

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ANDRÉ LUCAS CALDEIRA BRANT DE OLIVEIRA

**COMPARAÇÃO MORFOFUNCIONAL ENTRE A ESPERMATOGÊNESE E A  
BIOLOGIA ESPERMATOGONIAL DE DOIS PRIMATAS: HOMEM E SAGUI**

Belo Horizonte/MG  
2017

**ANDRÉ LUCAS CALDEIRA BRANT DE OLIVEIRA**

**COMPARAÇÃO MORFOFUNCIONAL ENTRE A ESPERMATOGÊNESE E A  
BIOLOGIA ESPERMATOGONIAL DE DOIS PRIMATAS: HOMEM E SAGUI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular  
Orientador: Dr. Hélio Chiarini Garcia

Belo Horizonte/MG  
2017



**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE  
ANDRE LUCAS CALDEIRA BRANT DE OLIVEIRA**

301/2017  
entrada  
1º/2016  
2016683273

Às quatorze horas do dia 25 de agosto de 2017, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**COMPARAÇÃO MORFOFUNCIONAL ENTRE A ESPERMATOGÊNESE E A BIOLOGIA ESPERMATOGONIAL DE DOIS PRIMATA: HOMEM E SAGUI**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Helio Chiarini-Garcia**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

| Prof./Pesq.                       | Instituição | Indicação |
|-----------------------------------|-------------|-----------|
| Dr. Helio Chiarini-Garcia         | UFMG        | Aprovado  |
| Dra. Elizete Rizzo                | UFMG        | APROVADO  |
| Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa | UFMG        | APROVADO  |

Pelas indicações, o candidato foi considerado: aprovado  
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 25 de agosto de 2017.**

Dr. Helio Chiarini-Garcia (Orientador)

Dr<sup>a</sup>. Elizete Rizzo

Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

  
Prof<sup>a</sup>. Luciana de Oliveira Andrade  
COORDENADORA DO PROGRAMA DE  
PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR ICB/UFMG

“É melhor lançar-se à luta em busca do triunfo, mesmo expondo-se ao insucesso, do que fazer fila com os pobres de espírito, que por viverem nessa penumbra cinzenta, nem sofrem muito, nem gozam muito, e não conhecem vitória nem derrota.”

**Roosevelt, Franklin**

Esta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (LABER) do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do professor Dr. Hélio Chiarini-Garcia.

O suporte financeiro para a realização deste trabalho foi promovido pelas instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus. A ele toda honra e toda a glória! Sempre me iluminando e guiando os meus passos em todos os momentos da minha vida.

Ao professor Dr. Hélio Chiarini Garcia, que há seis anos me acolheu no LABER quando eu era um calouro da biomedicina. Serei eternamente grato pelos ensinamentos, apoio, dedicação, confiança e orientação. Você é um exemplo de profissional para mim e para seus alunos.

A professora Dr. Fernanda Almeida, pelo carinho, apoio e colaboração durante todos estes anos trabalhando juntos.

A minha mãe, pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos de minha vida. Você é um exemplo de ser humano e profissional. A sua fé e perseverança me contagiam para que um dia eu alcance os meus sonhos como pessoa e profissional.

Ao meu pai, pelo amor, carinho e suporte dados hoje e sempre. Sua cobrança e seus conselhos são essenciais para que eu continue correndo atrás dos meus objetivos. Muito obrigado por tudo.

A minha avó Maria do Carmo, por todo amor e carinho. Você é um dos meus portos seguros. Serei sempre grato por tudo que você fez e faz por mim.

A minha irmã, pelo amor e companheirismo no dia a dia. Irmão é sinônimo de amor, e é a relação mais leal que alguém pode possuir na vida.

A Fernanda, que com seu amor, carinho e companheirismo caminha junto comigo, fazendo com que eu me torne uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus falecidos avós José e Brasília. Serei eternamente grato por todo amor, carinho, e ensinamentos que vocês me deram. Sei que estejam onde for, vocês estão sempre iluminando os meus passos.

Ao Dr. Reginaldo Martello, pelo suporte e ajuda na captação e coleta do material de estudo. Sem você a realização deste trabalho não seria possível.

Aos meus amigos do LABER e da Pós-Graduação, pela amizade, colaboração, e apoio em todas as etapas da realização deste trabalho.

A todos os meus amigos de infância. Vocês estão sempre me apoiando, aconselhando e divertindo, seja nas conversas sérias ou descontraídas. Amizade aqui é mato!

Aos professores da Biologia Celular, por todo o conhecimento e aprendizado transmitido durante o meu mestrado.

Um agradecimento extensivo a todos que, diretamente ou indiretamente, participaram deste meu trabalho.

Obrigado a todos!

## RESUMO

Estudos que avaliam a função testicular no homem em condições normais, patológicas ou experimentais utilizam, na maioria das vezes, roedores de laboratório como forma indireta de verificar os efeitos daquelas condições sobre o testículo humano. Primatas do Novo Mundo, principalmente os saguis *Callithrix sp.*, vem sendo cada vez mais utilizados para avaliação das funções testiculares como procedimento preliminar àqueles com os humanos. No entanto, apesar da proximidade filogenética com o homem, nenhum estudo determinou o quanto os processos espermatogênicos entre estas duas espécies são similares e se podem ser comparados com confiança. Tendo isto em mente, o objetivo do presente trabalho foi comparar parâmetros morfológicos e funcionais da espermatogênese no homem com os do sagui para verificar se esta espécie pode ser considerada um modelo experimental adequado. Para este fim, amostras testiculares de quatro pacientes humanos e de cinco saguis foram processadas conforme protocolo de microscopia de luz de alta resolução. Após a adaptação do ciclo do epitélio seminífero do sagui de nove para seis estádios, observamos que, mesmo possuindo uma geração espermatogonial a mais, a morfologia das espermatogônias do sagui foi similar à do homem. Em termos do processo espermatogênico, foi observado que as associações celulares presentes nos seis estádios do ciclo do epitélio seminífero, suas frequências e os índices da espermatogênese (mitótico, meiótico, capacidade de suporte das células de Sertoli e eficiência da espermatogênese) também foram similares em ambas as espécies. Verificou-se que as espermatogônias indiferenciadas  $A_{\text{escuras}}$  de ambas as espécies possuem dois subtipos, uma com presença e outra com ausência de vacúolos nucleares. Aquelas com vacúolos se posicionam em regiões específicas com proximidade de vasos sanguíneos, demonstrando, pela primeira vez, a presença de nicho espermatogonial no homem. Os poucos parâmetros morfométricos que diferiram entre o homem e o sagui foram devido ao número diferente de gerações espermatogoniais ( $A_{\text{escura}}$ ,  $A_{\text{clara}}$  e B no homem e  $A_{\text{escura}}$ ,  $A_{\text{clara}}$ ,  $B_1$  e  $B_2$  no sagui), o que não impede a comparação entre eles. Considerando a similaridade entre a espermatogênese e a biologia espermatogonial de ambos os primatas, demonstramos que o sagui possa ser utilizado como um modelo experimental mais adequado para estudos científicos que visam compreender a biologia testicular humana.

## ABSTRACT

Scientific studies that evaluate testicular function in human under healthy, pathological or experimental conditions often use rodents as experimental models to verify the effects of those conditions on the human testis. Currently, the New World monkeys, especially the genus *Callithrix* sp, have been widely used in biomedical researches to evaluate testicular biology as a preliminary test in non-human primates. However, despite being phylogenetically related to humans, no studies have confidently described if the spermatogenic process between these two species are comparable. Having said that, the objective of the present study was to compare the spermatogenesis morphological and functional parameters' between the human and the marmoset to further determine if such species could be an adequate experimental model. To do so, testicular samples from four men and five marmosets were processed according to high resolution light microscopy protocols. After the adaptation of the marmoset seminiferous epithelium cycle from nine to six stages, it was observed that, despite having an additional spermatogonial generation, the morphology of marmoset spermatogonia was similar to the human's ones. In terms of the spermatogenic process, it was observed that the cellular associations present in the six stages of the SEC, their frequencies and one of the spermatogenesis index (meiotic) were similar between both primates' species. In addition, it was noticed that  $A_{\text{dark}}$  undifferentiated spermatogonia from both species presented two subtypes: one with nuclear vacuole and another without such structure. Those  $A_{\text{dark}}$  with a nuclear vacuole were positioned in specific regions nearby blood vessels, suggesting for the first time the presence of a spermatogonial niche in humans. The few morphometric parameters that differed between man and marmoset were due to the different number of spermatogonial generations ( $A_{\text{dark}}$ ,  $A_{\text{pale}}$  and B in man; and  $A_{\text{dark}}$ ,  $A_{\text{pale}}$ ,  $B_1$  and  $B_2$  in the marmoset), which does not prevent the comparison between both species. Considering the similarity between the spermatogenesis and spermatogonial biology of both primates, we demonstrated that the marmoset can be used as a more adequate experimental model in studies that aimed to understand the human testicular biology.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Células germinativas do homem e as respectivas etapas do processo espermatogênico: (a) fase proliferativa ou espermatogonial, (b) fase meiótica ou espermatocitogênica e (c) fase de diferenciação ou espermiogênica ..... 14
- Figura 2.** Modelo esquemático dos dois tipos de arranjo espacial dos estágios da espermatogênese ao longo de um túbulo seminífero ..... 15
- Figura 3.** Esquema representando as diferentes gerações espermatogoniais do camundongo, macaco e do homem, e suas respectivas funções de se diferenciar e/ou autorenovar..... 17
- Figura 4.** Esquema comparativo das divisões espermatogoniais de três diferentes espécies de mamíferos: (a) camundongo, (b) macaco rhesus e (c) homem, e da eficiência da espermatogênese ..... 19
- Figura 5.** Representação do nicho espermatogonial mostrando a espermatogônia e as células somáticas que controlam o seu comportamento espermatogonial ..... 22
- Figura 6.** Esquema utilizado para determinação do posicionamento das espermatogônias no epitélio seminífero do sagui baseado em regiões de contato com o interstício ou túbulo-túbulo contato..... 32
- Figura 7.** Fotomicrografias das espermatogônias do homem:  $A_{\text{escura}}$  ( $A_{e\text{Vac}}$ ,  $A_{e\emptyset\text{Vac}}$ ),  $A_{\text{clara}}$ , B e do espermátócito em PI sob microscopia de luz de alta resolução ..... 37
- Figura 8.** Fotomicrografias das espermatogônias do sagui:  $A_{\text{escura}}$  ( $A_{e\text{Vac}}$ ,  $A_{e\emptyset\text{Vac}}$ ),  $A_{\text{clara}}$ ,  $B_1$ ,  $B_2$  e do espermátócito em PI sob microscopia de luz de alta resolução ..... 38
- Figura 9.** Diâmetro nuclear médio das espermatogônias do homem e do sagui ..... 39
- Figura 10.** Associações das células germinativas presentes nos seis estádios do (A) CES do homem e (B) do sagui ..... 41
- Figura 11.** Frequência relativa (%) dos estádios do CES do homem e do sagui..... 42
- Figura 12.** Fotomicrografias de corte transversal do parênquima testicular do homem (A) e do sagui (B). TS, túbulo seminífero; asterisco, região intersticial ..... 45

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 13.</b> Distância ( $\mu\text{m}$ ) entre as espermatogônias indiferenciadas: $A_{eVac}$ , $A_{e\emptyset Vac}$ , $A_{clara}$ , e o vaso sanguíneo mais próximo, nos seis estádios do CES do homem (A) e do sagui (B) .....  | 47 |
| <b>Figura 14.</b> Distância ( $\mu\text{m}$ ) entre as espermatogônias diferenciadas: B (homem), B1 e B2 (sagui), e do espermatócito em preleptóteno para o vaso sanguíneo mais próximo, nos seis estádios do CES do homem (A) e do sagui (B) .....  | 47 |
| <b>Figura 15.</b> Porcentagem das diferentes gerações espermatogoniais do sagui: $A_{eVac}$ , $A_{e\emptyset Vac}$ , $A_{clara}$ , B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> e do espermatócito PI que estão em regiões do epitélio seminífero adjacentes ao interstício, nos seis estádios do CES ..... | 49 |
| <b>Figura 16.</b> Número de células de Leydig presentes no interstício relacionadas aos estádios do CES dos túbulos adjacentes .....   | 49 |
| <b>Figura 17.</b> Quantificação de cortes transversais de vasos sanguíneos (A) e seus respectivos calibres em $\mu\text{m}^2$ (B) associados aos estádios do CES dos túbulos seminíferos adjacentes no sagui .....   | 50 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Adaptação do CES de IX estádios do sagui, para VI estádios, assim como no homem.....   | 28 |
| <b>Tabela 2.</b> Parâmetros clínicos e seus respectivos valores de referência dos quatro pacientes (P1-P4) homens avaliados .....   | 34 |
| <b>Tabela 3.</b> Peso corporal e peso testicular médio dos saguis (A1-A5) avaliados, em gramas..  | 34 |
| <b>Tabela 4.</b> Descrição morfológica das diferentes gerações espermatogoniais e espermatócito e preleptóteno em relação a: núcleo, nucléolo, heterocromatina, eucromatina, e os estádios do CES em que elas se encontram, em ambos os primatas, homem e sagui ..... | 36 |
| <b>Tabela 5.</b> Principais semelhanças e diferenças da distribuição das células germinativas em relação aos seis estádios do CES do homem e do sagui .....   | 40 |
| <b>Tabela 6.</b> Frequência relativa média (%) dos estádios do CES em ambos os primatas: homem e sagui.....   | 42 |
| <b>Tabela 7.</b> Frequência relativa média (%) das etapas do processo espermatogênico em ambos os primatas: homem e sagui .....   | 43 |
| <b>Tabela 8.</b> Índices mitótico, meiótico, capacidade de suporte da célula de Sertoli e eficiência da espermatogênese do homem e do sagui .....   | 44 |
| <b>Tabela 9.</b> Índice mitótico e eficiência da espermatogênese do homem e do sagui considerando-se as espermatogônias $A_{eVac}$ e $A_{e\emptyset Vac}$ como células tronco .....   | 45 |
| <b>Tabela 10.</b> Proporção da área (%) das regiões intersticiais e tubulares nos testículos do homem e do sagui .....  | 46 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

|                      |  |
|----------------------|--|
| %                    | Porcentagem  |
| °C                   | Graus Celsius  |
| A <sub>dark</sub>    | Espermatogônia A <sub>escura</sub>                                       |
| A <sub>escura</sub>  | Espermatogônia A <sub>escura</sub>                                       |
| A <sub>eVac</sub>    | Espermatogônia A <sub>escura</sub> com vacúolo nuclear                   |
| A <sub>e∅Vac</sub>   | Espermatogônia A <sub>escura</sub> sem vacúolo nuclear                   |
| A <sub>clara</sub>   | Espermatogônia A <sub>clara</sub>  |
| A <sub>isolada</sub> | Espermatogônia A <sub>isolada</sub>                                      |
| A <sub>pale</sub>    | Espermatogônia A <sub>clara</sub>  |
| A <sub>pareada</sub> | Espermatogônia A <sub>pareada</sub>                                      |
| B                    | Espermatogônia do tipo B   |
| B <sub>1</sub>       | Espermatogônia do tipo B <sub>1</sub>                                    |
| B <sub>2</sub>       | Espermatogônia do tipo B <sub>2</sub>                                    |
| BrdU                 | 5-bromo-2-desoxiuridina  |
| CES                  | Ciclo do epitélio seminífero   |
| CETEA                | Comitê de Ética em Experimentação Animal                                 |
| cm                   | Centímetro(s)  |
| COEP                 | Comitê de Ética em Pesquisa  |
| CONEP                | Comissão Nacional de Ética em Pesquisa                                   |
| DEPE                 | Diretoria de Ética em Pesquisa   |
| dL                   | Decilitro  |
| EPM                  | Erro padrão da média   |
| FGFR3                | Receptor do fator de crescimento de fibroblasto tipo 3                   |
| FSH                  | Hormônio folículo-estimulante  |
| g                    | Grama(s)   |
| HC-UFMG              | Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais            |
| IBAMA                | Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis |
| Id4                  | Proteína inibidora de ligação ao DNA                                     |
| KFeCN                | Ferrocianeto de potássio   |

|                  |   |
|------------------|---|
| Kg               | Quilograma(s)                                     |
| LABER            | Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução   |
| LH               | Hormônio luteinizante                             |
| M                | Molar   |
| mm               | Milímetro(s)                                      |
| mmHg             | Milímetro(s) de mercúrio                          |
| mg               | Miligrama(s)                                      |
| mL               | Mililitro(s)                                      |
| MLAR             | Microscopia de luz de alta resolução              |
| NCS              | Nucléolo de célula de Sertoli                     |
| ng               | Nanograma(s)                                      |
| OsO <sub>4</sub> | Tetróxido de ósmio                                |
| Pax7             | Proteínas de emparelhamento do gene Pax7          |
| pH               | Potencial hidrogeniônico                          |
| PI               | Espermatócito em preleptóteno                     |
| PVPI             | Solução de povidona-iodo                          |
| TCLE             | Termo de Consentimento Livre Esclarecido          |
| TTB              | Testosterona total basal                          |
| UI               | Unidade internacional                             |
| UTF1             | Fator de transcrição de células indiferenciadas 1 |
| UFMG             | Universidade Federal de Minas Gerais              |
| µm               | Micrômetro  |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA</b> .....   | 11 |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....  | 12 |
| 2.1. Objetivo geral .....  | 12 |
| 2.2. Objetivos específicos .....   | 12 |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....  | 13 |
| 3.1. Espermatogênese em mamíferos .....  | 13 |
| 3.2. Fase espermatogonial e espermatogônia tronco .....  | 16 |
| 3.3. Nichos espermatogoniais .....   | 20 |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 23 |
| 4.1. Espécimes e considerações éticas .....  | 23 |
| 4.2. Obtenção e processamento das amostras .....   | 24 |
| 4.2.1. <i>Biópsia testicular bilateral (humano)</i> .....  | 24 |
| 4.2.2. <i>Orquiectomia bilateral total (humano)</i> .....  | 25 |
| 4.2.3. <i>Orquiectomia bilateral total (sagui)</i> .....   | 25 |
| 4.3. Avaliação dos parâmetros clínicos não-invasivos .....   | 26 |
| 4.4. Avaliação dos aspectos morfológicos .....   | 26 |
| 4.4.1. <i>Caracterização morfológica das espermatogônias</i> .....                                       | 26 |
| 4.4.2. <i>Avaliação do diâmetro médio nuclear das células germinativas</i> .....                         | 27 |
| 4.5. Avaliação dos estádios do ciclo do epitélio seminífero .....  | 27 |
| 4.5.1. <i>Determinação dos estádios</i> .....  | 27 |
| 4.5.2. <i>Determinação da frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero</i> .....     | 28 |
| 4.5.3. <i>Determinação da frequência relativa de etapas da meiose do processo espermatogênico</i> .....  | 29 |
| 4.6. Índices da espermatogênese .....  | 29 |
| 4.6.1. <i>Índices da espermatogênese padrão</i> .....  | 29 |
| 4.6.2. <i>Índices da espermatogênese considerando os dois subtipos da A<sub>escura</sub></i> .....       | 30 |
| 4.7. Composição do parênquima testicular .....   | 30 |
| 4.8. Nicho espermatogonial .....   | 31 |
| 4.8.1. <i>Posicionamento das espermatogônias em relação à vascularização</i> .....                       | 31 |
| 4.8.2. <i>Avaliação de componentes somáticos relacionados com o nicho espermatogonial do sagui</i> ..... | 31 |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.9. Análise estatística .....   | 33        |
| <b>5. RESULTADOS .....</b>   | <b>34</b> |
| 5.1. Parâmetros clínicos não-invasivos do homem .....  | 34        |
| 5.2. Parâmetros clínicos não-invasivos do sagui .....  | 34        |
| 5.3. Caracterização morfológica das espermatogônias .....  | 35        |
| 5.4. Diâmetro nuclear das espermatogônias .....  | 39        |
| 5.5. Estádios do ciclo do epitélio seminífero .....  | 40        |
| 5.5.1. <i>Caracterização morfológica dos estádios do CES</i> .....                                       | 40        |
| 5.5.2. <i>Frequência relativa (%) dos estádios do CES</i> .....  | 42        |
| 5.5.3. <i>Frequência relativa de etapas da meiose do processo espermatogênico</i> .....                  | 42        |
| 5.6. Índices da espermatogênese .....  | 43        |
| 5.6.1. <i>Índices da espermatogênese padrão</i> .....  | 43        |
| 5.6.2. <i>Índices da espermatogênese considerando os dois subtipos de A<sub>escura</sub></i> .....       | 44        |
| 5.7. Composição do parênquima testicular .....   | 45        |
| 5.8. Nicho espermatogonial .....   | 46        |
| 5.8.1. <i>Posicionamento das espermatogônias em relação à vascularização</i> .....                       | 46        |
| 5.8.2. <i>Avaliação de componentes somáticos relacionados com o nicho espermatogonial do sagui</i> ..... | 48        |
| <b>6. DISCUSSÃO .....</b>  | <b>51</b> |
| <b>7. CONCLUSÃO .....</b>  | <b>58</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>   | <b>59</b> |
| <b>9. ANEXOS .....</b>   | <b>65</b> |

## 1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

Estudos biomédicos que envolvem a utilização de material humano são de difícil execução em virtude da dificuldade na obtenção de material biológico. Apesar desta dificuldade, uma série de estudos tem sido desenvolvidos recentemente, na área de andrologia, avaliando a função testicular do homem em condições normais (Muciaccia et al., 2013, Chiarini-Garcia et al., 2017; Nihi et al., 2017) e patológicas (Guido et al., 2014; Bachir e Jarvi, 2014). Apesar dos conhecimentos recentes mais detalhados da espermatogênese humana, por questões éticas, estudos experimentais para validação do uso de novos medicamentos e tratamentos para doenças andrológicas não podem ser executados no homem. Desta forma, animais experimentais como roedores (Drumond et al., 2011; Albuquerque et al., 2013) e primatas não humanos (Weinbauer et al., 2001; Sasaki et al., 2009) vem sendo utilizados para estes estudos mais iniciais como forma indireta de compreender os efeitos de medicamentos/tratamentos no testículo humano.

Nos últimos anos, os primatas do Novo Mundo, como os saguis, têm sido cada vez mais utilizados em pesquisas biomédicas, muitas delas direcionadas ao aspecto reprodutivo devido, principalmente, à sua maturidade sexual relativamente precoce, alta taxa de fecundidade e fácil manutenção e manejo (Holt e Moore, 1984; Leal e França, 2006). Diversos estudos demonstraram que a espermatogênese dos saguis se assemelha bastante com a espermatogênese humana devido a fatores tais como: aumento dos níveis de testosterona no período neonatal seguido por um período de quiescência até atingir a puberdade, presença de multi-estádios por corte transversal de epitélio seminífero e baixa eficiência espermatogênica quando comparada com a de roedores (Haider et al., 1989; Weinbauer et al., 2001; Wistuba et al., 2003). Desse modo, o ciclo do epitélio seminífero do sagui de IX estádios tem sido readaptado para VI estádios, conforme previamente estabelecido para o homem, procurando adequar este primata como modelo experimental para pesquisas relacionadas com a compreensão da espermatogênese humana (Weinbauer et al., 2001; Wistuba et al., 2003). No entanto, os achados até o momento, nos saguis, não deixam claro o quanto a espermatogênese destas duas espécies pode ser comparada, principalmente ao que se refere à biologia espermatogonial.

