



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**FLÁVINNY NEVES RODRIGUES**

**ANÁLISE MORFOFUNCIONAL DE TESTÍCULOS MURINOS TRATADOS COM  
ANTINEOPLÁSICO 5-FLUOROURACIL: COMPARAÇÃO QUALITATIVA ENTRE  
DUAS COLORAÇÕES HISTOLÓGICAS**

**FORTALEZA**

**2025**

FLÁVINNY NEVES RODRIGUES

ANÁLISE MORFOFUNCIONAL DE TESTÍCULOS MURINOS TRATADOS COM  
ANTINEOPLÁSICO 5-FLUOROURACIL: COMPARAÇÃO QUALITATIVA ENTRE  
DUAS COLORAÇÕES HISTOLÓGICAS

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à  
Coordenação do curso de Ciências Biológicas  
da Universidade Federal do Ceará, como  
requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel  
em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ana Beatriz Graça  
Duarte.

Coorientador: Prof. Dr. Yago Pinto da Silva.

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

R613a Rodrigues, Flávinny Neves.

Análise morfofuncional de testículos murinos tratados com antineoplásico 5 - fluorouracil :  
comparação qualitativa entre duas colorações histológicas / Flávinny Neves Rodrigues. – 2025.  
54 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,  
Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2025.

Orientação: Profa. Dra. Ana Beatriz Graça Duarte.

Coorientação: Prof. Dr. Yago Pinto da Silva .

1. Citotoxicidade reprodutiva. 2. Histopatologia. 3. Coloração histológica. I. Título.

CDD 570

---

FLÁVINNY NEVES RODRIGUES

ANÁLISE MORFOFUNCIONAL DE TESTÍCULOS MURINOS TRATADOS COM  
ANTINEOPLÁSICO 5-FLUOROURACIL: COMPARAÇÃO QUALITATIVA ENTRE  
DUAS COLORAÇÕES HISTOLÓGICAS

Monografia submetida à Coordenação do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Beatriz Graça Duarte (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Yago Pinto (Coorientador)  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr. José Roberto Feitosa Silva  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico este trabalho à minha mãe, Eny Medeiros, e avó Maria José, por todo amor e incentivo durante minha jornada.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família que me apoia e garante que eu tente o inimaginável. Obrigada à minha bisavó Valderina (*in memoriam*), que embora a saudade machuque, segue viva no meu coração. À minha avó Maria José, minha segunda mãe e eterno colo, a quem eu sempre corro quando tudo parece desmoronar. À minha mãe Eny Medeiros, a minha maior amiga e quem mais torce pelos meus sonhos, que sacrificou tanto da sua juventude para que eu pudesse estar sempre digna e educada. Agradeço a cada bronca e preocupação, cada “tenha cuidado, avisa quando chegar” é bem-vindo e guardado com muito amor. Tudo que sou e conquisto carrega um traço de vocês. Agradeço também aos meus familiares por cada memória, riso, lágrima e apoio mútuo.

Agradeço à professora Ana Beatriz, minha orientadora, a quem dedico este trabalho com gratidão. Obrigada por ter me acolhido, incentivado e dedicado tempo para uma orientação ímpar nesse processo tão árduo. Sua confiança foi essencial para que esse projeto se concretizasse e serviu de combustível para que eu me permitisse alçar novos voos. Ao professor e coorientador, Yago Pinto, agradeço por contribuir com seu tempo e valiosas sugestões pertinentes para a finalização desse trabalho. Ao professor José Roberto, obrigada por ter aceitado participar da banca, por ter me dado a oportunidade de monitoria em 2023 – que mudou minha visão no curso, e por ceder o protocolo e reagentes necessários para que o projeto fosse realizado.

Obrigada às minhas amigas, com quem sempre posso contar de olhos fechados em qualquer situação. Deborah Pontes, a irmã que a vida me deu, aos trancos e barrancos são mais de 10 anos de conversas intermináveis, apoio em todas as situações e piadas internas que não podem ser pronunciadas. Laís Cavalcante, minha prima e parceira de todas as horas, obrigada por todos os papos insalubres e vergonhas que nunca serão esquecidas. Ana Paula Castro e Yasmin Racanelli, que estão sempre dispostas a ouvir meus problemas e me fazem rir ininterruptamente. Formamos um trio, cujo nome não pode aqui ser mencionado, mas espero um dia conhecê-las pessoalmente.

Aos meus amigos de graduação, especialmente à Rayça, para sempre minha dupla de potencial infinito em todos os perrengues, a quem tenho orgulho de ter como amiga e ver o crescimento para além da vida acadêmica. Obrigada pela cumplicidade e pelo carinho, me inspiro muito em você. À “gangue da Rayça”, Rayça, Keven, Lucas, Laís, Hellen e Gabriel, é inacreditável que tenhamos perseverado uma pandemia e nos mantido juntos até o fim. Aqueles bancos da matinha úmida foram abrigo por toda a graduação.

Obrigada aos meus amigos de laboratório, principalmente à Thamyres que me ajudou nessa caminhada pela biologia da reprodução desde o início com uma gentileza sem igual e um sorriso imenso. Minha gratidão por compartilhar comigo seu trabalho e, acima de tudo, seu conhecimento. Ao Biocel-Lab que está nascendo e já conta com um time gigante – e ótimas festas feitas às pressas. À Monique, Paula e Thamyres agradeço o apoio no processo, não foi fácil, mas todo sacrifício vai ser recompensado. Vocês foram essenciais para que eu me mantivesse sã em meio ao caos que nos cercava. Às “mãezinhas”, Monique, Thamyres, Paula, Tayane, Natan e Júnior por todos os momentos descontraídos. À Ludimila, a maior do NEMPI, muito obrigada por toda ajuda, paciência e disponibilidade ao longo dessa jornada, por me ensinar tanto da rotina e me aconselhar quando precisei.

Aos meus companheiros de outras espécies. À Isabella Swan, minha alma de quatro patas, que me ensina sobre viver com leveza e lealdade sem precisar de palavras. Aos meus cachorros que já se foram, Nego e Mel, que tiraram meu medo – ainda guardo com carinho os lacinhos e gravatinhas. Às minhas gatas: Alma Flora, que faz eu subir no telhado quando escalo no forro e não sabe descer; e Maria Luísa, que distribui cabeçadas doloridas, mas cheias de dengo. Aos passarinhos velhinhos e resgatados Francisco, Luís e Zé que adoram me bicar.

Por fim, agradeço a mim por não desistir. Como Taylor Swift uma vez disse: *“Eu ainda acredito, embora não saiba o porquê. Eu nunca fui naturalmente vencedora, tudo o que eu faço é tentar, tentar e tentar novamente”*.

## RESUMO

O câncer é uma doença de caráter multifatorial que afeta a população mundial. Entre as estratégias de tratamento são utilizados antineoplásicos como o 5-Fluorouracil (5-FU), que afeta o metabolismo de células cancerígenas e células saudáveis com altas taxas de proliferação, como as células reprodutivas. No sistema reprodutor masculino, esse fármaco causa, especialmente, danos morfológicos capazes de diminuir a produção de espermatozoides e células germinativas viáveis, diminuindo ou, a depender da extensão do dano, tornando irreversível a fertilidade desses indivíduos. Ao avaliar os tecidos danificados pelos agentes citotóxicos, tipicamente se utiliza a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) na histologia, como método tradicional, que pode causar limitações a identificação de danos nas células que compõem o tecido seminífero. Dessa forma, podem ser implementadas diversas ferramentas que aumentem a confiabilidade da leitura, dentre elas, a coloração tricromática de Gomori, que ressalta as características histopatológicas e, até o presente momento, não existem estudos que o utilizem para tais fins em tecidos tratados com quimioterápicos. Assim, o presente trabalho tem como objetivo testar a utilização da coloração de Gomori, na desafiadora análise histopatológica de tecidos testiculares de murinos submetidos a tratamento com o 5-FU, sob a hipótese de que esse método levará a leituras mais assertivas. Para atingir tal objetivo, camundongos machos adultos da linhagem *Swiss*, foram divididos em dois grupos submetidos: i. a dosagem única intraperitoneal de 450mg/kg de 5-FU; ii. a solução salina, a 0,1ml/10g i.p. Posteriormente foram submetidos a eutanásia, para a coleta dos testículos, que foram processados em histologia clássica, para coloração de HE e TG. Em seguida, os TS foram avaliados em escores de alterações epiteliais e celulares de 0 a 3, no qual 0 significa nenhuma alteração e 1, 2 e 3 são graus crescentes de modificações. E a observação de alterações conjuntivas foi avaliada por escores cruzados em que (-) significa ausência de modificação e (+), houve alteração. Como resultado esperado, o grupo controle se manteve conservado e ambas as colorações foram positivamente aplicáveis para a leitura dos microambientes intra e intertubular. Dentre os principais resultados ao investigar a conservação do epitélio seminífero no grupo 5-FU, HE foi eficiente nos aspectos celulares, como na diferenciação espermatogênica e ao evidenciar a distribuição desordenada dessas populações celulares. TG, por sua vez, mostrou-se apto para destacar as alterações consecutivas ao tratamento com 5-FU, com foco em aspectos como resíduos celulares, diferenciação entre espermátides tardias e espermatozoides e realce citoplasmático das células espermatogênicas. De maneira geral, não foram observadas alterações estruturais proeminentes no tecido conjuntivo intersticial de

camundongos de ambos os grupos, devido à baixa frequência de fibras colágenas encontradas no tecido. As avaliações com HE, nesse aspecto, ressaltaram o interstício com células de Leydig agrupadas e pouco conteúdo amorfo de tecido conjuntivo intertubular. Entretanto, TG possibilitou a visualização clara de células mioides ao redor dos túbulos seminíferos, a delimitação da membrana basal discreta em murinos e os fibroblastos em menor quantidade no interstício. Conclui-se, portanto, que embora a coloração de HE seja prática e viável, é um método que apresenta limitações de interpretação e pode ser aprimorado. Assim, utilizar TG para avaliações histopatológicas pode ser uma ferramenta mais eficaz na descrição dos componentes teciduais para informações fundamentais sobre a toxicidade do 5-FU.

**Palavras-chave:** citotoxicidade reprodutiva; histopatologia; coloração histológica.

## ABSTRACT

Cancer is a multifactorial disease that affects the world's population. Treatment strategies include antineoplastic drugs such as 5-Fluorouracil, which affect the metabolism of cancer cells and healthy cells with high proliferation rates, such as reproductive cells. In the male reproductive system, this drug causes morphological damages capable of reducing the production of viable spermatozoa, thus reducing the fertility of these individuals. Therefore, when evaluating tissues damaged by cytotoxic agents, histology typically uses Hematoxylin and Eosin (HE) staining as a traditional method, which can cause limitations in identifying damage to the cells that make up the seminiferous tissue. Hence, various tools can be implemented to increase the reliability of the reading, including Gomori's trichrome stain, which highlights the histopathological characteristics and yet there have been no studies using it for this purpose in tissue treated with chemotherapy drugs. The aim of this study is to evaluate the use of Gomori staining in the challenging histopathological analysis of murine testicular tissues treated with 5-FU, under the hypothesis that this method will lead to more assertive readings. Adult male *Swiss* mice were divided into two groups of administration: i. a single intraperitoneal dose of 450 mg/kg of 5-FU; ii. saline solution at 0,1ml/10g i.p. They were then euthanized for testicular evaluation, which were processed for classical histology, HE and TG staining. The TS were then evaluated on a scale of 0 to 3 for epithelial and cellular changes, where 0 means no modification and 1, 2, and 3 are increasing degrees of alteration. In addition, the observation of conjunctival alterations was evaluated by cross scores in which (-) means no alteration and (+), there was alteration. As expected, the control group remained preserved, and both stains were positively applicable for reading the intra and intertubular microenvironments. Among the results when investigating the conservation of the seminiferous epithelium in the 5-FU group, HE was efficient in cellular aspects, such as spermatogenic differentiation and in showing the disordered distribution of these cell populations. Alternatively, TG was able to highlight the changes following treatment with 5-FU, focusing on aspects such as cell debris, differentiation between late spermatids and spermatozoa and cytoplasmic enhancement of spermatogenic cells. Overall, no prominent structural changes were observed in the interstitial connective tissue of mice from both groups, due to the low frequency of collagen fibers found in the tissue. From this perspective, HE evaluations highlighted the interstitium with grouped Leydig cells and little amorphous connective tissue content. However, TG allowed a clear visualization of myoid cells around the seminiferous tubules, the discrete basal membrane delimitation found in murines and fibroblasts in smaller quantities in the interstitium. It is

therefore concluded that although HE staining is practical and achievable, it is a method that has limitations in interpretation and can be improved. Thus, using TG for histopathological evaluations can be a more effective tool in describing tissue components for fundamental information on the toxicity of 5-FU.

**Keywords:** reproductive cytotoxicity; histopathology; histotechnique.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	– Diagrama esquemático e corte sagital do testículo humano	20
<b>Figura 2</b>	– Desenho esquemático do epitélio seminífero	24
<b>Figura 3</b>	– Desenho experimental detalhando o tratamento	29
<b>Figura 4</b>	– Animais e fixação	30
<b>Figura 5</b>	– Preparação das lâminas	31
<b>Figura 6</b>	– Preparação do corante	32
<b>Figura 7</b>	– Fotomicrografias do epitélio seminífero do grupo controle comparando HE e TG	36
<b>Figura 8</b>	– Fotomicrografias do epitélio seminífero do grupo 5-FU comparando HE e TG	37
<b>Figura 9</b>	– Fotomicrografias do interstício do grupo controle comparando HE e TG	40
<b>Figura 10</b>	– Fotomicrografias do interstício do grupo 5-FU comparando HE e TG	41
<b>Figura 11</b>	– Fotomicrografias para comparação histológica entre tecido murino e bovino com HE	43
<b>Figura 12</b>	– Fotomicrografias para comparação histológica entre tecido murino e bovino com TG	44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	– Tabela de escores morfológicos epiteliais dos túbulos seminíferos	33
<b>Tabela 2</b>	– Tabela de escores cruzados para o interstício	34
<b>Tabela 3</b>	– Média dos escores para cada parâmetro utilizando HE e TG	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>5-FU</b>	5-Fluorouracil
<b>ATP</b>	Ácido Fosfotúngstico
<b>C2R</b>	Cromotrop 2R
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética no Uso de Animais
<b>CE</b>	Células espermatogênicas
<b>CG</b>	Células germinativas
<b>CL</b>	Células de Leydig
<b>CM</b>	Células Mioides
<b>CS</b>	Células de Sertoli
<b>CTRL</b>	Controle
<b>EcI</b>	Espermatócitos primários
<b>EcII</b>	Espermatócitos secundários
<b>EG</b>	Espermatogônias
<b>ES</b>	Epitélio seminífero
<b>ETP</b>	Espermátides primárias
<b>ETT</b>	Espermátides terminais
<b>FCF</b>	Fast green
<b>HE</b>	Hematoxilina – Eosina
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>MB</b>	Membrana basal
<b>SPZ</b>	Espermatozoides
<b>SSCs</b>	Spermatogonial stem cells
<b>TA</b>	Túnica albugínea
<b>TG</b>	Tricrômico de Gomori
<b>TS</b>	Túbulos seminíferos
<b>SPZ</b>	Espermatozoides
<b>VS</b>	Vasos sanguíneos
<b>UFC</b>	Universidade Federal do Ceará

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Morfofisiologia da gônada masculina.....</b>	<b>19</b>
1.1.1 Desenvolvimento embrionário.....	20
1.1.2 Interstício, células mioides e células de Leydig .....	21
1.1.3 Epitélio germinativo .....	22
<b>1.2 Fatores que afetam a espermatogênese .....</b>	<b>24</b>
1.2.1 Agentes quimioterápicos e os impactos nas células espermáticas.....	24
1.2.2 Efeitos do 5-Fluorouracil nos testículos .....	25
<b>1.3 Técnicas de avaliação histopatológicas gônada masculina.....</b>	<b>26</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>2.1 Objetivo geral .....</b>	<b>28</b>
<b>2.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>28</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Comitê de ética e desenho experimental.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Processamento histológico e coloração das amostras biológicas .....</b>	<b>30</b>
3.2.1 Protocolo da coloração de Hematoxilina e Eosina .....	31
3.2.2 Protocolo da coloração de Tricrômico de Gomori .....	31
<b>3.3 Análise morfológica do tecido testicular corado com Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Gomori.....</b>	<b>32</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Análise morfológica do tecido epitelial murino .....</b>	<b>35</b>
<b>4.2 Análise morfológica do tecido conjuntivo murino .....</b>	<b>39</b>
<b>4.3 Análise comparativa entre tecido murino e bovino .....</b>	<b>42</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2019), o câncer é um conjunto de doenças complexas e multifatoriais no qual as células de um órgão ou tecido iniciam um crescimento descontrolado e anormal. Atualmente é o maior desafio na saúde pública no cenário global e seus impactos correspondem a causa de mortes prematuras (Santos *et al.*, 2023). Assim, a utilização de agentes antineoplásicos para o tratamento dessa doença aumentou no mundo todo à medida que as taxas de incidência de câncer aumentam na população (Medeiros *et al.*, 2023), devido à melhoria dos fármacos quimioterápicos (Giona, 2022), garantindo a sobrevivência desses pacientes. Dessa forma, considerando a maior expectativa de vida, procura-se entender os efeitos a longo prazo da utilização desses medicamentos ao longo da vida dos pacientes.

