túbulos seminíferos antes de serem cultivados; dos experimentos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, que constam da padronização da cultura e dos experimentos 8 e 9, que constam do teste da ação do cádmio sobre as culturas.

IV.1. Fragmentos analisados antes de serem cultivados.

Os experimentos realizados foram acompanhados da análise de fragmentos de túbulos seminíferos fixados antes de serem lançados em cultura, onde foram observadas as alterações introduzidas pelas técnicas de manipulação dos túbulos seminíferos (FIGURAS 4, 5, 6, 7 e 47). Estas alterações constaram principalmente de desorganização tecidual, caracterizada pelo aparecimento de espaços intercelulares intratubulares, e extrusão de diferentes populações celulares. Com o aprimoramento das técnicas de manipulação, a extrusão celular foi bastante diminuída, através de leve esmagamento das extremidades tubulares, impedindo a saída das células. Mesmo assim, não foi possível conter o deslocamento das células de sua localização original no epitélio seminífero em direção ao lúmen tubular (FIGURA 6).

As células de Sertoli mantiveram suas características, inclusive de polaridade (FIGURA 5). Foram observadas gotículas de lipídios pequenas principalmente no citoplasma (FIGURA 7). A presença destas gotículas, neste padrão de distribuição, é uma característica do tecido, sendo observadas em testículos íntegros que não sofreram manipulação.

Também foram observadas células germinativas multinucleadas, inclusive podendo ser identificadas entre as células que sofreram extrusão durante a manipulação dos túbulos. Eram predominantemente espermatócitos, que mantiveram as pontes citoplasmáticas existentes entre si.

IV.2. Experimento 1 (Meio HAMF10 / SFB 30% / 6 dias de cultivo / 30⁰C)

Durante o processo de preparação dos túbulos seminíferos para a cultura ocorreu a exteriorização de células, que se agruparam nas extremidades dos fragmentos. Alguns túbulos foram perdidos devido à intensidade de extrusão que ocorreu. Ao microscópio invertido estas células mantiveram aparência saudável durante os 6 dias de cultivo.

As análises histológicas demonstraram desorganização do epitélio seminífero, caracterizada pela perda das relações estruturais entre os diferentes tipos celulares presentes e ausência de lúmen intratubular. As células de Sertoli e as espermatogônias mantiveram localização preferencialmente periférica. Puderam ser observados sinais de degeneração, como a presença de resíduos celulares. Ocorreu a fragmentação do citoplasma de diferentes tipos celulares e o aparecimento de pequenas gotículas de lipídios distribuídas por todo o tecido, principalmente nos espaços intercelulares (FIGURA 8). Foi observada a despolarização das células de Sertoli, descaracterizando-as morfológicamente. Com relação à parede do túbulo observou-se em alguns cortes o seu espessamento acompanhado de arredondamento nuclear das células mióides.

IV.3. Experimento 2 (Meio HAMF10 / SFB 15% / 6 dias de cultivo / 28,2⁰C)

Durante a preparação para a cultura houve a exteriorização de células de diferentes tipos, mantendo aparência saudável durante o tempo de cultura, acompanhada por transiluminação.

As análises histológicas demonstraram sinais avançados de desorganização tecidual. A presença de espaços intercelulares e a ausência de lúmen demonstraram o deslocamento celular ocorrido no epitélio seminífero. Como característica de degeneração foi marcante a presença de grandes massas celulares multinucleadas, englobando diferentes tipos celulares. Foram observados resíduos celulares, presentes nos espaços intercelulares. Também foi característica a presença de vacuolização nuclear atingindo principalmente as populações germinativas (FIGURA 9). As gotículas de lipídios encontradas eram pequenas e pouco frequentes, não estando

restritas apenas aos citoplasmas celulares. Em algumas regiões foi observado um ligeiro espessamento da parede tubular

IV.4. Experimento 3 (Meio HAMF10 / SFB 15% / 15 dias de cultivo / 28,4^oC)

Na preparação dos túbulos ocorreu a exteriorização de várias células, que mantiveram aparência saudável durante o período de cultura. Algumas das células exteriorizadas desenvolveram um aspecto característico de células fibroblásticas, apresentando expansões citoplasmáticas e núcleo arredondado. Estas células apareceram aderidas ao fundo da placa, a partir do décimo dia de cultura.

O interior dos túbulos apresentou aumento de densidade, sendo pouco freqüentes os espaços intercelulares. Muitas vezes foram observadas células mióides ou mesmo componentes da parede tubular invaginando em direção ao lúmen do túbulo (FIGURA 10). A característica mais marcante neste experimento refere-se ao espessamento exagerado da parede tubular, juntamente com o arredondamento nuclear apresentado pelas células mióides, em padrão semelhante ao observado na FIGURA 12.

A desorganização também foi característica podendo ser observado o completo deslocamento das células de sua localização no epitélio seminífero. Os sinais de degeneração não foram percebidos claramente devido ao aspecto de densidade dos túbulos e à presença de material colagênico em seu interior. As gotículas de lipídios eram pequenas e freqüentes, localizadas nos espaços intercelulares. Os citoplasmas celulares nem sempre foram delimitados, sendo freqüentes os resíduos celulares (FIGURA 10).

IV.5. Experimentos 4 e 5 (Meio HAMF10 / SFB 15% e/ou FSH 0,1;0,2;0,4;0,8µg/ml / 8 dias de cultivo / 32^oC)

As condições empregadas nestes dois experimentos foram as mesmas, permitindo a análise conjunta dos dados, sendo particularidades de cada experimento devidamente comentadas abaixo, sem distinção de figuras.

O padrão de transiluminação caracterizou o aspecto saudável das células exteriorizadas durante os 8 dias de cultura, em qualquer dos tratamentos aplicados.

Parte do experimento, realizado apenas em meio de cultura, apresentou desorganização do epitélio seminífero, com a presença de espaços intercelulares e o deslocamento dos diferentes tipos de células. Foram observados sinais de degeneração por todo o tecido, como a presença de células multinucleadas, apesar de não constituírem uma presença constante. A presença de vacuolização nuclear e citoplasmática eram características deste tratamento. As gotículas de lipídios eram pouco freqüentes mas relativamente grandes. A parede tubular apresentou-se normal, não sendo comum o arredondamento nuclear das células mióides (FIGURA 11).

A presença de soro fetal bovino no meio de cultura (15%) provocou o espessamento da parede tubular e o arredondamento nuclear das células mióides. O interior dos túbulos apresentou aspecto de densidade. Os espaços intercelulares foram pouco freqüentes. Foi observada a invaginação da parede tubular em vários pontos (FIGURAS 12, 14, 16 e 18). As gotículas de lipídios eram pequenas e freqüentes (FIGURAS 13 e 20). Os sinais de degeneração incluíram as células multinucleadas (FIGURA 12) e a presença de resíduos celulares, em geral acompanhados de vacuolização citoplasmática (FIGURAS 11, 16 e 20).

A presença de FSH no meio de cultura diminuiu a freqüência com que apareceram os sinais de degeneração celular. A desorganização do tecido foi mantida constante, com a presença dos espaços intercelulares e o deslocamento das diferentes populações celulares do epitélio seminífero. As paredes dos túbulos apareceram íntegras e em geral não demonstraram sinais de espessamento (FIGURAS 15 e 17). A aplicação de diferentes concentrações do hormônio não pareceu causar alterações significativas na manutenção do tecido. O padrão de distribuição das gotículas de lipídios foi de pouca freqüência de gotículas grandes (FIGURAS 15, 19 e 21). As células multinucleadas foram menos freqüentes (FIGURA 21). Foram encontrados resíduos celulares (FIGURA 19 e 22) e em alguns cortes foram observados sinais de vacuolização nuclear (FIGURAS 19 e 20). De maneira geral a maior concentração de FSH testada (0,8µg/ml) introduziu maiores alterações no sentido de degeneração celular, inclusive alterações das paredes (FIGURAS 21 e 22).

IV.6. Experimentos 6 e 7 (Meio HAMF10:DMEM / HEPES / bicarbonato de sódio / BSA / MIX / FSH 0,4µg/ml / 6 dias de cultivo- fixações diárias / 32⁰C)

Estes 2 experimentos foram realizados sob exatamente as mesmas condições de cultura e fixação. Desta forma sua descrição será realizada em conjunto, sem distinção de figuras.

A proporção de extrusão celular diminuiu sensivelmente em relação aos experimentos anteriores, tanto durante a preparação quanto durante a cultura. Esta alteração pode estar relacionada ao uso de PBS durante a fragmentação dos túbulos. Mesmo diminuindo muito, o grau de extrusão celular o aspecto de descamação das células em direção ao lúmen tubular foi mantido. As células presentes no meio de cultura mantiveram aspecto saudável durante os 6 dias do experimento, bem como os túbulos analisados por transiluminação.

As observações histológicas demonstraram que a partir dos primeiros dias de cultura as alterações introduzidas pelas técnicas de manipulação causaram perturbações no tecido, tanto no sentido de desorganização quanto no sentido de degeneração celular. A principal característica relacionou-se ao deslocamento de diferentes tipos celulares de sua localização original no epitélio germinativo. Já no primeiro dia de cultura foi observado o início da vacuolização nuclear (FIGURA 23), que se manteve ao longo da cultura (FIGURAS 29, 32 e 34). A presença de células multinucleadas ao longo do experimento foi considerada como uma característica (FIGURAS 23, 24 e 26), no entanto, com a progressão da cultura foram encontradas grandes massas celulares multinucleadas. A partir do quarto dia de cultura a presença das células multinucleadas foi marcante, caracterizando a evolução dos sinais degenerativos (FIGURAS 29 e 33). Com a progressão da cultura houve aumento da quantidade das gotículas de lipídios presentes no tecido. Seu grau de condensação foi crescente (FIGURAS 24, 31 e 34). Foram encontrados espaços intercelulares intratubulares ao longo de todo o período de cultura, independente do tratamento (FIGURAS 23, 24 e 34).

Foram detectados resíduos celulares cada vez mais abundantes no decorrer da cultura (FIGURAS 28, 33 e 34). A sua distribuição acompanhou o aparecimento de vacuolização citoplasmática, a partir do terceiro dia de cultura (FIGURA 28 e 30). Também foi observado o aparecimento de inclusões citoplasmáticas, principalmente a

partir do terceiro dia de cultura (FIGURAS 27 e 28). A parede dos túbulos manteve seu aspecto normal nos primeiros dias de cultura, sem que ocorresse espessamento ou fragilização excessiva (FIGURAS 25 e 29). Com o decorrer da cultura, a partir do quarto dia, este aspecto não foi mantido, sendo freqüentes áreas de rompimento ou adelgaçamento da parede (FIGURA 30 e 32).

A degeneração foi progressiva. As espermátides foram encontradas em grandes quantidades na maioria dos cortes analisados (FIGURAS 30 e 31). A ausência de espermátides nos cortes não significou que houve degeneração das células, mas sim que o corte analisado continha um estágio do ciclo seminífero no qual estas células não estão presentes (FIGURAS 25, 27 e 28). A descaracterização morfológica das células de Sertoli, arredondamento nuclear e contração citoplasmática, foi observada a partir do segundo dia de cultura (FIGURAS 25, 29 e 33).

A presença do FSH diminuiu o grau e a freqüência dos sinais de degeneração descritos, retardando o aparecimento destes sinais (FIGURAS 24, 26, 28, 30, 32 e 34).

As observações ao microscópio de varredura comprovaram as alterações introduzidas pela manipulação dos túbulos, principalmente o aspecto de extrusão celular que foi observado nos fragmentos não cultivados (FIGURA 47). Este padrão de extrusão se manteve ao longo da cultura (FIGURA 49). Em algumas preparações foram observados espermatozóides (FIGURAS 48, 49 e 50), mas isto não constituiu uma regra, dependendo do estágio do ciclo seminífero em questão (FIGURAS 51, 52, 53 e 54). A desorganização foi comprovada em todas as preparações sendo observado o deslocamento das células em direção ao lúmen tubular, com a conseqüente ocupação deste, e o aparecimento de grandes espaços (FIGURAS 52 e 53). As paredes dos túbulos mantiveram aparência normal nos primeiros dias de cultura, sendo seu aspecto liso e contínuo (FIGURAS 48 e 49). Com o decorrer da cultura seu aspecto se tornou rugoso e fragilizado, sendo constantes os pontos de rompimento (FIGURAS 52, 53 e 54). Nos primeiros dias de cultura as células apresentaram contornos definidos, com a superfície lisa e arredondada (FIGURAS 50 e 51). A partir do quarto dia de cultura foram observadas grandes áreas de resíduos celulares, sendo difícil determinar os contornos celulares (FIGURAS 52, 53 e 54).

IV.7. Experimentos 8 e 9 (Meio HAMF10:DMEM / HEPES / bicarbonato de sódio / BSA / MIX / FSH (0,4µg/ml) / 6 dias de cultivo - fixações diárias / 32°C / aplicação de cádmio)

Estes dois experimentos envolveram a aplicação de cádmio às culturas, sob as mesmas condições de exposição, cultura e fixação. Não foi possível o acompanhamento das culturas por padrão de transiluminação uma vez que foi realizada em frascos de penicilina contendo vários fragmentos de túbulos cada um. Foi observado que os fragmentos expostos a concentração de 100µM de cádmio apresentavam-se debilitados, além de frágeis ao serem manipulados, a partir do segundo dia em cultura. Aparentemente os diâmetros do túbulos diminuíram quando em contato com o cádmio.

As observações das lâminas histológicas demonstraram a desorganização do epitélio seminífero no primeiro dia de cultura mesmo sem a aplicação de cádmio, como foi descrito durante a padronização das técnicas de cultura, nos experimentos 6 e 7. A parede tubular dos fragmentos apresentou aspecto normal. Foram observados espaços entre as células que se estendem por todo epitélio. Apareceram sinais de degeneração. Estavam presentes sinais de vacuolização nuclear, bem como resíduos celulares nos espaços intercelulares. Não foi freqüente o aparecimento de grandes massas celulares multinucleadas, embora algumas células apresentassem este padrão. As gotículas de lipídios apareceram em grande quantidade, de pequenas dimensões, restritas ao citoplasma celular (FIGURA 24), tornando-se mais disperso com o decorrer da cultura. Apesar de haver progressão dos sinais de degeneração ao longo da cultura, foram observadas células com aspecto normal. Os espaços intercelulares eram cada vez mais freqüentes. Começaram a aparecer resíduos celulares, células multinucleadas (FIGURA 26) e inclusões citoplasmáticas com mais freqüência (FIGURA 28).

Frente a este padrão de alterações introduzidas pela própria técnica de cultura de tecido são comentados a seguir os efeitos do cádmio diretamente sobre o epitélio germinativo.

A exposição dos fragmentos de túbulos seminíferos ao cádmio resultou na intensificação e aceleração, concentração dependente, do aparecimento dos sinais de

degeneração celular no tecido. O aparecimento de grandes massas celulares multinucleadas, a descaracterização das células de Sertoli, a presença de vacuolização citoplasmática e resíduos celulares foram observadas após 24 horas de tratamento com a menor concentração de cádmio testada ($1\mu\text{M}$) (FIGURA 35). O aumento da concentração de cádmio aplicada à cultura resultou na progressão da degeneração no mesmo espaço de tempo. A aplicação de cádmio a $10\mu\text{M}$ caracterizou-se, além dos sinais de degeneração descritos anteriormente, por intensa vacuolização nuclear (FIGURA 36), enquanto que cádmio a $100\mu\text{M}$ foi caracterizado pela presença de grandes quantidades de resíduos nos espaços intercelulares (FIGURA 37). Estes efeitos foram observados no primeiro dia após a exposição ao metal. Os efeitos descritos acentuaram-se ao longo da cultura, sendo mais drásticos quanto maior a concentração aplicada. Também foi crescente a frequência com que estes sinais apareceram nos cortes histológicos analisados. No segundo dia de exposição dos túbulos seminíferos ao cádmio ($1\mu\text{M}$) surgiram sinais de degeneração celular intensos como vacuolização citoplasmática e descaracterização das células de Sertoli (FIGURA 39). Quando foram analisados os túbulos tratados com $10\mu\text{M}$ de cádmio, no segundo dia de cultura, foram observadas grandes massas celulares multinucleadas intensamente vacuolizadas. A parede dos túbulos apareceu extremamente delgada (FIGURA 40). Aumentando-se a concentração para $100\mu\text{M}$ observou-se a intensificação dos processos degenerativos (FIGURA 41). No terceiro dia de cultura observou-se com maior frequência sinais de vacuolização nuclear, citoplasmática e a presença de células multinucleadas (FIGURAS 43 e 44). O material exposto ao cádmio ($100\mu\text{M}$) apresentou gotículas de lipídios grandes, extensos espaços intercelulares e vários resíduos celulares. As células não bem definidas (FIGURA 45). Durante o tratamento com cádmio observou-se pouca condensação de gotículas de lipídios nas células.

Quando o material tratado com cádmio foi observado ao microscópio eletrônico de varredura uma das características mais marcantes foi a fragilidade da parede tubular, a partir da menor concentração de cádmio ($1\mu\text{M}$), já no primeiro dia de cultura (FIGURA 56). A progressão da cultura interferiu neste aspecto, sendo comum pontos de rompimento da parede tubular (FIGURA 57 e 59). Outra característica das paredes tubulares foi seu aspecto extremamente rugoso (FIGURAS

60, 62 e 63), sendo que o tratamento com $100\mu\text{M}$ de cádmio intensificou este processo, detectado claramente a partir do primeiro dia (FIGURA 63). Também foi observada a progressiva ausência de contornos definidos das células intratubulares (FIGURAS 47 e 50). Apareceram massas heterogêneas de material intercelular no lugar das células delimitadas (FIGURA 57). Este também foi um efeito intensificado tanto pelo tempo em cultura quanto pela concentração do metal aplicada (FIGURAS 61, 65 e 67). Foram observados espaços intercelulares (FIGURA 58, 65 e 67) e o distanciamento de células da parede tubular (FIGURA 65). As caudas de espermatídes ou espermatozóides foram encontradas com certa freqüência e não pareceram sofrer alterações (FIGURAS 55, 64 e 66). Com o fechamento de extremidade tubular, através de leve esmagamento durante a fragmentação, evitou-se a extrusão celular. (FIGURA 62).

Foi realizado um experimento no qual o tecido ficou exposto ao cádmio ($1\mu\text{M}$) por todo o período de cultura até a fixação, 1, 2 ou 3 dias. Neste caso os efeitos de degeneração compararam-se à exposição por uma hora de $100\mu\text{M}$ de cádmio (FIGURAS 37, 41 e 45). Notou-se que, apesar dos sinais de degeneração presentes nestes dois casos serem semelhantes, a permanência do cádmio intensificou a degeneração, principalmente no sentido de vacuolização citoplasmática, e a presença de resíduos nos espaços intercelulares. No primeiro dia de cultura foi notado o aspecto mais delgado da parede celular, a presença de grandes massas celulares multinucleadas, marcadas por intensa vacuolização nuclear e citoplasmática. Também apareceram, com freqüência, resíduos entre as células (FIGURA 38). A degeneração atingida neste tratamento dificultou a localização de células com aspecto normal já no segundo dia de cultura (FIGURA 42). No terceiro dia de cultura foram observadas grandes massas de resíduos celulares e poucas células com contornos definidos. A degeneração do tecido foi total (FIGURA 46).

A observação ao microscópio de varredura revelou a intensa degeneração do material submetido ao cádmio, com exposição direta durante 1, 2 e 3 dias. Já no primeiro dia de cultura foi observada a substituição das células por resíduos (FIGURAS 68 e 69). A parede tubular apresentou-se bastante frágil e com aspecto rugoso, sendo que em vários pontos não manteve contato com o epitélio seminífero (FIGURA 68). No segundo dia de cultura foram notados sinais de degeneração nas

caudas de espermatozoides, além dos grandes espaços intercelulares. O aspecto rugoso das paredes dos túbulos foi crescente (FIGURA 70). Os efeitos foram progressivos e intensificaram-se com o decorrer da cultura. No terceiro dia de cultura foram observados somente resíduos celulares. Foi marcante a fragilidade da parede tubular (FIGURAS 71 e 72).

IV.8 Considerações gerais e micrografias

Para a padronização da técnica de cultura de túbulos seminíferos foram realizados 7 experimentos. Nestes experimentos houve variações nas metodologias de manipulação dos túbulos seminíferos e nas condições específicas de cultura. O objetivo da padronização foi a manutenção da estrutura do epitélio seminífero e a diminuição dos sinais de degeneração causados pelas perturbações introduzidas pelo sistema artificial em questão. Todas as características dos diferentes experimentos estão demonstradas na tabela 1 e no esquema 1. Os resultados obtidos durante toda a fase de padronização da cultura estão resumidos na tabela 2.

Para a observação dos efeitos do cádmio diretamente sobre os elementos dos túbulos seminíferos foram realizados 2 experimentos. Estes experimentos basearam-se nas condições pré-estabelecidas como as condições ideais de cultura, durante os experimentos 6 e 7, que constaram de meio HAMF10:DubelcoMEM (v:v), contendo 100 µg/ml de gentamicina, 15mM/ml HEPES, 1,2 g/l de bicarbonato de sódio, 1 g/l BSA, 0,1 mmol/l de MIX e 0,4 µg/ml de FSH, em estufa a 32^oC, por um período de 3 dias (esquema 2). Os efeitos das diferentes concentrações de cádmio e diferentes períodos de exposição estão demonstrados de forma condensada na tabela 3.

Tabela 2: Padronização da técnica de cultura de túbulos seminíferos.