Considerando que o ciclo do epitélio seminífero do sagui pode ser adaptado de IX para VI estádios e que determinados parâmetros da espermatogênese são similares (Weinbauer et



al., 2001; Wistuba et al., 2003; Leal e França, 2006), um estudo mais detalhado comparando a espermatogênese e a biologia espermatogonial de ambas as espécies, *Homo sapiens* e *Callithrix penicillata* seria pertinente. Se a biologia testicular de ambas as espécies apresentar similaridades relevantes, os saguis podem ser confirmados como um modelo adequado e mais confiável de estudo experimental com o objetivo de entender de forma mais direta os efeitos que novos medicamentos/tratamentos podem causar na espermatogênese humana.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho é o de comparar parâmetros morfofuncionais da espermatogênese e da biologia espermatogonial do sagui (*Callithrix penicillata*) com a do homem (*Homo sapiens*), visando determinar se o sagui pode ser um modelo experimental adequado para estudos que podem ser mais diretamente relacionados à espermatogênese humana.

### **2.2. Objetivos específicos**

Visam comparar diversos parâmetros da espermatogênese entre as duas espécies sob a microscopia de luz de alta resolução, dentre eles:

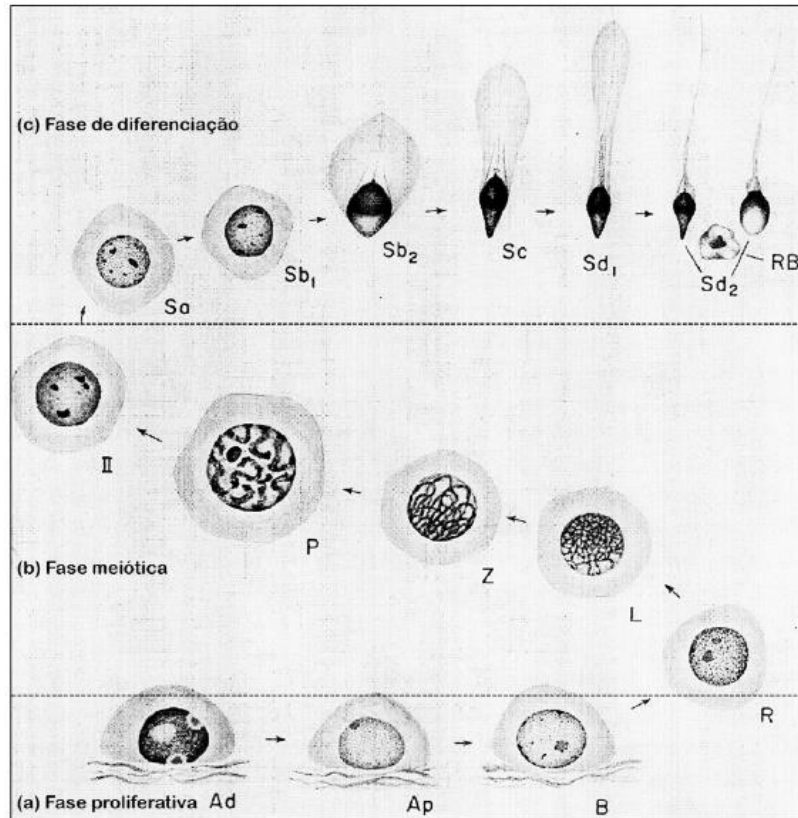
- A morfologia das diferentes gerações espermatogoniais;
- O ciclo do epitélio seminífero do sagui de seis estádios e aquele descrito para o homem;
- A frequência relativa dos seis estádios e das etapas da meiose do processo espermatogênico;
- Os índices da espermatogênese;
- A composição do parênquima testicular;
- A posição topográfica (nicho) das espermatogônias;
- O quanto os componentes somáticos, no sagui, (células de Leydig e vasos sanguíneos) podem estar relacionados com o nicho espermatogonial.

### 3. REVISÃO BILIOGRÁFICA

#### 3.1. Espermatogênese em mamíferos

A espermatogênese é um processo cíclico, altamente organizado, que ocorre nos testículos, onde as células germinativas tronco - espermatogônias diploides - se multiplicam e posteriormente se diferenciam em células haploides maduras, os espermatozoides. O desenvolvimento dos gametas ocorre nos túbulos seminíferos, especificamente no epitélio seminífero que é composto por dois tipos de células: as células somáticas, como as células de Sertoli, e as células germinativas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides). As células germinativas constituem-se de gerações sucessivas de células dispostas em camadas concêntricas bem definidas no epitélio seminífero onde sofrem processos mitóticos, meióticos, apoptóticos e de diferenciação celular. Estes processos constituem o evento biológico altamente eficiente denominado espermatogênese. A espermatogênese é um dos mais produtivos sistemas de autorenovação do corpo animal, variando de espécie para espécie nos mamíferos investigados (Clermont, 1963; Russell et al., 1990; Leal e França, 2006).

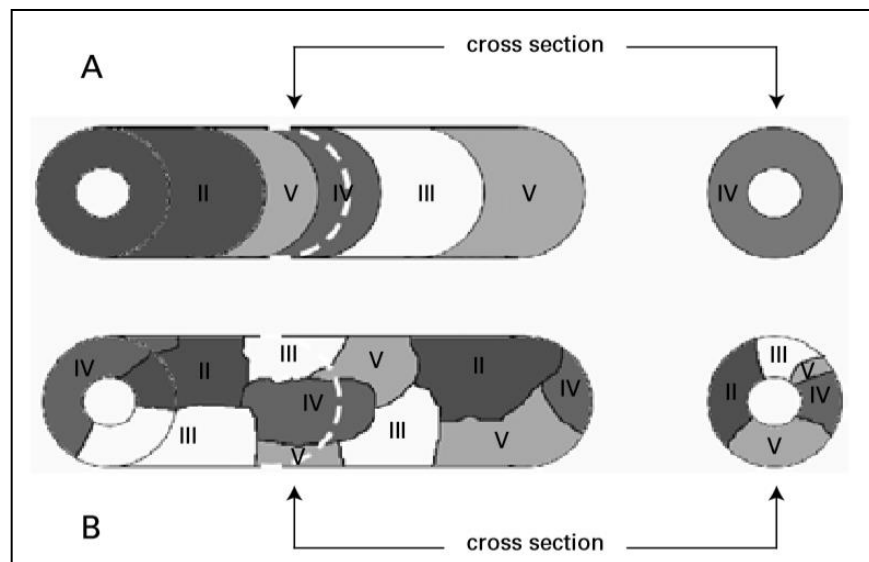
Baseado em considerações funcionais, durante sua evolução, a espermatogênese pode ser dividida em três fases (**Figura 1**): (1) fase proliferativa ou espermatogonial, na qual as espermatogônias passam por sucessivas e rápidas divisões mitóticas; (2) fase meiótica ou espermatocitogênica, onde o material genético é duplicado, recombinado e segregado; (3) fase espermiogênica ou de diferenciação, na qual células haploides, as espermátides, transformam-se em células altamente especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os ovócitos. Embora a organização geral da espermatogênese seja essencialmente a mesma em todos os mamíferos, existem características particulares relacionadas com o número de gerações espermatogoniais e os aspectos morfológicos das células germinativas presentes nas várias fases do processo espermatogênico, entre as diferentes espécies de mamíferos (Heller e Clermont, 1964; Millar et al., 2000; Chiarini-Garcia e Russell, 2001).



**Figura 1.** Células germinativas do homem e as respectivas etapas do processo espermático: (a) fase proliferativa ou espermatogonial, (b) fase meiótica ou espermatocitogênica e (c) fase de diferenciação ou espermiogênica. Ad, espermatogônia Aescura; Ap, espermatogônia Aclara; B, espermatogônia do tipo B; R, espermatócito em preleptóteno; L, espermatócito em leptóteno; Z, espermatócito em zigóteno; P, espermatócito em paquíteno; II, espermatócito secundário; As, Sb<sub>1</sub>, Sb<sub>2</sub>, Sc, Sd<sub>1</sub> e Sd<sub>2</sub>, espermátides; RB, corpo residual. (Adaptado de Heller e Clermont, 1964).

Nos túbulos seminíferos de animais sexualmente maduros, as células germinativas não estão distribuídas ao acaso, mas sim organizadas numa série bem definida de associações celulares ou estádios, ordenados de modo espécie-específico (Heller e Clermont, 1964; Holt e Moore, 1984; Russell et al., 1990) e constituindo o ciclo do epitélio seminífero (CES). O número de estádios que constituem o CES varia de espécie para espécie sendo que, por exemplo, para camundongos o ciclo do epitélio seminífero é dividido em XII estádios (Russell et al., 1990), para os saguis IX estádios (Holt e Moore, 1984; Millar et al., 2000) e para o homem VI estádios (Heller e Clermont, 1964; Nihi et al., 2017). O arranjo dos estádios do CES é, na maioria das espécies, segmentar (Leblond e Clermont, 1952; Russell, 1990; Chiarini-Garcia et al., 2009), isto é, apenas um estádio é observado em cada corte transversal de túbulo seminífero (**Figura 2**). No entanto, em algumas espécies de primatas como o homem, chimpanzé e sagui (Clermont, 1963; Haider et al., 1989; Sharpe, 1994), mais de um estádio pode ser observado

por secção transversal de túbulo seminífero, sugerindo que os estádios do ciclo estão distribuídos ao longo do comprimento do túbulo seminífero de uma forma não segmentar (Figura 2).



**Figura 2.** Modelo esquemático dos dois tipos de arranjo espacial dos estádios da espermatogênese ao longo de um túbulo seminífero. (A) Túbulo uni-estádio como observado nos roedores e alguns primatas. (B) Túbulo multi-estádio encontrado na maioria dos primatas. (I-VI) estádios do ciclo do epitélio seminífero. (Luetjens et al., 2005).

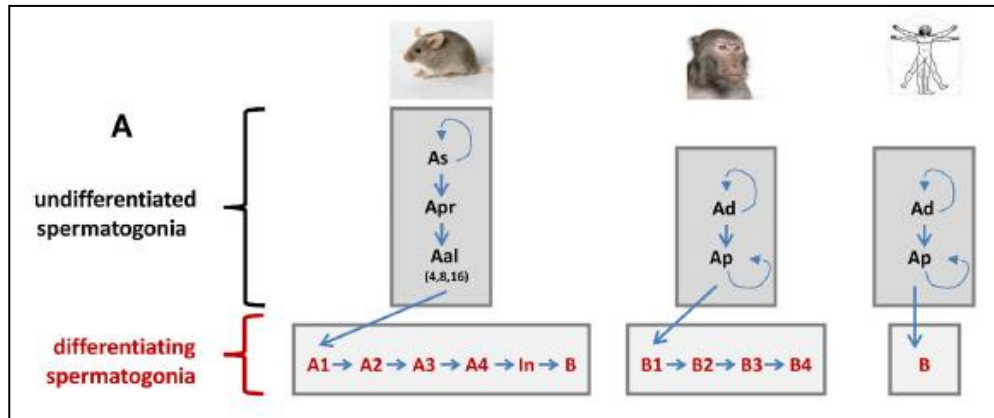
Por serem filogeneticamente próximos à espécie humana, os primatas do Novo Mundo, como os saguis, vem sendo utilizados em pesquisas na área da biologia reprodutiva devido ao fato de possuírem algumas características similares à espermatogênese humana tais como: (a) aumento dos níveis de testosterona no período neonatal seguido por um período de quiescência (infância) até atingir a puberdade (Mann e Fraser, 1996; Kelnar et al., 2002), (b) organização do CES em multi-estádios por secção transversal de túbulo seminífero (Haider et al, 1989), (c) baixa capacidade da célula de Sertoli em sustentar células germinativas e (d) baixa eficiência da espermatogênese quando comparada com a de roedores (Luetjens et al., 2005). Como uma forma de comparar a espermatogênese de diferentes primatas, alguns autores modificaram o CES do sagui de IX para VI estádios, assim como o CES do homem (Weinbauer et al., 2001; Wistuba et al., 2003).

### 3.2. Fase espermatogonial e espermatogônia tronco

A fertilidade masculina depende da produção diária de milhões de espermatozoides, isto é, dependente da contínua e controlada proliferação das espermatogônias. As espermatogônias são derivadas de células germinativas pluripotentes fetais, os gonócitos, em um processo que se inicia na vida fetal e, em primatas, termina após o nascimento (Gaskell et al., 2004; Honecker et al., 2004; Mitchell et al., 2008). Uma das principais semelhanças entre o testículo dos primatas do Novo Mundo e o testículo do homem, após o nascimento, é a considerável presença de gonócitos, que não são observados em roedores. Esta população de gonócitos persiste várias semanas após o nascimento até perderem as características pluripotentes, se transformando em espermatogônias (Wistuba et al., 2004; Mitchel et al., 2008; Albert et al., 2010).

A espermatogênese tem início com a divisão mitótica das espermatogônias tronco que estão distribuídas sobre a membrana basal do epitélio seminífero. Durante o processo de expansão clonal das espermatogônias, onde elas proliferam e se diferenciam, pontes citoplasmáticas são formadas interconectando as células filhas entre si (de Rooij e Russell, 2000). O processo de formação dessas pontes ocorre devido à citocinese incompleta de uma espermatogônia durante a divisão mitótica.

As espermatogônias podem ser funcionalmente divididas em dois tipos: indiferenciadas e diferenciadas (**Figura 3**). Essa distinção pode ser feita pelas características morfológicas e/ou pela variação de componentes moleculares presentes nas diferentes gerações de espermatogônia (Boitani et al., 2016; Neuhaus, 2017). Durante anos, a espermatogônia  $A_{\text{escura}}$  foi considerada, nos primatas, como a espermatogônia-tronco equivalente à espermatogônia  $A_{\text{isolada}}$  descrita em roedores. Entretanto, funcionalmente foram descritas de forma diferente. Enquanto as  $A_{\text{isoladas}}$  seriam as células-tronco atuando diretamente no processo de autorenovação da espermatogênese, as  $A_{\text{escuras}}$  em primatas funcionariam como células-tronco de reserva. Desta forma, as  $A_{\text{escuras}}$  se dividem com pouca frequência durante os ciclos do epitélio seminíferos de um indivíduo e se mantêm como células quiescentes (Ehmcke et al., 2005; Ehmcke e Schlatt, 2006; Mitchell et al., 2008).



**Figura 3.** Esquema representando as diferentes gerações espermatogoniais do camundongo, macaco e do homem, e suas respectivas funções de se diferenciar e/ou autorenovar. As, Aisolada; Apr, Apareada; Aal, Alinhada; A1-A4, espermatogônia A; In, espermatogônia indiferenciada; B-B4, espermatogônia do tipo B; Ad, espermatogônia Aescura; Ap, espermatogônia Aclara (Boitani et al., 2016).

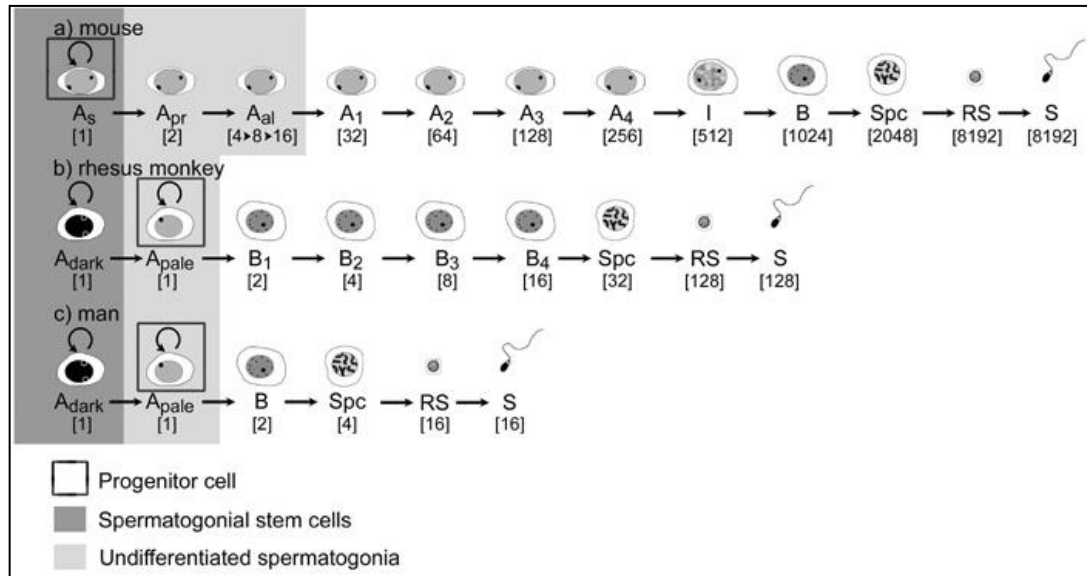
Já as espermatogônias que mantêm o processo de autorenovação em primatas são aquelas denominadas de  $A_{claras}$ , que atuam como células progenitoras, isto é, elas se autorenovam produzindo novas  $A_{claras}$  e suprem o processo espermatogênico produzindo as espermatogônias do tipo B, em número suficiente e adequado para cada espécie de primata, o que resultará na produção diária de milhões de espermatozoides (Ehmcke e Schlatt, 2006). O fato das  $A_{escuras}$  possuírem um baixo índice mitótico é um mecanismo de defesa favorável para preservar a integridade do genoma desta célula germinativa (Ehmcke et al., 2005; Ehmcke e Schlatt, 2006). No entanto, quando o estoque de  $A_{claras}$  é reduzido ou extinto, por exemplo, fisiologicamente ou após ações citotóxicas e irradiação (van Alphen e de Rooij, 1986), as  $A_{escuras}$  se dividem ativamente até repor o estoque de espermatogônias progenitoras ( $A_{claras}$ ), retornando ao estado de quiescência logo em seguida. Durante o período pré-puberal, quando o testículo está em desenvolvimento, as  $A_{escuras}$  também proliferam ativamente para ocupar os nichos que estão sendo formados (Simorangkir et al., 2005).

Entretanto, estudos recentes vêm demonstrando outras alternativas para o modelo de expansão das espermatogônias em mamíferos. Foi descrito a presença de dois tipos de células tronco em roedores: as que permanecem quiescentes, e as que se dividem após algum trauma testicular (Nakagawa et al. 2007, 2010). Além disso, demonstraram que as demais espermatogônias tronco ( $A_{pareada}$  e  $A_{alinhada}$ ), e não somente as  $A_{isoladas}$ , contribuem para manter o estoque de espermatogônias tronco (Yoshida, 2012). Além disso, outros trabalhos

demonstraram a presença de dois tipos raros de espermatogônias com a capacidade de se autorenovar: as Pax7+ e as Id4+, sendo que elas foram consideradas como sendo as verdadeiras espermatogônias quiescentes. As espermatogônias Pax7- e Id4- representam as espermatogônias progenitoras transitórias ativas, ou seja, que se dividem dando origem as espermatogônias  $A_{alinhadas}$  em roedores (Aloisio et al., 2014; Chan et al., 2014; Sun et al., 2015).

Analisando saguis da espécie *Callithrix penicillata*, Caldeira-Brant et al. (dados não publicados) demonstraram, através da cinética espermatogonial, que quando a população de espermatogônias  $A_{clara}$  começa a decrescer, devido a sua divisão em espermatogônias do tipo B, há um aumento no número de espermatogônias  $A_{escuras}$ . Este dado sugere que, quando a população de espermatogônia  $A_{clara}$  decai, as espermatogônias  $A_{escuras}$ , que se mantém quiescente durante o CES, entram em um estado ativo dando origem a novas  $A_{claras}$ , repondo assim sua população.

O número de gerações de espermatogônias do tipo B é variável entre as diferentes espécies de primatas (**Figuras 3-4**). Enquanto no macaco rhesus (*Macaca rhesus*) são descritas quatro gerações (Clermont e Leblond, 1959), nos saguis foi descrita apenas uma geração (Holt e Moore, 1984; Millar et al., 2000). Entretanto, sob microscopia de luz de alta resolução (MLAR), Caldeira-Brant e colaboradores (dados não publicados) descreveram uma nova geração, a espermatogônia do tipo B2, totalizando duas gerações para esta espécie. Para o homem (Clermont, 1963; Nihi et al., 2017), apenas uma geração foi descrita. O fato dos primatas terem um número pequeno de gerações espermatogoniais leva à produção de um número reduzido de espermatozoides a partir de cada espermatogônia-tronco, em relação às outras espécies (**Figura 4**). Desta forma, estas células-tronco devem dividir-se mitoticamente por muito mais vezes, em um mesmo período de tempo, para conseguir produzir o número adequado de espermatozoides nos primatas.



**Figura 4.** Esquema comparativo das divisões espermatogoniais de três diferentes espécies de mamíferos: (a) camundongo, (b) macaco rhesus e (c) homem, e da eficiência da espermatogênese.  $A_s$ , Aisolada;  $A_{pr}$ , Apareada;  $A_{al}$ , Aalinhada;  $A_1$ - $A_4$ , espermatogônia A;  $I$ , espermatogônia intermediária;  $B$ - $B_4$ , espermatogônia do tipo B;  $A_{dark}$ , espermatogônia Aescura;  $A_{pale}$ , espermatogônia Aclara;  $Spc$ , espermátocito;  $RS$ , espermátides arredondada;  $S$ , espermatozoide (Ehmcke et al., 2006).

A caracterização e diferenciação morfológica das espermatogônias são feitas baseando-se em aspectos morfológicos tais como: tamanho e formato da célula, condensação da cromatina, densidade da eucromatina, distribuição da heterocromatina, quantidade e características dos nucléolos, presença de vacúolos nucleares e também pelo estágio do CES que a espermatogônia se encontra. Apesar das espermatogônias humanas já terem sido descritas morfológicamente (Clermont, 1963; Heller e Clermont, 1964; Muciaccia et al., 2013), estes estudos não confirmaram com segurança as gerações espermatogoniais e a distribuição delas em relação ao epitélio seminífero. No entanto, estudo recente de Nihi et al. (2017) descreveu, com maior detalhamento morfológico, as espermatogônias e as demais células germinativas do CES do homem. Utilizando-se desta metodologia de processamento, foi possível identificar com segurança as espermatogônias  $A_{escuras}$ ,  $A_{claras}$  e  $B$ , diferindo esta última dos espermátocitos primários em preleptóteno. Mesmo utilizando métodos morfológicos de alta resolução, este estudo não identificou novas gerações espermatogoniais no homem quanto aos aspectos morfológicos.