Embora os agentes quimioterápicos sejam considerados seguros (Vodenkova *et al.*, 2020), são agentes inespecíficos que matam não só as células carcinogênicas como também células saudáveis apresentando efeitos colaterais, como disfunção renal, angina, toxicidades gastrointestinais e reprodutivos (Delessard *et al.*, 2020; Van Den Boogaard *et al.*, 2022), que, em casos graves, levam a infertilidade por danos às gônadas. É certo que as taxas de infertilidade após um tratamento com quimioterápicos são dependentes de diversos fatores, dentre eles o tipo de droga, a dosagem, o tempo e a idade dos pacientes (Lee *et al.*, 2006; Brydoy *et al.*, 2007).

Dentre as drogas mais utilizadas está o 5-Fluorouracil (5-FU) (De Oliveira Klein *et al.*, 2021), associado ao tratamento dos mais variados tipos de câncer (Yuan *et al.*, 2024), sendo um agente citotóxico que atua no bloqueio do metabolismo celular e na síntese de DNA (Shiga e Hiraide, 2020). No sistema reprodutor masculino, é conhecido que o 5-FU leva a alterações tóxicas em células germinativas durante a divisão mitótica nas espermatogônias, eventualmente progredindo para infertilidade masculina (Fahmy *et al.*, 2020; Emokpae e Igharo, 2020). Além disso, morfológicamente, a toxicidade do 5-FU está associada a anormalidades celulares testiculares, como desorganização epitelial e atrofia dos túbulos seminíferos (Medeiros *et al.*, 2023), defeitos espermatogênicos, espessamento da membrana basal, fibrose no interstício, aplasia epitelial e vacuolização nas células de Sertoli (Fahmy *et al.*, 2020; Pirzaman *et al.*, 2023; Yuan *et al.*, 2024).

Em pacientes que recebem tais tratamentos agressivos é crucial examinar os efeitos na capacidade funcional dos testículos, para garantir a preservação da fertilidade após a quimioterapia (Lopes *et al.*, 2016). Para tanto, os métodos de avaliação histopatológicos quantitativos e qualitativos são implementados de modo a determinar o tipo, o nível e a quantidade de danos causados ao tecido (Yalçın *et al.*, 2020). Em meio a incidência de cânceres

e tratamentos diversos com quimioterápicos, é imprescindível buscar parâmetros para a detecção de alterações no tecido (McLachlanet *et al*, 2007).

Para tanto, todos os fatores que fazem parte da rotina histológica, desde o fixador correto até a escolha dos corantes a serem utilizados, são determinantes para a boa leitura das lâminas e diagnósticos. A coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) é amplamente utilizada pois possui relativa simplicidade, funciona com diversos tipos de fixadores, e tem capacidade de exibir características celulares, citoplasmáticas e nucleares, e da matriz extracelular (Abrahamsohn, 2016; Bancroft 2018). A hematoxilina em combinação a eosina forma um corante bicrômico que se sobrepõem e cora os cortes com variações dos dois tons (Aarestrup, 2012). Em um tecido típico, os núcleos são corados em roxo, enquanto citoplasma e matriz extracelular pigmentam em distintos gradientes de rosa. Na prática, os corantes bicrômicos tornam difícil a visualização de muitos componentes dos tecidos (Abrahamsohn, 2016), sendo inevitável a manipulação de outras técnicas mais complexas para ajustar essas limitações, tornando a análise mais precisa e correta.

As colorações tricromáticas são uma classe composta por uma mescla de três ou mais cromóforos e surgem, então, da necessidade de observar os componentes teciduais que não são distinguíveis pela coloração de primeira escolha, HE (Ovalle, 2014; Abrahamsohn, 2016). Assim, cada corante caracteriza a marcação de núcleo, de citoplasma e de fibras de colágeno. Dentre os tricrômicos histológicos mais utilizados na rotina estão os de: Masson, Mallory e Gomori. Essas técnicas podem ser empregadas na avaliação de fibroses e distrofias pelo forte contraste fornecido quando comparados os tecidos conjuntivo, epitelial e muscular (Dibal; Garba; Jacks, 2022).

O Tricrômico de Gomori (TG) é constituído por 3 reagentes, o Cromotrop 2R (C2R), o Ácido Fosfotúngstico (PTA) e o Fast Green (FCF). O reagente C2R é um corante monoazo (N=N) vermelho cuja aplicação na histologia é o destaque citoplasmático e contracoloração, além de sua afinidade por proteínas (De Rijik, 2003; Wang; Silva; Faria, 2007). O PTA é um ácido muito utilizado funcionando como um mordente, que forma complexos com outros corantes a partir de seu íon tungstato (Everett; Miller, 1974; Mukade *et al.*, 2022), para impregnar corantes aniônicos às fibras colágenas. Em protocolos tricrômicos, o FCF se liga às fibras colágenas corando-as em verde (Molinaro, 2010). Quando os três cromóforos estão unidos, coram as fibras colágenas em verde, o citoplasma em vermelho e núcleo em roxo intenso.

O TG é aplicado comumente em investigações histopatológicas de próstata de esquilos (Lima *et al.*, 2020) e ratos adultos (Sánchez *et al.*, 2022), ovários felinos (Vilela *et al.*,

2016) e de esquilos (Melvin *et al.*, 2025), bem como rins (Zheng *et al.*, 2016) e infecções fúngicas (Sgreccia *et al.*, 2020). Nesses casos, a coloração é empregada com o fito de análise de fibras de colágeno (Ni *et al.*, 2014; Ferreira, 2023) ou fibras musculares (Triane *et al.*, 2009; Golsari *et al.*, 2018) e, a partir de modificações como impregnação de prata, inclui-se a leitura de fibras reticulares (Procop e Roberts, 2004), as quais formam estruturas filiformes de coloração acastanhada (Ross; Pawlina; Barnash, 2012). À vista disso, é imprescindível a avaliação histopatológica com coloração diferencial, como TG, que evidencia elementos fibrosos à base de colágeno (Molinaro, 2010), para a identificação morfológica dos componentes dos túbulos seminíferos. Entretanto, até este momento, não há estudos que associam a utilização do TG em leitura de lâminas de testículos murinos em situações de tratamentos utilizando quimioterápicos, como o 5-FU.

Ao investigar estudos sobre as alterações celulares e estruturais em testículos provenientes do tratamento com o 5-FU, observa-se a recorrência da coloração de HE como o primeiro método de leitura (Medeiros *et al.*, 2023; Demir *et al.*, 2025; Elsteha *et al.*, 2025). Indicativos como os constituintes da membrana basal e o interstício podem ter suas análises valorizadas em outras nuances de coloração. Para tanto, questiona-se a possibilidade da utilização de TG, visto a indispensável distinção entre os elementos da arquitetura do órgão para uma inspeção assertiva acerca dos efeitos danosos causados por fármacos gonadotóxicos. Portanto, partindo da hipótese que o TG trará maior assertividade nas análises, o presente trabalho tem o objetivo de comparar a utilização das colorações de Hematoxilina e Eosina e de Tricrômico de Gomori na análise de alterações morfológicas na arquitetura epitelial e intersticial do tecido testicular murinos tratados com o antineoplásico 5-fluorouracil, utilizando a coloração de Tricrômico de Gomori.

## **1.1 Morfofisiologia da gônada masculina**

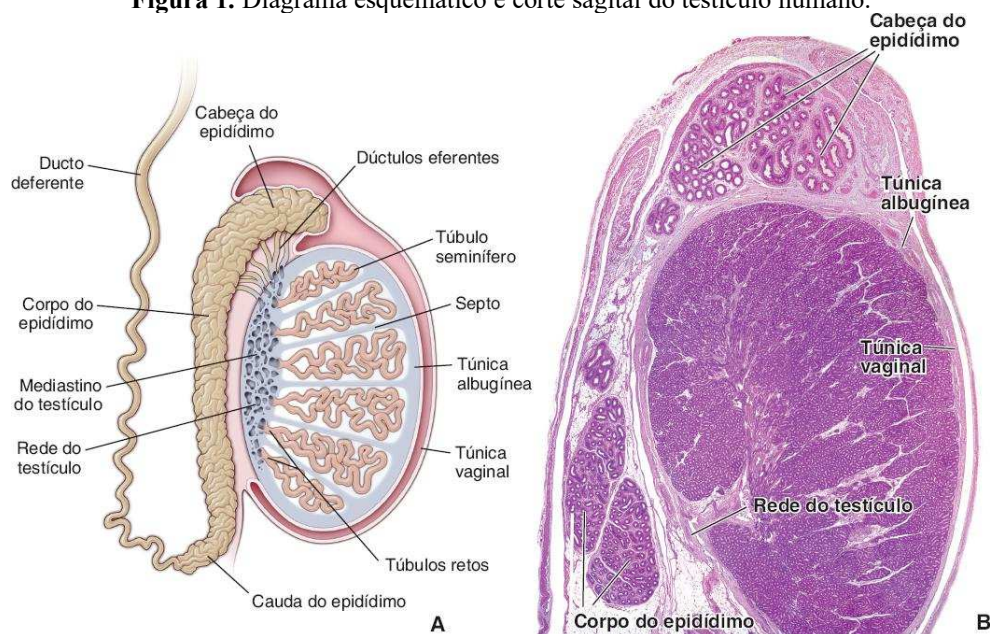
Anatomicamente, o sistema genital masculino é composto de testículos pareados, ductos genitais, glândulas acessórias e pênis (Junqueira e Carneiro, 2017). Os testículos constituem um par de órgãos com formato ovalado com dupla função ao produzir os hormônios sexuais e os gametas masculinos, a partir de células intersticiais e do epitélio germinativo (Ross; Pawlina; Barnash, 2012), respectivamente.

Duas túnicas recobrem essas gônadas, uma externa e serosa, a túnica vaginal, derivada do peritônio durante a descida do órgão (Graaff, 2003) e uma fibrosa de tecido conjuntivo denso modelado, a túnica albugínea (TA), cujas trabéculas aparam o parênquima

fornecendo estrutura (Samper *et al.*, 2007; Gosling, 2019). São essas expansões fibrosas que dividem cada testículo em lóbulos, os quais consistem em túbulos seminíferos (TS), que são as unidades funcionais dos testículos (Graaff, 2003; Pawlina, 2021). Aliado a isso, é no interstício, entre os TS, que ocorre a produção de testosterona, a partir das células de Leydig (CL) ainda no início da vida fetal (Pawlina, 2021).

Com relação ao epitélio que constitui os TS, nota-se sua estratificação e composição de dois tipos celulares: células germinativas (CG) e células de Sertoli (CS) (Gartner, 2022), células de sustentação. Através de cortes transversais é possível analisar a interação entre essas populações celulares e o arranjo que performam nos TS de cada lóbulo (Kierszenbaum e Tres, 2021), logo, a arquitetura dos TS depende dos estágios diferenciais das células espermatogênicas que ao se diferenciarem, organizam a estrutura dos túbulos. Ainda de acordo com Kierszenbaum e Tres (2021), a parede epitelial é formada por fibroblastos e células mioídes (CM) contráteis, além de membrana basal (MB) que separa a parede do epitélio seminífero (ES).

**Figura 1.** Diagrama esquemático e corte sagital do testículo humano.



Fonte: Pawlina, 2021.

### 1.1.1 Desenvolvimento embrionário

A diferenciação embriológica dos testículos no sistema masculino é intrínseca à morfofuncionalidade exercida pelo tecido adulto, o que, de acordo com Aarestrup (2012) ocorre por volta da sétima semana. É a existência e a expressão do gene SRY, no braço curto do

cromossomo Y, que determina a evolução de órgãos genitais masculinos (Pawlina, 2021), visto que até esse momento, o embrião potencialmente pode individualizar-se em sexo masculino ou feminino. Pawlina (2021) descreve ainda que a origem celular que compõe os testículos é derivada do mesoderma intermediário, do epitélio mesodérmico e as células germinativas são migratórias do saco vitelínico.

Resultante do mesoderma estão as CM, que se desenvolvem ao redor dos cordões seminíferos - futuros TS, e as células de Leydig fetais, que produzem testosterona (Chen *et al.*, 2009; Duffin, 2024). Aliado a isso, as CS, provenientes do epitélio mesodérmico que reveste as cristas urogenitais (Pawlina, 2021), são as primeiras células somáticas a serem especificadas, pois através da produção do fator inibidor mülleriano (MIF), bloqueiam as vias de ativação de órgãos femininos (Mäkelä *et al.*, 2019) e avançam sua proliferação dentro dos cordões seminíferos. As células germinativas, por sua vez, são recrutadas para as gônadas e desenvolvem-se em gonócitos, os precursores das espermatogônias (Pawlina, 2021).

### 1.1.2 Interstício, células mioides e células de Leydig

O espaço intersticial é a parte fora da delimitação dos TS e é composto sobretudo por células e tecido conjuntivo. Em condições dentro da normalidade, entre a população celular encontram-se as CL, em abundância, CM, as endoteliais vasculares, os fibroblastos, os macrófagos e os vasos linfáticos (Scudamore, 2014; Heinrich e DeFalco, 2019). Os fibroblastos são as células que sintetizam os componentes da matriz extracelular (MEC), assim são necessários para a manutenção e recuperação de danos (Junqueira e Carneiro, 2023). Além disso, a MB que separa os compartimentos do TS e do interstício é composta por colágeno IV e laminina, sobreposta por CM (Heinrich e DeFalco, 2019), oferecendo estrutura para a integridade funcional do tecido.

As CM constituem a parede dos TS e apresentam características similares às células musculares lisas, pois suas contrações são responsáveis pelo movimento dos espermatozoides (SPZ) (Ross; Pawlina; Barnash, 2012; Wang; Chen; Liu, 2018) do lúmen ao epidídimo. Esta particularidade, em conformidade a Mayerhofer (2013), é conferida por meio da ação dos andrógenos durante a puberdade, como o FSH (Hormônio folículo estimulante). A organização da parede dos TS está relacionada com a distribuição estratégica dessas células, entre o interstício, com CL, e as CS ao atentar-se às funções parácrinas dessas células (Mayerhofer, 2013). Participam indiretamente da espermatogênese ao estruturar a lâmina basal em conjunto as CS, fibras colágenas e demais componentes da MEC promovendo um microambiente para

as SSCs se renovarem (Skinner; Tung; Fritz, 1985; Zhou *et al.*, 2019). Adicionalmente, a indução de CS na maturação de espermátides acontece após os andrógenos ligarem-se aos receptores nas CM (Zhou *et al.*, 2019).

As CL, podem ser consideradas uma das mais importantes células localizadas no interstício testicular. Também conhecidas como células intersticiais, se apresentam em agregados, com citoplasma eosinofílico e núcleo grande e central (Scudamore, 2014). São responsáveis pela produção dos andrógenos que participam da diferenciação de CG e desenvolvimento de características secundárias masculinas (Adamczewska *et al.*, 2022), ao coordenarem a sinalização das CG para diferenciação. Levando em consideração sua função secretora, é válido observar que prejuízos a essas células estromais resultam em menor produção de testosterona e, por consequência, isso afeta diretamente a espermatogênese (Zhao *et al.*, 2020).

