

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Bruna Monsale Russo
Thaís Bellintani Semenzim

INFERTILIDADE MASCULINA GERADA POR TUMORES
DE CÉLULAS DE LEYDIG COMBINADOS ÀS
TERAPIAS ANTINEOPLÁSICAS

São Paulo
2015

Bruna Monsale Russo
Thaís Bellintani Semenzim

**INFERTILIDADE MASCULINA GERADA POR TUMORES
DE CÉLULAS DE LEYDIG COMBINADOS ÀS
TERAPIAS ANTINEOPLÁSICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Biomedicina do Centro
Universitário São Camilo, orientado pela
Profa. Dra. Samara Urban de Oliva como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

São Paulo
2015

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Russo, Bruna Monsale

Infertilidade masculina gerada por tumores de células de leydig combinados às terapias antineoplásicas / Bruna Monsale Russo, Thaís Bellintani Semenzim. -- São Paulo : Centro Universitário São Camilo, 2015.

48 p.

Orientação de Samara Urban de Oliva

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2015.

1. Infertilidade masculina 2. Neoplasias 3. Células leydig 4. Protocolos de quimioterapia combinada antineoplásica I. Semenzim, Thaís Bellintani II. Oliva, Samara Urban de III. Centro Universitário São Camilo IV. Título

CDD: 616.692

Bruna Monsale Russo
Thaís Bellintani Semenzim

**Infertilidade masculina gerada por tumores de células de Leydig
combinados às terapias antineoplásicas**

São Paulo, 26 de Outubro de 2015

Professor Orientador: Prof^a. Dr^a. Samara Urban de Oliva

Professor Examinador: Prof. Me. Rafael Ferreira Ribeiro

*Dedicamos às nossas famílias que
sempre nos apoiaram nos momentos mais
difíceis, sempre oraram, torceram por
nós e não mediram esforços para fazer
do nosso sonho, real.*

AGRADECIMENTOS

Bruna

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado a grande oportunidade de chegar até aqui e realizar o meu sonho.

Agradeço à minha mãe, Ruth; à minha tia Luciene; ao meu avô (e segundo pai), Waldemar, por estarem sempre ao meu lado e não medirem esforços para que meu sonho se tornasse realidade. Obrigada por todas as vezes em que vocês me deram forças para erguer a cabeça e continuar. Sem vocês eu não seria nada. Agradeço também ao meu pai, Ricardo, por me apoiar em minhas decisões e torcer por mim.

Agradeço à minha família como um todo, tias, tios, primas e primos pelas orações e pelos conselhos nos momentos mais difíceis.

Não poderia deixar de agradecer à minha grande amiga e companheira de trabalho, Thaís, que lutou, sofreu, riu e chorou ao meu lado, durante todo o decorrer destes 4 anos. Amiga, certamente sem você eu não teria conseguido aguentar tudo o que aguentamos, não teria dado tantas risadas, criado tantos apelidos e me divertido tanto. Obrigada por me ouvir todas as vezes em que eu mais precisei (sei que não foram poucas) e por sempre estar disposta a me ajudar em tudo e sempre tirar boas risadas de cada situação estressante ou constrangedora. Você foi e sempre será essencial na minha vida. Valeu a pena passar por tudo isso com você.

Também não poderia deixar de agradecer à nossa orientadora Prof^a Dr^a. Samara, que em todos os momentos estava disposta a nos ajudar, aconselhar e pronta a nos ouvir em todos os nossos momentos de desespero e por nos acalmar com palavras

doces e que nos transmitiam tanta confiança. Obrigada por toda dedicação e atenção, professora.

Vocês nos fizeram chegar até aqui. Obrigada!

Thaís

Agradeço a Deus, por ter me ajudado a alcançar uma das minhas maiores realizações, mesmo quando havia grandes dificuldades no caminho;

Agradeço à minha família por toda oportunidade, incentivo, dedicação e apoio proporcionados não só durante os quatro anos de faculdade, mas durante toda minha vida. Obrigada por estarem sempre presentes em todos os momentos importantes, e por acreditarem em mim;

Agradeço à Bruna, que além de sempre ter sido minha colega de provas, trabalhos e relatórios, se tornou uma amiga que sei que posso confiar e contar por toda a vida. Com você, a jornada se tornou mais leve e divertida, e juntas conseguimos conquistar nossos objetivos.

Agradeço à nossa orientadora, Prof^a. Dr^a. Samara Urban de Oliva por ter nos acolhido, e por sempre estar disposta a nos ajudar, tanto com o conteúdo, quanto com palavras de apoio.

RUSSO, Bruna Monsale; SEMENZIM, Thaís Bellintani. **Infertilidade masculina gerada por tumores de células de Leydig combinados às terapias antineoplásicas.** 2015, 48f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel de Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2015.

As células de Leydig tem como principal função a produção de andrógenos, tanto para a regulação parácrina da espermatogênese, quanto para a ocorrência dos efeitos sistêmicos endócrinos, androgênicos e anabólicos extra testiculares. São responsáveis pela secreção da testosterona, hormônio responsável pela masculinização do sistema urogenital masculino. Os diversos tipos de tumores testiculares causam danos à função reprodutiva masculina, podendo acarretar infertilidade em pacientes jovens e em idade reprodutiva. Os tumores testiculares são classificados em germinativos e não germinativos. A variante mais frequente de tumores não germinativos do testículo é o tumor que acomete as células de Leydig. Existem diversos métodos de tratamento para os indivíduos portadores de cânceres de células de Leydig, sendo possível a intervenção cirúrgica, a radioterapia e o tratamento quimioterápico citotóxico, considerado o mais bem-sucedido no que se diz respeito às altas taxas de sobrevivência. Entretanto, a preocupação dos médicos e cientistas em relação aos efeitos colaterais causados pela radioterapia e quimioterapia vem crescendo, já que elas não apresentam seletividade para os tecidos tumorais. Tanto os tumores testiculares quanto suas diferentes modalidades de tratamento possuem um grande impacto deletério sobre a reprodução humana, podendo submeter o paciente a um estado de esterilidade transitório ou, em casos mais raros, esterilidade permanente.

Palavras-chave: Infertilidade masculina. Neoplasias. Célula de Leydig. Protocolos de quimioterapia combinada antineoplásica.

RUSSO, Bruna Monsale; SEMENZIM, Thaís Bellintani. **Male infertility generated by Leydig cell tumors combined with antineoplastic therapies.** 2015, 48f. Completion of course work – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2015.

Leydig cell's main function is the production of androgens, for both the paracrine regulation of spermatogenesis, as well to the occurrence of endocrine, androgenic and anabolic extratesticular systemic effects. They are responsible for the secretion of testosterone, the hormone responsible for male urogenital system masculinization. The different types of testicular tumors cause damage to the male reproductive function and may cause infertility in young patients of reproductive age. Testicular tumors are classified into germinal and non-germinal. The most frequent variant of non-germinal cell tumors of the testis is a tumor that affects the Leydig cells. There are several treatment methods for patients with Leydig cell cancer, such as surgical intervention, radiotherapy and cytotoxic chemotherapy, which is considered the most successful when it comes to high survival rates. However, doctors and scientists are concerned about these methods due to the side effects caused by radiotherapy and chemotherapy, since they are not selective for tumor tissues only. Both testicular tumors and their different treatment modalities have a deleterious impact on human reproduction and may submit the patient to a transitional sterile state or, in rare cases, to a permanent sterility.

Keywords: Male infertility. Neoplasms. Leydig cells. Combined neoplastic chemotherapy protocols.

Lista de figuras

Figura 1 – Distribuição de células intersticiais	17
Figura 2 – Linhagem da célula de Leydig	20
Figura 3 – Diferenças das linhagens de células de Leydig na cascata esteroidogênica	22
Figura 4 – Regulação da diferenciação da célula de Leydig adulta no testículo pós-natal	24
Figura 5 – Biossíntese de esteroides nas células de Leydig	25
Figura 6 – Seminoma clássico	28
Figura 7 – Cortes histológicos do tumor das células de Leydig	30
Figura 8 – Sequência, cinética, e a sobrevivência após a irradiação em células espermatogênicas no homem	36
Figura 9 – Representação gráfica da contagem de espermatozoides em pacientes tratados com radioterapia	37

Lista de siglas

Abl	“Abelson leukemia”
ABP	Proteína ligadora de andrógenos
ACAT	Acil-CoA: colesterol aciltransferase
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ARE	Elementos androgênicos responsivos
Bcr	“Breakpoint cluster region”
CL	Células de Leydig
CLA	Células de Leydig adultas
CLF	Células de Leydig fetais
CLI	Células de Leydig imaturas
CLP	Células de Leydig progenitoras
CoA	Coenzima A
DHEA	Desidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
Gy	Gray
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HDAC	Inibidores de histona deacetilase
HDL	Lipoproteínas de alta densidade

HMG	3-hidroxi-3-methyl-glutaril
HSD	Hidroxiesteróide desoxidrogenase
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IICE	Injeção intracitoplasmática de espermatozoides
IL	Interleucinas
KIT	Proteína tirosina quinase
LAL	Lipase ácida lisossomal
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LH	Hormônio luteinizante
LHS	Lipase hormônio-sensível
LHR	Receptores do hormônio luteinizante
MSH	Hormônio melanotrófico
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
RA	Receptor de andrógeno
RE	Retículo endoplasmático
RED	Reduzido
REL	Retículo endoplasmático liso
TCL	Tumores das células de Leydig
TGF	Fator de transformação do crescimento
TH	Hormônio da tireoide
TRA	Técnicas de reprodução assistida
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
Lista de tabelas	
1 INTODUÇÃO	13
2	OBJETIVO
.....	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS
.....	16
4	DESENVOLVIMENTO
.....	17
4.1 Morfofisiologia e desenvolvimento das células de Leydig	
.....	19
4.2 Esteroidogênese testicular	
23	
4.3 Tumores testiculares: epidemiologia e classificação	
27	
4.4. Tumores de células de Leydig	
28	
4.5. Tratamento dos tumores de células de Leydig e infertilidade	
32	
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	
40	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

A incidência de câncer de testículo apresentou um aumento drástico nos últimos 50 anos (HUYGHE *et al.*, 2003; DELBES *et al.*, 2007), os quais podem ser classificados em: tumores germinativos, que consistem de 97% dos casos, e os tumores não germinativos, que incluem os tumores de células de Leydig. A testosterona, sintetizada e secretada pelas células de Leydig, além de ser responsável pelo comportamento sexual e de influenciar no desenvolvimento das vias genitais masculinas e da genitália externa, desempenha importante função na manutenção da espermatogênese. Alterações dos níveis de testosterona biologicamente ativa podem acarretar danos à espermatogênese, à maturação espermática no epidídimo, ao desenvolvimento e à função secretora das glândulas sexuais acessórias, considerando-se que estes são processos andrógeno-dependentes. A testosterona possui grande importância para a ocorrência normal da espermatogênese, para a manutenção e o desenvolvimento das vias genitais e glândulas acessórias masculinas, enquanto o estradiol possui um relevante papel na regulação indireta da síntese de testosterona, ou seja, sua ação se dá através do seu controle negativo exercido sobre a liberação do hormônio luteinizante (LEJEUNE *et al.*, 1998; de KRAWETZ; DE ROOIJ; HEDGER, 2009; SVINGEN; KOOPMAN, 2013; SMITH; WALKER, 2014).

Os efeitos virilizantes dos tumores de células de Leydig, devido ao excesso de secreção androgênica, principalmente de testosterona e, em menores quantidades, androstenediona e dehidroepiandrosterona, acarretam manifestações clínicas que variam de acordo com as fases do desenvolvimento sexual masculino. Desta forma, na fase da pré-puberdade, é comum a ocorrência de sinais de pseudopuberdade precoce, incluindo aumento do tamanho peniano, crescimento dos pelos pubianos, mudança de voz e ginecomastia. Na fase adulta, é comum o aparecimento de sinais de feminilização (AL-AGHA; AXIOTIS, 2007; MARIS *et al.*, 2015).

