

FABÍOLA NIHI

REAValiação DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO NO HOMEM

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro/2017

FABÍOLA NIHI

REAVALIAÇÃO DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO NO HOMEM

Tese 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 para obtenção do título de Doutora em Ciências.

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

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro/2017



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE

FABÍOLA NIHI

173/2017
entrada
1º/2013
2013669989

Às **quatorze horas** do dia **17 de fevereiro de 2017**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**REAVALIAÇÃO DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO HUMANO**", requisito final para obtenção do grau de Doutora 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 à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Helio Chiarini-Garcia	UFMG	Aprovada
Dra. Elizete Rizzo	UFMG	APROVADA
Dra. Gleide Fernandes de Avelar	UFMG	APROVADA
Dr. José Carlos Nogueira	FASEH	Aprovada
Dr. Sebastião Roberto Taboga	UNESP	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: aprovada
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata 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, 17 de fevereiro de 2017.**

Dr. Helio Chiarini-Garcia (Orientador) _____

Dra. Elizete Rizzo _____

Dra. Gleide Fernandes de Avelar _____

Dr. José Carlos Nogueira _____

Dr. Sebastião Roberto Taboga _____

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

Luciana de Oliveira Andrade

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

A captação dos pacientes utilizados na pesquisa e a coleta do material biológico foram realizadas no Ambulatório de Andrologia do Serviço de Urologia do Hospital das Clínicas da UFMG com auxílio do prof. Dr. Augusto Barbosa Reis e Dr. Reginaldo Martello. O processamento e análise histológica foram desenvolvidos no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (LABER) do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do prof. Dr. Hélio Chiarini Garcia e com o auxílio das seguintes 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)
- Centro de Aquisição e Processamento de Imagem (CAPI) do ICB;
- Centro de Microscopia da UFMG.

Dedico este trabalho aos maiores responsáveis pela minha educação, meus amados pais Newton e Mirtes, que encheram o lar familiar com tanto amor e carinho.

Agradecimento

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre me mostrou o caminho em todas as decisões da minha vida.

Aos meus amados pais, Newton e Mirtes, que me ensinaram com muito amor e carinho a sempre pedir licença, mas nunca deixar de entrar.

Ao meu “Ermão”, que sempre me fez acreditar eu podia fazer sempre melhor e sempre acreditou no meu potencial. Este trabalho tem toda beleza do seu talento artístico.

Ao meu marido e eterno namorado Tiago, que consegue me acalmar nos momentos de maior tormenta. Você definitivamente é o Yin do meu Yang.

À minha madrinha (quase mãe) Mercedes, que me encheu de carinho e amor por toda vida.

À “Valdi”, minha cunhada. Com sua vinda eu ganhei uma irmã que nunca tive.

Aos meus sobrinhos, Caio e Murilo, que enchem meu dia de alegria. Que vocês possam iluminar todos os meus dias com seus sorrisos.

Ao meu orientador Hélio, por todo o ensinamento. Toda sua paixão pela morfologia me cativou e motivou com este trabalho. Levarei os ensinamentos por toda vida.

À professora Fernanda, que sempre esteve disposta a ajudar com o trabalho e os ensinamentos de morfologia.

Aos meus amigos do laboratório, que convivem com o bom e o mau humor de todos os dias. Vocês me ajudaram a perseverar nesta jornada. Com certeza vocês deixaram os dias do doutorado mais suaves.

À Jubas, minha amiga família de BH, que foi uma companheira muito amável nesta jornada de quatro anos. Eu sei que você vai fazer a diferença pra muitas mulheres que passarão por sua vida, como fez na minha.

Aos pacientes, que na esperança de que pudéssemos esclarecer suas patologias disponibilizaram uma parte de vocês para a pesquisa.

Ao programa de pós-graduação, por todo o apoio e suporte.

Ao pessoal da limpeza, que passam despercebidos pelos corredores, mas que sem eles não teríamos condições de trabalho, em especial à Neli.

Às técnicas do CAPI, que sempre deram suporte técnico para o trabalho de microscopia eletrônica de transmissão.

Às agências financiadoras (Capes, CNPq e FAPEMIG) pelo apoio financeiro ao projeto.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escores histopatológicos da espermatogênese humana segundo Levin (1979), Johnsen (1970) e Bergmann <i>et al.</i> (1994).....	22
Tabela 2. Classificação histopatológica da espermatogênese segundo Levin (1979).....	23
Tabela 3. Classificação histopatológica da espermatogênese humana segundo Johnsen (1970).....	24
Tabela 4. Classificação histopatológica da espermatogênese segundo Bergmann e Kliesch (2010).....	25
Tabela 5. Avaliação morfológica comparativa das células germinativas testiculares de acordo com as diferentes combinações de métodos de fixação e inclusão obtidas no presente estudo e também comparando com os processamentos, conforme estudo desenvolvido por Chiarini-Garcia <i>et al.</i> (2017).....	31
Tabela 6. Frequência relativa (%) dos seis estádios do CES humano de acordo com os novos padrões de associações morfológicas de células germinativas para cada um dos pacientes (A-C adultos e D-F idosos).....	47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Células germinativas do testículo humano e a divisão das mesmas nas fases da espermatogênese de acordo com as modificações morfológicas e bioquímicas do núcleo e citoplasma. (a) fase proliferativa/espermatogonial, (b) fase meiótica/espermatocitogênica e (c) fase espermiogênica/diferenciação. Fonte: Adaptado de Heller e Clermont, 1964, p.548..... 13
- Figura 2.** Disposição concêntrica das células germinativas nas três fases da espermatogênese em corte transversal de túbulo seminífero. Em azul a *fase proliferativa*; em verde a *fase meiótica* e a lilás e marrom as duas gerações de espermátides da *fase de diferenciação*. Em amarelo apenas evidenciando o lúmen. Fonte: Retirado de Schlatt e Ehmcke, 2014, p. 08..... 14
- Figura 3.** Desenho esquemático do ciclo do epitélio seminífero do homem mostrando a composição das associações celulares típicas de VI estádios. Fonte: Adaptado de Clermont, 1966, p. 712..... 15
- Figura 4.** Fotomicrografia de corte transversal de túbulo seminífero de camundongo (A) e de homem (B). A) Corte transversal de túbulo seminífero de camundongo com apenas um estádio do CES. B) Corte transversal de túbulo seminífero humano com cinco estádios do CES. Fonte: acervo pessoal/próprio..... 16
- Figura 5.** Desenho esquemático do arranjo aleatório dos estádios da espermatogênese observados em segmento de túbulo seminífero. Túbulo seminífero do homem em corte transversal (A), longitudinal (B) e oblíquo (C). Fonte: Heller e Clermont, 1964, p.556..... 17
- Figura 6.** Fotomicrografia do estádio IV do CES do homem mostrando os detalhes de cromatina das células germinativas em dois fixadores diferentes. Processamento de Karnovsky/araldite (A) e glutaraldeído/araldite (B)..... 31
- Figura 7.** Mapa de distribuição das células germinativas em VI estádios epitélio seminífero humano..... 38
- Figura 8.** Estádio I do CES baseado nas características morfológicas das células germinativas do testículo, desde as espermatogônias até espermátides sob MLAR..... 39
- Figura 9.** Estádio II do CES baseado nas características morfológicas das células germinativas do testículo, desde as espermatogônias até espermátides sob MLAR..... 40
- Figura 10.** Estádio III do CES baseado nas características morfológicas das células germinativas do testículo, desde as espermatogônias até espermátides sob MLAR..... 41
- Figura 11.** Estádio IV do CES baseado nas características morfológicas das células germinativas do testículo, desde as espermatogônias até espermátides sob MLAR..... 42

Figura 12. Estádio V do CES baseado nas características morfológicas das células germinativas do testículo, desde as espermatogônias até espermátides sob MLAR.....	43
Figura 13. Estádio VI do CES baseado nas características morfológicas das células germinativas do testículo, desde as espermatogônias até espermátides sob MLAR.....	44
Figura 14. Chave de decisão binária para identificação de estádios específicos da espermatogênese humana.....	45
Figura 15. Frequência relativa (%) dos estádios do CES do homem de acordo com os novos limites definidos pelas descrições morfológicas sob a MLAR.....	46
Figura 16. Comparação da frequência relativa (%) dos VI estádios do CES de indivíduos adultos e idosos.....	47
Figura 17. Diâmetro nuclear médio das células germinativas.....	48

SUMÁRIO

Resumo.....	10
Abstract.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 A espermatogênese.....	12
1.2 Associações celulares típicas: divisão da espermatogênese em estádios.....	14
1.3 Classificação de estádios como ferramenta na avaliação testicular.....	16
1.4 Dificuldades de estabelecimento de estádios do CES humano.....	17
1.5 Justificativa.....	18
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Pacientes e considerações éticas.....	21
3.2 Seleção dos Pacientes.....	21
3.2.1 <i>Escore de cinco padrões.....</i>	22
3.2.2 <i>Escore de Johnsen.....</i>	23
3.2.3 <i>Escore de Bergmann.....</i>	24
3.3 Processamentos das amostras.....	25
3.3.1 <i>Fixação em glutaraldeído ou Karnovsky e inclusão em resina araldite.....</i>	25
3.3.2 <i>Fixação em glutaraldeído ou Karnovsky e inclusão em resina glicol metacrilato.....</i>	26
3.3.3 <i>Fixação em Bouin ou paraformaldeído e inclusão em Paraplast.....</i>	26
3.4 Análises morfológicas.....	26
3.5 Captura das imagens e classificação das células germinativas sob MLAR.....	26
3.6 Estudo ultra-estrutural das células germinativas.....	27
3.7 Determinação dos estádios do CES.....	28
3.8 Frequência relativa (%) de cada estágio do CES.....	28
3.9 Diâmetro nuclear.....	29
3.10 Análise estatística.....	29
4 RESULTADOS.....	30
4.1 Efeitos do processamento histológico.....	30
4.2 Morfologia das células germinativas em MLAR.....	31
4.2.1 <i>Fase proliferativa ou espermatogonial.....</i>	32
4.2.2 <i>Fase meiótica ou espermatocitária.....</i>	32
4.2.3 <i>Fase de diferenciação ou espermiogênica.....</i>	33

4.3 Morfologia das células germinativas em MET	35
4.4 Estádios do CES no homem sob MLAR	35
4.5 Frequência relativa (%) dos estádios do CES	46
4.6 Diâmetro nuclear das células germinativas	47
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
Anexo 1	62
Anexo 2	63
Anexo 3	68

RESUMO

Questão do Estudo: Todos os tipos de células germinativas do testículo podem ser identificados com precisão por técnicas de microscopia de luz e distribuídos de forma inequívoca em estádios do ciclo do epitélio seminífero (CES) humano?

Resposta: Utilizando o método de microscopia de luz de alta resolução (MLAR), que permite visualizar com melhor precisão as características que definem os diferentes tipos de células, identificamos as células germinativas do epitélio seminífero e as agrupamos em seis estádios com limites bem precisos, fornecendo assim, uma fonte de referência confiável para a compreensão do CES humano.

O que já é conhecido: A caracterização morfológica das células germinativas do homem havia sido feita há décadas com o uso de métodos histológicos convencionais (fixadores à base de formaldeído-Zenker-formol e inclusão em parafina). Esses primeiros estudos classificavam o CES em seis estágios. No entanto, avaliações morfofuncionais do parênquima testicular quase não utilizam estádios do CES devido a vários fatores, dentre eles, a identificação morfológica inadequada das células germinativas, que leva à dificuldade de determinar os limites precisos entre estes estádios e consequentemente levando à análise de frequência divergente entre os pesquisadores.

Desenho experimental, tamanho e duração: Fragmentos testiculares de doadores adultos e idosos com espermatogênese normal foram selecionados levando-se em consideração os escores de Levin, Johnsen e Bergmann e avaliados quanto à morfologia das células germinativas e a distribuição e frequência das mesmas ao longo do CES humano.

Participantes/material, configurações e metodologia: Fragmentos testiculares de pacientes com diagnóstico de agenesia bilateral congênita de ducto deferente (n=3 adultos) ou câncer de próstata (n=3 idosos) foram fixados em glutaraldeído e incluídos em resina epoxi araldite. As análises morfológicas foram realizadas tanto pela microscopia de luz quanto pela eletrônica de transmissão.

Principais resultados: o método de MLAR permitiu a identificação morfológica precisa e confiável de todas as células germinativas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides), principalmente devido aos aspectos da eucromatina, heterocromatina e nucléolo. Além disso, o desenvolvimento acrosomal das espermátides foi claramente definido. Com a descrição destas células, redefinimos os limites precisos de cada um dos seis estádios do CES do homem.

Limitações, razões para precaução: Ocasionalmente, as células germinativas podem estar ausentes em algumas seções tubulares. Nessa situação, para classificar o estágio deve-se levar em consideração todas as associações das células germinativas proposta no presente estudo.

Importantes implicações dos resultados: Nossos resultados trazem detalhes da composição de células germinativas de cada estágio do CES humano. Os diferentes tipos de espermátides que compõe as associações celulares redefiniram os dados de frequência relativa dos seis estádios do CES. As novas descrições pela MLAR servirão como base para estudos científicos sobre a espermatogênese humana, podendo ajudar a compreender melhor patologias testiculares e condições de infertilidade que permanecem sem solução.

Palavras-chave: células germinativas, testículo, sistema acrossômico, microscopia de luz de alta resolução.

ABSTRACT

Study question: Can all types of testicular germ cells be accurately identified by microscopy techniques and unambiguously distributed in stages of the human seminiferous epithelium cycle (SEC)?

Summary answer: By using a high-resolution light microscopy (HRLM) method, which allows a better visualization of cell morphological features, we identified all testicular germ cells in the seminiferous epithelium and precisely grouped them into six well-delimited SEC stages, thus providing a reliable reference source for staging in man.

What is already known: Morphological characterization of germ cells in human has been done decades ago with the use of conventional histological methods (formaldehyde-based fixative -Zenker-formal- and paraffin embedding). These early studies proposed a classification of the SEC in six stages. However, the use of stages of human SEC as baseline for morphofunctional evaluations of testicular parenchyma has not been used because of the incomplete morphological identification of germ cells that lead to the difficulties to define the boundaries between stages and consequently divergent frequency data among researchers.

Study design, size, duration: Testicular tissue from adult and elderly donors with normal spermatogenesis according to Levin's, Johnsen's and Bergmann's scores were used to evaluate germ cell morphology and validate their distribution and frequency in stages along the human SEC.

Participants/materials, setting, methods: Testicular tissue from patients diagnosed with congenital bilateral agenesis of vas deferens (n= 3 adults) or prostate cancer (n= 3 elderly) were fixed in gluraldehyde and embedded in araldite epoxy resin. Morphological analyses were performed by both light and transmission electron microscopy.

Main results and the role of chance: HRLM method enabled a reliable morphological identification of all germ cells (spermatogonia, spermatocytes and spermatids) based on high-resolution aspects of euchromatin, heterochromatin and nucleolus. Moreover, acrosomal development of spermatids was clearly revealed. Altogether, our data redefined the limits of each stage leading to a more reliable determination of the SEC in man.

Limitations, reasons for caution: Occasionally, germ cells can be absent in some tubular sections. In this situation, it has to be taken into account the germ cell association proposed in the present study to classify the stages.

Wider implications of the findings: Our findings provide details of the germ cell composition of each stage of the human SEC. The different types of spermatids that make the composition of the cellular associations redefined the relative frequency data of the six SEC stages. The new descriptions by the HRLM will serve as a valuable tool for scientific studies on human spermatogenesis and may help to better understand testicular diseases and infertility conditions that remain unsolved.

Key words: germ cells, testis, acrosomic system, high resolution light microscopy

1 INTRODUÇÃO

A caracterização morfológica das células germinativas e somáticas do epitélio seminífero e o ciclo espermatogênico têm sido avaliados através dos anos no testículo de muitas espécies (Clermont, 1972, Russell *et al.*, 1990). A compreensão das características morfológicas destas células, organização no epitélio seminífero, proliferação e comprometimento das células da linhagem germinativa através da espermatogênese em condições normais fornece a base para estudos que envolvem a desregulação da homeostase testicular permitindo uma melhor interpretação de estudos histopatológicos com a finalidade de dar suporte a intervenções clínicas.

Para se avaliar processos que levam a alterações morfológicas e funcionais do testículo é necessário compreender as características e condições normais do funcionamento da espermatogênese, tais como as fases que a compõem, duração de um ciclo espermatogênico e associações celulares que formam o ciclo do epitélio seminífero (CES). Uma das maiores carências de informação acerca da espermatogênese humana está relacionada com a insegurança na definição morfológica dos estádios do CES bem como a frequência relativa dos mesmos, fazendo com que existam poucos trabalhos científicos que utilizem esses importantes parâmetros para se avaliar processos patológicos testiculares. Assim, uma reavaliação morfológica mais pormenorizada faz-se necessária procurando compreender e distinguir de fato as diferentes etapas do CES visando determinar uma base sólida para estudos futuros relacionados com disfunções testiculares.

1.1 A espermatogênese

A espermatogênese é o processo de formação do gameta masculino que ocorre nos túbulos seminíferos e o bom funcionamento deste sistema garante a capacidade reprodutiva do indivíduo ao mesmo tempo em que garante a sobrevivência de uma população (Furlan, 2005). O evento corresponde à evolução temporal e sincrônica em que células-tronco indiferenciadas passam por processos de divisão, apoptose e diferenciação para se tornarem um espermatozoide (Herms *et al.*, 2010). Esses processos são altamente regulados por hormônios de centros superiores (eixo hipotálamo-hipófise-gônada) e locais (ação parácrina), para culminar na produção dos gametas, constituindo um evento biológico altamente eficiente (Kretser *et al.*, 1998). A espermatogênese representa um importante processo de autorenovação, proliferação e diferenciação de células-tronco, uma vez que a partir das espermatogônias-tronco milhões de espermatozoides são produzidos a cada dia, sendo uma ótima alternativa de obtenção de células pluripotentes e conseqüentemente importante nas pesquisas relacionadas à fertilidade (Mirzapour *et al.*, 2013; Silván *et al.*,

2013).

Todo o processo de espermatogênese, desde a diferenciação da espermatogônia-tronco até a espermição no lúmen, dura cerca de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos já investigados (França e Russell, 1998). Ele pode ser dividido em três fases de acordo com mudanças morfológicas e bioquímicas dos componentes do citoplasma e núcleo (Russell *et al.*, 1990): (a) fase proliferativa ou espermatogonial, na qual a espermatogônia-tronco através de divisões mitóticas, origina uma espermatogônia que vai manter a população de células-tronco e outra que vai se comprometer com a espermatogênese; (b) fase meiótica ou espermatocitogênica, na qual o material genético é duplicado, recombinado e segregado, sendo uma fase muito importante para a diversidade genética entre membros da mesma espécie; (c) fase espermiogênica ou de diferenciação, na qual as espermatídes, que são células haploides, passam por modificações estruturais de núcleo e citoplasma, e desenvolvimento do acrossoma, importantes para preparar morfologicamente o espermatozoide para futura mobilidade (**Figura 1**).