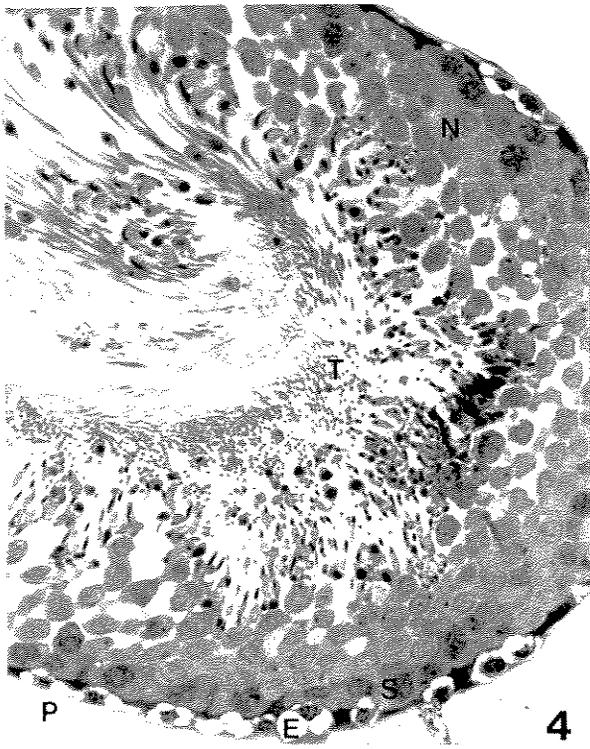
Experimento (duração) túbulos antes do cultivo	Extrusão celular	Ausência de interações	espaços intercelulares	parede tubular	células mióides	células de Sertoli	gotículas de lipídios restritas ao citoplasma	células multinucleadas (espermatoócitos)	resíduos celulares	vacuolização citoplasmática	vacuolização nuclear
1 (HAM, SFB) 30% 6 dias	++	+	+	espessa	≠	≠	pequenas e poucas	poucas	+	+	-
2 (HAM, SFB) 15% 6 dias	++	+	+	espessa	≠	≠	pequenas e poucas	++	+	+	+
3 (HAM, SFB) 15% 15 dias	++	+	poucos	espessa (++)	≠	≠	pequenas e frequentes	+	+	+	-
4 e 5 - meio (HAM-8 dias)	+	+	+	normal	normais	≠	grandes e poucas	poucas	+	+	+
FSH(0,1)	+	+	+	normal	normais	≠	grandes	+	+	+	±
FSH(0,1)+SFB	+	+	poucos	espessa	≠	≠	pequenas	+	+	+	±
FSH(0,2)	+	+	+	normal	normais	≠	grandes	±	+	+	±
FSH(0,2)+SFB	+	+	poucos	espessa	≠	≠	pequenas	+	+	+	±
FSH(0,4)	+	+	+	normal	normais	≠	grandes	±	+	+	+
FSH(0,4)+SFB	+	+	poucos	espessa	≠	≠	pequenas	+	+	+	+
FSH(0,8)	+	+	+	frágil	normais	≠	grandes	+	+	+	+
FSH(0,8)+SFB	+	+	poucos	espessa	≠	≠	pequenas	+	+	+	+
6 e 7 (HAM: MEM) - 1º dia	±	±	+	normal	normais	normais	pequenas	+	+	+	±
1º dia + FSH	±	+	+	normal	normais	normais	pequenas	+	±	+	±
2º dia	±	+	+	normal	normais	normais	pequenas	+	+	+	+
2º dia + FSH	±	+	+	normal	normais	normais	pequenas	+	+	+	+
3º dia	±	+	+	normal	normais	±	pequenas	+	±	++	+
3º dia + FSH	±	+	+	normal	normais	≠	grandes	+	+	++	+
4º dia	±	+	+	normal	normais	≠	pequenas	+	+	+	+
4º dia + FSH	±	+	+	normal	normais	≠	grandes	++	++	++	+
5º dia	±	+	+	normal	normais	≠	grandes	+	++	++	+
5º dia + FSH	±	+	+	frágil	normais	≠	grandes	++	++	++	+
6º dia	±	+	+	frágil	normais	≠	grandes	++	++	++	+
6º dia + FSH	±	+	+	frágil	normais	≠	grandes	++	++	++	+

(++ presença acentuada; + presença; ± presença fraca; - ausência; ≠ descaracterização)

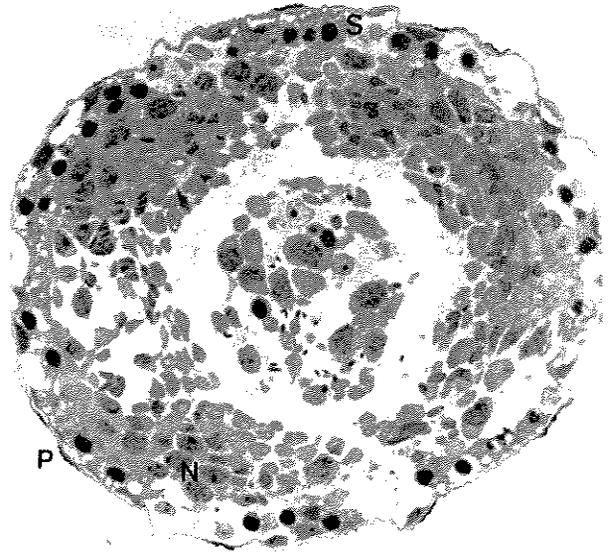
Tabela 3: Efeitos da aplicação de cádmio às culturas de túbulos seminíferos. Os controles correspondem às culturas realizadas nas mesmas condições descritas nos experimentos 6 e 7, na presença de FSH (0,4µg/ml) e na ausência de cádmio.

Concentração (exposição)	parede tubular	células mióides	Células de Sertoli	gotículas de lípidios	células multinucleadas	resíduos celulares	vacuolização citoplasmática	vacuolização nuclear
Controle 1 ^o dia	normal	normais	normais	várias e pequenas	poucas	±	±	±
1µM - 1 ^o dia (1 hora)	normal	normais	≠	-	+	+	+	+
10µM - 1 ^o dia (1 hora)	±	normais	≠	-	+	+	++	++
100µM - 1 ^o dia (1 hora)	±	≠	≠	poucas e pequenas	++	++	++	++
1µM - 1 ^o dia (direta)	frágil	≠	≠	-	++	++	++	++
Controle 2 ^o dia	normal	normais	±	várias e pequenas	+	±	+	+
1µM - 2 ^o dia (1 hora)	±	≠	≠	-	+	++	++	++
10µM - 2 ^o dia (1 hora)	±	≠	≠	poucas e pequenas	++	++	++	++
100µM - 2 ^o dia (1 hora)	frágil	≠	≠	-	++	++	++	++
1µM - 2 ^o dia (direta)	frágil	≠	≠	poucas e pequenas	++	++	++	++
Controle 3 ^o dia	normal	normais	≠	várias e pequenas	+	+	+	+
1µM - 3 ^o dia (1 hora)	±	≠	≠	-	++	++	++	++
10µM - 3 ^o dia (1 hora)	frágil	≠	≠	-	++	++	++	++
100µM - 3 ^o dia (1 hora)	frágil	≠	≠	-	++	++	++	++
1µM - 3 ^o dia (direta)	frágil	≠	≠	-	++	++	++	++

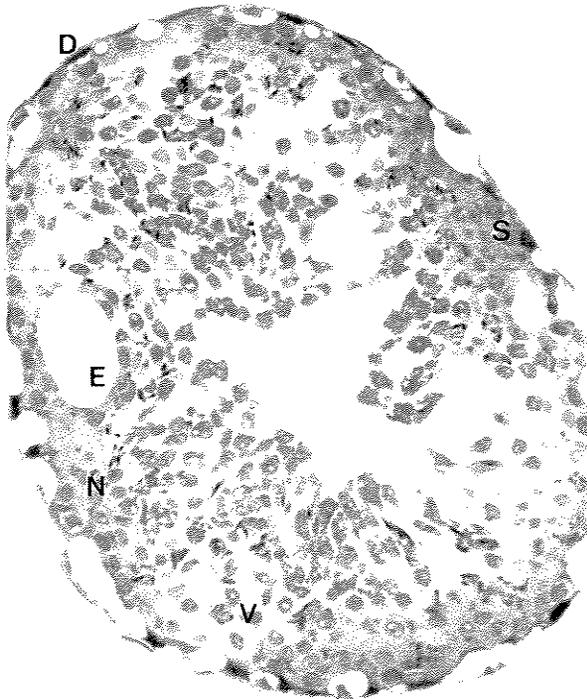
(++ presença acentuada; + presença; ± presença fraca; - ausência; ≠ descaracterização)



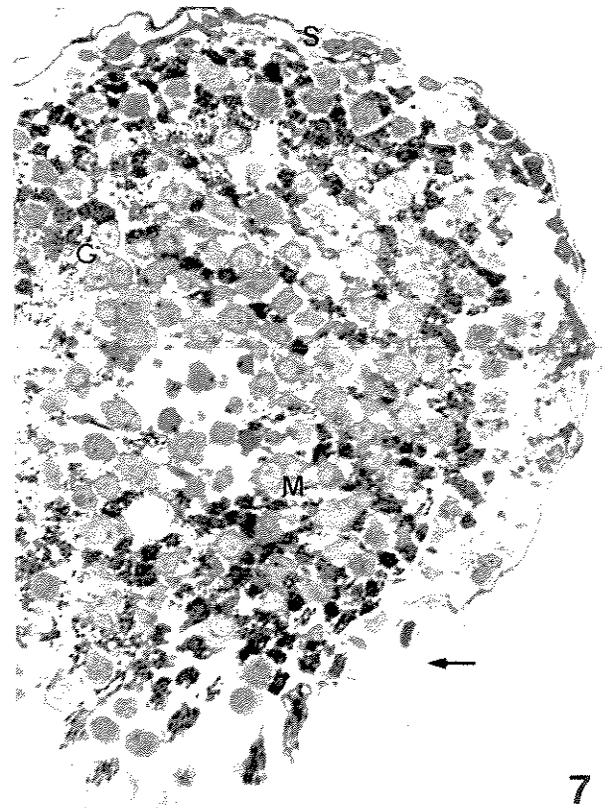
4



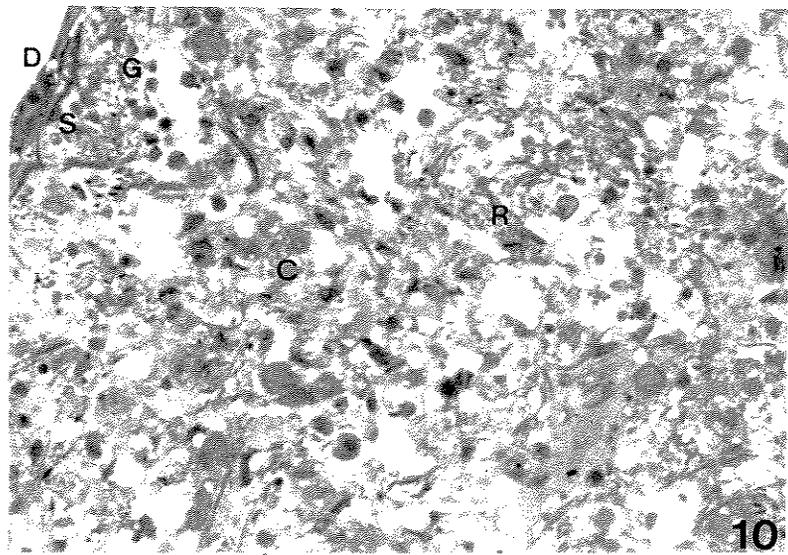
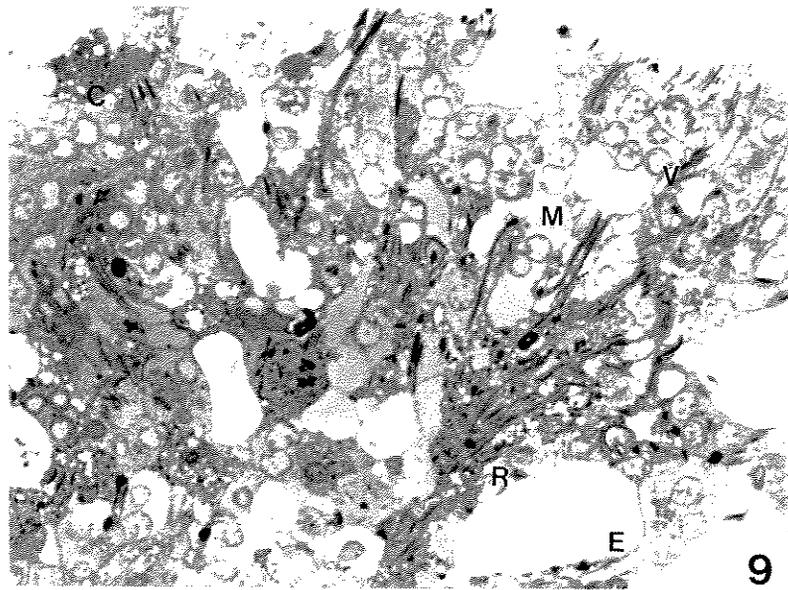
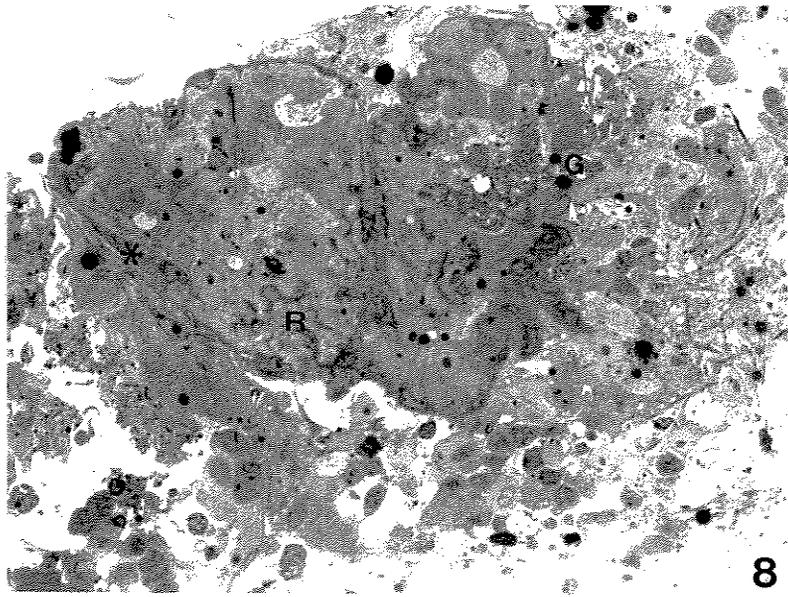
6

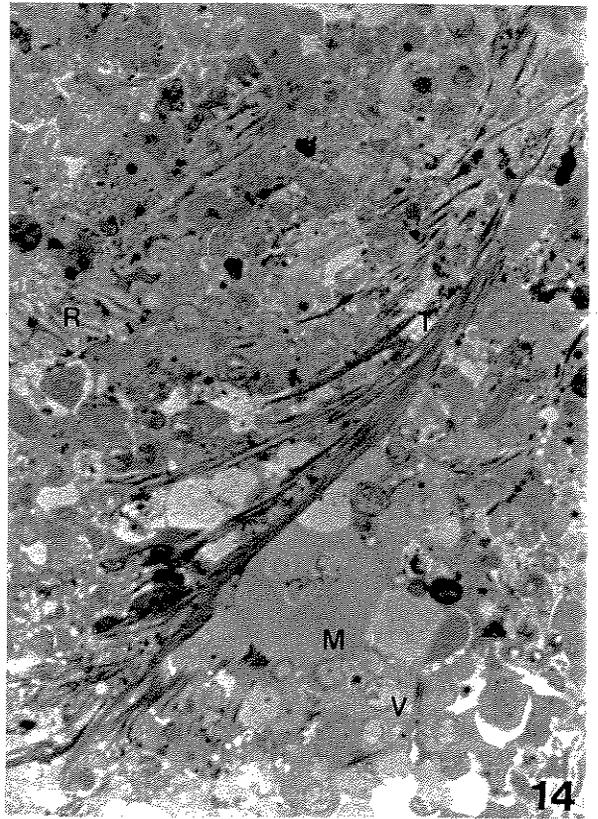
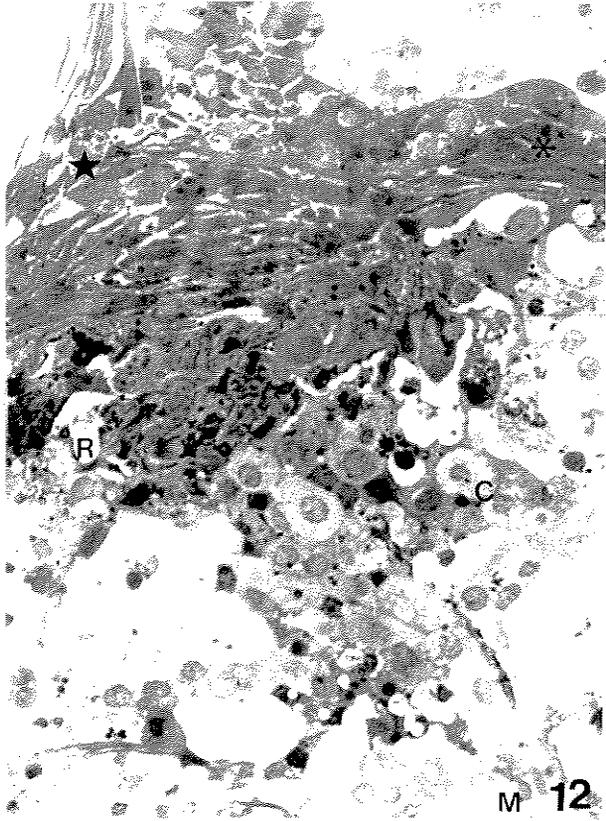
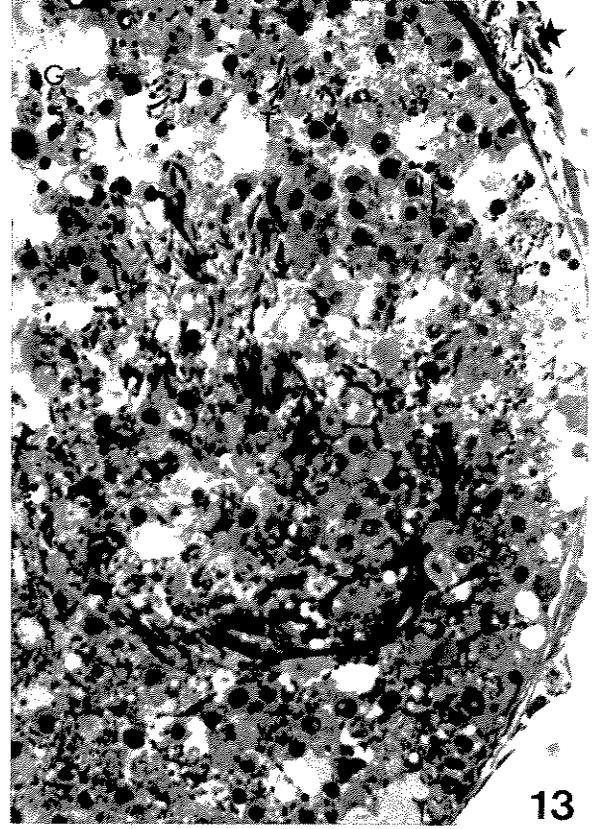
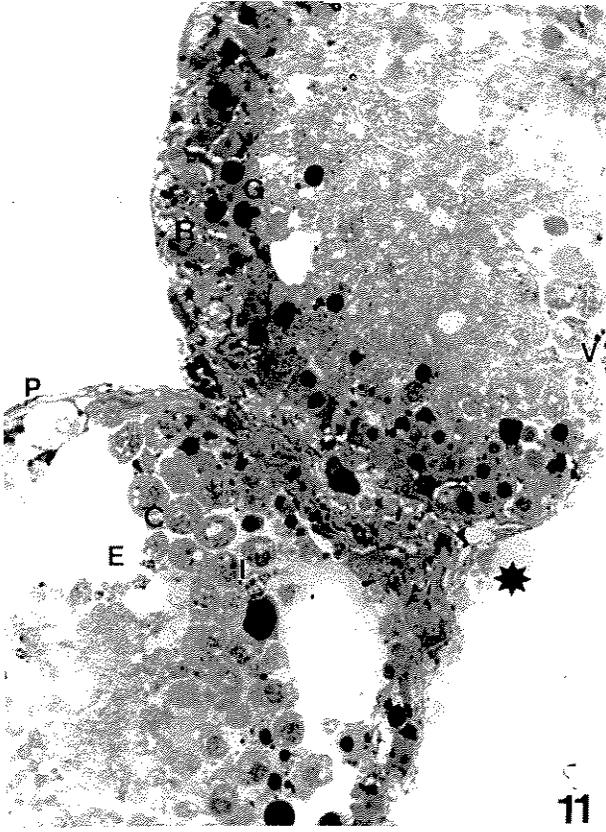


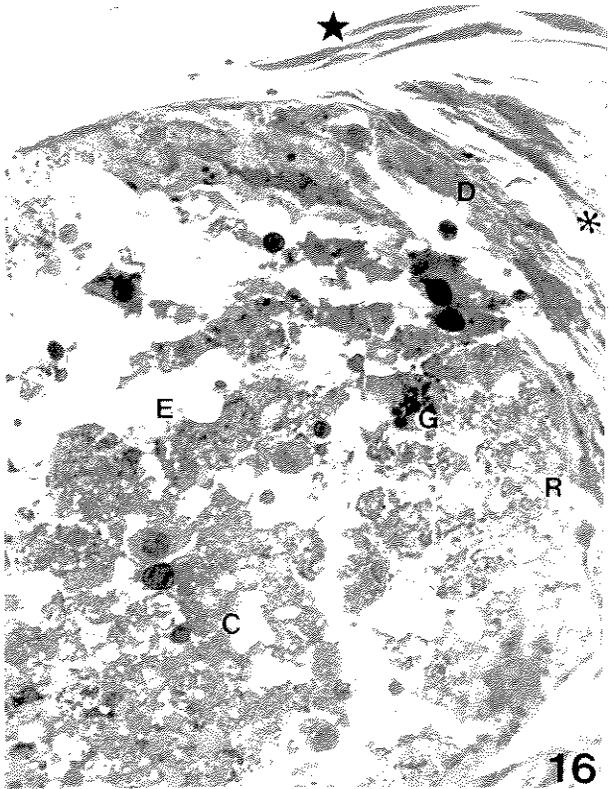
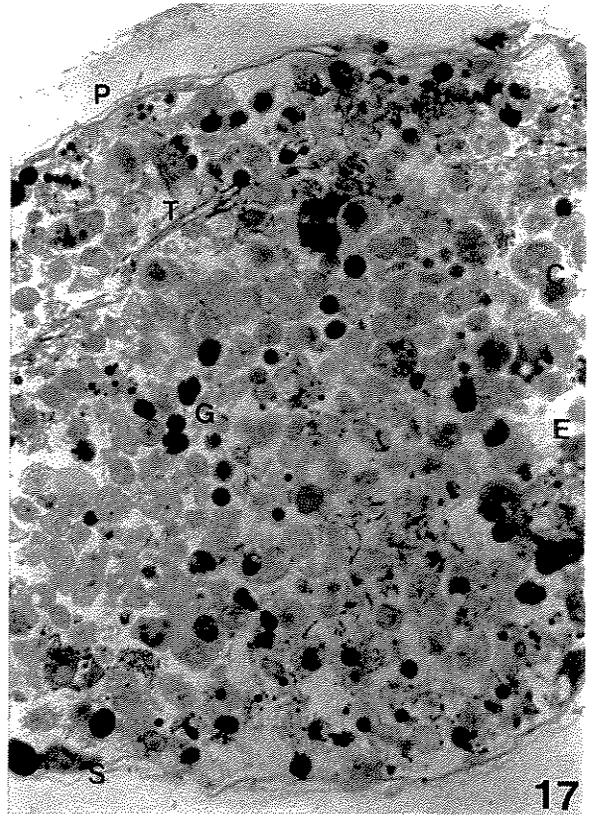
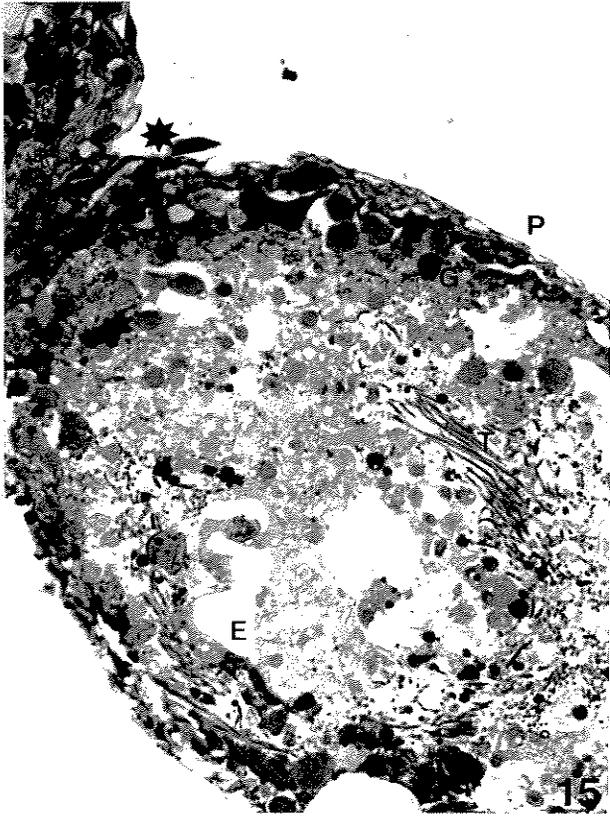
5