Os diversos tipos de tumores testiculares causam danos à função reprodutiva masculina, incluindo a espermatogênese, podendo acarretar infertilidade em pacientes jovens e em idade reprodutiva, acometidos por esta doença. Assim, tratamentos com quimioterápicos vêm mostrando um avanço importante no que concerne à cura de pacientes acometidos pela doença. Por outro lado, o alto índice

de cura do paciente mediante a utilização de protocolos de quimioterapia conduz a outro problema, qual seja: a ação destes agentes não é ideal e seletiva, já que não está restrita apenas às células tumorais, afetando também células normais, principalmente aqueles tecidos com alta capacidade proliferativa, tais como a medula óssea e o epitélio seminífero. Assim, após as terapias anticâncer, em particular, contra o câncer testicular, a alta incidência de infertilidade masculina pode ser observada naqueles pacientes que se encontrem em idade reprodutiva ou com potencial capacidade (DELBES et al., 2007). Há também que se considerar, no período pós-terapia, o aspecto relativo ao comprometimento da qualidade dos espermatozoides no que se refere ao nível de fragmentação do DNA já que são bem conhecidas as ações genotóxicas e mutagênica destes agentes antineoplásicos (COLPI et al., 2004; BOEKELHEIDE, 2005; CHOY; BRANNIGAN, 2013; MEISTRICH, 2013; SMITH-WHITLEY, 2014).

Levando em conta, então, a possibilidade do retorno à fertilidade ou a preservação da fertilidade, torna-se imprescindível o desenvolvimento de terapias alternativas que, além de garantirem, no futuro, um sêmen com número adequado de espermatozoides e com motilidade normal, também reduzam a ocorrência de danos epigenéticos (GOOSSENS; TOURNAYE, 2014).

2 OBJETIVOS

Realizar uma revisão bibliográfica sobre os efeitos deletérios dos tumores testiculares, em especial os das células de Leydig, juntamente com os tratamentos antineoplásicos sobre a fertilidade masculina.

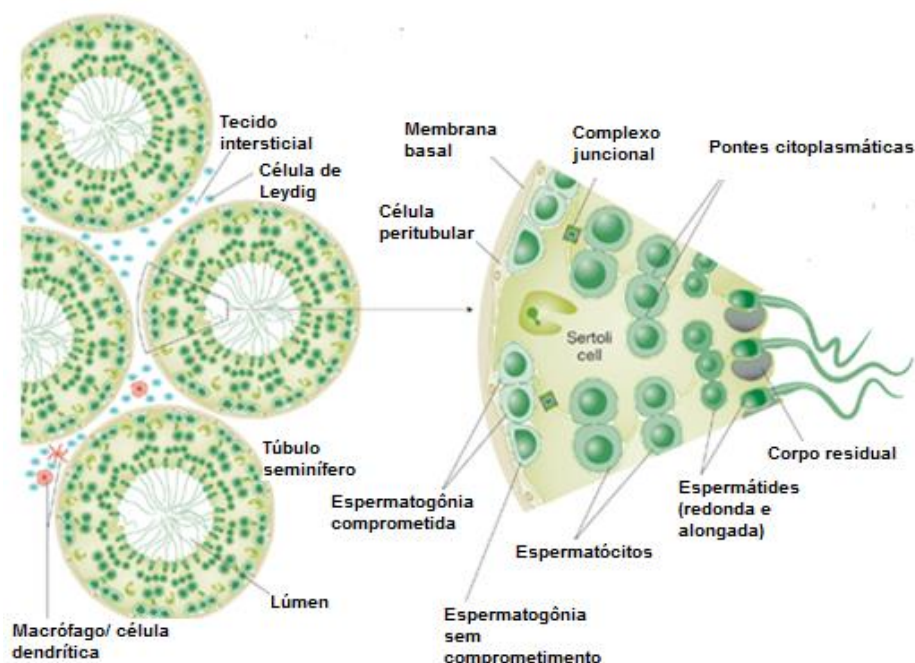
3 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma revisão de literatura, por meio de pesquisa nas bases de dados eletrônicas Medline, Pubmed, Lilacs e Scielo. Em todas as bases citadas, foram realizadas pesquisas simples, sem restrições quanto ao tipo de estudo, ano de publicação, idioma, campo de busca, espécie e gênero estudados. Como estratégia de busca foram utilizados os descritores: *Leydig cells* (células de Leydig), *testosterone* (testosterona), *male infertility* (infertilidade masculina), *steroidogenesis* (esteroidogênese), *Leydig cell differentiation* (diferenciação das células de Leydig), *chemotherapeutic agents* (agentes quimioterápicos).

4 DESENVOLVIMENTO

O testículo é o órgão responsável pela espermatogênese e pela produção de hormônios androgênicos, principalmente testosterona. Em mamíferos, o testículo apresenta dois compartimentos: o compartimento intersticial ou intertubular, composto por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e células de Leydig, e o compartimento intratubular, formado pelos túbulos seminíferos. Por sua vez, os túbulos seminíferos são constituídos por células da linhagem germinativa em diferentes estágios da espermatogênese e espermiogênese (espermatogônias, espermatócitos primários, espermatócitos secundários, espermátides redondas e alongadas), organizadas em camadas concêntricas, por células de Sertoli e pelas células mioides (Figura 1) (KRAWETZ; DE ROOIJ; HEDGER, 2009; MURTA; GOMES; MARTINEZ, 2013).

Figura 1 - As células intersticiais, principalmente as células de Leydig esteroidogênicas, estão distribuídos por todo o espaço entre os túbulos. Cada túbulo está rodeado por uma membrana basal e uma camada de células peritubulares, e o epitélio compreende as células germinativas em desenvolvimento e que suportam as células de Sertoli.



Fonte: (KRAWETZ; DE ROOIJ; HEDGER, 2009)

As células de Sertoli se estendem desde a lâmina basal até o lúmen do túbulo seminífero e desempenham diversas funções importantes no processo espermatogênico, incluindo o suporte estrutural e nutricional das células germinativas, formação da barreira hematotesticular, secreção de fluido testicular e de fatores parácrinos, autócrinos e endócrinos (FOLEY, 2001).

O processo espermatogênico está sob o controle neuroendócrino do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e tem início a partir da puberdade, devido a um aumento na secreção das gonadotrofinas hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). O FSH interage com receptores localizados nas células de Sertoli, sendo sua liberação regulada pela testosterona e pela inibina, enquanto o LH estimula as células de Leydig a produzirem andrógenos, principalmente testosterona (MARTY et al., 2003). O mecanismo de *feedback* regula a secreção de LH em função da concentração plasmática de testosterona circulante (CARVALHO, 2001).

Normalmente, as células de Leydig estão dispostas no interstício testicular em feixes ou grupos celulares situados próximos a vasos sanguíneos, provavelmente em decorrência da função endócrina exercida por essas células (RUSSELL, 1996). A ultraestrutura evidencia sua atividade esteroideogênica, apresentando retículo endoplasmático liso bem desenvolvido e mitocôndrias com cristas tubulares (RUSSELL et al., 1996). A testosterona sintetizada pelas células de Leydig pode ainda ser convertida em dihidrotestosterona, pela ação da enzima 5 α -redutase, e em 17 β -estradiol, pela ação da enzima aromatase (STOCCO, 1996). Assim, concentrações adequadas de testosterona são necessárias para a diferenciação sexual masculina na fase fetal (WU et al., 2007), para o estabelecimento do início da puberdade, desenvolvimento e a manutenção dos caracteres sexuais masculinos secundários e manutenção do processo espermatogênico (SHARPE, 1994; ZIRKIN; CHEN, 2000; DE GENDT et al., 2004; WU et al., 2007). Particularmente, a dihidrotestosterona é responsável pela manutenção funcional das glândulas sexuais acessórias e do epidídimo (STEERS, 2001; ROBAIRE; HAMZEH, 2011). Além disso, a célula de Leydig está envolvida na síntese de outras substâncias bioativas que atuam na regulação parácrina e autócrina da função testicular (TÄHKÄ, 1986; 1989). Estas substâncias, tais como β -endorfina, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e hormônio melanotrófico (MSH), participam no controle autócrino e parácrino das funções das células de Leydig e de Sertoli (BARDIN et al., 1987). Desta forma, as

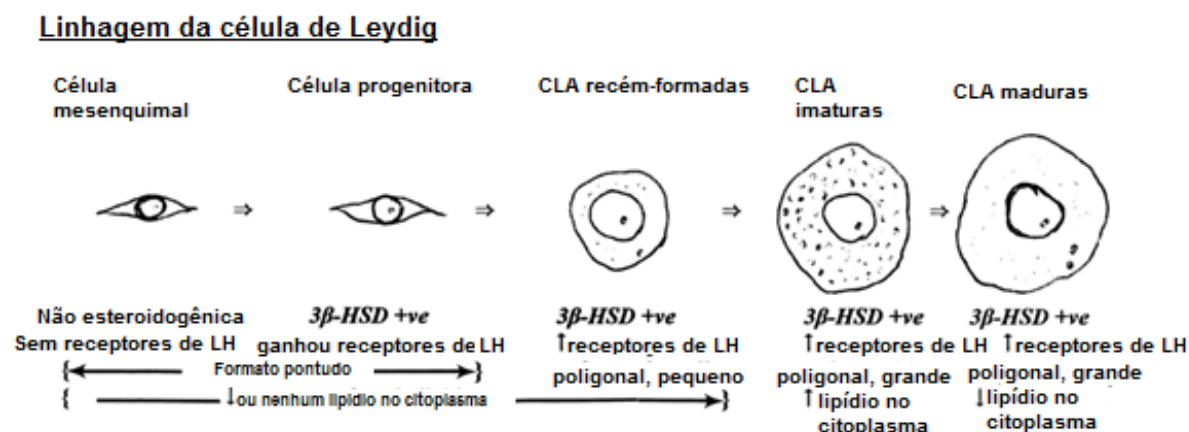
células de Leydig possuem influência direta na determinação do número definitivo de células de Sertoli pela ação da β -endorfina. Da mesma forma, as células de Sertoli parecem controlar a população das células de Leydig e sua capacidade esteroidogênica, por meio da secreção de fatores de crescimento estimulados pelo FSH e por andrógenos (DE GENDT et al., 2005; BARSOUM; YAO, 2010; HAZRA et al., 2013; SVINGEN; KOOPMAN, 2013).

4.1 Morfofisiologia e desenvolvimento das células de Leydig

Em humanos, a diferenciação das gônadas masculinas inicia-se na sexta semana de gestação, com a diferenciação do epitélio celomático em cordões sexuais medulares e, posteriormente, em túbulos seminíferos, e do blastema gonadal em interstício. A diferenciação funcional da primeira geração de células de Leydig parece começar entre a sexta e a sétima semana de gestação, quando a testosterona pode ser detectada no testículo fetal humano, atingindo seu nível máximo entre a 12^a e 15^a semana (HABERT et al., 2001). Nesta fase do desenvolvimento, a testosterona secretada pelas células de Leydig é responsável pela masculinização do sistema urogenital masculino (LEJEUNE et al., 1998). Além disso, a conversão de testosterona em dihidrotestosterona, pela enzima 5 α -redutase, é essencial para a masculinização da genitália externa (HABERT et al., 2001) e para o desenvolvimento das glândulas sexuais acessórias (FLICKINGER, 1970; HAYWARD e CUNHA, 2000; RADMAYR et al., 2008).

São identificadas duas populações de células de Leydig: as células fetais de Leydig (CLFs) e as células de Leydig adultas, que diferem quanto à morfologia e função. No período embrionário, enquanto algumas das células mesenquimais do interstício testicular se diferenciam em células de Leydig fetais e em outros tipos celulares presentes no interstício testicular, outras mantêm suas características indiferenciadas e consistem em precursores para as células de Leydig adultas (CLA) (Figura 2) (GE et al., 1996; ARIYARATNE; MENDIS-HANDAGAMA, 2001).

Figura 2 - Linhagem da célula de Leydig. CLA, Células de Leydig adultas.