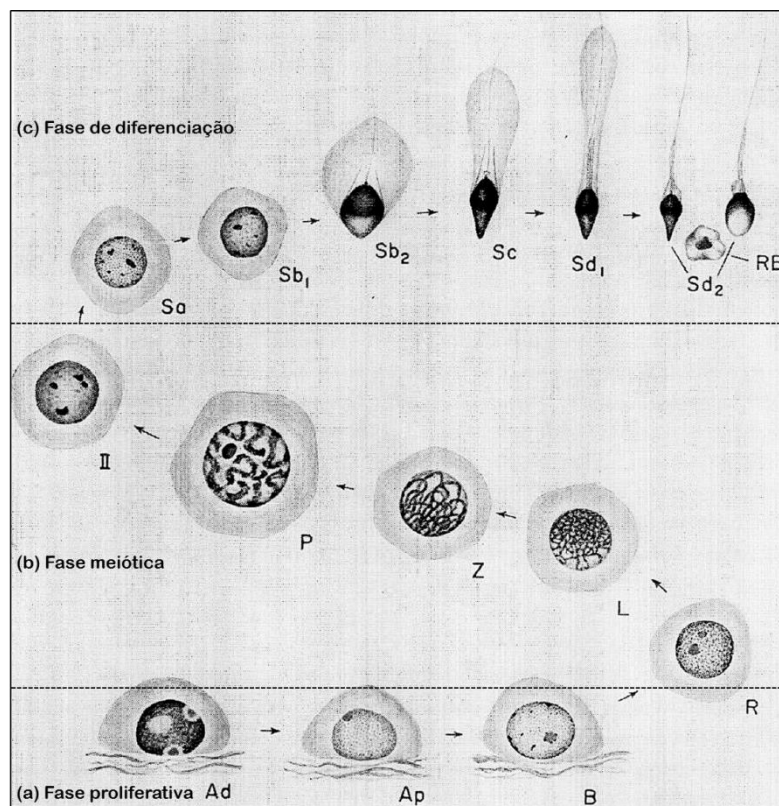


Figura 1. Células germinativas do testículo humano e a divisão das mesmas nas fases da espermatogênese de acordo com as modificações morfológicas e bioquímicas do núcleo e citoplasma. (a) fase proliferativa/espermatogonial, (b) fase meiótica/espermatocitogênica e (c) fase espermiogênica/diferenciação. A_d, espermatogônia A_{escura}; A_p, espermatogônia A_{clara}; B, espermatogônia B; R, preleptóteno; L, leptóteno; Z, zigóteno; P, paquíteno; II, espermatócito secundário; S_a, S_{b1}, S_{b2}, S_c, S_{d1}, S_{d2}, Espermatídes; RB, corpo residual. Fonte: Adaptado de Heller e Clermont, 1964, p.548.

As fases da espermatogênese encontram-se dispostas no epitélio seminífero de maneira que formam gerações sucessivas de células germinativas que passam por transformações para formar os espermatozoides. Uma secção transversal de túbulo seminífero possui o epitélio seminífero formado pelas três gerações de células germinativas, citadas anteriormente, dispostas de forma concêntrica (**Figura 2**): espermatogônias, dispostas no compartimento basal (fase proliferativa); seguida por gerações de espermatócitos apoiados sobre as espermatogônias (fase meiótica); e, finalmente, pelas espermatídes no compartimento adluminal (fase espermiogênica) (Schlatt e Ehmcke, 2014).

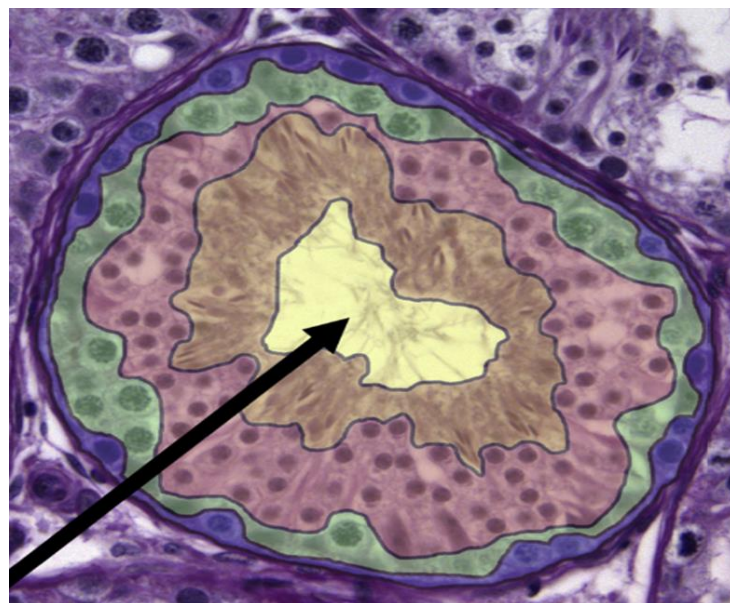


Figura 2. Disposição concêntrica das células nas *três fases da espermatogênese* em corte transversal de túbulo seminífero. Em azul a *fase proliferativa*; em verde a *fase meiótica* e a lilás e marrom as duas gerações de espermatídes da *fase de diferenciação*. Em amarelo apenas evidenciando o lúmen. Fonte: Schlatt e Ehmcke, 2014, p. 08.

1.2 Associações celulares típicas: divisão da espermatogênese em estádios

Cada secção transversal de túbulo seminífero é composta por gerações de espermatogônias, de espermatócitos e de espermatídes. Leblond e Clermont (1952) observaram que essas três gerações de células germinativas não se dispunham de maneira desordenada, observando que os mesmos tipos de espermatídes estavam sempre associados aos mesmos tipos de espermatócitos e espermatogônias, formando associações celulares de composição fixa, ao que deram o nome de estádios.

As associações de células germinativas típicas são classificadas por um conjunto de células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento e possuem características

morfológicas, arranjo estrutural e genético de desenvolvimento da espermatogênese. As células germinativas são amplamente reguladas por processos parácrinos mediados pelas células de Sertoli (Burgos e Fawcett, 1956; Clermont, 1972; Griswold, 1993; França *et al.*, 1998). O grupo de estádios que compõe a espermatogênese de uma espécie forma o CES (**Figura 3**).

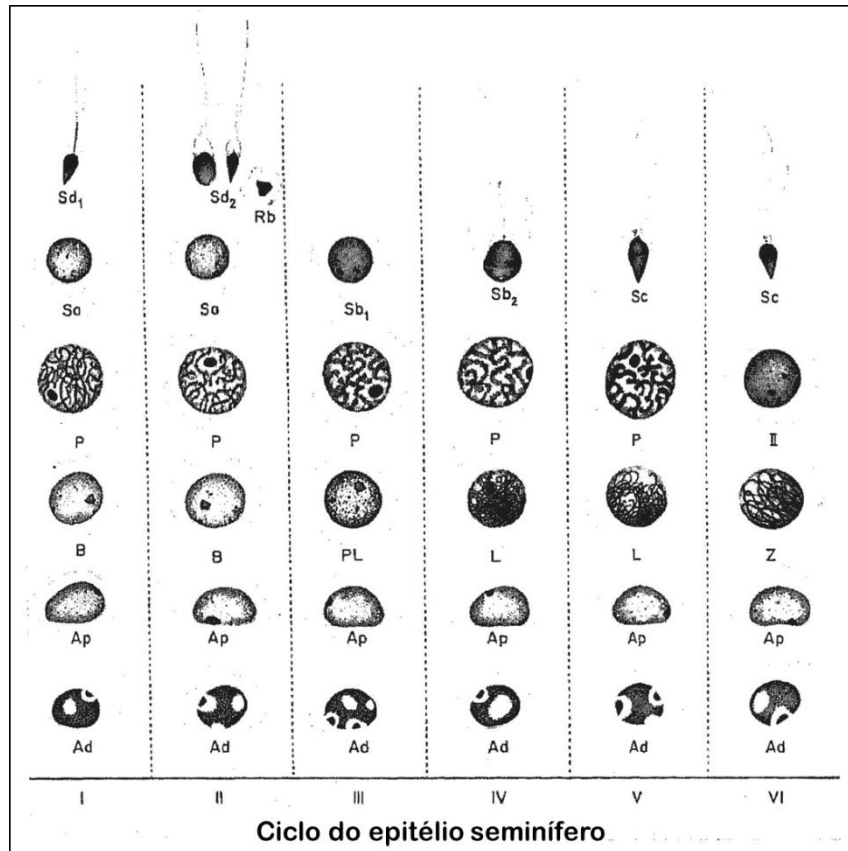


Figura 3. Desenho esquemático do ciclo do epitélio seminífero do homem mostrando a composição das associações celulares típicas de VI estádios. Ad, espermatogônia A_{escura}; Ap, espermatogônia A_{clara}; B, espermatogônia B; PL, preleptótenu; L, leptótenu; Z, zigótenu; P, paquíteno; II, espermátocito secundário; S_a, S_{b1}, S_{b2}, S_c, S_{d1}, S_{d2}, Espermátides; Rb, corpo residual. Fonte: Adaptado de Clermont, 1966b, p. 712.

A maioria das espécies já estudadas possui arranjo segmentar dos estádios do CES (Leblond e Clermont, 1952; Russell *et al.*, 1990), isto é, apenas um estádio é observado em cada corte transversal de túbulo seminífero (**Figura 4A**). No entanto, em algumas espécies de primatas como o homem, o chimpanzé e o sagui, mais de um estádio pode ser observado em cada secção transversal de túbulo seminífero, sugerindo que os estádios estão distribuídos de forma não segmentar, o que pode dificultar a classificação em estádios (**Figura 4B**) (Clermont, 1963; Sharpe, 1994; Smithwick *et al.*, 1996; Millar *et al.*, 2000; Leal e França, 2006).

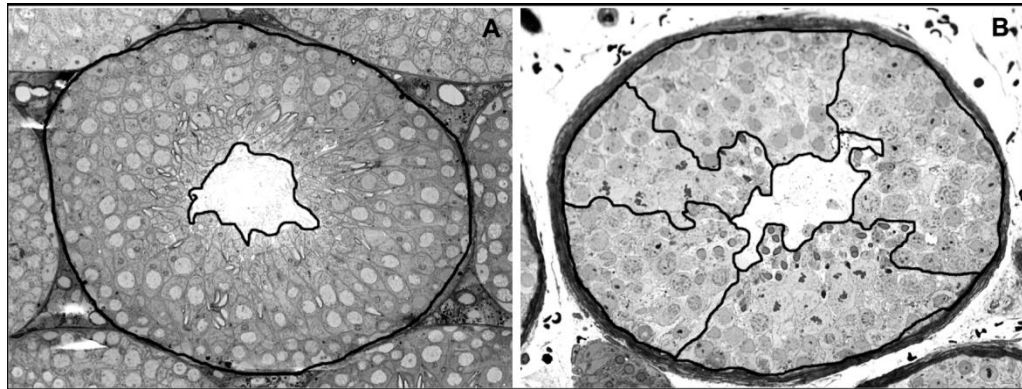


Figura 4. Fotomicrografias de corte transversal de túbulo seminífero de camundongo (A) e de homem (B). A) Corte transversal de túbulo seminífero de camundongo com apenas um estágio do CES. B) Corte transversal de túbulo seminífero humano com cinco estágios do CES. Fonte: acervo pessoal/próprio.

1.3 Classificação de estágios como ferramenta na avaliação testicular

O conhecimento dos estágios do CES e sua duração são importantes, pois dão suporte para uma avaliação precisa dos danos ao epitélio seminífero que podem levar à infertilidade. Para avaliar a condição do testicular, muitos métodos relacionados com o reconhecimento das células germinativas e cinética através do CES podem ser aplicados. O método de classificação mais utilizado é baseado na morfologia das espermátides (método do sistema acrossômico), empregando como base a morfologia do núcleo e o desenvolvimento do acrossoma sobre o mesmo (Russell *et al.*, 1990; Chiarini-Garcia *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2014).

Enquanto em roedores a progressão dos CES pode ser avaliada através da distribuição espermatogonial (Huckins, 1978ab) e do desenvolvimento do acrossoma das espermátides através da espermiogênese (Russell *et al.*, 1990), em humanos, estudos recentes faz a classificação baseado no desenvolvimento das espermátides (Muciaccia *et al.*, 2013), bem como associações celulares entre espermatócitos e espermátides (Clermont, 1963; Heller e Clermont, 1964), sendo este último o mais antigo e mais utilizado.

Cada espécie possui uma organização característica do CES que resulta em diferentes números de estágios. Assim, em camundongos são observados XII estágios (Oakberg, 1956; Russell *et al.*, 1990), enquanto em ratos existem XIV estágios do CES (Leblond e Clermont, 1952). Dentre os primatas, enquanto que nos macacos *Macaca rhesus* (Clermont e Leblond, 1959), *Cercopithecus aethiops* (Clermont, 1969) e *Macaca arctoides* (Clermont e Antar, 1973) foram descritos XII estágios, para o sagui (*Challithrix* sp) foram descritos IX estágios (Millar *et al.*, 2000) e para o homem VI estágios (Clermont, 1963).

Os estudos mais importantes envolvendo espermatogênese humana aconteceram na década de 60 com Clermont e colaboradores (Clermont, 1963; Heller e Clermont, 1964;

Clermont, 1966ab; Heller *et al.*, 1969), que estabeleceram as primeiras descrições morfológicas das células germinativas no homem. Clermont (1963), utilizando material obtido através de biópsias de homens saudáveis ou de necropsias, caracterizou VI estádios do CES, sem estabelecer os detalhes da evolução do sistema acrossômico, como acontece com outras espécies.

1.4 Dificuldades de estabelecimento de estádios do CES humano

Os estádios do CES humano parecem estar arranjados aleatoriamente e sem padrão sequencial ao longo do túbulo seminífero (Heller e Clermont, 1964; Johnson, 1994; Johnson *et al.*, 1996). Este arranjo aleatório dificulta estabelecer estádios do CES no homem, tendo em vista que a disposição de secções de túbulo seminífero pode gerar arranjos estruturais de associações celulares atípicas, ou seja, gerações de espermatídes associadas a gerações de espermatócitos e espermatogônias diferente do padrão, evidenciando células que podem estar em estágio mais avançado/atrasado do ciclo (Heller e Clermont, 1964; **Figura 5C**). A falta de descrições morfológicas adequadas em adição com a disposição irregular das células germinativas dificulta separar nitidamente os VI estádios do CES humano utilizando-se apenas o método do sistema acrossômico como base de classificação. Apesar da descrição dos VI estádios ser utilizada como base para a maioria dos estudos desde os anos 60, é notória a necessidade de revisão acerca da descrição e distribuição das células germinativas (Amann, 2008).

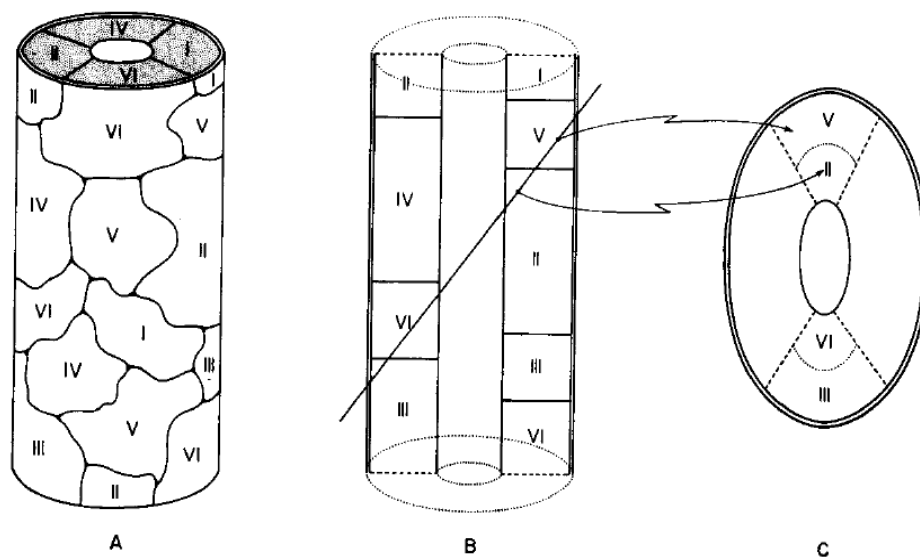


Figura 5. Desenho esquemático do arranjo aleatório dos estádios da espermatogênese observados em um segmento de túbulo seminífero. Túbulo seminífero do homem em corte transversal (A), longitudinal (B) e oblíquo (C). Os números em algarismos romanos (I-VI) representam os seis estádios do CES do homem. Fonte: Heller e Clermont, 1964, p.556.

A escolha entre diferentes abordagens de classificação da espermatogênese em estádios depende do objetivo do estudo e da metodologia aplicada tais como fixadores e diferentes materiais de inclusão. Os primeiros estudos desenvolvidos por Clermont (1963) e Heller e Clermont (1964) foram baseados em fixador Zenker-formol, incluídos em parafina e corados com hematoxilina e eosina. Estudo recente em testículo humano (Chiarini-Garcia *et al.*, 2017) demonstrou que a MLAR preserva de forma mais adequada a citologia do epitélio seminífero humano, quando comparado com outros processamentos. Desta forma, o uso de novas metodologias pode auxiliar em interpretações morfológicas mais precisas das células germinativas, facilitando o processo de determinação de estádios.

A utilização do método de fixação em glutaraldeído/ósmio, inclusão em resina e cortes semifinos (1 µm espessura) tornou possível a avaliação do testículo em microscopia de luz de alta resolução (MLAR). Este método foi utilizado para descrever precisamente o CES em roedores e cães (Russell *et al.*, 1990) e permitiu a determinação testicular de diferentes parâmetros espermatogoniais (Russell e Clermont, 1977), ontogenia espermatogonial (Drumond *et al.*, 2011), morfologia espermatogonial (Chiarini-Garcia e Russell, 2001; Chiarini-Garcia *et al.*, 2003) e, pela primeira vez, o nicho espermatogonial em mamíferos (Chiarini-Garcia *et al.*, 2001; Chiarini-Garcia *et al.*, 2003). Métodos similares foram utilizados para avaliações de eficiência da espermatogênese em testículos humanos. Estes se baseavam em parâmetros quantitativos de espermatócitos e espermátides (Johnsen *et al.*, 1992) ou na tentativa de reclassificação do CES humano extrapolando-o para XII estádios, como em camundongos (Muciaccia *et al.*, 2013).