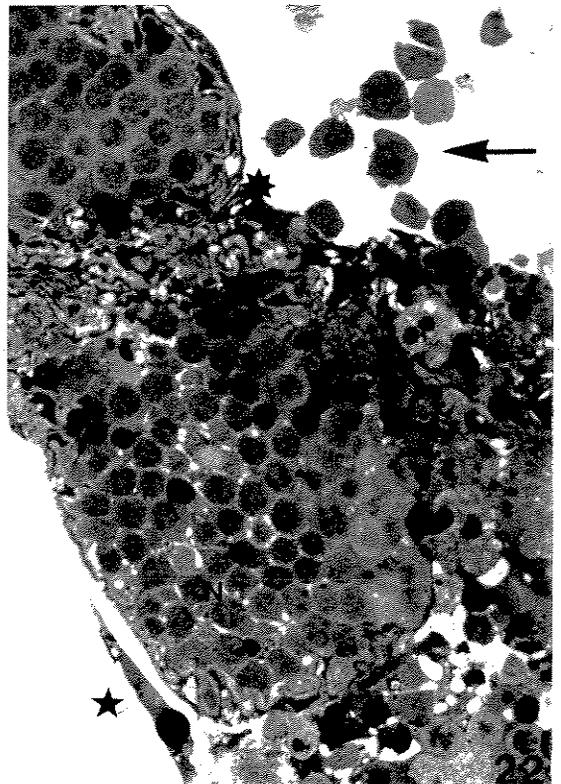
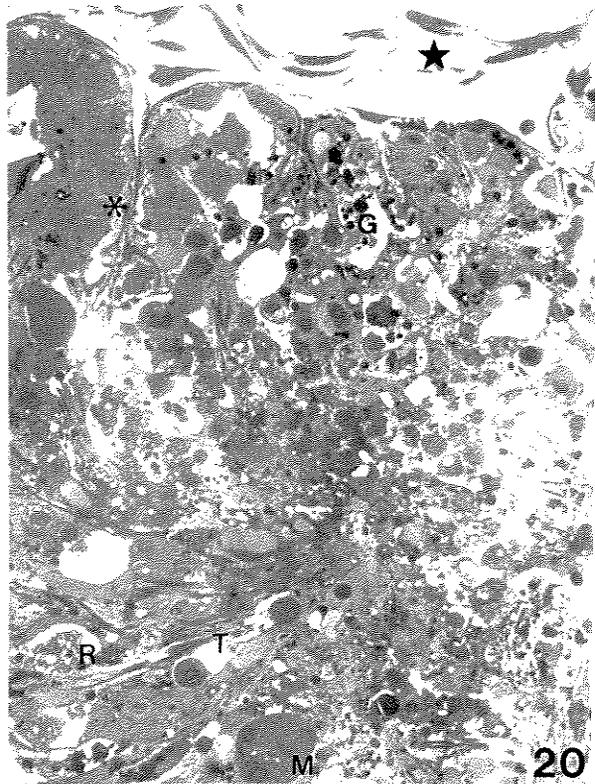
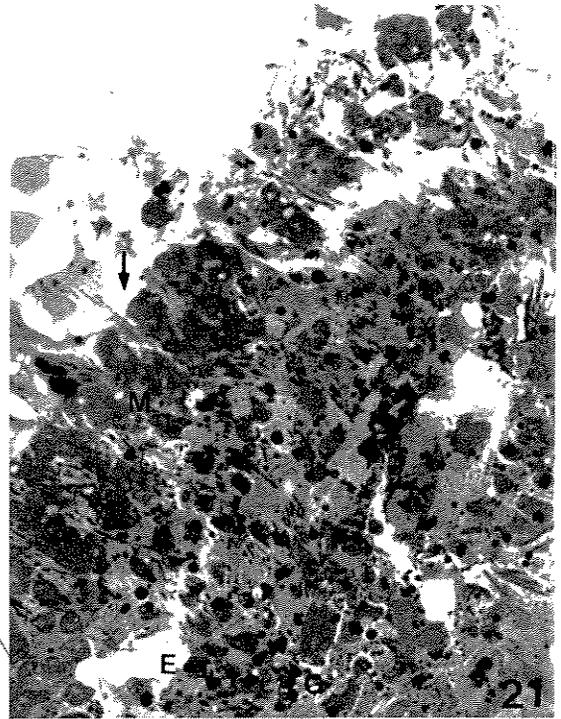
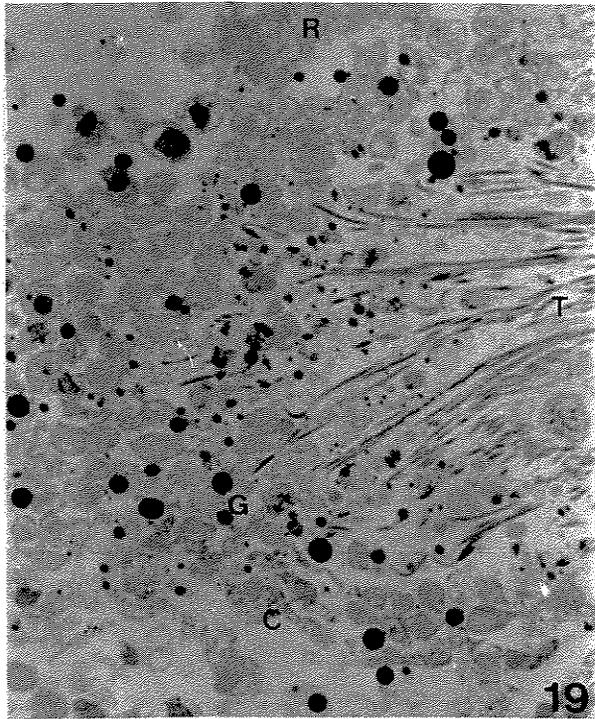


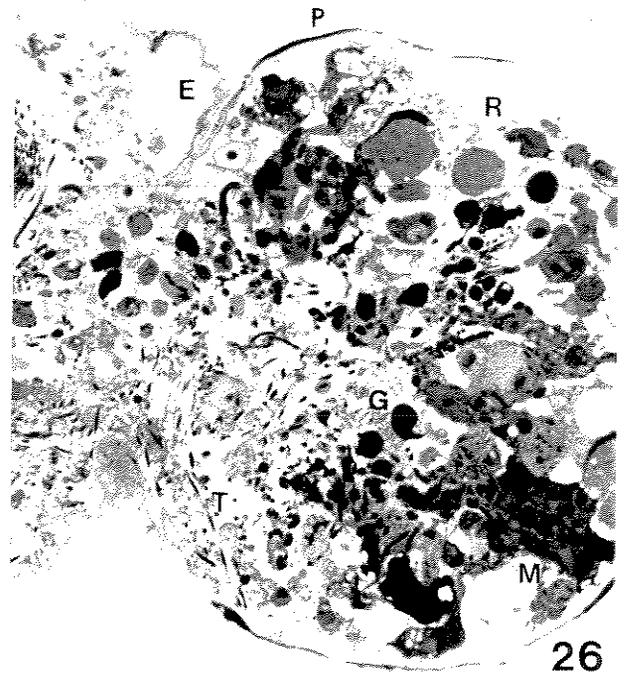
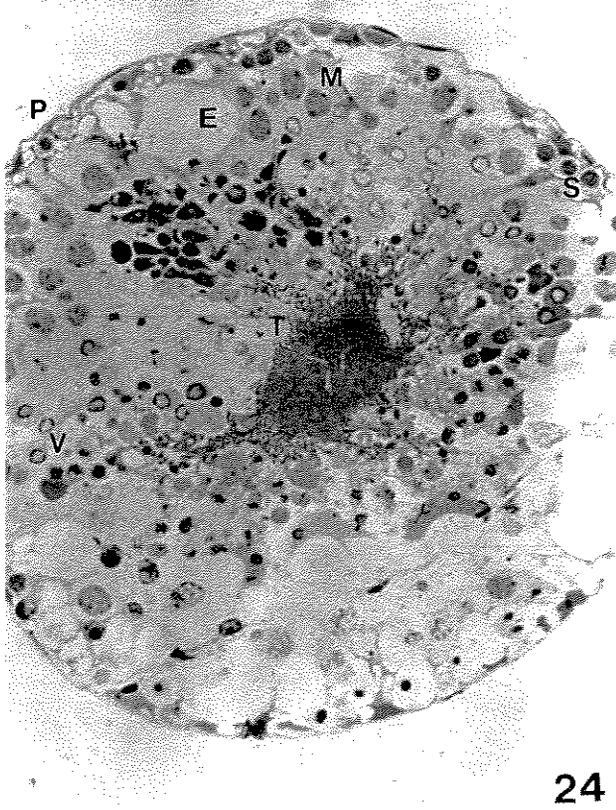
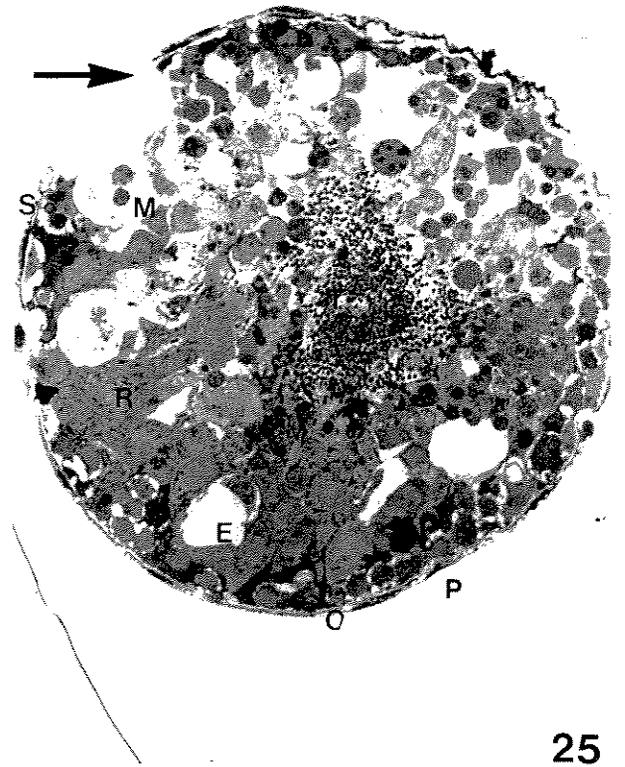
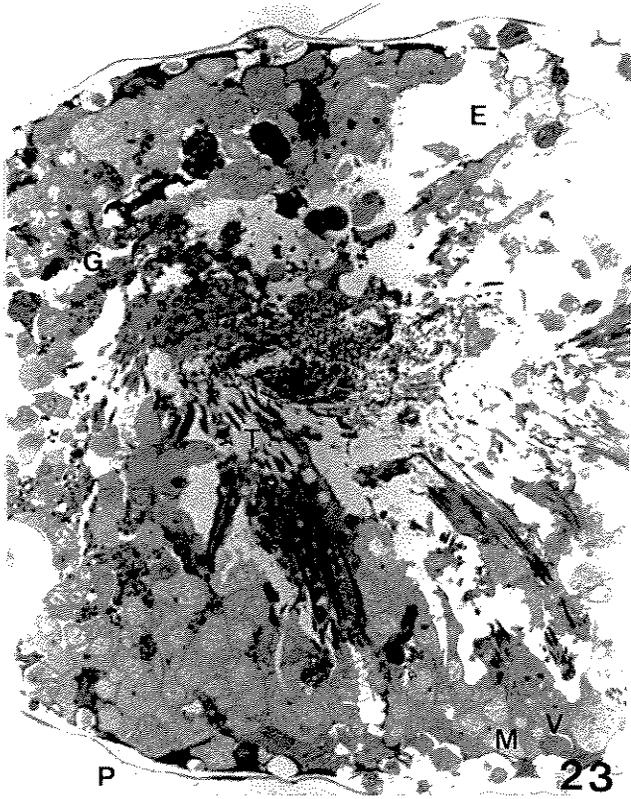
7

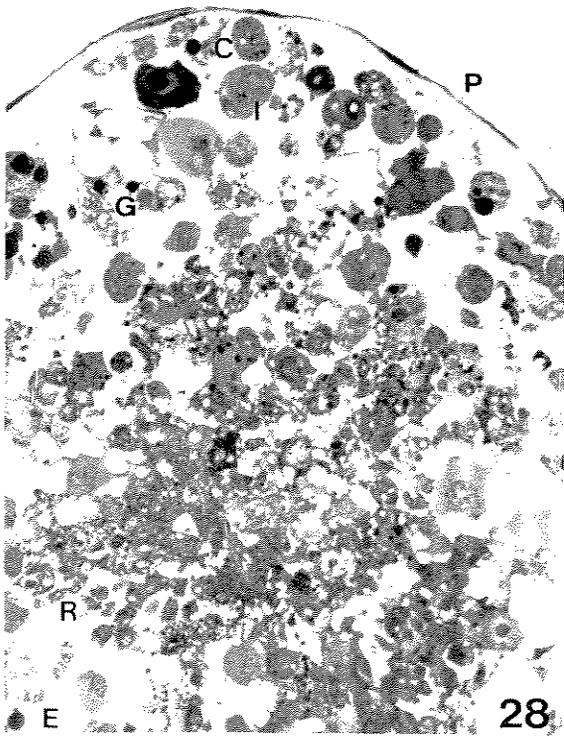
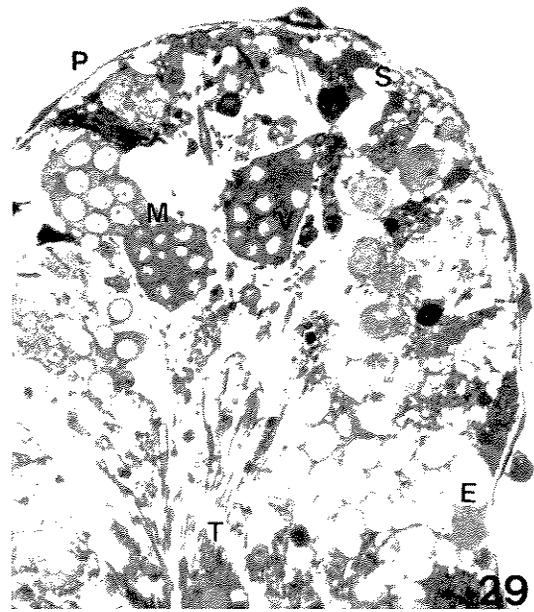
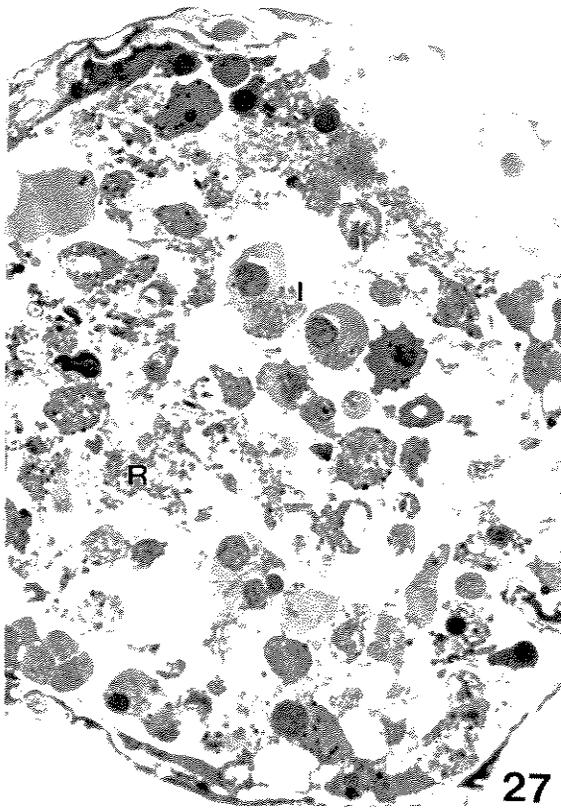


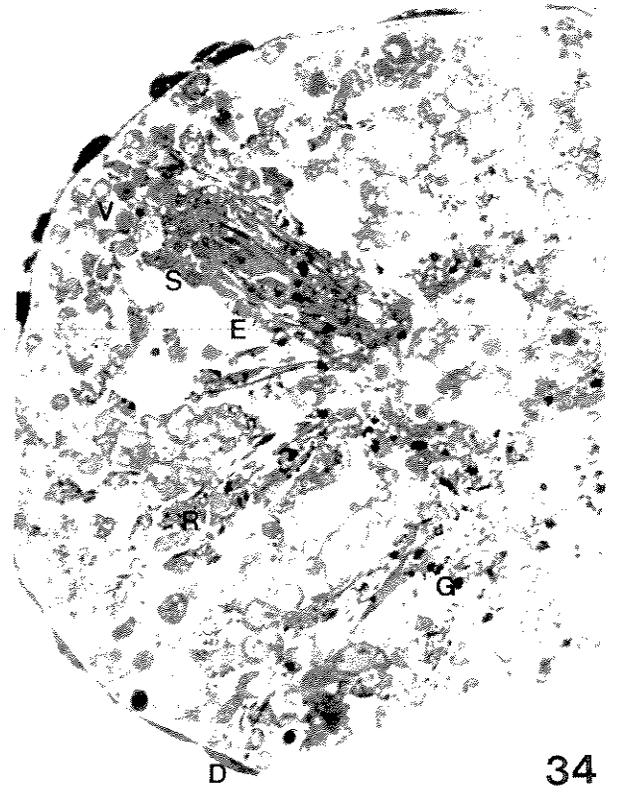
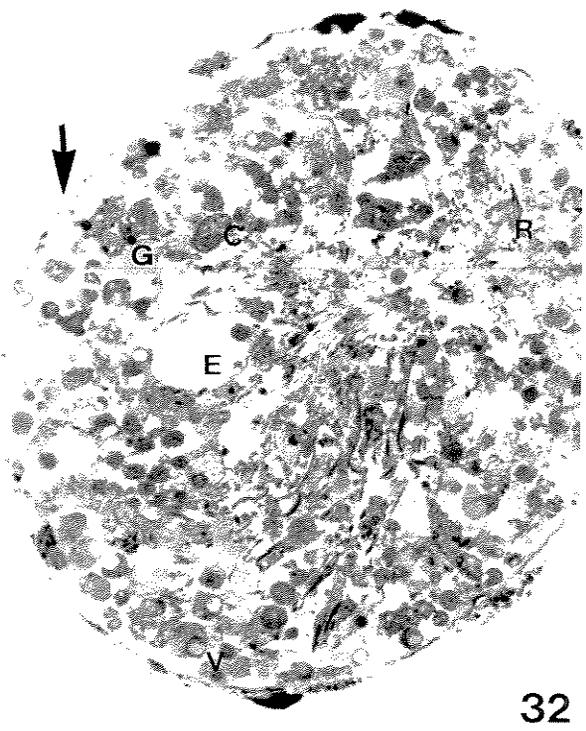
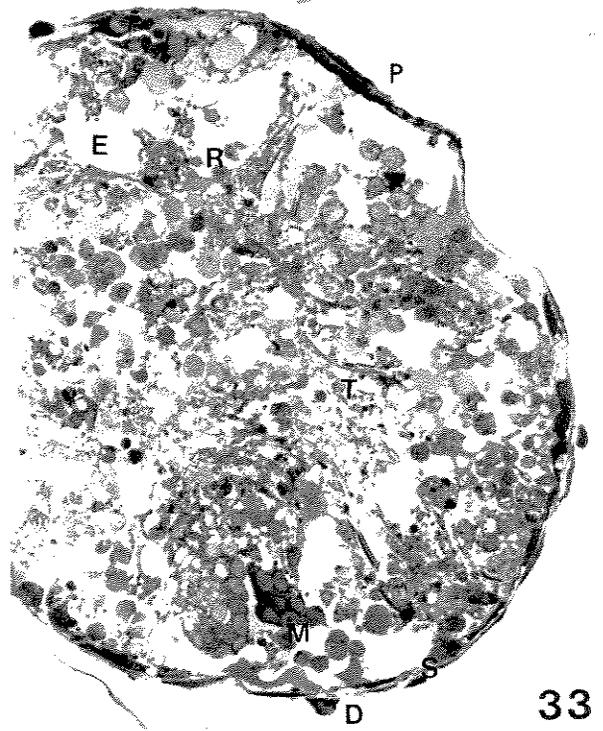
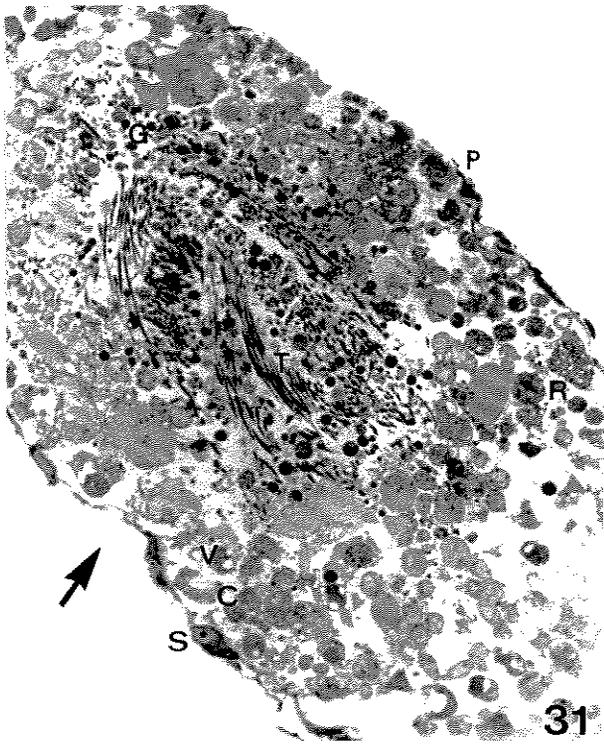