Fonte: (ARIYARATNE; MENDIS-HANDAGAMA, 2001)

A população de células de Leydig adultas se distribui em diferentes subpopulações que surgem, na fase pós-natal, desde a pré-puberdade até as fases de puberdade e adulta. A maturação pós-natal das células de Leydig adultas envolve a proliferação de células precursoras, a diferenciação das células precursoras em células progenitoras, de progenitoras em células de Leydig denominadas recém-formadas adultas, de células de Leydig recém-formadas adultas em células de Leydig adultas imaturas e, finalmente, a diferenciação destas últimas em células de Leydig adultas maduras (Figura 2) (ARIYARATNE; MENDIS-HANDAGAMA, 2001; CHEN et al., 2010).

A diferenciação das células precursoras em células progenitoras é a primeira etapa no processo de diferenciação das células de Leydig. Embora as células precursoras e progenitoras de células de Leydig sejam morfológicamente semelhantes, as células progenitoras expressam enzimas esteroidogênicas e são capazes de produzir andrógenos. Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas etapas da diferenciação das células progenitoras ainda não são totalmente conhecidos. Embora evidências confirmem que as células de Leydig progenitoras possuam receptores para LH, é incerto se estas células são responsivas ao LH no início de sua diferenciação (ARIYARATNE; MENDIS-HANDAGAMA, 2001).

A etapa seguinte no processo de diferenciação das células de Leydig envolve a conversão de células progenitoras em células de Leydig adultas recém-formadas, as quais apresentam características morfológicas distinguíveis, principalmente com relação a alteração na forma da célula, que se torna poligonal. Além disso, esta citodiferenciação é acompanhada pela migração das células das regiões peritubulares para a porção mais central do interstício. O conteúdo citoplasmático de células de Leydig adultas recém-formadas é escasso, com pouca ou nenhuma gotícula lipídica citoplasmática e, por conseguinte, o núcleo apresenta-se extenso e proeminente. Além disso, as células não contêm a enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 (11 β -HSD1) (ARIYARATNE; MENDIS-HANDAGAMA, 2001).

As células de Leydig adultas imaturas apresentam citoplasma amplo, contendo grande quantidade de gotículas lipídicas, o que acarreta aumento em seu tamanho. Em contraste com as células de Leydig adultas recém-formadas, toda a população de células adultas imaturas apresenta atividade das enzimas do citocromo P450 (P450_{SCC} e P450_{C17}) e das enzimas para o metabolismo de testosterona 3 β -hidroxiesteroide desoxidogenase (3 β -HSD) e 17 β -hidroxiesteroide desoxidogenase (17 β -HSD) (SHAN, 1993; ARIYARATNE; MENDIS-HANDAGAMA, 2001; HAIDER, 2004;).

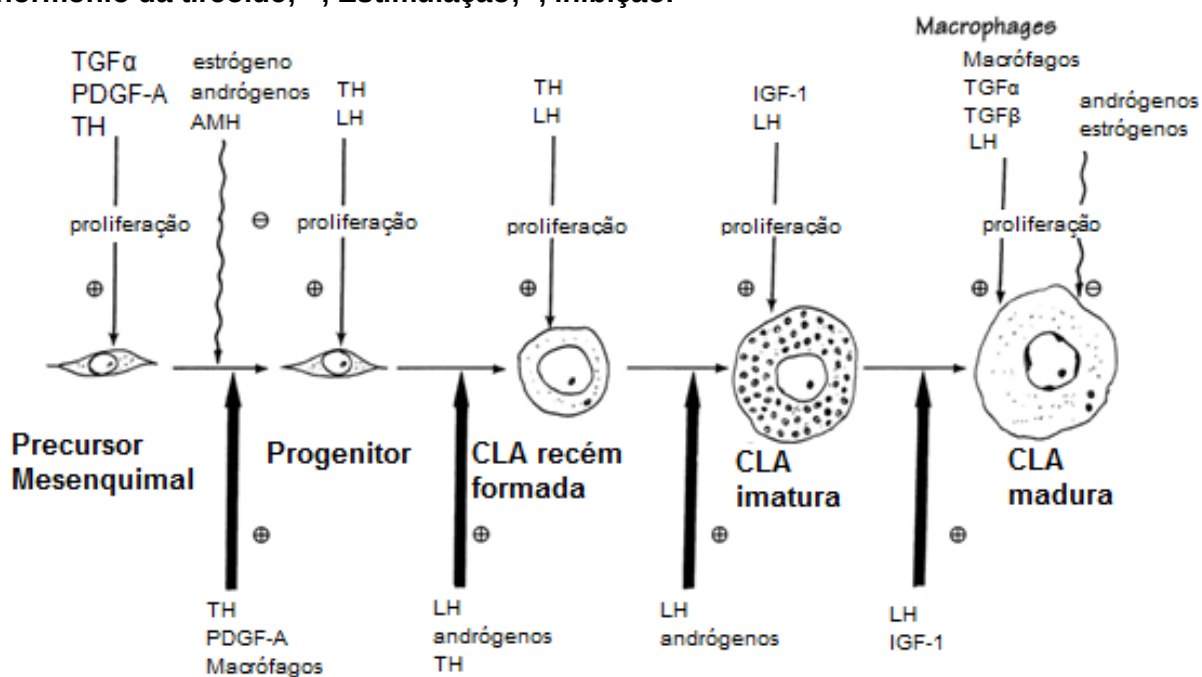
A diferenciação das células de Leydig adultas imaturas em maduras, que ocorre na puberdade, consiste na etapa final do processo e é caracterizada pelo aumento significativo no tamanho celular, as células adquirem morfologia arredondada e desaparecimento de gotículas lipídicas citoplasmáticas. Com o aumento gradual do volume das organelas, tais como o retículo endoplasmático liso e mitocondriais, essas células passam a apresentar maior atividade das enzimas esteroidogênicas, particularmente, da 17 β -HSD que catalisa a etapa final na biossíntese de testosterona, além de redução da atividade das enzimas que metabolizam a testosterona e aumento na expressão na resposta dos receptores ao hormônio LH, a ocorrência desse evento contribui para o aumento da atividade secretora de testosterona pelas células de Leydig, que define o início da puberdade (SHAN; HARDY, 1992; ARIYARATNE; MENDIS-HANDAGAMA, 2001).

O núcleo da célula de Leydig adulta madura é ovoide ou arredondado, posicionado excentricamente, a heterocromatina está geralmente localizada adjacente ao envoltório envelope nuclear, o nucléolo é grande e proeminente

(RUSSELL, 1996). O citoplasma é densamente preenchido por retículo endoplasmático liso (REL) e por mitocôndrias, as quais apresentam cristas tubulares e que estão em íntima associação com o REL, através de pequenos filamentos que se estendem de uma organela a outra (RUSSELL, 1996). Nas células que produzem esteroides, como o caso da célula de Leydig, há presença de muitos peroxissomos. Estes estão envolvidos na β -oxidação dos ácidos graxos e na biotransformação e metabolismo do colesterol (MENDIS-HANDAGAMA et al., 1990; MENDIS-HANDAGAMA, 1997).

Além de fatores testiculares locais, tais como, testosterona intratesticular e fatores mitogênicos produzidos pela célula de Sertoli, alguns fatores de crescimento são capazes de regular a proliferação, diferenciação e função endócrina da célula de Leydig, tais como as interleucinas 1α (IL- 1α) e 6 (IL-6), os fatores de crescimento "insulin-like" tipo 1 (IGF-1) e tipo 2 (IGF-2), os fatores de transformação do crescimento α (TGF- α) e β (TGF- β) e o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF-A) (Figura 3) (ARIYARATNE; MENDIS-HANDAGAMA, 2001).

Figura 3 - Representação esquemática resumindo a regulação da diferenciação da célula de Leydig adulta no testículo pós-natal. CLA, as células de Leydig adultas; TH, hormônio da tireoide; +, Estimulação; -, inibição.



Fonte: (ARIYARATNE; MENDIS-HANDAGAMA, 2001)

4.2 Esteroidogênese testicular

As células de Leydig (CL) tem como principal função a produção de andrógenos, tanto para a regulação parácrina da espermatogênese no testículo, quanto para que a ocorrência dos efeitos sistêmicos endócrinos, androgênicos e anabólicos extra testiculares. No período embrionário, as células de Leydig iniciam o processo de produção de andrógenos, o que é fundamental para que ocorra a masculinização do feto. Sua atividade endócrina testicular pode continuar por meses após o nascimento, seguido de inatividade hormonal até a puberdade. Neste período de inatividade, as células de Leydig degeneram ou diferenciam-se em células de Leydig adultas (CLA) durante a pré-puberdade, no caso dos roedores, ou na puberdade, em primatas, devido a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-testicular (TEERD; HUHTANIEMI, 2015).

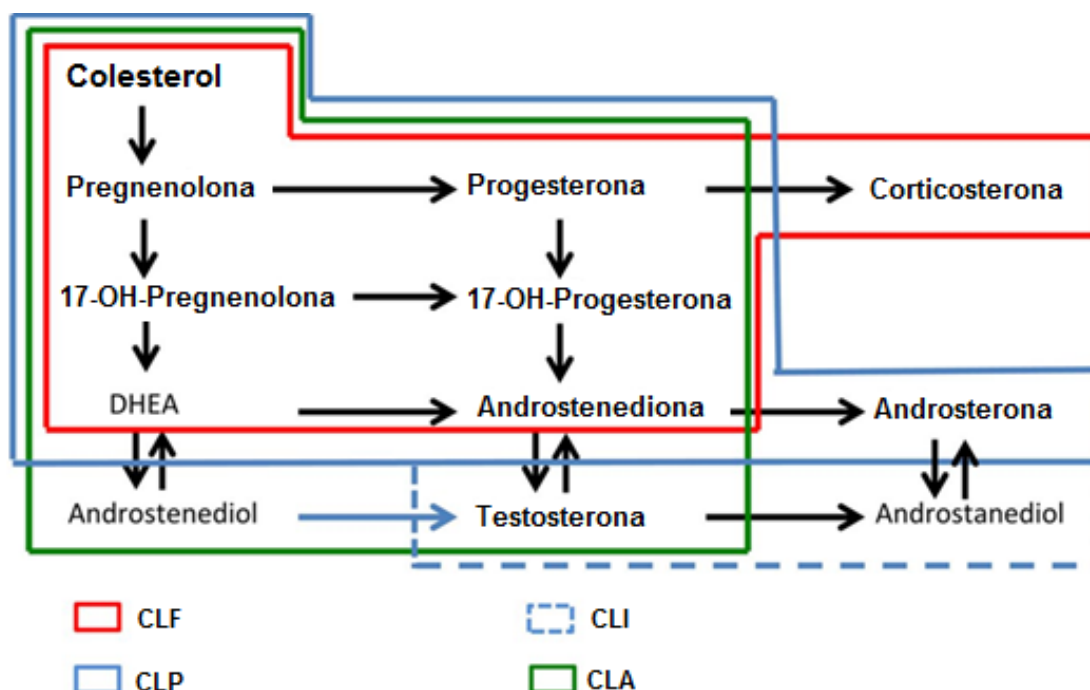
Sabe-se que as células de Leydig são capazes de produzir andrógenos 5α -reduzidos a partir da testosterona. Ademais, os metabólitos 5α -reduzidos DHT e 3β -androstanediol são os andrógenos predominantes no testículo durante a puberdade devido ao pico da atividade da enzima 5α -redutase nesta fase. Devido a maior potência de ação da dihidrotestosterona, a espermatogênese pode ocorrer normalmente, mesmo na ausência de altas doses de testosterona nos testículos, como ocorre no período da puberdade (STOCCO; MCPHAUL, 2006).

A esteroidogênese testicular fundamenta-se quase inteiramente na produção de andrógenos no compartimento intersticial do testículo. Os andrógenos são produzidos por cerca de 500 milhões de células de Leydig intersticiais, controladas a partir da liberação pulsátil do hormônio luteinizante (LH), que promove seus efeitos quando interage com seu receptor específico localizado na superfície de membrana das células de Leydig (STOCCO; MCPHAUL, 2006).

