

Fabíola de Araújo Resende Carvalho

Avaliação comparativa da espermatogênese de homens azoospérmicos em diferentes etiologias

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

Fabíola de Araújo Resende Carvalho

Avaliação comparativa da espermatogênese de homens azoospérmicos em diferentes etiologias

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 parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Dr. Hélio Chiarini-Garcia

Coorientador: Dr. Augusto Barbosa Reis

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



**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE
FABÍOLA DE ARAÚJO RESENDE CARVALHO**

172/2017
entrada
1º/2013
2013669962

Às **quatorze horas** do dia **23 de fevereiro de 2017**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ESPERMATOGÊNESE EM HOMENS AZOOSPÉRMICOS DEVIDO A DIFERENTES ETIOLOGIAS**", 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
Dr. Augusto Barbosa Reis	UFMG	Aprovada
Dra. Paula Peixoto Campos	UFMG	Aprovada
Dr. Fernando Marcos dos Reis	UFMG	Aprovada
Dr. Sérgio da Matta	UFV	Aprovado
Dr. José Carlos Nogueira	UFMG	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: _____

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, 23 de fevereiro de 2017.**

Dr. Helio Chiarini-Garcia (Orientador) _____

Dr. Augusto Barbosa Reis (Co-orientador) _____

Dr^a. Paula Peixoto Campos _____

Dr. Fernando Marcos dos Reis _____

Dr. Sérgio da Matta _____

Dr. José Carlos Nogueira _____

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

Prof. Luciana de Oliveira Andrade
COORDENADORA DO PROGRAMA DE

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

As coletas das biópsias testiculares foram feitas no Ambulatório de Andrologia do Serviço de Urologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais pelo coorientador Prof. Dr. Augusto Barbosa Reis e pelo Dr. Reginaldo Martello.

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

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

“De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar...
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!”

Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida sendo presença constante em todos os momentos, iluminando e guiando meus passos e responsável por todas as bênçãos e conquistas da minha vida, inclusive esta.

Aos meus queridos pais, Cristina e Antônio Carlos que são meu porto seguro e meus exemplos de vida, amor, fé, caráter, honestidade e perseverança. Amo vocês! Obrigada por tudo!

A minha irmã Fernanda, pela cumplicidade, amor, apoio e por me encorajar a seguir em frente sempre. Você é especial na minha vida!

Ao meu marido Pedro Henrique, pelo amor, apoio e por não deixar eu desistir nunca. Com você ao meu lado foi menos árdua a conclusão deste trabalho. Você foi o maior presente de Deus que eu poderia ganhar. Amo vc!

Ao professor Dr. Hélio Chiarini Garcia, pela orientação, apoio, confiança, dedicação e ensinamentos. Que você continue sendo este exemplo de profissional para todos seus alunos.

Ao professor Dr. Augusto e Dr. Reginaldo Martello, pela ajuda na captação e coleta do material de estudo.

À professora Fernanda Almeida pelo carinho, colaboração e apoio durante estes anos.

Ao Professor Dr. Fernando Reis por participar da banca e pelo tempo dispensado na preciosa ajuda na análise estatística dos dados deste trabalho.

Aos demais membros da banca, professores Dr. Sérgio da Matta, Dra. Paula Peixoto e Paulo Guilherme, pelas correções e sugestões que certamente serão de grande valia para este trabalho.

À Universidade Federal de Minas Gerais pela brilhante contribuição na capacitação de novos profissionais.

Ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular pela seriedade dos seus trabalhos.

Aos professores, coordenadora e vice-coordenadora do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, pelo apoio e ensinamentos adquiridos durante o curso.

Às Agências financiadoras, FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro que possibilitaram a realização deste trabalho.

A secretária do programa de Pós-graduação em Biologia Celular, Rhuana, pela preocupação permanente com as documentações necessárias durante a realização do curso e por estar sempre disponível para solucionar qualquer problema durante o curso.

Aos queridos colegas do LABER e do programa de Pós- graduação pela amizade, colaboração, e apoio durante estes anos de convivência.

As amigas-irmãs, Andréia, Rafaela e Laura pela amizade e por estarem sempre presentes e me apoiando em todos os momentos de minha vida. Vocês são amigas para vida toda! Amo vocês!

Aos queridos amigos de Divinópolis que sempre torceram por mim.

A todos os meus familiares pelo amor e torcida constante.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente, me ajudaram na conquista de mais esta etapa importante de minha vida.

A todos vocês o meu carinho e MUITO OBRIGADA!!!