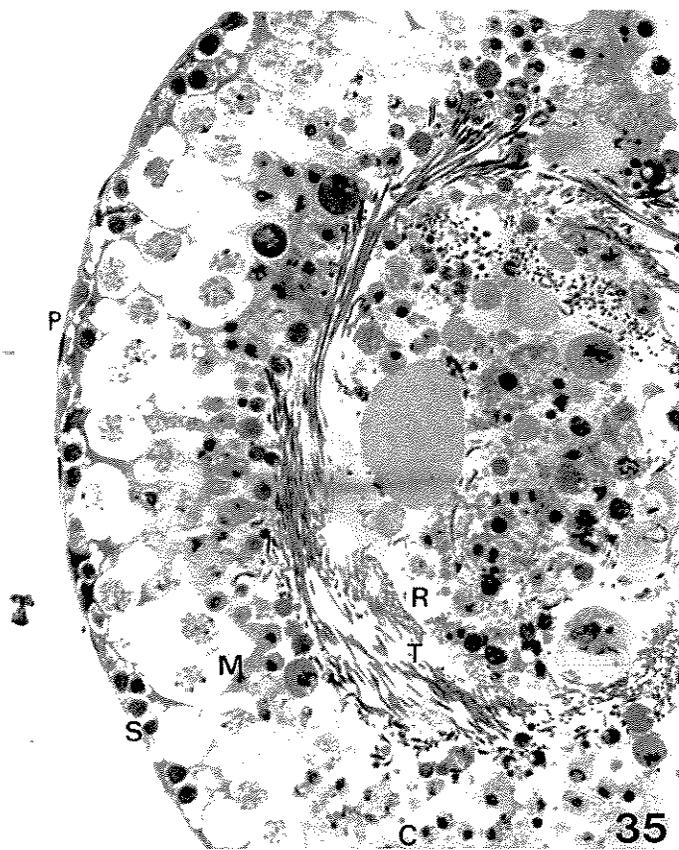




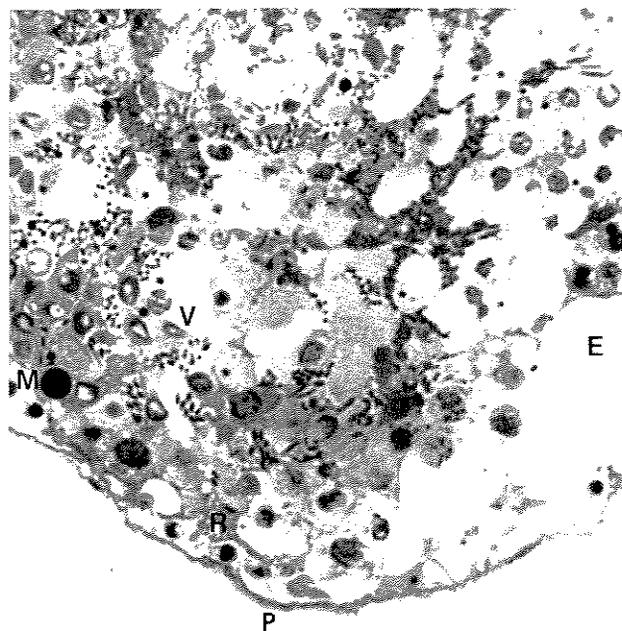




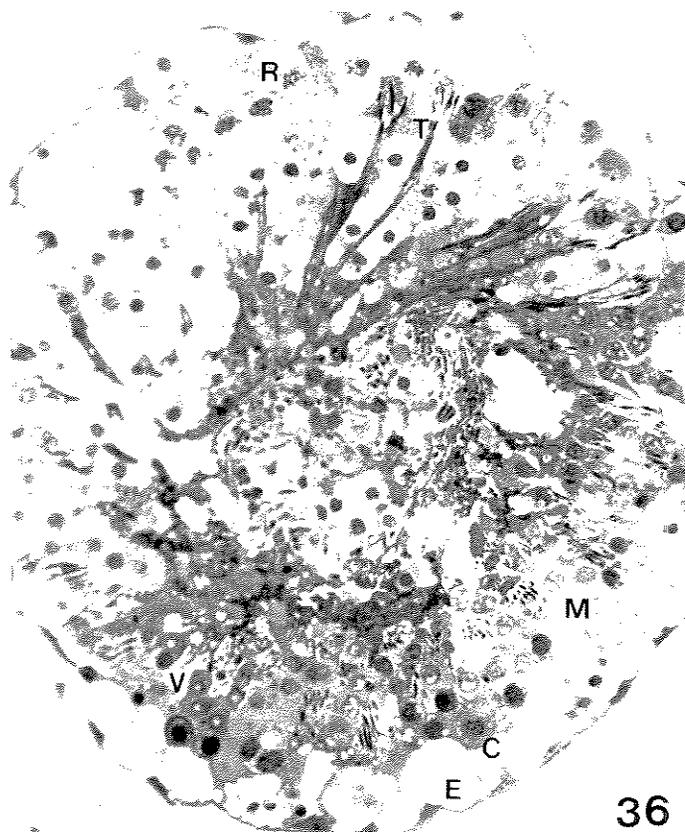




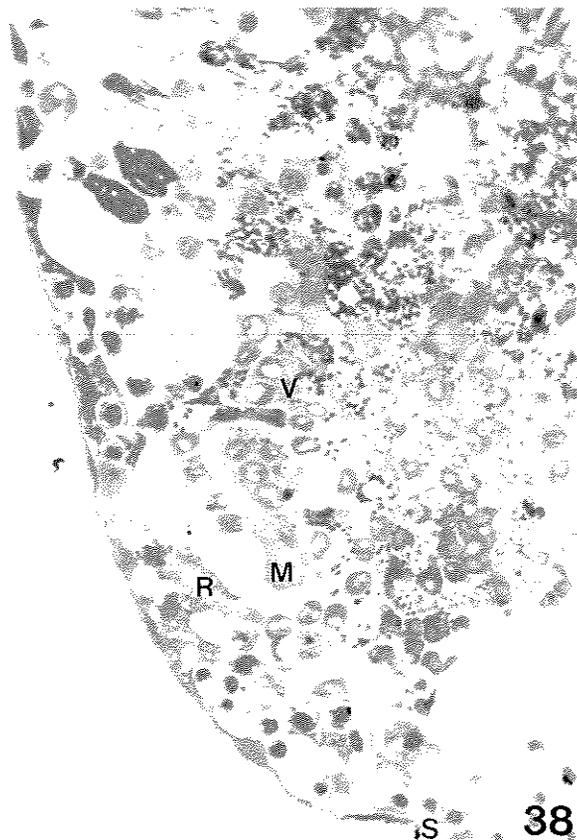
35



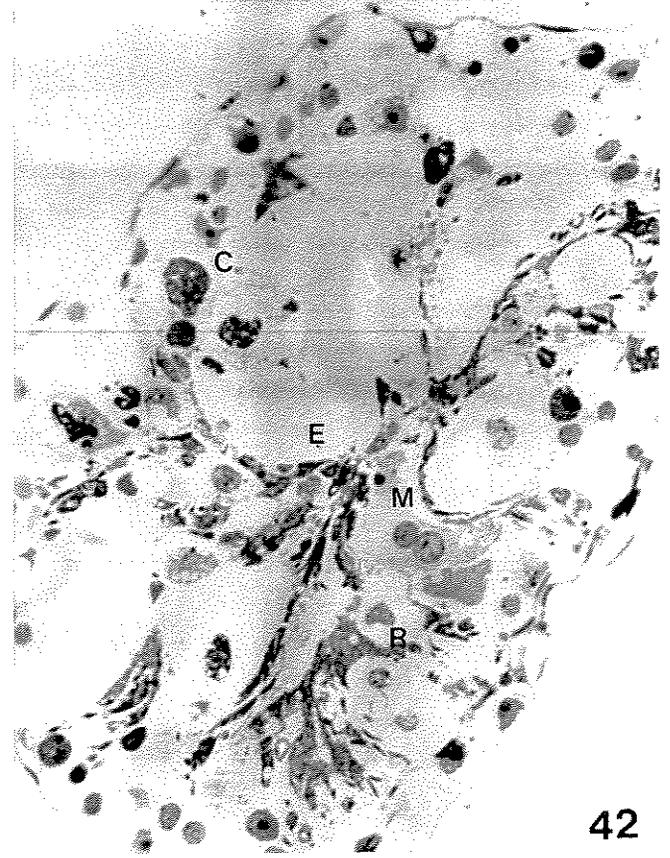
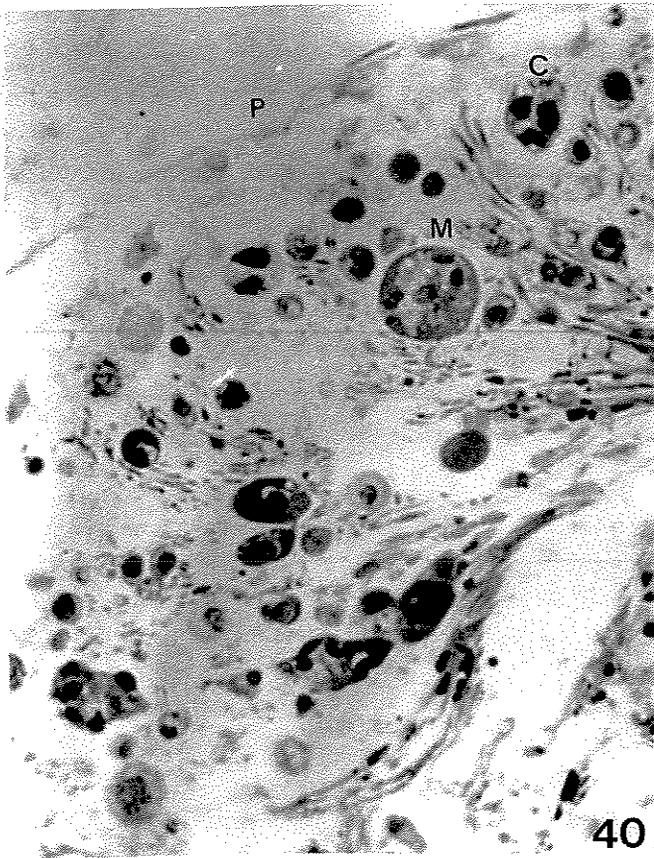
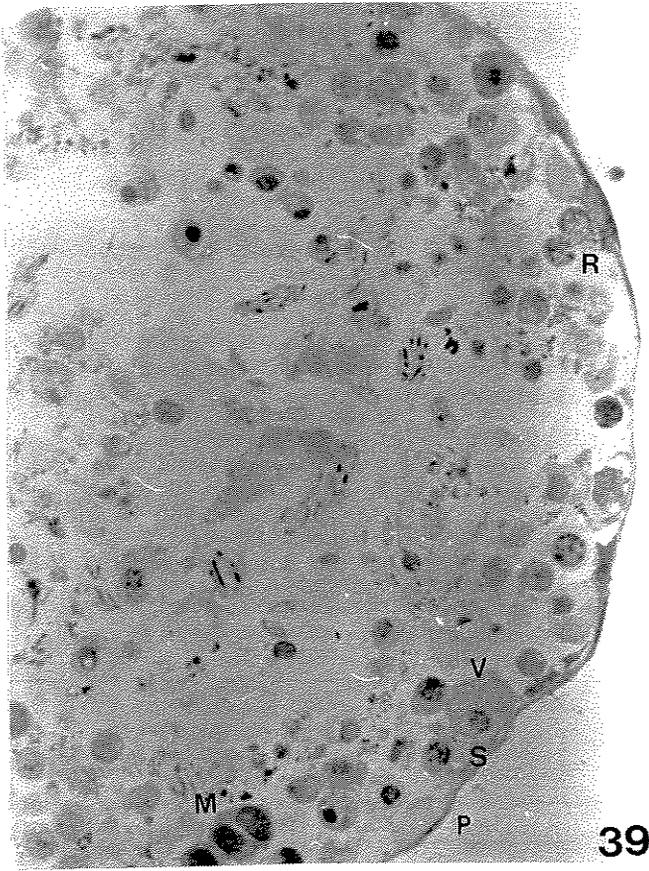
37

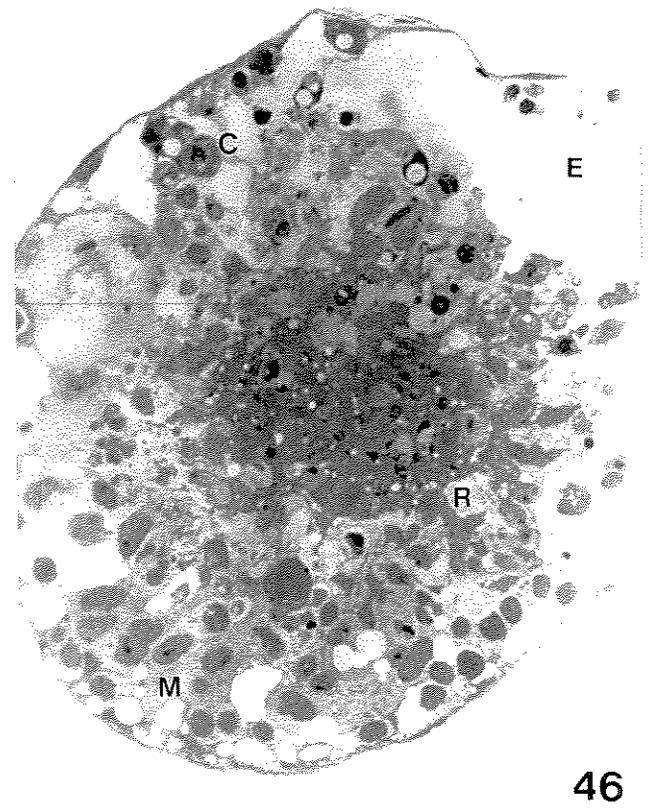
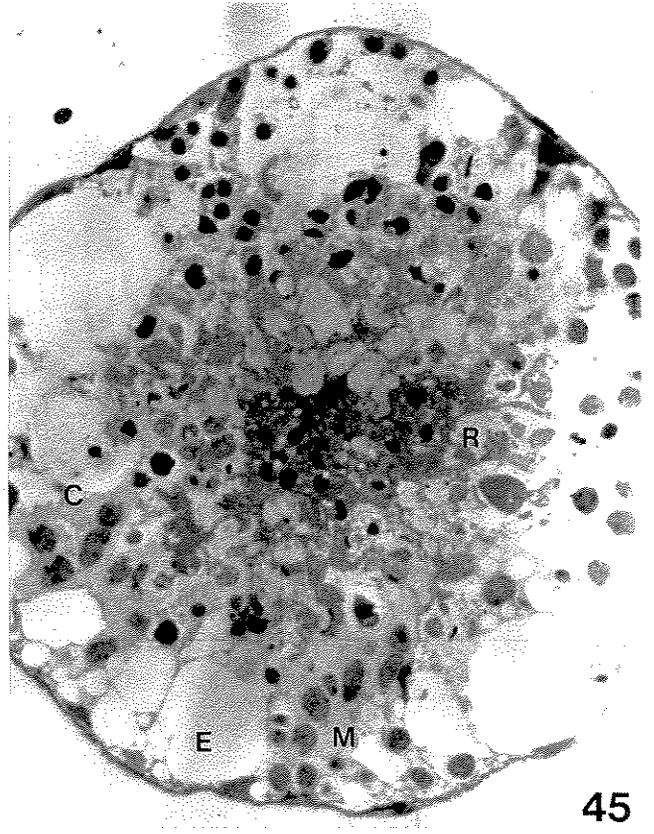
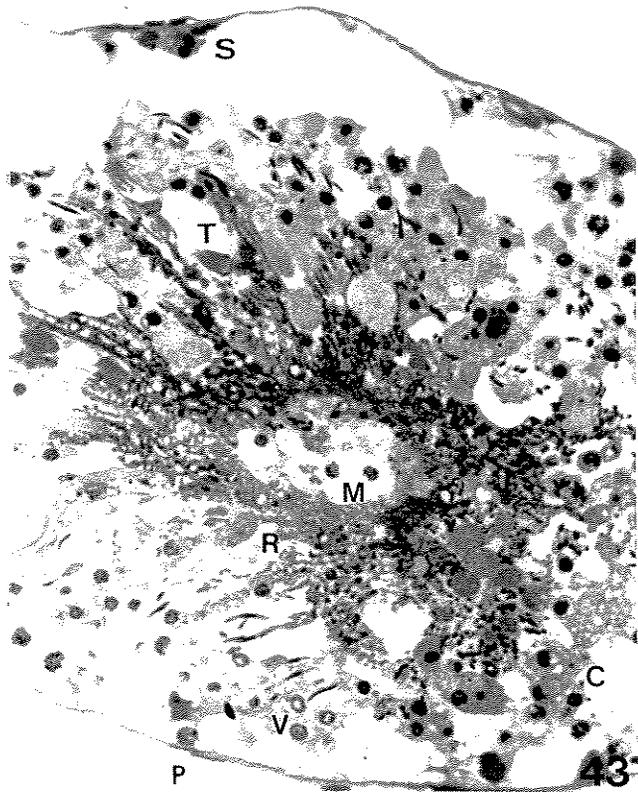


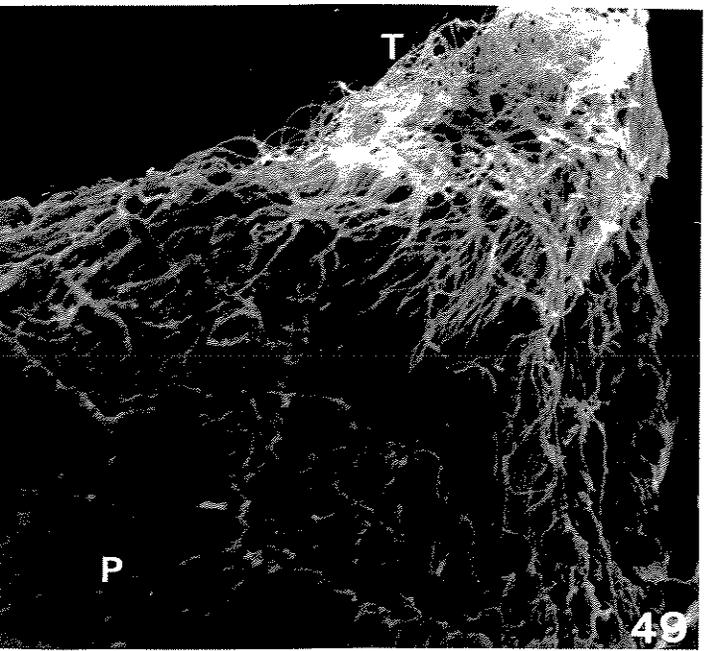
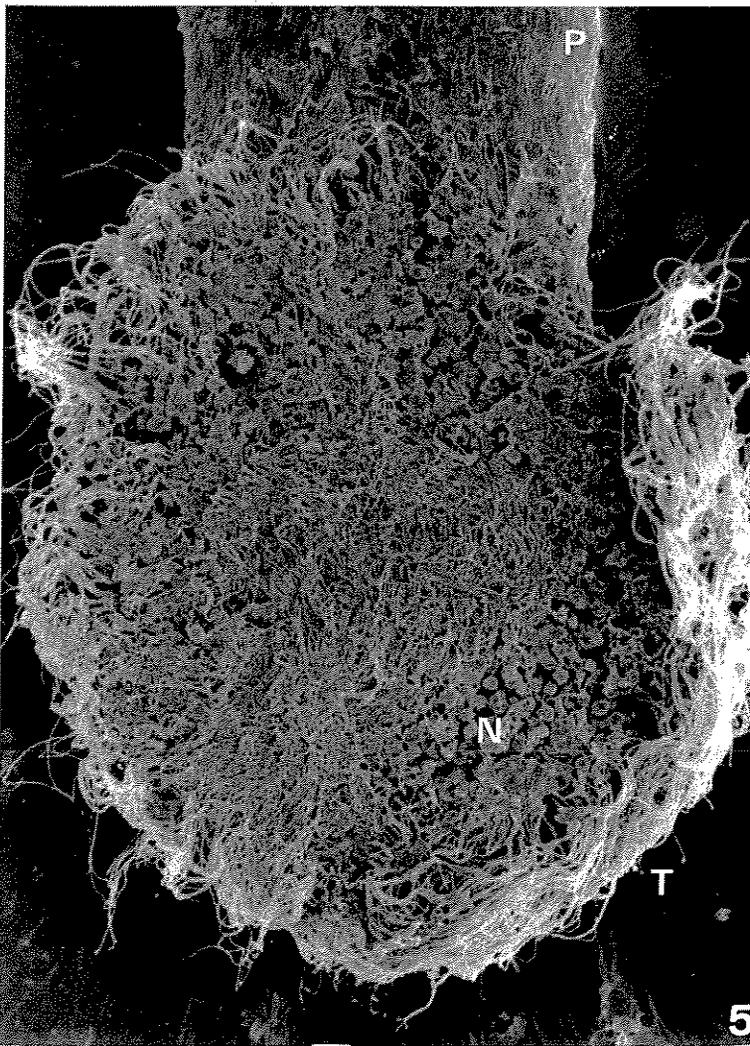
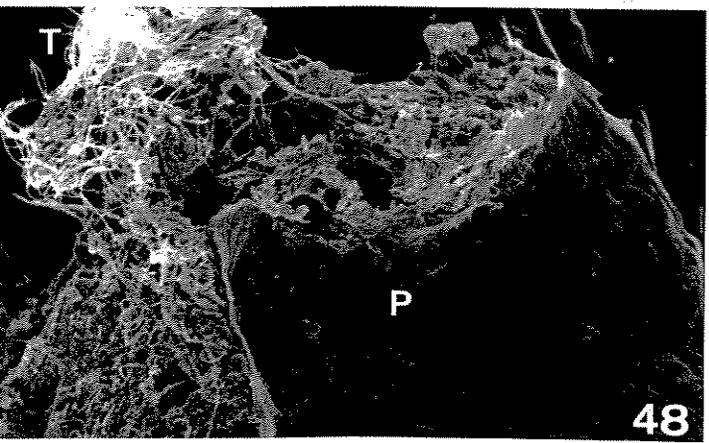
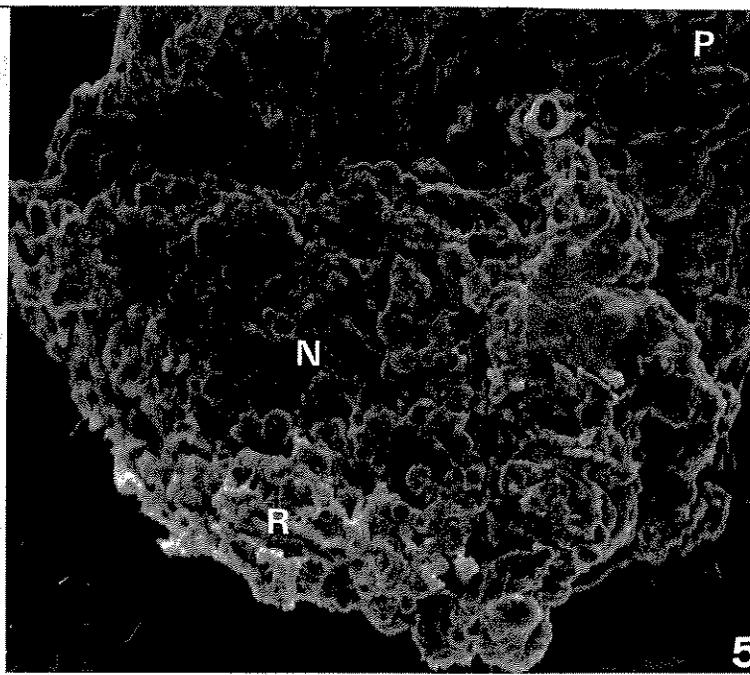
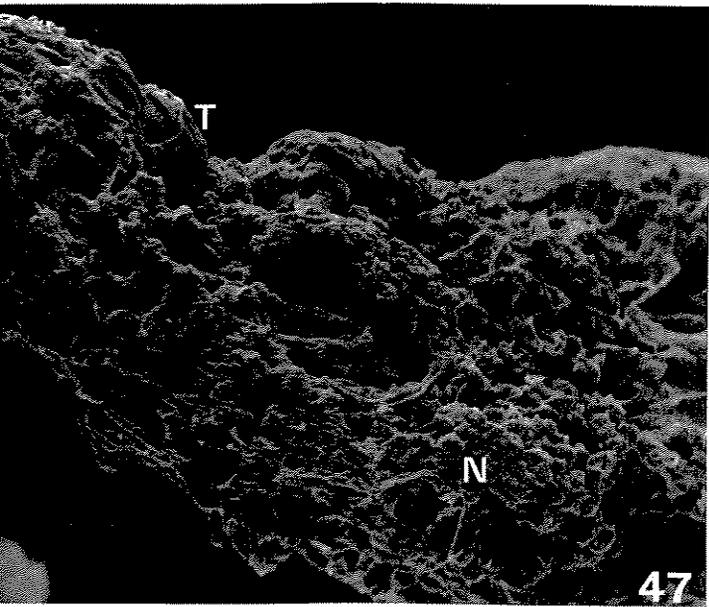
36