### 1.1.3 Epitélio germinativo

As CS, ou células de sustentação, são colunares e seu citoplasma estende-se por toda a espessura epitelial, facilmente reconhecidos por seu núcleo pálido e nucléolo evidente (Ross; Pawlina; Barnash, 2012; Abrahamsohn, 2016). Além disso, possuem limites basolaterais, projeções citoplasmáticas e interdigitações não identificáveis ao microscópio óptico que conseguem atender as demandas das células mais imaturas às mais especializadas (Aarestrup, 2012; O'Donnell, 2022). Essa população, de acordo com O'Donnell (2022) é capaz de adaptar-se ao estágio de desenvolvimento de quaisquer células germinativas em qualquer momento do ciclo.

São o tipo predominante do ES até a puberdade, não ocorrendo divisão mitótica em testículos adultos, aliado a isso, é conhecido que a taxa de proliferação de CS antes da puberdade influencia a população posterior adulta e é determinante no tamanho dos testículos (Kierszenbaum, 2021; O'Donnell, 2022). Essas células desempenham papéis fundamentais ao processo espermatogênico, como suporte estrutural e nutricional das demais CG e o estabelecimento da barreira hematotesticular (Adamczewska, 2022). Essa barreira é formada pelas junções comunicantes entre CS formando adesões próximas a MB, isso garante um microambiente saudável e imunologicamente privilegiado, pois as CS regulam a entrada e saída de metabólitos, citocinas e hormônios (Pohl *et al.*, 2021; Luaces *et al.*, 2023). Esse é um mecanismo essencial que garante a renovação, manutenção e maturação das CG. Dessa forma, são unidades que definem o bom funcionamento dos testículos, e segundo Mäkelä (2018), sua

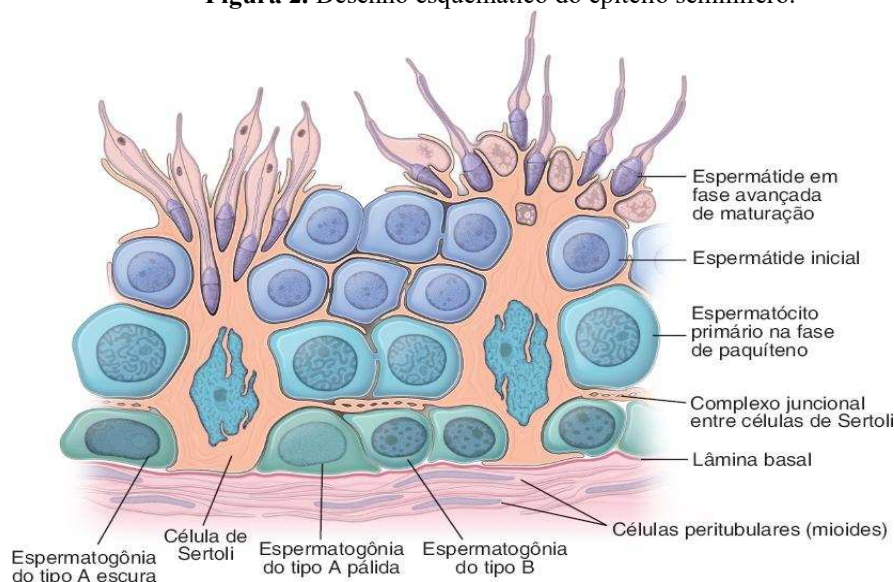
manutenção é fator decisivo para a saúde reprodutiva.

As CG amadurecem ao longo da MB ao lúmen dos TS, em uma estratificação organizada cujo objetivo é o mecanismo da espermatogênese. Este é um processo complexo dependente da regulação endócrina e parácrina (Pohl *et al.*, 2021) que envolve diferentes vias de proliferação e diferenciação das CE, em cada estágio observado nos TS, até a origem dos SPZ (Jan *et al.*, 2012; Wakayama *et al.*, 2022). Isso o configura como organizado e sistemático e vinculado à maturação completa do ambiente somático (Jan *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2019).

De maneira geral, após divisões mitóticas, as espermatogônias (EG) diferenciam-se em espermatócitos primários (EcI), que posteriormente, realizam a primeira divisão meiótica para espermatócitos secundários (EcII). Os EcII realizam a segunda meiose rapidamente e tornam-se, então, espermátides primárias (ETP). Por fim, esses ETP passam por maturação e condensam seus núcleos para a distinção em espermátides tardias (ETT), e são estas que passam pelo processo de espermiogênese, dando origem aos SPZ (Jan *et al.*, 2012; Ross; Pawlina; Barnash, 2017). Após o desenvolvimento dos SPZ, eles são lançados dos TS direto no epidídimo para maturação e posterior ejaculação.

As EG constituem uma população heterogênea com capacidade de renovar-se, com as células-tronco (SSC), e auto proliferar, progredindo o ciclo espermatogênico (O'Donnell, 2022). Morfologicamente ao observar os TS, nota-se que as EG se localizam ao lado das CS em contato íntimo com a lâmina basal, com núcleos redondos e pequenos. Já os EcI encontram-se mais afastados do lúmen distinguíveis seu núcleo grande e cromatina filamentososa. As ETP, por sua vez, são células mais próximas ao lúmen, cuja particularidade é seu núcleo pequeno e redondo, enquanto as ETT apresentam núcleo denso e forma alongada. Finalmente, os SPZ são os gametas que já estão no lúmen, com seu flagelo característico (Ross; Pawlina; Barnash, 2017; Kierszenbaum; Tres, 2021).

**Figura 2.** Desenho esquemático do epitélio seminífero.



Fonte: Pawlina, 2021.

## 1.2 Fatores que afetam a espermatogênese

É sabido que as células germinativas são extremamente sensíveis a alterações do microambiente e a agentes nocivos. Dentre os fatores que mais afetam a espermatogênese, Pawlina (2021) cita as deficiências nutricionais, tais como vitaminas A, B12 e C, a temperatura testicular elevada e doenças sistêmicas, além de infecções locais. Do mesmo modo, é possível mencionar os distúrbios do desenvolvimento, como o criptorquidismo, condição na qual há falha na descida de um ou ambos os testículos, fato que, quando não contornado, reduz a qualidade do sêmen e a fertilidade (Silverthorn, 2017; Rodprasert, 2024; Pipman, 2025), a torção testicular, com significativo aumento na apoptose de CE (Turner *et al.*, 2004), além de disruptores endócrinos ambientais, particularmente os pesticidas e as bifenilas policloradas (Faja *et al.*, 2022), e os microplásticos, que interrompem a produção de testosterona (Wu *et al.*, 2023). Aliado a isso, existem os agentes antineoplásicos, como o 5-Fluorouracil, que interagem com a síntese de DNA, cujos efeitos podem perdurar por décadas após o tratamento (Sriram *et al.*, 2024).

### 1.2.1 Agentes quimioterápicos e os impactos nas células espermáticas

Para o tratamento de câncer existem diferentes metodologias a serem implementadas que garantem a maior expectativa de vida desses pacientes. A quimioterapia é uma das estratégias terapêuticas mais eficazes, a qual se utiliza de medicamentos para inibir a

proliferação desenfreada das células tumorais (Behranvand *et al.*, 2022). De modo geral, os agentes antineoplásicos agem sobre o ciclo celular, entre os principais grupos destacam-se os agentes antimetabólitos que inibem a síntese do DNA, sendo restritos a fase S do ciclo (Almeida *et al.*, 2005). Entretanto, devido à falta de especificidade do mecanismo, as células saudáveis também são atingidas, assim, esses agentes podem produzir colaterais frequentes comprometendo a fisiologia basal do organismo (Ibharm e Ismail, 2020; Basark *et al.*, 2022).

Dentre os efeitos adversos mais discutidos, a fertilidade masculina é a consequência mais preocupante. Com a finalidade de assimilar os níveis de toxicidade gonadal causados por esses fármacos, é necessário avaliar o tipo de câncer a ser tratado, o tipo do medicamento, e fatores intrínsecos ao paciente, como a idade (Lopes *et al.*, 2016). Os agentes quimioterápicos podem levar à ruptura da fertilidade ao gerar lesões indiretas na ação endócrina das células somáticas, ou diretas, nas células germinativas (Delessard *et al.*, 2020), ao causar sensibilização nas CE, reduzindo a produção de SPZ férteis e vigorosos (D'Souza, 2003; Stukenborg, 2018; Duffin *et al.*, 2024). Em muitos casos, esse é um fator que pode desencadear a infertilidade masculina por consequência do comprometimento espermatogênico (Lopes *et al.*, 2016), pois a recuperação da produção normal de espermatozoides está intimamente relacionada à sobrevivência e capacidade de diferenciação das SSCs (Meistrich, 2013).

Dentre os fármacos antimetabólitos utilizados, alguns são conhecidos por causar toxicidade gonadal temporária ou permanente, como é o caso do 5-FU, cuja ação citotóxica compromete o progresso da espermatogênese (Meistrich, 1993; Shiga e Hiraide, 2020).

### 1.2.2 Efeitos do 5-Fluorouracil nos testículos

O 5-FU é um dos agentes antineoplásicos mais utilizados para os mais diversos tipos de câncer (Ghafouri-Fard, 2021a), sendo vastamente utilizado desde 1957 (Sethy e Kundu, 2021). É um agente antimetabólito citotóxico análogo da pirimidina (Basak *et al.*, 2022), assim, entra na célula por transporte facilitado (Sethy e Kundu, 2021), e exerce seus efeitos antitumorais ao inibir a síntese da enzima timidilato sintase, necessária para a replicação de DNA (Vodenkova, 2020; Shiga e Hiraide, 2020). Por sua ação inespecífica, seu potencial de ação está ligado à destruição de células cancerígenas e, conseqüentemente, de células com altas taxas proliferativas, como as células reprodutivas.

Em geral, é um quimioterápico cujas reações adversas são dependentes da dose e tempo de exposição (D'Souza e Narayana, 2001), e, nos testículos, Narayana (2000), afirma que mesmo doses baixas (10mg/kg) são suficientes para o desalinamento da arquitetura

epitelial e a sua descamação, causando atrofia a longo prazo. Dentre os danos causados a partir do 5-FU, a literatura cita: a indução de alterações nas CS e diminuição do peso de órgãos reprodutivos, como a vesícula seminal e a próstata (Naren *et al.*, 2022); retardo na diferenciação de espermátides (Russell e Russell, 1991); vacuolização nas CS (Takizawa e Horii, 2002); descamação do epitélio dos TS e presença de células gigantes multinucleadas (Narayana *et al.*, 2000); fibrose do interstício (Pirzaman *et al.*, 2023); dilatação de vasos sanguíneos (Medeiros *et al.* 2023); e diminuição do peso dos testículos, em decorrência da perda de CG (D'Souza e Narayana, 2001). Além disso, há significativa diminuição de SPZ, fato relacionado intrinsecamente à dosagem e tempo de uso do medicamento (D'Souza, 2003). Fahmy *et al.* (2020) aponta, também, efeitos do 5-FU nas células somáticas, causando anormalidades cromossômicas, e defeitos na morfologia dos SPZ, tais como ausência de cabeça ou dobramento de cauda. Aliado a isso, é sabido que o 5-FU é indutor de apoptose, de danos ao DNA e RNA e de estresse oxidativo, ocasionando a perturbação da funcionalidade celular e impactos na indução hormonal (Naren *et al.*, 2022; Pirzaman *et al.*, 2023).

Assim, é válido inferir que a utilização do fármaco interfere na normalidade do tecido testicular, culminando na perda de CG por alterações morfológicas e baixa produção de SPZ viáveis. Sendo esses, os desafios atrelados diretamente à oncofertilidade.

### **1.3 Técnicas de avaliação histopatológicas gônada masculina**

A avaliação histopatológica é um método indispensável para quantificar e qualificar as lesões, logo, histotécnicas podem ser implementadas para aumentar a detecção de alterações morfológicas. Especialmente em testículos, essas avaliações são desafiadoras devido à complexidade do tecido, composto por células múltiplas e especializadas (Ito, 2021). Para tanto, é necessário identificar um referencial a ser seguido e aumentar a confiabilidade das leituras.

À vista disso, diversos autores enumeram critérios com base nas características dos tecidos a serem investigados. Dentre eles, McLachlan *et al.* (2007), cita que os principais parâmetros para a avaliação epitelial são: heterogeneidade celular, avaliação de CE, presença de CS e diâmetro de TS (lúmen). MacLachlan *et al.* (2007) e Yalçın *et al.* (2020) citam, em comum, métodos morfométricos para a análise do epitélio, através do sistema de escores de Johnsen (1970) e Cosentino *et al.* (1986). Esse sistema busca medir o grau de danos causados à espermatogênese nos TS, indo de 1 a 10, no qual escore 1 é atribuído a um TS totalmente degenerado e sem células, enquanto escore 10 é avaliado a um TS íntegro e intacto (Johnsen,

1950). Aliado a isso, Kianifard *et al.* (2012) acrescenta a medição da espessura do ES como um parâmetro relevante, revelando perdas celulares.

Quanto à avaliação do interstício, MacLachlan *et al.* (2007) prioriza a notoriedade de CL e presença de células inflamatórias. Para além disso, Yalçin *et al.* (2020) traz à tona a busca de edemas e infiltrações do sistema inflamatório, fatores associados à diminuição do diâmetro dos túbulos. Em seu estudo, Bozkurt *et al.* (2018), avalia a presença de inflamação aguda, degeneração vacuolar, atrofia dos túbulos e necrose. Em consonância, Safarpour *et al.* (2024) traz a perspectiva de avaliar hiperemia e alterações nos padrões da população de CL.

Da mesma forma, outros métodos avaliativos podem ser aplicados, como a medição do diâmetro dos TS, bem como a quantificação de TS na amostra tecidual, de CL e CG (Kazemi *et al.*, 2016; Tesi *et al.*, 2020; Yalçin *et al.*, 2020).

## **2 OBJETIVOS**

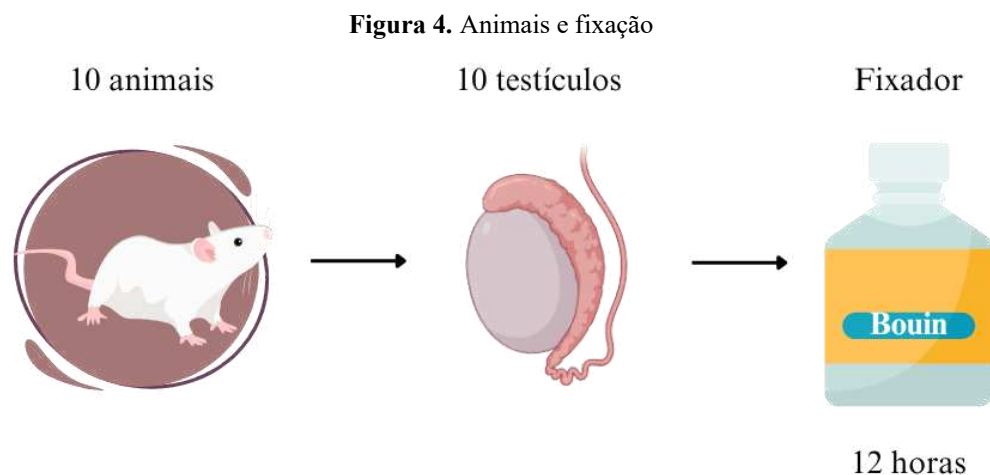
### **2.1 Objetivo geral**

Comparar a coloração de Tricrômico de Gomori (TG) e Hematoxilina e Eosina (HE) frente às alterações nos parâmetros morfológicos da arquitetura do tecido testicular de camundongos tratados com antineoplásico, 5-Fluorouracil (450mg/kg).

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Avaliar as alterações morfológicas nos túbulos seminíferos e interstício testicular de camundongos adultos tratados ou não com quimioterápico 5-FU na dose de 450mg/kg i.p. utilizando a coloração com HE;
2. Avaliar a aplicabilidade da coloração de TG para a identificação das alterações morfológicas de tecido testicular de camundongos tratados ou não com quimioterápico 5-FU na dose de 450mg/kg intraperitoneal;
3. Comparar a eficiência e aplicabilidade das duas técnicas de coloração para a avaliação morfológica do epitélio seminífero do tecido testicular e identificação dos diferentes estágios das células espermatogênicas.