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Etiologia da azoospermia dos 25 pacientes utilizados no presente estudo bem como suas respectivas idades.

Tabela 2. Classificação histopatológica da espermatogênese adaptado de Levin (1970).

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

Tabela 4. Classificação histopatológica da espermatogênese (Bergmann e Kleich, 2010).

Tabela 5. Proporção volumétrica dos componentes tubulares e intertubulares em pacientes azoospérmicos com agenesia de deferente (AD), Orquiepididimite (OE), Varicocele (VA) e orquite por caxumba (OC).

Tabela 6. Número total de espermatogônias e índice de proliferação (mediana e interquartis) após marcação imunohistoquímica (MCM7) em pacientes azoospérmicos com agenesia de ducto deferente (AD), orquiepididimite (OE), varicocele (VA) e orquite por caxumba (OC).

Tabela 7. Medianas e quartis 1 e 3 (entre parênteses) do hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), testosterona e relação testosterona/LH em pacientes azoospérmicos com agenesia de ducto deferente (AD), orquiepididimite (OE), varicocele (VA) e orquite por caxumba (OC).

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografias de testículos de homens com agenesia de ducto deferente. Em A, uma visão panorâmica de corte transversal de túbulos seminíferos com e sem lúmen mostrando epitélio seminífero (Ep) com presença de todos os tipos de células germinativas. Em B e C, cortes transversais de túbulos seminíferos com ausência (B) e presença (C) de células germinativas livres no lúmen (Lu). P, paquíteno; Ar, espermátide arredondada; Tp, túnica própria; VS, vaso sanguíneo. Barras: A: 130 μ m; B: 65 μ m; C: 30 μ m.

Figura 2. Fotomicrografias de testículos de homens com orquiepididimite. Em A, notar a presença de ilhas de fibrose juntamente com túbulos seminíferos (TS) com epitélio germinativo completo. Em B, observar um túbulo seminífero com células livres no lúmen (TS) e outro totalmente fibrosado/hialinizado (TF). P, paquíteno; Ar, espermátide arredondada; Tp, túnica própria; VS, vaso sanguíneo. Barras: A: 150 μ m; B: 75 μ m.

Figura 3. Fotomicrografias de testículos de homens com varicocele mostrando a variabilidade morfológica do tecido testicular. Em A, corte de túbulos seminíferos parcialmente obliterados e com epitélio (Ep) completo. Em B, túbulos seminíferos com padrão *Sertoli-only* e no detalhe (Bi) notar túbulo com túnica própria (Tp) espessada. Em C, parênquima testicular com túbulos fibróticos (TF). S, célula de Sertoli; P, paquíteno; Ar, espermátide arredondada; Tp, túnica própria; L, células de Leydig; VS, vaso sanguíneo. Barras: A, B, C: 58 μ m.

Figura 4: Fotomicrografias de testículos de homens com orquite com caxumba. Em A, observa-se túbulos seminíferos com padrão *Sertoli-only* em conjunto com túbulos em degeneração fibrótica (1 a 4, do menor para o maior grau de degeneração). Em B, corte de túbulos seminíferos com epitélio seminífero completo (Ep) associados a túbulos fibróticos (TF). Em C, nota-se túnica própria (Tp) espessa em túbulo seminífero com célula germinativa. Em D, parênquima testicular com apenas túbulos fibróticos (TF). S, célula de Sertoli. Barras: A, B: 55 μ m; C, 54 μ m; D, 110 μ m.

Figura 5: Comparação de três padrões de escores em homens azoospermicos com agenesia bilateral do ducto deferente (AD), orquiepididimite (OE), varicocele (VA) e orquite por caxumba (OC).

Figura 6: Avaliação comparativa dos diâmetros em homens s azospérmicos com agenesia bilateral do ducto deferente (AD), orquiepididimite (OE), varicocele (VA) e orquite por caxumba (OC).

Figura 7: Avaliação comparativa da presença de túbulos com células germinativas, túbulos com apenas células de Sertoli e os fibrosados em homens azospérmicos com agenesia bilateral do ducto deferente (AD), orquiepididimite (OE), varicocele (VA) e orquite por caxumba (OC).

Figura 8: Avaliação comparativa das áreas de epitélio, túnica própria e lúmen em homens azospérmicos com agenesia bilateral do ducto deferente (AD), orquiepididimite (OE), varicocele (VA) e orquite por caxumba (OC).