A testosterona é o andrógeno biologicamente mais importante sintetizado no testículo por meio de uma sequência de reações enzimáticas, que se iniciam quando o colesterol é convertido à pregnenolona, o primeiro esteroide produzido no

processo. A pregnenolona, após participar de algumas intermediações, é convertida em testosterona (Figura 4) (STOCCO; MCPHAUL, 2006).

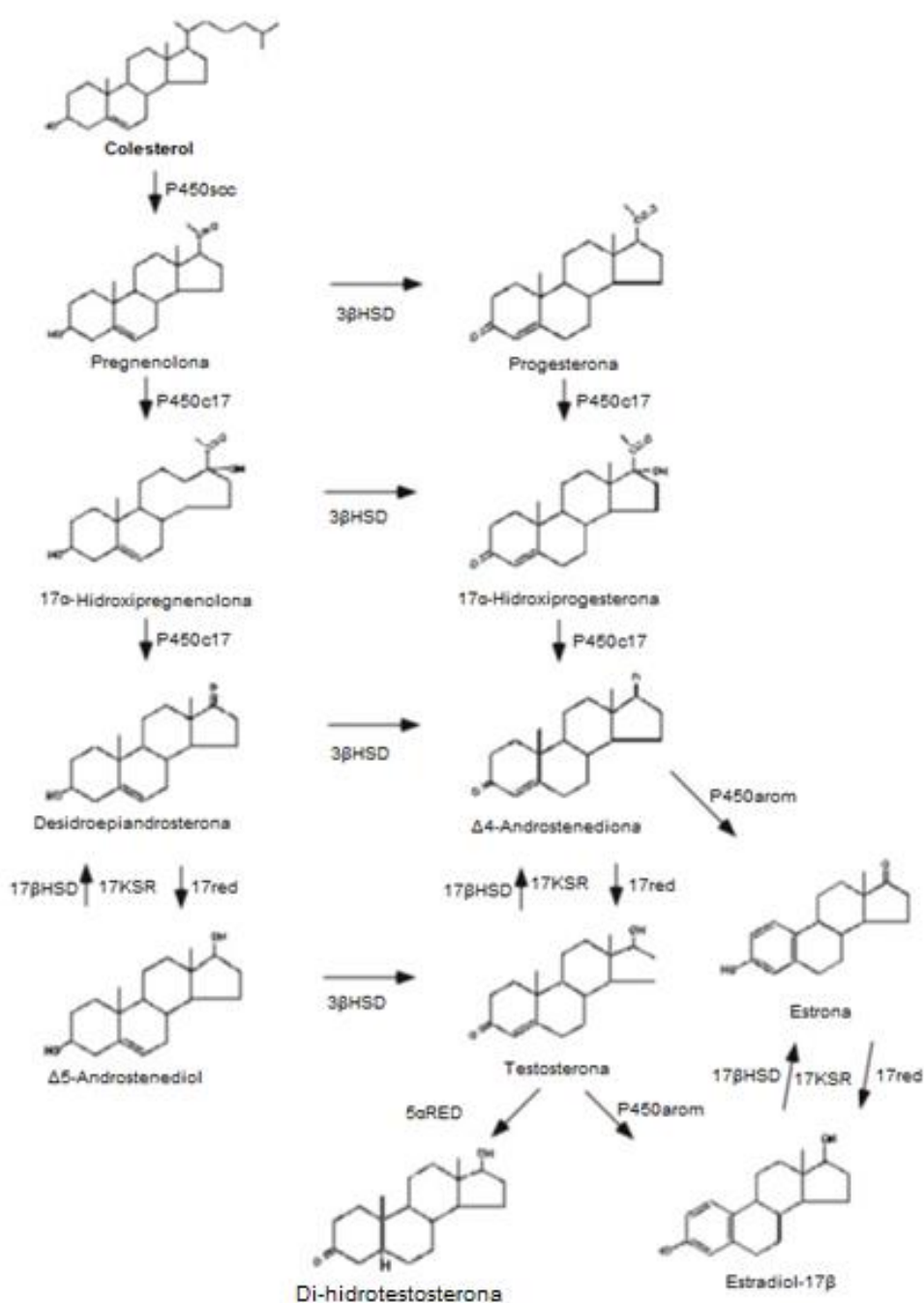
Figura 4 - Diferenças na cascata esteroidogênica entre células de Leydig fetais (CLF), células de Leydig progenitoras (CLP), células de Leydig imaturas (CLI) e células de Leydig adultas (CLA). A linha tracejada representa a diferença entre o CLP e CLI. As principais diferenças entre os diferentes tipos de CL estão nos produtos finais androgênicos e na capacidade de CLF para produzir glicocorticoides. DHEA: desidroepiandrosterona.



Fonte: (TEERDS, 2015)

As células de Leydig utilizam duas vias distintas, escolhidas de forma espécie-específica, para a síntese de androgênios. A via $\Delta 4$, após a conversão do colesterol em pregnenolona é seguida pela via pregnenolona $\rightarrow$ progesterona $\rightarrow$ androstenediona $\rightarrow$ testosterona, e é encontrada na maioria dos roedores, incluindo ratos e camundongos. Já a via $\Delta 5$, é seguida pela via colesterol $\rightarrow$ pregnenolona $\rightarrow$ 17 α -hidroxipregnenolona $\rightarrow$ desidroepiandrosterona $\rightarrow$ androstenediona $\rightarrow$ testosterona, estando presente em cachorros, coelhos, porcos, humanos e primatas. Níveis significativos de outros esteroides também podem ser produzidos a partir da metabolização da testosterona (Figura 5) (STOCCO; MCPHAUL, 2006).

Figura 5 - Biossíntese de esteroides nas células de Leydig, mostrando as etapas da conversão enzimática de colesterol em testosterona. A cadeia lateral do colesterol é clivada pela enzima citocromo P450_{scc}, sendo convertido em pregnenolona e, em sequência, é convertida a 17 α -hidroxipregnenolona e em desidroepiandrosterona, pela ação da enzima citocromo P450 17 α -hidroxilase/liase 17. A pregnenolona também pode ser convertida em progesterona por meio da ação da 3- β -hidroxiesteroide desidrogenase e, em seguida, para 17 α -hidroxiprogesterona e androstenediona pela enzima citocromo P450 17 α -hidroxilase/liase 17,20. Androstenediona é então convertida a testosterona através da ação da 17-cetoesteroide redutase. A testosterona também pode ser convertida em di-hidrotestosterona pela ação da enzima 5 α -redutase. De um modo geral, a enzima citocromo p450 é encontrada na mitocôndria e o restante das enzimas são encontrados no citoplasma de células esteroidogênicas. P450_{scc} (cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage), 3 β HSD, 3- β -hidroxiesteroide desidrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase; P450_{c17}, citocromo P450 17 α -hidroxilase/17,20 liase; 17KSR, 17-cetoesteroide redutase/17 β hidroxiesteroide desidrogenase; P450_{arom}, citocromo P450 aromatase; 5 α RED, 5 α redutase.



Fonte: (STOCCO; MCPHAUL, 2006)

As células esteroidogênicas podem fazer uso de quatro fontes de colesterol para a realização do processo de esteroidogênese: I) síntese “de novo” no RE; II) colesterol armazenados em gotículas de lipídios, na forma de ésteres de colesterol; III) captação do HDL circulante por meio do receptor B1 (SR-B1); e IV) absorção de LDL por meio de endocitose mediada por receptores. Ainda que as células esteroidogênicas sejam capazes de realizar síntese “de novo” de colesterol no RE, sua alta demanda no processo esteroidogênico determina a importação eficiente do

colesterol encontrado nas lipoproteínas circulantes, principalmente derivados de fontes dietéticas. Para isso, é necessário que haja controle na absorção celular, transporte e utilização de colesterol. A HMG-CoA redutase, fundamental para a síntese de colesterol, requer concentrações adequadas de LDL para o seu funcionamento adequado. A LDL se associa ao colesterol, que é absorvido por meio do reconhecimento dos receptores para LDL, encontrados na superfície das células. Assim, é providenciada a fonte primária de esterol intracelular na maioria dos mamíferos (STOCCO; MCPHAUL, 2006).

Ésteres de colesterol e LDL são reconhecidos e se ligam a receptores específicos na membrana plasmática das células de Leydig, onde são internalizados por endocitose. As vesículas endocíticas formadas se fundem com os lisossomos, causando a hidrólise da porção proteica da LDL em aminoácidos livres e subsequentemente armazenados ou diretamente convertidos em colesterol livre e usados para a síntese de hormônios esteroides; já os ésteres de colesterol são hidrolisados a colesterol livre por meio da lipase ácida lisossomal (LAL). O colesterol uniesterificado pode ser usado como substrato para a esteroidogênese ou pode ser reesterificado para o armazenamento em gotículas lipídicas pela acil-CoA. (MILLER; BOSE, 2011).

Os ésteres de colesterol HDL, em contraste com a via de endocitose dos receptores de LDL, são capazes de penetrar a célula pela via SR-B1, além de sofrerem a ação da enzima lipase hormônio-sensível (LHS). A LHS é amplamente expressa, especialmente nos tecidos adiposos, mobilizando os depósitos de gordura devido a hidrólise de triglicérides e de fosfolipídios. A LHS testicular possui atividade divergente à presente no tecido adiposo em relação a estrutura e a regulação durante o desenvolvimento. Existe uma ação conjunta da ACAT, LHS, e LAL encontrando uma constância para ajustar a distribuição relativa de colesterol em suas formas livre e esterificada (MILLER; BOSE, 2011).

4.3 Tumores testiculares: epidemiologia e classificação

O câncer de testículo é a neoplasia maligna com maior frequência em pacientes do sexo masculino na faixa etária entre 18 e 35 anos. Os tumores testiculares são classificados em germinativos e não germinativos. Os tumores germinativos, que incluem os seminomas, os não-seminomas (carcinoma embrionário, teratoma, coriocarcinoma, tumores do saco vitelino) e os tumores

mistos, correspondem a 90% das neoplasias testiculares e a 0,5% das neoplasias do sexo masculino, tendo maior incidência em homens brancos (SOUZA et al., 2005; MARTÍN et al., 2007).

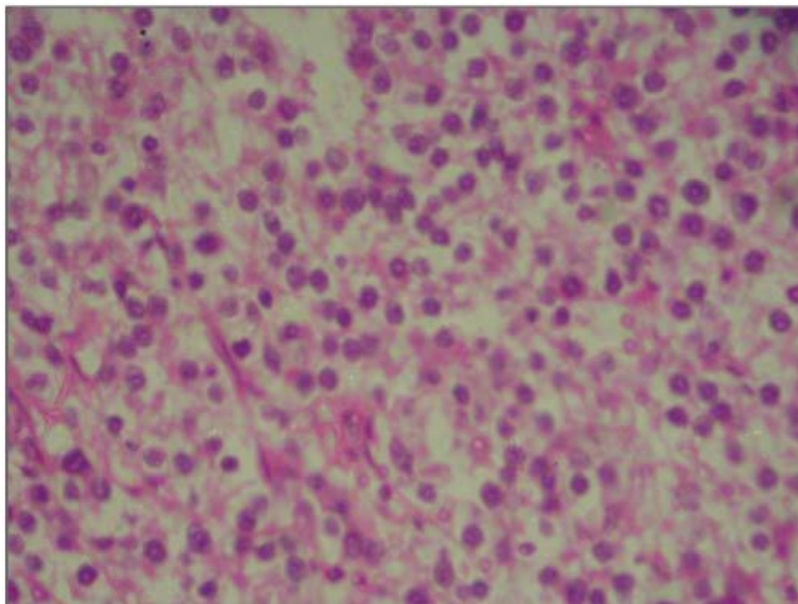
Dentre os fatores de risco mais comuns para o surgimento de uma neoplasia testicular, destacam-se a criptorquidia e a história familiar (SOUZA et al., 2005; MARTÍN et al., 2007). A possibilidade de se considerar microlitíase testicular como um fator de risco, bem como uma lesão pré-tumoral ainda não foi totalmente comprovada, porém é recomendado o controle semestral ou anual em casos da presença de testículo com microlitíase associado a neoplasia tratada no testículo contralateral (SOUZA et al., 2005). Tal fato se dá devido a heterogeneidade do intervalo de tempo entre o diagnóstico de microlitíase e o aparecimento de tumores testiculares, podendo variar de seis meses e dez anos (COELHO et al., 2005).