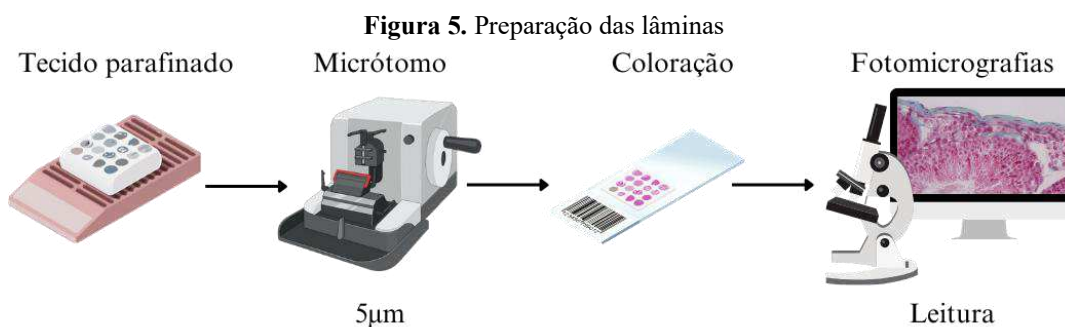
**Fonte:** Elaborada pela autora.

### 3.2 Processamento histológico e coloração das amostras biológicas

Para o processamento histológico, as amostras, previamente fixadas em Bouin, foram em seguida seccionadas longitudinalmente, inseridas em cassetes histológicos identificados e armazenados em álcool 70% até a etapa de inclusão.

Para a inclusão em parafina, o tratamento iniciou pela desidratação, etapa pela qual o álcool etílico, em concentrações crescentes, remove a água da amostra, sem que ocorram danos. Seguido pela diafanização, etapa em que o material é embebido em xilol, solvente orgânico que prepara as amostras para a impregnação com parafina. Por fim, a parafina é pré-aquecida e mantida em estado líquido a 60°C de modo que, após a impregnação, a amostra segue para o emblocamento em moldes de aço inoxidável e cassetes, que acondicionam as amostras.

Os cortes parafinados de tecido testicular foram preparados em micrótomo a 5µm de espessura, e as lâminas com tecido foram marcadas de acordo com seus respectivos grupos e animais. Executada a etapa de cortes, estes foram levados à estufa por 1 hora, aquecida a 60°C, para retirar o excesso de parafina, melhorando, dessa maneira, a adesão do corte à lâmina. Após essas etapas, o material estava pronto para ser corado.



**Fonte:** Elaborada pela autora.

### 3.2.1 Protocolo da coloração de Hematoxilina e Eosina

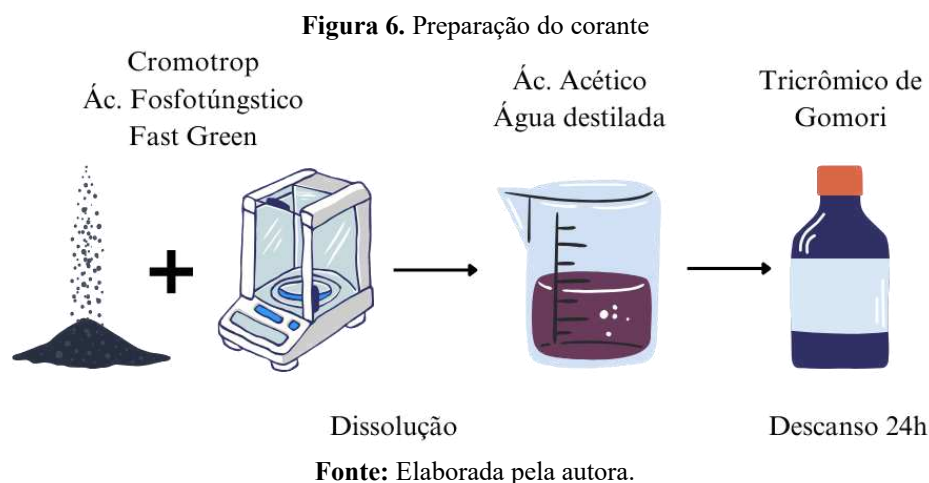
Para a coloração em HE, o protocolo utilizado foi baseado no trabalho citado em Molinaro (2010). O primeiro passo é a filtragem da solução de hematoxilina de Harris, que permite remover precipitados à base de óxido de mercúrio (Bancroft e Gamble, 2008).

Para o início da coloração, a desparafinização deve ser feita a partir de 2 imersões das lâminas no xilol, por 2 minutos cada. Seguida pela etapa de hidratação, por meio de sequências alcoólicas em concentrações decrescentes, assim, foram realizados 2 minutos de imersão em álcool etílico 100%, 90% e 70% até a água destilada. As lâminas, então, foram imersas em Hematoxilina de Harris por 2 minutos e depois lavadas por 1 minuto em água destilada, até que estas saiam sem excesso de corante. Em seguida, foram imersas em Eosina por 1 minuto e lavadas por 15 segundos em água corrente.

Posteriormente, as lâminas passaram pelo processo de desidratação, 15 banhos rápidos em concentrações alcoólicas crescentes: álcool 70%, 90% e 100% e, no fim, utilizou-se o xilol para a diafanização. Por fim, as lâminas recebem as lamínulas, selando os tecidos com Bálsamo do Canadá e prontas para a observação em microscopia de luz, após secas.

### 3.2.2 Protocolo da coloração de Tricrômico de Gomori

Para a preparação do corante de Gomori, foi necessário preparar a diluição dos reagentes em pó, adaptando o protocolo descrito por Gomori (1950), encontrado na obra de Molinaro (2010). Dessa maneira, 6g de C2R, 8g de ATP e 3g de FCF foram diluídos em 1 litro de água destilada, sempre homogeneizando a solução para evitar a formação de precipitados. Em seguida, foi adicionado 10ml de Ácido acético glacial à solução, que foi armazenada em frasco de vidro âmbar e deixada descansando por 24 horas antes de ser utilizada.



O protocolo de coloração seguiu as primeiras etapas gerais de coloração com poucas alterações em relação às etapas do corante de escolha. Primeiro, foi feita a desparafinização, realizada a partir de 2 imersões das lâminas no xilol, por 6 minutos cada, e 1 imersão em solução de álcool e xilol (proporção 1:1), por 3 minutos. Seguida pela hidratação, realizada com 2 minutos de imersão em álcool 100%, 80% e 70% até a água destilada.

Na etapa de coloração, as lâminas foram imersas em hematoxilina de Harris por 2 minutos e depois lavadas por 1 minuto em água destilada. Na última etapa de corante, foram imersas em Gomori por 18 minutos e novamente lavadas por 1 minuto em água corrente ao final do tempo. As lâminas passaram pelo processo de desidratação, 15 banhos rápidos em concentrações alcoólicas crescentes: álcool 70%, 80% e 100% e, no fim, utilizou-se o xilol como líquido intermediário entre o álcool e o meio de selagem, o Bálsamo do Canadá. Após seladas, as lâminas foram deixadas secando antes de posteriores análises ao microscópio de luz.

### **3.3 Análise morfológica do tecido testicular corado com Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Gomori**

Para a análise histológica do epitélio de cada grupo por coloração, foram selecionados aleatoriamente 15 túbulos seminíferos por animal (n=10) com secção transversal circular (Tesi *et al*, 2020), totalizando 300 túbulos, e classificados segundo adaptação da tabela de escores de Damasceno, (2023 - Tabela 1). Cada túbulo foi analisado em microscópio de luz seguindo os parâmetros morfológicos: integridade da membrana basal, organização do epitélio germinativo, vacuolização (gaps), retração do epitélio e alteração celular, como a perda celular no epitélio.

**Tabela 1** - Tabela de escores morfológicos epiteliais dos túbulos seminíferos

<b>Coloração:</b> _____				
<b>Animal:</b> _____	<b>Grupo:</b> _____	<b>Túbulo:</b> _____		
<b>Alterações epiteliais dos túbulos seminíferos</b>	0	1	2	3
Integridade da membrana basal				
Organização do epitélio seminífero				
Vacúolos (gaps)				
Retração do epitélio seminífero				
Perda das células epiteliais				
<b>Escore total</b>				

**Fonte:** Elaborada pela autora, adaptada de Damasceno (2023).

A análise dos parâmetros foi descrita de acordo com a Padronização de Avaliação Histológica (PAH) de Damasceno (2023), indo de 0 a 3 com relação a morfologia do ES, no qual 0 referiu-se a alterações mínimas na morfologia e 3 à total degeneração da estrutura do ES para cada parâmetro analisado (alta retração, desorganização epitelial e espaços intercelulares).

Assim, o componente membrana basal recebeu escore 0 quando se apresentava íntegro, contínuo e com organização de células mioides, escore 3 quando a arquitetura estava evidentemente perdida. Já a organização do ES levou em consideração a ordem celular durante a espermatogênese, assim, foi atribuído 0 quando ES era típico, e escore 3 quando havia desorganização da estratificação celular. Aliado a isso, os gaps ou vacúolos foram identificados quando se apresentaram redondos e bem delimitados, e foram classificados com escore 0 quando ocupavam até 10% da área avaliada, e escore 3, ao ultrapassar 80%. A retração do epitélio foi determinada a partir da separação deste em relação a base da membrana basal, separando os dois componentes, recebendo escore 0 quando o epitélio estava aderido à base, e escore 3 em separação total. Por fim, o parâmetro de perda celular quantificou as células germinativas, no qual, casos com até 10% de perda celular receberam escore 0 e perdas superiores a 80%, escore 3.

Em relação à avaliação do tecido conjuntivo, foram feitas análises por escore cruzado, utilizando os símbolos (-) e (+), em que (-) significou ausência da alteração e (+) marcou a modificação no tecido. O foco foi observar a presença de espessamentos da membrana basal, fibroses, dilatação dos vasos e degeneração de células de Leydig em toda a extensão da amostra (El-Sayyad *et al.* 2013; Safarpour *et al.*, 2024).

**Tabela 2** - Tabela de escores cruzados para o interstício.

<b>Coloração:</b> _____		
<b>Animal:</b> _____ <b>Grupo:</b> _____		
<b>Alterações intersticiais</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
Membrana basal espessa		
Fibrose		
Dilatação dos vasos		
Degeneração de células de Leydig		

**Fonte:** Elaborada pela autora, adaptada de Safarpour *et al.* (2024).

Além disso, também foram realizadas análises comparativas entre o interstício do tecido murino e bovino quanto aos componentes do compartimento intertubular, através da observação morfológica dos seguintes parâmetros: CL, fibroblastos, VS, TA e MB.

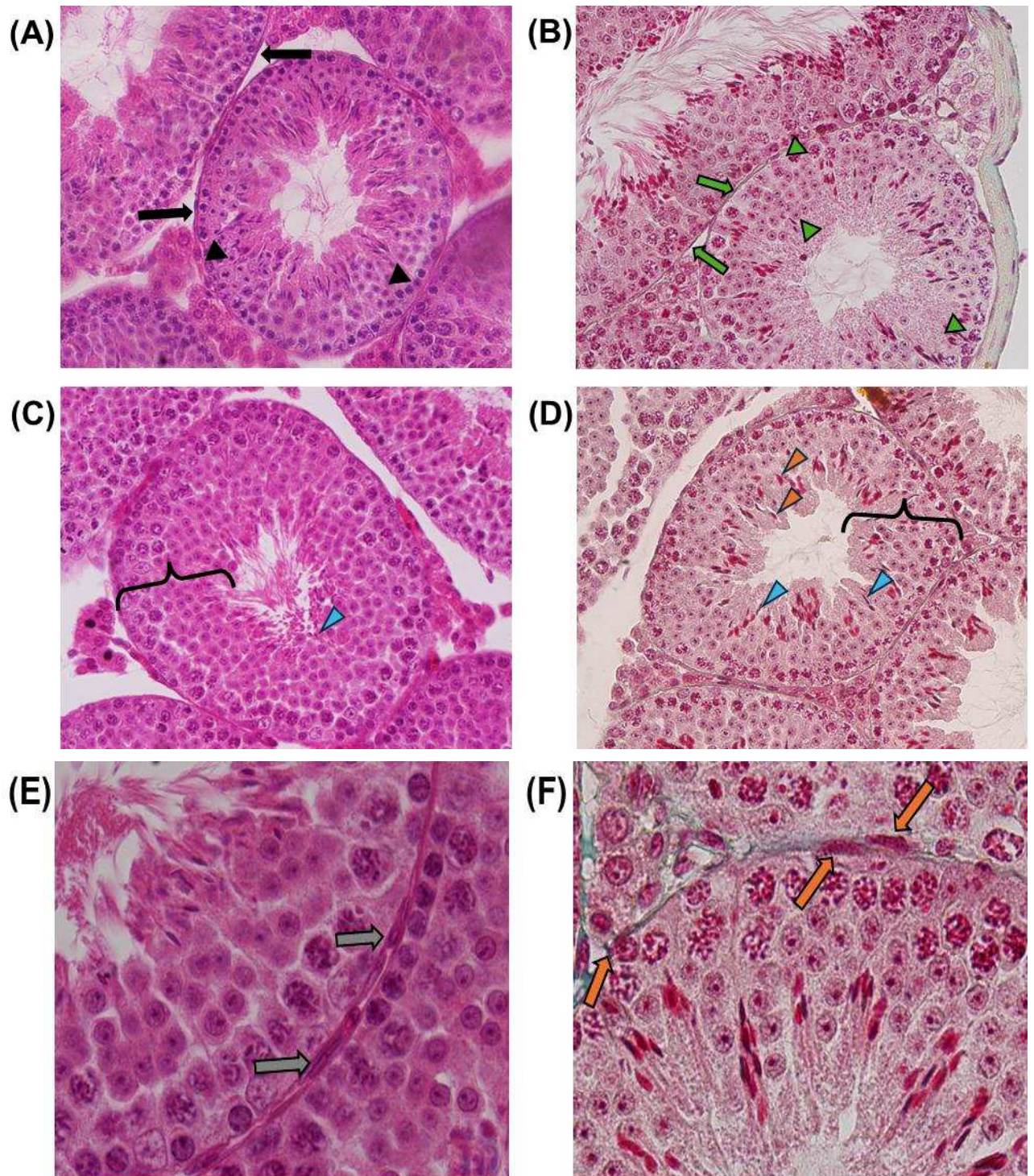
Finalmente, foi organizada uma prancha comparativa entre os dois tipos de coloração, a partir de fotomicrografias do interstício e dos TS de cada grupo, com aumento de 100, 400 e 1000x utilizando os softwares de imagem do microscópio NIS-Elements Br (Nikon Instruments; Calenzano, Itália) e Motic Images Plus 3.1 (Motic Asia; Kowloon, Hong Kong).

