

MÉTODOS EM TOXICOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO E FERTILIDADE EM ROEDORES

METHODS IN TOXICOLOGY OF THE MALE REPRODUCTIVE SYSTEM AND FERTILITY IN RODENTS

Leonardo Toshio Oshio*, Martha de Oliveira Guerra**

RESUMO

A influência de fatores ambientais na fertilidade masculina vem sendo cada vez mais discutida. A despeito de diferenças regionais e étnicas da população humana e falta de padronização de técnicas de contagem de espermatozoides, diversos estudos demonstraram que, ao longo dos anos, houve redução da fertilidade masculina humana; tal redução se deve provavelmente à modificação do estilo de vida, fatores ocupacionais e da exposição a substâncias e a agentes físicos. Dentre as substâncias potencialmente capazes de causar infertilidade destacam-se novos medicamentos, produtos químicos como plásticos, agentes de limpeza e pesticidas. Além da perda de fertilidade, a radiação ionizante e os quimioterápicos podem ocasionar alterações genéticas nas células germinativas com conseqüentes manifestações neoplásica e de malformações, além de infertilidade nos descendentes.

Diante do exposto, ressaltamos a necessidade de estudos pré-clínicos em animais de laboratório, a fim de apontar substâncias com capacidade de alterar a reprodução e a fertilidade dos mamíferos e, a partir daí, calcular-se o risco para o ser humano. Nesse sentido, os testes para avaliação da toxicidade reprodutiva são de extrema importância e precisam ser gradativamente aprimorados.

PALAVRAS - CHAVE

Toxicologia. Infertilidade masculina. Espermatozoides.

ABSTRACT

The influence of environmental factors on male fertility has been increasingly discussed. Despite regional and ethnic differences in human population and lack of standardization of techniques for sperm count, several studies have shown that over the years, a reduction of human male fertility, such a reduction is probably due to modification of lifestyle, occupational factors and exposure to substances and physical agents. Among the substances that can potentially cause infertility stand out new drugs and chemicals such as plastics, cleaning agents and pesticides. Besides the loss of fertility, ionizing radiation and chemotherapy may cause genetic changes in the germ cells with subsequent manifestations of cancer and malformations, and infertility in the offspring. Given the above, we emphasize the need for preclinical studies in laboratory animals, to point substances capable of altering the reproduction and fertility in mammals and, from there, calculate the risk to humans. In this sense, tests to evaluate reproductive toxicity are extremely important and must be gradually improved.

KEY WORDS

Toxicology. Male infertility. Sperm.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, nota-se um crescente interesse na influência de fatores ambientais na fertilidade masculina (PFLIEGER-BRUSS; SCHUPPE; SCHILL, 2004). Carlsen et al. (1992) relataram que a concentração de espermatozoides do sêmen humano reduziu de 113 milhões para cerca de 66 milhões/ml entre os anos de 1938 e 1990. Apesar dessa comparação não ter levado em conta as diferenças regionais e étnicas da

população humana e a falta de padronização das técnicas de contagem de espermatozoides utilizadas, compreende-se que houve redução da fertilidade masculina humana ao longo dos anos. Essa perda deveu-se principalmente à modificação do estilo de vida, fatores ocupacionais e das substâncias e agentes físicos aos quais o homem foi submetido.

No rol das substâncias potencialmente capazes de causar infertilidade, podem-se citar os novos medicamentos desenvolvidos como os anti-neoplásicos (SCHRADER et al., 2001) e fitoterápicos (DAS et al., 2004), produtos químicos como plásticos (bisfenol A e ftalatos), agentes de limpeza (alquilfenóis) e pesticidas (compostos organoclorados) (PFLIEGER-BRUSS; SCHUPPE; SCHILL, 2004).