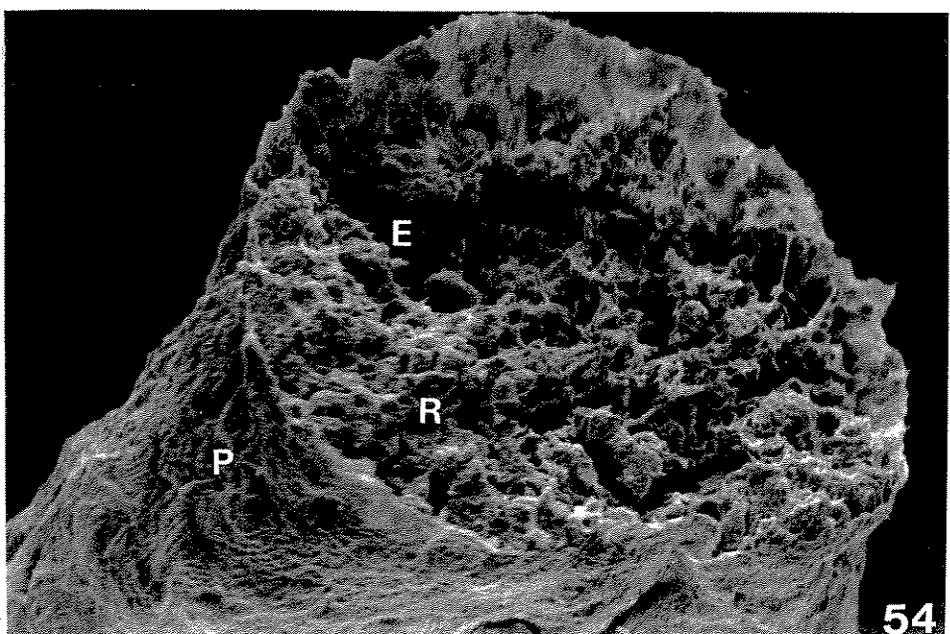
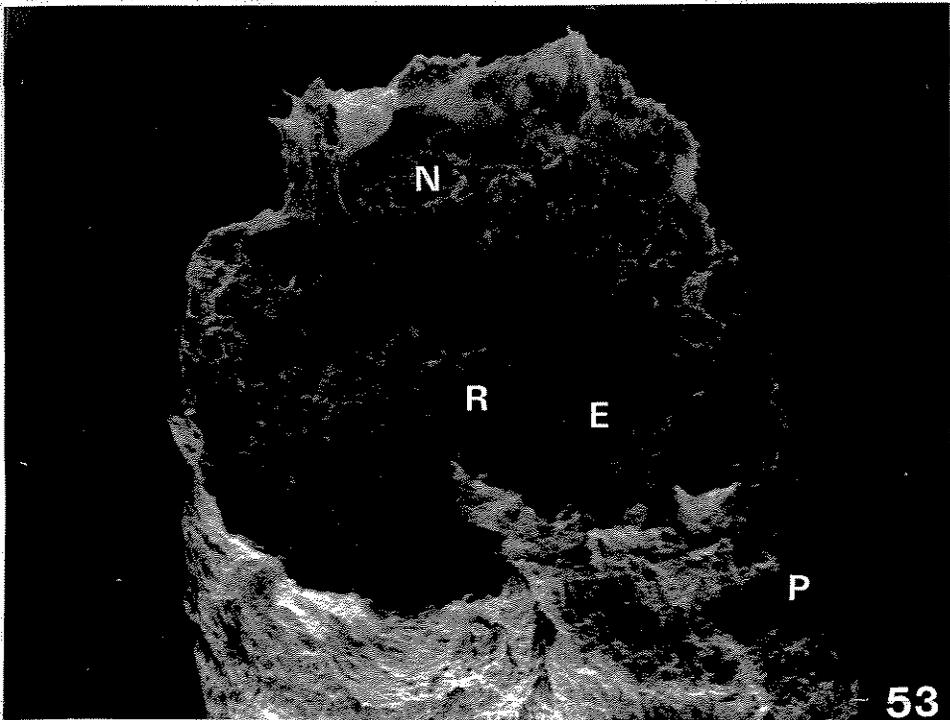
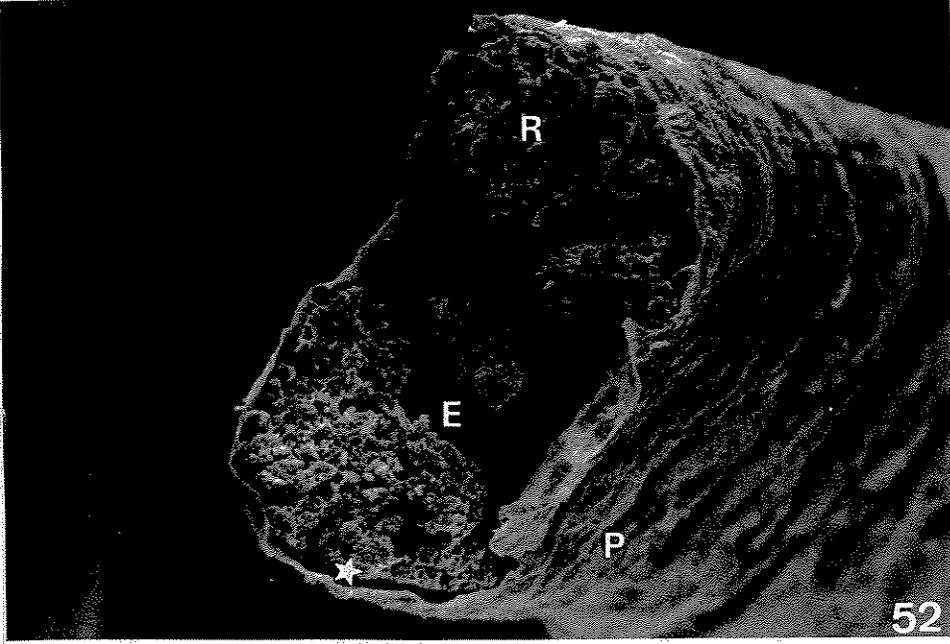


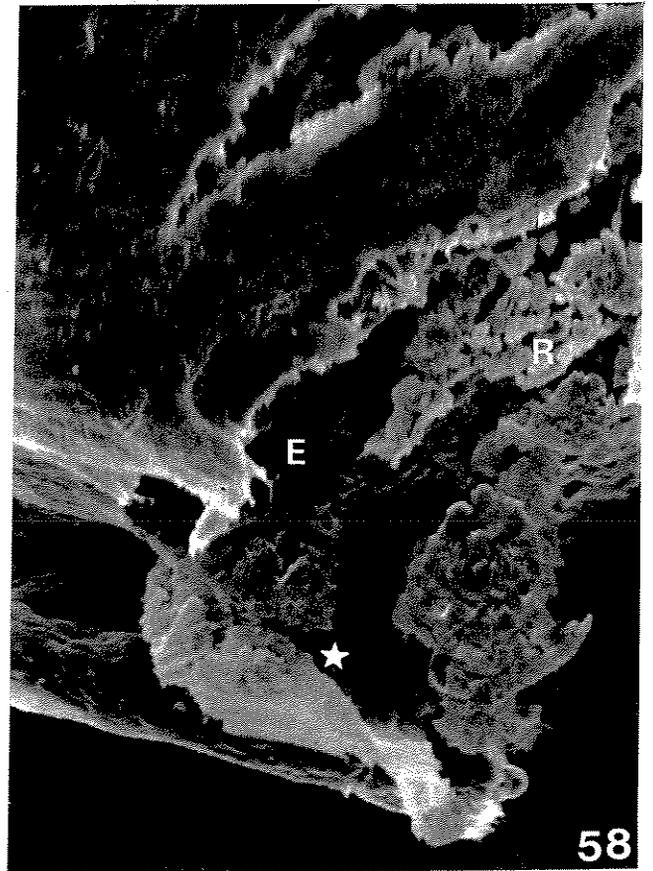
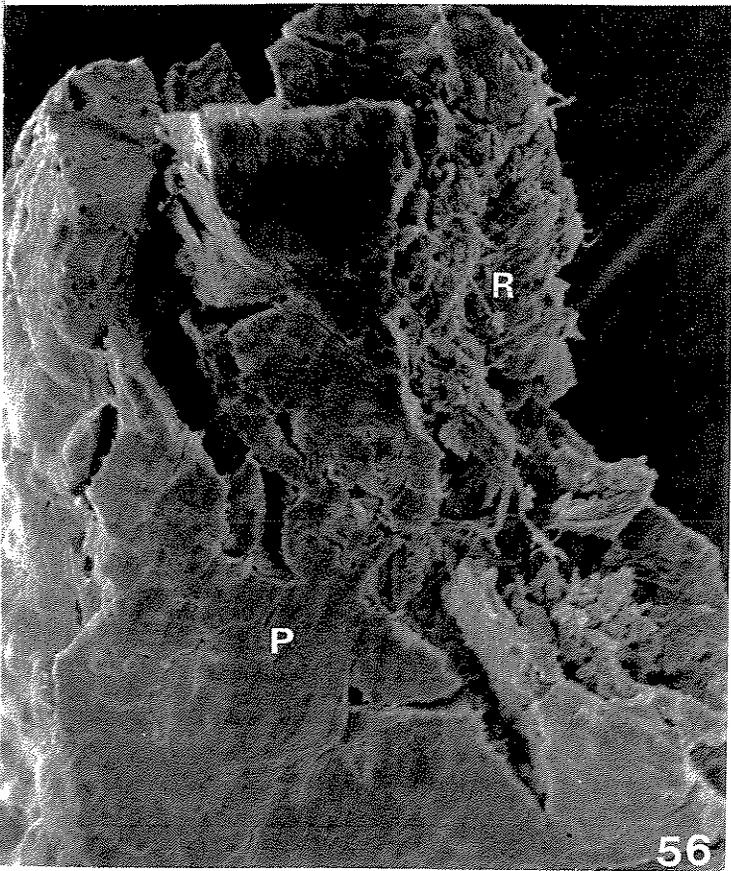
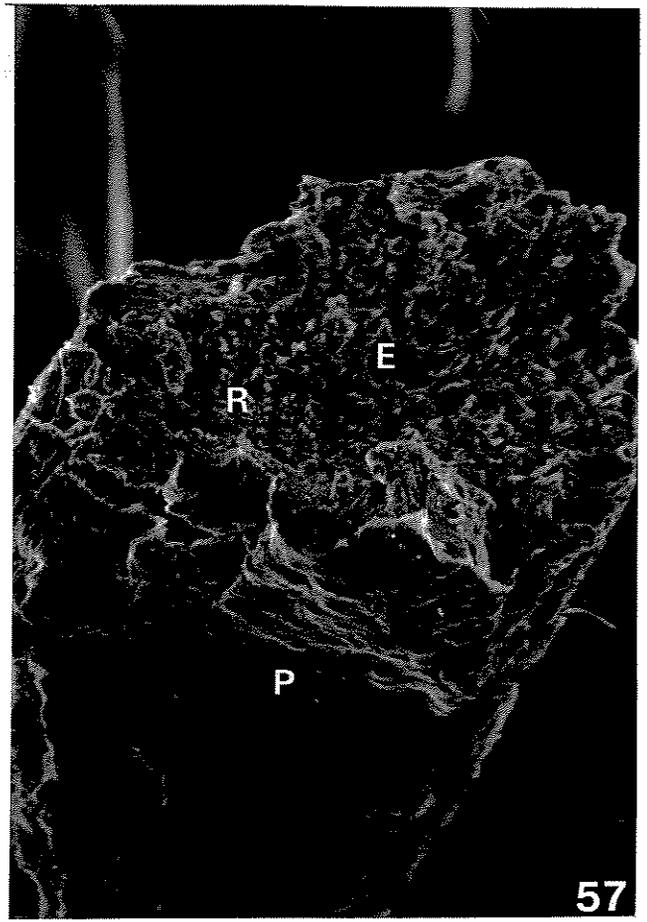
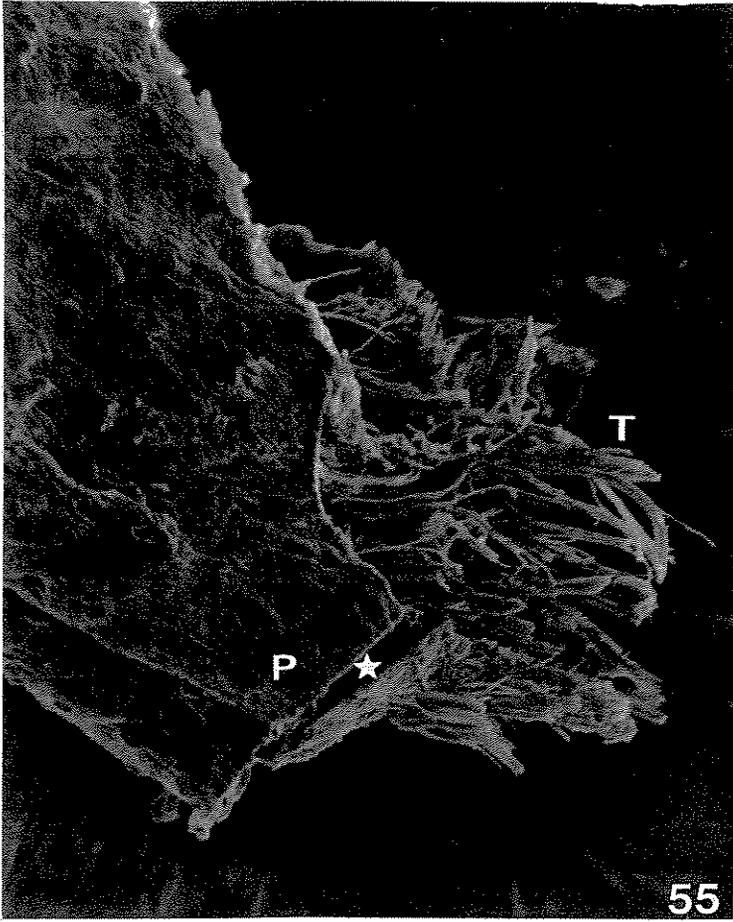
38

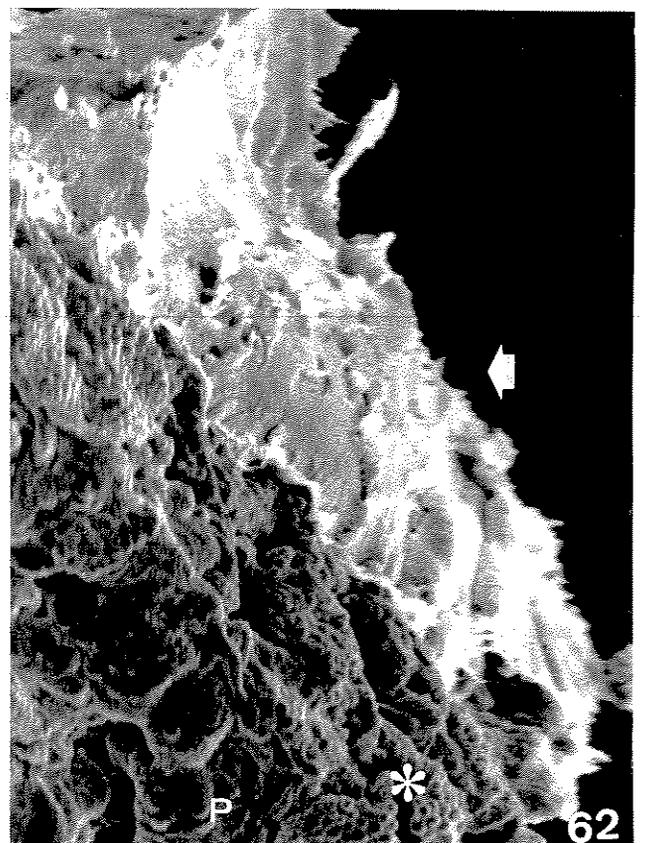
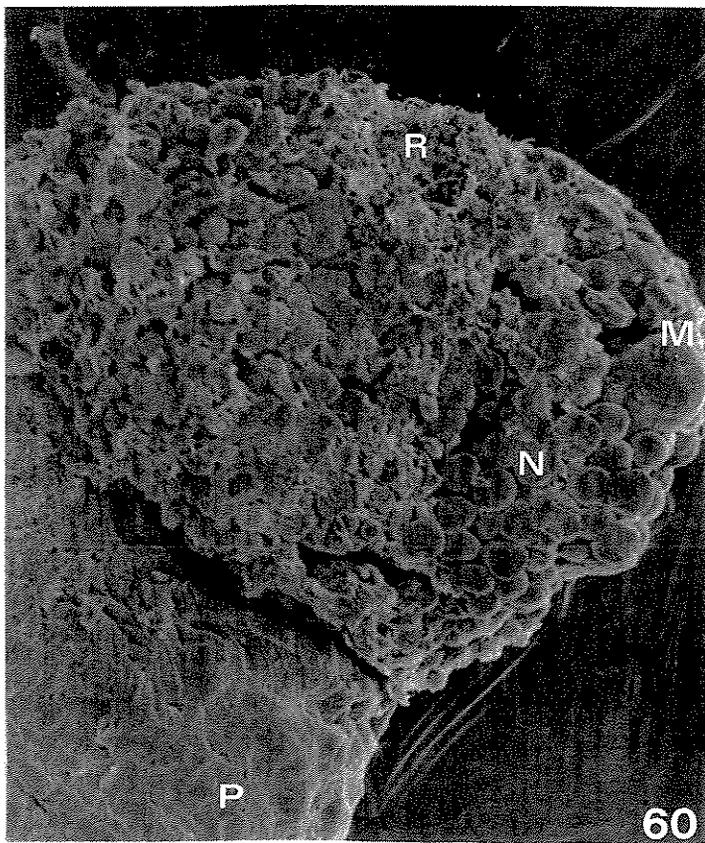
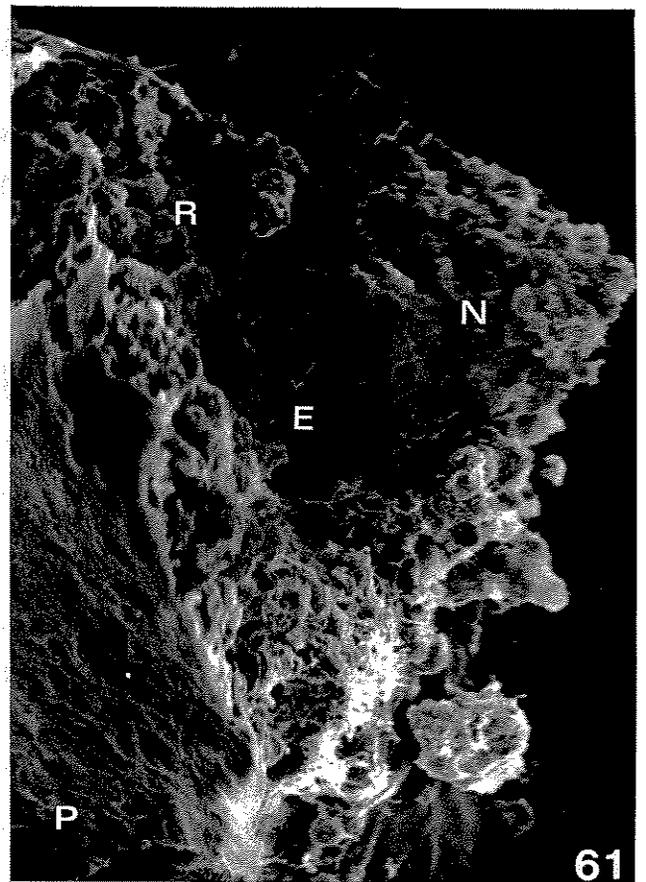
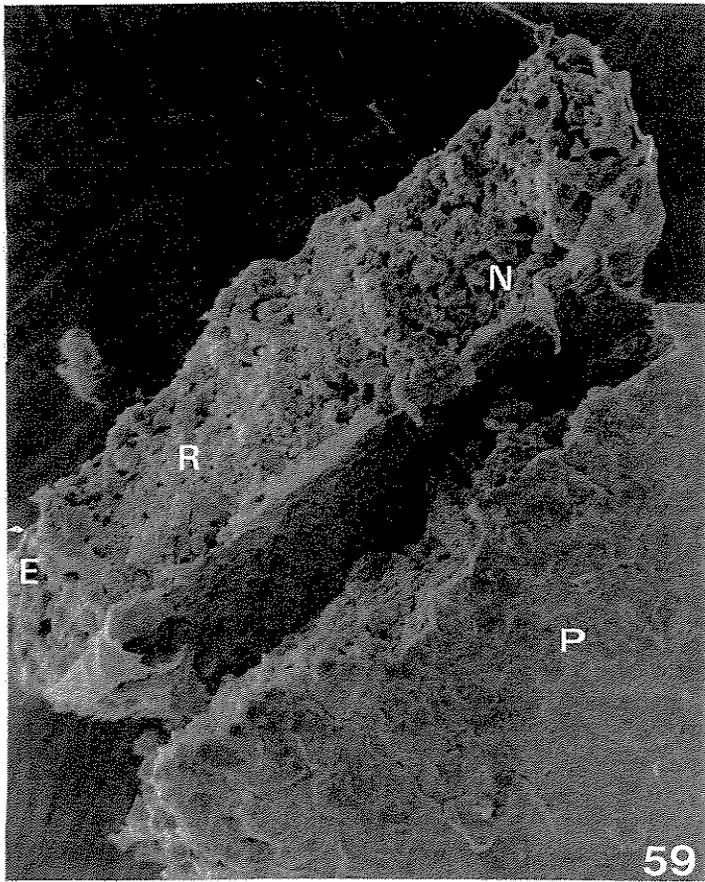