### 3.3. Nichos espermatogoniais

Atualmente, um dos tópicos mais estudados em biologia são as células tronco. O entendimento da sua morfologia, topografia, fisiologia e interações destas células com o microambiente no qual está inserida são os aspectos mais pesquisados. As células-tronco estão normalmente presentes em tecidos cuja renovação é necessária durante toda a vida do ser vivo. Isto é, nos tecidos autorenováveis tais como: a epiderme, o epitélio intestinal, o tecido hemocitopoético e o epitélio seminífero (Spradling et al., 2001, Ehmcke e Schlatt, 2006). Para exercer a função de renovar um tecido, as células-tronco têm como propriedade a capacidade de autorenovação, isto é, elas se dividem em duas sendo que pelo menos uma das duas células recém-formadas continua como célula-tronco e com as mesmas propriedades da célula-tronco mãe, isto é, se mantém como célula de estoque, enquanto a outra célula (célula-filha) pode se diferenciar (Watt e Hogan, 2000; Spradling et al., 2001). Portanto, as células-tronco possuem a capacidade ilimitada de gerar células-filhas diferenciadas. Essas células-filhas vão se diferenciar dando origem às células diferenciadas e especializadas do tecido do qual elas fazem parte.

Para que estas células-tronco possam desempenhar o seu papel adequadamente, gerando células-filhas e mantendo a estrutura de um tecido autorenovável, é sabido que elas devem estar sob controle químico e físico de um microambiente favorável (Watt e Hogan, 2000). Este microambiente pode ser constituído de células somáticas e matriz extracelular que de forma parácrina controlam a proliferação das células-tronco, estimulando ou inibindo-as (Spradling et al., 2001; Zao e Garbers, 2002; Tsai et al., 2002; Clevers, 2015).

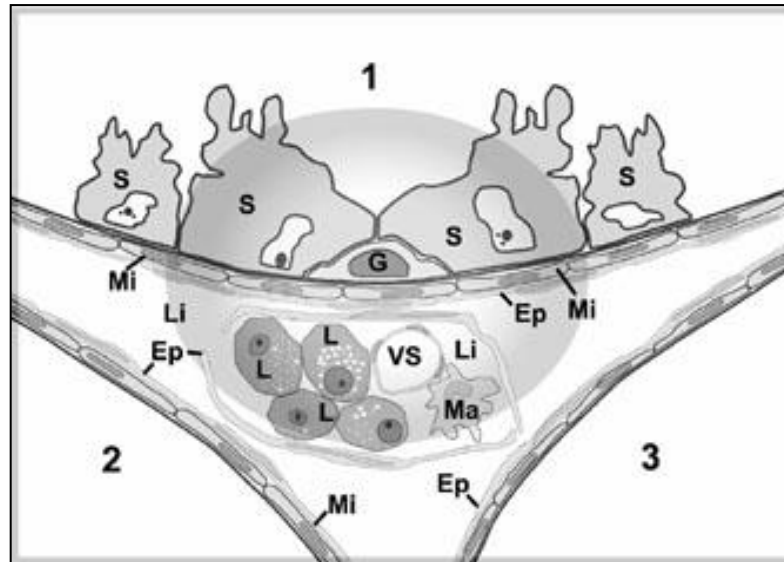
A estrutura constituída de células-tronco, células diferenciadas e tecidos circunjacentes especializados é conhecida como nicho, atuando como sistema de suporte para proliferação, diferenciação e sobrevivência das células-tronco (Watt e Hogan, 2000). Após sofrer um estímulo adequado, as células-tronco entram em divisão gerando células-filhas que irão perder o contato físico com o nicho, não sendo mais controlados por este microambiente. Dessa forma, iniciam o processo de diferenciação que culminará na formação de células maduras, diferenciadas, daquele determinado tecido/órgão (Spangrude et al., 1988; Miller et al., 1997; Bjerkness e Cheng, 1999).

O epitélio seminífero é um dos mais bem conhecidos sistemas de autorenovação do organismo, sendo capaz de manter uma espermatogênese adequada e a produção de espermatozoides por toda a vida de um animal. Para que este sistema se mantenha é necessária a presença de células-tronco no epitélio seminífero, as chamadas espermatogônias-tronco ( $A_{\text{escuras}}$  em primatas e  $A_{\text{isoladas}}$  em outras espécies de mamíferos). Apesar destas espermatogônias-tronco já terem sido identificadas há várias décadas (Clermont, 1963; Huckins, 1971; Oakberg, 1971), a distribuição delas em nichos no epitélio seminífero ainda não havia sido descrita até recentemente. Estudos em mamíferos demonstraram que as espermatogônias não estão aleatoriamente distribuídas no epitélio seminífero. Sendo que, as espermatogônias indiferenciadas estão preferencialmente localizadas em regiões de contato com o interstício (**Figura 5**) e, ao se diferenciarem, se afastam da região intersticial para as regiões de contato túbulo-túbulo (Chiarini-Garcia e Russell, 2001, Chiarini-Garcia et al., 2003, 2009; do Nascimento et al., 2009). Yoshida e colaboradores (2007) também demonstraram, em roedores, que as espermatogônias indiferenciadas estão associadas com as áreas intersticiais, próximas de vasos sanguíneos. Utilizando marcadores específicos de espermatogônias indiferenciadas, Costa et al. (2012) demonstraram que estas espermatogônias também estão preferencialmente localizadas próximas ao interstício em equinos.

Estudos recentes vêm propondo um modelo pelo qual as  $Id4+$ , espermatogônias-tronco de roedores ( $A_{\text{isolada}}$ ), localizam-se em áreas avasculares. Observaram que quando elas se tornam “comprometidas” em se diferenciar, migram para as regiões próximas ao interstício, ricas em vasos sanguíneos, para contato com região mais rica em oxigênio, metabolitos e fatores de crescimento (Chan et al., 2014). Estudando a espermatogênese do sagui, Caldeira-Brant et al. (dados não publicados), descreveram pela primeira vez o nicho espermatogonial em um primata. Foi demonstrado que um dos subtipos de espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$ , aquelas que apresentam zonas de rarefação da cromatina ou vacúolo nuclear, estão posicionadas próximas dos vasos sanguíneos, em estádios específicos do CES.

Atuando de forma interativa e complexa, podem fazer parte do nicho: as células de Sertoli, componentes da membrana basal, células mioides, células de Leydig, macrófagos, fibras do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, dentre outros (Potter e De Falco, 2017) (**Figura 5**). Fatores parácrinos específicos destes componentes do nicho bem como fatores de origem sistêmica podem controlar a sobrevivência e atividade das espermatogônias-tronco –

estimulando ou inibindo – e assim coordenando o processo espermatogênico, que culmina com uma produção espermática adequada (Spradling et al., 2001; Chiarini-Garcia et al., 2003; De Falco et al, 2015).



**Figura 5.** Representação do nicho espermatogonial mostrando a espermatogônia e as células somáticas que controlam o seu comportamento. G, espermatogônia; S, célula de Sertoli; Mi, célula mioide; Ep, célula epitelial linfática; L, célula de Leydig; Ma, macrófago; Li, vaso linfático; VS, vaso sanguíneo, 1,2,3, túbulos seminíferos (do Nascimento et al., 2009).

Até o momento, nenhum estudo sobre a presença de nichos espermatogoniais foi desenvolvido em humanos. As espécies de mamíferos estudadas até então mostram um padrão semelhante de distribuição de nichos espermatogoniais. No entanto, considerando que diferentemente das outras espécies os primatas possuem dois tipos de célula-tronco ( $A_{\text{escuras}}$  e  $A_{\text{claras}}$ ), ambas com a peculiar propriedade de se autorenovarem, estudos no sentido de melhor entendê-las tornam-se bastante atrativos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Espécimes e considerações éticas

No presente trabalho utilizaram-se nove espécimes (quatro humanos e cinco saguis) que foram divididas da seguinte forma:

Grupo Humano (*Homo sapiens*): foram obtidas amostras testiculares de quatro pacientes adultos coletadas de duas formas:

- Biópsia testicular bilateral: dois pacientes adultos (30 e 38 anos), sexualmente maduros, com azoospermia obstrutiva devido a vasectomia, foram submetidos a biópsia testicular antes da vasovasostomia. O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), parecer nº ETIC 032/04 (**Anexo I**). Os pacientes que doaram os testículos foram informados sobre os objetivos do presente estudo e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo II**).
- Orquiectomia bilateral total: dois pacientes adultos (58 e 60 anos), sexualmente maduros, com câncer de próstata e sem nenhum tipo de tratamento, seja hormonioterapia, quimioterapia ou radioterapia, foram submetidos a técnica de orquiectomia bilateral total. Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP), nº ETIC 117/07 (**Anexo III**), no DEPE (Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do HC-UFMG), sob Processo nº 079/2007 (**Anexo IV**) e na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, sob Registro CONEP nº 14.250 (**Anexo V**). Como previsto pelo COEP e CONEP, os pacientes que doaram os testículos foram informados sobre os objetivos do presente estudo e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo VI**).

Grupo primata não-humano - Saguí (*Callithrix penicillata*):

- Orquiectomia bilateral total de cinco saguis adultos e sexualmente maduros, de idade não informada, provenientes do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e cedidos ao Biotério de Primatas da UFMG no ano de 2006. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) (**Anexo VII**).

## 4.2. Obtenção e processamento das amostras

### 4.2.1 *Biópsia testicular bilateral (humano)*

A cirurgia de biópsia aberta dos testículos, executada por médicos do Hospital das Clínicas da UFMG, foi realizada com paciente em posição de decúbito dorsal. Feita inicialmente a degermação da pele do escroto com solução de povidona-iodo (PVPI) degermante e antissepsia com tintura de PVPI, colocou-se um campo cirúrgico fenestrado sobre o paciente. Realizou-se o bloqueio anestésico do funículo espermático por punção percutânea um centímetro abaixo do tubérculo púbico e infiltrou-se 7 mL da solução 1:1 de lidocaína 1% e bupivacaína 0,5% em cada funículo espermático. Concomitante, 1 mL dessa solução foi injetada sob a pele, subcutâneo, da região a ser incisada. O procedimento cirúrgico iniciou-se com a incisão da pele do escroto de aproximadamente 1.5 cm, abertura e exposição de todas as camadas desde a pele até a túnica albugínea. A hemostasia foi realizada com eletro-cautério. Foi retirado um fragmento de uma única região do testículo, com uma tesoura Iris reta, medindo aproximadamente 10 x 7x 5mm. A síntese foi realizada por planos de tecido com fio catgut cromado 4-0. O mesmo procedimento foi realizado no testículo contralateral.

As pequenas amostras testiculares obtidas durante a biópsia foram imersas em solução de glutaraldeído a 5% (*biological grade*) em tampão fosfato 0.1M pH 7,3, à temperatura ambiente, por 30 minutos. Posteriormente, a solução fixadora foi renovada e as biópsias refixadas à 4°C, por mais 24 horas. Logo após, as amostras foram armazenadas em tampão fosfato 0,1M, pH7,3 e à 4°C até o processo de inclusão.

Para inclusão do material, pequenos fragmentos de 1mm de espessura foram recortados, respeitando a posição dos túbulos seminíferos em cortes transversais, e pós-fixados por imersão em ósmio reduzido (OsO<sub>4</sub> 1% e KFeCN 1,5% em água destilada) por 90 minutos. Em seguida, os fragmentos foram imersos em solução de acetato de uranila 2%, à temperatura ambiente, por 60 minutos. Posteriormente, após desidratação em banhos crescentes de álcool e acetona, as amostras foram incluídas em resina araldite (EMS). Dos blocos de araldite foram obtidos cortes semifinos de 1µm de espessura, que foram corados com azul de toluidina a 1% em borato de sódio a 1% e estudados sob MLAR conforme protocolo descrito por Chiarini-Garcia e Meistrich (2008).

#### 4.2.2. Orquiectomia bilateral total (humano)

As orquiectomias foram todas do tipo total, com a retirada de ambos os testículos. Para tal, foi realizado bloqueio anestésico local por punção percutânea do escroto, utilizando-se seringa estéril de 20 mL acoplada à agulha de 21-gauge, com infiltração de 7 mL de solução 1:1 de lidocaína 1% e bupivacaína 0,5% em cada cordão espermático e 1 mL dessa solução sob a pele e subcutâneo da região incisada. Com o paciente na posição de decúbito dorsal, fez-se a degermação da pele de toda a região genital com solução PVPI degermante e antissepsia da mesma com tintura de PVPI. O procedimento cirúrgico iniciou-se com uma incisão da pele escrotal de aproximadamente 4,0 cm, na região da rafe escrotal, por onde foram expostas todas as camadas, desde a pele até a túnica vaginal. A hemostasia foi realizada com auxílio de um eletrocautério. O testículo foi exteriorizado e retirado. Nesse tempo cirúrgico foi feito novamente a hemostasia, com auxílio do eletrocautério e sutura com fio de catgut 2-0. O mesmo fio foi usado na rafia dos outros planos, separadamente até a pele. Foi feito o mesmo procedimento no testículo contralateral, caso presente (Mayor & Zingg, 1975).

Dos testículos foram retirados, com auxílio de lâmina de barbear, vários fragmentos espessos através de incisões transversais do testículo. Estes fragmentos foram fixados em solução de glutaraldeído a 5% (*biological grade*) em tampão fosfato a 0,1M pH 7,3, à temperatura ambiente, por 30 minutos. Posteriormente, destes fragmentos espessos foram obtidos, apenas da superfície, cortes de 2-3mm de espessura que foram refixados por mais 24 horas e a 4°C no mesmo tipo de fixador. Em seguida, seguiu-se o protocolo de processamento para MLAR (Chiarini-Garcia e Meistrich, 2008).

#### 4.2.3. Orquiectomia bilateral total (sagui)

A fixação testicular foi realizada através de perfusão intra-aórtica no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (LABER). Vinte minutos antes do procedimento de coleta, 0,5 mL de heparina foram injetados intraperitonealmente. Em seguida, os animais foram sedados com 1mL de tiopental sódico (50mg/kg) e os testículos foram inicialmente fixados por perfusão intra-aórtica. Após abertura da cavidade torácica, o ventrículo esquerdo foi canulado e inicialmente o leito vascular foi lavado com solução salina 0,9% contendo 5000 UI de heparina (Liquemine, Roche) para cada 1000 mL de solução a uma pressão de aproximadamente 80 mmHg. Posteriormente, procedeu-se perfusão com glutaraldeído a 5% em tampão fosfato 0,1M pH 7.3. Após perfusão de aproximadamente 20 a 30 minutos, os

testículos foram retirados, pesados e recortados em pequenos fragmentos de 1 a 2 mm de espessura, imersos em solução de glutaraldeído 4%, onde permaneceram por 24 horas, a 4°C. Posteriormente, seguiu-se o protocolo de inclusão para MLAR (Chiarini-Garcia e Meistrich, 2008).

### **4.3. Avaliação dos parâmetros clínicos não invasivos**

Para avaliação indireta da espermatogênese dos pacientes humanos, parâmetros não invasivos foram avaliados no presente estudo: (a) dosagem do hormônio folículo estimulante, (b) dosagem do hormônio luteinizante e (c) dosagem de testosterona total para aqueles submetidos a orquiectomia bilateral total. A coleta do sangue foi realizada no período da manhã com os pacientes em jejum de 4 horas. Foram coletados 5 mL de sangue por punção venosa utilizando-se o sistema BD Vacuteiner® com tubo de plástico para soro. As amostras foram encaminhadas para análise no Laboratório do HC-UFG. Do soro, foram determinadas as concentrações dos respectivos hormônios supracitados utilizando-se do Kit da Vitros immunodiagnostic (*Jonhson& Johnson*) por métodos de imunoensaio imunométrico por quimioluminescência.

Em relação aos saguis, os parâmetros avaliados foram o peso corporal e o peso dos testículos direito e esquerdo de cada animal, obtidos após a orquiectomia bilateral total.

### **4.4. Avaliação dos aspectos morfológicos**

#### *4.4.1. Caracterização morfológica das espermatogônias*

Para identificação e caracterização morfológica dos diferentes tipos de espermatogônia, em ambos os primatas, foram analisados aproximadamente 500 cortes transversais de túbulos seminíferos sob microscopia de luz de alta resolução (MLAR). Utilizando-se do fotomicroscópio BX51, as células foram examinadas cautelosamente empregando-se movimentos delicados do botão micrométrico para observar, principalmente, os pequenos detalhes da cromatina (eucromatina e heterocromatina) e do nucléolo. Além da cromatina, foram também analisados aspectos morfológicos tais como: tamanho e formato da célula, tamanho e formato do núcleo, presença de vacúolos nucleares, e o estágio do CES que a célula germinativa se encontrava. As fotomicrografias digitais foram obtidas através da câmera Q-Color 3 em um aumento de 400x, acoplada ao fotomicroscópio BX51, ambos da

Olympus. Estas imagens foram ajustadas no programa Adobe Photoshop quanto ao contraste, brilho, foco e resolução. Para a quantificação da heterocromatina das espermatogônias de ambos os primatas, analisou-se as 20 fotomicrografias de cada geração espermatogonial através do programa Image J, onde calculou-se a área total do núcleo, e a área ocupada pelos grânulos de heterocromatina. Em seguida, determinou-se a proporção da área ocupada por estes grânulos de heterocromatina no núcleo das espermatogônias.

#### *4.4.2. Avaliação do diâmetro médio nuclear das células germinativas e da célula de Sertoli*

Os diâmetros médios nucleares (média dos diâmetros maior e menor) de todas as gerações espermatogoniais foram medidos, em ambos primatas, de modo aleatório em todos os estádios do CES. Para este fim, fotomicrografias digitais das espermatogônias foram obtidas, como descrito anteriormente, onde posteriormente determinou-se o diâmetro médio utilizando-se o sistema de morfometria do programa Image-Pro Plus, após padronização em micrômetros com régua micrométrica.

### **4.5. Avaliação dos estádios do ciclo do epitélio seminífero**

#### *4.5.1. Determinação dos estádios*

A caracterização dos estádios do CES humano foi baseada em trabalhos prévios da literatura (Heller e Clermont, 1964; Nihi et al., 2017). Para o sagui, adaptamos o CES original da espécie, de IX estádios (Holt e Moore, 1984), para VI estádios similar ao trabalho de Weinbauer et al. (2001) (**Tabela 1**). Esta adaptação foi feita inicialmente visando distribuir espacialmente as células germinativas do sagui de forma semelhante ao humano, isto é, em seis estádios, para facilitar comparações dos parâmetros testiculares que serão avaliados no presente estudo. A classificação dos estádios do CES baseou-se na diferenciação das espermátides (desenvolvimento do sistema acrossômico), desde a primeira espermátide arredondada (resultante da meiose) até a formação da espermátide alongada mais diferenciada (pronta para ser espermiada). Concomitantemente, avaliaram-se as outras células germinativas do epitélio seminífero tais como os diferentes tipos espermatogoniais e as várias fases de evolução dos espermatócitos primários.



**Tabela 1.** Adaptação do CES de IX estádios do sagui, para VI estádios, assim como no homem.

| <b>Homem</b><br>(Clermont, 1963) | <b>Sagui</b><br>(Holt e Moore, 1984) | <b>Presente estudo - Sagui</b><br>(Weinbauer et al., 2001) |
|----------------------------------|--------------------------------------|--|
| I                                | I                                    | I (I)  |
| II                               | II                                   | II (II-III)  |
| III                              | III                                  | III (IV)   |
| IV                               | IV                                   | IV (V-VI)  |
| V                                | V                                    | V (VII-VIII)   |
| VI                               | VI                                   | VI (IX)  |
| -                                | VII                                  | -  |
| -                                | VIII                                 | -  |
| -                                | IX                                   | -  |

#### 4.5.2. Determinação da frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero

A caracterização dos estádios foi realizada a partir do sistema acrossômico, isto é, com base na diferenciação das espermatídes, que foi específica para cada um dos estádios, além de certa associação com outras células germinativas, principalmente espermatócitos em preleptóteno, leptóteno e zigóteno. A determinação da frequência de cada estágio do CES humano foi realizada com base no estudo de Nihi et al. (2017). Para calcular a frequência dos estádios no sagui, foram obtidas imagens digitais de cerca de 40 túbulos seminíferos, em um aumento de 80x, por animal. Posteriormente, com o auxílio do programa Adobe Photoshop, foram delimitadas as áreas respectivas aos estádios do CES presentes no epitélio seminífero de cada túbulo avaliado. Em seguida, as áreas demarcadas para cada estágio foram determinadas no programa Image-Pro Plus, e sua frequência calculada conforme fórmula:

$$\text{Frequência do estágio (\%)} = \frac{\sum \text{área total do estágio} \times 100}{\sum \text{Área total}}$$

Onde:  $\sum$  da área total do estágio = somatório da área do estágio a ser determinado;

$\sum$  Área total = somatório da área total de todos os estádios.

Concomitante à análise feita nas fotomicrografias, os campos correspondentes a elas eram observados sob microscópio para confirmar, com a ajuda do botão micrométrico, o diagnóstico preciso das células germinativas e os limites entre os estádios.

#### 4.5.3. *Determinação da frequência relativa de etapas da meiose do processo espermatogênico*

Baseando-se na frequência relativa média dos estádios do CES calculamos a frequência relativa de três etapas da meiose durante a espermatogênese: (a) etapa pós-meiótica, (b) etapa pré-meiótica e (c) etapa meiótica. Para determinação da frequência dessas etapas somou-se a frequência relativa dos estádios do CES que compõe cada uma dessas etapas: (a) estádios I-II, (b) estádios III-IV-V e (c) estágio VI.

### 4.6. Índices da espermatogênese

#### 4.6.1. Índices da espermatogênese padrão

Com o objetivo de determinar a eficiência do processo espermatogênico, alguns índices foram calculados baseando-se no número de células germinativas presentes no epitélio seminífero no estágio III do CES. Dessa forma, contou-se, em ambos os primatas, o número das espermatogônias:  $A_{\text{escura}}$  e  $A_{\text{clara}}$ ; dos espermatócitos em fase de: preleptóteno e paquíteno; espermatídes arredondadas; e de nucléolos das células de Sertoli (NCS), todos presentes no estágio III do CES. O número total de células germinativas obtido foi corrigido em termos da espessura do corte e diâmetro nuclear segundo Abercrombie (1946) e modificado por Amann (1962) conforme a fórmula abaixo:

$$NC = NO \frac{EC}{EC + \left(\frac{DM}{2}\right)^2 - \left(\frac{DM}{4}\right)^2}$$

Onde: NC: número corrigido de um determinado tipo celular  
 NO: número obtido deste mesmo tipo celular  
 EC: espessura do corte histológico  
 DM: diâmetro médio do núcleo ou nucléolo

Baseado nos valores obtidos, os seguintes índices foram determinados segundo Melo et al. (2014) e Chiarini-Garcia et al. (2017):

- Índice mitótico (o coeficiente da eficiência mitótica das espermatogônias):  $n^{\circ}$  espermatócito em preleptóteno/ $n^{\circ}$  espermatogônia  $A_{\text{escura}}$ .
- Índice meiótico (a eficiência/morte das células germinativas durante a divisão meiótica):  $n^{\circ}$  espermátide arredondada/ $n^{\circ}$  espermatócito em paquíteno
- Capacidade de suporte da célula de Sertoli (o número de espermátides arredondadas suportadas por cada célula de Sertoli):  $n^{\circ}$  espermátides arredondadas/ $n^{\circ}$  NCS
- Eficiência da espermatogênese (determinar o número de espermátides arredondadas produzidas após um ciclo completo de fase proliferativa (espermatogonial) e meiótica (espermatocitária), estimando a eficiência global da espermatogênese):  $n^{\circ}$  espermátides arredondadas/ $n^{\circ}$  espermatogônia  $A_{\text{escura}}$ .