Além da perda de fertilidade, Anderson (2005) mencionou que a radiação ionizante e os quimioterápicos podem ocasionar alterações

* Mestrando. Médico Veterinário. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira. Correspondence Author. leonardo_oshio@yahoo.com.br

** Orientadora. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira. Monografia apresentada como parte das exigências da disciplina "Tópicos Avançados em Toxicologia Reprodutiva I" Dezembro – 2009

Received: 30/06

Accepted: 09/07

genéticas nas células germinativas com conseqüentes manifestações neoplásica e de malformações e infertilidade nos descendentes.

Dessa maneira, há necessidade de estudos pré-clínicos em animais de laboratório, especialmente os roedores, a fim de apontar substâncias com capacidade de alterar a reprodução e a fertilidade dos mamíferos e, a partir daí, calcular-se o risco para o ser humano. A atual estratégia de teste deve ser determinada pela evidência de exposição a uma substância por uma dada população. Devem ser considerados o estado físico da substância, a via de administração semelhante à utilizada pelos humanos, a existência de dados anteriores de toxicidade e similaridades estrutural e de atividade a outros compostos (ICH, 2005).

Os protocolos para realização dos estudos experimentais podem variar quanto à duração do tratamento e número de animais necessários, o número de gerações envolvidas e a fase de vida avaliada. A escolha da dosagem é um dos fatores mais críticos no delineamento de um estudo experimental (BUSCHMANN, 2006). A maior dose deve ser escolhida com bases em outros relatos disponíveis, como os de farmacologia e estudos de toxicidade crônica e aguda. A partir da escolha, dosagens menores devem ser selecionadas em uma escala descendente (ICH, 2005).

2 DADOS BÁSICOS SOBRE A ESPERMATOGÊNESE

A espermatogênese é uma seqüência de eventos celulares que resultam na formação de um espermatozóide maduro a partir de células precursoras. A condição para sua ocorrência depende de organização celular não-germinativa dentro do túbulo seminífero, desempenhada pelas células de Sertoli, que fornecerão sustentação nutricional e física aos espermatozoides e demais células da linhagem. Além disso, as células de Sertoli formam a barreira hemato-testicular cuja função é promover um ambiente isento de agentes nocivos aos espermatócitos, espermátides e espermatozoides (KERR et al., 2006). O evento espermatogênico é regulado pela interação entre o hipotálamo, hipófise e os testículos através de hormônios que são liberados por estes sítios e que estimularão ou inibirão a atividade deste eixo.

O GnRH ou hormônio liberador de gonadotropinas é secretado pelo hipotálamo e estimula a secreção das gonadotropinas FSH (hormônio folículo-estimulante) e LH (hormônio luteinizante).

Nos testículos, o LH atua sobre a célula de Leydig estimulando-a para produzir e secretar a testosterona, hormônio androgênio necessário para a realização da espermatogênese. Esse mesmo hormônio, através do mecanismo de feed-back negativo sobre o hipotálamo e hipófise, controla a secreção de GnRH e gonadotropinas.

O FSH atua na preservação da viabilidade das células da linhagem germinativa e no controle da população das células de Sertoli, principalmente nos animais jovens. Além disso, o FSH estimula a secreção de inibina B pelas células de Sertoli que atua nas células da hipófise como mecanismo de retroalimentação negativa (O'DONNELL et al., 2006).

Uma vez que há a produção dos espermatozoides no testículo, estes são conduzidos pelos ductos eferentes até o epidídimo onde ocorrerá o desenvolvimento da motilidade e da capacidade fertilizatória, além da estocagem e do transporte (ROBAIRE; HINTON; ORGENBIN-CRIST, 2006). À ejaculação, os espermatozoides juntam-se às secreções das glândulas acessórias. Os principais compostos produzidos por essas glândulas são o ácido cítrico, frutose, espermolisinase, prostaglandinas e esperminas que realizam a proteção e nutrição do espermatozóide no trato reprodutor feminino (RISBRIDGER; TAYLOR, 2006).