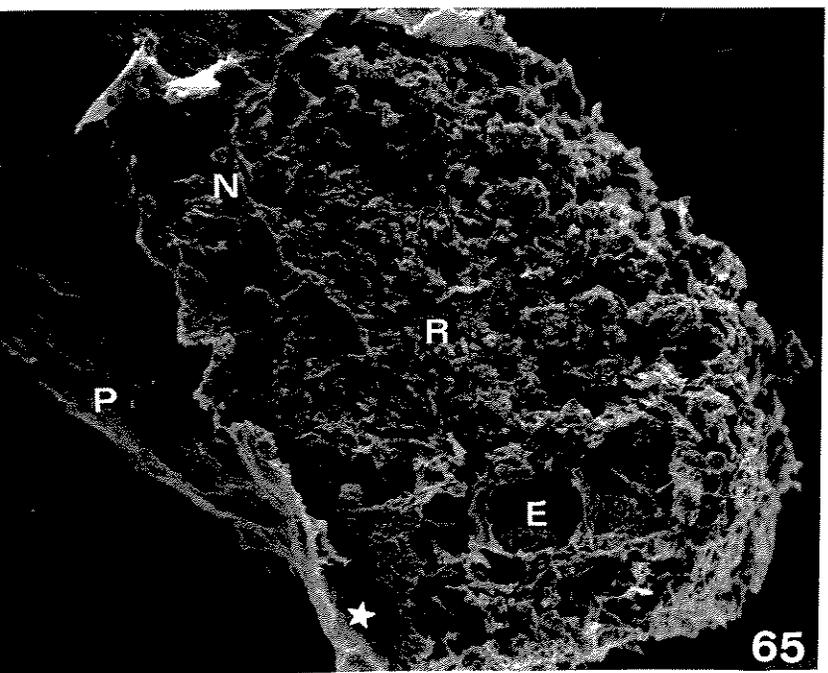
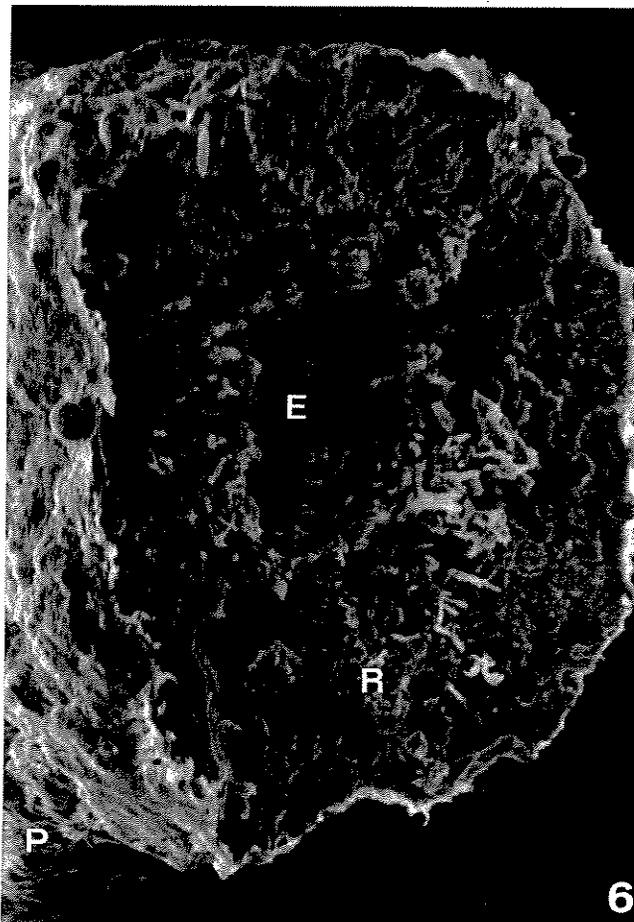
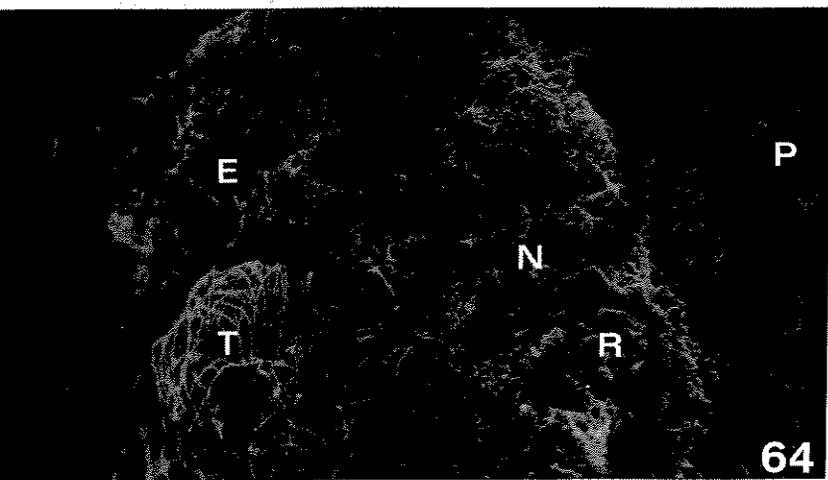
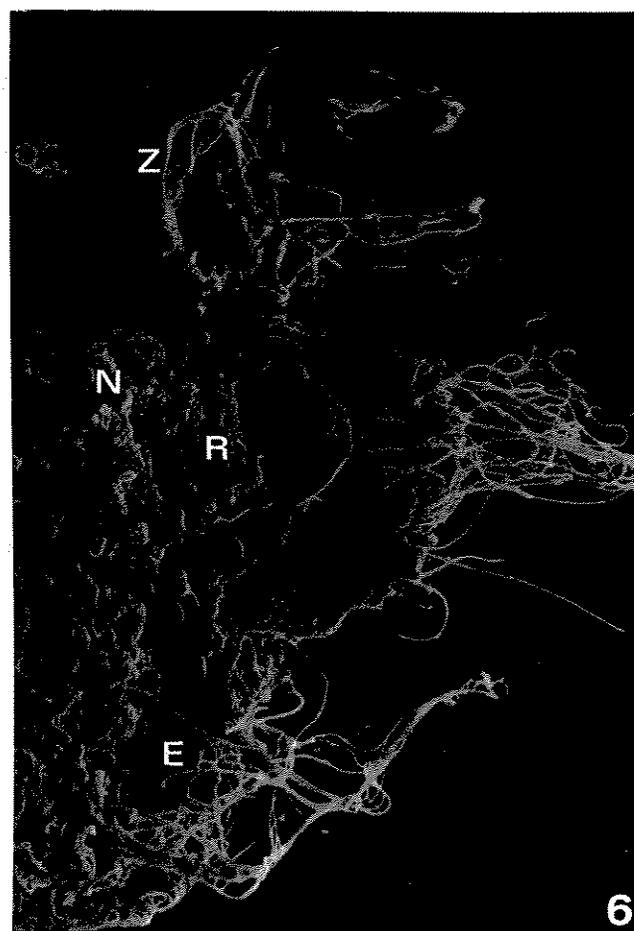
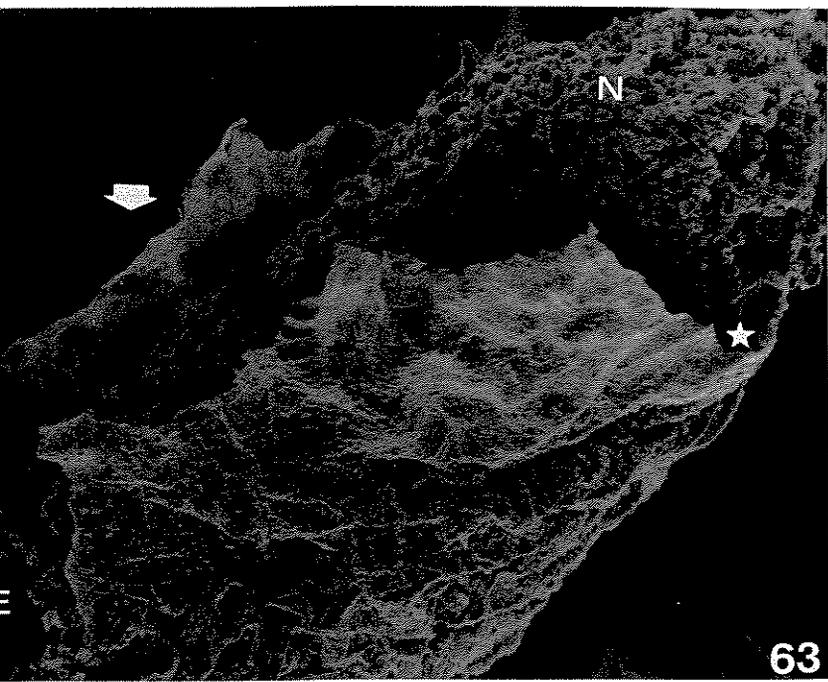


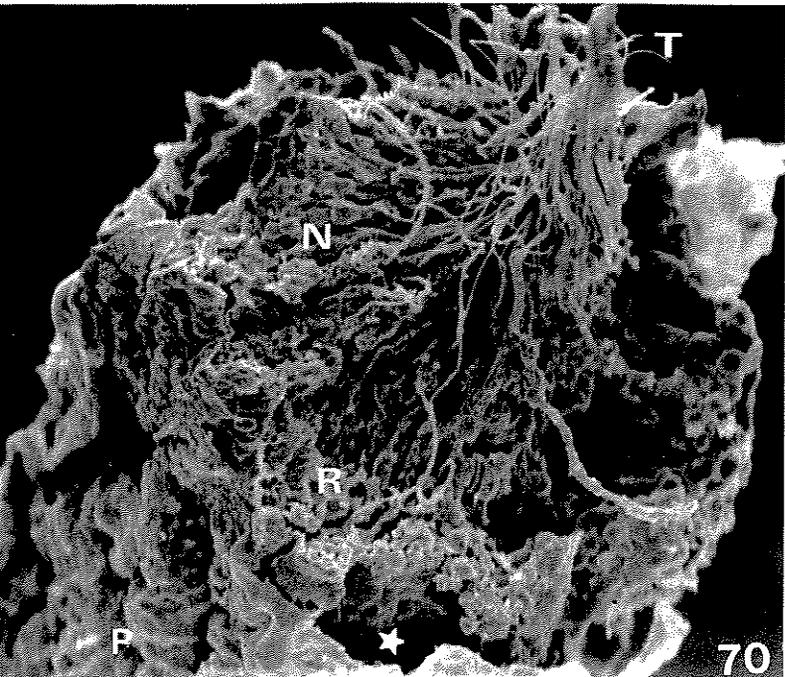
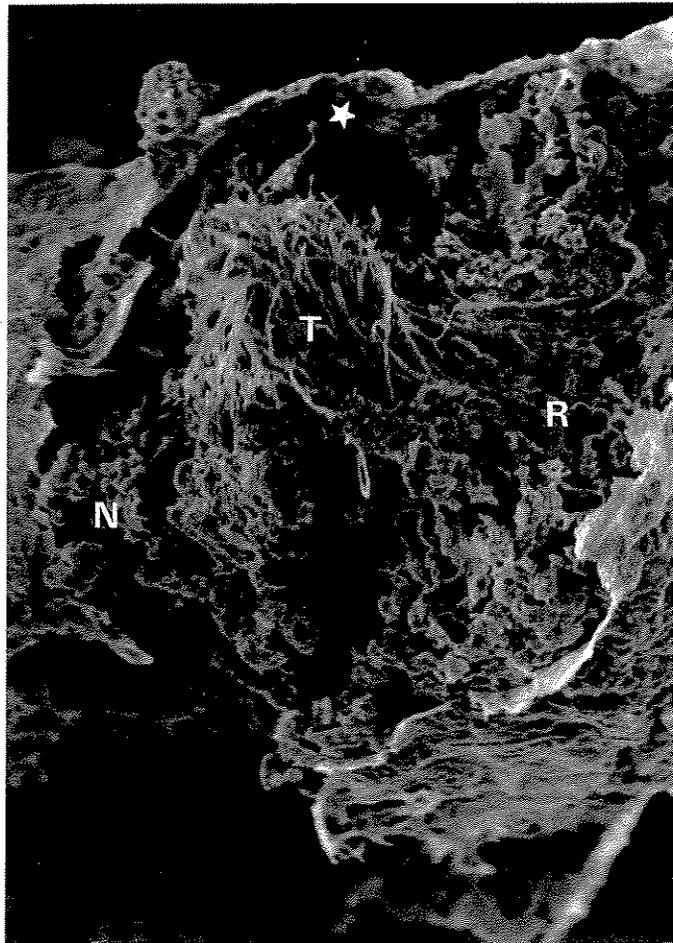
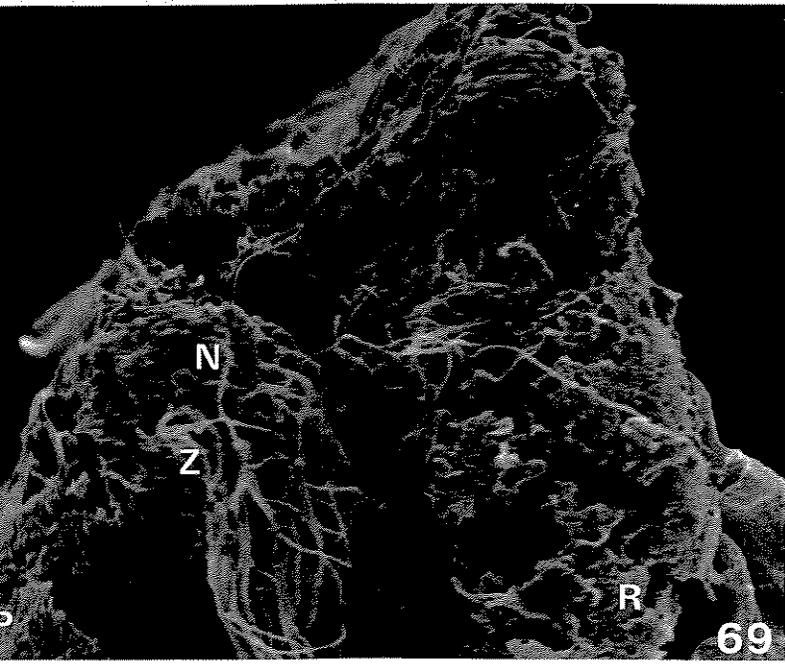
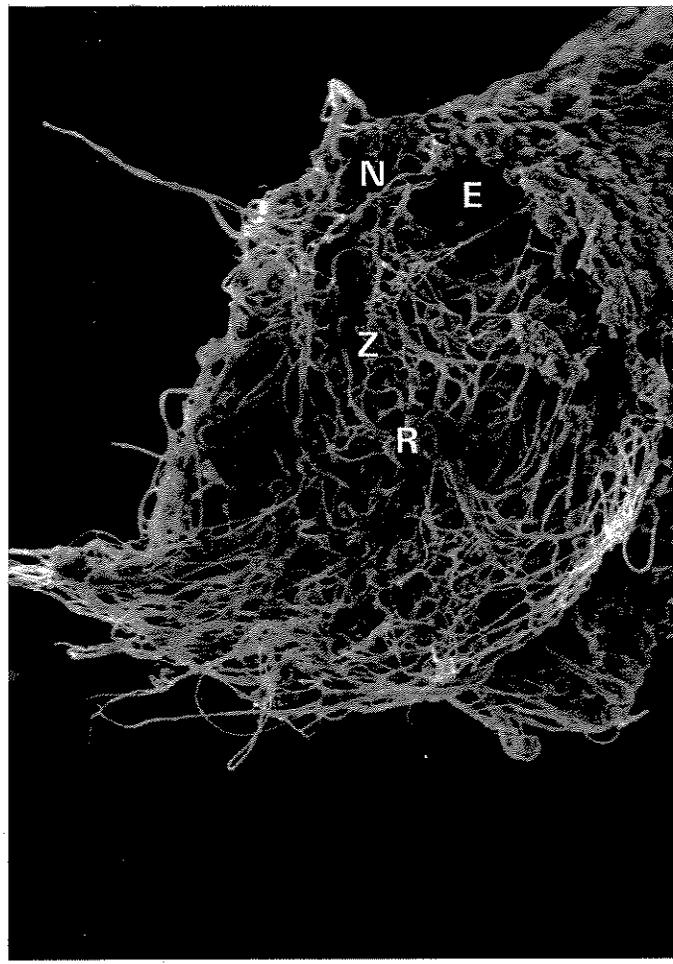
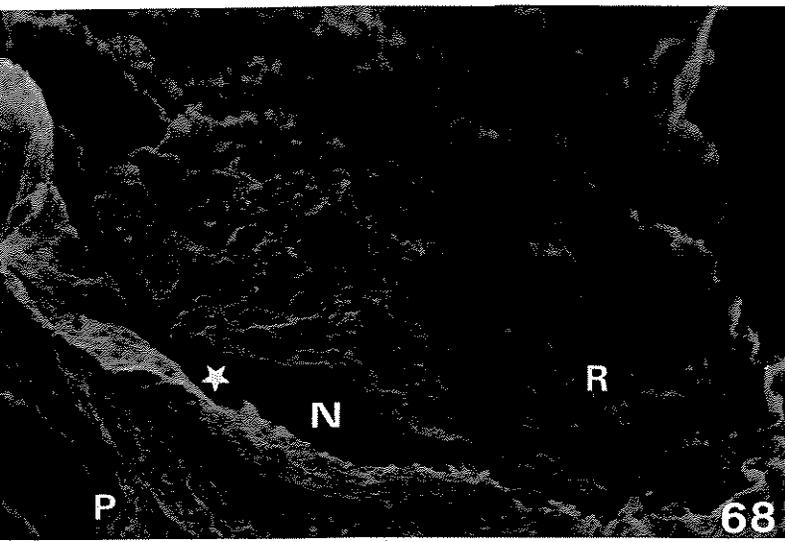












V. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos diferentes experimentos demonstraram aspecto alterado dos fragmentos dos túbulos seminíferos em relação ao padrão encontrado *in vivo*, principalmente no que diz respeito à organização do epitélio germinativo. Não foram mantidas as relações entre as diferentes populações celulares, como estão presentes em tecidos íntegros (Leblond & Clermont, 1952a, b; Fawcett, 1975a, b; Ritzén *et al.*, 1989).

As técnicas de isolamento e fragmentação dos túbulos seminíferos introduziram alterações estruturais severas no epitélio germinativo. A opção por realizar isolamento mecânico dos fragmentos visou eliminar danos causados por tratamento enzimático, que envolve tripsina ou colagenase, e poderia afetar a parede tubular, removendo as células mióides, e conseqüentemente fragilizando-a (Wright *et al.*, 1983; Seidl & Holstein, 1990). O uso de tampão PBS durante a preparação do material (Kangasniemi *et al.*, 1990a) facilitou a manipulação dos túbulos, tornando-os menos viscosos e tendo como conseqüência a diminuição dos danos. Mesmo assim, foi comum observar ao microscópio invertido a extrusão de células nas extremidades e através dos fragmentos em padrão semelhante ao citado por outros autores (Parvinen *et al.*, 1983; Seidl & Holstein, 1990). A presença de diferentes tipos celulares em extrusão pode auxiliar na identificação dos fragmentos em cultura através da análise por transiluminação (Parvinen *et al.*, 1983). Em nossos experimentos as células mais comumente observadas sofrendo extrusão foram as espermátides, podendo também ser encontrados espermatócitos. Este fato pode ser justificado pela localização central e por sua relação não tão intrínseca com as células de Sertoli, principalmente no que se refere às espermátides (Russell, 1977a, b; Ritzén *et al.*, 1989). A aparência destas células foi sempre saudável, mesmo quando a cultura se estendeu por quinze dias. Nas extremidades dos fragmentos que apresentaram extrusão foi freqüente a formação de agrupamentos celulares, e conseqüente diminuição de densidade celular intratubular. Alguns túbulos acabaram por desintegrar-se, transformando-se num aglomerado de células, sendo impossível prosseguir com seu processamento.

Juntamente com a extrusão celular surgiram espaços intercelulares

se manteve em todos os experimentos realizados. Por ter sido uma característica observada nas análises dos túbulos seminíferos antes de serem cultivados (FIGURAS 5 e 47), deve ser atribuída às condições de manipulação, apesar de ter sido agravada com o tempo de cultura.

Para eliminar ou pelo menos minimizar esta perturbação, foi realizado o fechamento das extremidades tubulares com leve esmagamento, a partir dos experimentos 6 e 7. Notamos que apesar deste procedimento ter impedido o fluxo intenso de células para o exterior dos túbulos a descamação destas em direção ao lúmen permanece (FIGURAS 24 e 49). Este fato corresponde ao colapso da corda espermatogênica (Steinberger & Steinberger, 1970; Seidl & Holstein, 1990). Esta desorganização afetou principalmente as células de localização mais central no túbulo (FIGURAS 4 e 48), sendo que as espermatogônias geralmente mantiveram sua posição periférica, e parecendo ser uma população de células pouco afetada pelas condições de cultura. Desta forma, estas células poderiam garantir a continuidade do processo de espermatogênese caso as condições de desenvolvimento fossem favoráveis novamente, como descrito por outros autores (Clermont & Hermo, 1975; Steinberger & Steinberger, 1970; 1975).

Uma vez que as células do epitélio seminífero dependem da integridade das relações estruturais presentes neste tecido, a desorganização, causada pela manipulação, interfere no desenvolvimento celular. A provável causa desta desorganização, introduzida através de processos mecânicos de isolamento dos fragmentos, pode estar relacionada às perturbações físicas sofridas pelas células de Sertoli. Desta forma, as interações destas células com as células germinativas seriam desfeitas, e estas últimas seriam liberadas de sua posição original no epitélio. Na análise histológica dos fragmentos antes de serem cultivados não foram observadas alterações nas células de Sertoli (FIGURA 5), porém no decorrer da cultura estas apareceram descaracterizadas morfológicamente (FIGURA 29). A desorganização do epitélio seminífero pode causar ou agravar processos de degeneração que se estabeleceram no tecido com o decorrer da cultura.

Apesar do padrão de transiluminação ter se mantido normal durante todo o nosso experimento, notamos que mais da metade dos fragmentos dos experimentos 1, 2 e 3, analisados histologicamente, estavam alterados, coincidindo com os dados da

nestes resultados de manutenção morfológica das células, devido ao aprimoramento das condições de manipulação e cultura.

Os sinais de degeneração foram observados através de análises histológicas logo no primeiro dia de cultura (FIGURAS 23 e 24), em concordância com o trabalho de Steinberger & Steinberger (1970). Esta degeneração pode estar relacionada à desorganização do epitélio seminífero, distúrbios morfológicos e funcionais das células de Sertoli e alterações da parede tubular como citado por Seidl & Holstein (1990). Os sinais de degeneração mais aparentes que encontramos foram: o arredondamento nuclear das células mióides (FIGURAS 10 e 34), o espessamento da parede tubular (FIGURAS 12 e 16), a presença de resíduos celulares (FIGURAS 28 e 54), além de vacuolização citoplasmática (FIGURA 9) e/ou nuclear (FIGURA 29).

Como resultado do processo degenerativo que se instala nas células ocorre condensação diferencial da cromatina, caracterizada por vacuolização nuclear, e degeneração dos componentes citoplasmáticos como resultado da diminuição do metabolismo celular. Em consequência aparecem resíduos nos espaços intercelulares, provenientes da intensa degeneração citoplasmática.

A despolarização das células de Sertoli, ou sua descaracterização morfológica, foi observada a partir dos primeiros dias de cultura, onde algumas células são afetadas (FIGURA 24). Isto está diretamente relacionado aos processos preparatórios da cultura e não foi revertido ao longo desta. No quarto dia de cultura, nos experimentos 6 e 7, praticamente todas as células de Sertoli presentes estavam descaracterizadas (FIGURA 29). Outros sinais de degeneração que apareceram neste tipo celular correspondem à presença de resíduos e gotículas de lipídios no citoplasma, que algumas vezes apresenta vacuolização. Também observamos que as gotículas de lipídios presentes nas células de Sertoli tiveram seu padrão de distribuição modificado ao longo da cultura. Inicialmente observamos gotículas pequenas e numerosas, restritas aos citoplasmas celulares (FIGURA 7), como ocorre em tecidos íntegros (Fawcett, 1975b), e ao longo da cultura ocorreu a condensação destas gotículas, que se tornaram maiores e menos numerosas e podendo ser encontradas nos espaços intercelulares (FIGURA 11). Este tipo de distribuição também foi encontrado por Miething (1993) em testículos em processo de envelhecimento, ou na presença de sinais de degeneração, como foi relatado por Seidl & Holstein (1990). A

presença destas gotículas sugere a diminuição do metabolismo de lípidios pelas células (Hoja *et al.*, 1995) acarretando no crescente acúmulo.

A presença de células multinucleadas é freqüente em toda nossa experimentação (FIGURA 24), inclusive entre as células que sofreram extrusão durante a fragmentação dos túbulos, mesmo antes de cultivados. Estas células multinucleadas podem ser espermátócitos normais, devido à sua natureza sincicial, ou mesmo de outros tipos celulares. A presença destes outros tipos celulares está relacionada a alterações patológicas ou degenerativas. Com o decorrer da cultura começaram a aparecer grandes massas celulares multinucleadas (FIGURA 29), que podem ter sua origem a partir do aumento de pontes citoplasmáticas existentes, confluência de membranas ou amitose. Estas massas celulares não são mais de natureza sincicial e envolvem diferentes tipos celulares. Este foi um dos sinais mais evidentes de degeneração e seu aparecimento, em diferentes níveis, permitiu avaliar o grau de degeneração do tecido.