## 4 RESULTADOS

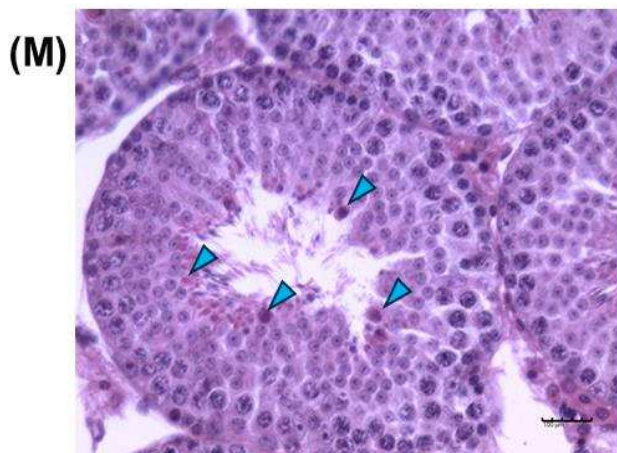
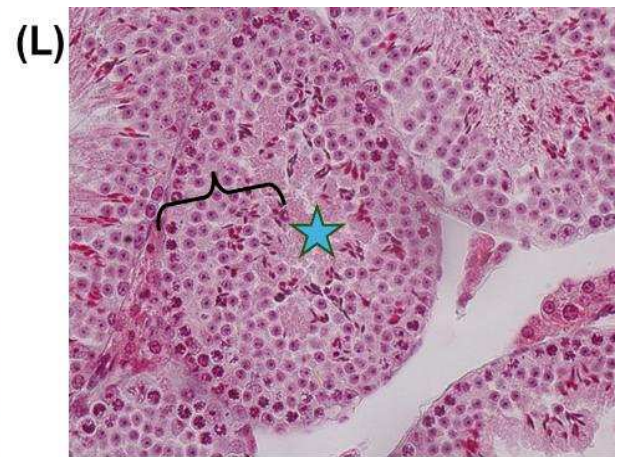
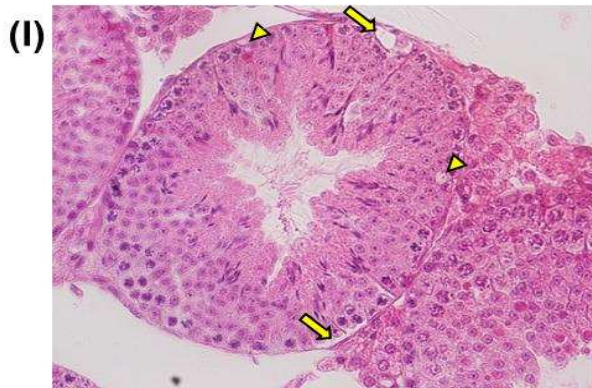
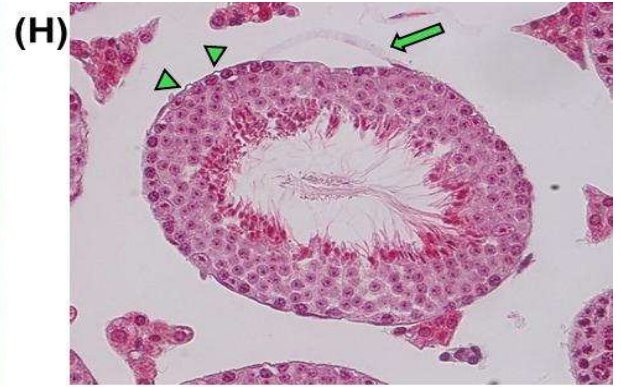
### 4.1 Análise morfológica do tecido epitelial murino

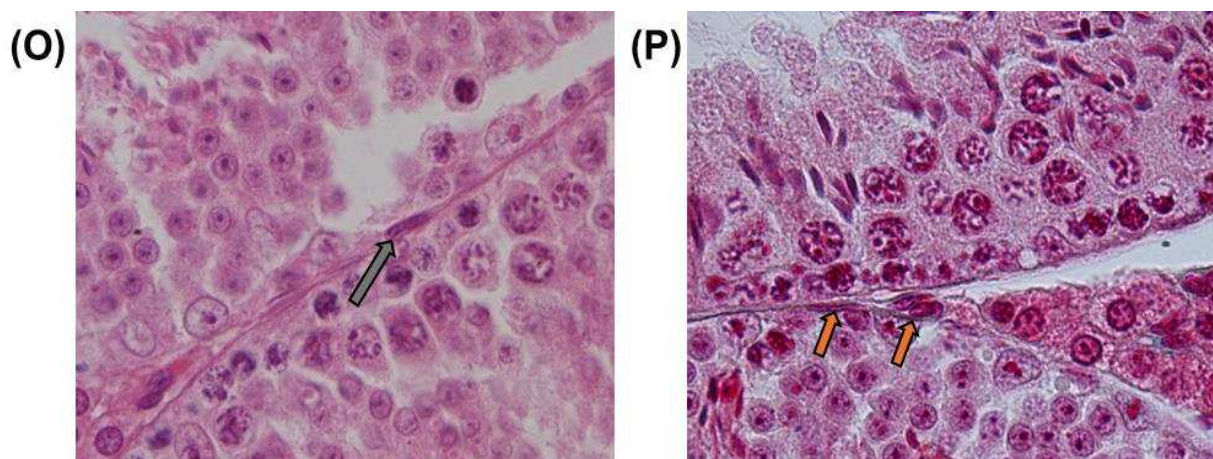
No grupo controle, os TS tiveram a organização típica da estratificação do epitélio preservada, bem como a morfologia das CG e CS foram mantidas dentro da normalidade. Não foram observadas vacuolizações intercelulares, retração do ES ou perda celular. A coloração de HE permitiu uma avaliação nítida das características nucleares e citoplasmáticas (Fig. 7-A), e forneceu uma boa definição das camadas celulares (Fig. 7-C), assim, a arquitetura geral dos túbulos foi bem destacada. As CM com seus núcleos roxos são visualizadas com nitidez apenas quando a ampliação de 1000x é implementada (Fig. 7E). A utilização de TG, apesar de ser comumente usada para destacar colágeno, proporcionou contraste suficiente entre o citoplasma das células mais periféricas e a MB (Fig. 7-B), demonstrando o contorno regular dos TS. Também identificou a estratificação típica do epitélio germinativo e a fase transicional entre ETT para SPZ foi beneficiada por TG (Fig. 7-D), distinguíveis em HE apenas pelo flagelo recém-formado.

Com base nas observações morfológicas, os efeitos do tratamento com 5-FU concentraram-se no epitélio germinativo dos TS, que gerou várias alterações histopatológicas observáveis. No grupo 5-FU, foram observadas: a retração do epitélio em sua associação com a MB; modificações na MB, com presença de ondulações; vacúolos redondos; desorganização celular, com ausência de lúmen; e redução das células espermatogênicas presentes nos TS. Além disso, foram observados debris celulares ao longo da camada celular e no lúmen, bem como a diminuição de SPZ. A utilização da HE viabilizou a identificação da desorganização celular e as perdas de populações de CG (Fig. 8-I,K). Em relação aos debris, HE foi sutil na distinção (Fig. 8-M) e as CM foram observadas com clareza apenas na ampliação de 1000x (Fig. 8-O). Já TG, permitiu observar de forma mais clara a retração do epitélio e descolamento da MB (Fig. 8-H,J), desorganização da distribuição celular (Fig. 8-L) e presença dos resíduos celulares (Fig. 8-N). As CM foram componentes ressaltados contra a MB com núcleos intensamente roxos em contraste com a MB discreta em verde, mesmo nas menores ampliações (Fig. 8-P).



**Figuras 7.** Fotomicrografias do epitélio seminífero do grupo controle comparando HE e TG. **A-C-E**, lâminas coradas com HE: **A**) Membrana basal (setas pretas) e citoplasma das células (pontas de setas pretas) - 400x; **C**) Organização do epitélio (chave preta), Espermatíde tardia (ponta de seta azul) - 400x; **E**) Células mioides (setas cinzas) - 1000x. **B-D-F**, lâminas coradas com TG: **B**) Membrana basal (setas verdes) e citoplasma das células (pontas de setas verdes) - 400x; **D**) Organização da arquitetura dos TS (chave preta), Espermatíde tardia (pontas de setas azuis), Espermatozoides (pontas de setas laranja) - 400x; **F**) Células mioides (setas laranja) - 1000x.





**Figuras 8.** Fotomicrografia do epitélio seminífero do grupo 5-FU, comparando HE e TG. **G-I-K-M-O**, lâminas coradas com HE: **G)** Membrana basal dobrada (setas pretas) - 400x; **I)** Retração da membrana (setas amarelas) e gaps (ponta de setas amarelas) - 400x; **K)** Desorganização do epitélio (chave preta) - 400x; **M)** Debris celulares (pontas de setas azuis) - 400x; **O)** Célula mioide (seta cinza) - 1000x. **H-J-L-N-P**, lâminas coradas com TG: **H)** Descolamento do epitélio (seta verde) e ondulações na membrana (pontas de setas verdes) - 400x; **J)** Retração do epitélio (setas brancas), gaps (pontas de setas brancas) - 400x; **L)** Desorganização epitelial (chave preta) e ausência de lúmen (estrela azul) - 400x; **N)** Debris celulares (setas azuis) - 400x; **P)** Células mioides (setas laranjas) - 1000x.

A tabela 3 apresenta a média dos escores atribuídos a cada parâmetro histológico, avaliados por meio das colorações de HE e TG, nos grupos CTRL e 5-FU. Esses escores refletem o grau de alteração tecidual observado qualitativamente. O grupo CTRL apresentou valores mínimos durante a avaliação, mantendo-se com os padrões morfológicos preservados e esperados. No 5-FU, observa-se um aumento de escores em todos os parâmetros, especialmente integridade da MB, a organização celular e a perda do epitélio seminífero, sugerindo que o quimioterápico induziu alterações teciduais perceptíveis.

**Tabela 3.** Média dos escores para cada parâmetro utilizando HE e TG.

Tratamento	Controle		5-FU	
	HE	TG	HE	TG
Integridade da Membrana Basal	0	0,2	0,3	0,73
Organização celular	0,04	0,1	0,21	0,78
Vacuolização	0,01	0,12	0,14	0,22
Retração da Membrana Basal	0	0,14	0,32	0,46
Perda epitelial	0,02	0,12	0,72	0,72

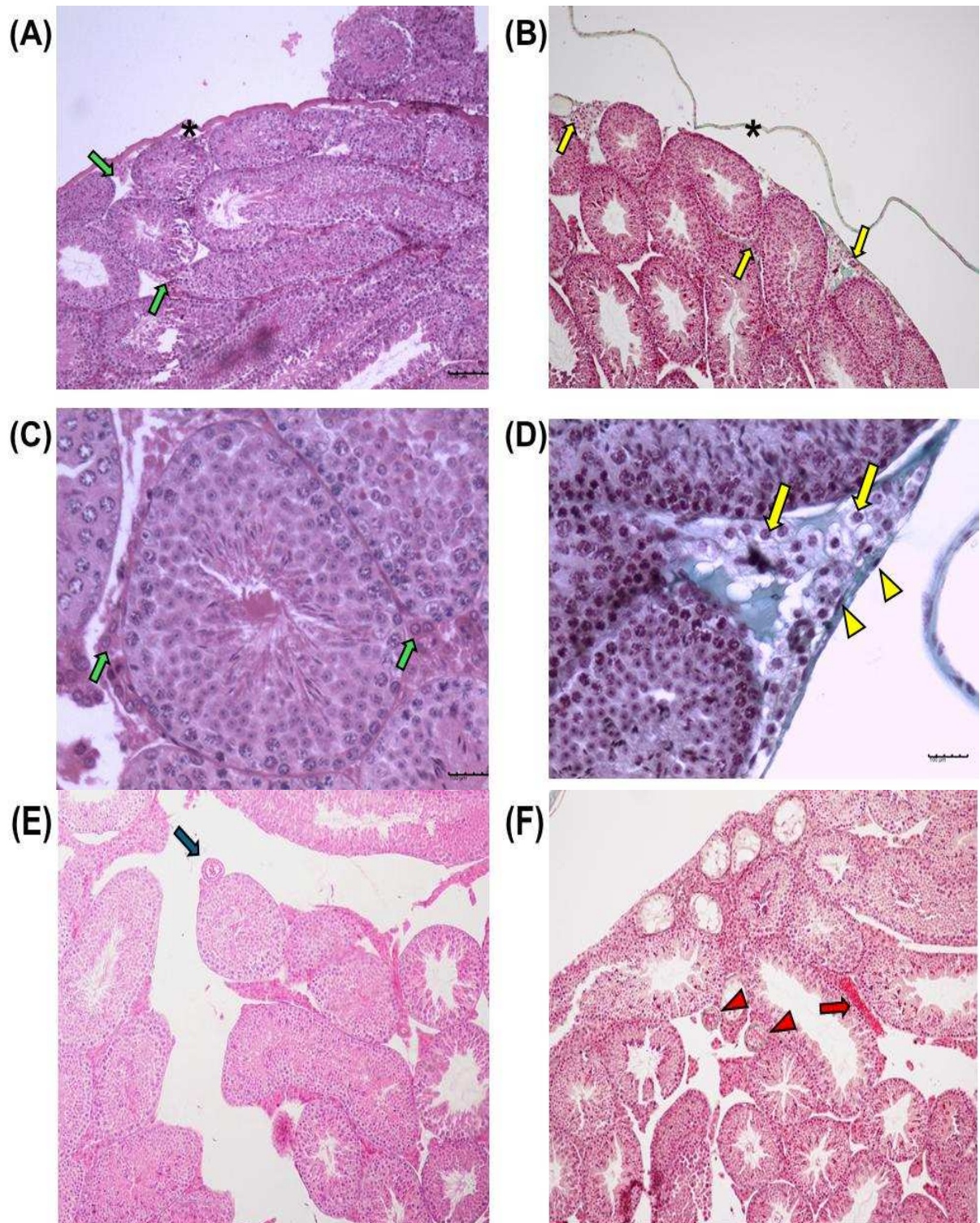
**Fonte:** Elaborada pela autora.

## 4.2 Análise morfológica do tecido conjuntivo murino

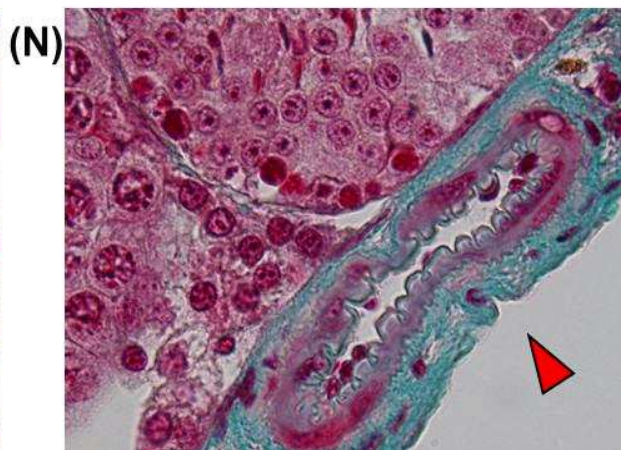
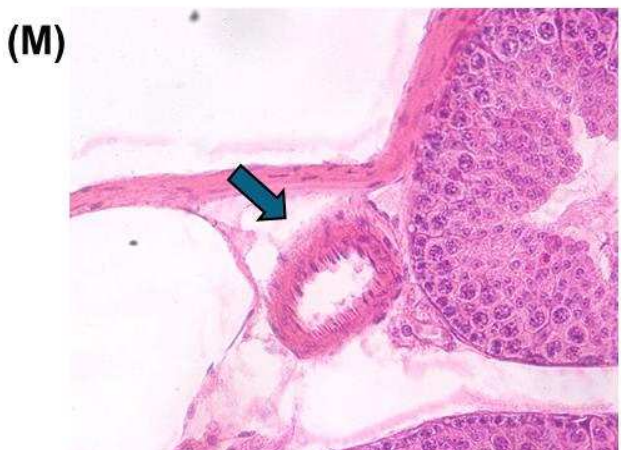
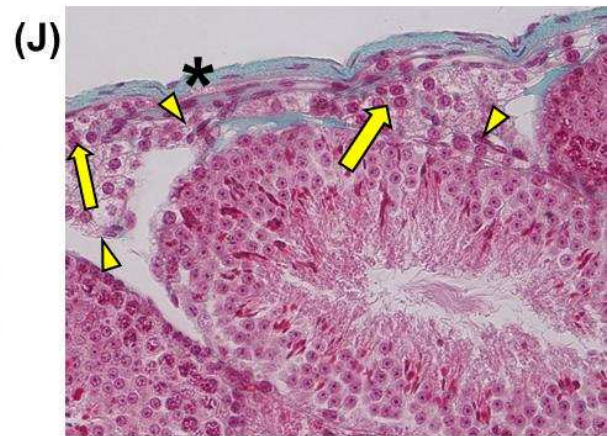
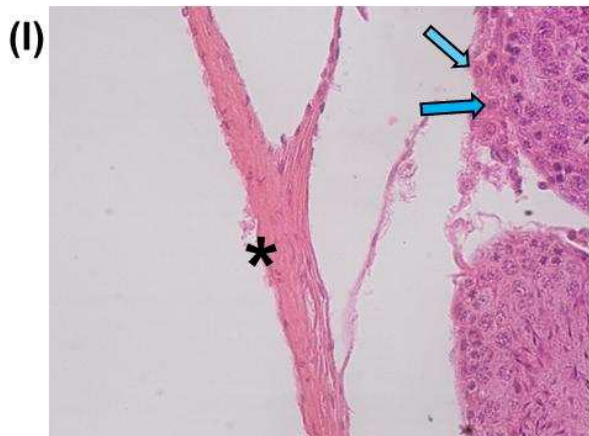
No grupo controle, o interstício apresentou-se regular entre os TS, entretanto, com pouca proporção de fibras colágenas. As CL tiveram sua morfologia assegurada, agrupadas em triângulos, e os vasos sanguíneos (VS) estavam distribuídos ao longo da amostra tecidual, também não foram observadas alterações na TA. A coloração por HE possibilitou uma identificação nítida de CL e VS, mesmo com poucos componentes na MEC (Fig. 9-A,C, E). A coloração de TG evidenciou, principalmente, a parede dos delicados VS (Fig. 9-B), e melhor distinção entre CL, células arredondadas com núcleo grande e central, e fibroblastos, células alongadas com pouco citoplasma e núcleo denso em roxo, embora presentes em menor quantidade (Fig. 9-B,D), e a TA (Fig. 9-F).