3 TOXICOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

Os agentes nocivos podem exercer seus efeitos ao nível pré-testicular, testicular e pós-testicular. O nível pré-testicular envolve alterações no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, com impedimento da dinâmica hormonal necessária à ocorrência da espermatogênese. Efeitos citotóxicos e genotóxicos nas células da linhagem germinativa caracterizam os efeitos testiculares. Por fim, os efeitos pós-testiculares são aqueles que interferem na atividade epididimária e na produção e/ou secreção das glândulas acessórias, como o a vesícula seminal e próstata (PFLIEGER-BRUSS; SCHUPPE; SCHILL, 2004).

4 PROTOCOLOS UTILIZADOS PARA ESTUDOS EM TOXICOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

4.1 QUANTO AO PERÍODO DE TRATAMENTO

4.1.1 Tratamento em dose única

O teste envolve a administração única de uma substância, com doses fixas de 5, 50, 300, 2000 e excepcionalmente, 5000mg/kg. São necessários cinco animais para cada dose da substância analisada (OECD, 2001a).

4.1.2 Tratamento pela administração de doses repetidas

Engloba o tratamento dos animais por doses repetidas da substância pelo período de 28 (OECD, 2008) ou 90 dias (OECD, 1998). A vantagem do segundo estudo em relação ao primeiro é a melhor identificação dos órgãos-alvo e acompanhamento de possíveis efeitos cumulativos. Geralmente requisitam-se dez animais para os estudos de 28 dias e vinte animais para os de 90 para cada dose da substância. Tratamentos entre 28 e 90 dias já foram propostos nos Guidelines 421 (1995) 422 (1996) da OECD como testes preliminares ao tratamento crônico.

Há também o protocolo em que os animais são tratados por 12 meses (OECD, 2009a). O objetivo desse teste é verificar os efeitos cumulativos da substância em um animal com idade geriátrica. Normalmente são utilizados vinte animais para cada grupo.

4.2 QUANTO AO NÚMERO DE GERAÇÕES ENVOLVIDAS

4.2.1 Toxicidade em uma geração

Fornecer dados do efeito de uma substância sobre o desempenho reprodutivo e também das alterações teratogênicas na geração descendente. Os machos devem ser tratados por um ciclo espermatogênico completo que é de 56 dias no camundongo e 70 dias no rato (OECD, 1983).

4.2.2 Toxicidade em duas gerações

O tratamento é realizado na geração parental, como descrito anteriormente, mas continuamente na geração F1 nos períodos de lactação, puberdade, fase adulta, acasalamento, gestação e obtenção da geração F2. A característica deste teste é a obtenção de uma geração completamente exposta à substância (OECD, 2001b). Entretanto, por razões éticas e econômicas, devido ao maior número de animais envolvidos, necessita-se de melhores parâmetros analíticos para justificar a sua execução (BUSCHMANN, 2006).

4.3 QUANTO AO ESTÁGIO DE VIDA DOS ANIMAIS UTILIZADOS

O estágio de vida em que é avaliada a toxicidade de uma substância é um fator crítico, uma vez que determinada fase pode ser, comparativamente, mais susceptível aos efeitos do medicamento que outra. Os animais podem ser submetidos ao tratamento nos períodos pré-natal (gestação), lactação, puberdade e vida adulta (BUSCHMANN, 2006).

5 VARIÁVEIS ANALISADAS EM TOXICOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

5.1 DESENVOLVIMENTO FÍSICO

A avaliação física externa como o peso corporal, o ganho de peso e o consumo de ração podem oferecer dados importantes dos mecanismos de ação das substâncias sobre o metabolismo animal e presença de toxicidade direta da substância.

Em animais jovens pré-desmame são verificados a abertura dos pavilhões auriculares, o crescimento da pelagem e a erupção dos dentes incisivos. Nos animais em fase pós-desmame, anota-se a idade em que ocorreu a separação da glândula balanoprepucial nos machos. Este último evento, associado à descida do testículo para o escroto, indica o início da maturidade sexual. Uma alteração nos padrões de tempo para início desses eventos pode indicar influência das substâncias no desenvolvimento corporal e do sistema reprodutor animal (ICH, 2005).