A presença de soro fetal bovino (SFB) como complemento do meio de cultura, utilizado nos experimentos 1,2,3,4 e 5, alterou o padrão histológico dos fragmentos em relação aos fragmentos fixados antes de serem cultivados. Sabe-se que a presença de SFB em sistemas de cultura de tecidos ou órgãos acaba por ativar populações inespecíficas de células, apesar de fornecer vários dos nutrientes necessários para complementar o meio de cultura (Maurer, 1986). Em nosso experimento a característica mais marcante do SFB foi o espessamento da parede tubular, provavelmente devido à síntese de colágeno pelas células mióides em um processo de descaracterização funcional destas células. Observamos várias camadas na parede tubular (FIGURA 12). O espessamento da parede tubular foi acompanhado em geral por invaginação células mióides ou de material da parede tubular em direção ao lúmen, acarretando em aparente aumento da densidade intratubular (FIGURA 18). O aspecto das células mióides também foi alterado devido a aplicação do SFB, tendo sido observado o arredondamento nuclear destas (FIGURA 16). Nos casos das culturas mantidas por 15 dias as células mióides que sofreram extrusão diferenciaram-se em células do tipo fibroblásticas. Estas células diferenciadas aderiram ao fundo da placa de cultura e cresceram de forma confluyente, diferentemente daquelas que mantiveram suas características morfológicas e não

colaboradores (1970). Foi constatado em outros trabalhos a diferenciação de células mióides na presença de SFB em células com características de músculo liso (Steinberger *et al.*, 1970) e fibroblásticas (Tung & Fritz, 1986; Seidl & Holstein, 1990; Tung & Fritz, 1990). Outros autores também constataram a interferência do SFB sobre as culturas de elementos germinativos (Steinberger *et al.*, 1969; Mather, 1980; Mather *et al.*, 1982).

Devido aos efeitos inespecíficos do SFB, ficou estabelecido que este não deveria ser utilizado como complemento para o meio de cultura nos nossos experimentos seguintes.

A importância da presença de hormônio folículo estimulante (FSH) no meio de cultura como complemento é bastante discutida. Parece haver um consenso quanto à sua importância na iniciação da espermatogênese, mas não para a manutenção do processo. Alguns autores admitem sua importância apenas na manutenção qualitativa (Steinberger *et al.*, 1969; 1970; Chemes *et al.*, 1971; Welch *et al.*, 1979; Parvinen *et al.*, 1980; Mather *et al.*, 1982; Parvinen *et al.*, 1983; Matsumoto, 1989; Kangasniemi *et al.*, 1990a; Seidl & Holstein, 1990). Neste experimento a presença de FSH diminuiu a degeneração presente no tecido em cultura, tanto em grau quanto em frequência de degeneração, resultado este também constatado por Seidl & Holstein (1990). Desta forma o FSH não impediu que ocorressem sinais de degeneração celular, mas pelo menos retardou seu aparecimento, quando comparados com os fragmentos cultivados apenas em meio de cultura (DMEM e/ou HAMF10). Com base em estudos anteriores foram testadas 4 concentrações diferentes de FSH (0,1 , 0,2 , 0,4 e 0,8 μ g/ml) (Parvinen e colaboradores, 1983; Anthony & Skinner, 1989; Seidl & Holstein, 1990; Boitani e colaboradores, 1993). Estas variações de concentração não trouxeram poucas diferenças quanto a diminuição de degeneração ou de desorganização celular. As menores concentrações testadas (0,1 e 0,2 μ g/ml) não tiveram efeito tão expressivo quanto a concentração de 0,4 μ g/ml. Foi observado que a maior concentração do hormônio testada (0,8 μ g/ml) aumentou a frequência de aparecimento dos sinais de degeneração de uma forma geral. Para o prosseguimento do processo de padronização ficou estabelecido o uso de FSH à concentração de 0,4 μ g/ml.

A presença de sinais de degeneração bem como a desorganização tecidual foram relativamente freqüentes nas culturas. As variações das condições aplicadas visavam minimizá-los. Sabe-se que para a manutenção das populações presentes no epitélio seminífero é fundamental a integridade deste epitélio, como por exemplo a manutenção da barreira hemato-testicular garantindo um microambiente específico aos túbulos seminíferos e também a manutenção das interações celulares específicas entre as células de Sertoli e as demais células germinativas. O processo de padronização visou estabelecer as alterações introduzidas pela técnica de cultura, sendo possível estabelecer correlações entre os resultados obtidos como foi proposto por Russell & Steinberger (1989). Devemos considerar o fato de que parte dos trabalhos propondo a técnica de cultura de túbulos seminíferos baseia-se em estudos bioquímicos, e apesar de citarem as análises morfológicas e histológicas estas não constavam dos resultados apresentados (Lacroix *et al.*, 1981; Wright *et al.*, 1983; Toppari & Parvinen, 1985; Toppari *et al.*, 1985; Kangasniemi *et al.*, 1990a; Perez-Ramirez & Castells, 1991). Apesar das dificuldades da técnica, foram obtidos resultados histológicos mais encorajadores por outros autores (Steinberger & Steinberger, 1966; Parvinen *et al.*, 1983; Vihko *et al.*, 1984; Toppari *et al.*, 1986; Kangasniemi *et al.*, 1990b; Seidl & Holstein, 1990 e Boitani *et al.*, 1993), motivando a continuidade deste estudo.

Foi determinada como condição ideal de cultura a manipulação dos túbulos seminíferos em PBS e a cultura em meio HAMF10:DubelcoMEM (v:v), contendo 100 µg/ml de gentamicina, 15mM/ml HEPES, 1,2 g/l de bicarbonato de sódio, 1 g/l BSA, 0,1 mmol/l de MIX e 0,4 µg/ml de FSH, em estufa a 32^oC.

O período de 3 dias foi determinado como ideal. A partir do quarto dia de cultura são intensificados os processos de descaracterização das células de Sertoli, aparecimento de massas celulares multinucleadas, fragilização da parede tubular, aparecimento de vacuolização nuclear e citoplasmática, aparecimento de inclusões citoplasmáticas e resíduos celulares. Foi observado, ao microscópio invertido, o movimento das caudas dos espermatozóides que sofreram extrusão até o terceiro dia de cultura.

Os resultados obtidos a partir da aplicação do cádmio nas culturas de túbulos seminíferos demonstraram a intensificação dos processos degenerativos presentes nos experimentos 6 e 7, na ausência de cádmio.

Notamos que os sinais de degeneração tecidual aparecem mais precocemente nos materiais expostos ao metal. Além do aceleração degenerativo observado, foi constatado um aumento de freqüência do aparecimento desses sinais nos cortes histológicos analisados.

O efeito do cádmio se mostrou diretamente proporcional às concentrações aplicadas às culturas e ao tempo de exposição das mesmas ao metal, em concordância com outros autores (Gunn & Gould, 1970; Janecki *et al.*, 1992; Waalkes *et al.*, 1992a). As três concentrações de cádmio testadas (1, 10 e 100 μ M) foram baseadas em dados da literatura envolvendo outros experimentos (Espevik *et al.*, 1982; Wahba *et al.*, 1990; Janecki *et al.*, 1992; Von Ziglinicki *et al.*, 1992). Com aumento da concentração do cádmio ou o prolongamento da exposição dos túbulos ao metal, os processos degenerativos são mais intensos e freqüentes. Já no segundo dia de cultura do material exposto a 10 μ M de cádmio praticamente não podem ser observadas células com aspecto normal, nem mesmo contornos celulares bem definidos, quando o material é analisado à microscopia de luz (FIGURA 40). A degeneração do tecido é marcante. Estas observações sugerem a impossibilidade de reversão do quadro degenerativo que se estabelece durante a cultura. Outros autores constataram a ação do cádmio sobre as células germinativas logo após a exposição ao metal, quer seja *in vivo* (Gunn & Gould, 1970; Aoki & Hoffer, 1978; Selypes *et al.*, 1992; Waalkes *et al.*, 1992a; Cabral, F.H.C., 1996-dados não publicados) ou *in vitro* (Lee & Dixon, 1973; Espevik *et al.*, 1982; Janecki *et al.*, 1992; Von Ziglinicki *et al.*, 1992). Pode haver interferências de componentes do próprio meio de cultura sobre a absorção e ação do cádmio (Von Ziglinicki *et al.*, 1992), mas a uniformidade dos componentes e técnicas utilizadas nos experimentos descarta este fator, uma vez que os resultados obtidos foram entendidos com base em dados comparativos.

Não foi observado com freqüência o acúmulo de gotículas de lipídios nos citoplasmas ou espaços intercelulares. Este fato pode ter ocorrido devido a intensificação degenerativa observada e da diminuição de densidade intratubular.

Observamos como um dos principais efeitos a descaracterização morfológica das células de Sertoli. Esta ocorre a partir do primeiro dia de cultura com a menor concentração de cádmio testada ($1\mu\text{M}$) (FIGURA 35), e que corresponde a um quadro semelhante ao do quinto dia de cultura na ausência de cádmio (experimentos 6 e 7) (FIGURA 32). Este fator foi progressivo. As células de Sertoli apresentaram arredondamento nuclear, retração e vacuolização citoplasmáticas (FIGURA 43). Não eram freqüentes gotículas de lipídios acumuladas nos citoplasmas celulares. Foi descrito anteriormente por Espevik e colaboradores (1982) e por Janecki e colaboradores (1992) o efeito do cádmio sobre as células de Sertoli e sobre as junções entre elas, responsáveis pela barreira hemato-testicular, em concordância com os nossos resultados.

Além da degeneração das células de Sertoli foram constatadas em nossos experimentos alterações em outros tipos celulares. As células mióides foram afetadas quando expostas a este metal, apresentando arredondamento nuclear e intensa vacuolização citoplasmática (dados não demonstrados). Como consequência da degeneração destas células ocorreu significativo adelgaçamento das paredes tubulares, que adquiriram fragilidade excessiva, sendo freqüentes os pontos de rompimento (FIGURA 63). Outra característica morfológica da parede que se tornou alterada em virtude da exposição ao cádmio é o aspecto rugoso, escamado, que esta exhibe, e pode ser claramente constatado através de preparação de microscopia eletrônica de varredura (FIGURAS 62 e 68). A fragilidade da parede pode ter acentuado a desorganização intratubular, através do aumento da extrusão celular. Como consequência desta desorganização ocorreu intensificação da degeneração das populações celulares presentes nos túbulos seminíferos.

As células germinativas também se apresentaram afetadas devido à ação do cádmio. A presença do metal desencadeia um processo de vacuolização citoplasmática intensa podendo ser notados resíduos nos espaços intercelulares e extensas áreas de degeneração (FIGURAS 43 e 46). A vacuolização nuclear também foi considerada um indicativo de degeneração, sendo observada a partir do primeiro dia de cultura e afetando grande parte das células presentes nos túbulos seminíferos analisados (FIGURAS 37 e 38).

Outra característica degenerativa resultante da ação do cádmio sobre as

podem ser detectadas como grandes massas celulares multinucleadas (FIGURA 45), diferentemente das células multinucleadas observadas nos fragmentos antes de serem cultivados (espermatócitos). A provável explicação para o aparecimento deste tipo de células pode estar baseada na fusão de suas membranas, uma vez que isto pode ser observado já a partir do primeiro dia de cultura com a aplicação do cádmio (FIGURA 35).

Aparentemente as células menos afetadas morfologicamente após o tratamento com cádmio foram as espermátides tardias ou os espermatozóides presentes nos túbulos seminíferos (FIGURAS 35, 43, 66 e 71), provavelmente devido ao seu baixo metabolismo celular.

Frente a estes resultados obtidos podemos concluir que o cádmio possui ação tóxica direta sobre as populações celulares presentes nos túbulos seminíferos mantidos em condições de cultura.

O mecanismo de ação toxicológica do cádmio é bastante controverso. A sensibilidade do testículo ao cádmio é conhecida (Parizek & Zahor, 1956; Gunn & Gould, 1970; Aoki & Hoffer, 1978; Waalkes *et al.*, 1988; Wahba *et al.*, 1990; Selypes *et al.*, 1992; Von Ziglinicki *et al.*, 1992; Waalkes *et al.*, 1992a) e no entanto a hipótese mais aceita baseia-se no fato da necrose tubular ser secundária às alterações da rede vascular testicular. A degeneração ou alteração dos elementos germinativos surgiria como conseqüência da isquemia testicular (Gunn & Gould, 1970; Aoki & Hoffer, 1978; Selypes *et al.*, 1992; Waalkes *et al.*, 1992a). Outros autores já demonstraram a ação direta do cádmio sobre as células do epitélio germinativo, empregando experimentos de cultura de células (Wahba *et al.*, 1990; Janecki *et al.*, 1992; Von Ziglinicki *et al.*, 1992).

Não foi possível quantificar, com os experimentos *in vitro*, qual a intensidade dos danos causados pela ação do cádmio no epitélio seminífero, uma vez que a própria técnica de cultura deste tecido já leva a alterações estruturais. É necessário então se estabelecer um teste comparativo, padronizando inicialmente as alterações introduzidas durante a cultura deste epitélio em condições normais e as alterações quando da presença do cádmio. No entanto, nossos resultados reforçam a teoria de que o cádmio afeta diretamente as células germinativas, em concordância com o trabalho de Lee & Dixon (1973), que constatou que doses pequenas de cádmio, que

Os resultados obtidos neste trabalho podem ser utilizados como base para investigações futuras da patobiologia do cádmio sobre as células germinativas. Apesar de não podermos definir qual a ordem dos acontecimentos degenerativos que afetam a estrutura testicular durante a exposição ao cádmio, este estudo comprovou a interferência prejudicial deste metal no processo espermatogênico.

VI. CONCLUSÕES

1- A manipulação dos túbulos seminíferos constitui a primeira fonte de alterações do tecido em cultura. O uso de tampão (PBS) para isolar os fragmentos tornou-os menos viscosos, permitindo que os danos ao material intratubular fossem diminuídos. As perturbações físicas sofridas pelas células de Sertoli durante as preparações constituíram a principal causa da desorganização tecidual observada. Grande parte da degeneração celular observada, inclusive das células de Sertoli, resultou da dissociação entre as diferentes populações presentes, como consequência da desorganização tecidual.

2- As condições ideais de cultura estabelecidas neste trabalho foram: meio HAMF10:DMEM, na presença de HEPES (15mM/ml), bicarbonato de sódio (1,2g/l), BSA (1g/l), MIX (0,1mM/l), FSH (0,4ug/ml) e gentamicina (100µg/ml), em estufa a 32°C.

3- A presença de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultura causou a descaracterização das células mióides, resultando no arredondamento nuclear destas e espessamento da parede tubular. A invaginação de células mióides e de material da parede tubular, devido à presença de SFB, resultou em densidade intratubular. As células mióides diferenciaram-se em fibroblastos, quando em condições específicas de cultura (meio HAMF10, SFB15%, durante 15 dias), crescendo aderidas à placa de cultura em padrão confluyente.

4- A presença de hormônio folículo estimulante (FSH) no meio de cultura causou a diminuição da intensidade e da frequência de aparecimento dos sinais de degeneração. A concentração de 0,4µg/ml do hormônio se mostrou a mais eficiente entre as testadas (0,1, 0,2, 0,4 e 0,8µg/ml).

5- O período de 3 dias de cultura foi determinado como sendo ideal para o estudo dos efeitos do cádmio sobre os de túbulos seminíferos.

6- Com a padronização da cultura e a determinação da alterações teciduais introduzidas no epitélio germinativo foi possível aplicar esta técnica em estudos toxicológicos.

7- O cádmio possui efeito tóxico sobre as células germinativas *in vitro*. O efeito do cádmio foi progressivo, proporcional à concentração (1, 10 e 100 μ M) e ao tempo de exposição (1 hora, 1, 2 e 3 dias).

VII. RESUMO

Foram realizados sete experimentos de cultura de túbulo seminíferos abrangendo variações das condições de fragmentação, manipulação e de cultura. As variações aplicadas à cultura visaram minimizar os sinais de desorganização e degeneração tecidual. Verificou-se que as técnicas de fragmentação introduziram alterações na organização do epitélio seminífero, como o deslocamento de populações celulares germinativas em direção ao lúmen tubular. Como consequência desta movimentação celular apareceram também espaços intercelulares no epitélio germinativo. Esta desorganização tecidual interfere na integridade das interações entre as populações celulares presentes, necessárias para seu desenvolvimento. Apareceram sinais de degeneração celular progressivos como a descaracterização das células de Sertoli, acúmulo de gotículas de lipídios, vacuolização nuclear e citoplasmática e presença de resíduos celulares. As alterações não puderam ser revertidas. O teste de complementos no meio de cultura (soro fetal bovino-SFB, e hormônio folículo estimulante-FSH) objetivou o aprimoramento da técnica. A presença de SFB ativou populações celulares inespecíficas, as células mióides, causando alterações morfológicas nestas células, como o arredondamento nuclear. Estas células cresceram desordenadamente e a parede tubular apresentou-se espessada. Já a presença de FSH teve efeito positivo, retardando o aparecimento dos sinais de degeneração. Foi importante estabelecer quais as condições ideais de cultura, meio HAMF10:DMEM, na presença de HEPES(15mM/ml), bicarbonato de sódio (1,2g/l), BSA(1g/l), MIX(0,1mM/l), FSH(0,4ug/ml) e gentamicina(100µg/ml), em estufa a 32^oC, por um período de 3 dias. Nestas condições obtivemos o mínimo possível de alterações do epitélio seminífero. Estabelecemos então um padrão das alterações introduzidas através da técnica de cultura em si. Frente a este controle foram realizados dois experimentos de aplicação do cádmio às culturas de túbulos seminíferos. Estes experimentos foram realizados num período de três dias, com fixações diárias, utilizando as condições de cultura pré-estabelecidas. Foram testadas três concentrações do metal (1;10 e 100µM) durante uma hora de exposição. Também foi realizado um controle com exposição direta dos túbulos seminíferos em cultura ao cádmio 1µM. Foi constatada a intensificação e o aceleração dos sinais de degeneração devido à presença do metal no meio de cultura.

VIII. ABSTRACT

Cultures of seminiferous tubules were made according to seven experiments including variations of fragmentation conditions, of manipulation and of culture medium. Tubule fragmentation and manipulation introduced disturbances of the seminiferous epithelium, such as the dislocation of germ cells directed towards the tubular lumen. As a consequence of this movement there were intercellular spaces. The epithelial integrity is fundamental for cellular interactions necessary for cellular development. During the culture period cellular degeneration occurred progressively. Morphological disturbances of the Sertoli cells, marked accumulation of lipid droplets, nuclear and cytoplasmatic vacuolization and the presence of cellular debris were observed. The addition of calf fetal serum (CFS) to the medium activated myoid cell populations and caused morphological alterations of these cells (such as nuclear rounding). These changes were accompanied by the thickening of the tubular wall. On the other hand the presence of FSH in the culture medium was very positive, delaying and reducing degeneration signs. It was important to establish the disturbances caused by the culture techniques and the period during which the seminiferous tubules can be maintained with minimum alterations to be used as a control situation. Two experiments were made with cadmium applied to the seminiferous tubules cultures. These experiments were based on culture conditions established by the previous experiments and they were monitored with daily fixations during a three day period. Three concentrations of this metal (1, 10 e 100 μ M) were tested during a one hour period of exposition. A control of direct exposition of tubules to the metal (1 μ M) was carried out entire culture period. As a consequence of cadmium present in the culture, degeneration was intensified and accelerated. It was established that cadmium can act directly on germ cells causing degenerative alterations

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABÉ,S.-I. Differentiation of spermatogenic cells from vertebrates *in vitro*. *Int. Rev. Cytol.*, v.109, p.159-209, 1987.
- ADASHI,E.Y. & HSEUH,A.J.W. Autoregulation of androgen production in a primary culture of rat testicular cells. *Nature*, v.293, p.737-738, 1981.
- ALBERTS,B.; BRAY,D.; LEROIS,J.; RAFF,M.; ROBERTS,K. & WATSON,J.D. Molecular Biology of the Cell. Chapter 15: Germ cells and fertilization. Garland Publishing, Inc. N. Y., London. Second edition. p.864-867, 1989.
- ANTHONY,C.T. & SKINNER,M.K. Actions of extracellular matrix on Sertoli cell morphology and function. *Biol. Reprod.*, v.40, p.691-702, 1989.
- AOKI,A. & HOFFER,A. Reexamination of the lesions in rat testis caused by cadmium. *Biol. Reprod.*, v.18, p.579-591, 1978.
- BALHORN,R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell. Biol.*, v.93, p.298-305, 1982.
- BLANER,W.S.; GALDIERI,M.; & GOODMAN,D.W. Distribution levels of cellular retinol and cellular retinoic acid-binding protein in various types of rat testis cells. *Biol. Reprod.*, v.36, p.130-137, 1987.
- BLOMHOFF,R.; GREEN,H.M.; BUG,T. & NORUM,K.R. Transport and storage of vitamin A. *Science*, v.250, p.399-404, 1990.
- BOITANI,C.; POLITI,M.G. & MENNA,T. Spermatogonial cell proliferation in organ culture of immature rat testis. *Biol. Reprod.*, v.48, p.761-767, 1993.
- BURGOS,M.H.; VITALE-CALPE,R. & AOKI,A. Chapter 9: Fine structure of the testis and its functional significance. *In: The testis. Vol.1: Development, anatomy and physiology.* Eds. Johnson,A.D.; Gomes,W.R. & VanDemark,N.L. New York Academic Press, p:551-649, 1970.
- CENTOL,I.; DENIZ,A.; BENITEZ,L.; MARRECO,I.; FANGUEL,L.F. & RUIZ DE GALARRETA,C.M. Functional activity of rat testicular cells in culture. *Biochem. Intern.*, v.16, p.311-322. 1988.
- CHAMPY,C. Quelques résultats sur la méthode des culture des tissus. VI. Le testicule. *Arch. Zool. Exp. Gén.*, v.60, p.461, 1920.
- CHEMES,H.E.; DYM,M. & RAJ,H.G.M. The role of gonadotropin on initiation of

- CLERMONT, Y. Contractile elements in the limiting membrane of the seminiferous tubules of the rat. *Exp. Cell Res.*, v.15, p.438-440, 1958.
- CLERMONT, Y. Two classes of spermatogonial stem cells in the monkey (*Cercopithecus aethiops*). *Am. J. Anat.*, v.126, p.57-72, 1969.
- CLERMONT, Y. & BUSTOS-OBREGON, E. Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto". *Am. J. Anat.*, v.122, p.237-247, 1968.
- CLERMONT, Y. & HERMO, L. Spermatogonial stem cells in the albino rat. *Am. J. Anat.*, v.142, p.159-176. 1975.
- CLERMONT, Y. & HUCKINS, C. Microscopic anatomy of the sex cords and the seminiferous tubules in growing and adult male albino rats. *Am. J. Anat.*, v.108, p.79-97. 1961.
- CLERMONT, Y. & LEBLOND, C.P. Renewal of spermatogonia in the rat. *Am. J. Anat.*, v.93, p.475-502. 1953.
- CLERMONT, Y.; LEBLOND, C.P. & MESSIER, B. Durée de cycle de l'épithélium siminal du rat. *Arch. Anat. Microscop. Morphol. Exptl. Suppl.*, v.48, p.37-56. 1959.
- COUROT, M.; REVIERS, M.T.H.DE & ORTAVANT, R. Cap.6: Spermatogenesis. *In: The testis. Vol.1: Development, anatomy and physiology.* Eds. Johnson, A.D.; Gomes, W.R. e VanDemark, N.L.. New York Academic Press, p. 339-432. 1970.
- CURTIS, D. *In vitro* differentiation of diakinesis figures in human testis. *Hum. Genet.*, v.59, p.406-411. 1981.
- DAVIS, J.R.; LANGFORD, G.A. & KIRBY, P.J. The testicular capsule. *In: The testis. Vol.1: Development, anatomy and physiology.* Eds. Johnson, A.D.; Gomes, W.R. e VanDemark, N.L.. New York Academic Press. p. 287-337. 1970.
- DAVIS, C.M.; PAPADOPOLUS, V.; SOMMERS, C.L.; KELINMAN, H.K. & DYM, M. Differential expression of extracellular matrix components in rat Sertoli cells. *Biol. Reprod.*, v.43, p.860-869. 1990.
- DE, S.K.; ENDERS, G.C. & ANDREWS, G.K. High levels of metallothionein messenger RNAs in the male germ cells of the adult mouse. *Mol. Endocr.*, v.5, p.628. 1991.