Na maioria dos casos, a microlitíase não apresenta sinais clínicos e o diagnóstico é feito por meio de ultrassonografia, onde podem ser visualizadas múltiplas microcalcificações de 1 a 2 mm de diâmetro, distribuídas aleatoriamente por todo o testículo. Sua incidência é mínima, variando de 0,6 a 6,7%, e pode ter surgimento de forma isolada em casos raros, contudo a porcentagem de casos associados a tumores testiculares é de 30 a 40% (COELHO et al., 2005).

Dentre os tumores germinativos, o seminoma é o tipo mais frequente entre a população adulta, correspondendo a 45 a 50% dos casos, enquanto na população infantil, o tumor germinativo mais comum é o tumor do saco vitelino, ocorrendo em 80% dos casos (DIAS NETO et al., 2002).

Morfologicamente, o seminoma é caracterizado pela presença de células semelhantes às células germinativas primitivas associadas a infiltrado linfocitário (Figura 6), e são divididos em três subtipos: o clássico, presente em 85% dos casos, o anaplásico, compreendendo de 5% a 10% dos casos, e o espermatocítico, com incidência de 4% a 6%. O seminoma anaplásico é o tipo que apresenta o pior prognóstico devido à baixa sensibilidade ao tratamento radioterápico (SOUZA et al., 2005).

Figura 6 - Seminoma clássico. HE, 400x. Células neoplásicas isoladas com núcleos redondos, nucléolo evidente e citoplasma claro.



Fonte: (SOUZA et al., 2005)

O tumor germinativo não seminomatoso mais frequente é o carcinoma embrionário, originado a partir da linhagem de células totipotentes, das quais podem derivar várias linhagens neoplásicas simultâneas (SOUZA et al., 2005).

Em contrapartida, a classe de tumores não germinativos, compreendendo os tumores de células de Sertoli, tumores de células de Leydig, gonadoblastomas e tumores mistos, possui uma ocorrência mais rara, correspondendo a apenas 2 a 3% das neoplasias testiculares, os fatores de risco relacionados a estes tipos de tumores incluem os genéticos, os congênitos, como a criptorquidia anteriormente citada, os hormonais e os adquiridos, tais como a atrofia e trauma testicular (DIAS NETO et al., 2002; SOARES et al., 2003).

4.4. Tumores de células de Leydig

A variante mais frequente de tumores não germinativos do testículo é o tumor que acomete as células de Leydig e, apesar de apresentarem-se raros, correspondem a cerca de 1-3% das neoplasias testiculares gerais (SOARES et al., 2003;). Ambos os testículos são acometidos pelo tumor em uma mesma frequência, sendo bilateral em 3% dos casos. As maiores incidências de tumores de células de Leydig ocorrem na infância, resultando em 20% a 25% dos casos, ou em adultos da quarta e quinta década de vida. No entanto, é possível que os homens sejam

afetados por este tipo de neoplasia durante qualquer faixa etária (SOARES et al., 2003).

O quadro clínico é evidenciado por uma massa testicular acompanhada ou precedida por manifestações hormonais em 20% dos casos, caracterizando-se pela masculinização infantil, conhecida como síndrome de pseudopuberdade precoce, em que ocorre o aumento do volume dos órgãos genitais externos, pilosidade púbica, axilar e facial; e feminização no adulto causando ginecomastia, diminuição da libido, disfunção erétil e infertilidade (SOARES et al., 2003).

A distinção entre as formas benignas e malignas dos tumores de células de Leydig é realizada pela verificação da ausência ou da presença de metástases, as quais surgem, por ordem de frequência, nos gânglios retroperitoneais, pulmão, fígado e osso. Além disso, existem critérios anatomopatológicos que indicam possível malignidade, compreendendo a existência de tumor com dimensão superior a 5 centímetros, pleomorfismo celular e índice mitótico elevado, invasão capsular, vascular e do cordão espermático, aneuploidia e elevada imunoreatividade para o antígeno nuclear de proliferação celular. Pacientes com tumores classificados como malignos seguem com mau prognóstico, com uma sobrevida média de 2 anos, uma vez que não apresentam resposta positiva à radioterapia e à quimioterapia; ao contrário de pacientes com tumores benignos, que tendem a se encaminhar com um prognóstico favorável (SOARES et al., 2003).

Os tumores são constituídos predominantemente ou totalmente por células de Leydig, que possuem aspecto grande e poliédrica, citoplasma granular eosinofílico, podendo ser vacuolizado e conter pigmentos de lipofuscina. Seu núcleo, redondo e monomórfico, contém um pequeno nucléolo e exibe atipias leves e raras figuras de mitose. Frequentemente são encontrados cristais de Reinke, que podem variar em número e em tamanho (Figura 7) (FILHO et al., 2007).

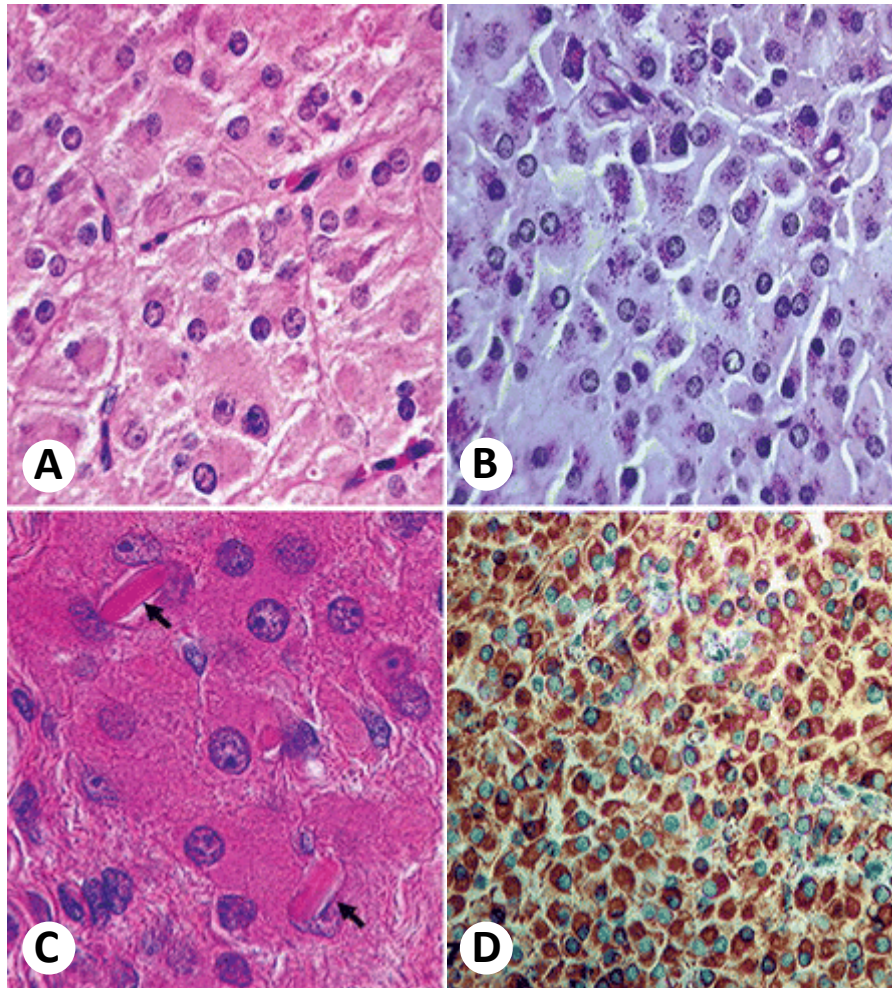
Figura 7 - (A) Corte histológico do tumor das células de Leydig. As células tumorais possuem um citoplasma abundante, eosinofílico e finamente granular, com núcleos redondos regulares, alguns com nucléolos únicos ou múltiplos visíveis. Os núcleos são centrais ou excêntricos. Observa-se os limites celulares e os septos fibrovasculares entre as células tumorais. As porções claras do citoplasma evidenciam a presença de lipídeos (hematoxilina-eosina, aumento total x400).

(B) Os grânulos de lipofuscina citoplasmáticos são bem evidenciados nas células tumorais, sendo uma das principais características morfológicas para o diagnóstico de tumor de células de Leydig (PAS; aumento total x400).

(C) Cristais de Reinke intracitoplasmáticos presentes em células de Leydig tumorais. Os cristais aparecem como estruturas refráteis, cilíndricos, retangulares ou

romboides dispostas de uma forma linear (setas). A identificação de cristais de Reinke é muito útil para a distinção entre tumor das células de Leydig e outras lesões semelhantes (hematoxilina-eosina, aumento total x800).

(D) Marcação imunopositiva citoplasmática para a β -inibina, a qual consiste em marcador sensível e específico para distinguir entre tumores de células de Leydig dos tumores de células germinativas (reação imuohistoquímica para marcação da proteína β -inibina, aumento total x400).



Fonte: (AL-AGHA; AXIOTIS, 2007)

Os mecanismos que acarretam tumores de células de Leydig ainda são pouco conhecidos. Um dos possíveis fatores inclui alterações no eixo hipotálamo-hipófise-testículo, acarretando uma excessiva estimulação nas células de Leydig devido aos altos níveis de LH. Desta forma, danos estruturais nos receptores de LH e nas proteínas G acopladas a estes receptores podem estar envolvidos na indução da tumorigênese das células de Leydig. Os receptores de LH (LHR) são acoplados à proteína G e possuem em sua estrutura sete domínios transmembrânicos, tendo como função mediar a transdução de sinal por meio da ativação de proteínas G heterotriméricas. No decorrer da embriogênese do sexo masculino, a atuação da

gonadotrofina coriônica humana (hCG) sobre o LHR culmina com a produção de testosterona e, sendo assim, é responsável pela virilização do trato genital. Durante a puberdade, o LHR medeia a ação de LH na síntese de testosterona pelas células de Leydig (BOOT, 2011).

Mutações que causam inativação do gene LHR podem acarretar hipoplasia das células de Leydig, ocasionando distúrbios do desenvolvimento sexual e ocorrência de puberdade precoce limitada aos indivíduos do sexo masculino independente de gonadotrofinas. A alteração se caracteriza como sendo um distúrbio autossômico dominante, uma vez que a hiperplasia de células de Leydig imprópria ocorre em resposta à uma ativação constitutiva do LHR. As mutações ativadoras acontecem principalmente no sexto domínio transmembrânico da LHR, em que diversas substituições de resíduo de ácido aspártico na posição 578 foram relatados: D578G-LHR, D578YLHR e LHR-D578H (BOOT, 2011).

As células de Leydig são responsáveis pela síntese dos andrógenos, que irão estar acoplados ao receptor de andrógeno (RA), pertencente à família de receptores nucleares, e assim desencadear os eventos celulares imprescindíveis para o início da espermatogênese (MESQUITA, 2009). O complexo RA, quando deslocado para o núcleo, reconhece uma sequência específica do DNA e dos elementos androgênicos responsivos (ARE - *androgen response elements*). Sendo assim, haverá o recrutamento de coativadores, auxiliando o início da transcrição de genes regulados por andrógenos (MARIS et al., 2015).

O RA é capaz de induzir a expressão gênica e promover a progressão do ciclo celular (MESQUITA, 2009). As mutações no gene RA são causadoras da síndrome de insensibilidade androgênica e, como resultado do desequilíbrio hormonal, está associada a um maior risco de desenvolvimento de tumores testiculares. A realização de estudo imunohistoquímico em testículos de pacientes portadores da síndrome da sensibilidade ao andrógeno demonstraram aumento da expressão de citocromo P450 aromatase como sendo uma das alterações moleculares responsáveis pelo aumento do risco de tumor de células de Leydig (MARIS et al., 2015).