No grupo 5-FU as alterações no interstício também não foram proeminentes. As CL se mantiveram preservadas, com maior evidência dos VS nos animais avaliados. Alterações morfológicas nos componentes da MEC também não foram observadas. Dessa forma, HE proporcionou apenas a visibilidade das CL e a marcação geral da TA (Fig. 10-G,I), enquanto TG distinguiu os poucos fibroblastos presentes entre as CL e as fibras colágenas (Fig. 10-H,J). Com relação à TA, nota-se que TG permitiu maior detalhamento do tecido, favorecendo a observação e a integridade das fibras que a compõem, embora também não tenha sido avaliado nenhum tipo de dano diretamente ligado a esse componente (Fig. 10-I,J). Acerca dos VS, a leitura não demonstrou alterações proeminentes. Os VS observados são de pequeno a médio calibre e, novamente, TG sobressai mais seus aspectos que HE, especialmente os menores VS (Fig. 10-K,L). Aliado a isso, notou-se, qualitativamente, um aumento do espaço intertubular ocasionado pela diminuição do diâmetro dos TS, embora não tenha sido feita análise morfométrica para tal constatação.

De maneira geral, não foram observadas alterações estruturais densas no tecido conjuntivo intersticial de camundongos de ambos os grupos, devido à baixa frequência de colágeno expressa no tecido.



**Figuras 9.** Fotomicrografias do interstício do grupo controle, comparando HE e TG. **A-C-E**, lâminas coradas com HE: **A**) Túnica albugínea (asterisco) e interstício (setas verdes) - 100x; **C**) Células de Leydig (setas verdes) - 400x; **E**) Vaso em corte transversal (seta azul) - 100x. **B-D-F**, lâminas coradas com TG: **B**) Túnica albugínea (asterisco) e interstício (setas amarelas) - 100x; **D**) Células de Leydig (setas amarelas) e fibroblastos (pontas de setas amarelas) - 400x; **F**) Vasos sanguíneos em corte transversal (pontas de setas vermelhas) e longitudinal (seta vermelha) - 100x.



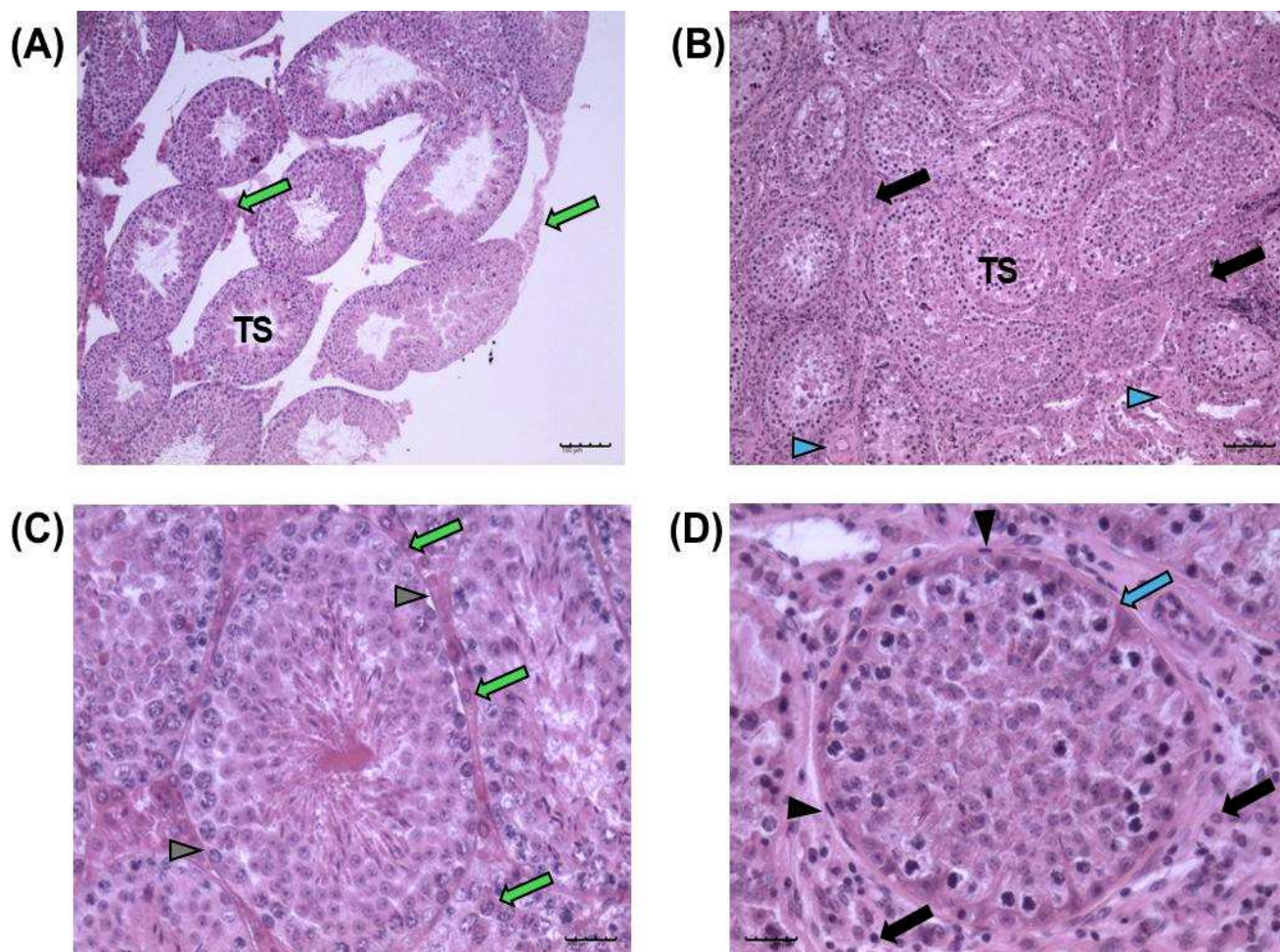
**Figuras 10.** Fotomicrografias do interstício do grupo 5-FU, comparando HE e TG. **G-I-K-M**, lâminas coradas com HE: **G**) Interstício (seta azul claro) e túnica albugínea (asterisco) - 100x; **I**) Células de Leydig (setas azuis claro) - 400x; **K**) Vaso em corte transversal (seta azul escuro) - 100x; **M**) Vaso sanguíneo em corte transversal (seta azul) - 400x. **H-J-L-N**, lâminas coradas com TG: **H**) interstício (setas amarelas) próximo a túnica albugínea (asterisco) - 100x; **J**) Células de Leydig (setas amarelas) e fibroblastos (pontas de setas amarelas) - 400x; **L**) Vasos sanguíneos em corte transversal (ponta de seta vermelha) e longitudinal (seta vermelha) - 100x; **N**) Vaso sanguíneo em corte transversal (ponta de seta vermelha) - 400x.

### 4.3 Análise comparativa entre tecido murino e bovino

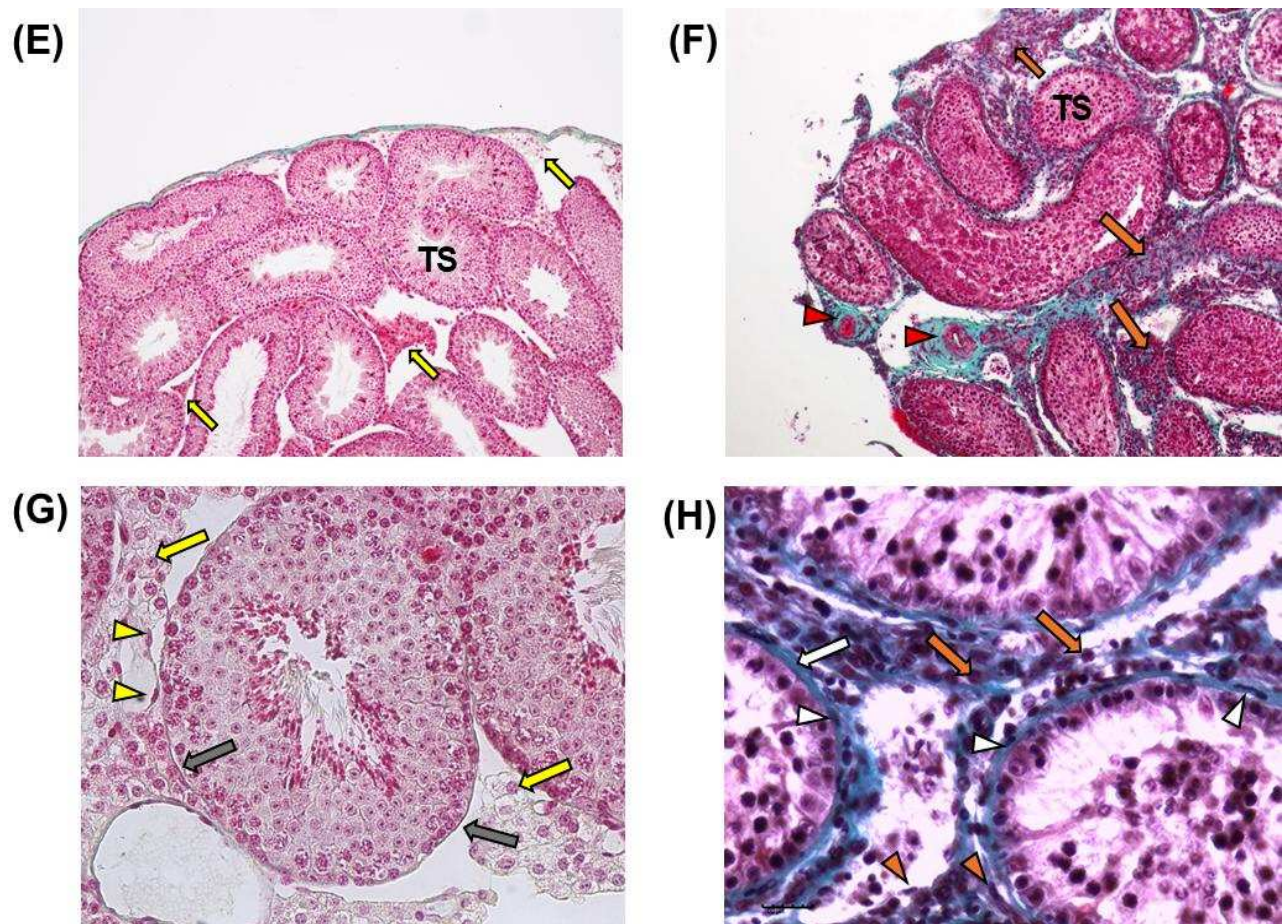
Neste trabalho, ao avaliar os grupos, em ambas as colorações utilizadas foi observado que o tecido testicular murino apresenta um maior espaço intertubular (Figuras 11-A e 12-E), justificado pela escassez de fibras colágenas, assim, seu interstício é mais disperso. Em HE, a arquitetura intersticial do tecido testicular de camundongos apresentou maior prevalência das ilhotas de CL com pouco conteúdo fibroso. Em relação a MB avaliada se mostrou delgada e com poucas CM finas ao redor dos TS (Figuras 11-C). Em TG foi possível observar todo o conteúdo estromal, com a evidência da presença de poucos fibroblastos e maior distinção da MB (Fig. 12-G).

O tecido testicular bovino, por sua vez, exibiu um interstício mais abundante e desenvolvido, com MEC bem espessa. Na coloração de HE, embora ainda seja observável a presença massiva de tecido conjuntivo, não há distinção objetiva entre as populações celulares, (Fig. 11-B), apenas as CL puderam ser notadas e apontadas, como na figura 11-D. Em contrapartida, a coloração intensa oferecida por TG mostrou a distribuição uniforme da matriz conjuntiva entre os TS, ao evidenciar a presença de fibras colágenas espessas e de fibroblastos, além de ilhotas de CL bem definidas (Fig. 12-H). A MB observada em bovino apresentou-se de maneira densa e as CM aparecem em maior quantidade envolvendo o TS, com maior detalhamento na leitura com TG (Figuras 11-D e 12-H). Adicionalmente, os vasos sanguíneos foram elementos que também apresentaram maior definição pela coloração de TG, em contraste com o tecido estrutural (Fig. 12-F).

Dessa maneira, o tecido bovino tem por característica principal, uma arquitetura resistente e robusta, o que está ligado diretamente às necessidades de um órgão de animal de maior porte, assim como o tecido murino reflete a sutileza compatível a um animal de menor porte. Infere-se, nesse contexto, que utilizar a coloração TG permitiu avaliar as mudanças na estrutura e na composição do interstício em ambas as espécies, mas com ênfase nas espécies de maior porte, com foco principalmente na riqueza das fibras colágenas e células intersticiais,



**Figura 11.** Fotomicrografias para comparação histológica entre tecido murino e bovino usando HE. **A-C**, lâminas de testículo de camundongo: **A)** Interstício (seta verde) - 100x; **C)** Células de Leydig (setas verdes) e membrana basal (pontas de setas cinza) - 400x. **B-D**, lâminas de testículo de touro: **B)** Interstício (setas pretas) e vasos sanguíneos transversais (pontas de setas azuis) - 100x; **D)** Células de Leydig (setas pretas), membrana basal (seta azul) e células mioides (pontas de setas pretas) - 400x.



**Figura 12.** Fotomicrografias para comparação histológica entre tecido murino e bovino corados com TG. **E-G**, lâminas de camundongos: **E**) Interstício (setas amarelas) - 100x; **G**) Células de Leydig (setas amarelas), fibroblastos (pontas de setas amarelas), membrana basal (setas cinza) - 400x. **F-H**, lâminas de touro: **F**) Interstício (setas laranja) e vasos sanguíneos (pontas de setas vermelhas) - 100x; **H**) Membrana basal (seta branca), células mioides (pontas de setas brancas), células de Leydig (setas amarelas) e fibroblastos (pontas de setas laranja) - 400x.

## 5 DISCUSSÃO

Diante do exposto, as análises morfológicas neste trabalho revelaram alterações expressivas nos túbulos seminíferos no grupo tratado com o antineoplásico, particularmente no ambiente intratubular. Os achados encontram concordância com os estudos de D'Souza e Narayana (2001), Fahmy *et al* (2020), Ghafouri-Fard *et al.* (2021) e Demir *et al.* (2025) que descrevem os efeitos citotóxicos do 5-FU no metabolismo das células germinativas. Embora o órgão não tenha um volume grande de tecido conjuntivo, utilizar uma coloração diferencial, ofereceu sensibilidade e confiabilidade na leitura dos parâmetros estabelecidos.