1.5 Justificativa

Estudos sobre distribuição de células germinativas bem como a cinética espermatogonial no epitélio seminífero humano têm sido desenvolvidos desde Clermont (1963) utilizando-se principalmente fixação em formalina ou Zenker e inclusão em parafina. Apesar da baixa resolução obtida pelas técnicas utilizadas, as descrições morfológicas feitas naquela época perduram até os dias de hoje. No entanto, com o advento e a padronização de métodos de estudo modernos e acurados como a MLAR (Chiarini-Garcia e Meistrich, 2008), tornou-se possível determinar morfológicamente tipos celulares antes indistinguíveis nas técnicas antigas. Avaliações testiculares utilizando métodos de fixação e inclusão mais modernos revelaram que os resultados morfométricos e funcionais podem gerar respostas discrepantes (Latendresse *et al.*, 2002; Howroyd *et al.*, 2005; Chiarini-Garcia *et al.*, 2017).

Assim, a reavaliação minuciosa das composições celulares que formam os VI estádios do CES do homem proposto por Clermont (1963) e Heller e Clermont (1964), a partir de protocolos mais modernos de processamento histológico através da MLAR

(Chiarini-Garcia e Meistrich, 2008; Chiarini-Garcia *et al.*, 2011) e MET (Chiarini-Garcia e Russell, 2002), podem resultar em descrições morfológicas mais detalhadas e definitivas das células germinativas do homem. Desta forma, em um contexto mais amplo, as descrições morfológicas permitiriam ajustar os limites entre os estádios, estabelecendo um método confiável na determinação dos seis estádios do CES do homem e suas frequências relativas (%) de forma replicável.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Reavaliar o ciclo do epitélio seminífero (CES) humano, utilizando-se as microscopias de luz de alta resolução (MLAR) e eletrônica de transmissão (MET).

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar diferentes tipos de fixadores e meios de inclusão na preservação das células germinativas para selecionar o mais adequado para estudos sob microscopia de luz;
- Descrever morfológicamente as células germinativas sob as MLAR e MET;
- Determinar os limites precisos entre os seis estádios do CES com base na descrição detalhada da morfologia das células germinativas sob a MLAR;
- Calcular a frequência (%) dos seis estádios do CES baseado na nova descrição morfológica através da área absoluta de túbulos seminíferos cortados em qualquer posição (transversal, oblíquo ou longitudinal);
- Calcular a frequência relativa (%) dos seis estádios do CES em diferentes indivíduos (adultos e idosos);
- Determinar o diâmetro nuclear das células germinativas da linhagem espermatogonial e espermatocitária, para dar suporte à distinção entre células semelhantes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pacientes e considerações éticas

Foram utilizados neste estudo testículos de seis pacientes, três deles jovens (34 ± 2 anos) e três idosos (77 ± 6 anos). Dos pacientes jovens, dois deles doaram biópsias testiculares durante procedimento de reversão de vasectomia enquanto o terceiro para diagnóstico da causa de azoospermia. Estes pacientes foram recrutados no Ambulatório de Andrologia do Serviço de Urologia do Hospital das Clínicas da UFMG, sob aprovação do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da UFMG (Parecer nº ETIC 032/04) (**Anexo 1**). Dos três pacientes idosos, foram utilizados os testículos obtidos após procedimento cirúrgico de orquiectomia, como conduta terapêutica para tratamento para o câncer de próstata. Estas coletas foram executadas no Ambulatório de Andrologia do Serviço de Urologia do Hospital das Clínicas da UFMG, sendo aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP) sob nº CAAE – 0117.0.203.000-07, pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão (DEPE) do Hospital das Clínicas da UFMG (Processo nº 079/2007) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde e Ministério da Saúde, sob o protocolo CONEP nº 14.250 e parecer número 189/2008 (**Anexo 2**).

Todos os pacientes foram informados sobre os objetivos dos projetos de pesquisa e concordaram com a utilização dos testículos na pesquisa assinando um Termo de Consentimento Livre Esclarecido - TCLE (**Anexo 3**).

Após a coleta das biópsias testiculares e dos testículos orquiectomizados, estes foram colocados em soluções fixadoras e encaminhados para o Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução da UFMG (LABER - ICB/UFMG), onde os fragmentos testiculares foram seccionados em fragmentos menores para posterior processamento histológico (ver item 3.3. Processamento das Amostras).

3.2 Seleção dos Pacientes

Os pacientes selecionados para este estudo foram captados de outros experimentos que estudaram comparativamente os efeitos de diferentes processamentos histológicos na interpretação de biópsias testiculares de pacientes adultos (Reis, 2012) e os efeitos da radioterapia e hormonioterapia na espermatogênese de pacientes idosos com câncer de próstata (Martello, 2013 e Vellez, 2016).

Para participar deste estudo morfológico os indivíduos deveriam ter espermatogênese preservada. Os pacientes que fizeram a reversão da vasectomia estavam

recanalizando os ductos deferentes visando recuperar a fertilidade pela relação sexual natural. A causa da azoospermia no ejaculado foi considerada obstrutiva, portanto, apesar de azoospérmico o indivíduo tinha uma espermatogênese normal. Em relação aos pacientes com câncer de próstata, foram selecionados apenas aqueles que não sofreram nenhum tipo de tratamento prévio à orquiectomia.

Apesar do diagnóstico destes pacientes ser de espermatogênese normal, antes de serem selecionados fez-se avaliação minuciosa utilizando três diferentes padrões de avaliação da espermatogênese baseados na anatomia patológica:

(a) escore que descreve alterações da espermatogênese em Cinco Padrões, baseado em Levin (1979) e revisto por McLachlan *et al.* (2007);

(b) escore de Johnsen (1970), que divide as alterações da espermatogênese em 10 escores, separando assim os diferentes tipos de hipoespermatogênese e parada de maturação;

(c) escore de Bergmann (Bergmann *et al.*, 1994; revisão em Bergmann e Kliesch, 2010), que avalia a espermatogênese em relação à presença de espermátides alongadas no parênquima testicular.

Os pacientes adultos selecionados apresentaram os três diferentes escores nos valores mais altos, demonstrando espermatogênese normal (**Tabela 1** – pacientes A-C). Em relação aos pacientes idosos (**Tabela 1** – pacientes D- F), observou-se uma pequena queda que indicava hipoespermatogênese, considerada normal para a idade (**Tabela 1**).

Tabela 1. Escores histopatológicos da espermatogênese humana segundo Levin (1979), Johnsen (1970) e Bergmann *et al.* (1994).

Indivíduos*	Escore histopatológico da espermatogênese		
	5 Padrões	Johnsen	Bergmann
A	4	8,4	9,0
B	5	9,3	10,0
C	4	8,0	8,5
D	5	7,5	5,8
E	5	8,6	8,5
F	5	8,2	7,7

* letras de A-C pacientes adultos e E-F pacientes idosos.

3.2.1 Escore de Cinco Padrões

A classificação dos cinco padrões leva em consideração todos os cortes dos túbulos seminíferos das biópsias para classificar o testículo baseando-se nos seguintes padrões (**Tabela 2**):

Tabela 2. Classificação histopatológica da espermatogênese segundo Levin (1979)

Padrões	Aspectos morfológicos da espermatogênese
Padrão 5	<ul style="list-style-type: none"> • Espermatogênese normal: quando se encontrou o epitélio germinativo completo em toda a área avaliada da biópsia associado ao tecido intertubular normal.
Padrão 4	<ul style="list-style-type: none"> • Hipoespermatogênese: quando todos os estágios da linhagem do epitélio germinativo foram identificados, mas, em alguns túbulos seminíferos, ele encontrava-se reduzido em vários graus. Esta classificação incluiu os padrões mistos com túbulos com padrão de parada de maturação, aplasia de células germinativas e fibrose testicular quando estes estavam associados a túbulos seminíferos com o epitélio germinativo completo.
Padrão 3	<ul style="list-style-type: none"> • Parada de maturação: este padrão descreve a parada total do epitélio germinativo em algum estágio particular da espermatogênese, sem a formação de espermátides alongadas.
Padrão 2	<ul style="list-style-type: none"> • Aplasia de células germinativas: este termo é usado exclusivamente para descrever o padrão de túbulos seminíferos com ausência completa de qualquer célula germinativa e apenas revestidos por células de Sertoli.
Padrão 1	<ul style="list-style-type: none"> • Fibrose testicular: este padrão descreve estruturas com aparência de túbulos seminíferos, mas que não possuem nenhuma célula em seu interior (epitélio germinativo ou células de Sertoli) e usualmente apresentam uma fibrose peritubular e o acúmulo de um depósito amorfo no seu interior (hialinização).

3.2.2 *Score de Johnsen*

Este padrão de avaliação da espermatogênese leva em consideração o momento exato em que ocorreu parada de maturação das células germinativas (**Tabela 3**).

Tabela 3. Classificação histopatológica da espermatogênese humana segundo Johnsen (1970)

Escores	Aspectos morfológicos da espermatogênese
Escore 10	• Espermatogênese completa com muitas espermátides alongadas. Epitélio germinativo organizado com espessura preservada e a luz do túbulo livre.
Escore 9	• Muitas espermátides alongadas estão presentes, mas o epitélio germinativo está desorganizado com evidente descamação ou obliteração da luz do túbulo.
Escore 8	• Apenas algumas espermátides alongadas (menos de cinco) presentes no corte transversal do túbulo seminífero.
Escore 7	• Ausência de espermátides alongadas e presença de muitas espermátides em alongamento e arredondadas.
Escore 6	• Ausência de espermátides alongadas e presença de poucas espermátides em alongamento e arredondadas (menos de cinco).
Escore 5	• Ausência de espermátides e presença de muitos espermatócitos.
Escore 4	• Presença de poucos espermatócitos (menos de cinco) e ausência de espermátides.
Escore 3	• Espermatogônias são as únicas células germinativas presentes.
Escore 2	• Ausência de células germinativas e presença de apenas células de Sertoli.
Escore 1	• Ausência de células no corte transversal do túbulo seminífero.

3.2.3 Escore de Bergmann

Os critérios de Bergmann levam em conta a porcentagem de túbulos seminíferos que contém espermátides alongadas segundo a fórmula:

$$Escore = \frac{NE}{NT} \times 10$$

Onde: NE – nº total de túbulos seminíferos com espermátides alongadas
NT – nº total de túbulos seminíferos contados

Desta forma, a obtenção do escore é baseada na porcentagem de túbulos com espermátides alongadas, onde o escore 10 significa 100% de túbulos contendo espermátides alongadas e o escore 1 significa 10% de túbulos contendo espermátides alongadas. Quando o score obtido foi menor do que 10% (9% a 1%) utilizou-se subclassificação com escore de 0,9 a 0,1 (**Tabela 4**).

Tabela 4. Classificação histopatológica da espermatogênese segundo Bergmann e Kliesch (2010).

%*	Score	Aspectos morfológicos da espermatogênese
100 – 95	10	Espermatogênese normal
94 – 85	9	
84 – 75	8	
74 – 65	7	Túbulos seminíferos com espermatogênese e áreas de atrofia
64 – 55	6	
54 – 45	5	
44 – 35	4	
34 – 25	3	
24 – 15	2	
14 – 10	1	
9 – 1	0,9 - 0,1	
0	0	Aplasia de células germinativas, parada de maturação, atrofia testicular, túbulos hialinizados.

* Porcentagem de túbulos seminíferos com espermátides alongadas.

3.3 Processamentos das amostras

3.3.1 Fixação em glutaraldeído ou Karnovsky e inclusão em resina araldite

Dois fragmentos testiculares foram fixados por imersão, um em glutaraldeído (EMS, grau biológico) a 5% em tampão fosfato 0,05M pH 7,3, e outro em Karnovsky modificado (paraformaldeído a 2% e glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,05M pH 7,3) (Karnovsky, 1965), por 1 hora. Estes fragmentos foram então recortados em fragmentos menores e adicionalmente fixados por mais 12-24 horas a 4°C, com as respectivas soluções renovadas. Em seguida, da superfície destes fragmentos foram recortadas finas fatias, de aproximadamente 1 mm de espessura, que foram pós-fixados em ósmio reduzido (tetróxido de ósmio a 1%, ferrocianeto de potássio a 1,5% em água destilada) à temperatura ambiente por 90 min. Após desidratação em série etanólica crescente e banhos de acetona, estes fragmentos foram submetidos a séries de inclusão crescente de acetona:araldite até a inclusão em resina araldite pura (EMS). Dos blocos de araldite foram obtidos cortes semifinos de 1µm de espessura, corados com azul de toluidina/borato de sódio e que foram utilizados para os estudos sob a MLAR (Chiarini-Garcia e Meistrich, 2008). Deste material ainda foram selecionadas áreas e delas obtidos cortes ultrafinos de 70-80 nm de espessura, que foram utilizados para os estudos sob MET. Os cortes ultrafinos e a aquisição de micrografias em MET foram realizados no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do ICB e no Centro de Microscopia da UFMG.

3.3.2 Fixação em glutaraldeído ou Karnovsky e inclusão em resina glicol metacrilato

Dois fragmentos testiculares foram pré-fixados por imersão, um em glutaraldeído a 5% em tampão fosfato 0,05M pH 7,3, e outro em solução de Karnovsky. Estes fragmentos foram recortados em pedaços menores e adicionalmente fixados por mais um intervalo de 12 a 24 horas a 4°C, com as respectivas soluções renovadas. Após este período, da superfície destes fragmentos foram recortadas finas fatias, entre aproximadamente 2 a 3 mm de espessura, que foram desidratadas em série etanólica crescente e incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato (Historesina, Leica). Dos blocos de glicol metacrilato foram obtidos cortes semifinos de 3 µm de espessura, que foram corados com azul de toluidina com borato de sódio 1% (Chiarini-Garcia *et al.*, 2011).

3.3.3 Fixação em Bouin ou paraformaldeído e inclusão em Paraplast

Outro fragmento testicular foi subdividido em duas partes, sendo fixados durante 12 a 24 horas um em solução de Bouin e outro em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,05M pH 7,3, sendo, a seguir, armazenados em etanol a 70% e tampão fosfato 0,05M pH 7,3, à 4°C, respectivamente, até o momento da inclusão. Estes fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e, em seguida, incluídos em Paraplast. Destes blocos foram obtidos cortes histológicos de 5 µm de espessura que foram corados com hematoxilina e eosina.

3.4 Análises morfológicas

Inicialmente, as células germinativas foram avaliadas sob a microscopia de luz, comparando a morfologia das mesmas após os três processamentos histológicos. Levou-se em consideração principalmente as características nucleares tais como forma, tamanho e aspectos da cromatina e do nucléolo.

3.5 Captura das imagens e classificação das células germinativas sob MLAR

Imagens sob MLAR de todas as células germinativas foram capturadas com câmera digital Q-Color 3 acoplada ao microscópio Olympus BX-51, utilizando o programa Image-Pro Express (Media Cybernetics), ajustado para preto e branco e associado a um filtro verde (550 nm) para melhorar detalhes citológicos. Pelo menos 300 imagens digitais foram tiradas de todas as células germinativas ao longo dos seis estádios do CES, com

base nas descrições de Heller e Clermont (1964). As células germinativas foram agrupadas em três fases distintas com base em suas características citológicas sob a MLAR, a saber:

(a) Fase proliferativa ou espermatogonial - composta pelas espermatogônias tipo $A_{\text{escuras}} (A_e)$, $A_{\text{claras}} (A_{\text{claras}})$ e B;

(b) Fase meiótica ou espermatocitogênica – constituídas pelos espermatócitos primários em preleptóteno, leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno e pelos espermatócitos secundários) e;

(c) Fase de diferenciação ou espermiogênica – formada pelas espermátides S_{a1} , S_{a2} , S_{b1} , S_{b2} , S_{c1} , S_{c2} , S_{d1} , e S_{d2} .

Dos blocos de araldite foram selecionados túbulos seminíferos com os estádios desejados, que foram previamente selecionados em MLAR e aparados para obtenção de cortes ultrafinos para avaliações ultra-estruturais.

As imagens em MLAR foram ajustadas para resolução (600 dpi), nitidez (montante de 140%; raio fixado em 7 pixels e limiar definido em 0,0) e contraste/níveis de cinza (curva sigmóide - entrada 150 e a saída 180). Para MET, as imagens foram ajustadas para resolução (600 dpi), nitidez (quantidade de 60%; raio fixado em 3 pixels e limiar de 0,0) e contraste/escala de cinza (curva sigmóide). Todas as imagens, ajustes e configurações de montagem de figuras foram realizados utilizando o Adobe Photoshop e Adobe Illustrator softwares (Adobe System, Inc., Mountain View, CA), respectivamente.

3.6 Estudo ultra-estrutural das células germinativas

Imagens em MET foram obtidas em Tecnai G2-12 - Espírito Biotwin FEI microscópio eletrônico usando a Análise de software Tecnai Imagem, no Centro de Microscopia da UFMG. As áreas dos estádios haviam sido previamente selecionadas de cortes semifinos. Foram capturadas mais de 50 imagens de todas as células germinativas dos VI estádios do CES e a classificação das células foi caracterizada pela morfologia do núcleo, características de distribuição da cromatina e posicionamento dessas células no epitélio seminífero. Devido o acrossoma das espermátides ser de fácil identificação na MET, estas células foram utilizadas para direcionar a localização e determinação do estágio em questão o qual as outras células germinativas faziam parte.

As características morfológicas das células germinativas foram avaliadas de forma comparativa em nível ultra-estrutural utilizando-se MET, bem como os diferentes tipos espermatogoniais, baseando-se em descrições prévias feitas por Chiarini-Garcia e Russell (2002) para camundongo e Holstein e Roosen-Runge (1981), Paniagua *et al.* (1986) e Nistal *et al.* (1987) para homens.

3.7 Determinação dos estádios do CES

Os critérios utilizados para definição dos estádios foram baseados naqueles descritos por Clermont (1963) e Heller e Clermont (1964), que dividem o CES humano em seis estádios. O presente estudo de reavaliação do CES procurou definir com exatidão os limites entre estes estádios levando em consideração as variações morfológicas das células germinativas (determinadas anteriormente de forma precisa). Os detalhes que definem o final de um estágio e o início do estágio subsequente são descritos nas figuras 8-13 no canto superior direito. Esses detalhes foram imprescindíveis para se determinar os limites precisos de cada um dos seis estádios do CES.

3.8 Frequência relativa (%) de cada estágio do CES

A frequência dos estádios do CES foi determinada em um total de 228 secções de túbulos seminíferos, escolhidas aleatoriamente, a partir de imagens capturadas com o programa Image-Pro Express (Media Cybernetics). Faz-se relevante enfatizar que como os estádios no homem estão distribuídos de forma aleatória nos túbulos seminíferos (multi-estádios), não foram selecionados somente secções transversais de túbulos seminíferos. Assim, todos os túbulos do corte histológico de cada lâmina foram mensurados, independente da posição de corte. Utilizando o programa Image J Launcher software (Broken symmetry software version 1.4.3.67), mediu-se a área dos estádios presentes em toda extensão dos túbulos seminíferos. No final, para cada indivíduo, determinou-se a frequência relativa de cada estágio (%) através da área total de epitélio seminífero (somatório das frequências dos seis estádios) de acordo com a seguinte fórmula:

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

Onde: Σ da área total do estágio = somatório da área do estágio a ser determinado;

Σ Área total = somatório da área total de todos os estádios.