Alterações no gene RA também podem ocasionar desenvolvimento sexual masculino anormal, uma vez que os andrógenos participam ativamente no desenvolvimento e nas respostas fisiológicas que levam ao início e manutenção do processo espermatogênico e à diferenciação sexual masculina tanto no período

fetal, quanto pós-natal. Desta forma, um dos fatores que pode levar à infertilidade masculina pode estar relacionado a mutações no gene RA (MESQUITA, 2009).

O prognóstico dos pacientes diagnosticados com neoplasia de célula de Leydig é normalmente favorável, uma vez que o tumor possui crescimento lento e propicia o diagnóstico ainda nos estágios iniciais da doença (FILHO et al., 2007).

4.5. Tratamento dos tumores de células de Leydig e infertilidade

Apesar da incidência do câncer de células de Leydig ser considerada baixa, houve um aumento significativo de casos envolvendo este tipo de tumor, o qual dobrou o número de casos descritos desde 1936. Levando em consideração este aumento, também ocorreu considerável melhora de 90% nas taxas de sobrevida devido ao desenvolvimento de tratamentos mais eficientes (DIAS NETO et al., 2002).

Existem diversos métodos de tratamento para os indivíduos portadores de cânceres testiculares, dentre eles os tumores de células de Leydig, sendo possível a intervenção cirúrgica, por meio de orquidectomia uni ou bilateral; a radioterapia, bem como o tratamento utilizando quimioterápicos citotóxicos, considerado o mais bem-sucedido no que se diz respeito às altas taxas de sobrevivência. Embora os tratamentos utilizando quimioterapia e radioterapia constituam um importante avanço da medicina na área de oncologia e tragam esperança para muitos pacientes, paralelamente a estas conquistas terapêuticas, vem crescendo a preocupação dos médicos e cientistas em relação aos efeitos colaterais causados por estas terapias, já que elas não apresentam seletividade para os tecidos tumorais (OLIVEIRA; OSELAME; NEVES, 2014).

Tanto os tumores testiculares quanto suas diferentes modalidades de tratamento, possuem um grande impacto deletério sobre a reprodução humana, podendo submeter o paciente a um estado de esterilidade transitório ou, em casos mais raros, esterilidade permanente (PASQUALOTTO; PASQUALOTTO, 2007). A prevenção da toxicidade gonadal tornou-se um dos alvos de interesse nesta área pois células da linhagem germinativa estão em constantes processos de meiose e mitose e, portanto, são mais vulneráveis à quimioterapia e à radioterapia, além do fato de que muitos pacientes tratados são crianças, adolescentes ou adultos em

idade fértil, ainda sem um planejamento familiar definido (RUSSELL & RUSSELL, 1991; OLIVEIRA; OSELAME; NEVES, 2014).

Evidências sugerem que o processo da doença em si influencia a espermatogênese. Ainda, nos casos da existência de tumores testiculares, a alteração do processo espermatogênico observada antes do início do tratamento não possui relação com o estágio inicial da doença nem com a extensão ou gravidade dos sintomas conferidos pela neoplasia (GONÇALVES, 2010). Portanto, na maioria dos pacientes que apresentam câncer nos testículos, a redução da qualidade espermática ocorre antes da introdução de qualquer forma de tratamento e posteriormente, observa-se uma deterioração na espermatogênese devido aos danos, quer sejam temporários ou permanentes, acarretados pelos agentes quimiotáxicos. O efeito negativo do câncer sobre a fertilidade pode estar relacionado à mecanismos locais, tais como a destruição tecidual direta, ou a mecanismos sistêmicos, como a liberação de citocinas e de outros fatores imunológicos (PASQUALOTTO; PASQUALOTTO, 2007; TROTTMANN et al., 2007).

Com relação aos tratamentos quimioterápicos e/ou radioterápicos, estes podem causar danos sobre o sistema reprodutor masculino. Dentre eles, pode-se destacar as disfunções endócrinas, como a redução dos níveis de testosterona e, conseqüente redução na produção de espermatozoides, e as alterações do epitélio seminífero, as quais dependem do tipo, da dose e da duração do tratamento, além da localização do tumor. Estes danos podem resultar em comprometimento da fertilidade e, em casos mais graves, ausência total de espermatozoides no ejaculado (OLIVEIRA; OSELAME; NEVES, 2014).

A ação deletéria dos agentes antineoplásicos depende de seu mecanismo de ação em diferentes etapas da síntese do DNA, transcrição e tradução (ALMEIDA et al., 2005). Além disso, estas drogas podem alcançar facilmente as células de Leydig, de Sertoli e espermatogônias, bem como atravessar livremente a barreira hematotesticular, causando danos nas células germinativas em estágio final de maturação (TROTTMANN et al., 2007).

Os agentes alquilantes amplamente utilizados em oncologia, como por exemplo a cisplatina e a carboplatina, interferem no DNA por meio da alquilação e são responsáveis pelas ações deletérias mais graves sobre as gônadas masculinas (OLIVEIRA; OSELAME; NEVES, 2014). Sua ação citotóxica deve-se às ligações cruzadas às fitas complementares de DNA (ROBERTS & PASCOE, 1972). Essas

interações cruzadas ocorrem inter e intra-fita, com acoplamento mono e bifuncional com as bases, principalmente as purinas (EVANS et al., 1982).

Dentre os vários efeitos adversos da terapia com agentes quimioterápicos alquilantes destaca-se a nefrotoxicidade (GONZALES-VITALE et al., 1977), a ototoxicidade (KOVACH et al., 1973), a degeneração axonal e desmielinização dos neurônios periféricos (REINSTEIN et al., 1980) e a ação deletéria sobre a fisiologia testicular (AYDINER et al., 1997). Os efeitos citotóxicos severos sobre os testículos podem ser evidenciados pela depleção de células da linhagem germinativa e aumento da frequência de células apoptóticas no epitélio seminífero (MEISTRICH et al., 1982; LIRDI et al., 2008; MALARVIZHI & MATHUR, 1995; AYDINER et al., 1997; VAWDA & DAVIES, 1986; HANDELSMAN et al., 1988; HUANG et al., 1990; KINKEAD et al., 1992; ZHANG et al., 2001). As espermatogônias constituem as células da linhagem germinativas mais sensíveis à ação dos fármacos citostáticos pois apresentam intensa capacidade proliferativa. Por outro lado, as espermátides são mais resistentes aos efeitos citotóxicos destes agentes (GONÇALVES, 2010).

Além disso, os compostos derivados da platina podem inibir a secreção de testosterona pelas células de Leydig (VAWDA, 1994; MALARVIZHI & MATHUR, 1995), de modo que mudanças nos níveis hormonais podem estar relacionadas a danos sobre a célula de Leydig e, conseqüentemente, à depleção de células germinativas (HUANG et al., 1990) e azoospermia (GONÇALVES, 2010).

No entanto, estudos realizados em pacientes acometidos por diferentes tipos de neoplasias testiculares e tratados com quimioterapia, apresentam conclusões limitadas quanto a função das células de Leydig devido ao pequeno número casos analisados (GERL et al., 2000).

O tratamento quimioterápico é capaz de alterar os níveis dos hormônios sexuais, uma vez que pode acarretar elevação nos níveis séricos de FSH e de LH, sugerindo a indução de uma disfunção endócrina. Este aumento ocorre, provavelmente, para compensar a redução do *feedback* negativo exercido pela testosterona sobre o eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, consequência de uma menor produção deste hormônio pelas células de Leydig. No entanto, mesmo em níveis elevados, o LH e o FSH são capazes de manter os níveis séricos normais de testosterona (GONÇALVES, 2010).

Geralmente um ano após o término do tratamento quimioterápico, aproximadamente 50% dos pacientes apresentam reestabelecimento da

concentração espermática, percentagem que, ao fim de cinco anos, ultrapassa 80%. Tal recuperação, bem como sua extensão e velocidade de melhora dependem do agente quimioterápico utilizado, da dose administrada e da função testicular anterior ao tratamento (GONÇALVES, 2010). Em casos de tumores testiculares, estima-se em um período de cinco anos, a recuperação da espermatogênese possa ser alcançada completamente. No entanto, após a quimioterapia, cerca de 15 a 30% dos indivíduos apresentam infertilidade permanente (OLIVEIRA; OSELAME; NEVES, 2014).

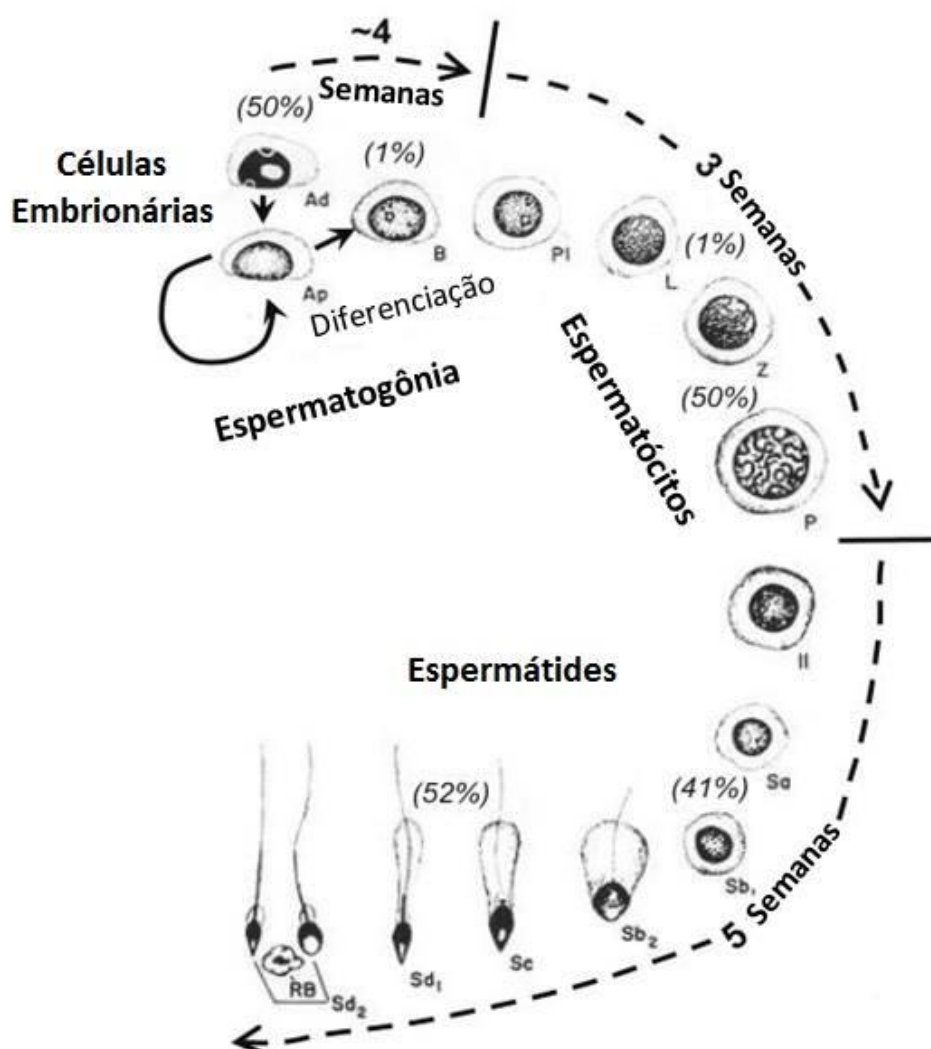
O desenvolvimento biotecnológico tem propiciado ampla utilização das radiações ionizantes, tanto na área industrial como na área médica. É também de amplo conhecimento que o emprego adequado das radiações ionizantes apresenta grande valor no diagnóstico clínico e, na radioterapia, para tratamento de neoplasias malignas. No entanto, as radiações ionizantes podem interagir diretamente com componentes celulares tais como o DNA, as proteínas e os lipídios, provocando alterações estruturais nestas células (ROOTS; OKADA 1975; MICHAELS; HUNT 1978).

A radiação gama é uma das terapias mais utilizadas no tratamento de uma grande variedade de neoplasias malignas (CURRY et. al. 2006). Pacientes em idade reprodutiva, submetidos ao tratamento de radioterapia, apresentam frequentemente, alterações da espermatogênese, resultando em redução acentuada de parâmetros testiculares e seminais e, finalmente, conduzindo a longos períodos de infertilidade ou à esterilidade permanente (KATO et. al. 2001).