Figura 9: Fotomicrografia de túbulos seminíferos de homens marcados com tricrômio de Gomori (A, C, E) e PAS (B, D, F) mostrando deposição de colágeno (coloração azul) e membrana basal (PAS + / coloração púrpura). A e B mostram túbulos seminíferos preservados com delgada túnica própria com pouca deposição de colágeno (A, CO) e membrana basal PAS + fortemente corada (B, seta). Em C e D, os túbulos só com células de Sertoli com túnica própria espessa com muito depósito de colágeno espesso (CO) e membrana basal PAS + fracamente corada (seta), respectivamente. Em E e F, mostrando um padrão de túbulos fibróticos com deposição total de colágeno (E, azul) e ausência de coloração com PAS (F). CM, célula mioide; S, célula de Sertoli; F, fibroblasto; VS, vaso sanguíneo. Barras: A-D, 10 µm e E-F, 40 µm.

Figura 10: Eletromicrografia comparando a túnica própria de pacientes com agenesia bilateral do ducto deferente - AD (A) e varicocele - VA (B) mostrando que enquanto a membrana basal (MB) é espessa e as fibras colágenas (FC) são poucas abaixo da MB na AD, MB é mais fina e abaixo dela existe um depósito extenso de FC. ES, epitélio seminífero; CM célula mioide; Seta, extensões citoplasmáticas de célula mioide. Barra: 1 µm.

LISTA DE ABREVIATURAS

µm - Micrômetro
AD - Agenesia de deferente
ADD - Agenesia de ducto deferente
Ar - Espermátide arredondada
CAP - Centro de aquisição e processamento de imagens
cGy - Centigray
CM - Célula mioide
cm - Centímetro
CO - Colágeno
COEP - Comitê de Ética e Pesquisa
CTE - Células tronco espermatogoniais
DAB – Diaminobenzidina
DNA - Ácido desoxirribonucleico
EP - Epitélio Seminífero
ES -Epitélio seminífero
F - Fibroblasto
FC -Fibras colágenas
FIV - Fertilização in vitro
FSH - Hormônios folículo estimulante
GNDF - Fator neurotrófico derivado de célula glial
GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofina
ICB - Instituto de Ciências Biológicas
ISCI - Injeção intracitoplasmática de espermatozoide
Ki67 - Antígeno Ki67
KIT - Receptor tirosina Kinase
KL - Ligante de KIT
LH - Hormônio Luteinizante
Lu - Lúmen
MB - Membrana basal
MCM10 - Minichromosome Maintenance Proteins 10
MCM2 - Minichromosome Maintenance Proteins 2
MCM7 - Minichromosome Maintenance Proteins 7
MET - Microscopia eletrônica de transmissão
mg - Miligrama
mL -Mililitro
mm - Milímetro
OC - Orquite por caxumba
OE - Orquiepididimite
OMS -Organização Mundial da Saúde
PAS - Ácido Periódico de Schiff
PBS – Phosphate buffered saline

pH - Potencial hidrogeniônico

PVPI - Polvidona-iodo

RNA -Ácido ribonucleico

S - Sertoli

T - Testosterona

TF - Túbulo fibrótico

TP -Túnica própria

TS - Túbulo seminífero

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

VA - Varicocele

VS - Vaso sanguíneo

Vv% - Proporção Volumétrica

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo Geral	5
2.2. Objetivos específicos	5
3. REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1. Infertilidade Masculina	6
3.2. Azoospermia e biópsia testicular	9
3.3. Etiologia das azoospermias em estudo	11
3.3.1. Agenesia de ducto deferente	11
3.3.2. Orquiepididimite	12
3.3.3. Varicocele	14
3.3.4. Orquite por caxumba	16
3.4. Espermatogênese no homem	18
3.5. Fatores que regulam o processo espermatogênico	20
3.6. Túnica própria e efeitos na espermatogênese	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Pacientes	25
4.2. Biópsia testicular	25
4.3. Processamento das biópsias testiculares	26
4.3.1. Processamentos para avaliações morfológicas e morfométricas	27
4.3.2. Processamento para avaliação ultraestrutural da túnica própria	27
4.3.3. Processamento para avaliações imunohistoquímicas e histoquímicas	27
4.4. Avaliações morfológicas e morfométricas	28
4.4.1. Morfologia	28
4.4.2. Morfometria	28
a) <i>Escores histopatológicos da espermatogênese</i>	29
b) <i>Diâmetro tubular</i>	32
c) <i>Avaliação da percentagem de túbulos seminíferos considerando a célula germinativa mais avançada</i>	33
d) <i>Cálculo das áreas de epitélio seminífero, túnica própria e lúmen</i>	33