Dentre os achados no presente trabalho, muitos túbulos exibiram degeneração total das CG, cuja organização marcante está vinculada fortemente ao funcionamento normal dos testículos (Pirzaman *et al.*, 2023), em concordância com Smart *et al.* (2017), que aponta os efeitos drásticos de perda das CG causados por drogas quimioterápicas em concentrações são relevantes. Esse critério leva a perda da estratificação das populações celulares e diminui a quantidade e qualidade de SPZ produzidos. Além disso, a retração do epitélio germinativo relatada demonstra que o fármaco afeta os microtúbulos de CS e reduz a ancoragem das CG a MB (Narayana *et al.*, 2000). Narayana *et al.* (2000) ainda apontam que essas células soltas podem ser encaminhadas ao longo dos TS e essa falha pode, eventualmente, bloquear a passagem nos ductos eferentes, comprometendo o fluxo espermático. Embora ambas as colorações tenham sido funcionais, a utilização de TG favoreceu a distinção entre os elementos do ES, com superior nitidez da desorganização epitelial e retração, como uma ferramenta mais sensível para evidenciar colapsos no ES.

Além disso, apenas no grupo 5-FU, alguns túbulos exibiram uma coleção de debris celulares no lúmen. De acordo com Cheng *et al.* (2018), são fragmentos de células em apoptose ou necrose, decorrentes da toxicidade causada pela natureza do quimioterápico. Nesta investigação, esses resíduos não foram considerados artefatos, pois somente foram encontrados no grupo que recebeu o tratamento com 5-FU. Diante disso, a observação desses resíduos foi melhor evidenciada com a coloração de TG, pois o contraste dos corpos intensamente corados em vermelho destacou-se em detrimento dos núcleos em roxo das CG, danos esses que podem não ser evidenciados com a coloração convencional.

O interstício localizado no ambiente intertubular é fundamental para manter a homeostase do tecido testicular. As células intersticiais promovem a estabilidade das SSCs, garantindo a espermatogênese e assegurando a fertilidade masculina (Heinrich e DeFalco, 2019). Além disso, trata-se de um espaço altamente vascularizado, que possibilita a troca de

nutrientes, hormônios e oxigênio, e o colágeno presente entre os TS, mantém a integridade do tecido (Heinrich e DeFalco, 2019; Pirzaman *et al.*, 2023). Aliado a isso, a utilização de 5-FU está relacionada a um aumento na deposição de colágeno, visto que o testículo é um órgão sensível aos efeitos tóxicos dos quimioterápicos (Pirzaman *et al.*, 2023). Entretanto, os achados nesse trabalho contrastam com os de Sarfapour *et al.* (2024) e de Medeiros *et al.* (2023) que relataram lesões intersticiais intensas após a administração do 5-FU, incluindo fibrose, edema, hiperemia e a dilatação dos VS.

No presente estudo, não foi observada fibrose evidente nos tecidos avaliados, sugerindo que não houve deposição excessiva de colágeno, embora seja uma alteração associada ao fármaco. Na avaliação do tecido murino aqui descrita, apesar da quantidade pouco expressiva de componentes da MEC, a coloração de Gomori ofereceu distinção entre os poucos elementos presentes em contraste as CL, devido à marcação específica das fibras colágenas em verde pelo corante FCF. Adicionalmente, embora os núcleos das células intersticiais sejam corados com hematoxilina, o contraste citoplasmático fornecido por C2R possibilitou a diferenciação entre o núcleo, em roxo, e citoplasma, em vermelho. Esse contraste facilitou a identificação das CL e dos fibroblastos no interstício, por contraposição citoplasmática. A coloração TG também contribuiu para a nitidez da TA e a integridade do estroma do grupo controle, favorecendo a análise de eventuais espessamentos na distribuição das fibras colágenas coradas em azul-esverdeado. Dessa maneira, caso os tecidos tratados com 5-FU apresentassem concentração de fibras em TA, TG permitiria melhor delimitação dessas alterações, em detrimento de HE. Em linhas gerais, a coloração de TG ofereceu maior caracterização estromal, detalhando melhor a arquitetura geral do tecido de sustentação.

É de extrema importância considerar e reconhecer irregularidades nas células peritubulares que podem acarretar dificuldades na produção e no tráfego de SPZ (Zhou *et al.*, 2019). É válido ressaltar que as células peritubulares em diferentes mamíferos se apresentam em maior distribuição, sempre muito finas e fusiformes, entretanto, em murinos, são células dispersas e em pouca quantidade (Mayerhofer, 2013). Esse pode ser um fator determinante da delicadeza encontrada ao observar a membrana que corresponde a delimitação de TS de murinos e corrobora com a necessidade de evidenciá-la o máximo possível, como ocorreu em TG.

Além disso, reconhecer danos causados à MB também é uma característica vantajosa na identificação de TS degenerados, visto que o 5-FU também pode ser associado ao espessamento desse componente (Pirzaman *et al.*, 2023). De acordo com Pohl *et al.* (2021), quando a MB é lesionada, ocorre a destruição do microambiente propício para a diferenciação

das CG. A MB separa as interações entre intra e intertubular, de modo que sua desorganização pode reduzir a densidade espermato gênica e até a ruptura do processo como um todo. Neste trabalho, não foi observado o espessamento dessa estrutura, e a utilização de TG favoreceu distinção da MB envolvendo os TS, podendo notar rupturas e ondulações que prejudicam a adesão ao ES

Entretanto, durante as análises foi notada uma baixa quantidade de tecido conjuntivo intersticial em ambos os grupos de camundongos corroborada pela literatura (Mayerhofer, 2013, Scudamore *et al.*, 2014). Essa constatação impactou diretamente a avaliação da eficácia de TG nesse contexto, uma vez que seu diferencial está relacionado exatamente ao contraste entre epitélio e colágeno. Apesar da distinção entre CL e fibroblastos ter sido possível, a escassez das fibras colágenas dificultou a visualização do estroma, pois a coloração evidencia os componentes fibrilares da MEC. Por consequência, foi um fator que dificultou a comprovação da eficiência da coloração, o que pode ter limitado a avaliação de parâmetros para o tecido conjuntivo em observar a integridade do estroma testicular. Isto posto, foram consideradas particularidades morfológicas intrínsecas às espécies de portes distintos, e a variação da técnica de TG ao avaliá-las. Tornou-se, então, relevante discutir se a própria espécie possui uma fraca constituição de tecido conjuntivo. Para tanto, foi feita a comparação entre o tecido testicular de camundongos e de touros, assim, foi possível discutir a aplicabilidade e o que foi observado em cada modelo.

Em seu trabalho comparativo entre mamíferos através de microscopia eletrônica, Fawcett *et al.* (1973) trazem descrições sobre a organização do tecido intersticial nos testículos de diversas espécies, dentre elas, camundongos e touros. O autor afirma que a composição do interstício de camundongos (*Mus musculus*) e de ratos (*Rattus rattus*) muito se assemelha ao do porquinho-da-índia (*Cavia porcella*). Dessa maneira, o tecido conjuntivo é muito escasso nessas espécies, sua expressão está restrita a poucas células fusiformes de fibroblastos e em pequenos feixes de fibrilas ao redor dos vasos, CL e TS, de tal modo que podem ser observados espaços vazios no meio intertubular. Acerca do encontrado em touros (*Bos taurus*), o autor correlaciona ao tecido de carneiros (*Ovis aries*), cujas CL são discretas e mais isoladas em meio a um estroma rico em colágeno e fibroblastos, até no suporte oferecido aos vasos de alto calibre.

O interstício bovino, assim, é abundante em tecido conjuntivo frouxo e as características observadas estão de acordo com a complexidade estrutural e volume testicular da espécie. Seu tecido é bastante valorizado ao se utilizar TG pois seu conteúdo é destacado com intensidade elevada em azul-esverdeado. Em contrapartida, o que pode ser considerado quando se examina o interstício de murinos é a fragilidade da arquitetura, dada a ausência de

um suporte no estroma e quais as consequências de ter os TS vulneráveis. Esse é um fator que pode estar relacionado à propensão desse tecido a obter artefatos, devido a fixadores e manuseio, como retratado por Scudamore (2014).

Segundo Aarestrup (2012), apesar da frequente suposição que roxo é mais escuro que rosa, existem infinitas tonalidades entre essas cores, fato esse que pode levar a erros na identificação do tecido. Até o presente momento, a técnica convencional de HE é a mais utilizada e reflete muito bem a arquitetura geral e, embora eficiente, demonstra dificuldades em aspectos mais difíceis como a observação da membrana basal e alterações ocasionadas desse aspecto. Dessa maneira, é importante implementar métodos diferenciais de coloração pois, a partir deles, é possível minimizar erros durante a leitura (Everett; Miller, 1974).

Em consequência disso, a implementação de colorações tricromáticas em análises de tecidos danificados por quimioterápicos conversa com Chen *et al.* (2011), pois o contraste oferecido entre os tecidos conjuntivo e epitelial permite informações vitais sobre a disposição do tecido observado, ressaltando colaterais. A comparação entre as colorações reforça o potencial do TG como técnica que beneficia a evidência da matriz extracelular e a avaliação estrutural em diferentes modelos animais.

O destaque que a coloração de TG proporcionou ao tecido epitelial analisado foi a distinção das populações celulares. Ambas as técnicas apresentaram eficácia na identificação dos tipos celulares que sequenciam a espermatogênese. Dessa forma é fundamental aplicar para a análise das alterações ligadas à matriz extracelular e a arquitetura intersticial. Enquanto HE é uma técnica adequada para a avaliação geral do tecido, inferimos que TG, de fato, mostrou-se fundamental para a análise das alterações ligadas à matriz extracelular e a arquitetura intersticial. Os achados conduzidos neste estudo reforçam o papel complementar de TG à HE, o padrão-ouro na técnica histológica.

Por outro ângulo, é importante mencionar que podem ocorrer interferências durante o processamento do tecido. Nesse contexto, o tipo de fixador utilizado deve ser compatível com o tecido, pois agentes como o formol, de acordo com McLachlan *et al.* (2007), podem causar encolhimento dos TS e alterar a percepção ao longo da avaliação. Além disso, na hora da dissecação dos testículos de camundongos, uma compressão forte pode levar a retração do epitélio e ao aparecimento de células esfoliadas no lúmen, que podem ser confundidas com achados patológicos (Scudamore, 2014). De mesmo modo, a subjetividade de leitura também pode ser abordada, a vista disso, o avaliador deve ser capaz de reconhecer os tipos celulares individualmente por sua morfologia típica e atípica (McLachlan *et al.*, 2007). Fawcett *et al.* (1973) trazem à tona, também, que artefatos de encolhimento podem ser obtidos pela escassez

de colágeno entre os TS. Verificou-se também que Fawcett *et al* (1973) utilizou-se de fixadores clássicos para microscopia eletrônica, como: tampão 5% glutaraldeído; ácido pícrico, paraformaldeído e glutaraldeído, para fixação proteica; além de tetróxido de ósmio. Tais componentes são diferentes dos utilizados tradicionalmente para a histologia, o que pode ser citado como um viés para a observação rica e detalhada de seu trabalho. Adicionalmente, embora Narayana *et al.* (2000) afirme que mesmo as doses mais baixas de 5-FU são gonadotóxicas, é considerável avaliar se o tempo de exposição ao antineoplásico neste trabalho foi suficiente para causar danos severos à MEC.

Além disso, ressalta-se que existem poucos estudos que investiguem a presença e disposição de fibras colágenas no compartimento intersticial, especialmente em murinos. Essa é uma lacuna que dificultou o entendimento das diferenças morfológicas entre espécies e, para além disso, os impactos que agentes antineoplásicos podem ocasionar na estrutura testicular.

Vale salientar o presente estudo trouxe ineditismo ao comparar as duas colorações histológicas com a finalidade de observação das alterações em tecido murino submetidos a ação de agentes quimioterápicos e ao comprovar que a coloração de TG pode ser viável para tais análises por sua sensibilidade elevada. Essa coloração favoreceu, assim, a percepção de danos sutis em causados a esses tecidos. A utilização de TG neste trabalho também se mostrou uma ferramenta favorável na leitura de lâminas histológicas em animais de maior porte, como bovinos, permitindo a distinção completa clara dos componentes do interstício, especialmente nas fibras colágenas espessas e os VS de grande calibre. Outrossim, enfatiza-se que as análises morfológicas conduzidas tiveram caráter qualitativo, visto que não foram aplicados testes estatísticos para a validação numérica dos resultados obtidos. Ressalta-se que o foco foi a identificação dos padrões morfológicos, com ênfase na aplicabilidade de uma coloração diferencial para uma validação robusta da leitura histopatológica.

De maneira geral, estudos futuros poderiam complementar os achados do atual trabalho ao incorporar métodos quantitativos em relação à quantidade de colágeno intersticial encontrado em murinos, de modo a alavancar o aproveitamento do potencial da coloração tricrômica, bem como a morfometria dos TS para validação da diminuição do diâmetro observada. Além disso, se sugere a avaliação morfológica de CS, visto que a sua funcionalidade essencial no testículo e estudos sugerem que o 5-FU causa alterações morfológicas nessas células (Naren *et al.*, 2022). Para investigações futuras, a utilização de colorações específicas como Alcian Blue poderia ser indicada, visto que marcam as glicoproteínas presentes na MB (Wardi e Allen, 1972; Mukai *et al.*, 2020), contribuindo para uma análise mais robusta das alterações estruturais.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o Tricrômico de Gomori é um método de coloração diferencial eficaz para a análise histológica de testículos de camundongos, ao fornecer maior compreensão e precisão na identificação dos tecidos conjuntivo e epitelial, tanto em condições de controle quanto após tratamento com quimioterápicos. A coloração se mostrou competente para evidenciar a análise dos impactos causados na arquitetura epitelial germinativa dos túbulos seminíferos após a exposição do tecido a toxicidade do agente antineoplásico, 5-Fluorouracil, especialmente quanto a presença de debris, retração epitelial e a disposição das células espermatogênicas. No interstício testicular, apesar das limitações inerentes ao tecido murino, TG permitiu visualização detalhada dos componentes da matriz extracelular, com realce de fibroblastos entre as células de Leydig, além da conservação da membrana basal e das células mioides. Esses achados reforçam a sensibilidade da técnica na detecção de danos estruturais sutis, contribuindo para um diagnóstico morfológico robusto. Portanto, os achados neste trabalho validam a relevância do TG em avaliações histopatológicas ao fornecer informações fundamentais sobre a toxicidade do 5-FU, tanto na espermatogênese quanto no tecido de suporte. A técnica se consolida de maneira complementar e confiável para estudos que evidenciam alterações delicadas, com aplicabilidade em investigações sobre os efeitos de agentes quimioterápicos na função reprodutiva masculina.

## REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, B.J. **Histologia Essencial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. E-book. p.13.
- ABRAHAMSOHN, P. **Histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. E-book. p.9.
- ADAMCZEWSKA, D.; SŁOWIKOWSKA-HILCZER, J.; WALCZAK-JĘDRZEJOWSKA, R. The Fate of Leydig Cells in Men with Spermatogenic Failure. **Life**, v. 12, n. 4, p. 570, 2022.
- ALMEIDA, V. L. DE . *et al.*. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.
- BANCROFT, J. D.; GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques**. 6. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2008.
- BARROS, S. F. M. **Avaliação do efeito anti-inflamatório e antioxidante do extrato hidroalcoólico do cogumelo *Agaricus blazei* Murill, dos seus polissacarídeos e da água ozonizada na mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil**. Dissertação (Mestre em Ciências Morfofuncionais) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, p. 93, 2025.
- BASAK, D. *et al.* Comparison of Anticancer Drug Toxicities: Paradigm Shift in Adverse Effect Profile. **Life**, v. 12, n. 1, p. 48. 2021.
- BEHRANVAND, N. *et al.* Chemotherapy: a double-edged sword in cancer treatment. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 71, p. 507-526, 2022.
- BOZKURT, M. *et al.* Protective effect of hydrogen sulfide on experimental testicular ischemia reperfusion in rats. **Journal of Pediatric Urology**, v. 16, n. 1, p. 41-48, 2020.
- BRASILEIRO FILHO, GERALDO. **Bogliolo - Patologia**. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021. E-book, p. 128.
- BRYDØY, M. *et al.* Gonadal dysfunction and fertility problems in cancer survivors. **Acta Oncologica**, v. 46, n. 4, p. 480–489, 2007.
- CHANG, J. *et al.* Chemotherapy-generated cell debris stimulates colon carcinoma tumor growth via osteopontin. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 1, p. 114-125, 2018.
- CHEN, H.; GE, R.-S.; ZIRKIN, B. R. Leydig cells: From stem cells to aging. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 306, n. 1-2, p. 9–16, 2009.
- CHEN, J. *et al.* Assessment of Cardiovascular Fibrosis Using Novel Fluorescent Probes. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. e19097, 2011.
- CHENG, L. *et al.* Testicular cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1–24, 2018.
- CONSENTINO, M.J. *et al.* Histopathology of prepubertal rat testes subjected to various

durations of spermatic cord torsion. **J Androl**, v.7, p. 23-31, 1986.