Para confirmação do número de gerações de espermatogônias diferenciadas, em ambos os primatas, determinou-se o índice mitótico baseando-se no número de espermatócitos em preleptóteno e da primeira geração de espermatogônia diferenciada (B no homem e B1 no sagui) nos estádios em que se encontram suas maiores populações, III e I respectivamente:

- Índice mitótico:  $n^{\circ}$  espermatócito em preleptóteno (estádio III) / $n^{\circ}$  espermatogônia B (estádio I).

#### 4.6.2. Índices da espermatogênese considerando os dois subtipos da $A_{\text{escura}}$

Adicionalmente ao cálculo padrão dos índices da espermatogênese, após a identificação de dois subtipos da espermatogônia  $A_{\text{escura}}$ : com vacúolo nuclear ( $A_{\text{eVac}}$ ) e sem vacúolo nuclear ( $A_{\text{e}\emptyset\text{Vac}}$ ), calculou-se novamente os índices mitótico e da espermatogênese baseando-se nesses dois novos subtipos. Esta análise teve como objetivo verificar, em ambos os primatas, como estes índices se comportam quando cada subtipo da espermatogônia  $A_{\text{escura}}$  passa a ser considerado, separadamente, como a espermatogônia tronco. Os cálculos foram feitos da seguinte forma:

- Índice mitótico:  $n^{\circ}$  espermatócito em preleptóteno/ $n^{\circ}$  espermatogônia  $A_{\text{eVac}}$  ou  $A_{\text{e}\emptyset\text{Vac}}$ .

- Eficiência da espermatogênese: nº espermátides arredondadas/nº espermatogônia  $A_{eVac}$  OU  $A_{e\emptyset Vac}$ .

#### **4.7. Composição do parênquima testicular**

Para o melhor entendimento da ocupação dos tecidos testiculares (interstício e túbulo seminífero) no parênquima testicular, 15 fotomicrografias digitais em aumento de 16x, de cada espécime, em ambos os primatas, foram obtidas utilizando-se sistema fotográfico acoplado ao microscópio BX51, como descrito anteriormente. Sobre esta imagem projetou-se uma grade de 221 pontos, utilizando-se a ferramenta “Grid Mask” do programa Image Pro-Plus. Numa contagem total de 3315 pontos por indivíduo, determinou-se a proporção (%) de cada um dos componentes do parênquima testicular - interstício e túbulo seminífero.

#### **4.8. Nicho espermatogonial**

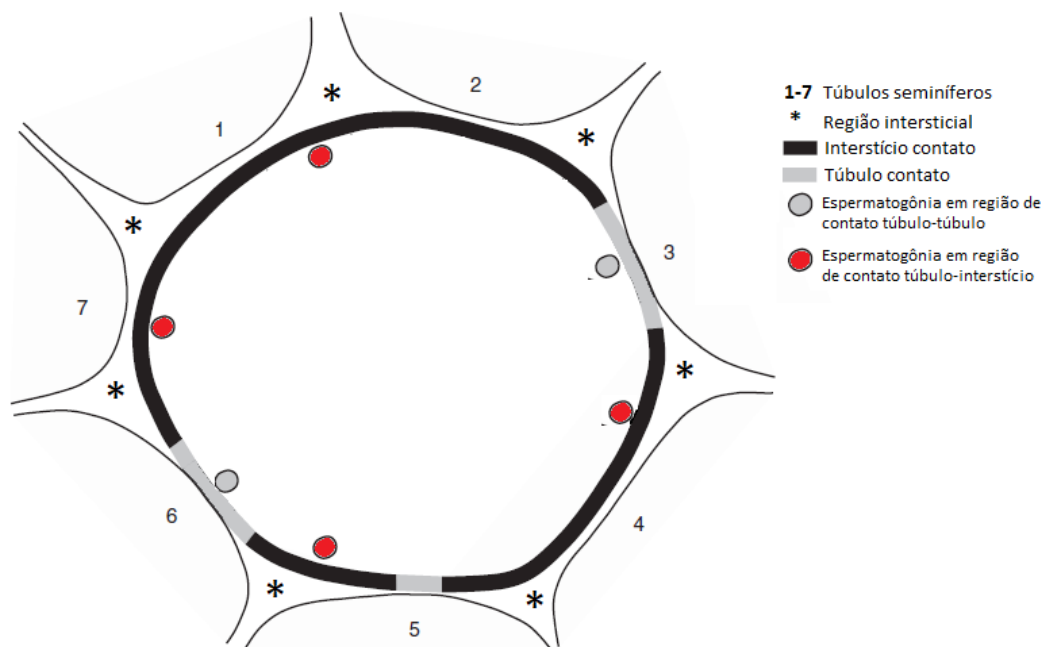
##### *4.8.1. Posicionamento das espermatogônias em relação à vascularização*

Com a finalidade de estudar a topografia das espermatogônias humana ( $A_{eVac}$ ,  $A_{e\emptyset Vac}$ ,  $A_{clara}$  e B) e reavaliar as do sagui ( $A_{eVac}$ ,  $A_{e\emptyset Vac}$ ,  $A_{clara}$ , B1 e B2) em seis estádios, aproximadamente 25 fotomicrografias digitais em aumento de 40x para o homem e 80x para o sagui foram obtidas de cada animal, de regiões contendo cortes transversais de túbulos seminíferos e de interstício. As imagens foram tratadas digitalmente utilizando-se do programa Adobe Photoshop, onde as diferentes gerações espermatogônias, de cada primata, foram identificadas e marcadas com diferentes cores. Utilizando-se do programa Image-Pro Plus, foi medida a distância ( $\mu\text{m}$ ) em linha reta, de cada uma das espermatogônias, nos seis estádios do CES, até o vaso sanguíneo mais próximo. Os vasos sanguíneos considerados foram os capilares e as vênulas.

##### *4.8.2. Avaliação de componentes somáticos relacionados com o nicho espermatogonial.*

Como a região do interstício testicular do sagui está, na maioria das vezes, bem delimitada entre três ou mais túbulos seminíferos, o que não acontece no testículo humano, foi possível determinar, morfológicamente, se células e estruturas presentes no interstício

interferem no nicho espermatogonial. Primeiramente, avaliou-se o posicionamento das espermatogônias em relação ao interstício e regiões de túbulo contato (**Fig. 6**). Aproximadamente 30 fotomicrografias do parênquima testicular, em um aumento de 40x, foram obtidas de cada animal. As imagens foram tratadas digitalmente utilizando-se do programa Adobe Photoshop, onde as diferentes gerações espermatogoniais foram identificadas e marcadas com diferentes cores. Como a organização do parênquima testicular do sagui assemelha-se com aquela dos roedores, identificou-se as espermatogônias presentes em regiões de contato com o interstício e em regiões de contato com outro túbulo seminífero (**Fig. 6**).



**Figura 6.** Esquema utilizado para determinação do posicionamento das espermatogônias no epitélio seminífero do sagui baseado em regiões de contato com o interstício ou contato túbulo-túbulo. (Adaptado de Chiarini-Garcia et al., 2003).

Posteriormente, quantificou-se o número de cada geração espermatogonial e calculou-se a porcentagem, dentro de uma mesma geração espermatogonial, de quantas espermatogônias estavam posicionadas em regiões de contato túbulo-túbulo e túbulo-interstício.

Outro parâmetro avaliado foi o número de células de Leydig em relação aos estádios do CES dos túbulos adjacentes. Para cada região intersticial compartimentalizada entre os túbulos seminíferos, identificou-se morfologicamente as células de Leydig presentes, quantificou-se e associou-se o número delas com os estádios do CES presentes no epitélio

seminífero dos túbulos adjacentes. As células de Leydig consideradas encontravam-se até 50µm de distância do túbulo seminífero que estava sendo avaliado.

Por fim, avaliou-se se o número e tamanho de cortes transversais dos vasos sanguíneos presentes no interstício teriam algum tipo de relação com o nicho espermatogonial e se estes estariam associados a algum estágio específico do CES. Para este fim, capilares e vênulas presentes nas regiões intersticiais foram morfológicamente identificados e quantificados e o seu número associado aos estádios do CES dos túbulos adjacentes. Para isto, 25 fotomicrografias do parênquima testicular foram obtidas, por animal, para determinação da área dos cortes transversais dos vasos sanguíneos identificados. Através do programa Image-Pro Plus, mediu-se a área destes vasos e associou-se com os estádios do CES presentes nos túbulos seminíferos adjacentes. Os vasos sanguíneos considerados encontravam-se até 50µm de distância do túbulo seminífero adjacente.

#### **4.9. Análise estatística**

Para avaliação estatística dos dados do diâmetro nuclear médio e do nicho espermatogonial, foi utilizado o programa GraphPad Prism 6.0. Os parâmetros avaliados de ambos os grupos experimentais, humano e sagui, foram testados para normalidade antes da análise estatística. As médias dos grupos experimentais foram comparadas pelo Teste T de Student. Aqueles que não apresentaram distribuição normal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis onde  $P < 0,05$  foi considerado significativo. Nas tabelas e nos gráficos, os dados relacionam média com o erro padrão da média.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Parâmetros clínicos não-invasivos do homem

Os parâmetros clínicos não invasivos avaliados demonstram que, de uma forma indireta, a espermatogênese destes pacientes deve estar preservada. Como pode ser observado na **Tabela 2**, a dosagem hormonal de cada paciente encontra-se dentro de seus respectivos valores de referência.

**Tabela 2.** Parâmetros clínicos e seus respectivos valores de referência dos quatro pacientes (P1-P4) homens avaliados.

| Parâmetro clínico | P1   | P2 | P3   | P4   | VR*         |
|-------------------|------|----|------|------|-------------|
| FSH (mUI/mL)      | 2,57 | NA | 1,49 | 1,64 | 1,55 - 9,74 |
| LH (mUI/mL)       | 3,91 | NA | 4,18 | 3,83 | 0,82 - 6,22 |
| TTB (ng/dL)       | 227  | NA | 523  | 646  | 71,8 - 623  |

*Legenda:* FSH, hormônio folículo estimulante; LH, hormônio luteinizante; TTB, testosterona total basal; NA, não avaliado; VR, valor de referência; \*Valores segundo manual da Vitros Imunodiagnostic®.

### 5.2. Parâmetros clínicos não-invasivos do sagui

Os parâmetros clínicos avaliados no sagui, como forma de avaliação indireta de seu estado clínico, foi o peso corporal e quanto à espermatogênese foi o peso testicular. Ambos os parâmetros se encontram dentro de seus respectivos valores de referência como pode ser observado na **Tabela 3**. A idade exata dos animais não foi informada, mas sabia-se que todos os cinco animais utilizados tinham mais de dois anos de vida, o que os caracterizava como animais sexualmente maduros, uma vez que eles atingem a puberdade entre o período de 12 a 15 meses de vida (Abbott e Hearn, 1978).

**Tabela 3.** Peso corporal e peso testicular médio dos saguis (A1-A5) avaliados, em gramas.

| Parâmetro clínico | A1   | A2   | A3   | A4   | A5   | VR*         |
|-------------------|------|------|------|------|------|-------------|
| Peso corporal     | 300  | 261  | 315  | 296  | 292  | 300 ± 15    |
| Peso TD           | 0,62 | 0,49 | 0,55 | 0,60 | 0,65 | 0,53 ± 0,06 |
| Peso TE           | 0,66 | 0,44 | 0,52 | 0,59 | 0,59 | 0,54 ± 0,06 |

*Legenda:* TD, testículo direito; TE, testículo esquerdo; VR, valor de referência; \* valores de referência conforme Leal e França (2006). Dados apresentados como média ± EPM.

### 5.3. Caracterização morfológica das espermatogônias

As principais características morfológicas das espermatogônias do homem ( $A_{\text{escura}}$ ,  $A_{\text{clara}}$ , B) e do sagui ( $A_{\text{escura}}$ ,  $A_{\text{clara}}$ , B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>), observadas sob MLAR, estão descritas na **Tabela 4** e podem ser observadas na **Figura 7** para o homem, e na **Figura 8** para o sagui. Não foram observadas variações morfológicas de uma única geração espermatogonial relacionadas a estágios específicos do CES, similar ao observado em estudos prévios (Nihi et al., 2017; Caldeira-Brant et al., dados não publicados).

Durante a caracterização morfológica das espermatogônias dos primatas utilizados neste trabalho, observamos que, especificamente, os núcleos das espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$  se apresentavam morfológicamente de duas formas: (a) aquelas com zona de rarefação da cromatina dando ao núcleo aspecto da presença de um vacúolo nuclear e (b) aquelas que não continham esta zona de rarefação. Esta peculiaridade nuclear foi descrita anteriormente por outros autores tanto para o homem (Nihi et al., 2017), quanto para o sagui (Caldeira-Brant et al., dados não publicados) sendo que esta rarefação da cromatina tem sido classicamente chamada de vacúolo nuclear. Desta forma, denominamos, no presente estudo, de  $A_{e\emptyset\text{Vac}}$  aquelas espermatogônias com ausência de vacúolo nuclear e de  $A_{e\text{Vac}}$  aquele subtipo no qual este vacúolo nuclear estava presente. Devido à utilização de espessura de corte histológico de apenas 1 $\mu\text{m}$ , estes vacúolos foram facilmente visualizados e, desta forma, as espermatogônias  $A_{e\text{Vac}}$  e  $A_{e\emptyset\text{Vac}}$  foram, ao longo de todo este trabalho, avaliadas morfometricamente como subtipos diferentes, buscando alguma peculiaridade que pudesse diferenciá-las funcionalmente.

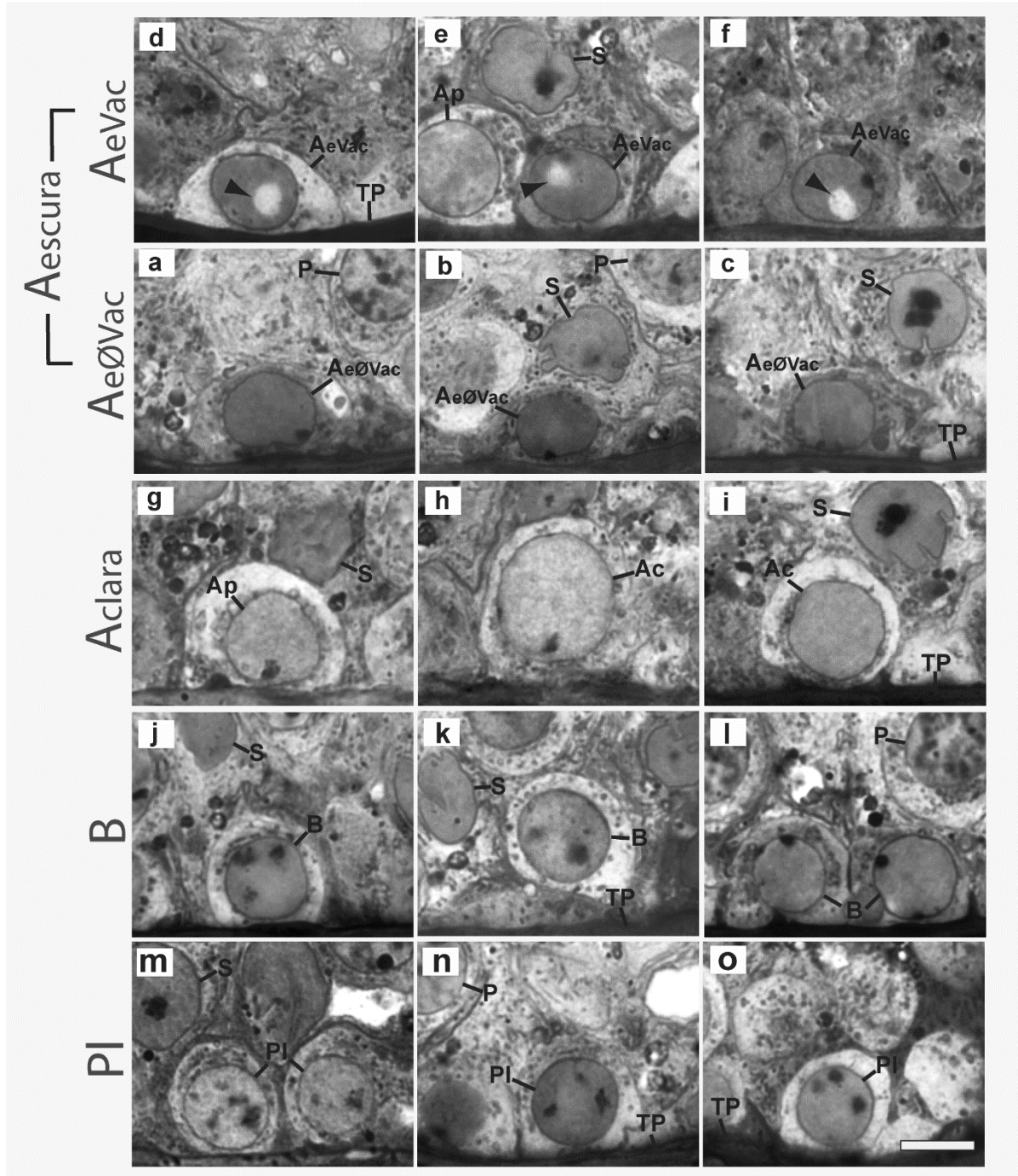
As gerações espermatogoniais de ambos os primatas, quando comparadas entre si, apresentam muitas similaridades, como por exemplo a distribuição e condensação da cromatina. Entretanto, algumas gerações apresentam diferenças significantes. A espermatogônia  $A_{e\text{Vac}}$  do homem apresenta zonas de rarefação da cromatina concêntricas e bem definidas (**Fig. 7**). Por outro lado, a  $A_{e\text{Vac}}$  do sagui apresenta vacúolos tanto na forma concêntrica como difusos pelo núcleo da célula (**Fig. 8**). Outra geração que apresenta diferenças morfológicas quando comparamos ambas as espécies de primatas é a espermatogônia do tipo B. A espermatogônia B do homem se assemelha, morfológicamente, à espermatogônia B<sub>1</sub> do sagui. No entanto, a espermatogônia B<sub>2</sub> do sagui difere-se da



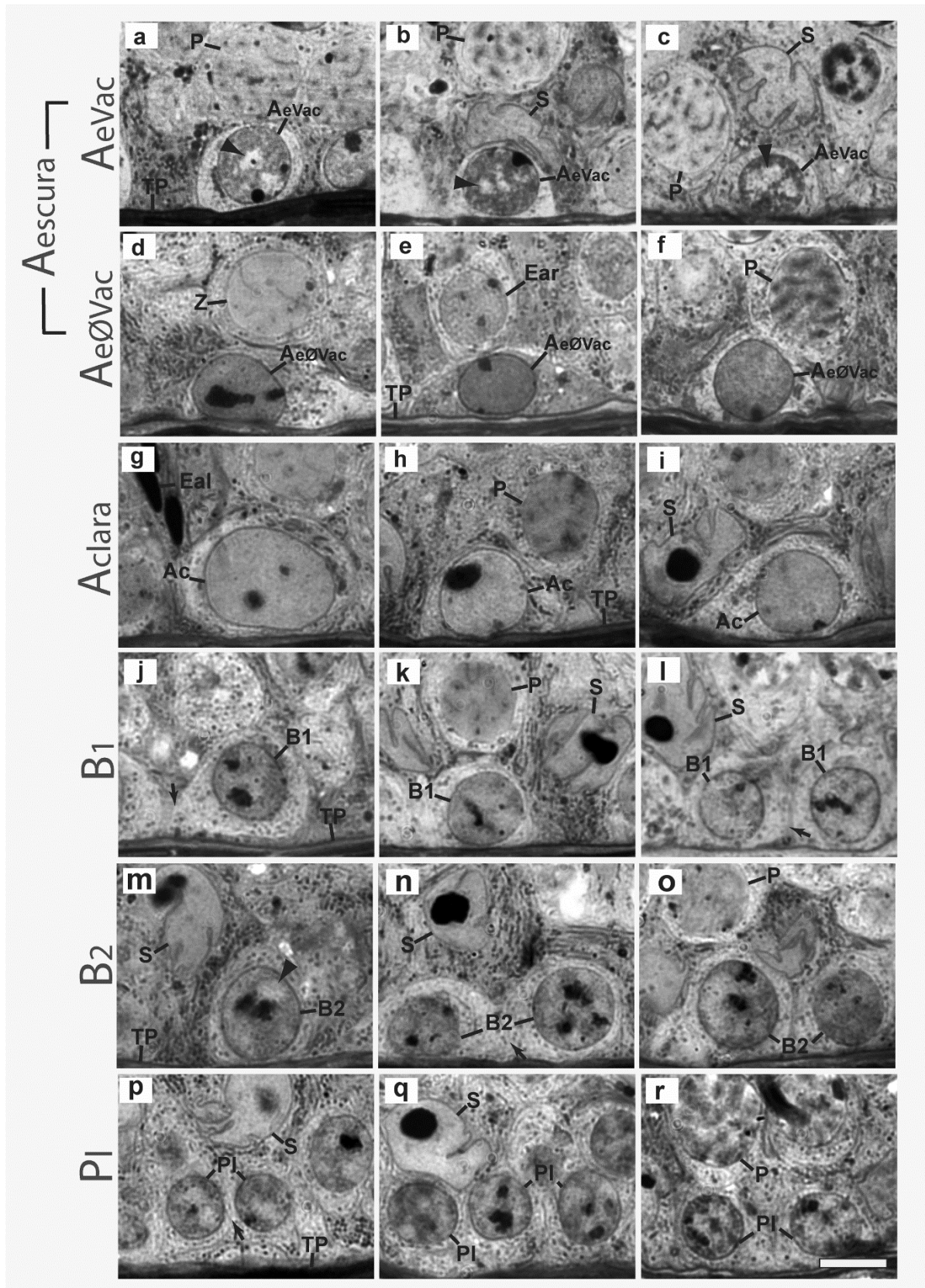
espermatogônia B do homem devido a maior condensação da eucromatina e maior quantidade de grânulos de heterocromatina (Tab. 4).