5.2 PESO DOS TESTÍCULOS E GLÂNDULAS SEXUAIS ACESSÓRIAS

A análise do peso gonadal e glândulas sexuais acessórias dos animais parentais e descendentes é útil, uma vez que o desenvolvimento dessas estruturas é dependente de estímulo hormonal apropriado. Entretanto, outros mecanismos podem resultar em alterações semelhantes e qualquer evidência nessa variável deve ser interpretada como necessidade subsequente de análise do modo de ação e de histopatologia (OECD, 2002).

5.3 PRODUTOS DAS GLÂNDULAS SEXUAIS ACESSÓRIAS

A secreção das glândulas vesiculares e da próstata compõe o plasma seminal do sêmen. Elas são responsivas aos andrógenos e sua função está intimamente relacionada à dos testículos. A aferição dos produtos como a frutose na vesícula seminal e o ácido cítrico na próstata pode, além de oferecer indícios de seu estado funcional, demonstrar a qualidade do sêmen (RISBRIDGER; TAYLOR, 2006). Como os produtos dessas glândulas contribuem para a viabilidade do esperma após a ejaculação até o momento da fecundação, uma contribuição insuficiente desses órgãos poderia significar perda de qualidade do sêmen (DAS, 2004).

5.4 CONTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES E AVALIAÇÃO DE MOTILIDADE

As amostras podem ser coletadas a partir da cauda do epidídimo através da realização de pequenas secções e recuperação de secreção epididimária. Também poder ser coletadas através da difusão dos espermatozoides para a solução fisiológica após permanência de fragmentos da cauda do epidídimo ou do ducto deferente no meio. A avaliação da motilidade é feita anteriormente à contagem devido à influência da queda de temperatura na motilidade.

A avaliação de motilidade pode ser feita manualmente através de câmaras de contagem ou por programa de computador (CASA® - Computer-assisted sperm analysis) (SEED et al., 1996; OECD, 2004). Podem ser utilizados o hematocitômetro (WHO, 1999) e a câmara de Makler para avaliação de mobilidade dos espermatozoides.

A porcentagem de espermatozoides móveis é definida como número de espermatozoides móveis/número total de espermatozoides x 100.

5.5 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

Uma pequena amostra pode ser colocada em uma lâmina e pode ser visualizada como preparação úmida ou seca ao ar. As amostras são coradas com eosina Y e são contados cerca de 200 a 400 espermatozoides em microscópio óptico com aumento de 400x. Não há uma classificação universal das alterações morfológicas espermáticas. Geralmente notam-se alterações na cabeça, como aumento ou redução do tamanho do acrossoma e na cauda, como enrolamento, multiplicidade, laceração ou persistência de gotas citoplasmáticas (OECD, 2004).

5.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA TESTICULAR

A histopatologia testicular é um dos parâmetros mais sensíveis para análise de possíveis alterações na fertilidade masculina. Aspectos degenerativos testiculares podem ser identificados em seções coradas por hematoxilina e eosina, como a hipocelularidade e morte celular no epitélio seminífero, vacuolização das células de Sertoli, formação de células multinucleadas (células gigantes compostas de espermatócitos e espermátides) e a presença de espermátides arredondadas e restos celulares no epidídimo (OECD, 2004).

5.7 TESTE DE DOMINÂNCIA LETAL

O teste de dominância letal consiste em acasalar machos tratados com fêmeas não tratadas. O objetivo desse teste é verificar possíveis alterações genéticas nos espermatozoides que não causaram alterações morfológicas para o gameta, mas que não permitem sustentar o desenvolvimento embrionário (OECD, 1984). Os resultados desse teste são observados nos índices de perdas pré e pós-implantação, obtidos na coleta dos dados das fêmeas, sacrificadas aos 2/3 da prenhez. O teste pode indicar também alterações não mutagênicas, como redução na concentração de espermatozoides, alterações no transporte de espermatozoides, na penetração no ovócito e no comportamento do macho (OECD, 2002).