As medidas feitas no programa de computador foram acompanhadas simultaneamente com a utilização do microscópio, no mesmo campo, para o diagnóstico preciso das células germinativas e dos limites precisos entre os estádios, evitando erros de classificação. O uso do microscópio foi importante uma vez que os detalhes citológicos da cromatina e nucléolo, determinantes para classificação celular, são observados com mais precisão apenas empregando movimentos constantes do foco no micrométrico. O

percentual de cada estágio do CES permitiu determinar a frequência relativa (%) de cada estágio por indivíduo.

No homem, a classificação dos estágios é dificultada por vários motivos. A presença de mais de um estágio por secção de túbulo seminífero, ausência ou pequeno número de um tipo de célula germinativa que deveria estar presente em um estágio conhecido e não está, ou um determinado estágio pode conter tipos celulares que não deveriam estar naquele lugar. No caso das associações celulares atípicas, os estágios foram classificados levando em consideração os tipos celulares germinativos predominantes.

3.9 Diâmetro nuclear

Os diâmetros nucleares médios (média dos dois eixos perpendiculares) de pelo menos 20 células de cada tipo celular por paciente foram medidos desde as espermatogônias A_e até as espermátides arredondadas S_{a1} . Foram selecionados somente células com núcleos grandes, para priorizar os cortes que seccionasse a parte central das células (maior diâmetro). As células germinativas foram mensuradas utilizando o software Image J, após a aferição do sistema com uma régua micrométrica.

3.10 Análise estatística

Dados de frequência relativa de estágios e diâmetro nuclear médio foram submetidos a testes estatísticos utilizando-se o programa Graphpad Prism versão 5.0 e Statistical Analysis System (SAS Institute, Cary; NC, USA SAS). Foram utilizados teste de normalidade antes da escolha dos testes estatísticos. Os dados de frequência foram analisados como um delineamento experimental inteiramente casualizado e o modelo estatístico incluiu o homem como fator fixo e frequência como fator aleatório. Os efeitos da idade sobre a frequência foram analisados pelo procedimento do modelo linear geral (GLM) do programa SAS. As médias de mínimos quadrados foram comparadas utilizando o teste t de Student com valor de significância de 5 % ($P < 0,05$). Nas tabelas e nos gráficos, os dados relacionam média \pm erro padrão da média (EPM).

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos do processamento histológico

Análise comparativa de diferentes fixadores e métodos de inclusão revelou que o processamento histológico pode gerar descrições morfológicas distintas. A **Tabela 5** mostra uma análise qualitativa e comparativa dos diferentes fixadores e métodos de inclusão avaliados neste estudo. Embora a inclusão com glicol metacrilato tenha melhorado expressivamente os detalhes citológicos em comparação com outras técnicas de inclusão como a parafina, este método não obteve resultados tão favoráveis na determinação morfológica de células germinativas e estádios do CES quanto a resina araldite independente do fixador utilizado. Porém, análise comparativa dos materiais incluídos em araldite utilizando esses dois melhores fixadores (Karnovsky e glutaraldeído) revelou que a cromatina das células germinativas se apresenta de maneira muito distinta, evidenciando que a simples troca do fixador ou do método de inclusão já interfere no método ideal para a MLAR. Como esses resultados comparativos demonstram que o melhor método de estudo é aquele que emprega o glutaraldeído como fixador e a araldite como meio de inclusão, a sequência do presente estudo descreve as análises feitas utilizando apenas testículos que foram fixados e incluídos com este tipo de processamento.

Fragmentos testiculares fixados em glutaraldeído e incluídos com araldite permitiram a visualização de detalhes citológicos à microscopia de luz, principalmente aqueles relacionados às características do núcleo, como detalhes de compactação dos nucléolos, cromatina condensada e aspecto granular da cromatina descondensada, fazendo com que todos os tipos de células germinativas fossem facilmente distinguíveis. Por outro lado, os fragmentos testiculares fixados em Karnovsky e incluídos em araldite, não obtiveram as mesmas definições dos detalhes citológicos como aspectos de granulosidade de cromatina descondensada e compactação da cromatina condensada, que se apresentaram muito claros, tornando difícil distinguir células germinativas semelhantes (**Figura 6**). Portanto, as descrições citológicas que permitiram determinar e distinguir as células germinativas e a separação nítida dos estádios do CES no homem foi ideal quando utilizado o glutaraldeído como fixador e resina araldite como método de inclusão. Os efeitos do processamento histológico foram semelhantes entre os pacientes adultos e idosos.

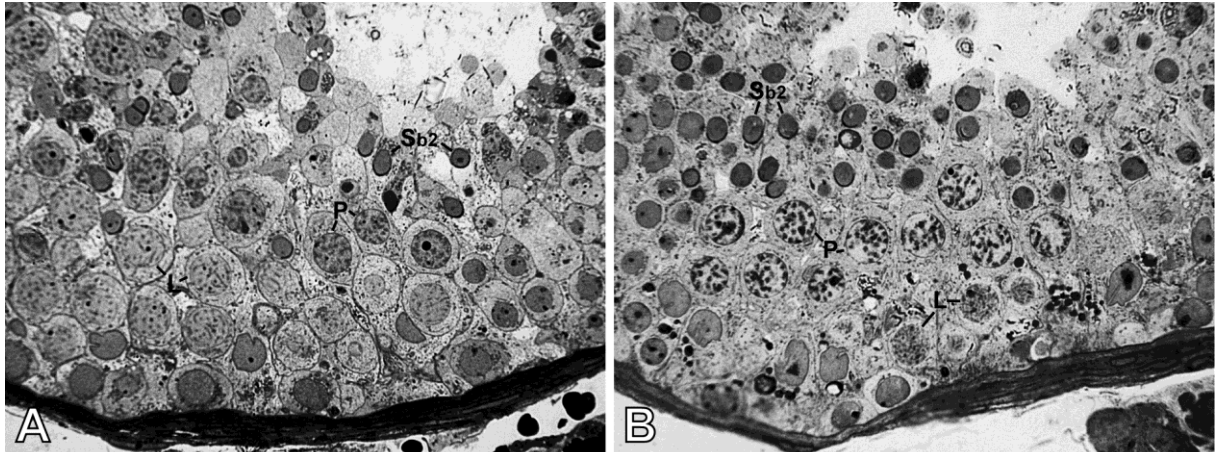


Figura 6. Fotomicrografia do estágio IV do CES do homem mostrando os detalhes de cromatina das células germinativas em dois fixadores diferentes. Processamento de Karnovsky/araldite (A) e glutaraldeído/araldite (B). P, paquíteno; L, leptóteno; S_{b2} , espermátide em alongamento tipo 2.

4.2 Morfologia das células germinativas em MLAR

As principais características morfológicas típicas de cada célula germinativa, desde as células-tronco (A_e) até a espermátide alongada mais madura (S_{d2}), são mostradas nas **Figuras 7 a 13**. Abaixo, a descrição citológica de cada célula germinativa, separadas de acordo com as três fases da espermatogênese: (1) proliferativa ou espermatogonial (espermatogônia A_e , A_c e B), (2) meiótica ou espermatocitogênica (espermatócitos primários em preleptóteno, leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno, espermatócitos secundários e figuras de divisão meiótica) e (3) de diferenciação ou espermiogênese (espermátides S_{a1} , S_{a2} , S_{b1} , S_{b2} , S_{c1} , S_{c2} , S_{d1} e S_{d2}). Não foram observadas diferenças morfológicas entre as células germinativas dos indivíduos adultos e dos idosos.

Tabela 5. Avaliação morfológica comparativa das células germinativas testiculares de acordo com as diferentes combinações de métodos de fixação e inclusão obtidas no presente estudo e também comparando com os processamentos, conforme estudo desenvolvido por Chiarini-Garcia *et al.* (2017).

	B/P	PF/P	K/GMA	G/GMA	K/A	G/A
Cromatina das espermatogônias	+	+	++	++	+++	++++
Cromatina dos espermatócitos	+	+	++	++	++	++++
Acrossoma das espermátides	+	+	++	++	+++	++++

Nota: B, Bouin; P, Paraplast; PF, paraformaldeído; K, Karnovsky; GMA, glicol metacrilato; A, araldite; G, glutaraldeído; +, qualidade mediana; ++, boa qualidade; +++, ótima qualidade; +++++, excelente qualidade.

4.2.1 Fase proliferativa ou espermatogonial

Espermatogônias A_e tem um núcleo arredondado e cromatina escura. A região da periferia nuclear é ligeiramente mais escura, enquanto o envoltório nuclear é evidentemente mais escuro (**Figuras 8-13**). Vacúolos nucleares estão presentes na maioria das A_e e são exclusividade destas células. A granulosidade da cromatina descondensada é mínima ou quase nula, devido à quase completa ausência de manchas que contribui para a aparência homogênea do núcleo, enquanto a cromatina condensada, raramente observada, é finamente granulada e encontrada próxima ao envoltório nuclear. Geralmente um ou dois nucléolos arredondados, muito compactos e densamente corados são vistos normalmente associados ao envoltório nuclear (**Figuras 8-13**).

Os núcleos das espermatogônias A_c são geralmente maiores do que os das espermatogônias A_e ($9,28 \pm 0,13$ vs $8,58 \pm 0,21$ μm de diâmetro, respectivamente) e mostram um aspecto bem claro de nucleoplasma (**Figuras 8-13**). O núcleo é ligeiramente oval e sob MLAR a eucromatina é homogeneamente granular e não é possível visualizar heterocromatina. Um número menor de nucléolos é visto em A_c , geralmente apenas um por secção nuclear, em geral maiores, compactos e encontrados próximos ao envoltório nuclear. A diferença mais evidente entre os dois tipos de espermatogônias do tipo A é o aspecto pálido e granuloso de coloração nuclear e a ausência de vacúolos nucleares nas espermatogônias do tipo A_c (**Figuras 8-13**).

Espermatogônias do tipo B apresentam núcleo arredondado, medindo $9,02 \pm 0,28$ μm de diâmetro e, ao contrário das espermatogônias do tipo A, apresentam o nucleoplasma flocular. A cromatina descondensada contribui para o aspecto granuloso do núcleo, enquanto que aglomerados de cromatina condensada podem ser vistos próximos do envoltório nuclear. Os nucléolos, não compactos, se localizam ligeiramente deslocados do envoltório nuclear. Espermatogônias tipo B são vistas apenas no estágio I (**Figura 8**) e II (**Figura 9**) do CES, apresentando morfologia semelhante em ambos os estágios.

4.2.2 Fase meiótica ou espermatocitária

Preleptóteno é a primeira geração de espermatócito primário (**Figura 10**). Seu núcleo é redondo e menor ($8,18 \pm 0,40$ μm) do que os das espermatogônias. A cromatina descondensada é granular e flocular como as espermatogônias tipo B, entretanto a cromatina condensada se torna mais proeminente e extremamente estriada em comparação com as espermatogônias. Os nucléolos possuem aspecto não compacto e difuso, ocupando grande extensão sobre o núcleo e, em geral, são evidenciados longe do envoltório nuclear.

A disposição em finos fios de cromatina é a principal característica nuclear dos espermatócitos primários em leptóteno (**Figura 11**). O núcleo arredondado mede $10,05 \pm 0,03 \mu\text{m}$. Zigótenos em estágio inicial se parecem muito com leptótenos, sendo difícil diferenciá-los (**Figura 12**). No entanto, os zigótenos tardios (**Figura 13**) possuem cromatina com aspecto de cordões, sendo mais volumosa e espessa em comparação com a cromatina dos leptótenos. O núcleo dos zigótenos possui diâmetro médio de $10,26 \pm 0,31 \mu\text{m}$.

Espermatócitos em fase de paquíteno tornam-se progressivamente maiores ao longo dos estádios do CES (desde $10,60 \pm 0,15$ até $11,37 \pm 0,14 \mu\text{m}$). A cromatina inicialmente pouco volumosa e levemente clara preenche toda a área do núcleo. Conforme as células caminham para estádios mais avançados, a cromatina torna-se mais volumosa e enovelada, centralmente localizada, tornando espaços claros mais evidentes nos paquítenos mais tardios (**Figuras 8-12**).

O diplóteno tem sua incidência muito baixa durante a fase meiótica (**Figura 13**). O núcleo do diplóteno é geralmente oval e seu diâmetro médio está em torno de $11,35 \pm 0,55 \mu\text{m}$. A cromatina dos diplótenos é bem característica, com aspecto difuso e turvo, deslocando-se em direção ao contorno nuclear, fazendo com que os espaços na área central do núcleo fiquem bem evidentes. Os espermatócitos secundários poderiam ser morfológicamente confundidos com espermatídes S_{a1} , mas eles são ~25% maiores ($9,55 \pm 0,43$ vs $7,11 \pm 0,06 \mu\text{m}$, respectivamente). As figuras de divisão meiótica são facilmente reconhecidas por serem grandes e caracterizadas pelo desaparecimento do envoltório nuclear. Os cromossomos estão em fase de condensação máxima, sendo facilmente visualizados. As figuras de divisão podem ser observadas em uma das fases da divisão meiótica, como metáfase, anáfase ou telófase (**Figura 13**).

4.2.3 Fase de diferenciação ou espermiogênica

As notáveis mudanças morfológicas que ocorrem ao longo da maturação das espermatídes, desde as arredondadas iniciais (S_{a1}) até as alongadas maduras (S_{d2}) envolvem alterações nucleares e citoplasmáticas estruturais progressivas que tornam possível distinguir os diferentes tipos de espermatídes do CES no homem. Fases iniciais de espermatídes são facilmente distinguíveis, pois enquanto não há a condensação/compactação do núcleo, o acrossoma é facilmente identificado, permitindo determinar os primeiros quatro estádios (estádio I a IV) do CES no homem. A descrição detalhada em MLAR sobre este evento é mostrada nas **Figuras 8 a 11**. No entanto, logo que a condensação do núcleo ocorre na S_{c1} (estádio V) em diante (S_{c2} -VI; S_{d1} -I e S_{d2} -II), a coloração do acrossoma torna-se indistinguível do resto do núcleo em MLAR, dificultando a distinção das espermatídes alongadas (**Figuras 12-13 e 8-9**, respectivamente).

A primeira classe de espermátides são as espermátides do tipo S_a , cujo formato do núcleo é arredondado. Inicialmente, as S_{a1} são espermátides arredondadas que não possuem vesícula acrossômica evidente e progressivamente esta vesícula aumenta de tamanho. São consideradas S_{a1} tardias as espermátides com vesículas grandes, porém com o acrossoma em formato côncavo em relação ao núcleo (**Figura 8**). Enquanto as S_{a2} são espermátides arredondadas que possuem vesícula acrossômica sempre evidente, mas com o acrossoma com formato achatado em relação ao núcleo (**Figura 9**). Desta forma, a distinção entre S_{a1} e S_{a2} é baseada na morfologia do acrossoma em relação ao núcleo.

A segunda classe de espermátides são as do tipo S_b , cujo formato do núcleo é suavemente alongado. São consideradas células em alongamento e a vesícula acrossômica nestas células já desapareceu, dando início à fase de formação do capuz acrossômico. As S_{b1} são espermátides que podem ser encontradas tanto na forma arredondadas quanto suavemente alongadas. O acrossoma destas células tem forma convexa em relação ao núcleo e progressivamente se espalha ao redor da superfície apical do núcleo (**Figura 10**). A região do acrossoma destas células começa a se posicionar de forma a fazer face com a lâmina basal do túbulo seminífero. As S_{b2} são espermátides em alongamento e com o acrossoma bem espalhado sobre o núcleo. A característica que diferencia as S_{b2} das S_{b1} é o contato que o núcleo faz na região do acrossoma com a membrana plasmática (**Figura 11**). A região do acrossoma destas células já está totalmente voltada para a lâmina basal do túbulo seminífero, enquanto que na região caudal do núcleo a formação do flagelo começa a se destacar.

A terceira classe de espermátides são as do tipo alongadas e são compostas pelos morfótipos S_{c1} , S_{c2} , S_{d1} e S_{d2} . As espermátides do tipo S_c ainda são passíveis de serem diferenciadas pela compactação do núcleo. As S_{c1} possuem o núcleo mais claro e acrossoma ainda evidente (**Figura 12**) enquanto as S_{c2} possuem o núcleo densamente corado, resultado da condensação da cromatina, o que torna o acrossoma não mais evidente (**Figura 13**). Essas células nem sempre podem ser diferenciadas, sendo necessário recorrer às células germinativas associadas à elas para classificá-las entre S_{c1} e S_{c2} . A região caudal das espermátides S_c ainda possuem grande parte do corpo citoplasmático em comparação com as espermátides S_d . Enquanto isso, as S_{d1} (**Figura 8**) e S_{d2} (**Figura 9**) são espermátides que tem alta compactação da cromatina, tornando difícil a classificação das mesmas. Nessas últimas, ocorre reabsorção do corpo citoplasmático pelas células de Sertoli, dando destaque para o flagelo de formato característico.

4.3 Morfologia das células germinativas em MET

A avaliação ultra-estrutural foi utilizada de forma pontual ao longo deste estudo procurando auxiliar na caracterização de detalhes das células germinativas que não estavam plenamente claros ou de forma complementar e confirmatória em relação à avaliação sob a MLAR, como pode ser observado ao longo das figuras dos estádios (**Figuras 8-13**). Também ao nível ultra-estrutural a morfologia das células germinativas dos adultos e idosos foi semelhante. Os blocos de araldite de estádios-específicos foram separados previamente através da análise de cortes semifinos sob MLAR e as células específicas de cada estágio então eram caracterizadas. Uma das avaliações importantes da MET foi em relação à morfologia nucleolar, permitindo distinguir melhor a forma de condensação dos nucléolos entre as espermatogônias e o preleptóteno (**Figuras 8 a 10**). As espermatogônias do tipo A possuem nucléolos mais compactos e localizados muito próximos à periferia nuclear, enquanto que as espermatogônias do tipo B possuem nucléolo mais disperso/reticulado e ligeiramente deslocado do envoltório nuclear (**Figura 8-9**). As células de preleptóteno possuem nucléolos maiores, bem dispersos e completamente afastados do envoltório nuclear (**Figura 10**).

Os espermatócitos em estágio de leptóteno, zigóteno e paquíteno possuem morfologia semelhante na microscopia eletrônica de transmissão, sendo mais facilmente diferenciados sob MLAR. Os espermatócitos secundários foram facilmente identificados na MET pela grande quantidade de retículo endoplasmático ao redor do núcleo (**Figura 13**). As espermátides mais avançadas (S_c e S_d) foram mais facilmente identificadas na microscopia eletrônica e, de forma comparativa, ajudaram a estabelecer as seis associações celulares sob a MLAR.