**Tabela 4.** Descrição morfológica das diferentes gerações espermatogoniais e espermatócito em preleptóteno em relação a: núcleo, nucléolo, heterocromatina, eucromatina, e os estádios do CES em que elas se encontram, em ambos os primatas, homem (H) e sagui (S).

| Célula         |        | Grupo           | Núcleo          | Nucléolo   | Heterocromatina  | Eucromatina  | CES     |
|----------------|--------|-----------------|-----------------|--|--|--|---------|
| <b>Aescura</b> | AeVac  | H<br>(Fig.7a-c) | Oval            | Um ou dois por secção, denso, compacto e periférico                    | Pequenos e raros pontos (ocupam <1% do núcleo)   | Fortemente corada, com áreas concêntricas de rarefação (vacúolos)        | I a VI  |
|                |        | S<br>(Fig.8a-c) | Oval            | Um ou dois por secção, denso e compacto. Raros difusos e periféricos.  | Pequenos, frequentemente periféricos, com raros grumos aderidos ao envoltório nuclear (ocupam ~5% do núcleo) | Fortemente corada, com pequenas ou grandes áreas de rarefação (vacúolos) | I a VI  |
|                | Ae∅Vac | H<br>(Fig.7d-f) | Oval            | Um ou dois por secção, denso, concêntrico e periférico                 | Pequenos e raros pontos periféricos (ocupam <2% do núcleo)   | Fortemente corada, homogeneamente distribuída pelo núcleo                | I a VI  |
|                |        | S<br>(Fig.8d-f) | Oval            | Um ou dois por secção, denso, concêntrico. Raros difusos e periféricos | Pequenos, frequentemente aderidos ao envoltório nuclear (ocupam ~5% do núcleo)                               | Fortemente corada, homogeneamente distribuída pelo núcleo                | I a VI  |
| <b>Aclara</b>  |        | H<br>(Fig.7z-i) | Oval ou redondo | Um por secção, denso e compacto  | Pequenos e raros pontos periféricos (ocupam ~1% do núcleo)   | Fracamente corada e distribuída homogeneamente pelo núcleo               | I a VI  |
|                |        | S<br>(Fig.8z-i) | Oval ou redondo | Um por secção, denso, difuso e/ou compacto                             | Frequentemente pequenos, densos e aleatoriamente distribuídos (ocupam ~3% do núcleo)                         | Fracamente corada e distribuída homogeneamente pelo núcleo               | I a VI  |
| <b>B</b>       | B      | H<br>(Fig.7j-l) | Redondo         | Dois por secção, difusos e maiores que nas gerações antecessoras       | Grumos aleatoriamente distribuídos pelo núcleo (ocupam ~3% do núcleo)  | Bem corada e, frequentemente, granular                                   | VI-I-II |
|                | B1     | S<br>(Fig.8j-l) | Redondo         | Um ou dois por secção, densos, concêntricos ou reticulado              | Pontilhada ou em grumos aleatoriamente distribuídos (ocupam ~5% do núcleo)                                   | Bem corada, manchada e granular  | VI-I    |
|                | B2     | S<br>(Fig.8m-o) | Redondo         | Um a três por secção, densos, concêntricos ou reticulados              | Pequenos pontos ou grandes grumos aleatoriamente distribuídos (ocupam ~10% do núcleo)                        | Mais corada que nas B1, manchada e frequentemente com vacúolos           | I-II    |
| <b>PI</b>      |        | H<br>(Fig.7m-o) | Redondo         | Dois por secção, mais difusos e dispersos que nas espermatogônias B    | Grumos difusos, as vezes reticulares, aleatoriamente distribuídos (ocupam ~10% do núcleo)                    | Bem corada e manchada  | III     |
|                |        | S<br>(Fig.8p-r) | Redondo         | Dois por secção, grandes e difusos como nas espermatogônias B2         | Pequenos ou grandes grumos aleatoriamente distribuídos (ocupam ~15% do núcleo)                               | Mais corada que nas espermatogônias B, granular e manchada               | III     |



**Figura 7.** Fotomicrografias das espermatogônias do homem: Aescura (AeVac, AeØVac), Aclara, B e do espermatócito em PI sob microscopia de luz de alta resolução. Ac, espermatogônia Aclara; B, espermatogônia do tipo B; PI, espermatócito em preleptóteno; P, espermatócito em paquíteno; S, célula de Sertoli, TP, túnica própria; cabeça de seta, vacúolo nuclear ou zona de rarefação da cromatina. Barra:8 $\mu$ m

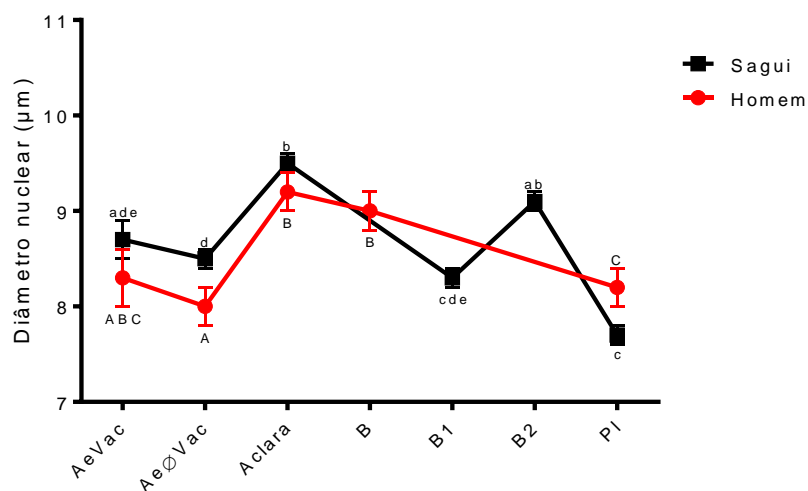


**Figura 8.** Fotomicrografias das espermatogônias do sagui: Aescura (AeVac, AeØVac), Aclara, B1, B2 e do espermatócito em PI sob microscopia de luz de alta resolução. Ac, espermatogônia Aclara; B1, espermatogônia do tipo B1; B2, espermatogônia do tipo B2; PI, espermatócito em preleptóteno; Eal, espermátide alongada; Ear, espermátide arredondada; P, espermatócito em paquíteno; Z, espermatócito em zigóteno; S, célula de Sertoli, TP, túnica própria; cabeça de seta, vacúolo nuclear ou zona de rarefação da cromatina; seta, ponte citoplasmática. Barra:8µm.

#### 5.4. Diâmetro nuclear das espermatogônias

Os diâmetros das células germinativas (espermatogônias e espermatócitos em preleptóteno), apresentados na **Figura 9**, foram semelhantes entre ambas as espécies. A medida do diâmetro nuclear, correlacionada com as características morfológicas das células, é um fator determinante para caracterização e diferenciação das mesmas. A partir desta análise, pode-se confirmar que a espermatogônia  $A_{clara}$  possui um grande diâmetro nuclear, sendo maior do que grande parte das espermatogônias presentes no epitélio seminífero tanto do homem quanto do sagui ( $P < 0,05$ ). (**Fig.9**).

Por outro lado, observou-se que o espermatócito primário em preleptóteno tem o menor diâmetro nuclear, sendo considerada a menor célula dentre as medidas no sagui. É importante também associar que, embora existam diferenças morfológicas entre os dois subtipos de espermatogônias  $A_{escuras}$  ( $A_{e\emptyset Vac}$  e  $A_{eVac}$ ), há pouca diferença entre os diâmetros nucleares de ambas, sendo levemente superior na vacuolada, em ambos os primatas. Em se tratando das espermatogônias do tipo B, no homem, observou-se que elas possuem um tamanho intermediário entre aquelas do tipo A, sendo pouco menores que as  $A_{claras}$ , e maiores do que as  $A_{escuras}$ . Em contrapartida, no sagui, enquanto a espermatogônia  $B_1$  possui tamanho similar as espermatogônias  $A_{escuras}$ , sendo levemente menor, a espermatogônia  $B_2$  é maior do que a  $B_1$ .



**Figura 9.** Diâmetro nuclear médio das espermatogônias do homem e do sagui. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM. Letras maiúsculas diferem significativamente dentro do grupo do homem e letras minúsculas diferem significativamente dentro do grupo do sagui ( $P < 0,05$ ).

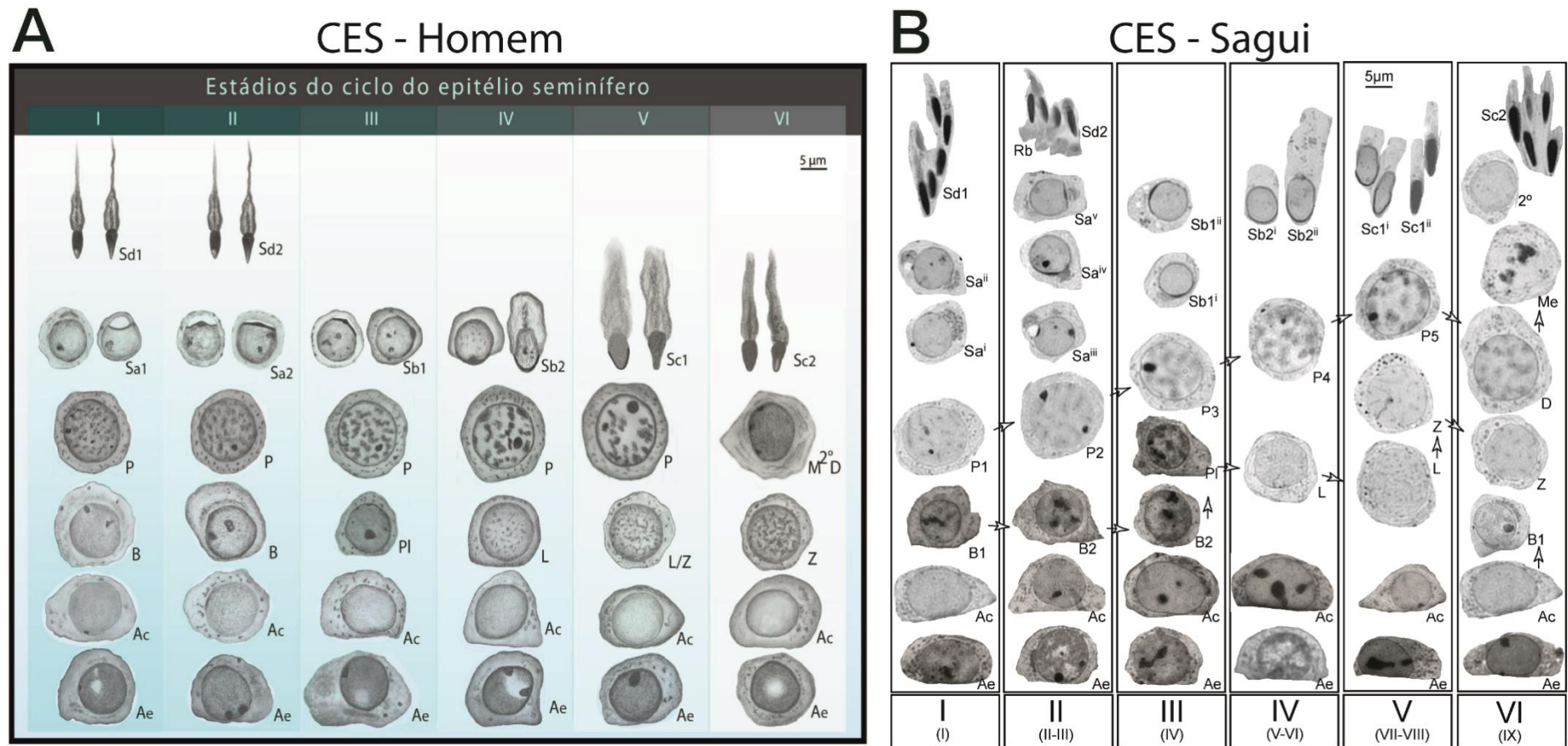
## 5.5. Estádios do ciclo do epitélio seminífero

### 5.5.1. Caracterização morfológica dos estádios do CES

Após a descrição morfológica detalhada das células germinativas utilizando-se da técnica de MLAR, foi possível identificar, com precisão, as associações celulares presentes no epitélio seminífero. Os estádios do CES do homem foram baseados no trabalho de Nihi et al. (2017), como pode ser observado na **Figura 10A**. Em relação à adaptação do CES do sagui, originalmente com IX estádios (Holt e Moore, 1984), para VI estádios, foi levado em consideração o desenvolvimento do sistema acrossômico nas espermátides em conjunto com as associações das demais células germinativas (Wistuba et al, 2003). Como pode ser observado na **Figura 10B**, há um padrão de maturação das espermátides, a partir do estágio I, onde observa-se uma variação do tamanho e angulação da vesícula acrossômica. Esta caracterização, juntamente com as gerações de células germinativas da fase proliferativa e meiótica, permitiu estabelecer para o sagui seis estádios do CES, assim como no homem. As principais semelhanças e diferenças entre cada um dos seis estádios do homem e do sagui estão descritas na **Tabela 5**.

**Tabela 5.** Principais semelhanças e diferenças da distribuição das células germinativas em relação aos seis estádios do CES do homem e do sagui

| Estádio | Semelhanças   | Diferenças   |
|---------|---|--|
| I       | <ul style="list-style-type: none"> <li>Três gerações espermatogoniais: Ae<math>\emptyset</math>Vac/AeVac, Aclara e B</li> <li>Início da formação da vesícula acrossômica nas espermátides arredondadas</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Presença de espermatogônia B no homem e B1 no sagui.</li> </ul> |
| II      | <ul style="list-style-type: none"> <li>Três gerações espermatogoniais: Ae<math>\emptyset</math>Vac/AeVac, Aclara e B</li> <li>Achatamento da vesícula acrossômica nas espermátides</li> <li>Espermição</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Presença de espermatogônia B no homem e B1 no sagui.</li> </ul> |
| III     | <ul style="list-style-type: none"> <li>Duas gerações espermatogoniais (Ae<math>\emptyset</math>Vac/AeVac e Aclara)</li> <li>Presença do espermatócito em preleptóteno</li> <li>Vesícula acrossômica cobre ~40% da superfície nuclear das espermátides e se direciona para a membrana basal do túbulo seminífero.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Presença de espermatogônia B no sagui (B2)</li> </ul>           |
| IV      | <ul style="list-style-type: none"> <li>Duas gerações espermatogoniais (Ae<math>\emptyset</math>Vac/AeVac e Aclara)</li> <li>Presença do espermatócito em leptóteno</li> <li>Início do alongamento das espermátides arredondadas</li> </ul>  |  |
| V       | <ul style="list-style-type: none"> <li>Duas gerações espermatogoniais (Ae<math>\emptyset</math>Vac/AeVac e Aclara)</li> <li>Aparição do espermatócito em zigóteno</li> <li>Presença de espermátides alongadas</li> </ul>  |  |
| VI      | <ul style="list-style-type: none"> <li>Duas gerações espermatogoniais (Ae<math>\emptyset</math>Vac/AeVac e Aclara)</li> <li>Presença dos espermatócitos em diplóteno e secundário</li> <li>Presença de divisões meióticas</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Presença de espermatogônia B no homem e B1 no sagui.</li> </ul> |



**Figura 10.** Associações das células germinativas presentes nos seis estádios do (A) CES do homem (Nihl et al., 2017) e (B) do sagui. I-VI, estádios do CES; Ae, espermatogônia Aescura; Ac, espermatogônia Aclara; B(1-2), espermatogônia B; Pl, espermatócito em preleptóteno; L, espermatócito em leptóteno; Z, espermatócito em zigóteno; P, espermatócito em paquíteno; Me, divisão meiótica; 2º, espermatócito secundário; S (a-d), espermátides, Rb, corpo residual. Barra: 5µm.

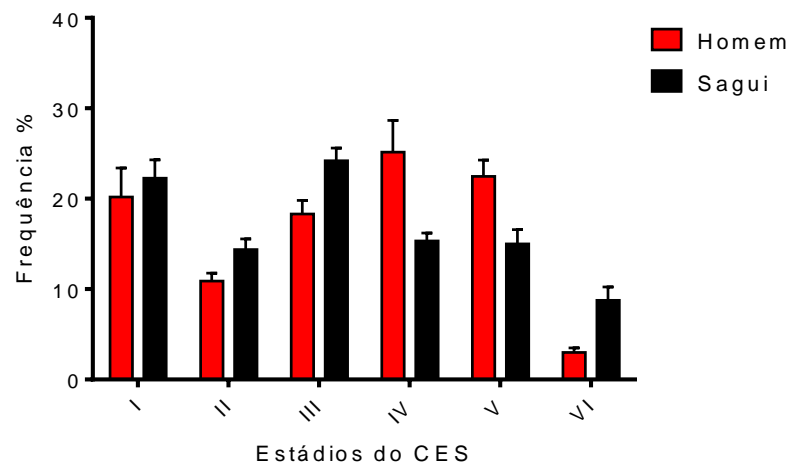
### 5.5.2. Frequência relativa (%) dos estádios do CES

Após a identificação das associações celulares e dos limites precisos entre os seis estádios do CES, foi possível calcular a frequência relativa (%) de cada um dos estádios em ambos os primatas. Como pode ser observado na **Tabela 6** e na **Figura 11**, há pequena variação entre a duração dos três primeiros estádios do CES quando comparamos o homem com o sagui. Entretanto, a frequência dos três estádios iniciais é maior no sagui. Por outro lado, nos estádios IV e V, observa-se uma variação maior entre a frequência dos estádios, sendo que a duração deles é maior no CES do homem. Já no estágio onde ocorre a divisão da meiose (VI), a sua frequência foi expressivamente maior (3x) no sagui.

**Tabela 6.** Frequência relativa média (%) dos estádios do CES em ambos os primatas: homem e sagui

| Grupo | I          | II         | III        | IV         | V          | VI        |
|-------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|
| Homem | 20,2 ± 3,2 | 10,9 ± 0,9 | 18,3 ± 1,5 | 25,2 ± 3,5 | 22,5 ± 1,8 | 3,0 ± 0,5 |
| Sagui | 22,3 ± 2,1 | 14,4 ± 1,2 | 24,2 ± 1,4 | 15,3 ± 0,9 | 15,0 ± 1,6 | 8,8 ± 1,5 |

Legenda: I-VI, estádios do CES; frequência relativa representada como média ± EPM



**Figura 11.** Frequência relativa (%) dos estádios do CES do homem e do sagui.

### 5.5.3. Frequência relativa de etapas da meiose do processo espermatogênico

Baseando-se na frequência relativa média dos estádios do CES, é possível calcular a duração de etapas do processo espermatogênico. A etapa pós-meiótica corresponde ao período subsequente à segunda divisão da meiose (estádio VI), e ocorre entre os estádios I e

II. Já a etapa pré-meiótica, que antecede a divisão meiótica, é representada pelos estádios III, IV e V. Por fim a etapa meiótica, onde acontecem as duas divisões da meiose com o diplóteno dividindo para formar o espermatócito secundário (meiose I - divisão reducional) e, em seguida, a meiose II (divisão equacional) formando as células haplóides (espermátides arredondadas). Como pode ser observado na **Tabela 7**, a etapa pré-meiótica foi maior no homem, onde nos estádios III, IV e V ocorre o desenvolvimento dos espermatócitos primários em preleptóteno, leptóteno, zigóteno e paquíteno e alongamento das espermátides. Ao contrário, no estágio VI onde ocorrem as divisões da meiose, a frequência foi maior no sagui, o que equivale à período de tempo mais longo.

**Tabela 7.** Frequência relativa média (%) de etapas da meiose do processo espermatogênico em ambos os primatas: homem e sagui.

| Grupo | Etapa pós-meiótica<br>(estádios I e II) | Etapa pré-meiótica<br>(estádios III, IV e V) | Etapa meiótica<br>(estádio VI) |
|-------|---|--|--------------------------------|
| Homem | 31,1 ± 3,8                              | 65,9 ± 3,6                                   | 3,0 ± 0,5                      |
| Sagui | 36,6 ± 2,2                              | 54,6 ± 1,4                                   | 8,8 ± 1,5                      |

*Legenda:* Dados apresentados como média ± EPM.

## 5.6. Índices da espermatogênese

### 5.6.1. Índices da espermatogênese padrão

Os índices da espermatogênese demonstram o rendimento de diferentes etapas do processo espermatogênico, tanto da eficiência da espermatogênese como um todo, como de partes que envolvem as divisões celulares (mitótica e meiótica) e a capacidade de suporte das células de Sertoli. Para o cálculo dos índices mitótico e meiótico, utilizamos, assim como no trabalho de Melo et al. (2014) o número total da espermatogônias tronco  $A_{\text{escura}}$  ( $A_{\text{e}\emptyset\text{Vac}} + A_{\text{eVac}}$ ) no estágio III do CES do homem e do sagui, independente da presença de vacúolos nucleares.

Como pode ser observado na **Tabela 8**, os índices da espermatogênese demonstraram algumas diferenças entre os primatas em questão. O índice mitótico, que representa a eficiência da fase proliferativa (espermatogonial), foi bem menor no homem quando comparado com o sagui. Este achado pode estar relacionado ao fato do homem apresentar uma geração espermatogonial a menos ( $B$  no homem e  $B_1$  e  $B_2$  no sagui). Em relação ao índice meiótico, que mede a eficiência da fase meiótica do ciclo, os primatas apresentam valores similares ( $\sim 3$ ) de um valor teórico esperado de 4 espermátides para cada espermatócito primário. A capacidade das células de Sertoli em suportar as espermátides no seu citoplasma,



é três vezes maior no sagui quando comparado com esta capacidade no homem, o que também pode estar relacionado à diferença do número de gerações espermatogoniais entre estas duas espécies. Por último, quanto à eficiência geral da espermatogênese, que demonstra quantas espermátides são produzidas a partir de uma única espermatogônia tronco ( $A_{\text{escura}}$ ), observou-se que o sagui é pelo menos 3x mais eficiente que o homem (**Tab. 8**).

O índice mitótico pode ser utilizado para determinar o número de gerações de espermatogônias diferenciadas em uma espécie através da divisão do número de espermátócitos em preleptóteno pelo número da primeira geração de espermatogônia diferenciada (B no homem e B1 no sagui). Observamos que, para o homem, este índice foi de 1,5 e no sagui 2,8. Considerando a presença de uma geração de espermatogônia B no homem e duas no sagui, os índices mitóticos esperados seriam de  $\sim 2$  para o homem e um valor entre dois e quatro para sagui. Os resultados obtidos comprovaram a presença de uma geração de espermatogônia B no homem e duas gerações para o sagui (B1 e B2).

**Tabela 8.** Índices mitótico, meiótico, capacidade de suporte da célula de Sertoli e eficiência geral da espermatogênese do homem e do sagui.

| Epg-tronco          | Grupo | Mitótico      | Meiótico      | Suporte células de Sertoli | Eficiência Espermatogênese |
|---------------------|-------|---------------|---------------|----------------------------|----------------------------|
| $A_{\text{escura}}$ | Homem | $3,0 \pm 0,2$ | $2,8 \pm 0,3$ | $2,1 \pm 0,2$              | $13,0 \pm 1,0$             |
|                     | Sagui | $8,4 \pm 0,9$ | $3,0 \pm 0,1$ | $6,3 \pm 2,1$              | $45,4 \pm 12,0$            |

*Legenda:* Epg-tronco, espermatogônia tronco. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM.