D'SOUZA, U.J.A. Toxic effects of 5-Fluorouracil on sperm count in wistar rats. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 10, n.1, p. 43-45, 2003.

DA SILVA LIMA, D. *et al.* Aluminum exposure promotes histopathological and pro-oxidant damage to the prostate and gonads of male and female adult gerbils. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 116, p. 104486, 2020.

DAMASCENO, T. R. **Padronização de uma tabela de escores morfológicos para avaliação do tecido testicular bovino criopreservado: uma proposta.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, p.47, 2023.

DE OLIVEIRA KLEIN, M. *et al.* Detection of anti-cancer drugs and metabolites in the effluents from a large Brazilian cancer hospital and an evaluation of ecotoxicology. **Environmental Pollution**, p. 115857, 2020.

DE RIJK, E. P. C. T. *et al.* A Fast Histochemical Staining Method to Identify Hyaline Droplets in the Rat Kidney. **Toxicologic Pathology**, v. 31, n. 4, p. 462–464, 2003.

DELESSARD, M. *et al.* Exposure to Chemotherapy During Childhood or Adulthood and Consequences on Spermatogenesis and Male Fertility. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1454, 2020.

DEMIR, E. A. *et al.* Relieving 5-fluorouracil-associated testicular toxicity in rats: Investigating the therapeutic potential of arbutin. **South African Journal of Botany**, v. 179, p. 22–30, 2025

DIBAL, N. I.; GARBA, S. H.; JACKS, T. W. Histological stains and their application in teaching and research. **Asian Journal of Health Sciences**, v. 8, n. 2, p. 43–43, 2022.

D'SOUZA, U.J.A.; NARAYANA, K. Induction of seminiferous tubular atrophy by single dose of 5-Fluorouracil (5-FU) in wistar rats. **Indian J Physiol Pharmacol**, v. 45, n.1, p. 87-94, 2001.

DUFFIN, K. *et al.* Impacts of cancer therapy on male fertility: Past and present. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 100, p. 101308, 2024.

EL-SAYYAD, H.I.H *et al.* Effects of Adriamycin, Cisplatin and 5-Fluorouracil on the testes of albino rats. **British Journal of Medical and Health Sciences**, v. 1. n.5, p.45-62, 2013.

ELSTEHA, A. R. A. *et al.* Effects of platelet rich plasma on 5-fluorouracil induced degeneration on the testis of adult male albino Rats. **Tanta Medical Journal**, v. 53, n. 2, p. 279–286, abr. 2025.

EMOKPAE, M. A.; IGHARO, O. G. Linking senescence, apoptosis, and oxidative stress in fertility. **Aging**, p. 113–123, 2020.

FAHMY, M. A. *et al.* Genotoxicity and sperm defects induced by 5-FU in male mice and the possible protective role of *Pentas lanceolata*-iridoids. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 850-851, p. 503145, 2020.

- FAJA, F. *et al.* Environmental disruptors and testicular cancer. **Endocrine**, v. 78, p. 429-435, 2022.
- FARIA, E. F.; FREITAS JUNIOR, C. H. Câncer de Testículo. In: Arquimedes Nardoza Júnior; Miguel Zerati Filho; Rodolfo Borges dos Reis. (Org.). **Urologia Fundamental**. 1 ed. São Paulo: Planmark, 2010, p. 179-188.
- FAWCETT, D.W. *et al.* Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. **Biol. Reprod.**, v. 9, p.500-532, 1973.
- FERREIRA, C. J. S. Collagen content and C-X-C motif chemokine ligand 12 expression in neoplastic breast stroma. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 69, p. e20221210-e20221213, 2023.
- GARTNER, L. P. **Tratado de Histologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2022. E-book, p.500.
- GHAFOURI-FARD, S. *et al.* 5-Fluorouracil: A Narrative Review on the Role of Regulatory Mechanisms in Driving Resistance to This Chemotherapeutic Agent. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 658636, 2021.
- GIONA S. The Epidemiology of Testicular Cancer. In: Barber N, Ali A, editors. **Urologic Cancers**. Brisbane (AU): Exon Publications; 2022. Chapter 9.
- GOLSARI, A. *et al.* Prevalence of adult Pompe disease in patients with proximal myopathic syndrome and undiagnosed muscle biopsy. **Neuromuscular Disorders**. v. 28, n. 3, p. 257–261, 2018.
- GOMORI, G. A rapid one-step trichrome stain. **American Journal of Clinical Pathology**, v.20, p. 661-664, 1950.
- GOSLING, J A. **Anatomia Humana**. 6. ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2019. E-book, p.168.
- GRAAFF, K. M. V. **Anatomia Humana**. 6. ed. Barueri: Manole, 2003. E-book, p.702.
- HEINRICH, A.; DEFALCO, T. Essential roles of interstitial cells in testicular development and function. **Andrology**, v. 8, n. 4, p. 903-914, 2019
- ISMAIL, NI; IBHARM, SF. Chemotherapy – Types, Side Effects and Resistance. **Journal of Tomography System and Sensor Application**, v. 3, n. 2, 2020.
- ITO, Y. *et al.* A method for utilizing automated machine learning for histopathological classification of testis based on Johnsen scores. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021.
- JAN, S. Z. *et al.* Molecular control of rodent spermatogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 12, p. 1838–1850, 2012.
- JOHNSEN, S.G. Testicular biopsy score count- a method for registration of spermatogenesis in human normal values and results in 335 hypogonadal males. **Hormones**, v.1, p.2-25, 1970.

JUNQUEIRA, L. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: Texto e Atlas**. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 101; 2023.

KAZEMI, S. *et al.* Histopathology and histomorphometric investigation of bisphenol a and nonylphenol on the male rat reproductive system. **North American Journal of Medical Sciences**, v.8, n.5, p.215-221, 2016.

KIANIFARD, D. *et al.* The ultrastructural changes of the sertoli and leydig cells following streptozotocin induced diabetes. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 15, n.1, p.623-635, 2016.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e Biologia Celular - Uma Introdução à Patologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2021.

LEE, S. J. *et al.* American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 24, n. 18, p. 2917–31, 2006.

LOPES, F. *et al.* Irinotecan metabolite SN38 results in germ cell loss in the testis but not in the ovary of prepubertal mice. **Mol. Human Rep.**, v. 22, n.11, p. 745-755, 2016.

LUACES, J. P. *et al.* What do we know about blood-testis barrier? current understanding of its structure and physiology. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 11, p. 1114769, 2023.

MÄKELÄ, J. A. *et al.* Testis Development. **Endocrine Reviews**, v.40, n. 4, p. 857-905, 2019.

MAYERHOFER, A. Human testicular peritubular cells: more than meets the eye. **Reproduction**, v. 145, n.5, p. 107-116, 2013.

MCLACHLAN, R.I. *et al.* Histological evaluation of the human testis – approaches to optimizing the clinical value of the assessment: Mini Review. **Human Reproduction**, v. 22, n. 1, p. 2-16, 2007

MEDEIROS, P. *et al.* Antineoplastic drugs in environmentally relevant concentrations cause endocrine disruption and testicular dysfunction in experimental conditions. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 100, p. 104122, 2023.

MEISTRICH, M. L. The Effects of Chemotherapy and Radiotherapy on Spermatogenesis in Humans. **Fertility and sterility**, v. 100, n. 5, 2013.

MELVIN, I. B. *et al.* Perinatal exposure to bisphenol A impairs the Mongolian gerbil ovarian follicle dynamics and its extracellular milieu. **Emerging Animal Species**, v. 12, p. 100054–100054, 2025.

MOKHTAR, D. Microscopic and histochemical characterization of the bovine uterine tube during the follicular and luteal phases of estrous cycle. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 3, n. 1, p. 44, 2015.

MOLINARO, E. M. *et al.* Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 2. Rio de Janeiro: **EPSJV**; p. 89-188, 2010.

MUKADE, Y. *et al.* Phosphotungstic Acid–treated Picrosirius Red Staining Improves Whole-

slide Quantitative Analysis of Collagen in Histological Specimens. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 71, n. 1, p. 11–26, 2022.

MUKAI, S. *et al.* Three-dimensional electron microscopy for endothelial glycocalyx observation using Alcian blue with silver enhancement. **Medical Molecular Morphology**, v. 54, n. 2, p. 95–107, 2020.

NARAYANA, K. *et al.* 5-Fluorouracil (5-FU) induces the formation of giant cells and sloughing of seminiferous epithelium in the rat testis. **Indian J Physiol Pharmacol**, v. 44, p. 317-322, 2000.

NAREN, G. *et al.* Reproductive and developmental toxicities of 5-fluorouracil in model organisms and humans. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 24, p. e9, 2022.

NI, H. *et al.* Nrf2 promotes the development of fibrosis and tumorigenesis in mice with defective hepatic autophagy. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 3, p. 617–625, 2014.

O'DONNELL, L.; SMITH, L. B.; REBOURCET, D. Sertoli cells as key drivers of testis function. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 121, p. 2–9, 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Cancer**. 2019. Disponível em:  
<[https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1)>

OVALLE, W. **Netter Bases da Histologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2014. E-book, p.382.

PAWLINA, W. **Ross Histologia - Texto e Atlas**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021. E-book, p.836.

PIPMAN, V. *et al.* Criptorquidia: una revisión de los avances más recientes en su diagnóstico y tratamiento. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v. 123, n. 3, 2025.

PIRZAMAN, A. T. *et al.* 5-Fluorouracil-induced toxicity in both male and female reproductive systems: A narrative review. **Human & Experimental Toxicology**, v. 42, mar. 2023.

POHL, E. *et al.* Healthy ageing and spermatogenesis. **Reproduction**, v. 161, n. 4, p. 89–101, 2021.

PROCOP, G. W.; ROBERTS, G. D. Emerging fungal diseases: the importance of the host. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 24, n. 3, p. 691–719, 2004.

RODPRASERT, W.; VIRTANEN, H. E.; TOPPARI, J. Cryptorchidism and puberty. **Frontiers in endocrinology**, v. 15, 2024.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W.; BARNASH, T. A. Atlas de histologia descritiva. Porto Alegre: **ArtMed**, 2012. E-book, p. 286-301.

RUSSELL, L. D.; RUSSELL, J. A. Short-term Morphological response of the rat testis to administration of five chemotherapeutic agents. **American Journal of Anatomy**, v. 192, n. 2, p. 142–168, 1991.

SAFARPOUR, S. *et al.* Quercetin nanoparticles ameliorates 5-Fluorouracil-induced testicular damage in mice: A biochemical and histological study. **South African Journal of Botany**, v. 164, p. 200-208, 2024.

SAMPER, J. C.; PYCOCK, J. F.; MCKINNON, A. O. Current therapy in equine reproduction. St. Louis, Mo.: **Saunders Elsevier**, 2007.

SÁNCHEZ, P. *et al.* Impact of chronic exposure of rats to bisphenol A from perinatal period to adulthood on intraprostatic levels of 5 $\alpha$ -reductase isozymes, aromatase, and genes implicated in prostate cancer development. **Environmental Research**, v. 212, p. 113142–113142, 2022.

SANTOS, M. de O. *et al.* Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, p. e–213700, 2023.

SCUDAMORE, C.L. **A practical Guide to the Histology of the Mouse**. John Wiley & Sons, 2013. E-book. p.97-105.

SETHY, C.; KUNDU, C. N. 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 137, p. 111285, 2021.

SGRECCIA, A. *et al.* Acute ischemic stroke treated with mechanical thrombectomy and fungal endocarditis: A case report and systematic review of the literature. **Journal of Neuroradiology**, v. 47, n. 5, p. 386–392, 2020.

SHIGA, T.; HIRAIDE, M. Cardiotoxicities of 5-Fluorouracil and Other Fluoropyrimidines. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 21, n. 4, 2020.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana**. 7. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2017. E-book. p.810.

SKINNER, M. K.; TUNG, P. S.; FRITZ, I. B. Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. **The Journal of Cell Biology**, v.100, p. 1941-1947, 1985.

SMART, E. *et al.* Chemotherapy drugs cyclophosphamide, cisplatin and doxorubicin induce germ cell loss in an in vitro model of the prepubertal testis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1773, 2018.

SOARES, P. M. G *et al.* Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 63, p. 91-98, 2008.

SRIRAM, S. *et al.* Alkylating agents-induced gonadotoxicity in prepubertal males: Insights on the clinical and preclinical front. **Clinical and Translational Science**, v. 17, n. 7, 2024.

STUKENBORG, J.-B. *et al.* Cancer treatment in childhood and testicular function: the importance of the somatic environment. **Endocrine Connections**, v. 7, n. 2, p. 69–87, 2018.

TAKIZAWA, S.; HORII, I. Endocrinological assessment of toxic effects on the male reproductive system in rats treated with 5-Fluorouracil for 2 or 4 weeks. **The Journal of**

**Toxicological Sciences**, v. 27, n.1, p.49-56, 2002.

TRIANE, R. *et al.* Desenvolvimento ovariano de *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) (Actinopterygii, Perciformes), no reservatório de Pedra, Rio de Contas, Bahia. **Biota Neotropica/Biota Neotropica**, v. 9, n. 3, p. 131–136, 2009.

TURNER, T. T.; HYUN J. B.; LYSIAK, J. L. The molecular pathology of experimental testicular torsion suggests adjunct therapy to surgical repair. **The Journal of Urology**, v. 172, n. 6 Part 2, p. 2574–2578, 2004.

VAN DEN BOOGAARD, W. M. C.; KOMNINOS, D. S. J.; VERMEIJ, W. P. Chemotherapy Side-Effects: Not All DNA Damage Is Equal. **Cancers**, v. 14, n. 3, p. 627, 2022.

VILELA, J. M. V. *et al.* Culture of domestic cat ovarian tissue in vitro and in the chick embryo chorioallantoic membrane. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1774–1781, 2016.

VODENKOVA, S. *et al.* 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 206, p. 107447, 2020.

WAKAYAMA, T. *et al.* Quantitative evaluation of spermatogenesis by fluorescent histochemistry. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 157, p. 287-295, 2022.

WANG Y.Q.; CHEN, S.R.; LIU, Y.X. Selective deletion of WLS in peritubular myoid cells does not affect spermatogenesis or fertility in mice. **Mol Reprod Dev.**, v. 85, n.7, p. 559-561, 2018.

WANG, W.; SILVA, C. G.; FARIA, J. L. Photocatalytic degradation of Chromotrope 2R using nanocrystalline TiO<sub>2</sub>/activated-carbon composite catalysts. **Applied Catalysis B Environment and Energy**, v. 70, n. 1-4, p. 470–478, 2007.

WARDI, A. H.; ALLEN, W. S. Alcian blue staining of glycoproteins. **Analytical Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 621–623, 1972.

WU, D. *et al.* Long-term exposure to polystyrene microplastics triggers premature testicular aging. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 20, n. 35, 2023.

YALÇIN, T. *et al.* The methods used in histopathological evaluation of testis tissues. **Batman University Journal of Life Sciences**, v.10, n. 7, p. 148-157, 2020.

YUAN, W. *et al.* The male reproductive toxicity after 5-Fluorouracil exposure: DNA damage, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction in vitro and in vivo. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 278, p. 116465–116465, 2024.

ZHAO, L. *et al.* Single-cell analysis of developing and azoospermia human testicles reveals central role of Sertoli cells. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020.

ZHENG, G. *et al.*  $\alpha 3$  Integrin of Cell-Cell Contact Mediates Kidney Fibrosis by Integrin-Linked Kinase in Proximal Tubular E-Cadherin Deficient Mice. **The American Journal of Pathology**, v. 186, n. 7, p. 1847–1860, 2016.

ZHOU, R. *et al.* The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 76, p. 2681–2695, 2019.