4.4 Estádios do CES no homem sob MLAR

Após a descrição morfológica de todas as células germinativas, pode-se observar que as associações celulares típicas se repetem no epitélio seminífero, podendo separar o CES em estádios de acordo com a morfologia e as gerações de células germinativas, de forma semelhante em adultos e idosos. Foi observado um padrão de cinética de espermátides, através do tamanho da vesícula acrossômica e desenvolvimento e angulação do acrossoma (**ver item 4.2.3**). Estas características, em conjunto com as gerações de células germinativas da fase proliferativa e meiótica, permitiram estabelecer seis estádios do CES no homem com coerência e facilidade. Desta forma, propomos seis estádios/associações de células germinativas bem definidas e de composição fixa que além de reafirmar a divisão em seis estádios do CES do homem proposto por Clermont (1963) e

Heller e Clermont (1964), também faz uma proposta de reclassificação da composição de células que fazem parte de cada estágio do CES, com ênfase no sistema acrossômico. Os detalhes destas associações estão apresentados de forma detalhada nas figuras 7 (Mapa da CES), 8 a 13 (descrição detalhada de cada um dos estádios) e 14 (chave de decisão binária).

Apesar da descrição celular detalhada sob MLAR, a definição de estádios baseados apenas na geração de espermátides da espermatogênese, apesar de possível, não é recomendada, pois as modificações de compactação e morfologia do núcleo de espermátides alongadas são ínfimas quando comparadas às células de estádios vizinhos como, por exemplo, o estágio V (S_{c1}) e VI (S_{c2}). A transição entre estas espermátides não ocorre de maneira abrupta (**Figura 12**). Adicionalmente, as secções de túbulo seminífero em humanos são multi-estádios, desta forma, estádios sequenciais do CES podem estar lado a lado na secção de túbulo seminífero, dificultando a separação entre estádios baseada somente pelo método do sistema acrossômico, necessitando, assim, de gerações de células mais iniciais da espermatogênese como as espermatogônias e os espermátócitos para auxiliar na determinação dos estádios.

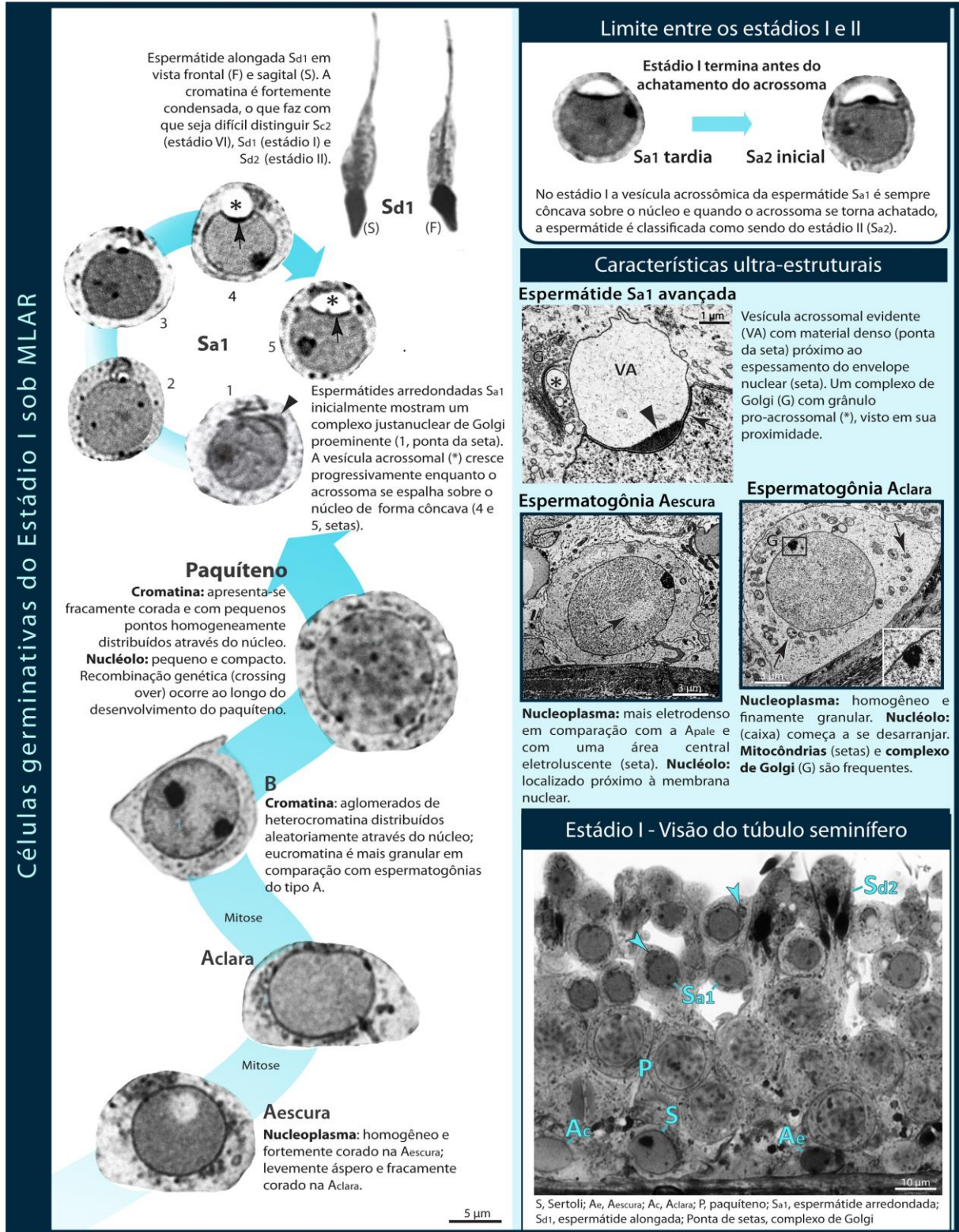
Espermatogônias do tipo A (A_e e A_c) não foram úteis para determinação dos estádios, uma vez que foram observadas ao longo de todos os seis estádios do CES (**Figuras 8-13**). Por outro lado, espermatogônias do tipo B podem auxiliar a determinar estádios, uma vez que estas células são observadas apenas nos estádios I e II (**Figuras 8-9**). As células germinativas em fase meiótica, de preleptóteno até diplóteno, foram observadas em um ou mais estádios do CES, sendo fundamentais na determinação de estádios. Os primeiros espermátócitos primários foram vistos em estádios específicos como preleptótenos em estágio III (**Figura 10**), leptótenos no estágio IV (**Figura 11**) e zigótenos em estádios V e VI (**Figuras 12-13**). Os espermátócitos em paquíteno, por se apresentarem em quase todos os estádios, auxiliaram apenas em direcionar se a área do epitélio pertencia a estádios iniciais ou finais do CES (**Figuras 8-12**), enquanto que espermátócitos em diplóteno, divisões de meiose e espermátócitos secundários foram exclusivamente observados no estágio VI (**Figura 13**).

Com a finalidade facilitar o estudo de determinação dos estádios do CES humano, construímos uma chave de decisão binária. Enquanto os estádios iniciais (I a IV) podem ser bem definidos pelo formato do núcleo e pelo desenvolvimento do acrossoma, a classificação dos estádios finais (V e VI) deve ser definida com o auxílio dos tipos de espermátócitos (**Figura 14**). Na chave de decisão binária, a presença de duas gerações de espermátides leva ao primeiro grupo onde estão os estádios I e II. Ambos os estádios são formados por espermatogônias do tipo B. Portanto, a decisão entre estágio I ou II está na forma côncava (estádio I) ou achatada (estádio II) do acrossoma das espermátides arredondadas. Se

somente espermátides em alongamento estão presentes, a chave binária leva ao segundo grupo em que estão os estádios III e IV. O estágio III é classificado pela presença de espermatócitos em preleptótenos, que são específicos deste estágio, e pelas espermátides S_{b1} , que possui a região do acrossoma sem qualquer contato com a membrana citoplasmática. O estágio IV possui espermatócitos em leptótenos e S_{b2} , cuja região do acrossoma entra em contato com a membrana citoplasmática. O último grupo da chave de decisão é composto somente por espermátides alongadas e a diferença entre os estádios V e VI é determinado pelas gerações de espermatócitos. O estágio V possui paquítenos, enquanto que o estágio VI possui diplótenos, espermatócitos secundários e figuras de divisão. A chave de decisão binária por si só ajuda a classificar estádios, porém compreender as diferentes células germinativas que compõem cada estágio é fundamental para determinar os limites precisos na análise de frequência (**Figuras 8-13**).



Figura 7. Mapa de distribuição das células germinativas em VI estádios do epitélio seminífero humano. Ae, espermatogônia Aescura; Ac, espermatogônia Aclara; B, espermatogônia B; Pl, preleptoteno; L, leptoteno; Z, zigoteno; P, paquíteno; M, figuras de meiose; D, diplóteno; 2°, espermatócito secundário; Sa1, Sa2, Sb1, Sb2, Sc1, Sc2, Sd1, Sd2, espermátides



Células germinativas do estágio II sob MLAR

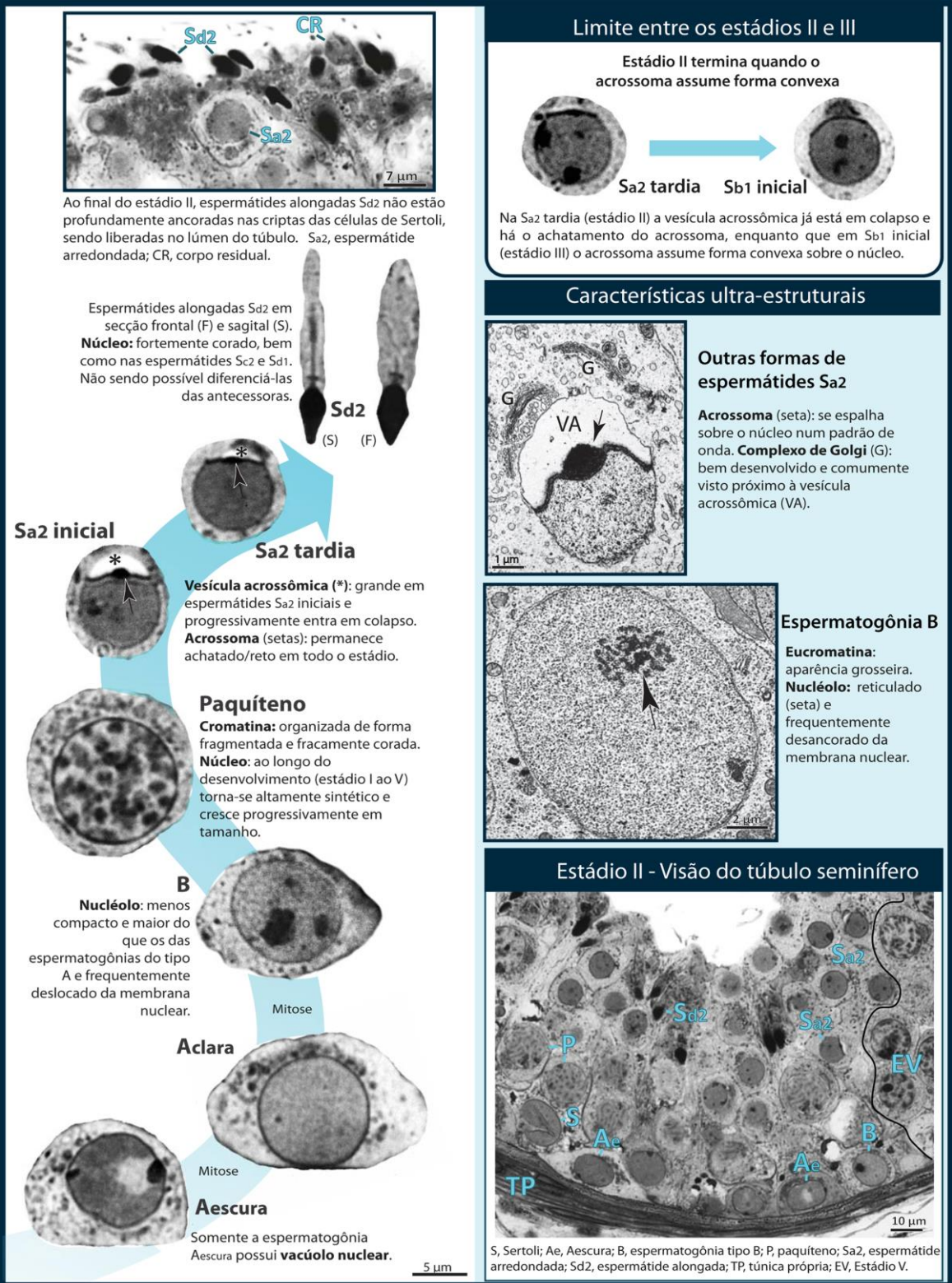


Figura 9. Estádio II do CES baseado nas características morfológicas das células germinativas do testículo, desde espermatogônias até espermatídes sob MLAR. Os limites entre os estádios II e III estão indicados. Alguns aspectos ultra-estruturais também são mostrados na MET.

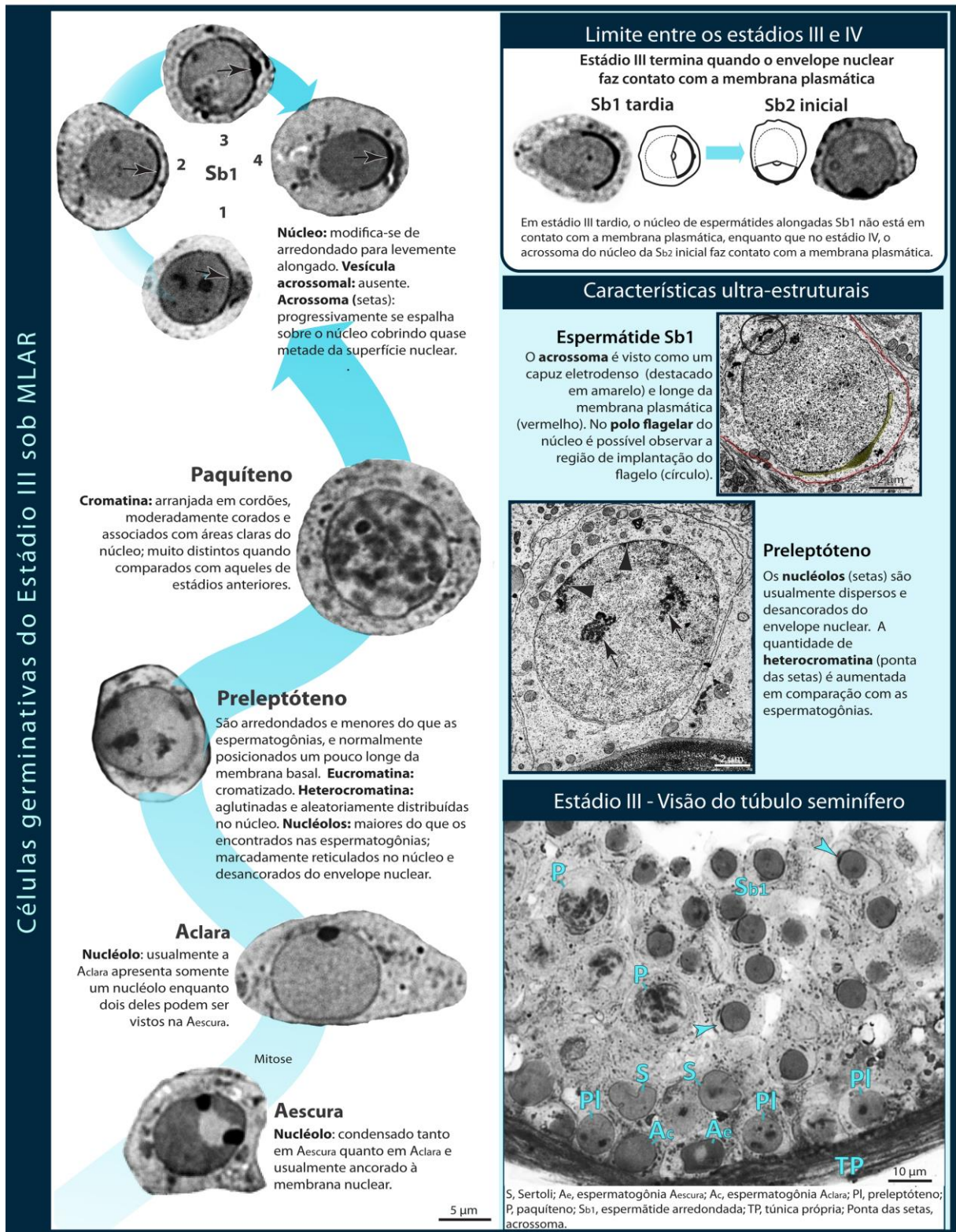


Figura 10. Estádio III do CES baseado nas características morfológicas das células germinativas do testículo, desde espermatogônias até espermatídes sob MLAR. Os limites entre os estádios III e IV estão indicados. Alguns aspectos ultra-estruturais também são mostrados na MET.