### 5.6.2. Índices da espermatogênese considerando os dois subtipos de $A_{\text{escuras}}$

Determinou-se também os índices mitótico e eficiência geral da espermatogênese levando em consideração as duas variações da espermatogônia tronco  $A_{\text{escura}}$ , as com vacúolo nuclear ( $A_{\text{eVac}}$ ) e aquelas sem vacúolo nuclear ( $A_{\text{e}\emptyset\text{Vac}}$ ). Esta avaliação teve como objetivo verificar como estes índices se comportam quando cada um destes subtipos passa a ser considerado, separadamente, como espermatogônia tronco. Os resultados obtidos (**Tab. 9**) mostraram que ambos os índices são maiores no sagui, à semelhança do encontrado quando os dois subtipos foram considerados juntos, tanto para as  $A_{\text{eVac}}$  quanto para as  $A_{\text{e}\emptyset\text{Vac}}$ . Entretanto, quando avaliamos apenas dentro de uma mesma espécie, observamos que os dois índices eram maiores ( $\sim 2x$ ) quando as espermatogônias com vacúolos ( $A_{\text{eVac}}$ ) foram consideradas para o cálculo como células tronco. Este achado, observado em ambas as

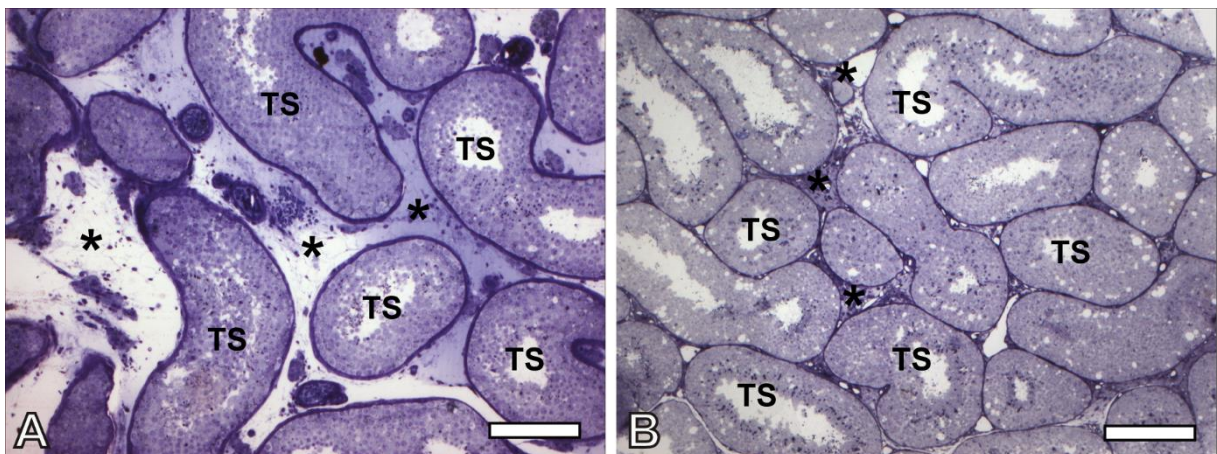
espécies, demonstra que os dois subtipos de espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$  apresentam população diferente, o que pode indicar diferente funcionalidade e papel em relação à manutenção do processo espermatogênico.

**Tabela 9.** Índice mitótico e eficiência da espermatogênese do homem e do sagui considerando-se as espermatogônias  $A_{\text{eVac}}$  e  $A_{\text{e}\emptyset\text{Vac}}$  como células tronco. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM

| Epg-tronco                        | Grupo | Índice mitótico | Eficiência da espermatogênese |
|-----------------------------------|-------|-----------------|-------------------------------|
| $A_{\text{eVac}}$                 | Homem | $8,6 \pm 1,0$   | $36,7 \pm 3,7$                |
|                                   | Sagui | $28,2 \pm 4,4$  | $147,5 \pm 21,3$              |
| $A_{\text{e}\emptyset\text{Vac}}$ | Homem | $4,8 \pm 0,5$   | $20,6 \pm 1,9$                |
|                                   | Sagui | $12,2 \pm 1,6$  | $66,5 \pm 21,4$               |

### 5.7. Composição do parênquima testicular

Para determinar a região do parênquima testicular onde estão localizados os nichos espermatogoniais, constituídos pelas espermatogônias tronco associadas às células somáticas e tecidos adjacentes, faz-se necessário primeiro entender a distribuição topográfica destes componentes levando em consideração a disposição dos túbulos seminíferos e do interstício testicular. Como pode ser bem observado na **Figura 12**, o interstício no testículo humano é nitidamente maior no homem (**Fig. 12A**) quando comparado com o do sagui (**Fig. 12B**). De fato, através de avaliação morfométrica verificamos que enquanto a proporção volumétrica (%) ocupada pela região intersticial foi de 42% no homem, no sagui foi de apenas 14% (**Tabela 10**).



**Figura 12.** Fotomicrografias de corte transversal do parênquima testicular do homem (A) e do sagui (B). TS, túbulo seminífero; asterisco, região intersticial. Barra:172 $\mu\text{m}$ .

Desta forma, como no homem o espaço intersticial é maior, os seus constituintes, tais como vasos sanguíneos, células de Leydig e células efetoras (macrófagos, mastócitos, etc), encontram-se dispersos em algumas situações dificultando as inter-relações destes componentes intersticiais com as espermatogônias, posicionadas nos túbulos seminíferos, dificultando a avaliação dos nichos espermatogoniais.

**Tabela 10.** Proporção da área (%) das regiões intersticiais e tubulares nos testículos do homem e do sagui. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM.

| Grupo | Interstício  | Túbulo       |
|-------|--------------|--------------|
| Homem | 42 $\pm$ 3,4 | 58 $\pm$ 3,4 |
| Sagui | 14 $\pm$ 0,9 | 86 $\pm$ 0,9 |

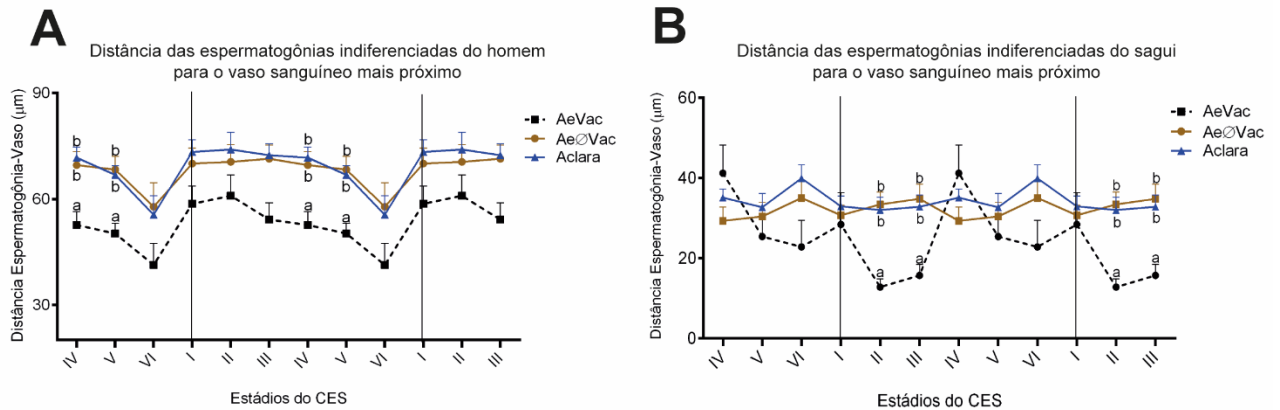
## 5.8. Nicho espermatogonial

### 5.8.1 Posicionamento das espermatogônias em relação à vascularização

Após um melhor entendimento da composição do parênquima testicular no que diz respeito às regiões tubulares e intersticiais, verificou-se que a forma mais confiável de analisar, nas duas espécies, o posicionamento das espermatogônias em nichos foi relacionando a distância entre as espermatogônias com vasos sanguíneos (vênulas e capilares) presentes no interstício. Assim como as espermatogônias indiferenciadas dos roedores se posicionam próximas a vascularização (Chiarini-Garcia e Russell, 2001; Chiarini-Garcia et al., 2003; Yoshida et al., 2007), buscamos avaliar se este comportamento se repete em primatas medindo esta distância ( $\mu\text{m}$ ) entre as espermatogônias e o vaso sanguíneo mais próximo, em cada um dos estádios do CES.

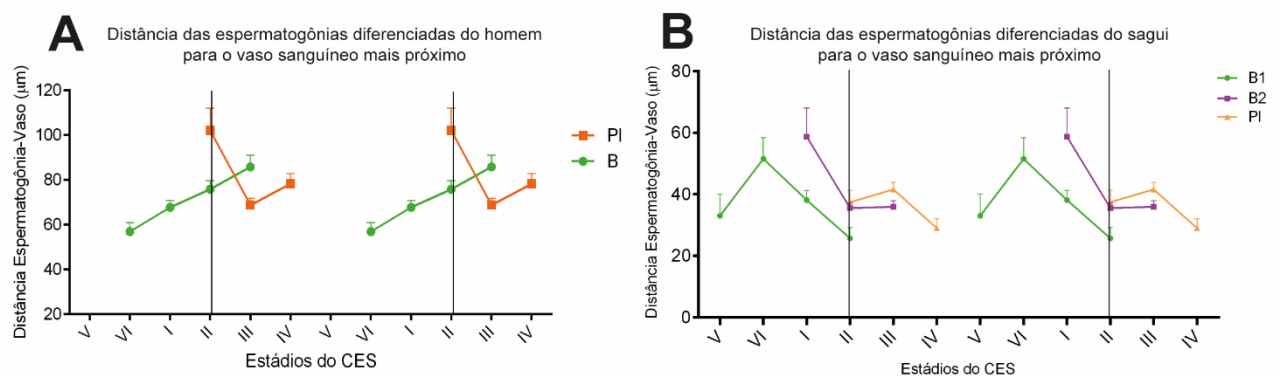
Verificamos que todas as espermatogônias estão mais distantes dos vasos sanguíneos no homem, o que seria esperado uma vez que o espaço intersticial é maior nesta espécie. Um achado semelhante entre as duas espécies seria em relação à distância das espermatogônias indiferenciadas  $A_{e\emptyset Vac}$  e  $A_{clara}$  que se comportam de forma semelhante em relação aos vasos sanguíneos (**Fig. 13**). A distância delas tem pequena variação em relação aos vasos sanguíneos ao longo dos seis estádios do CES. Enquanto no homem ambas distanciam em torno de  $\sim 70\mu\text{m}$ , no sagui estão a  $\sim 35\mu\text{m}$  dos vasos mais próximos. Verificamos, pela primeira vez, que as espermatogônias com vacúolos nucleares ( $A_{eVac}$ ) se comportaram de forma peculiar. Em ambas as espécies se posicionaram próximas dos vasos sanguíneos, estando mais próximas do que as demais espermatogônias indiferenciadas nos estádios IV e V no homem, e II e III no

sagui ( $P < 0,05$ ) (**Fig. 13**). Quanto ao distanciamento destas células ao longo dos estádios em relação aos vasos, verificou-se que enquanto no homem houve uma pequena variação no distanciamento (entre  $\sim 40$  e  $\sim 60\mu\text{m}$ ), nos saguis este distanciamento foi bastante variável com extremos entre os estádios II ( $13\mu\text{m}$ ) e IV ( $41\mu\text{m}$ ).



**Figura 13.** Distância ( $\mu\text{m}$ ) entre as espermatogônias indiferenciadas: AeVac, AeØVac, Aclara, e o vaso sanguíneo mais próximo, nos seis estádios do CES do homem (A) e do sagui (B). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM, onde letras diferentes no mesmo estádio diferem significativamente ( $P < 0,05$ ).

Em se tratando das espermatogônias diferenciadas e do espermatócito primário em preleptóteno, do homem e do sagui, observa-se que elas apresentam uma variação considerável de seu posicionamento em relação aos vasos sanguíneos no decorrer dos estádios do CES (**Fig. 14**). Enquanto no homem as espermatogônias do tipo B se afastam dos vasos sanguíneos (**Fig. 14A**), no sagui, as espermatogônias B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> apresentam um posicionamento aleatório (**Fig. 14B**). Assim como as espermatogônias diferenciadas, os PI também se posicionam de forma aleatória em ambos os primatas (**Fig. 14A-B**).

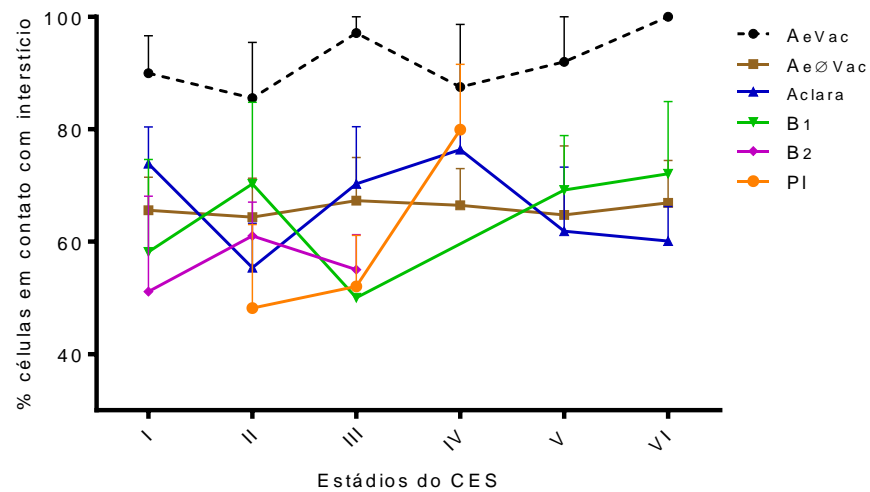


**Figura 14.** Distância ( $\mu\text{m}$ ) entre as espermatogônias diferenciadas: B (homem), B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (sagui), e do espermatócito em preleptóteno para o vaso sanguíneo mais próximo, nos seis estádios do CES do homem (A) e do sagui (B). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM.

### *5.8.2. Avaliação de componentes somáticos relacionados com o nicho espermatogonial do sagui*

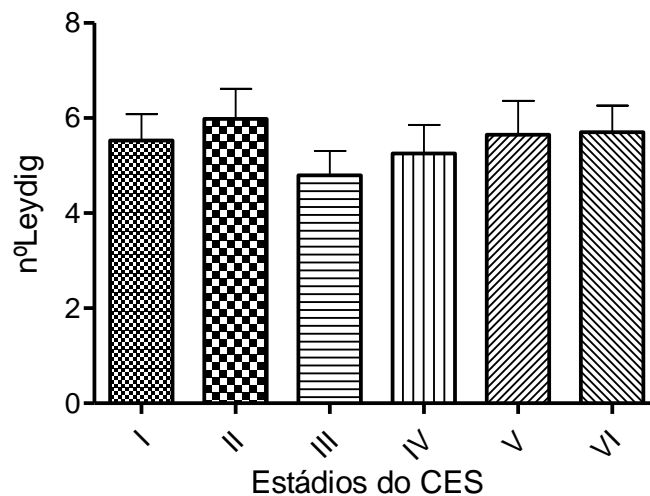
Como nos saguis os túbulos seminíferos estão mais próximos devido a um reduzido interstício, foi possível, nesta espécie, realizar análises mais pormenorizadas na busca do nicho espermatogonial. Como a área do interstício está, na maioria das vezes, fechada e compartimentalizada entre três ou mais túbulos seminíferos (**Fig. 12**), tornou-se possível associar diversos fatores relacionando as espermatogônias tronco com a região intersticial. Dessa forma, determinamos: (a) a porcentagem de cada uma das diferentes gerações espermatogoniais do sagui que estão posicionadas em regiões do epitélio seminífero adjacentes ao interstício(**Fig. 15**);(b) o número de células de Leydig presentes na região intersticial em relação a cada um dos estádios do CES (**Fig. 16**); (c) o número de cortes transversais de vasos sanguíneos (capilares e vênulas) presentes no interstício em relação aos estádios do CES(**Fig. 17A**), assim como(d) relação com o calibre destes vasos (**Fig. 17B**). As células e estruturas consideradas encontravam-se até no máximo 50µm de distância do túbulo seminífero.

Ao avaliar o posicionamento de todas as gerações espermatogoniais do sagui em relação à região intersticial, verificou-se que à exceção das espermatogônias com vacúolo nuclear ( $A_{eVac}$ ), todas as outras apresentam posicionamento variável ao longo de todo o compartimento basal do túbulo seminífero (**Fig. 15**). Aproximadamente 60% se posicionam próximas das regiões intersticiais enquanto 40% adjacentes às regiões de contato entre túbulos vizinhos. Ao contrário, as espermatogônias  $A_{eVac}$  estão preferencialmente localizadas nas regiões dos túbulos seminíferos que estão em contato com o interstício, onde estão concentradas as células de Leydig, macrófagos, células efetoras e vasos sanguíneos, numa proporção de 90%, com apenas 10% destas células nas regiões de túbulo contato (**Fig. 15**).



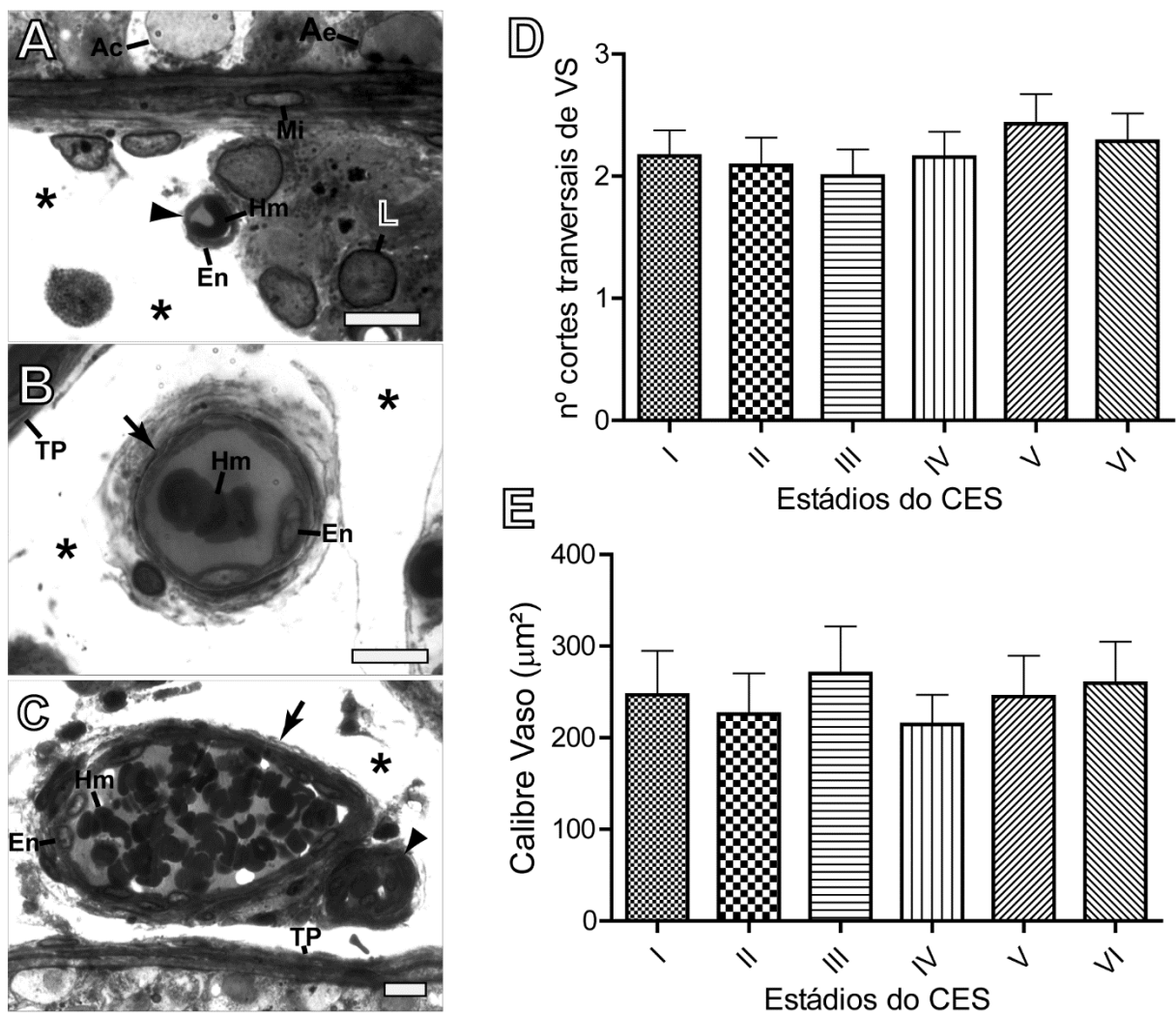
**Figura 15.** Porcentagem das diferentes gerações espermatogoniais do sagui: AeVac, Ae∅Vac, Aclara, B1, B2 e do espermatócito PI que estão em regiões do epitélio seminífero adjacentes ao interstício, nos seis estádios do CES. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM.

Quanto às células de Leydig posicionadas em relação à região intersticial, verificou-se que o seu número foi semelhante independente do estágio do CES presente no epitélio seminífero dos túbulos adjacentes (**Fig. 16**). Apesar destas células serem consideradas importantes em relação ao controle do nicho espermatogonial, estes parâmetros morfológicos por nós avaliados não indicaram nenhuma peculiaridade que pudesse sugerir o posicionamento delas em região específica, indicando a localização no nicho espermatogonial desta espécie.



**Figura 16.** Número de células de Leydig presentes no interstício relacionadas aos estádios do CES dos túbulos adjacentes. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM.

Como os vasos sanguíneos são estruturas determinantes na localização de nichos espermatogoniais de outras espécies de mamíferos, procuramos no sagui avaliar parâmetros relacionados à vascularização além daquele já utilizado no presente estudo, que avaliou a distância da espermatogônia em relação ao vaso mais próximo. Continuamos a utilizar apenas os capilares a as vênulas (**Figs. 17A-C**), considerando que são aqueles onde ocorre a maior troca de metabólitos com os tecidos. Verificamos que independente do estágio do CES, o número de cortes transversais destes vasos e o seu o calibre não demonstraram posicionamento peculiar que pudesse indicar região de nicho espermatogonial (**Figs. 17D-E**).



**Figura 17.** Quantificação de cortes transversais de vasos sanguíneos (A) e seus respectivos calibres em  $\mu\text{m}^2$  (B) associados aos estádios do CES dos túbulos seminíferos adjacentes no sagui. Vasos sanguíneos de pequeno (C), médio (D) e grande (E) porte. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM. Asterisco, interstício; Seta, vaso sanguíneo; VC, vaso sanguíneo; En, célula endotelial; Hm, hemácia; L, célula de Leydig; Mi, célula mioide; TP, túnica própria; Ae, espermatogônia Aescura; Ac, espermatogônia Aclara. Barra:  $10\mu\text{m}$ . ( $P > 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, através de análises morfológicas de diversos aspectos da espermatogênese, comparamos o processo espermatogênico e a biologia espermatogonial entre o homem e o sagui procurando validar o sagui como um modelo experimental adequado para estudos futuros que possam ser mais diretamente aplicados à espermatogênese humana. Os resultados obtidos demonstram que, apesar de diferirem em certos parâmetros tais como: o número de gerações espermatogoniais e composição do parênquima testicular, a espermatogênese e a biologia espermatogonial de ambos os primatas são muito similares. Dessa forma, acreditamos que o sagui pode ser considerado um modelo experimental adequado para estudos envolvendo a validação de novos medicamentos e/ou tratamentos relacionados com a espermatogênese humana.