O teste estendido, em que a eutanásia e verificação dos fetos é realizada um dia antes do parto, é útil para estudos de malformações congênitas, tais como a hidrocefalia, exencefalia, fenda palatina, nanismos e anasarca (ANDERSON, 2005).

5.8 DOSAGEM HORMONAL

Avaliação das concentrações dos hormônios luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH) e testosterona, podem ser feitas por meios sorológicos como o ELISA ou radioimunoensaio. Os níveis de testosterona são úteis

para verificar se a substância estimula o fígado a degradar o hormônio. Aferições de FSH e LH fornecem informações de uma possível atividade da substância no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (OECD, 2009b).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A perda de fertilidade masculina advinda da exposição aos agentes ambientais químicos, físicos ou infecciosos, tem despertado preocupação e vem sendo motivo de estudo de organizações e centros de pesquisa. Além da perda de fertilidade, as malformações e aumento de incidência de tumores nas gerações descendentes também estão sendo implicados como conseqüências desta exposição, devido à geração de espermatozoides com alterações cromossômicas. Tais constatações fazem com que cada vez mais sejam tomadas medidas para uma análise sistemática e cuidadosa dos fatores que estão pondo em risco a sobrevivência da espécie humana. Nesse sentido, os testes para avaliação da toxicidade reprodutiva são de extrema importância e precisam ser gradativamente aprimorados.

7 REFERÊNCIAS

- ANDERSON, D. Male-mediated developmental toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v.207, n.2, p. 506-513, 2005.
- BUSCHMANN, J. Critical aspects in reproductive and developmental toxicity testing of environmental chemicals. **Reproductive Toxicology**, Elmsford, v.22, n.2, p.157-163, 2006.
- CARLSEN, E. et al. Evidence of decreasing quality of semen during past 50 years. **British Medical Journal**, London, v.305, n. 6854, p.609-613, 1992.
- DAS, S. et al. Reproduction in male rats is vulnerable to treatment with flavonoid-rich seed extracts of *Vitex negundo*. **Phytotherapy Research**, London, v.18, n.1, p.8-13, 2004.
- ICH. Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility S5(R2), 2005. Disponível em: < <http://www.ich.org/cache/comp/502-272-1.html#S3A> >.
- KERR, J. B. et al. Cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms. In: NEILL, J. D. et al. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3.ed. New York: Elsevier, 2006.
- O'DONNELL, L. et al. Endocrine Regulation of Spermatogenesis. In: NEILL, J. D. et al. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3.ed. New York: Elsevier, 2006.