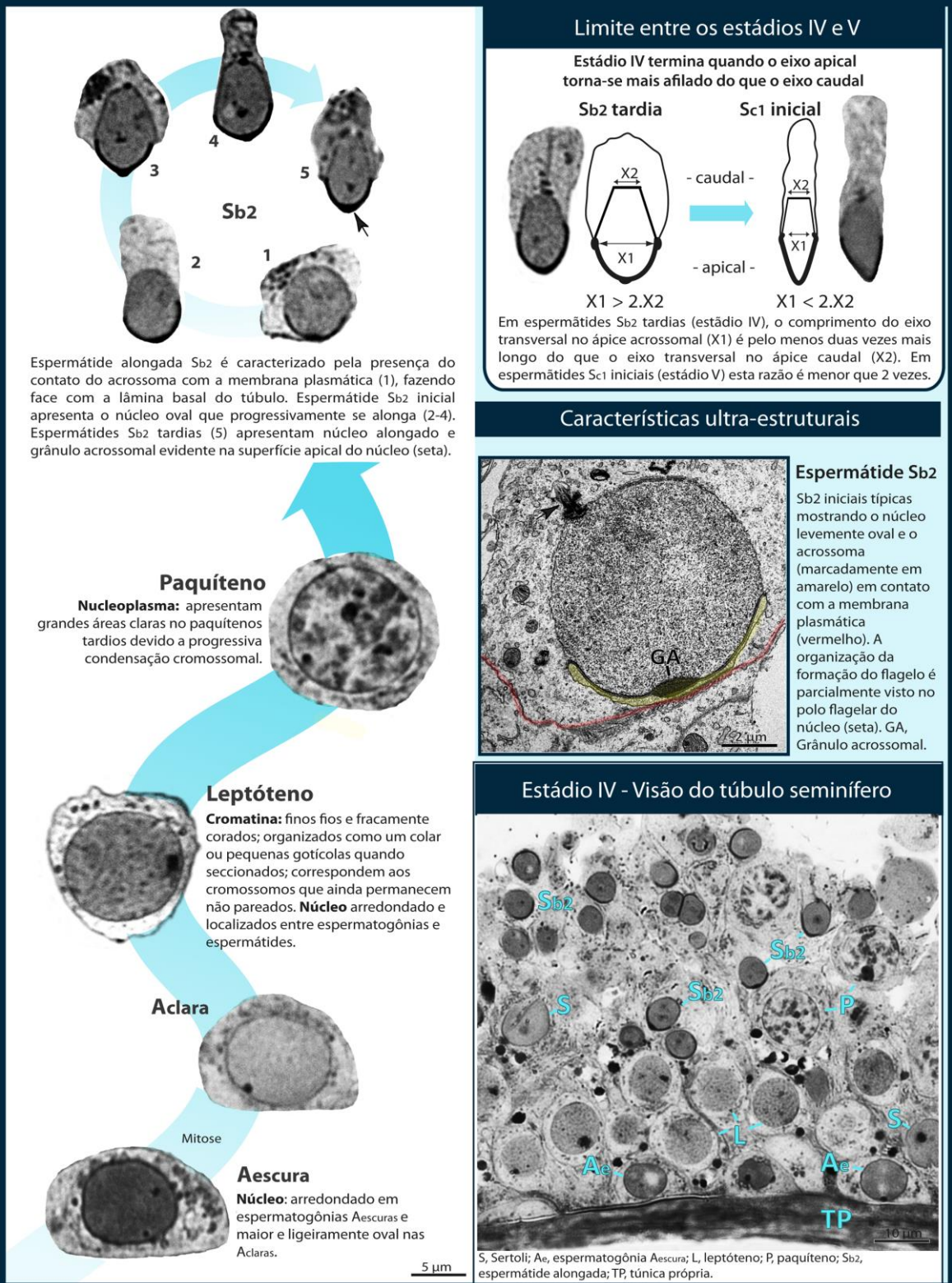


Figura 11. Estádio IV do CES baseado nas características morfológicas das células germinativas do testículo, desde espermatogônias até espermátides sob MLAR. Os limites entre os estádios IV e V estão indicados. Alguns aspectos ultra-estruturais também são mostrados na MET.

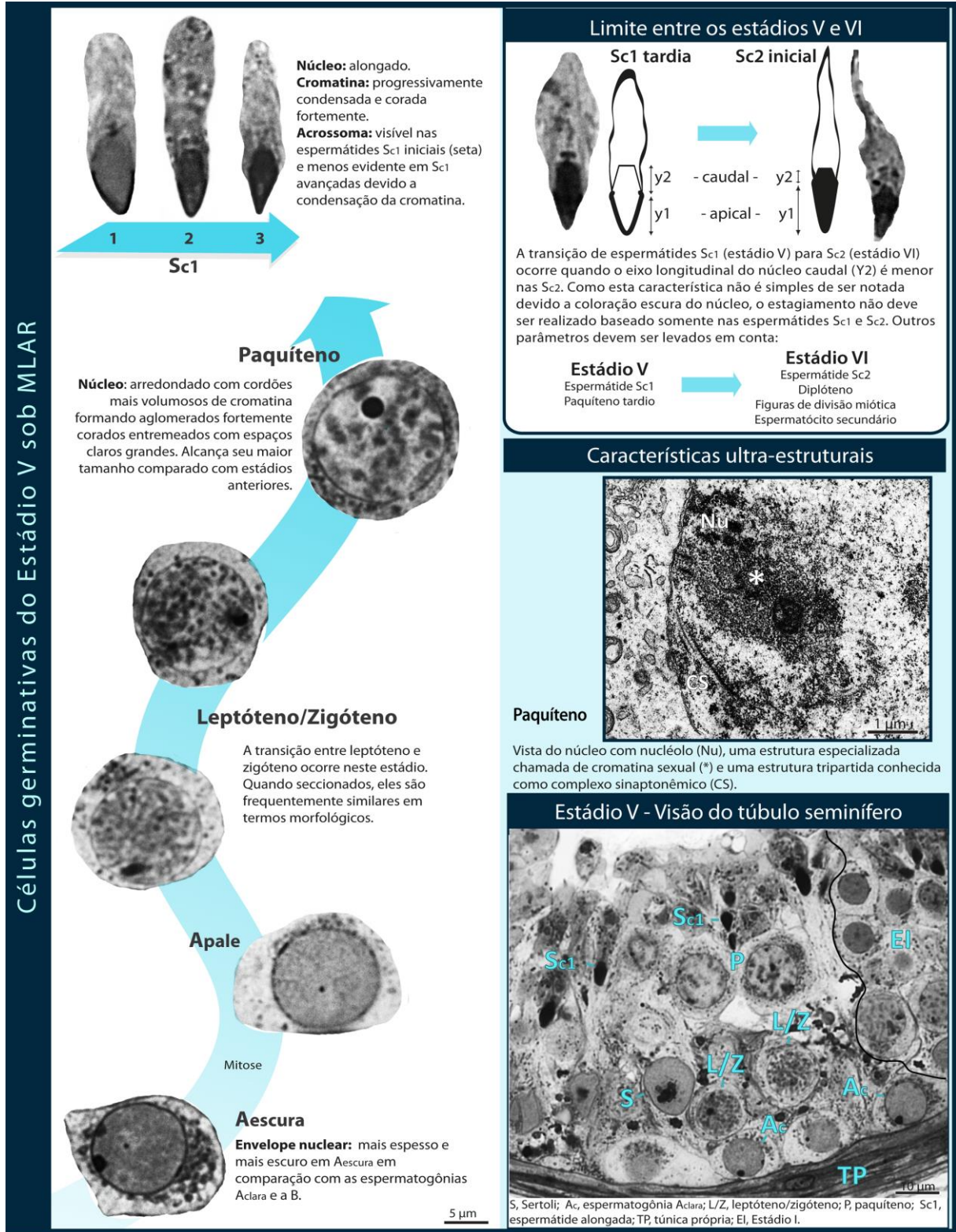


Figura 12. Estádio V do CES baseado nas características morfológicas das células germinativas do testículo, desde espermatogônias até espermatídes sob MLAR. Os limites entre os estádios V e VI estão indicados. Alguns aspectos ultra-estruturais também são mostrados na MET.

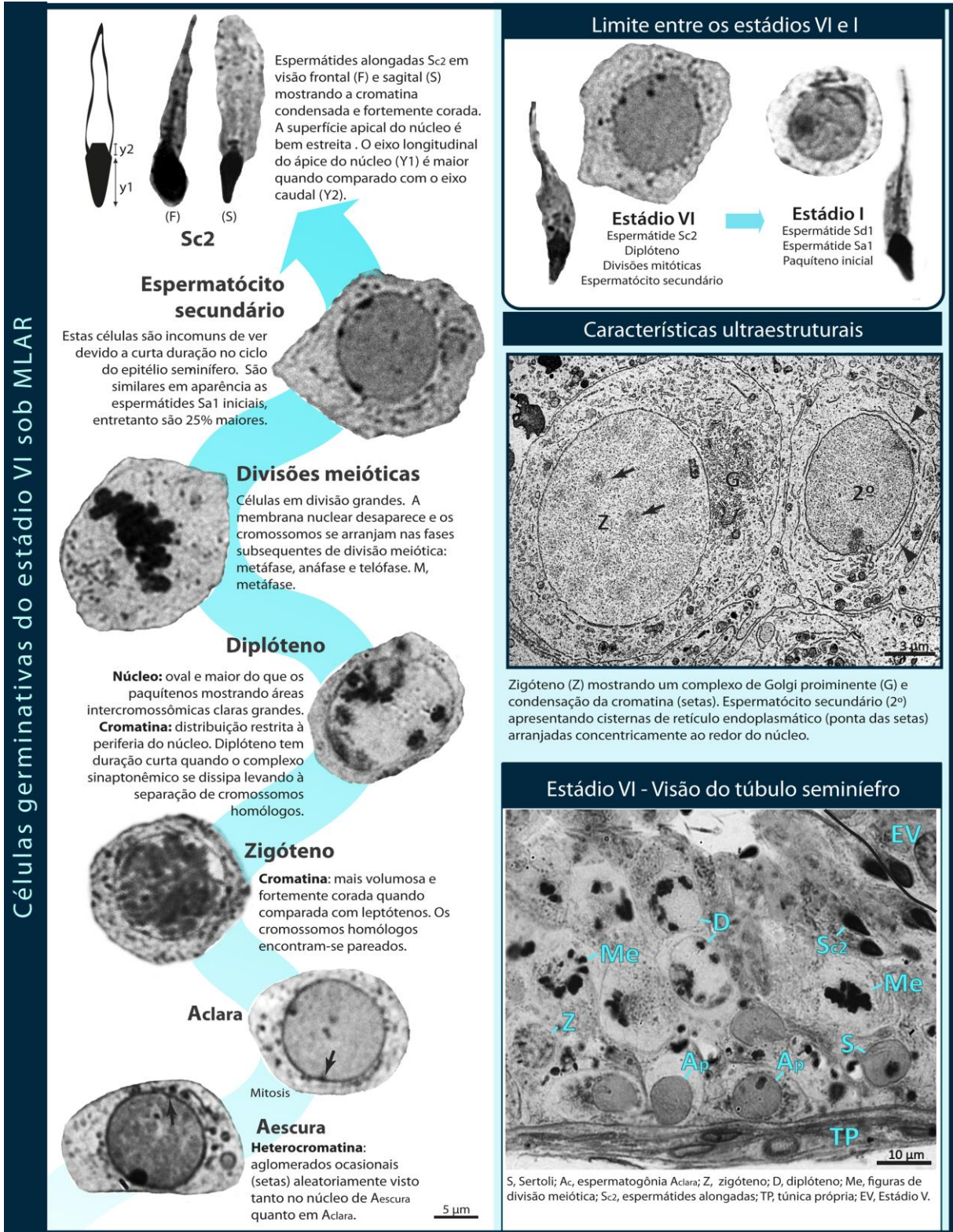


Figura 13. Estádio VI do CES baseado nas características morfológicas das células germinativas do testículo, desde espermatogônias até espermátides sob MLAR. Os limites entre os estádios VI e I estão indicados. Alguns aspectos ultra-estruturais também são mostrados na MET.

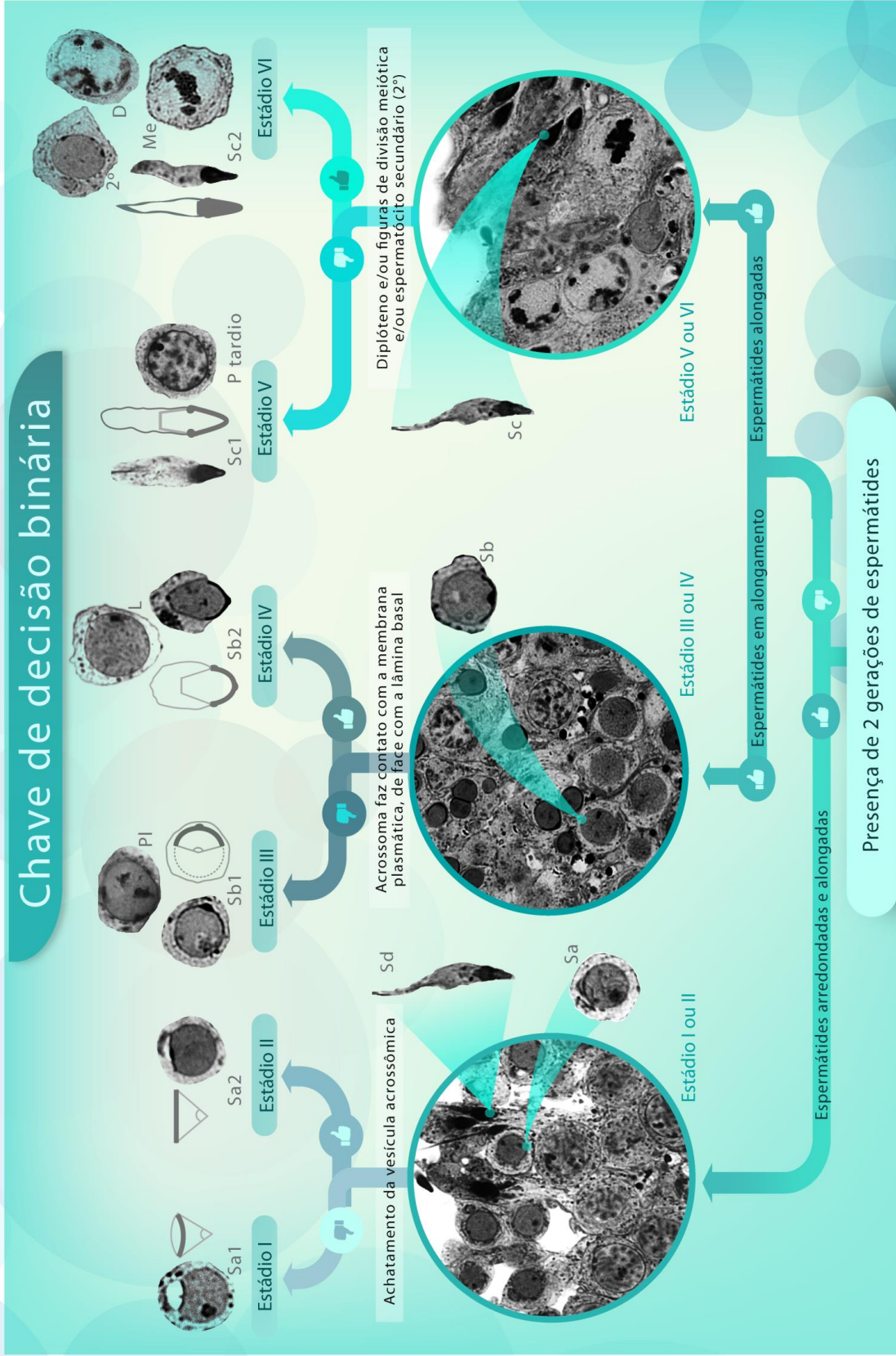


Figura 14. Chave de decisão binária para identificação de estádios específicos da espermatogênese humana. Sa1, espermátide arredondada tipo 1; Sa2, espermátide arredondada tipo 2; Sb1, espermátide em alongamento tipo 1; Sb2, espermátide em alongamento tipo 2; Sc1, espermátide alongada tipo 1; Sc2, espermátide alongada tipo 2; PI, preleptóteno; L, leptóteno; P, paquíteno; Me, Figuras de divisão meiótica; D, diplóteno; Me, Figuras de divisão meiótica; 2º, espermatócito secundário.

4.5 Frequência relativa (%) dos estádios do CES

A frequência relativa (%) dos estádios do CES do homem de acordo com as redefinições dos limites entre estádios vizinhos (**Figura 15 e Tabela 6**). Os seis pontos de cada estádio do CES do gráfico representam a frequência de cada um dos seis indivíduos utilizados na pesquisa.

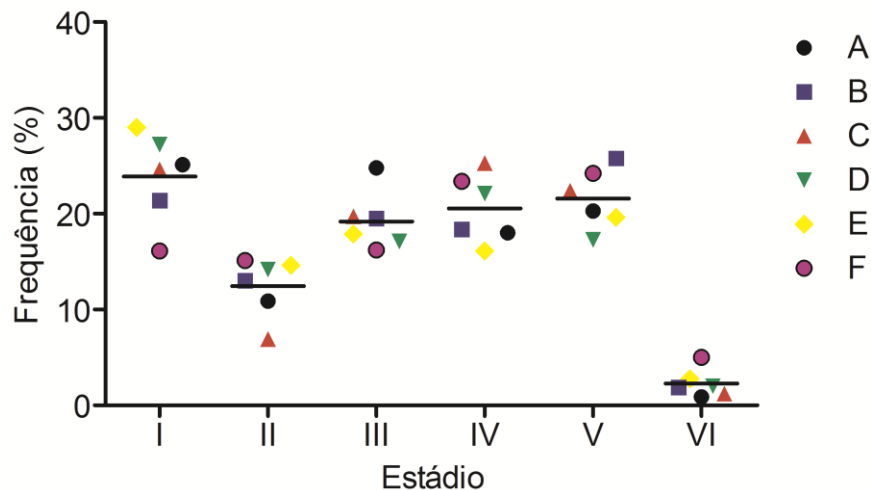


Figura 15. Frequência relativa (%) dos estádios do CES do homem de acordo com os novos limites definidos pelas descrições morfológicas sob a MLAR. As letras de A a F representam os seis indivíduos utilizados na pesquisa.

A frequência relativa (%) dos estádios teve uma dispersão muito pequena entre os indivíduos. Alguns pontos de dispersão podem ser observados nos estádios I e II. Apesar dessas pequenas dispersões, não houve diferença estatística quando as frequências de cada estádio foram comparadas entre os diferentes indivíduos, mostrando que o método de separação dos estádios conseguiu delimitar os seis estádios do CES com confiabilidade, mostrando que os dados de frequência relativa (%) são robustos.

Na **Tabela 6**, os valores das frequências dos três primeiros indivíduos (A-C) representam os indivíduos adultos, enquanto os três últimos (D-F) representam os indivíduos idosos. Os valores dos intervalos de confiança dos estádios (I: 20.2-27.6 - II: 10.0-15.0 - III: 16.8-21.6 - IV: 17.7-23.5 - V: 19.1-24.1 - VI: 1.1-3.5) mostraram-se muito próximos (valores mínimo e máximo), fortalecendo os resultados de que as dispersões em torno da média foram mínimas, corroborando o método empregado por nós para delimitar os seis estádios do CES humano.

Tabela 6. Frequência relativa (%) dos seis estádios do CES humano de acordo com os novos padrões de associações de células germinativas para cada um dos pacientes (A-C adultos e D-F idosos).

Indivíduos	Estádios do CES humano						N° de túbulos seminíferos
	I	II	III	IV	V	VI	
A	27,2	14,2	17,1	22,1	17,3	2,0	28
B	29,0	14,6	17,9	16,1	19,6	2,8	29
C	16,1	15,1	16,2	23,4	24,2	5,0	31
D	25,1	10,9	24,8	18,0	20,3	0,9	43
E	21,4	13,0	19,5	18,4	25,8	1,9	47
F	24,6	6,9	19,7	25,3	22,4	1,2	50
Média	23,9	12,5	19,2	20,6	21,6	2,3	
EPM	1,9	1,3	1,2	1,5	1,3	0,6	228

Nota: EPM, erro padrão da média

Comparando a distribuição de frequência relativa (%) dos estádios do CES de humanos adultos (obstrução do ducto deferente) e idosos (câncer de próstata), constata-se que não há diferença significativa ($P > 0,05$) entre as idades (**Figura 16**).