e) <i>Proporções volumétricas (Vv%)</i>	33
4.5. Avaliação Imunohistoquímica.....	34
4.6. Avaliação Hormonal	35
4.7. Estatística	35
5. RESULTADOS	36
5.1. Morfologia testicular	36
5.1.1. <i>Agenesia de ducto deferente</i>	36
5.1.2. <i>Orquiepididimite</i>	36
5.1.3. <i>Varicocele</i>	39
5.1.4. <i>Orquite por caxumba</i>	39
5.2. Escores histopatológicos da espermatogênese	42
5.3. Parâmetros tubulares	42
5.3.1. <i>Diâmetro tubular</i>	42
5.3.2. <i>Avaliação da percentagem de túbulos seminíferos considerando a célula germinativa mais avançada</i>	43
5.3.3. <i>Áreas de epitélio seminífero, túnica própria e lúmen</i>	43
5.3.4. <i>Proporções volumétricas (Vv%)</i>	44
5.4. Avaliação da túnica própria.....	45
5.5. Avaliação da proliferação espermatogonial.....	48
5.6. Avaliação hormonal.....	48
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÕES	56
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	57
9. ANEXOS	69
Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	69
Anexo 2 – Aprovação pelo Comitê de Ética.....	71

Resumo

Os conhecimentos atuais sobre as causas da azoospermia estão focados principalmente em observações clínicas, sem indicações precisas de quais componentes germinativos e/ou somáticos do parênquima testicular estão sendo afetados. No presente estudo, comparamos o processo espermatogênico das causas mais comuns de azoospermia, denominadas agenesia congênita bilateral do ducto deferente (AD), orquiepididimite (OE), varicocele (VA) e orquite devido à caxumba (OC), utilizando abordagens morfofuncionais em biópsias testiculares coletas, processadas e analisadas de forma controlada. Observou-se que o parênquima testicular dos pacientes com AD e OE (azoospermia obstrutiva) não apresentaram alterações significativas, enquanto nos pacientes com VA e OC (azoospermia não obstrutiva), o comprometimento foi grave, mostrando grande quantidade de túbulos seminíferos fibrosados e com aplasia de células germinativas. A população de espermatogônias foi significativamente reduzida em pacientes com VA e OC, apesar de manter baixa capacidade proliferativa. Além disso, os níveis de FSH e LH plasmáticos aumentaram em pacientes com VA e OC, demonstrando comprometimento funcional das células de Sertoli e Leydig. Apesar desses danos, a manutenção da capacidade de proliferação espermatogonial nestes pacientes com VA e OC mantém a possibilidade de que esses pacientes possam ser pais biológicos com a possibilidade de cultivo das espermatogônias, com obtenção de espermatozoides *in vitro* para aplicação em reprodução assistida.

Abstract

The current knowledge on the causes of azoospermia is mainly focused on clinical assessments, with no indication of which germ and/or somatic components of the testicular parenchyma are compromised. In the present study, we compared the spermatogenic process of men affected by four different common etiologies that lead to azoospermia: congenital bilateral agenesis of vas deferens (AD); orchiepididymitis (OE); varicocele (VA) and mumps orchitis (MO), through the use of morphofunctional approaches in a controlled sample collection. The testicular parenchyma from AD and OE patients did not show major spermatogenic alterations, while in VA and MO patients the impairment was severe, showing a large amount of fibrotic and Sertoli cell-only tubules. The spermatogonial population was significantly reduced in VA and MO patients, even though their proliferative capacity was retained. Furthermore, plasma FSH and LH levels increased in VA and MO patients, suggesting Sertoli and Leydig cells impairments. Despite these damages, the preservation of spermatogonial proliferation in patients with VA and MO raises the possibility of these patients becoming biological parents through assisted reproduction.

1. Introdução

Sabe-se que aproximadamente metade das causas da infertilidade entre casais ocorre devido ao fator masculino. Muitas condições clínicas podem causar esta infertilidade por induzir alterações morfofuncionais em diferentes partes do sistema reprodutivo, o que pode afetar a quantidade de espermatozoides produzidos. Essas condições podem incluir malformações congênitas, exposições toxicológicas, distúrbios genéticos, distúrbios endócrinos e doenças infecciosas e/ou inflamatórias (Bachir e Jarvi, 2014; Neto et al., 2016).