Os primeiros trabalhos que descreveram morfológicamente as células germinativas do homem (*Homo sapiens*; Heller e Clermont, 1964;) e do sagui (*Callithrix sp*; Holt e Moore, 1984) utilizaram técnicas de processamento que, até certo ponto, não permitiam identificar os principais detalhes morfológicos das células germinativas, principalmente em termos de distribuição e condensação da cromatina. Com o passar dos anos e a evolução das técnicas de processamento, Russell et al. (1990) padronizaram um novo método de observação sob microscopia de luz que abriu um novo campo de visão das células germinativas, permitindo novas abordagens de estudo do processo espermatogênico como um todo. Somente em 2001 que, pela primeira vez, e utilizando o mesmo processamento, Chiarini-Garcia e Russell (2001) distinguiram morfológicamente os sete subtipos de espermatogônias de camundongos. Esta técnica chamada de microscopia de luz de alta resolução (MLAR), que basicamente consiste da utilização do fixador glutaraldeído e do uso de resinas plásticas para inclusão, permite a visualização, em detalhes, de aspectos da cromatina e de membranas celulares. Foi através dela que o nicho espermatogonial foi descrito pela primeira vez em mamíferos (Chiarini-Garcia e Russell, 2001) e confirmado em outras espécies (Chiarini-Garcia et al., 2003, 2009; do Nascimento et al., 2009; Costa et al., 2012). Recentemente, Nihi et al. (2017) e Caldeira-Brant et al. (dados não publicados) utilizaram o método da MLAR e descreveram as características morfológicas das células germinativas bem como o ciclo do epitélio seminífero (CES) do homem e do sagui, respectivamente.



Diante da recente descrição morfológica da espermatogênese e das linhagens espermatogoniais destas duas espécies de primatas sob a MLAR, fomos motivados a comparar diversos parâmetros deste processo entre ambas as espécies. De fato, considerando a proximidade filogenética entre estas duas espécies, detectamos que diversos parâmetros foram similares o que torna os saguis um modelo experimental mais adequado para estudos comparativos com o homem, quando comparado ao uso de roedores.

No que diz respeito à fase proliferativa do processo espermatogênico, verificamos que o número de gerações e a morfologia das espermatogônias do homem (Nihl et al., 2017) e do sagui são similares. Ambas as espécies possuem as espermatogônias  $A_{\text{escura}}$ ,  $A_{\text{clara}}$  e B, diferindo apenas pela presença de duas gerações de espermatogônia do tipo B ( $B_1$  e  $B_2$ ) no sagui, descritas por Caldeira-Brant et al. (dados não publicados). Além do número de gerações ser similar, a morfologia delas também foi semelhante. Ambas as espécies possuem também os dois subtipos de espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$ , as com e as sem vacúolos nucleares. Em conjunto, estes fatores fazem com a espermatogênese de ambas as espécies possa ser prontamente comparada quanto a este aspecto. No entanto, quando se compara com a fase proliferativa de outras espécies que não sejam primatas, o número de gerações é significativamente diferente com três a quatro gerações em primatas (Luetjens et al., 2005) e sete a nove gerações em outras espécies de mamíferos como os roedores, por exemplo (Russell et al., 1990; Chiarini-Garcia e Russell, 2001). Além disso, a morfologia espermatogonial apresenta diferenças significativas entre primatas e outras espécies de mamíferos. Desta forma, o presente estudo mostra que, quanto à fase proliferativa, o sagui mostrou ser um modelo adequado para estudo comparativo com homem.

Uma das bases para divisão do processo espermatogênico em diferentes etapas, conforme o sistema acrossômico, conhecido como “estádios do ciclo do epitélio seminífero” é a evolução da espermiogênese, bem descrita por Russell et al. (1990). Isto é, o epitélio pode ser separado em etapas levando em consideração as modificações que acontecem com a espermatíde arredondada (logo após a meiose II), até a formação da espermatíde alongada (próximo à espermição). O número de etapas é variável entre as espécies uma vez que a evolução das espermatídes é variável entre elas. Enquanto no homem esta fase pôde ser dividida em seis estádios (Clermont, 1963), no sagui foi dividida em nove (Holt e Moore, 1984). Isto certamente seria um problema para comparar parâmetros da espermatogênese entre homem e sagui que tivessem de utilizar o CES para sua avaliação. Desta forma, pela primeira

vez, adaptamos sob a MLAR, o CES do sagui para seis estádios e fizemos as diversas comparações morfométricas do processo espermatogênico sob esta visão. Apesar de não ser uma divisão natural do ciclo, a adaptação do CES do sagui em seis estádios se mostrou de fácil visualização e compreensão, o que torna os achados morfométricos, sob o nosso ponto de vista, coerentes.

Em se tratando da comparação entre as frequências relativa (%) dos estádios do CES de ambos os primatas, observamos que o terço inicial do ciclo (estádios I e II), fase que corresponde a etapa pós-meiótica, é mais duradouro no sagui do que no homem. Isto nos sugere que a fase inicial do desenvolvimento acrossômico e a divisão das espermatogônias  $B_1$  em espermatogônias  $B_2$  tornam mais longa esta etapa no sagui em relação a essa mesma etapa no homem. Por outro lado, a frequência relativa dos estádios III, IV e V, que correspondem a etapa pré-meiótica, onde ocorrem os principais eventos relacionados com a evolução dos espermátócitos primários e alongamento das espermátides, é maior no homem do que no sagui. A última etapa do CES ocorre no estágio VI, onde ocorrem as duas divisões da meiose (meiose I e II), sendo que esta etapa no sagui é mais longa do que no homem. Apesar das diferenças apresentadas na frequência relativa dos estádios, a readaptação do CES do sagui de nove para seis estádios se mostrou mais uma vez possível. Já em relação ao estágio VI, onde ocorrem as duas divisões da meiose (fase pós-meiótica), não houve alteração no processo de readaptação dos estádios, isto é, o estágio VI do homem corresponde em termos de tipos celulares exatamente ao estágio IX do sagui. Desta forma, em tese, esta fase do ciclo seria biologicamente semelhante entre as duas espécies. No entanto, vimos que no sagui a duração deste estágio foi três vezes maior no sagui quando comparado com o homem. Portanto, se o sagui for utilizado em estudos futuros como modelo experimental para avaliação da espermatogênese comparativa com a do homem, esta diferença deve ser considerada ao interpretar os resultados obtidos.

Com o objetivo de comparar a eficiência de algumas etapas da espermatogênese entre as duas espécies aqui estudadas, fizemos avaliações morfométricas e verificamos que os valores encontrados possuem semelhanças e diferenças. No entanto, as diferenças encontradas estão relacionadas com o número de gerações de espermatogônias do tipo B, sendo que homem apresenta uma geração (B) e o sagui duas gerações ( $B_1$  e  $B_2$ ). O índice meiótico, aquele que mede a eficiência da fase meiótica, ou seja, a taxa de sobrevivência/apoptose dos espermátócitos durante a meiose I e II, foi similar e semelhante

ao observado anteriormente para homem (Chiarini-Garcia et al., 2017) e sagui (Caldeira-Brant et al., dados não publicados). Já o índice mitótico, parâmetro que demonstra a eficiência da fase proliferativa (espermatogonial) do ciclo espermatogênico, foi diferente entre as espécies de primatas analisadas no presente estudo. O valor obtido para o sagui é aproximadamente três vezes maior do que no homem, muito provavelmente devido ao fato do sagui apresentar uma geração espermatogonial a mais. Levando em consideração que o homem possui três gerações espermatogoniais ( $A_{\text{escura}}$ ,  $A_{\text{clara}}$  e B) e o sagui quatro ( $A_{\text{escura}}$ ,  $A_{\text{clara}}$ ,  $B_1$  e  $B_2$ ), através de uma progressão geométrica, as divisões destas células teoricamente deveriam dar origem a oito e dezesseis espermátócitos em preleptóteno, respectivamente. No entanto, em ambas as espécies, os índices encontrados foram em torno da metade do teoricamente esperado, demonstrando que a fase proliferativa teve perda aproximada de 50 a 60% para ambas as espécies. Resultados semelhantes foram encontrados anteriormente para homens (Johnson et al., 1995; Wistuba et al., 2003, Chiarini-Garcia et al., 2017). O cálculo do índice mitótico baseado no número de espermátócitos em preleptóteno dividido pelo número da primeira geração de espermatogônia do tipo B ( $B$  no homem e  $B_1$  no sagui) evidenciou a presença de uma geração de espermatogônia diferenciada no homem e duas no sagui.

Como o sagui apresenta uma geração espermatogonial a mais, isso faz com que haja um número maior de espermátócitos produzidos a partir das espermatogônias existentes, e conseqüentemente, um maior número de espermátides produzidas após as divisões da meiose. Este aporte maior de células no epitélio seminífero do sagui é refletido na capacidade de suporte da célula de Sertoli, que é três vezes maior no sagui do que no homem. Este mesmo raciocínio utilizado para interpretar a eficiência geral da espermatogênese, que mede quantas espermátides são produzidas no final do processo espermatogênico, considerando a espermatogônia  $A_{\text{escura}}$  como ponto de partida, demonstra ser também três vezes maior no sagui do que no homem. Estes resultados mostram que os índices aqui apresentados podem ser prontamente utilizados para avaliar a espermatogênese do sagui de forma comparada com a do homem, desde que a diferença do número de espermatogônias do tipo B entre as duas espécies seja levada em consideração na interpretação dos resultados. Em relação aos roedores (Melo et al., 2014), estes índices são extremamente diferentes, dificultando a comparação com os primatas aqui avaliados.

Estudo recente de Caldeira-Brant et al. (dados não publicados) descreveu que duas diferentes gerações de espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$  no sagui - uma com a presença de vacúolo nuclear ( $A_{\text{eVac}}$ ) e outra com ausência deste vacúolo ( $A_{\text{e}\emptyset\text{Vac}}$ ) – estão posicionadas de forma diferente. Este estudo, que foi desenvolvido utilizando o CES do sagui de IX estádios, mostrou que ao contrário das  $A_{\text{e}\emptyset\text{Vac}}$ , as  $A_{\text{eVac}}$  estão mais próximas de vasos sanguíneos e localizam-se preferencialmente em regiões próximas de interstício, onde estão concentradas as células de Leydig, macrófagos, mastócitos entre outras células efetoras. Quando no presente estudo fizemos o mesmo tipo de avaliação considerando a divisão do CES em VI estádios, à semelhança do homem, encontramos o mesmo resultado validando o posicionamento dos dois subtipos de  $A_{\text{escuras}}$  independentemente do número de estádios avaliado. Este tipo de avaliação não havia sido desenvolvido anteriormente para homens e, no presente estudo, demonstramos pela primeira vez que o homem também possui os dois subtipos de  $A_{\text{escuras}}$  e que estes apresentam a mesma distribuição que aqueles demonstrado no sagui.

Entretanto, quando avaliamos as alterações que esses dois subtipos de  $A_{\text{escuras}}$  provocaram nos índices da espermatogênese dentro de uma mesma espécie, observamos alterações interessantes. Quando consideramos a espermatogônia  $A_{\text{e}\emptyset\text{Vac}}$  como sendo a espermatogônia tronco no cálculo do índice mitótico e na eficiência da espermatogênese, verificamos um aumento de aproximadamente 1,5x, em ambos os primatas. Em relação a espermatogônia  $A_{\text{eVac}}$ , estes índices aumentam aproximadamente 3x. Estes achados, juntamente com a cinética espermatogonial do sagui (Caldeira-Brant et al., dados não publicados) e do homem (dados não publicados) demonstram que estes dois subtipos espermatogoniais se comportam de forma diferente. Estudo desenvolvido por von Kopylow et al., (2012), em humanos, demonstrou que as espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$  com vacúolo podem ser consideradas as mais quiescentes, ou indiferenciadas, por expressarem marcadores de células tronco (UTF1, FGFR3) e não expressarem aqueles de células em proliferação (c-Kit). Levando em consideração estes achados de von Kopylow et al. (2012) no homem e a cinética espermatogonial de ambas as espécies, acreditamos que esta célula corresponda àquela mais quiescente. A avaliação da cinética espermatogonial do homem e do sagui reforça esta hipótese uma vez que a este tipo celular está presente em número pequeno e constante ao longo de todos os estádios do CES. Para confirmar esta hipótese, estudos futuros avaliando aspectos funcionais das espermatogônias fazem-se necessários em ambas as espécies.

O estudo do nicho espermatogonial e sua interferência no comportamento das espermatogônias vem sendo um dos temas mais estudados na área da biologia da reprodução. No presente trabalho, o posicionamento das espermatogônias dos saguis em relação ao vaso sanguíneo mais próximo foi reavaliado em VI estádios, depois do estudo inicial feito por Caldeira-Brant et al. (dados não publicados) em IX estádios e, pela primeira vez, em humanos. Ao comparar os resultados obtidos de ambas as espécies, em relação aos diversos tipos espermatogoniais ( $A_{eVac}$ ,  $A_{e\emptyset Vac}$ ,  $A_{clara}$  e B ou  $B_1$  e  $B_2$ ), constatou-se que estas células se comportam à semelhança daquelas observadas em outras espécies de mamíferos quanto ao posicionamento em nicho (Chiarini-Garcia e Russell, 2001; Chiarini-Garcia et al., 2003, 2008, 2009; Yoshida et al., 2007). As espermatogônias  $A_{escuras}$  são consideradas as células-tronco testiculares dos primatas (Ehmcke e Schlatt, 2005; Ehncke et al., 2006) e, desta forma, esperasse que estejam sob controle de fatores nos nichos espermatogoniais.

Estudo em sagui (Caldeira-Brant et al., dados não publicados) demonstrou que as  $A_{escuras}$  estão realmente posicionadas próximas ao interstício e a vasos sanguíneos, o que foi confirmado no presente estudo avaliando o CES do sagui em VI estádios, e em humanos. Mas, quando nestes estudos as  $A_{escuras}$  foram separadas nos dois subtipos, com e sem vacúolo nuclear, estas se posicionam de forma diferente. Os resultados mostram que aquelas com vacúolos ( $A_{eVac}$ ) se comportaram em posição mais próxima dos vasos e interstício indicando serem estas as mais quiescentes e tendo comportamento de célula-tronco espermatogonial. Outro ponto similar entre a espermatogênese do homem e do sagui, observado no presente trabalho, foi o posicionamento variado das espermatogônias diferenciadas (B,  $B_1$  e  $B_2$ ) e do espermatócito em preleptóteno em relação aos vasos sanguíneos e interstício. Este achado foi similar aquele descrito para os roedores (Chiarini-Garcia e Russell, 2001; Chiarini-Garcia et al., 2003), onde as espermatogônias diferenciadas estão afastadas em relação ao interstício. Desta forma, o presente estudo demonstra que a distribuição das espermatogônias do homem e do sagui, quando avaliado em VI estádios, foi semelhante, validando o sagui como modelo experimental para estudos da biologia espermatogonial em humanos.

Portanto, no presente trabalho demonstramos que o sagui possui características do processo espermatogênico e da biologia espermatogonial similares aquelas do homem. Desde a morfologia e nicho das espermatogônias, a organização, duração e eficiência do processo espermatogênico. As poucas diferenças observadas entre os primatas em questão estão relacionadas à presença de uma geração espermatogonial a mais no sagui.

Estudos que pretendem utilizar o sagui como modelo experimental para avaliação de parâmetros relacionados à espermatogênese humana, como em casos patológicos, testes farmacológicos e para validação de novos tratamentos andrológicos, por exemplo, devem levar em consideração as pequenas diferenças biológicas entre as espécies. Apesar da dificuldade para obter e manter saguis para desenvolvimento de estudos científicos, o presente estudo confirma que ele é um modelo experimental adequado para estudos visando compreender, de forma indireta, a biologia testicular humana, quando comparada com o uso de roedores.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho nos permitiram chegar às seguintes conclusões:

- Os saguis possuem semelhanças do processo espermatogênico em relação à do homem suficientes para habilitá-los como modelo experimental para estudos comparados da biologia testicular;
- O homem possui dois subtipos de espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$  e, dentre elas, aquela que possui vacúolo nuclear se posiciona mais próxima a vasos sanguíneos indicando posicionamento em nicho espermatogonial.
- As duas espécies são similares quanto a organização das associações celulares nos seis estádios do CES, índice meiótico, morfologia das espermatogônias, presença dos dois subtipos da  $A_{\text{escura}}$  ( $A_{\text{eVac}}$  e  $A_{\text{e}\emptyset\text{Vac}}$ ) e posicionamento das espermatogônias indiferenciadas em relação aos vasos sanguíneos mais próximos.
- As diferenças entre as duas espécies se devem à presença de uma geração a mais de espermatogônia no sagui, que reflete nos índices mitótico, eficiência da célula de Sertoli e eficiência geral da espermatogênese.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT D, HEARN J. Physical, hormonal and behavioural aspects of sexual development in the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v53, p.155–166, 1978.
- ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear population from microtome sections. **The Anatomical Record**, v. 94, n. 2, p. 239-247, 1946.
- ALBERT, S; EHMCKE, J.; WISTUBA, J.; EILDERMANN, K.; BEHR, R.; SCHLATT, S.E; GROMOLL, J. Germ cell dynamics in the testis of the postnatal common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). **Reproduction**, v. 140, n. 5, p. 733-742, 2010.
- ALBUQUERQUE, AV., DRUMOND, AL., SHAO, S., MELO, RC., ALMEIDA, FR., MEISTRICH, ML; CHIARINI-GARCIA, H . A New Approach for Optimal Morphological Identification and Immunolabeling of Spermatogonial Cells. **Microscopy and Microanalysis**, v. 20, n. 04, p. 1304-1311, 2014.
- ALOISIO, G.M; NAKADA, Y; SAATCIOGLU, H.D; PENA, C.G; BAKER, M.D; TARNAWA, E.D; MUKHERJEE, J; MANJUNATH, H; BUGDE, A; SENGUPTA, A.L; AMATRUDA, J.F; CUEVAS, I; HAMRA, F.K; CASTRILLON, D.H. PAX7 expression defines germline stem cells in the adult testis, **Journal of Clinical Investigation**. v. 124, p. 3929–3944, 2014.
- AMANN, R. Reproductive capacity of dairy bulls. III. The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy, and age on spermatogenesis. **American Journal of Anatomy**, v. 110, n. 1, p. 49-67, 1962.
- BACHIR E JARVI. Infectious, inflammatory, and immunologic conditions resulting in male infertility. **Urologic Clinics of North America**. v.41, p.67-81. 2014
- BJERKNESS, M.; CHENG, H. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. **Gastroenterology**, v. 116, p. 7-14, 1999.
- BOITANI, C; DI PERSIO, S, ESPOSITO, V; VICINI, E. Spermatogonial cells: mouse, monkey and man comparison. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 59, p. 79-88, 2016.
- CALDEIRA-BRANT, A.L; ALVES-FREITAS, D; ERAS-GARCIA, L; ALMEIDA, F.R.C.L; CHIARINI-GARCIA, H. Spermatogonial behavior in marmoset: new generation, kinetics and niche. Dados não publicados.
- CHAN, F; OATLEY, M.J; KAUCHER, A.V; YANG, Q.E; BIEBERICH, C.J; SHASHIKANT, C.S; OATLEY, J.M. Functional and molecular features of the Id4+ germline stem cell population in mouse testes. **Genes & Development**. v. 28, p.1351–1362, 2014.
- CHIARINI-GARCIA, H.; RUSSELL, L. High resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. **Biology of Reproduction**., v. 65, p. 1175-1178, 2001.



- CHIARINI-GARCIA, H; RAYMER , M; RUSSELL, L. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. **Reproduction**, v. 126, n. 5, p. 669-680, 2003.
- CHIARINI-GARCIA e MEISTRICH. High-resolution microscopic characterization of spermatogonia. **Methods in Molecular Biology**, v. 450, p. 95-107, 2008.
- CHIARINI-GARCIA, H; ALVES-FREITAS, D; BARBOSA, IS.; ALMEIDA, FRCL. Evaluation of the seminiferous epithelial cycle, spermatogonial kinetics and niche in donkeys (*Equus asinus*). **Animal Reproduction Science**, v. 116, n. 1-2, p. 139-154, 2009.
- CHIARINI-GARCIA, H.; LIMA, M.; REIS, A.; MARTELLO, R.; NIHI, F.; GOMES, M.; ALMEIDA, F. Influence of three different histological methods on the morphology and morphometrical data in human testis. **Histology and Histopathology**, v. 32, p. 27-34, 2017.
- CLERMONT, Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. **American Journal of Anatomy**, v. 112, n. 1, p. 35-51, 1963.
- CLERMONT, Y.; ANTAR, M. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and the spermatogonial renewal in the monkey *Macaca arctoides*. **American Journal of Anatomy**, v. 136, n. 2, p. 153-165, 1973.
- CLERMONT, Y.; LEBLOND, C.; Differentiation and renewal of spermatogonia in the monkey, *Macaca rhesus*. **American Journal of Anatomy**, v. 104, p. 237–273, 1959.
- CLEVERS, H. What is an adult stem cell?. **Science**, v. 350(6266), p.1319-1320, 2015.
- COSTA G.M.J.; AVELAR, G.F.; REZENDE-NETO, J.V.; CAMPOS, P.H.A.; LACERDA S.M.S.N.; ANDRADE, B.S.C; THOME, R.G.; HOFMANN, M.C.; FRANÇA, L.R. Spermatogonial Stem Cell Markers and Niche in Equids. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e44091, 2012.
- DE FALCO, T.; POTTER, S.J.; WILLIAMS, A.V; WALLER, B.; KAN, M.J.; CAPEL, B. Macrophages Contribute to the Spermatogonial Niche in the Adult Testis. **Cell Reports**, v. 12, n. 7, p. 1107-1119, 2015.
- DE ROOIJ, DG.; RUSSELL, LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. **Journal of Andrology**. v. 21, p. 776-798, 2000.
- DO NASCIMENTO, HF; DRUMOND, AL; DE FRANÇA, LR; CHIRIANI-GARCIA, H. Spermatogonial morphology, kinetics and niches in hamsters exposed to short- and long-photoperiod. **International Journal of Andrology**, v. 32, n. 5, p. 486-497, 2009.
- DRUMOND, A. WENG, C.; WANG, G.; CHIARINI-GARCIA, H.; ERAS-GARCIA, L.; MEISTRICH, M. Effects of multiple doses of cyclophosphamide on mouse testes: Accessing the germ

cells lost, and the functional damage of stem cells. **Reproductive Toxicology**, v. 32, n. 4, p. 395-406, 2011.

EHMCKE, J; LUETJENS, CM; SCHLATT, S. Clonal organization of proliferating spermatogonial stem cells in adult males of two species of non-human primates, *Macaca mulatta* and *Callithrix jacchus*. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 2, p. 293-300, 2005.