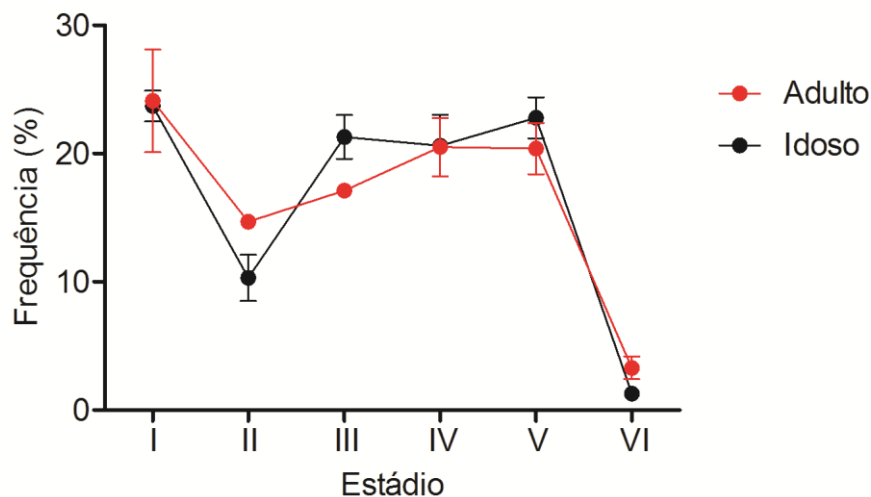


Figura 16. Comparação da frequência relativa (%) dos VI estádios do CES de indivíduos adultos e idosos.

4.6 Diâmetro nuclear das células germinativas

O diâmetro de cada tipo de célula germinativa (**Figura 17**) foi um fator adicional determinante na caracterização das células germinativas. O diâmetro nuclear médio (média entre o maior e o menor eixo) das células germinativas foi mensurado desde as espermatogônias A_e até espermátides S_{a1} .

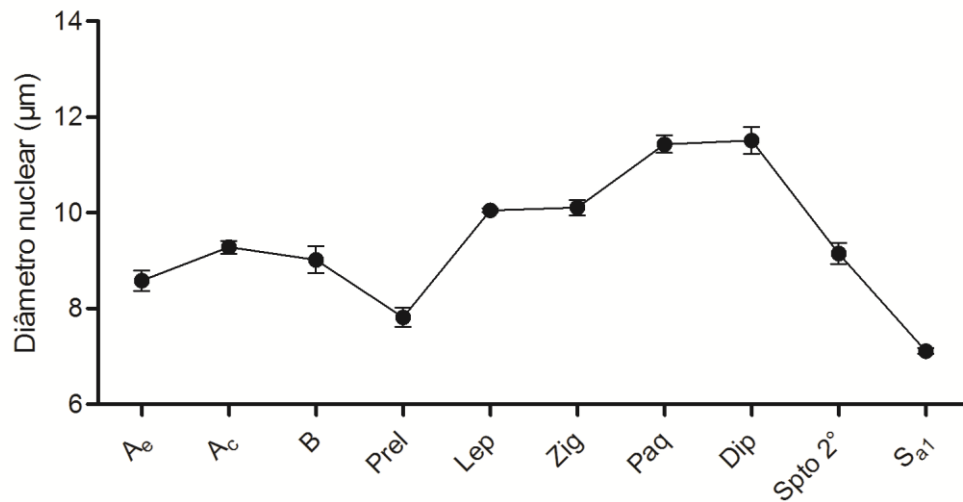


Figura 17. Diâmetro nuclear médio das células germinativas. A_e, espermatogônia A_{escura}; A_c, espermatogônia A_{clara}; B, espermatogônia B; Prel, preleptóteno; Lep, leptóteno; Zig, zigóteno; Paq, paquíteno; Dip, diplóteno; Spto 2º, espermatócito secundário; S_{a1}, espermátide arredondada tipo 1. Diâmetro nuclear médio ± Erro padrão da média.

Dois momentos de distinção importantes entre as células germinativas utilizando o diâmetro celular seriam entre as espermatogônias do tipo B e os preleptóteno bem como entre os espermatócito secundário e as espermátides arredondadas S_{a1}. Nestes casos o diâmetro celular foi determinante na classificação destas células. Observe que a média de diâmetro dos preleptótenos é bem menor do que as espermatogônias B ($p < 0,05$). O mesmo ocorre entre as espermátides S_{a1} que são bem menores do que os espermatócitos secundários (~25%; $p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Existem diversos protocolos de fixação e inclusão na literatura, entretanto nenhum é considerado ideal, pois enquanto alguns são excelentes em preservar propriedades estruturais do tecido, priorizando análises morfológicas, outros, por exemplo, preservam a propriedade antigênica do tecido, priorizando análises funcionais. A busca por análise morfológica mais acurada fez surgir alguns fixadores que são formados pela mistura de substâncias, na tentativa de superar as vantagens de um fixador pela vantagem de um segundo adicionada a ela. Estudo recente indicava resultados melhores com o uso do glutaraldeído como fixador e araldite como método de inclusão para avaliações morfométricas do testículo (Chiarini-Garcia *et al.*, 2017). Acreditava-se que o Karnovsky, fixador provindo da mistura entre o paraformaldeído, que possui rápido poder de penetração no tecido, e glutaraldeído, cujo poder de fixação tem qualidade excelente, teria resultados tão bons ou superiores quanto o glutaraldeído na preservação morfológica do tecido testicular, porém, a análise comparativa mostrou que o material fixado somente em glutaraldeído apresentou descrições morfológicas superiores ao do Karnovsky. Do nosso ponto de vista, a falta de descrições morfológicas claras das células germinativas do testículo humano sempre foi um impasse para se estudar estádios e sua duração no CES. Os detalhes das células germinativas que compõem cada estágio analisados sob MLAR no presente estudo geraram dados definitivos acerca de frequências relativas dos estádios do CES humano, estabelecidas através da redefinição de limites claros entre estádios vizinhos.

As informações na literatura sobre caracterização morfológica das células do epitélio germinativo e sobre CES humano são muito antigas (Clermont, 1963, Heller e Clermont, 1964), e por muito tempo essa caracterização morfológica do parênquima testicular tem sido a única a ser utilizada. Apesar da importância da divisão da espermatogênese em estádios para estudos histopatológicos, poucos estudos utilizam este CES do homem para compreender a espermatogênese sob estas condições. Este fato se deve à dificuldade de conseguir doadores saudáveis como controle, da dificuldade de preservar morfológicamente o epitélio seminífero e do arranjo aleatório dos estádios, que tem levam a encontrar presença/ausência de células em locais não esperados do epitélio. Em conjunto, esses fatores contribuem para que pesquisadores não se sintam seguros para utilizar o modelo de CES proposto por Clermont e colaboradores (1963), o que tem levado à escassez de informações histopatológicas detalhadas sobre a espermatogênese humana. Com objetivo de resolver esta questão, a partir de métodos de estudo mais modernos o presente trabalho propõe um modelo de divisão de estádios do CES confiável, adaptado a partir daquele proposto por Clermont e colaboradores.

Um dos fatores que efetivamente contribui para a baixa qualidade morfológica do

epitélio seminífero humano é o que se refere aos métodos de fixação e inclusão dos fragmentos testiculares. Estudos prévios têm demonstrado que o tipo de processamento histológico interfere nas avaliações morfométricas do testículo (Howroud *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2012; Chiarini-Garcia *et al.*, 2017), em alguns casos alterando a interpretação de um mesmo resultados quando analisado por grupos de pesquisa diferentes. A avaliação qualitativa dos diferentes métodos de fixação e inclusão do nosso estudo demonstrou que a MLAR, que emprega fixação em glutaraldeído e inclusão em araldite, foi a que apresentou melhores resultados. Os fragmentos fixados com glutaraldeído e incluídos em outro tipo de resina plástica, o glicol metacrilato, apresentaram resultados morfológicos expressivamente melhores em comparação com aqueles processados em paraformaldeído/parafina. Mas, apesar disto, não demonstraram resolução suficiente quando comparado com o processamento glutaraldeído/araldite. Já a fixação em solução de Karnovsky, da qual esperávamos uma qualidade superior, não se obteve a qualidade desejada em todas as células germinativas como quando se utilizou o glutaraldeído, com impacto severo na distinção da cromatina de espermátócitos em leptóteno e zigóteno. Portanto, o presente estudo mostra que análises morfológicas acuradas do testículo humano devem ser analisadas através do processamento de MLAR.

Apesar do processamento morfológico sob a MLAR ter sido determinante para diversos estudos que utilizam os estádios do CES de roedores e cães (Russell *et al.*, 1990), tais como a caracterização dos tipos espermatogoniais de camundongos e ratos (Chiarini-Garcia e Russell, 2001; Chiarini-Garcia *et al.*, 2003) e a determinação de nicho espermatogonial nestas espécies (Chiarini-Garcia *et al.* 2001; Chiarini-Garcia *et al.*, 2003), o CES humano não havia sido revisitado, até o presente momento e de forma específica, sob o método de MLAR. No presente estudo, a MLAR permitiu caracterizar morfológicamente e de forma precisa os tipos de espermatogônias (A_e , A_c e B), espermátócitos e espermátides em humanos. Dentre os destaques, a distinção nítida dos tipos de espermátides presentes em cada estágio e células germinativas tais como espermatogônias do tipo B e preleptóteno, cujas células eram consideradas morfológicamente indistintas até o momento (Muciaccia *et al.*, 2013). Esses achados podem contribuir no avanço de estudos sobre cinética da espermatogênese humana sob condições normais e patológicas. De fato, a distinção morfológica imprecisa das diferentes células germinativas, principalmente espermatogoniais, tem levado a uma carência de informações sobre o comportamento da espermatogênese do homem (Ehmcke e Schlatt, 2006).

Apenas processamentos histológicos sofisticados e de alta qualidade não são suficientes para alcançar alta resolução e distinção de detalhes citológicos na microscopia de luz. Recomenda-se o uso de um microscópio apropriado e de seu ajuste adequado, seguindo método de centralização da luz preconizado por Koehler. Como as

fotomicrografias digitais das células germinativas são estáticas, não mostram todos os detalhes que o observador pode ver, mesmo após o ajuste apropriado do microscópio antes de obter a imagem. Alguns dos detalhes citológicos descritos no presente estudo, tais como as características nucleares, não são facilmente visualizados nas micrografias digitais estáticas, uma vez que esses detalhes citológicos são melhor realçados na observação ao microscópio, quando o foco pode ser ajustado em diferentes partes das organelas através de movimentos sutis e constantes do micrométrico.

Ao avaliar a espermatogênese humana, deve-se tomar cuidado com possíveis diversidades morfológicas entre os pacientes devido a diferenças sutis que podem ocorrer na preparação dos fixadores, espessura do corte histológico e coloração. Mesmo utilizando rigorosamente a mesma metodologia, algumas vezes as células germinativas não são morfológicamente iguais entre pacientes diferentes, embora similares. Nesses casos, todas as células germinativas devem ser estudadas pelo examinador de forma comparativa com a morfologia proposta no presente estudo, adequando o padrão antes de começar qualquer avaliação morfofuncional confiável da espermatogênese.

Considerando as controvérsias na distribuição das células germinativas do CES humano em seis estádios (Amann, 2008; Muciaccia *et al.*, 2013), nossos achados levam-nos a manter a divisão do CES em seis associações celulares tal como proposto por Clermont (1963). Estudo recente desenvolvido por Muciaccia *et al.*, (2013) propõe divisão deste mesmo ciclo em 12 estádios, o que aumenta a dispersão das células germinativas, que passam a aparecer em um maior número de estádios diferentes. Desta forma, células que eram estágio-específicas como os preleptótenos e leptótenos aparecem em mais de um estágio, dificultando ainda mais determinar estádios. O arranjo multi-estádios nos túbulos seminíferos, associados à ausência/presença de células germinativas de localização inesperada, quando associado a um processamento histológico de baixa resolução, dificulta a classificar o CES em mais de seis associações, como acontece com o modelo proposto por Clermont e colaboradores (Clermont, 1963). Diante disto, e levando em consideração nossa proposta de classificação do CES através de um método de alta resolução através da MLAR, propomos manter a distribuição do CES em seis estádios, uma vez que esta diminui a dispersão de células germinativas e facilita a classificação dos estádios.

Análises utilizando o sistema acrossômico para determinar 12 estádios do CES humano baseados apenas em cortes transversais de túbulo seminífero obtiveram somente 46% de túbulos viáveis para análise de frequência (Muciaccia *et al.*, 2013), mostrando que esta metodologia é inviável para avaliar patologias testiculares, pois exclui mais da metade do parênquima testicular. Contudo, as frequências relativas (%) dos estádios foram determinadas com precisão no presente estudo após uma redefinição da maneira convencional de se estabelecer estádios. Análises de fragmentos testiculares muito

pequenos obtidos através de biópsias testiculares apresentavam poucas secções transversais de túbulo seminífero por indivíduo. Adicionalmente, não se justifica utilizar somente secções transversais de túbulos seminíferos, tendo em vista o arranjo aleatório dos estádios do CES humano (Johnson, 1996), o que gera secções de túbulos seminíferos multi-estádios independente da posição do corte. Desta forma, houve uma necessidade de adaptar o método de se estabelecer frequências relativas (%) para o epitélio humano, para ser um método aplicável a qualquer parênquima testicular. Esta nova forma de se determinar estádios através da varredura de todos os túbulos seminíferos independente da posição do corte permite ter uma noção mais exata do testículo como um todo, permitindo uma avaliação mais ampla do parênquima testicular para fins diagnósticos. As frequências foram avaliadas em grupos de faixa etária diferente (adultos e idosos) e as frequências foram homogêneas. As pequenas diferenças morfológicas observadas no epitélio seminífero dos idosos, com aspecto de leve hipoespermatogênese (revisão em Martello, 2013), demonstraram que o avançar da idade não altera a cinética do epitélio seminífero no que esse refere à distribuição dos estádios do CES. Portanto, esta nova forma de determinar frequência baseada na análise da área total de todos os túbulos seminíferos disponíveis permitiu estabelecer uma frequência relativa (%) dos estádios do CES do homem de forma concisa, definitiva e aplicável a qualquer parênquima testicular.

A dispersão nas análises de frequência é resultado da falta de limite preciso entre as associações celulares que fazem parte de cada estágio e que os separam em estádios diferentes, associada com a organização aleatória e multi-estádio dos cortes transversais de túbulo seminífero (Johnson, 1996). As frequências obtidas por Clermont (1963) são muito distintas das obtidas por Heller *et al.* (1969). Os dados de frequência relativa dos estádios de acordo com o método aqui proposto revelaram que houve homogeneidade entre os diferentes indivíduos, isto é, as frequências dos estádios no presente estudo não diferiram significativamente entre os indivíduos, independente da idade. Adicionalmente, os intervalos de confiança (95%) das frequências relativas dos estádios I-VI obtidas por Clermont (1963) foi alto em comparação com as frequências estabelecidas no presente estudo. Enquanto a variabilidade das frequências ao redor das médias de Clermont (1963) foi de 30%, 35%, 100%, 63%, 30% e 40% para os estádios I a VI, respectivamente, as nossas frequências variaram em 15%, 20%, 13%, 14%, 12% e 52%. As espermátides do tipo S_a são classificadas apenas como arredondadas pela proposta de Clermont (1963) e através da MLAR foi possível distinguir pela primeira vez e com precisão as espermátides dos tipos S_{a1} (estádio I) e S_{a2} (estádio II). O resultado de maior contraste em relação à frequência de estádios comparando nosso estudo com o da literatura (Clermont, 1963; Heller *et al.*, 1969), foi entre os estádios IV (21% e ~11%, respectivamente) e V (21% e ~26%, respectivamente). Esta discrepância pode ser resultado da falta de informação sobre as

diferenças de morfologia do núcleo e desenvolvimento do acrossoma entre espermátides em alongamento (Sb) e alongadas (Sc), que foi possível pela MLAR. Desta forma, acreditamos que a inconsistência das frequências observadas por Clermont (1963) pode ser devido à dificuldade em estabelecer os limites dos estádios, que foram prontamente estabelecidos por nós sob a MLAR.

A descrição morfológica minuciosa do formato do núcleo e do desenvolvimento do acrossoma das espermátides foi determinante para estabelecer os limites precisos entre estádios vizinhos. Apesar da alta resolução da MLAR, não é indicado a utilização apenas das espermátides S_{c1} e S_{c2} para classificar estádios finais do CES (estádios V e VI, respectivamente), uma vez que essas células, pela intensa condensação do núcleo, podem ser confundidas morfológicamente pela MLAR. Nestes estádios, tal como observado por Clermont (1963) e Heller e Clermont (1964), a classificação levou em consideração o tipo de espermátócito presente, mesmo após avaliação sob a MLAR. A chave de decisão binária (**Figura 14**) foi desenvolvida para tornar mais didática a metodologia de classificação dos estádios do CES humano. Apesar de possível estabelecer com segurança os estádios do CES humano pela chave de decisão binária, é recomendado sempre fazer uma análise citológica mais detalhada de todos os estádios, levando em consideração as irregularidades do epitélio seminífero humano, com ausência/presença de células germinativas em locais não esperados e que pode atrapalhar na determinação desses estádios.

Na clínica médica, os andrologistas utilizam de forma rotineira os escores histopatológicos (Cinco Padrões, Johnsen e de Bergmann) para o diagnóstico das desordens testiculares humanas (McLachlan *et al.*, 2007). Estes métodos são relativamente simples de serem executado se são suficientes para compreender as alterações na espermatogênese com propósitos clínicos. O método de MLAR utilizado na distinção de estádios, proposto no presente estudo, não tem o intuito de sobrepor aos métodos rotineiros utilizados na clínica andrológica. Na realidade, os detalhes morfológicos observados após a MLAR têm como objetivo dar suporte para estudos científicos relacionados ao comportamento da espermatogênese e compreender as causas de inúmeros danos testiculares ainda não resolvidos através do uso de técnicas convencionais. Os conhecimentos histopatológicos obtidos através deste método de estudo mais sofisticado e dispendioso da MLAR poderão ser aplicados de forma indireta na melhor interpretação dos resultados obtidos através de métodos convencionais mais simples de execução, baratos e de fácil acesso, utilizados na clínica andrológica.

Assim, esperamos que os detalhes que permitiram caracterizar as células germinativas que compõe as associações celulares e a redefinição das frequências relativas dos estádios aqui proposto possa colaborar com estudos sobre CES, encorajando pesquisadores da área de andrologia a aplicá-la em estudos que visem melhor compreender

a cinética da espermatogênese sob diferentes condições experimentais e patológicas. Além disto, pode ser uma ferramenta útil como modelo para estudo de CES de outras espécies que possuem arranjo em multi-estádio, como outras espécies de primatas.