- DYM,M. & FAWCETT,D.W. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.*, v.3, p.308-326. 1970.
- EARL,F.L. & THEODORE, J.V. Chapter 26: Teratogenicity of heavy metals. *In: Toxicity of heavy metals in the environment. Part 2.* Ed. Oehme, F.W. , Marcel Dekker, Inc. p.617-639. 1979.
- ELLINGSON,D.J. & YAO,K.T.S. Growth and observations of Chinese hamster seminiferous epithelium *in vitro*. *J. Cell Science.* 6: 195-205. 1970.
- ESPEVIK,T.; LAMIK,M.K.; SUNDE,A. & EIKE-NES,K.B. Effects of cadmium on survival and morphology of cultures rat Sertoli cells. *J. Reprod. Fertil.*, v.65, p.489-495. 1982.
- FARAONIO,R.; GALDIERI,M. & COLANTUONI,V. Cellular retinol-acid-binding-protein mRNA expression in the cells of rat seminiferous tubules and their regulation retinoids. *Europ. J. Biochem.*, v.211, p.835-842, 1993.
- FAWCETT,D.W. Gametogenesis in the male: Prospects for its control. *In: The developmental biology of reproduction* Eds. Markert,C., Papaconstantinou,J. Academic Press Inc., p.25-53, 1975a.
- FAWCETT,D.W. Chapter 2: Ultrastructure and function of the Sertoli cell. *In: Handbook of physiology. Section 7: Endocrinology. Vol. 5: The male reproductive system.* Eds. Hamilton,D.W., Greep,R.O.. American Physiological Society, Washington,D.C., p.21-55, 1975b.
- FISHBEIN,L. Sources, transport, and alterations of metal compounds: an overview. I. arsenic, beryllium, cadmium, chromium and nickel. *Environ. Health Perspec.*, v. 40, p.43-64. 1981.
- FUJISAWA,M.; BARDIN,C.W. & MORRIS,P.L. A germ cell factor(s) modulates preproenkephalin gene expression in rat Sertoli cells. *Mol. Cell. Endocr.*, v.84, p.79-88, 1992.
- GHATNEKAR,R.; LIMA-DE-FARIA,A.; SUBIN,S. & MENANDER,K. Development of human meiosis *in vitro*. *Hereditas*, v.78, p.265-272, 1974.
- GLAUERT,A.M. Practical Methods in Electron Microscopy. Vol III: Fixation, Dehydration and embedding of biological specimens. North-Holland Publishing Company, p.1-207, 1975.

- GRISWOLD,M.D. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol. Reprod.*, v.52, p.211-216, 1995.
- GUNN,S.A. & GOULD,T.C. Cadmium and other mineral elements. *In: The testis. Vol.3: Influencing factors.* Eds. Johnson,A.D.; Gomes,W.R. e VanDemark,N.L.. New York Academic Press. p.337. 1970.
- HANDELSMAN,D.J.; SPALIVIERO,J.A. & PHIPPARD,A.F. Highly vectorial secretion of inhibin by primate Sertoli cells *in vitro*. *J. Clini. Endoc. Metab.*, v.71, p.1235-1238. 1990.
- HAYASHI,I. & SATO,G.H. Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. *Nature*, v.259, p.132-134, 1976.
- HEW,K.W.; HEATH,G.L.; JIWO,A.H. & WELSH,M.J. Cadmium *in vivo* caused disruption of tight junction-associated microfilaments in rat Sertoli cells. *Biol. Reprod.*, v.49, p.840-849. 1993.
- HOJA,H.; AYOAMA,H.; TANAKA,S. & TERAMOTO,S. Ultrastructural and morphometrical analyses of Leydig and Sertoli cells in the testis of rats with hereditary polydactylism. *J. Reprod. Fert.*, v.104, p.331-335. 1995.
- HUANG,H.F.S.; GOULD,S. & BOCCABELLA,A.V. Modification of Sertoli cell function in vitamin-A deficient rats. *J. Reprod. Fert.*, v.85, p.273-281, 1989.
- HUCKINS,C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat. Rec.*, v.169, p.533-548, 1971.
- HUGHTANIEMI,I.; NIKULA,H. & PARVINEN,M. Petrussis toxin enhances FSH stimulated AMPc production in rat seminiferous tubules in a stage dependent manner. *Mol. Cell. Endocr.*, v.62, p.89-94. 1989.
- IWAMI,K. & MORIYAMA,T. Comparative effect of cadmium on osteoblastic cells and osteoclastic cells. *Arch. Tox.*, v.67, p.352-357. 1993.
- JANECKI,A.; JAKUBOWICK,A. & STEINBERGER,A. Effect of cadmium chloride on transepithelial electrical resistance of Sertoli cell monolayer in two-compartment cultures-A new model for toxicological investigations of the blood-testis barrier *in vitro*. *Tox. Appl. Pharm.*, v.112, p.51-57. 1992.
- JENNETTE,K.W. The role of metals in carcinogenesis: biochemistry and metabolism. *Environ. Health Perspec.*, v. 40, p. 233-252.1981.

- JOHNSON,L.; PETTY,C.S. & NEAVES,W.B. Further quantification of human spermatogenesis: germ cell loss during postprophase of meiosis and its relationship to daily sperm production. *Biol. Reprod.*, v.29, p.207-215, 1983.
- KAJI,T.; MISHIMA,A.; YAMAMOTO,C.; SAKAMOTO,M. & KOZUKA,H. Zinc protection against cadmiu-induced destruction of the monolayer of cultured vascular endothelial cells. *Tox. Letters (Amsterdam)*, v.66, p.247-255. 1993.
- KANGASNIEMI,M.; KAIPIA,A.; TOPPARI,J.; MALI,P.; HUHTANIEMI,I. & PARVINEN,M. Cellular regulation of basal and FSH-stimulated cyclic AMP production in irradiated rat testis. *Anatom. Rec.*, v.227, p.23-36, 1990a.
- KANGASNIEMI,M.; KAIPIA,A.; MALLP.; TOPPARI,J.; HUHTANIEMI,I. & PARVINEN,M. Modulation of basal and FSH-dependent cyclic AMP production in rat seminiferous tubules staged by an improved transillumination technique. *Anatom. Rec.*, v.227., p.67-72, 1990b.
- LACROIX,M. & FRITZ,I.B. The control of the synthesis and secretion of plasminogen activator by rat Sertoli cells in culture. *Mol. Cell. Endocr.*, v.26, p.247-258. 1982.
- LACROIX,M.; PARVINEN,M. & FRITZ,I.B. Localization of testicular plasminogen activator in discrete portions (Stages VII and VIII) of the seminiferous tubule. *Biol. Reprod.*, v.25, p.143-146, 1981.
- LACROIX,M.; SMITH,F.E. & FRITZ,I. Secretion of plasminogen activator by Sertoli cell enriched cultures. *Mol. Cel. Endocr.*, v.9, p.227-336, 1977.
- LEBLOND,C.P. & CLERMONT,Y. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. *Am. J. Anat.*, v.90, p.167-215, 1952a.
- LEBLOND,C.P. & CLERMONT,Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals N. Y. Acad. Sci.*, v.55, p.548-573, 1952b.
- LEE,I.P. & DIXON,R.L. Effects of cadmium on spermatogenesis studied by velocity sedimentation cell separation and serial mating. *J. Pharm. Exp. Ther.*, v.187, p.641-652, 1973.

- LEJEUNE,H.; SKALLI,M.; SANCHEZ,P.; AVALLET,O. & SAEZ,J.M. Enhancement of testosterone secretion by normal adult human Leydig cells by co-culture with enriched preparations of normal adult human Sertoli cells. *Int. J. Androl.*, v.16, p.27-34, 1993.
- LOUIS,B.G. & FRITZ,I.B. Follicle-stimulating hormone and testosterone independently increased the production of androgen-binding-protein by Sertoli cells in culture. *Endocr.*, v.104, p.454-461, 1979.
- LUCIS,O.J.; SHAIKH,Z.A. & EMBIL,J.A. Cadmium as trace element and cadmium binding components in human cells. *Experimentia*, v.26, p.1109-1110, 1970.
- LUFT,G.H. Improvements in epoxy resin embedding methods, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, v.9, p.409, 1961.
- MACFARLENE,J.R.; DE KRESTER,D.M. & RISBRIDGER,G.P. Stimulatory and inhibitory factors of Leydig cell steroidogenesis are secreted simultaneously by the rat seminiferous tubules and do not affect Leydig cell inhibin production *in vitro*. *Reprod. Fert. Dev.*, v.6, p.693-698, 1994.
- MATHER,J.P. Establishment and characterization of two distinct mouse testicular epithelial cell lines. *Biol. Reprod.*, v.23, p.243-252, 1980.
- MATHER,J.P. Intratesticular regulation - Evidence for paracrine and autocrine control of testicular function. *In: Mammalian cell culture*. Ed. Mather,J.P. Plenum Press, N.Y., p.167-193, 1984.
- MATHER,J.P.; ZHUANG,L.-Z.; PEREZ-INFANTE,V. & PHILLIPS,D.M. Culture of testicular cells in hormone-supplemented serum-free medium. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.383, p.44-68, 1982.
- MATSUMOTO,A.M. Chapter 5. Hormonal control of human spermatogenesis. *In: The testis. Comprehensive endocrinology. Second edition*. Eds. Burger,H., Kretser,D., Raven Press Ltd., N.Y., p.181-196, 1989.
- MAURER,H.R. Chapter 2: Towards chemically-defined, serum-free medium for mammalian cell culture. *In. Animal cell culture - A practical approach*. Ed. Freshney,R.I. I.R.L. Press Limited, p.13-31, 1986.
- MEIZEL,S. & TURNER,K.O. Progesterone acts at the plasma membrane of human sperm. *Mol. Cell. Endocr.*, v.11, p.R1-R5, 1991.

- MIETHING,A. Multinucleated spermatocytes in the aging human testis: formation, morphology and degenerative fate. *Androl.*, v.256, p. 317-323. 1993.
- NISHIMURA,H.; NISHIMURA,N. & TOHYAMA,C. Localization of metallothionin in the genital organs of the male rat. *J. Histochem. Cytochem.*, v.38, p.927-933. 1990.
- NORDBERG,G.F. & ANDERSEN,O. Metal interactions in carcinogenesis: enhancement, inhibition. *Environ. Health Perspec.*, v. 40, p.65-81. 1981.
- NORDBERG,T. Metal carcinogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 543, p. 377. 1988.
- OLDEREID,N.B.; THOMASSEN,Y.; ATTRMADAL,A.; OLAISEN,B. & PURVIS,K. Concentration of lead, cadmium and zinc in the tissues of reproductive organs of men. *J. Reprod. Fert.*, v.99, p.421-425, 1993.
- PARIZEK,J. & ZAHOR,Z. Effects of cadmium salts on testicular tissue. *Nature (London)*, v.177, p.1036-1037. 1956.
- PARVINEN,M.; MARANA,R.; ROBERTSON,D.M.; HANSSON,V. & RITZEN,E.M. Functional cycle of rat Sertoli cells: Differential binding and action of follicle stimulating hormone at various stages of the spermatogenic cycle. *In: Testicular development, structure and function.* Eds. Steinberger,A., Steinberger,E., Raven Press, N. Y., p.425-432, 1980.
- PARVINEN,M. & VANHA-PERTULA,T. Identification and enzyme quantitation of the stages of the seminiferous epithelial wave in the rat. *Anat. Rec.*, v.174, p.435-450, 1972.
- PARVINEN,M.; WRIGHT,W.W.; PHILLIPS,D.M.; MATHER,J.P.; MUSTO,N.A. & BARDIN,C.N. Spermatogenesis *in vitro*: completion of meiosis and early spermiogenesis. *Endocr.*, v.112, p.1150-1152, 1983.
- PEREY,B.; CLERMONT,Y. & LEBLOND,C.P. The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *Am. J. Anat.*, v.108, p.47-77, 1961.
- PEREZ-RAMIREZ,B. & CASTELLS,M. *In vitro* biosynthesis of rat sperm outer dense fiber components. *Life Sciences*, v.49, p.1549-1554, 1991.
- PROZIAECK,W.C. & LAMAR,P.C. Surface binding and uptake of cadmium by LLC-PK1 cells on permeable membrane supports. *Arch. Tox.*, v.67, p.113-119. 1993.
- RADER,W.A. & SPAULDING,J.E. Chapter 28: Regulatory aspects of the trace elements in the environment. *In: Toxicity of heavy metals in the environment.*

- RAJAN,N.; SUNG,W.K. & GOODMAN,D.S. Localization of cellular retinol-binding protein mRNA in rat testis and epididymis and its stage-dependent expression during the cycle of the seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.*, v.43, p.835-842, 1990.
- RAYCHOWDURY,S.S.; THOMPSON,E.W.; BLACKSHAW,A.W. & IRVING,M.G. Sertoli cells as paracrine modulators of DNA synthesis in rat peritubular cells in culture. *J. Reprod. Fert.*, v.99, p.513-518. 1993.
- RISLEY,M.S.; EINHEBER,S. & BUMCROT,D.A. Changes in DNA topology during spermatogenesis. *Chromosoma*, v.94, p.217-227, 1986.
- RITZÉN,E.M.; BOITANI,C.; PARVINEN,M.; FRENCH,F.C. & FELDMAN,M. Stage-dependent secretion of ABP by rat seminiferous tubules. *Mol. Cell. Endocr.*, v.25, p.25-33. 1982.
- RITZÉN,E.M.; HANSSON,V. & FRENCH,F.S. Chapter 9. The Sertoli cell. *In: The testis. Comprehensive endocrinology. Second edition. Eds. Burger,H., DE KRESTER,D., Raven Press, Ltd. N. Y., p.269-302, 1989.*
- ROSSMAN,T.G. Effects of metals on mutagenesis and DNA repairs. *Environ. Health Perspec.*, v. 40, p 189-195. 1981.
- RUSSELL,L.D. Desmosome-like junctions between Sertoli and germ cells in the rat testis. *Am. J. Anat.*, v.148, p.301-312, 1977a.
- RUSSELL,L.D. Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am. J. Anat.*, v.148, p.313-328, 1977b.
- RUSSELL,L.D.; SAXENA,N.K. & TURMER,T.T. Cytoskeletal involvement in spermiation and sperm transport. *Tissue & Cell*, v.21, p.361-379, 1989.
- RUSSELL,L.D. & STEINBERGER,A. Sertoli cells in culture: views from the perspectives of an *In Vivoist* and *In Vitroist*. *Biol. Reprod.*, v.41, p.571-577. 1989.
- SAKSENA,S.K. & SALMENSEN,R. Effect of cadmium chloride on ovulation and on induction of sterility in the female golden Hamster. *Biol. Reprod.*, v. 29, p. 249-256. 1983.
- SANG,Q.-X.; STEVENSON,W.G.S.; LIOTTA,L.A. & BYERS,S.W. Identification of type III collagenase in rat testicular cell culture: influence of peritubular-Sertoli cell interactions. *Biol. Reprod.*, v.43, p.956-964, 1990.

- SANGALANG,G.B. & O'HALLORAN,M.J. Adverse effects of cadmium on brook trout testis and on *in vitro* testicular androgen synthesis. *Biol. Reprod.*, v. 9, p. 394-403. 1973.
- SEIDL,K. & HOLSTEIN,A.F. Organ culture of human seminiferous tubules: a useful tool to study the role of nerve growth factor in the testis. *Cell. Tissue Res.*, v.261, p.539-574. 1990.
- SELYPES,A.; SERENYI,P.; BOLDOG,I.; BROKOS,F. & TAKAIS,S. Acute and 'long-term' genotoxic effects of CdCl₂ on testes of mice. *J. Tox. Environm. Health*, v.36, p.401-409. 1992.
- SETCHELL,B.P. & PILSWORTH,L.M. Chapter 1. The functions of the testis of vertebrate and invertebrate animals. *In*; The testis. Comprehensive endocrinology. Second edition. Eds. Burger,H., DE KRESTER,D., Raven Press,Ltd. N.Y., p.1-66, 1989.
- SHAIK,Z.A. & TEWARI,P.C. Similarities between metallothionin and low molecular weight testicular cadmium-binding protein. *Experimentia*, v.46, p.694-696. 1990.
- SHARPE,R.M. Testosterone and spermatogenesis. *J Endocr.*, v.113, p.1-2, 1987.
- SIROVER,M.A. Effects of metals in *in vitro* bioassays. *Environ. Health Perspec.*, v. 40, p 163-172. 1981.
- STEINBERGER,A. & STEINBERGER,E. Stimulatory effect of vitamins and glutamine on the differentiatios of germ cells in rat testis organ culture grown in chemically defined media. *Exp. Cell Res.*, v.44, p.429-435, 1966.
- STEINBERGER,A. & STEINBERGER,E. Chapter 7: *In vitro* growth and development of mammalian testis. *In*: The testis. Vol. 2: Biochemistry. Eds. Johnson,A.D., Gomes,W.R., Vandemark,N.L., Academic Press, p.363-391. 1970.
- STEINBERGER,E. & STEINBERGER,A. Cap.1: Spermatogenic function of the testis. *In*: Handbook of physiology. Section 7: Endocrinology. Vol. 5: The male reproductive system. (eds. Hamilton,D.W., Greep,R.O.). American Physiological Society, Washington,D.C., p.1-19, 1975.
- STEINBERGER,E.; STEINBERGER,A. & FICHER,M. Study of spermatogenesis and steroid metabolism in cultures of mammalian testis. *Rec. Prog. Horm. Res.*, v.26, p.547-588, 1970.
- STEINBERGER,E.; STEINBERGER,A. & PERLOFF,W.H. Initiation of

- SUZUKI,Y.; MORITA,I.; YAMANE,Y. & MUROTA,S-i. Cadmium stimulates prostaglandin ϵ_2 production and bone resorption in cultured fetal mouse calvaria. *Biochem. Bioph. Res. Comm.*, v.158, p.508-513. 1989.
- TOPPARI,J.; EEROLA,E. & PARVINEN,M. Flow cytometric DNA analysis of define stages of rat seminiferous epithelium cycle during *in vitro* differentiation. *J. Androl.*, v.6, p.325-333, 1985.
- TOPPARI,J. & PARVINEN,M. *In vitro* differentiation of rat seminiferous tubular segments from defined stages of the epithelial cycle: morphological and immunolocalization analysis. *J. Androl.*, v.6, p.334-343, 1985.
- TOPPARI,J.; TSUTSUMI,I.; BISHOP,P.C.; PARKER,J.W.; AHMAD,M.; TSANG,C.; CAMPEAU,J.D. & DI ZEREGO,G.S. Flow cytometric quantification of rat spermatogenic cells after hypophysectomy and gonadotropin treatment. *Biol. Reprod.*, v.40, p.623-634, 1989.
- TOPPARI,J.; VIHKO,K.K.; RASANEN,K.G.E.; EROLA,E. & PARVINEN,M. Regulation of stages VI and VIII of the rat seminiferous epithelial cycle *in vitro*. *J. Endocr.*, v.108, p.417-422, 1986.
- TROWEL.O.A. The culture of mature organs in a synthetic medium. *Exptl. Cell Res.*, v.16, p.118-147. 1959.
- TUNG,P.S. & FRITZ,I.B. Cell-substratum and cell-cell interactions promote testicular peritubular myoid cells histotypic expression *in vitro*. *Develop. Biol.*, v.115, p.155-170. 1986.
- TUNG,P.S.& FRITZ,I.B. Characterization of rat testicular peritubular myoid cells in culture: α -smooth muscle isoactin is a specific differentiation marker. *Biol. Reprod.*, v.42, p.351-356. 1990.
- UENO,H.; NISHIMUNE,Y. & MORI,H. Cyclic localization change of Golgi apparatus in Sertoli cells induced by mature spermatids in rats. *Biol. Reprod.*, v.44, p.656-662, 1991.
- VAN PELT,A.M.M. & ROOIJ,D.G.de. Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vitamin-A deficient rats and high replicate doses support the full development of spermatogenic cells. *Endocr.*, v.128, p.697-704, 1991.

- VIHKO,K.K.; SUOMINEN,J.J.O. & PARVINEN,M. Cellular Regulation of plasminogen activator secretion during spermatogenesis. *Biol. Reprod.*, v.31, p.383-389, 1984.
- VON EBNER,V. Untersuchungen über den bau der samenkanälchen und die entwicklung der spermatozoiden bei den säugetieren und beim menschen. Leipzig: Rollet's Untersuchungen aus dem Isntitut für Physiologie und Histologie in Graz. p. 200, 1871.
- VON ZGLINICKI,T.; EDWALL,C.; ÖSTUND,E.; LIND,B.; NORDBERG,M.; RINGERTZ,N.R. & WROBLEWSKI,J. Very low cadmium concentrations stimulate DNA synthesis and cell growth. *J. Cell Sci.*, v.103, p. 1073-1081. 1992.
- WAALKES,M.P.; DIWAN,B.A.; BARE,R.M.; WARD,J.M.; WEGHORST,C. & RICE,J.M. Anticarcinogenic effects of cadmium in B6C3F1 mouse liver and lung. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.110, p.327.1991.
- WAALKES,M.P.; COOGAN,T.P. & BARTER,R.A. Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. *Crit. Rev. Toxicol.*, v.22, p.175-201. 1992a.
- WAALKES,M.P.; FRIDBERG,L.; NELSON,N.; BEAUMONT,J.; FOWLER,B.A.; LAUWERYS,R.; NOSDBERG,G.; VOSTAL,J. & ZIELHUIS,R. WOORKGROUP. Problems of epidemiological evidence. *Environm. Health Perspec.*, v.40,p.11-20.1992b.
- WAALKES,M.P.; PERANTONIA,A.; BHAVE,M.R. & REHM,S. Strain dependence in mice of resistance and suseptibility to the testicular effects of cadmium: assessment of the role of testicular cadmium-binding proteins. *Tox. Appl. Pharm.*, v.93, p.47-61. 1988.
- WAHBA,Z.Z.; HERNANDEZ,L.; ISSAQ,H.J. & WAALKES,M. Involvement of sulphhydryl metabolism in tolerance to cadmium in testicular cells. *Tox. Appl. Pharm.*, v.104, p.157-166. 1990.
- WALKER,I. & COLEMAN,M.D. The blood-brain barrier: *in vitro* methods and toxicological applications. *Toxicol. in vitro*, v.9, p.191-204. 1995.
- WASEEM,M.; BAJPL,R. & RAW,J.L. Reaction of pulmonary macrophages exposed to nickel and cadmium *in vitro*. *J. Environm. Path. Tox. Onc.*, v.12, p.47-54. 1993.

- WEBB,M. The metallothioneins. *Biochem. Soc. Transac.*, v.3, p.632-634. 1975.
- WELCH,J.P.; MITCHELL,R.B. & DAVIS,J.C. Cytophotometric measurements of DNA, RNA and basic protein in FSH treated rat Sertoli cells in culture. *Biol. Reprod.*, v.21, p.69-64, 1979.
- WRIGHT,W.W.; MUSTO,N.A.; MATHER,J.P. & BARDIN,C.W. Sertoli cells secrete both testis-specific and serum proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.78, p.7565-7569,1981.
- WRIGHT,W.W.; PARVINEN,M.; MUSTO,N.A.; GUNSALUS,G.L.; PHILLIPS,D.M.; MATHER,J.P. & BARDIN,C.W. Identification of stage-specific proteins synthesized by rat seminiferous tubules. *Biol. Reprod.*, v.29, p.257-270, 1983.
- ZAKOUR,R.A.; KUNKEL,T.A. & LOEB,L.A. Metal-induced infidelity of DNA synthesis. *Environ. Health Perspec.*, v.40, p.197-205. 1981.