EHMCKE, J.; SCHLATT, S. A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates. **Reproduction**, v. 132, n. 5, p. 673-680, 2006.

GASKELL, TL.; ESNAL, A.; ROBINSON, LL; ANDERSON, RA.; SAUNDERS, P. T. Immunohistochemical Profiling of Germ Cells Within the Human Fetal Testis: Identification of Three Subpopulations. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 6, p. 2012-2021, 2004.

GUIDO, C., SANTORO, M., DE AMICIS, F., PERROTTA, I., PANZA, S., RAGO, V., CESARIO, M., LANZINO, M. AND AQUILA, S. Human sperm anatomy and endocrinology in varicocele: role of androgen receptor. **Reproduction**, v. 147(5), p.589-598, 2014.

HAIDER, S. G.; PASSIA, D.; TREIBER, A.; MILHORST, S. Description of eight phases of spermiogenesis in the marmoset testis. **Acta Anatomica**, v.135, p. 180-184, 1989.

HELLER, C; CLERMONT, Y. Spermatogenesis in Man: An Estimate of Its Duration. **Science**, v. 140, n. 3563, p. 184-186, 1964.

HOLT, WV; MOORE, HDM. Ultrastructural aspects of spermatogenesis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Journal of Anatomy**, v. 138, p. 175±188, 1984.

HONECKER, F; STOOP, H; DE KRIJGER, RR.; CHRIS LAU, YF.; BOKEMEYER, C.; LOOIJENGA, LH. Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. **Journal of Pathology**, v. 203, n. 3, p. 849-857, 2004.

HUCKINS, C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. **The Anatomical Record**, v. 169, n. 3, p. 533-557, 1971.

KELNAR, CJ; MCKINNELL C; WALKER, M; MORRIS, KD; WALLACE, WH; SAUNDERS, PT; FRASER, HM; SHARPE, RM. Testicular changes during infantile 'quiescence' in the marmoset and their gonadotrophin dependence: a model for investigating susceptibility of the prepubertal human testis to cancer therapy?. **Human Reproduction**, v. 17, n. 5, p. 1367-1378, 2002.

LEAL, M; FRANÇA, R. The Seminiferous Epithelium Cycle Length in the Black Tufted-Ear Marmoset (*Callithrix penicillata*) Is Similar to Humans. **Biology of Reproduction**, v. 74, n. 4, p. 616-624, 2006.

- LEBLOND, C.P.; CLERMONT, Y. Definitions of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 55, p. 548-573, 1952
- LUETJENS, CM.; WEINBAUER, G.; WISTUBA, J. Primate spermatogenesis: new insights into comparative testicular organisation, spermatogenic efficiency and endocrine control. **Biological Reviews**, v. 80, n. 03, p. 475, 2005.
- MANN, D; FRASER, H. The neonatal period: a critical interval in male primate development. **Journal of Endocrinology**, v. 149, n. 2, p. 191-197, 1996.
- MELO, M., ALMEIDA, F., CALDEIRA-BRANT, A., PARREIRA, G. AND CHIARINI-GARCIA, H. Spermatogenesis recovery in protein-restricted rats subjected to a normal protein diet after weaning. *Reproduction*, **Fertility and Development**, v. 26(6), p.787, 2014.
- MILLAR, MR.; SHARPE, RM.; WEINBAUER, GF.; FRASER, HM.; SAUNDERS. PT. Marmoset spermatogenesis: organizational similarities to the human. **International Journal of Andrology**, v. 23, n. 5, p. 266-277, 2000.
- MILLER, S. J.; LAVKER, R. M.; SUN, T-T. Keratinocyte stem cell of cornea, skin and hair follicles. In: *Stem cells*. Ed. CS Potten. **Academic Press**, London, p. 331-362, 1997.
- MITCHELL, RT; COWAN, G.; MORRIS KD.; ANDERSON, RA.; FRASER, HM; MACKENZIE, WH.; KELNAR, CJ.; SAUNDERS, PT.; SHARPE, RM. Germ cell differentiation in the marmoset (*Callithrix jacchus*) during fetal and neonatal life closely parallels that in the human. **Human Reproduction**, v. 23, n. 12, p. 2755-2765, 2008.
- MUCIACCIA, B., BOITANI, C., BERLOCO, B., NUDO, F., SPADETTA, G., STEFANINI, M., DE ROOIJ, D. AND VICINI, E. Novel Stage Classification of Human Spermatogenesis Based on Acrosome Development1. **Biology of Reproduction**, v. 89(3), 2013.
- NAKAGAWA, T; NABESHIMA, Y; YOSHIDA, S. Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. **Developmental Cell**, v. 12, p. 195–206, 2007.
- NAKAGAWA, T; SHARMA, M; NABESHIMA, Y; BRAUN, R.E; YOSHIDA, S. Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell Compartment. **Science**, v. 328, p. 62–67, 2010.
- NEUHAUS, N.; YOON, J.; TERWORT, N.; KLIESCH, S.; SEGGEWISS, J.; HUGE, A.; VOSS, R.; SCHLATT, S.; GRINDBERG, R.V.; SCHOLER, H.R. Single-cell gene expression analysis reveals diversity among human spermatogonia. **Molecular Human Reproduction**, v. 23, n. 2, p. 79-90, 2017.
- NIHI, F.; GOMES, M.L.M; CARVALHO, F.A.; REIS, A.B.; MARTELLO, R.; MELO, R.C.N; ALMEIDA, F.R.C.L.; CHIARINI-GARCIA, H. Revisiting the human seminiferous epithelium cycle. **Human Reproduction**, v. 32, n. 6, p. 1170-1182, 2017.

- OAKBERG, E. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. **The Anatomical Record**, v. 169, n. 3, p. 515-531, 1971.
- POTTER, S.; DE FALCO, T. Role of the testis interstitial compartment in spermatogonial stem cell function. **Reproduction**, v. 153, n. 4, p. R151-R162, 2017.
- RUSSELL, LD., ETTLIN, R. A., HIKIM, A. P. S. E CLEGG, E. D. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. **Cache River Press**, Clearwater. 286p. 1990
- SASAKI, E; SUEMIZU, H., SHIMADA, A., HANAZAWA, K., OIWA, R., KAMIOKA, M., TOMIOKA, I., SOTOMARU, Y., HIRAKAWA, R., ETO, T., SHIOZAWA, S., MAEDA, T., ITO, M., ITO, R., KITO, C., YAGIHASHI, C., KAWAI, K., MIYOSHI, H., TANIOKA, Y., TAMAOKI, N., HABU, S., OKANO, H. E NOMURA, T.. Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. **Nature**, v. 459, n. 7246, p. 523-527, 2009.
- SHARPE RM. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill JD (eds.), **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press; 1363–1394, 1994.
- SIMORANGKIR, D. R; MARSHALL, G. R; EHMCKE, J; SCHLATT, S; PLANT, T. M. Prepubertal Expansion of Dark and Pale Type A Spermatogonia in the Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*) Results from Proliferation During Infantile and Juvenile Development in a Relatively Gonadotropin Independent Manner. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 6, p. 1109-1115, 2005.
- SPANGRUDE, G. S.; HEIMFELD, S.; WEISSMAN, I. L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. **Science**, v. 241, p. 58-62, 1988.
- SPRADLING, A; DRUMMOND-BARBOSA, D.; KAI, T. Stem cells finds their niche. **Nature**, v. 414, p. 98-104, 2001.
- SUN, F; XU, Q.; ZHAO, D.; DEGUI, C.C. Id4 Marks spermatogonial stem cells in the mouse testis, **Scientific Reports**. v. 5, p. 17594, 2015.
- TSAI, RYL.; KITTAPPA, R.; MCKAY, D. G. Plasticity, niches, and the use of stem cell. **Developmental Cell**, v. 2, p. 707-712, 2002.
- VAN ALPHEN, M.; VAN DE KANT, H.; DE ROOIJ, D. Depletion of the Spermatogonia from the Seminiferous Epithelium of the Rhesus Monkey after X Irradiation. **Radiation Research**, v. 113, n. 3, p. 473, 1988.
- VON KOPYLOW, K.; STAEGE, H.; SPIESS, A.N.; SHULZE, W.; PRIMIG, M.; KIRCHHOFF, C. Differential marker protein expression specifies rarefaction zone-containing human Adark spermatogonia. **Reproduction**, v. 143, n. 1, p. 45-57, 2011.
- WATT, F.M.; HOGAN, B.L.M. Out of Eden: Stem Cells and Their Niches. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1427-1430, 2000.

- WEINBAUER, G. Quantitative Analysis of spermatogenesis and apoptosis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) reveals high rates of spermatogonial turnover and high spermatogenic efficiency. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 1, p. 120-126, 2001.
- WISTUBA, J; SCHROD, A.; GREVE, B.; HODGES, JK.; ASLAM, H.; WEINBAUER, GF.; LUETJENS, CM. Organization of Seminiferous Epithelium in Primates: Relationship to Spermatogenic Efficiency, Phylogeny, and Mating System. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 2, p. 582-591, 2003.
- YOSHIDA, S. Elucidating the identity and behavior of spermatogenic stem cells in the mouse testis. **Reproduction**, v. 144, p. 293–302, 2012.
- YOSHIDA, S; SUKENO, M; NABESHIMA, Y. A Vasculature-Associated Niche for Undifferentiated Spermatogonia in the Mouse Testis. **Science**, v. 317, n. 5845, p. 1722-1726, 2007.
- ZHAO, G.; GARBERS, D. Male germ cell specification and differentiation. **Development Cell**, v. 2, p. 537-547, 2002.

## 9. ANEXOS

### ANEXO I



Universidade Federal de Minas Gerais  
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

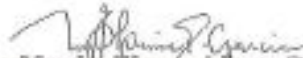
Parecer nº. ETIC 032/04

Interessado: Prof. Dr. Fernando Marcos Reis  
Faculdade de Medicina - UFMG

### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou após cumprida as solicitações à diligência no dia 15 de junho de 2004 o projeto de pesquisa intitulado « Estudo Endócrino Molecular do Testículo em Homens Orquiectomizados e em Homens Azoospermicos. » e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



Profa. Dra. Maria Elena Lima Perez Garcia  
Presidente do COEP/UFMG

## ANEXO II

**APÊNDICE 1 - Formulário de consentimento livre e esclarecido****I. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA**

A pesquisa visa ao estudo da fisiologia do tecido testicular de pacientes inférteis portadores de azoospermia, que são submetidos de rotina ao tratamento cirúrgico de biópsia testicular durante a propedêutica do ambulatório de andrologia e à dosagem de substâncias encontradas no sangue envolvidas no controle da produção de espermatozoides pelo testículo, com o objetivo de diagnosticar a presença ou ausência de espermatogênese nesses pacientes. Esta pesquisa terá o objetivo de melhor compreender as alterações fisiológicas do tecido de testículos com e sem produção de espermatozoides em pacientes azoospermicos. Uma melhor compreensão da fisiologia desse tecido ajudará no entendimento da espermatogênese (formação de espermatozoides), bem como na melhora do tratamento da infertilidade masculina. O material a ser utilizado será somente o da biópsia testicular, ou seja, uma parte do fragmento de tecido testicular retirado no momento do procedimento cirúrgico, para fins de diagnóstico. No momento da biópsia testicular, será coletada também uma amostra de sangue de 5ml da veia braquial de um dos braços, com o auxílio de seringa de 5ml acoplada a uma agulha de 27 x 5 para punção venosa.

**II. SIGILO DOS DADOS**

Todos os seus dados serão confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a essas informações, que serão utilizadas somente para fins de pesquisa.

**III. BENEFÍCIOS DA PESQUISA**

Este estudo trará inúmeros benefícios importantes, que poderão ter aplicação direta na terapêutica (tratamento clínico). O conhecimento das alterações fisiológicas e das respostas do tecido testicular e as dosagens de substâncias na amostra de sangue envolvidas no controle do testículo poderão ajudar no tratamento da infertilidade masculina.

**IV. RISCOS**

Quanto à cirurgia, não existe risco para os pacientes, uma vez que será utilizada somente parte do tecido testicular já retirado quando do procedimento cirúrgico (biópsia testicular) para fins de diagnóstico anatomopatológico do tipo de azoospermia. A coleta da amostra de sangue com uma seringa acoplada à agulha para punção venosa pode ocasionalmente causar dor, hematoma (mancha roxa abaixo da pele) e irritação (mancha avermelhada que pode coçar) no local da retirada do sangue do seu braço. A quantidade de sangue retirada (5ml) não trará qualquer alteração ao seu sistema circulatório, sendo que em 24 horas seu organismo, por si só, recompõe essa pequena quantidade de sangue coletada.

**V. RESSARCIMENTO DAS DESPESAS**

Não está prevista qualquer forma de remuneração para os voluntários. Todas as despesas específicas relacionadas ao estudo são de responsabilidade do laboratório de Endocrinologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

## VI. DEMAIS ESCLARECIMENTOS

Você dispõe de liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante a pesquisa. Você poderá recusar-se a participar deste estudo e/ou abandoná-lo a qualquer momento, sem precisar justificar. A aceitação ou não da participação não influenciará no seu tratamento. Nesta pesquisa utilizaremos somente parte do tecido testicular retirado durante a biópsia de testículo para a realização de estudo anatomopatológico e a amostra de sangue coletada no dia do procedimento cirúrgico. Não serão utilizados outros tecidos, não sendo realizado qualquer tipo de manipulação, experimento ou intervenção direta com o paciente.

## VII. TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, voluntariamente, concordo que o material biológico (tecido testicular) proveniente da minha cirurgia de biópsia testicular e a amostra de sangue coletada sejam utilizados para fins de pesquisa científica no Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina e no laboratório de Endocrinologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Estou ciente do exposto e, ainda, de que esta pesquisa não trará qualquer prejuízo a minha saúde.

Belo Horizonte,.....de.....de.....

---

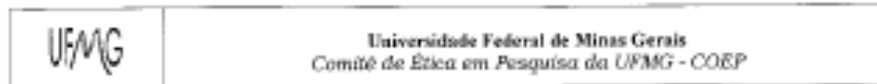
Assinatura do voluntário:

Telefone para contato: 3409-9487 (Urologia Hospital das Clínicas da UFMG)

Dr. Augusto Barbosa Reis: 8897 4776



## ANEXO III



## Parecer nº. ETIC 117/07

**Interessado(a): Prof. Hélio Chiarini-Garcia**  
**Departamento de Morfologia**  
**Instituto de Ciências Biológicas-UFMG**

## DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 22 de maio de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliações morfofuncionais e moleculares da linhagem espermatogonial humana antes e após tratamento contra o câncer de próstata"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Por se tratar de pesquisa classificada em Área Temática Especial, a mesma será encaminhada à CONEP/MS para apreciação, devendo o pesquisador aguardar sua aprovação final para que se inicie a execução.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
**Presidente do COEP-UFMG**



ANEXO IV



**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Hospital das Clínicas**  
*Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão - DEPE*

**UFMG**

Belo Horizonte, 19 de outubro de 2007.

**PROCESSO Nº 079/2007****TÍTULO: "Avaliações morfofuncionais e moleculares da linhagem espermatogonial humana antes e após tratamento contra o câncer de próstata."**

Sr(a) Pesquisador(a):

Reportando-nos ao projeto de pesquisa acima referenciado, considerando sua concordância com o parecer da Comissão de Avaliação Econômico-financeira de Projetos de Pesquisa do HC e a aprovação pelo COEP/UFMG em 22/maio/2007, esta Diretoria aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional. Solicitamos enviar à DEPE relatório parcial ou final, após um ano.

Atenciosamente,



**PROF. HENRIQUE VITOR LEITE**  
Diretor da DEPE/HC-UFMG

Ao Sr.  
Prof. Hélio Chiarini-Garcia  
Depto. Morfologia  
I. C. B./UFMG

## ANEXO V



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
 Conselho Nacional de Saúde  
 Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

**PARECER Nº 189/2008**

Registro CONEP: 14250 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0117.0.203.000-07

Processo nº. 25000.147585/2007-36

Projeto de Pesquisa: *"Avaliações Morfofuncionais e Moleculares da linhagem espermatogonial humana antes e após tratamentos contra o câncer de próstata."*

Pesquisador Responsável: Dr. Hélio Chiarini Garcia

Instituição: Instituto de Ciências Biológicas /Universidade Federal de Minas Gerais – (Centro Único)

CEP de origem: COEP/UFMG

Área Temática Especial: Reprodução Humana; Cooperação Estrangeira

Patrocinador: A ser definido (Instituição/Agências Financiadoras/ Próprios)

**Sumário Geral do Protocolo**

É um trabalho de nível acadêmico a ser realizado pelo Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB / UFMG), visando estudar a biologia das células espermatogoniais humanas com a intenção de esclarecer a biologia espermatogonial desde o ciclo do epitélio seminífero quanto à morfologia, cinética e descrição dos nichos espermatogoniais (até agora pouco estudados). Pretende ainda determinar a presença e/ou ausência de mRNAs que poderiam estar relacionados com a diferenciação espermatogonial e sua localização específica no parênquima testicular. Determinar a presença/ausência e os níveis relativos de proteínas sintetizadas a partir destes genes, bem como sua localização no parênquima testicular, bem como determinar as concentrações hormonais. Todos esses parâmetros serão analisados em testículos obtidos de pacientes tratados no Hospital das Clínicas da UFMG–HC/UFMG ou em Hospitais e Unidades de Oncologia ligados à Instituição, para os quais tenha sido recomendado a orquiectomia subcapsular bilateral como tratamento para câncer avançado de próstata.

Os pacientes, em número de 30 a 40, mas que podem chegar a 60 (como está previsto na Folha de Rosto) que comporão os vários grupos experimentais, serão avaliados pelos médicos do Setor de Andrologia do HC/UFMG e a coleta se fará com a participação de membros da equipe proponente, do Setor de Urologia e Uro-Oncologia do HC/UFMG, presentes no momento da cirurgia de orquiectomia. Anteriormente à coleta será feito o levantamento dos dados clínicos dos pacientes e o esclarecimento para a obtenção do TCLE.

Os grupos experimentais serão compostos de testículos de pacientes com câncer de próstata sem nenhum tratamento prévio (grupo A); submetidos a prostatectomia radical (Grupo B); submetidos a radioterapia (grupo C); submetidos a bloqueio antiandrógeno (Grupo D) e submetidos a radioterapia e bloqueio antiandrógeno (Grupo E).

Imediatamente após a orquiectomia os parênquimas testiculares direito e esquerdo serão preparados para os fins específicos da pesquisa. Trata-se de material que seria normalmente descartado.

As análises morfológicas e morfométricas serão realizadas no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução - LABER/ICB/UFMG.

## ANEXO VI



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Hospital das Clínicas  
Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS E MOLECULARES DA LINHAGEM ESPERMATOGONIAL HUMANA ANTES E APÓS TRATAMENTOS CONTRA O CANCER DE PRÓSTATA

##### I. INTRODUÇÃO:

Esse termo de consentimento pode conter palavras que você não entenda. Favor solicitar ao médico ou equipe do estudo que explique quaisquer palavras ou informações que você não entenda claramente. Você está convidado a participar voluntariamente de um estudo sobre células tronco dos testículos. Antes de concordar em participar desse estudo, é importante que você leia e entenda este documento. Ele descreve as finalidades, procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e precauções do estudo. Você tem direito de se retirar do estudo a qualquer momento. Se você participar, receberá uma cópia deste documento para manter em seu arquivo.

##### II. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

A pesquisa visa o estudo das células tronco dos testículos. Como estas células são as responsáveis por manter o indivíduo fértil por toda a sua vida adulta, alterações e doenças relacionadas com estas células tronco podem levar o indivíduo à sub-fertilidade ou mesmo à infertilidade. Apesar dos grandes avanços na área médica, ainda sabe-se muito pouco como estas células funcionam em um indivíduo normal e, muito menos ainda, como elas são afetadas em diferentes doenças. Diante disto, pretendemos neste projeto de pesquisa, estudá-las em homens portadores de câncer avançado de próstata, nos quais a indicação médica foi a retirada dos testículos. Estes homens serão divididos em grupos levando-se em consideração àqueles que não sofreram nenhum tratamento prévio contra o câncer de próstata e aqueles que se submeteram a diferentes tratamentos. Pequenos pedaços dos testículos que seriam desprezados, serão preservados em formol e estudados em laboratórios de pesquisa. Estes estudos serão desenvolvidos principalmente no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG.

##### III. SIGILO DOS DADOS

Todos os seus dados serão confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a estas informações que serão utilizadas somente para fins de pesquisa. Os dados obtidos nesse estudo podem ser revisados pelo Comitê de Ética em Pesquisa e pelas autoridades reguladoras do Brasil, com fins de verificar procedimentos e/ou dados do estudo. Os resultados dessa pesquisa deverão ser publicados em revistas científicas nacionais ou internacionais.

##### IV. BENEFÍCIOS DA PESQUISA

Os resultados obtidos possivelmente trarão inúmeros conhecimentos importantes para o melhor entendimento da infertilidade masculina. Estes novos conhecimentos podem ser aplicados na melhor compreensão dos casos clínicos, refletindo diretamente em tratamentos mais adequados.

##### V. RISCOS

Pelo fato de estarmos utilizando testículos retirados para auxiliar no tratamento do câncer prostático, e que seria totalmente descartado, isso não acarreta nenhum risco adicional a esses pacientes além daquele já esperado para a cirurgia. A coleta da amostra de sangue periférico, que será utilizada para dosagens hormonais, com uma seringa acoplada a agulha para punção venosa, pode ocasionalmente causar dor, hematoma (mancha roxa abaixo da pele) e irritação (mancha avermelhada que pode coçar) no local da retirada do sangue do seu braço. A quantidade de sangue retirada não trará nenhuma alteração ao seu sistema circulatório, sendo que em 24 horas seu organismo, por si só, recompõe esta pequena quantidade de sangue coletada.

## ANEXO VII



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO  
ANIMAL (CETEA)

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº **077/03** relativo ao projeto intitulado "Caracterização morfológica e distribuição topográfica dos diversos tipos de espermatogônias em diferentes mamíferos" que tem como responsável Hélio Chiarini Garcia, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal** (CETEA/UFMG), tendo sido aprovado em reunião de **03.12.2003**.

Este certificado expira-se em **03.12.2008**

## CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **077/03** related to the project entitled "Morphology and topographic distribution of different spermatogonial types in different mammal species", under the supervision Hélio Chiarini Garcia, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation** (CETEA/UFMG) and was approved in **03.12.2003**.

This certificate expires in **03.12.2008**

Belo Horizonte, 03 de dezembro de 2003

**Dra. CLEUZA MARIA F. REZENDE**

Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais -Reitoria – Campus Pampulha  
Avenida Antônio Carlos 6627-7 Andar CEP: 31270-901 - Belo Horizonte MG-Brasil  
Telefone: (31) 3499-4031 – Fax: (31) 3499-4027 – Home page: [www. ufmg.br/prpq/cetea](http://www.ufmg.br/prpq/cetea)