- OECD Test Guideline for Testing of Chemicals. One-Generation Reproduction Toxicity Study, 1983. Disponível em: < <http://puck.sourceoecd.org/vl=2323077/cl=79/nw=1/rpsv/cgi-bin/fulltextew.pl?prpsv=/ij/oecdjournals/1607310x/v1n4/s15/p1.idx> >.
- OECD Test Guideline for Testing of Chemicals. Genetic Toxicology: Rodent Dominant Lethal Test, 1984. Disponível em: < <http://titania.sourceoecd.org/vl=3581380/cl=35/nw=1/rpsv/cgi-bin/fulltextew.pl?prpsv=/ij/oecdjournals/1607310x/v1n4/s43/p1.idx> >.
- OECD Test Guideline for Testing of Chemicals. Repeated Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, 1995. Disponível em: < <http://puck.sourceoecd.org/vl=2323077/cl=79/nw=1/rpsv/cgi-bin/fulltextew.pl?prpsv=/ij/oecdjournals/1607310x/v1n4/s21/p1.idx> >.
- OECD Test Guideline for Testing of Chemicals. Repeated Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, 1996. Disponível em: < <http://puck.sourceoecd.org/vl=2323077/cl=79/nw=1/rpsv/cgi-bin/fulltextew.pl?prpsv=/ij/oecdjournals/1607310x/v1n4/s22/p1.idx> >.
- OECD Test Guideline for Testing of Chemicals. Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents, 1998. Disponível em: < <http://puck.sourceoecd.org/vl=2323077/cl=79/nw=1/rpsv/cgi-bin/fulltextew.pl?prpsv=/ij/oecdjournals/1607310x/v1n4/s8/p1.idx> >.
- OECD Test Guideline for Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure, 2001a. Disponível em: < <http://titania.sourceoecd.org/vl=2468818/cl=37/nw=1/rpsv/cgi-bin/fulltextew.pl?prpsv=/ij/oecdjournals/1607310x/v1n4/s20/p1.idx> >.
- OECD Test Guideline for Testing of Chemicals. Two-generation reproduction toxicity study, 2001b. Disponível em: < <http://puck.sourceoecd.org/vl=2323077/cl=79/nw=1/rpsv/cgi-bin/fulltextew.pl?prpsv=/ij/oecdjournals/1607310x/v1n4/s16/p1.idx> >.
- OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD Series on Testing and Assessment No. 21 – Appraisal of Test Methods of Sex Hormone Disrupting Chemicals, 2002. Disponível em: < <http://puck.sourceoecd.org/vl=8545154/cl=17/nw=1/rpsv/cgi-bin/fulltextew.pl?prpsv=/ij/oecdjournals/1607310x/v1n5/s19/p1.idx> >.
- OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD Series on Testing and Assessment No. 43 – Draft Guidance Document on Reproductive Toxicity Testing and Assessment, 2004. Disponível em: < <http://puck.sourceoecd.org/vl=8545154/cl=17/nw=1/rpsv/cgi-bin/fulltextew.pl?prpsv=/ij/oecdjournals/1607310x/v1n5/s19/p1.idx> >.
- OECD Test Guideline for Testing of Chemicals. Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents, 2008. Disponível em: < <http://puck.sourceoecd.org/vl=2323077/cl=79/nw=1/rpsv/cgi-bin/fulltextew.pl?prpsv=/ij/oecdjournals/1607310x/v1n4/s7/p1.idx> >.
- OECD Test Guideline for Testing of Chemicals. Chronic Toxicity Studies, 2009a. Disponível em: < <http://puck.sourceoecd.org/vl=2323077/cl=79/nw=1/rpsv/cgi-bin/fulltextew.pl?prpsv=/ij/oecdjournals/1607310x/v1n4/s35/p1.idx> >.
- OECD Test Guideline for Testing of Chemicals. Hershberger Bioassay in Rats: A Short-term Screening Assay for (Anti) Androgenic Properties, 2009b. Disponível em: < http://titania.sourceoecd.org/vl=3564732/cl=12/nw=1/rpsv/periodical/p15_about.htm?jnlissn=1607310x >.
- PFLIEGER-BRUSS, S.; SCHUPPE, H. -C.; SCHILL W. -B. The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals. **Andrologia**, Berlin, v.36, n.6, p.337–345, 2004.
- RISBRIDGER, G. P.; TAYLOR, R. A. Physiology of the Male Accessory Sex Structures: The Prostate Gland, Seminal Vesicles, and Bulbourethral Glands. In: NEILL, J. D. et al. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3.ed. New York: Elsevier, 2006.
- ROBAIRE, B.; HINTON, T.; ORGENBIN-CRIST, M. The Epididymis. In: NEILL, J. D. et al. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3.ed. New York: Elsevier, 2006.
- SCHRADER, M.; MÜLLER, M.; STRAUB, B.; MILLER, K. The impact of chemotherapy on male fertility: a survey of the biologic basis and clinical aspects. **Reproductive Toxicology**, Elmsford, v.15, n.6, p.611-617, 2001.
- SEED, et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. **Reproductive Toxicology**, Elmsford, v.10, n.3, p.237-344, 1996.
- WHO. **WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction**. 4. Ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.