Alguns estudos experimentais demonstraram que espermatogônias diferenciadas são os alvos primários da radiação gama, resultando em progressiva depleção de células da linhagem germinativa, principalmente de espermatócitos em fase de leptóteno e de paquíteno e de espermátides (Figura 8). (MEISTRICH, 2013). Além disso, foi demonstrado que os testículos de ratos imaturos, nas fases iniciais da pré-puberdade, apresentam uma acentuada radiosensibilidade, fato que pode conduzir à ocorrência de alterações tanto nas células de Sertoli como nas células de Leydig (ERICKSON; BLEND 1976; KANGASNIEMI et. al. 1996; MULLER 2003; LEE; SHIN, 2013). Além dos efeitos diretos sobre as células germinativas, podem também ocorrer alterações do eixo hipotálamo-hipófise-gônada, caracterizadas por redução nos níveis séricos de FSH e aumento dos níveis séricos de LH, assim como alteração na produção de hormônios esteroides e redução nos

níveis de ABP, IL-1 e inibina (MAITI et. al. 2001; MULLER 2003; DOHLE, 2010; MEISTRICH, 2013).

Figura 8 - Sequência, cinética e a sobrevivência de células da linhagem germinativa após a irradiação, em testículos humanos. As setas indicam o tempo necessário para a diferenciação das células em diferentes etapas do ciclo espermatogênico. Os números entre parênteses mostram contagens de células remanescentes no epitélio seminífero, baseadas em observações histológicas, após 2 semanas de irradiação com 1Gy, apresentando vasta morte e depleção de células germinativas em diferentes etapas do processo espermatogênico.

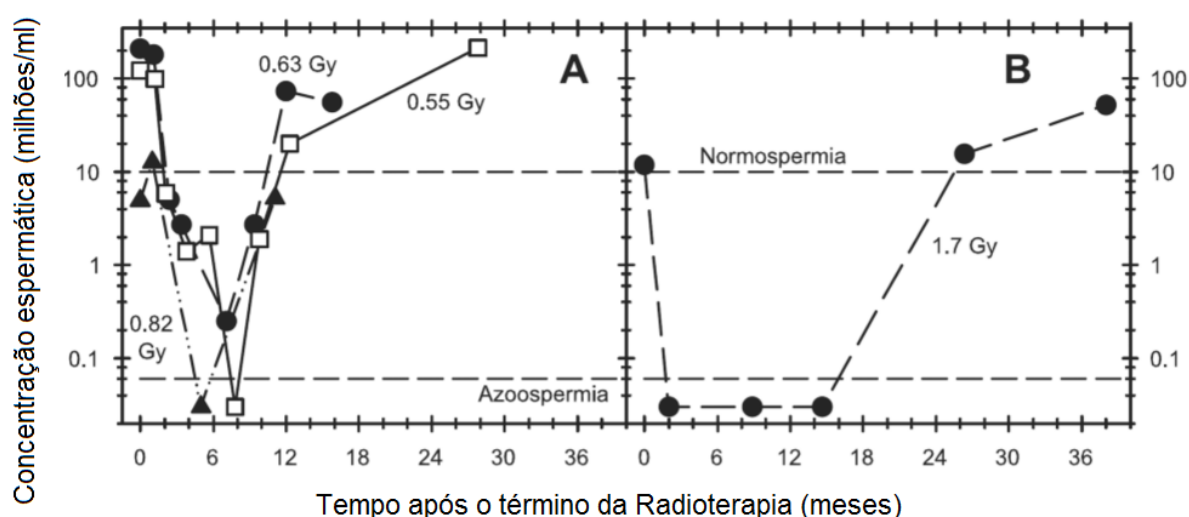


Fonte: (MEISTRICH, 2013)

A recuperação na produção de espermatozoides após doses moderadas de radiação 0,5 a 0,8 Gy, em que muitas células tronco espermatogênicas são degeneradas, não ocorre antes de 9 meses após o término do tratamento. Com irradiação em altas doses (1,7Gy), a recuperação não se inicia antes da 14 a 26 meses, sendo observada azoospermia mesmo havendo espermatogônias tronco

sobreviventes, como evidenciado pela subsequente recuperação do epitélio seminífero (Figura 9). Estas observações sugerem que espermatogônias do tipo A somente reiniciam sua diferenciação após a recuperação de toda população de células tronco espermatogênicas. Em roedores, evidências sugerem que a radiação possa acarretar danos ou alterações nas vias de sinalização de células de Sertoli, limitando a diferenciação das espermatogônias (MEISTRICH, 2013).

Figura 9 - Recuperação na produção de espermatozoides em pacientes tratados com radioterapia hemi-pélvica para seminoma (A), ou radioterapia pélvica para doença de Hodgkin (B). As doses estão indicadas em cada caso.



Fonte: (MEISTRICH, 2013)

A identificação e compreensão de várias vias de sinalização celulares, envolvidas na transdução de sinais desencadeados pela ativação de receptores por seus ligantes nas células tumorais, tornou possível o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos do câncer, comumente conhecidas como terapias alvo dirigidas aos ligantes (fatores de crescimento), aos seus receptores ou às moléculas envolvidas nas suas vias de sinalização intracelular (LEITE et al., 2012). Além disso, a hormonioterapia, que utiliza moduladores que inibem a ação de hormônios que agem na proliferação e na diferenciação celular, e a imunoterapia, por meio do uso de anticorpos monoclonais (Mabs), vem ganhando espaço no tratamento das diferentes formas de tumores. Dentre estas novas terapias, destacam-se os inibidores de receptores do fator de crescimento de tirosina-quinase, que agem como agentes antiangiogênicos devido a ligação ao VEGF ou bloqueio de seu

receptor mTOR, os inibidores de histona deacetilase (HDAC), os retinoides, os inibidores de proteassomos, os agentes imunomoduladores (supressores ou estimulantes) e os anticorpos monoclonais específicos para tumores (MEISTRICH, 2013).

O imatinib (Gleevec®), uma tirosina quinase utilizada com grande êxito para promover inibição tanto do oncogene Bcr-Abl quanto de receptores KIT e PDGF, está sendo amplamente estudado devido a sua ação sobre o sistema reprodutor masculino. Efeitos sobre a espermatogênese poderiam ser esperados, pois o PDGFR é fundamental na migração do gonócito e desenvolvimento das células de Leydig, uma vez que o receptor KIT tem um papel importante sobre a diferenciação de espermatogônias e sobre a função da célula de Leydig. Entretanto, o tratamento de roedores adultos com imatinib mostram apenas efeitos modestos ou nenhum efeito tanto sobre a espermatogênese quanto sobre a fertilidade masculina. Isso mostrou-se similar para seres humanos, embora possa haver alguns efeitos maiores sobre a espermatogênese neste caso (MEISTRICH, 2013).

Geralmente, o tratamento crônico com interferon-alfa em pacientes oncológicos adultos, do sexo masculino, não afeta a contagem de espermatozoides, os níveis hormonais ou a função sexual, ainda que o tratamento agudo produza uma queda transitória dos níveis de testosterona e que haja relato de azoospermia após o tratamento com interferon (MEISTRICH, 2013).

A fim de preservar a capacidade reprodutiva dos pacientes submetidos às terapias gonadotóxicas, geralmente é realizada a criopreservação do sêmen, que deve ser realizada antes do início do tratamento e, se possível, múltiplas amostras devem ser preservadas, para serem utilizadas futuramente em técnicas de reprodução assistida (GONÇALVES, 2010).

Embora a criopreservação do sêmen deva ser aconselhada aos pacientes, ela não é eficaz em todos os casos. Cerca de 11% dos pacientes apresentam astenozoospermia ou oligospermia. Já em pacientes pré-púberes, a técnica torna-se inviável devido à imaturidade gonadal, o que faz com estudos busquem métodos de criopreservação de tecido testicular. Dos pacientes que optam pelo método de criopreservação do sêmen, apenas 10% recorrem aos espermatozoides criopreservados, seja porque conseguem procriar por meios naturais, por meio de reprodução assistida utilizando o seu ejaculado oligozoospermico, ou pela opção de não procriar após o tratamento (GONÇALVES, 2010).

O sêmen criopreservado é utilizado em menos de 10-15% dos casos e possui grande variação entre os estudos realizados até o momento. Durante os últimos anos, as novas técnicas de reprodução assistida têm aumentado a possibilidade de pacientes com câncer se tornarem pais, pelo uso do banco de sêmen (DOHLE, 2010).

No entanto, estudos realizados em humanos apontam que há um risco acrescido dos citostáticos ocasionarem mutações nos espermatozoides em até algumas semanas após o término da quimioterapia (GONÇALVES, 2010). Essas mutações podem aumentar o risco de ocorrência de malformações congênitas, retardo do crescimento e o surgimento de tumores nos descendentes (DOHLE, 2010).

Novas técnicas de preservação da fertilidade são capazes de utilizar células tronco espermatogênicas, coletadas previamente ao tratamento oncológico, a partir do tecido testicular. Outras opções tais como a maturação *in vitro* de células tronco embrionárias em espermatogônias estão sendo investigadas e ainda é incerto se essas técnicas serão bem-sucedidas em seres humanos (DOHLE, 2010).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos tumores das células de Leydig apresentarem-se raros, correspondendo a cerca de 1-3% das neoplasias testiculares, quando progridem à malignidade não são responsivos à radioterapia e à quimioterapia, evoluindo a um mau prognóstico. Tanto os tumores testiculares quanto as diferentes modalidades de tratamento, ainda bastante utilizadas, apresentam significantes limitações e inconvenientes, ocasionando efeitos nocivos sobre a fertilidade e danos reprodutivos contingentes ou perduráveis. Para tanto, possíveis alternativas são as terapias biológicas específicas, que vêm sendo amplamente estudadas e, frequentemente, envolvem inibidores de pequenas moléculas ou anticorpos monoclonais. No entanto, sua eficácia em seres humanos ainda é questionada e necessitam de maiores investigações. Além disso, é de extrema necessidade que sejam realizados estudos que direcionem as pesquisas, no sentido de definir tratamentos preventivos ou estratégias globais para a prevenção da função gonádica, sem que haja prejuízo da eficácia dos tratamentos empregados, bem como das taxas de cura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-AGHA, Osama M.; AXIOTIS, Constantine A. An in-depth look at Leydig cell tumor of the testis. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**. p. 311–317, 2007.

AYDINER, Adnan; AYTEKIN, Yener; TOPUZ, Erkan. Effects of cisplatin on testicular tissue and the Leydig cell-pituitary axis. **Oncology**, 54: p.74-78, 1997.

ARIYARATNE, Siril H. B.; MENDIS-HANDAGAMA, Chamindrani Mhamindrani S. M. Changes in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. **Biol Reprod.**, 62: p. 680-690, 2000.

BOEKELHEIDE, Kim. Mechanisms of toxic damage to spermatogenesis. **J Natl Cancer Inst Monogr**. 2005;(34): p. 6-8.

BOOT, Annemieke M. et al. Mutation analysis of the LH receptor gene in Leydig cell adenoma and hyperplasia and functional and biochemical studies of activating mutations of the LH receptor gene. **J Clin Endocrinol Metab**. p. 96. 2011.

CARVALHO, Onofre Ferreira de et al. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, p. 33-38. jul. 2001.

CHOY, Jeremy T.; BRANNIGAN, Robert E. The determination of reproductive safety in men during and after cancer treatment. **Fertility And Sterility**. Chicago, Illinois, p. 1187-1191. nov. 2013.

COLPI, G.M. et al. Testicular function following chemo–radiotherapy. **European Journal Of Obstetrics & Gynecology And Reproductive Biology**. Milan, Italy, p. 2-6. 18 mar. 2004.

COELHO, Raquel et al. Microlitíase e tumor testicular. **Acta Med Port**, Amadora, Portugal, p. 485-487, 2005.