6 CONCLUSÃO

- O processamento histológico empregando fixação com glutaraldeído, inclusão em araldite e cortes de 1 μm de espessura, conhecido como microscopia de luz de alta resolução (MLAR), é o que proporciona a melhor resolução para avaliação morfológica das células germinativas testiculares sob a microscopia de luz;
- A caracterização das espermatídes através da morfologia do núcleo e desenvolvimento do acrossoma foi fundamental na determinação dos estádios do CES humano, entretanto a classificação dos estádios finais do ciclo (V e VI) precisa ser determinada levando em consideração as gerações de espermatócitos;
- As características das células germinativas que compõem os seis estádios do CES permitiu estabelecer de forma precisa os limites entre estádios vizinhos no ciclo, determinando as frequências relativas (%) dos seis estádios do CES humano de forma precisa;
- A morfologia das células germinativas e a frequência dos estádios do CES foram homogêneas entre diferentes faixas etárias (homens adultos e idosos).

REFERÊNCIAS

- Amann, RP. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? **J Androl.** v. 29, p. 469-487, 2008.
- Bergmann M, Behre HM, Nieschlag E. Serum FSH and Testicular morphology in male infertility. **Clinical Endocrinology.** v. 40, p. 133-136, 1994
- Bergmann M, Kliesch S. Testicular biopsy and histology. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (eds). **Andrology—Male Reproductive Health and Dysfunction.** Springer; p. 155-172, 2010
- Burgos MH, Fawcett DW. An electron microscope study of spermatid differentiation in the toad, *Bufo arenarum hensel*. **J Biophys Biochem Cytol.**; v. 2, n. 3, p. 223-240, 1956.
- Chiarini-Garcia H, Meistrich ML. High-resolution light microscopic characterization of spermatogonia. **Methods Mol Biol.** v. 450, p. 95-107, 2008.
- Chiarini-Garcia H, Alves-Freitas D, Barbosa IS, Almeida FR. Evaluation of the seminiferous epithelial cycle, spermatogonial kinetics and niche in donkeys (*Equus asinus*). **Anim Reprod Sci.** v. 116, p. 139-154, 2009.
- Chiarini-Garcia H, Hornick JR, Griswold MD, Russell LR. Distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random. **Biology of Reproduction.** v. 65, p. 1179-1185, 2001.
- Chiarini-Garcia H, Lima M, Reis AB, Martello R, Nihi F, Gomes MLM, Almeida FRCL. Influence of the fixative and embedding in the morphology and morphometric data of human testicle. **Histol Histopathol.** V. 32, p. 27-34, 2017.
- Chiarini-Garcia H, Parreira GG, Almeida FR. Glycol methacrylate embedding for improved morphological morphometrical, and immunohistochemical investigations under light microscopy: testes as a model. **Methods Mol Biol.** v. 689 p. 3-18, 2011.
- Chiarini-Garcia H, Raymer AM, Russell LD. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. **Reproduction.** v. 126, p. 669-680, 2003.

Chiarini-Garcia H, Russell LD. Characterization of mouse spermatogonial types by electron microscopy. **Reproduction**. v. 123, p. 567-577, 2002.

Chiarini-Garcia H, Russell LD. High resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. **Biol Reprod**. v. 65, p. 1175-1178, 2001.

Clermont Y, Antar M. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and the spermatogonial renewal in the monkey *Macaca arctoides*. **Am. J. Anat.** v. 136, n. 2, p. 153-165, 1973.

Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiological reviews** v. 52, p. 198-236, 1972.

Clermont Y, Leblond P. Differentiation and renewal of spermatogonia in the monkey *Macaca rhesus*. **Am. J. Anat.** v. 104, p. 237-273, 1959.

Clermont Y. Renewal of spermatogenesis in man. **Am. J. Anat.**, v. 118, p. 509–524, 1966a.

Clermont Y. Spermatogenesis in man: A study of the spermatogonial population. **Fertility and sterility** v. 17, p. 705-721, 1966b.

Clermont Y. The cycle of seminiferous epithelium in man. **Am. J. Anat.**, v. 112, p. 35-51, 1963.

Clermont Y. Two classes of spermatogonial stem cells in the monkey (*Cercopithecus aethiops*). **Am J Anat**. v. 126, n. 1, p. 57-71, 1969.

Drumond AL, Meistrich ML, Chiarini-Garcia H. Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: a high-resolution light microscopy approach. **Reproduction**. v. 142, p. 145-155, 2011.

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

França LR, Russell LD. **The testis of domestic animals**. In: *Reproduction- a multidisciplinary overview*. MARTINEZ, F. REGADERA, J. (eds.). Churchill Livingstone, Madrid, p. 197-219, 1998.

França LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. **Biol Reprod.** v. 59, n. 6., p. 371-7, 1998.

Furlan MMDP. **Bases Celulares da Fisiologia dos Órgãos e Sistemas dos Animais.** Eduem. 50e. IB. Coleção Fundamentum; n° 23. 2005.

Griswold MD. Action of FSH on mammalian Sertoli cells. In: **The Sertoli Cell** (eds. MD Griswold & LD Russell), Cache River Press, Clearwater, FL. pp. 493–508, 1993.

Heller CG, Clermond Y. Kinetics of the Germinal Epithelium in Man. **Recent ProgHorm Res.** v. 20, p. 545-575, 1964.

Heller CG, Heller CV, Rowley MJ. Human spermatogenesis: An estimate of the duration of each cell association and of each cell type. **Mammalian spermatogenesis** v. 184, p. 1012-1018, 1969.

Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes **Microsc Res Tech.** v. 73 n. 4 p.:241-78, 2010.

Holstein AS, Roosen-Runge EC. Atlas of human spermatogenesis. Ed: Grosse Verlag. Berlin, 224p. 1981.

Howroyd P, Hoyle-Thacker R, Lyght O, Williams D, Kleymenova E. Morphology of the fetal rat testis preserved in different fixatives. **Toxicol Pathol.** v. 33, p. 300-304, 2005

Huckins C. Spermatogonial intercellular bridges in whole-mounted seminiferous tubules from normal and irradiated rodent testes. **American Journal of Anatomy,** v. 153, p. 97-121, 1978a.

Huckins C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. **The anatomical record.** v. 190, p. 905-926, 1978b.

Johnsen GJ. Testicular Biopsy Score Count – A method for Registration of Spermatogenesis in Human Testes: Normal Values and Results in 335 Hypogonadal Males. **Hormones.** v. 1, p. 2-25, 1970.

Johnsen L, Chaturvedi PK, Williams JD. Missing generations of spermatocytes and spermatids in seminiferous epithelium contribute to low efficiency of spermatogenesis in humans. **Biology of Reproduction**. v. 47, p. 1091-1098, 1992.

Johnson L. A new approach to study the architectural arrangement of spermatogenic stages revealed little evidence of a partial wave along the length of human seminiferous tubules. **Journal of Andrology**. v. 15, n. 5, p. 435-441, 1994.

Johnson K, McKenzie S, Snell JR. Partial wave in human seminiferous tubules appears to be a random occurrence. **Tissue & Cell**. v. 28, n. 2, p. 127-136, 1996.

Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **J Cell Biol**. 27:137A, 1965.

Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. **Human Reprod**. v.1, p. 1-8, 1998.

Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. **Toxicol Pathol**. v. 30, p. 524-33, 2002.

Leal MC, França LR. The seminiferous epithelium cycle length in the black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) is similar to humans. **Biol Reprod**. v. 74, n. 4. p. 616-624. 2006.

Leblond CP, Clermont Y. Definitions of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Ann NY Acad Sci**. v. 55, n. 4, p. 548-573, 1952.

Levin HS. 1979. Testicular biopsy in the study of male infertility: its current usefulness, histologic techniques, and prospects for the future. **Hum Pathol**. 10:569-84.

Martello R. Efeitos da radioterapia e hormonioterapia na espermatogênese de pacientes com câncer de próstata. Tese de doutorado. Departamento de Cirurgia: Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia. Faculdade de Medicina da UFMG. 96p. 2013.

McLachlan RI, de Meyts ER, Kretser DM. Histological evaluation of the human testis- approaches to optimizing the clinical value of the assessment: Mini Review. **Hum Reprod.** v. 22, p. 2-16, 2007.

Millar MR, Sharpe RM, Weinbauer GF, Fraser HM, Saunders PT. Marmoset spermatogenesis : organizational similarities to the human. **Int. J. Androl.** v. 23, n. 5, p. 266-277, 2000.

Mirzapour T, Movahedin M, Ibrahim TAT, Haron AW, Nowroozi MR. Evaluation of the effects of cryopreservation on viability, proliferation and colony formation of human spermatogonial stem cells *in vitro* culture. **Andrologia.** v. 45, n. 1, p. 26-34, 2013.

Muciaccia B, Boitani C, Berloco BP, Nudo F, Spadetta G, Stefanini M, de Rooij DG, Vicini E. Novel stage classification of human spermatogenesis based on acrosome development. **Biol Reprod.** v. 89, p. 1-10, 2013.

Nistal M, Codesal J, Paniagua R, Santamaria L. Decrease in the number of human Ap and Ad spermatogonia and in the Ap/ Ad ratio with advancing age. New data on the spermatogonial stem cell. **J Androl.**v. 8, n. 2, p. 64-68, 1987.

Oakberg EF. A description of spermatogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. **Am J Anat.** v. 99, n. 3, p. 391-414. 1956.

Paniagua R, Nistal M, Amat P, Rodríguez MC, Alonso JR. Quantitative differences between variants of A spermatogonia in man. **J Reprod Fertil.** v. 77, n. 2, p. 669-73, 1986.

Reis AB. Estudo comparativo entre diferentes processamentos histológicos na interpretação de biópsias testiculares. Departamento de Cirurgia: Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Faculdade de Medicina da UFMG. 77p. 2012.

Russell LD, Clermont Y. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. **Anat Rec.** v. 187, p. 347-366, 1977.

Russell LD, Ettlín RA.,Sinha Hikim AP, Clegg ED. **Histological and histopathological evaluation of the testis.** Clearwater: Cache River Press. 286 p. 1990.

Schlatt S, Ehmcke J. Regulation of spermatogenesis: An evolutionary biologist's perspective. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 29, p. 2-16, 2014.

Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E.; Neill, J.D. (Eds). **The Physiology of Reproduction**. 2. ed. New York: Raven Press. pp. 1363-1434, 1994.

Silván U, Díez-Torre A, Moreno P, Arluzea J, Andrade R, Silió M, Aréchaga J. The spermatogonial stem cell niche in testicular germ cell tumors. **Int. J. Dev. Biol.** v. 57, p. 185-195, 2013.

Smithwick EB, Young LG, Gould KG. Duration of spermatogenesis and relative frequency of each stage in the seminiferous epithelium cycle of the chimpanzee. **Tissue Cell**. v. 28, n. 3, p. 357-366, 1996.

Sousa AL, Campos-Junior PH A, Costa GMJ, França LR. Spermatogenic cycle length and sperm production in the freshwater turtle. **Biol Reprod**. v. 90, p. 1-10, 2014.

Vellez LT. Avaliação Morfofuncional de Testículo Humano de Pacientes Submetidos a Tratamentos para o Câncer de Próstata. Departamento de Morfologia: Programa de Pós-graduação em Biologia Celular. UFMG. 2016.

Anexo 1**UFMG**

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

Parecer nº. ETIC 032/04

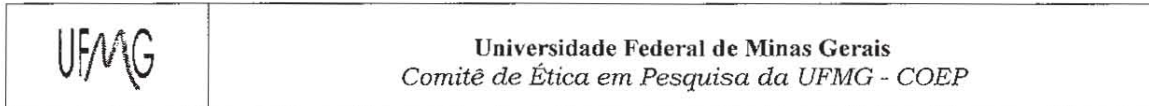
Interessado: Prof. Dr. Fernando Marcos Reis
Faculdade de Medicina - UFMG

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



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





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



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.

diferenciação espermatogonial serão feitas na Universidade do Texas, Huston, USA, em colaboração com missões dos pesquisadores brasileiros da UFMG.

Apresentação do Protocolo

O protocolo está devidamente instruído.

A Folha de Rosto está devidamente preenchida e assinada, especialmente no que se refere aos compromissos do Investigador e da Instituição.

As Declarações dos diversos departamentos e as licenças para a realização da pesquisa estão presentes, inclusive o esclarecimento sobre o grau de relação dos profissionais da equipe de Urologia (3 pesquisadores) e os pacientes submetidos à orquiectomia.

O protocolo está devidamente classificado como sendo de cooperação estrangeira devido ao Contrato de colaboração entre a UFMG e a UT/M.D. Anderson Cancer Center de Huston, Texas, USA, que também consta do protocolo e está devidamente traduzido.

Constam os Currículo Vitae- CV do Pesquisador Principal e de seus colaboradores, bem com os CV dos pesquisadores colaboradores da Universidade do Texas.

Não existe propriamente um Orçamento financeiro, mas um detalhamento e uma explicação dos diversos custos e da perspectiva de onde deverão vir esses recursos para cobrir os custos. Consta, inclusive, uma explicação sobre a participação do próprio SUS no processo, visto que os pacientes orquiectomizados pertencem ao SUS e a cirurgia é coberta pelo Sistema Único de Saúde.

Local de Realização do Estudo

É projeto nascido e a ser executado na Universidade Federal de Minas Gerais, como Centro Único, que contará com a parceria da Universidade do Texas na Análise dos dados. O país de origem do projeto é, portanto, o Brasil.

Comentários

O projeto está sendo reapresentado com documentos solicitados pela CONEP que estavam ausentes na sua apresentação anterior (Reg. CONEP 14033), estando o protocolo também com páginas incompletas.

O presente protocolo está, em geral, de acordo com o que vem preconizado pela Resolução CNS 196/96 e suas complementares, oferecendo aos sujeitos de pesquisa todas as garantias e seus direitos.

É um trabalho inédito e a equipe da UFMG, de acordo com seus currículos, está capacitada para a sua realização.

O material utilizado no estudo (retirado na orquiectomia – e proveniente do tratamento de câncer de próstata avançado) seria normalmente descartado após o procedimento cirúrgico, portanto é informado que não haverá riscos adicionais aos sujeitos da pesquisa nesse sentido.

Certamente os resultados da pesquisa poderão trazer compreensão da espermatogênese humana, no conhecimento das causas da infertilidade, mostrar como os diversos tratamentos de câncer podem prejudicar o processo espermatogênico e sugerir modos de minorar tais efeitos danosos.

A metodologia é adequada aos fins desejados.

O pesquisador esclarece que os médicos pesquisadores não têm nenhuma influência na indicação e realização da ablação cirúrgica (orquiectomia bilateral) em pacientes portadores de câncer avançado de próstata e que esses procedimentos são sempre indicados pelos médicos do Setor de Uro-Oncologia, visando apenas o tratamento da doença em questão.

Cont. Parecer CONEP 189/2006

Haverá envio de material biológico para o exterior (Universidade do Texas) que deverá ser utilizado apenas para os fins propostos no estudo.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE garante o sigilo dos dados, apresenta os principais benefícios esperados da pesquisa, mostra a ausência prática de maiores riscos destacando os desconfortos de determinados procedimentos. Não prevê nem ressarcimentos, nem indenizações.

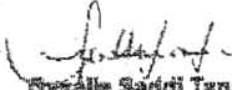
Considerações sobre a análise das respostas ao Parecer CONEP Nº 813/2007, relativo ao projeto de pesquisa em questão:

1. Foi informado pelo pesquisador a orquiectomia contínua sendo o tratamento padrão ouro.
2. A incidência dessa prática na instituição em pauta foi de 21 procedimentos em 2005 e 37 em 2008.
3. O TCLE foi revisto conforme solicitado:
 - a. O TCLE (Anexo 4) foi incorporado ao protocolo;
 - b. Quanto à orientação para o direito de reabilitação (possibilidade de colocação de prótese) foi esclarecido que é feita apenas a orquiectomia bilateral subcasular (e não a total), onde é retirado apenas o parênquima testicular e cujo resultado final é melhor do que a colocação de uma prótese.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta - se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado

Brasília 07 de abril de 2008.


Crystelle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS



Anexo 3

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Hospital das Clínicas Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

“Reavaliação da espermatogênese humana à luz de modernos métodos de estudo morfológicos e funcionais”

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.

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. Parte do material será enviada, sem nenhuma identificação dos dados pessoais do paciente, para o Departamento de Radiação Oncológica Experimental da Universidade do Texas nos Estados Unidos, onde serão desenvolvidos experimentos relacionados com as células tronco.

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.

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.

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, recompõem esta pequena quantidade de sangue coletada.

RESSARCIMENTO DAS DESPESAS

Não está prevista qualquer forma de remuneração para os pacientes voluntários. As despesas específicas relacionadas com o desenvolvimento do presente estudo são de responsabilidade do Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG e do Departamento de Radiação Oncológica Experimental da Universidade do Texas, EUA.

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 neste estudo não influenciará no seu tratamento. Nesta pesquisa utilizaremos a parte do testículo retirada cirurgicamente, conforme indicação médica e que seria, depois, desprezada. A cirurgia no qual você se submeterá retirará apenas o miolo do testículo e deixará outras partes que darão volume ao escroto. No entanto o paciente pode optar por colocar uma prótese (Portaria nº 467 - SAS/MS de 20.08.2007) mas, neste caso, todo o testículo tem de ser retirado para que haja espaço para a prótese. No momento da retirada do testículo será coletada também amostra de sangue da veia braquial de um dos braços do paciente. O consentimento em participar deste projeto não acarretará coleta de nenhum outro material adicional nem mudanças no tratamento indicado. Não serão utilizados outros tecidos e não serão realizados quaisquer outras manipulações, experimentos ou intervenções diretas com o paciente.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu,voluntariamente, concordo que o material biológico (tecido testicular e sangue periférico) proveniente da minha cirurgia de orquiectomia, seja utilizado para fins de pesquisa científica no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução do ICB/UFMG e no Departamento de Radiação Oncológica Experimental da UT. Estou ciente do exposto acima e ainda de que esta pesquisa não trará qualquer prejuízo à minha saúde.

Nome completo do paciente:

Nº Registro do paciente:

Assinatura do paciente ou representante legal:

Local e data:

Nome da pessoa que obteve o Consentimento Livre e Esclarecido:

Assinatura da Pessoa que obteve o consentimento Livre e esclarecido:

Local e data:

Se você tem quaisquer perguntas sobre esse estudo ou sobre seus direitos, favor contatar com:

Telefones para contato:

Pesquisadores:

Prof. Hélio Chiarini-Garcia - Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução – (31) 3499.2807

Profª Fernanda RCL Almeida - Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução – (31) 3499.2992

Prof. Dr. Augusto Reis - Setor de Urologia do Hospital das Clínicas da UFMG – (31) 3248.9488 ou 9164.8173

Prof. Dr. Reginaldo Martello - Setor de Urologia do Hospital das Clínicas da UFMG – (31) 3248.9488 ou 9974-9590

Prof. Dr. Denny

Se você tiver alguma pergunta sobre os seus direitos como participante de um estudo, favor contatar:

Endereço do Comitê de Ética:

Comitê de Ética em Pesquisa – UFMG

Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005

Av. Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha

31.270-901 – Belo Horizonte – MG

Telefone: (31) 3409.4592