COOKE, B. A. et al. Control of Steroidogenesis in Leydig Cells. **Steroid Biochem. Molec. Bio.**, London, v. 43, n. 5, p. 455-459, 1992.

CURRY, H. L. et al. Caring for survivors of childhood cancers: the size of the problem. **Eur. J. Cancer**, 42(4) p. 501-508, 2006.

DIAS NETO, José Anastácio et al. Prognóstico de tumores testiculares germinativos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 3, p. 55-58, 2002.

DOHLE, Gert R. Male infertility in cancer patients: Review of the literature. **International Journal Of Urology**, Rotterdam, p. 327-331, jan. 2010.

ERICKSON, B. H.; BLEND, M. J. Response of the Sertoli Cell and Stem Germ Cell to ⁶⁰Co γ-Radiation (Dose and Dose Rate) in Testes of Immature Rats. **Biol. Reprod.**, 14: p. 641-650, 1976.

EVANS, William E. et al. Pharmacokinetics modeling of cisplatin disposition in children and adolescents with cancer. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, 10: p. 22-26, 1982.

FILHO, Antônio et al. Tumor Ovariano de Células de Leydig Puro. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Vitória, Es, v. 3, n. 54, p.245-250, nov. 2007.

FREITAS, Ana Carolina Lopes et al. Tumor Ovariano raro de células de Sertoli-Leydig: um relato de caso. **Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba**, Espírito Santo, v. 16, n. 3, p.152-154, 2014.

GERL, Arthur et al. The Impact of Chemotherapy on Leydig Cell Function in Long Term Survivors of Germ Cell Tumors. **Wiley Online Library**, Munich, p.1297-1303, 2000.

GOOSSENS, Ellen; TOURNAYE, Herman. Male fertility preservation, where are we in 2014? **Annales D'endocrinologie**. Paris, p. 115-117. maio 2014.

GONÇALVES, João André Neto Parra Rocha. **AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO TRATAMENTO DE QUIMIOTERAPIA NA FERTILIDADE MASCULINA**. 2010. 34 f. Tese (Mestrado) - Curso de Medicina, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

GONZALES-VITALE, Juan C. et al. The renal pathology in clinical trials of cis-platinum (II) diamminedichloride. **Cancer**, 39: p. 1362-1371, 1977.

HANDELSMAN, David J. et al. Effects of gonadotropin-releasing hormone analogs on cis-platinum-induced spermatogenic damage. **Int. J. Androl.**, 11: p. 425-435, 1988.

HANUKOGL, Israel. Steroidogenic Enzymes: Structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. **Steroid Biochem. Molec. Biol**, Jerusalém, v. 43, n. 8, p.779-804, 1992.

HART, William R.; BURKONS, David M. Germ cell neoplasms arising in gonadoblastomas. **American Cancer Society**, Michigan, v. 43, p.669-678, 1979.

HUANG, Hosea F. S. et al. Acute and chronic effects of cisplatin upon testicular function in the rat. **J. Androl.**, 11: p. 436-445, 1990.

JUNQUEIRA, Luiz C.; CARNEIRO, José. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KANGASNIEMI, M. et al. Suppression of mouse spermatogenesis by a gonadotropin releasing hormone antagonist and antiandrogen: failure to protect against radiation-induced gonadal damage. **Endocrinology**, 137(3): p. 949-955, 1996.

KATO, Kazuo. et al. Organ doses from radiation therapy in atomic bomb survivors. **Radiat. Res.**, 155(6): p. 785-795, 2001.

KINKEAD, T. et al. Short term effects of cis-platinum on male reproduction, fertility and pregnancy outcome. **J. Urol.**, 147: p. 201-206, 1992.

KOVACH J.S.; Phase II study of cis-diamminedichloroplatinum (NSC-119875) in advanced carcinoma of the large bowel. **Cancer Chemother. Rep.**, 57(3): p. 357-359, 1973.

LATRONICO, Ana Claudia. Mutações Ativadoras do Gene do Receptor do Hormônio Luteinizante em Meninos com Testotoxicose. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 45, p.58-63, 1 fev. 2001.

LEE, Sun Hee; SHIN, Choong Ho. Reduced male fertility in childhood cancer survivors. **Annals Of Pediatric Endocrinology Metabolism**. Seoul, Korea, p. 168-172. 24 dez. 2013.

LEITE, Caio Abner V. G. et al. Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica** , v. 9, p. 130, 2012.

LIRDI, L.C. et al. Amifostine protective effect on cisplatin-treated rat testis. **Anat. Rec.**, 291: p. 797-808, 2008.

MAEGAWA, Gustavo Henrique Boff; CENTA, Lidio Jair R. Aspectos genéticos do fator masculino na infertilidade. **Fam. Saúde Desenv.**, Curitiba, v. 2, n. 1, p.7-12, jun. 2000.

MAITI, Sourindra. et al. Irradiation selectively inhibits expression from the androgen-dependent Pem homeobox gene promoter in Sertoli cells. **Endocrinology**, 142(4): p. 1567-1577, 2001.

MALARVIZHI, D.; MATHUR, P.P. Effect of cisplatin on physiological status of normal rat testis. **Indian J. Exper. Biol.**, 33: p. 281-283, 1995.

MARCELINO, M. et al. Um Caso Raro de Hiperandrogenismo: Tumor ovárico bilateral de Células de Leydig. **Acta Med Port**, Lisboa, v. 23, p.113-118, 2010.

MARIS, Pamela et al. Androgens Inhibit Aromatase Expression Through DAX-1: Insights Into the Molecular Link Between Hormone Balance and Leydig Cancer Development. **Endocrinology**. Itália, p. 1251-1262. abr. 2015.

MARTÍN, Fátima Lallave et al. Estudio descriptivo de los tumores testiculares germinales: 13 años de experiencia en el área de salud de Badajoz. **Urología Oncológica**, España, v. 5, n. 60, p.531-537, 2007.

MESQUITA, Wyara Elanne de Jesus Castro. **Análise de alterações no gene receptor de andrógeno em homens com infertilidade idiopática**. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

MEISTRICH, Marvin L. et al. Damaging effects of fourteen chemotherapeutic drugs on mouse testis cells. **Cancer Res.**, 42: p. 122-131, 1982.

MEISTRICH, Marvin L. The Effects of Chemotherapy and Radiotherapy on Spermatogenesis in Humans. **Institutes Nacional Of Health**, Houston, Texas, p.1-14, nov. 2013.

MEISTRICH, Marvin L. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. **Fertility And Sterility**. Houston, Texas, p. 1180-1186. 05 set. 2013.

MICHAELS, Howard B.; HUNT, John W. A model for radiation damage in cells by direct effect and by indirect effect: a radiation chemistry approach. **Radiat. Res.**, 74(1): p. 23-34, 1978.

MILLER, Walter L.; BOSE, Himangshu S.. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. **Journal Of Lipid Research**. Savannah, p. 2111-2135. 5 out. 2011.

MULLER, Jorn. Impact of Cancer Therapy on the Reproductive Axis. **Horm. Res.**, 59(Suppl 1): p. 12–20, 2003.

MURTA, Danillo Velloso Ferreira; GOMES, Viviane Cristine Leite; MARTINEZ, Lorena Catalina Rodriguez. A ORGANIZAÇÃO CELULAR DOS TESTÍCULOS DE MAMÍFEROS. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, São Paulo, p.1-12, 2013.

NUNES, Carla et al. Hiperandrogenismo por tumor de Leydig do ovário produtor de testosterona. **Rev Port Endocrinol Diabetes Metab.**, Lisboa, v. 10, p.18-20, 2014.

OLIVEIRA, Kamile Denise de; OSELAME, Gleidson Brandão; NEVES, Eduardo Borba. Infertilidade após o tratamento oncológico. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, Brasília, v. 1, n. 3, p.72-84, 09 abr. 2014.

PASQUALOTTO, Fábio Firmbach; PASQUALOTTO, Eleonora Bedin. Congelamento de espermatozoides para pacientes com câncer e a reprodução assistida: Cryopreservation of sperm before the initiation of cancer therapy and assisted reproductive technics. **Grupo Editorial Moreira Jr**, Caxias do Sul, Rs, p.194-199, ago. 2007.

RANGEL, Elaine Maria Leite. **Avaliação do ambiente virtual de aprendizagem no ensino de fisiologia em um curso de licenciatura em enfermagem**. 2009. 210 f. Tese (Doutorado) - Curso de Enfermagem, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

REINSTEIN, L.; OSTROW, S.S.; WIERNIK, P.H. Peripheral neuropathy after cis-platinum (II) (DDP) therapy. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, 61: p. 280-282, 1980.

ROBERTS, J.J.; PASCOE, J.M. Cross-linking of complementary strands DNA in mammalian cells by antitumor platinum compounds. **Nature**, 235: p. 282-284, 1972.

ROSENBLATT, Charles et al. Infertilidade Masculina - Novos Conceitos. **Urologia**, São Paulo, n. 71, p.85-92, set. 2010.

ROOTS, Ruth; OKADA, Shigefumi. Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in x-ray-induced DNA strand breaks of killing of mammalian cells. **Radiat. Res.**, 64(2): p. 306-320, 1975.

SALEIRO, Sofia et al. Tumor de células de Leydig do ovário – caso clínico. **Acta Obstet Ginecol Port**, Coimbra, v. 4, n. 3, p.217-220, 2009.

SANTOS, Társila Rodrigues Moreno et al. CONSIDERAÇÕES SOBRE INFERTILIDADE MASCULINA. **Cadernos de Graduação: Ciências biológicas e da saúde**, Aracaju, v. 1, n. 16, p.21-26, mar. 2013.

SMITH, Lee B.; WALKER, William H.. The regulation of spermatogenesis by androgens. **Seminars In Cell & Developmental Biology: Regulation of Spermatogenesis Part II & DNA Replication**. Usa, p. 2-13. jun. 2014.

SMITH-WHITLEY, Kim. Reproductive issues in sickle cell disease. **Blood Journal**. Washington Dc, p. 3538-3443. 03 dez. 2014.

SOARES, Pedro et al. Tumor de Células de Leydig do Testículo. **Acta Urológica**. Portugal, Almada, p. 37-39. jan. 2003.

SOUZA, Luís Ronan Marquez Ferreira de et al. Neoplasias testiculares: aspectos ultra-sonográficos com correlação anatomopatológica. **Rev Imagem**, Uberlândia, v. 23, n. 4, p.243-252, out. 2005.

STRAUME, Anne Hege et al. Elevated levels of the steroidogenic factor 1 are associated with over-expression of CYP19 in an oestrogen-producing testicular Leydig cell tumour. **European Journal Of Endocrinology**. Norway, p. 941-949. 2012.

STOCCO, Douglas M. et al. Acute regulation of Leydig cell steroidogenesis. **The Leydig Cell**. Viena: Cache River Press. 1^a Ed. 1996, p. 241-258.

STOCCO, Douglas M.; MCPHAUL, M.J. Physiology of testicular steroidogenesis. In: NEIL, J.D. eds. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, California: Academic Press, p.977- 1016, 2006.

TÄHKÄ, K. M. Current aspects of Leydig cell function and its regulation. **Journals Of Reproduction And Fertility Ltd**, Finlândia, p.367-380, 1986.

TEERD, Katja J.; HUHTANIEMI, Ilpo T. Morphological and functional maturation of Leydig cells : from rodent models to primates. **Human Reproduction Update**, London, v. 1, p.310-328, 27 fev. 2015.

TROTTMANN, Matthias et al. Semen Quality in Men with Malignant Diseases before and after Therapy and the Role of Cryopreservation. **European Association Of Urology**, Munich, p.355-367, abr. 2007.

VAWDA, A.I.; DAVIES, A.G. Effects of cisplatin on the mouse testis. **Acta Endocrinol.**, 112: p. 436-441, 1986.

VAWDA, A.I. Effect of testosterone on cisplatin-induced testicular damage. **Arch. Androl.**, 32: 53-7. 1994.

ZHANG, X. et al. Cisplatin-induced germ cell apoptosis in mouse testes. **Arch. Androl.**, 46: p. 43-49. 2001.