Em qualquer caso, se o espermatozoide estiver ausente do ejaculado, os pacientes são considerados azoospermicos. Azoospermia pode estar relacionada com a obstrução do trato genital, evitando a passagem dos espermatozoides para o ejaculado ou, devido a um efeito não-obstrutivo relacionado a doenças genéticas ou externas que causam expressivo prejuízo da espermatogênese (McLachlan, 2007).

Várias etiologias estão relacionadas à azoospermia obstrutiva e não-obstrutiva, sendo quatro delas frequentes. As azoospermias obstrutivas mais comuns estão associadas com (i) agenesia bilateral do vaso deferente (AD) (Okada, 1999) e (ii) orquiepididimite (OE), que está relacionada a processo inflamatório do testículo/epidídimo causada por bactérias (Bachir e Jarvi, 2014). As azoospermias mais comuns associadas a causas não-obstrutivas são (iii) a varicocele (VA), que compromete a espermatogênese devido ao aumento da temperatura testicular causada por defeito vascular (Saleh et al., 2010) e (iv) à orquite devido à caxumba (MO), consequência da inflamação testicular causada por vírus (Yung et al., 2011).

A expressiva maioria dos estudos envolvendo patologias que causam a azoospermia é focada principalmente em avaliações clínicas (Gorelick e Goldstein, 1993; Daudin et al., 2000; Papatsoris et al., 2002; Davis et al., 2010). Entretanto, ainda são escassos os dados referentes aos componentes do parênquima testicular, como cinética das células somática e germinativas ao longo do processo espermatogênico, que são afetados pelos diferentes processos patológicos do homem azoospermico.

De fato, existem poucos estudos na literatura com o objetivo de compreender mais especificamente as características morfofuncionais e morfométricas dos testículos de pacientes azoospermicos, após diferentes fatores etiológicos (Steger et al., 1998; Maymon et al., 2002; Bar-

Shira Maymon et al., 2003; Hentrich et al., 2011). Atualmente, o que sabemos sobre os aspectos morfológicos e funcionais dos homens inférteis é uma coleção de achados provenientes de estudos de vários grupos de pesquisa utilizando diferentes procedimentos de processamento metodológico e de diversas populações, principalmente relacionadas à azoospermia obstrutiva e não obstrutiva, que, em algumas situações, são contraditórios.

Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar, de forma comparativa, parâmetros morfológicos, morfométricos e funcionais dos testículos de pacientes azoospermicos da mesma população, afetada por quatro condições etiológicas bem definidas (AD, OE, VA e MO). Biópsias testiculares foram obtidas e avaliadas pelos mesmos pesquisadores seguindo os mesmos procedimentos para coleta das amostras, processamento e anlises histopatológicas.

Acreditamos que os resultados obtidos possam auxiliar no diagnóstico patológico mais assertivo das causas da azoospermia, permitindo a escolha de tratamentos mais adequados de forma diferenciada entre as diferentes etiologias.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar, de forma comparativa, os parâmetros morfológicos, morfométricos e funcionais dos testículos de pacientes azoospermicos da mesma população afetada por quatro condições etiológicas bem definidas, tais como agenesia de ducto deferente (AD), orquiepididimite (OE), varicocele (VA) e orquite por caxumba (OC).

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a morfologia das células somáticas e germinativas sob as microscopias de luz procurando correlacionar possíveis alterações celulares, sob as diferentes condições patológicas;
- Determinar os escores histopatológicos da espermatogênese, conforme avaliado pela anatomia patológica;
- Avaliar parâmetros tubulares (diâmetro e área) do testículo de homens azoospermicos;
- Determinar a proporção volumétrica de componentes celulares e teciduais dos túbulos seminíferos e interstício testiculares;
- Avaliar a túnica própria dos túbulos seminíferos sob a microscopia de luz e eletrônica de transmissão;
- Avaliar através de estudo imunohistoquímico a capacidade de proliferação espermatogonial (MCM-7);
- Avaliar o perfil hormonal destes pacientes, (testosterona, hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante).

3. Revisão de Literatura

3.1. Infertilidade masculina

Infertilidade pode ser definida como a incapacidade de um casal sexualmente ativo, sem a utilização de métodos contraceptivos, de estabelecer gravidez dentro de um ano, período no qual por volta de 90% dos casais o fazem. Trata-se de um fenômeno universal que atinge de 8 a 15% dos casais, independente dos fatores socioeconômicos ou culturais (Who, 1999).

Classifica-se ainda o termo infertilidade primária se presente em um casal que nunca conseguiu gestar. Em quase um terço destes casais, a causa da infertilidade se deve exclusivamente ao fator masculino e em até 20% dos casos a infertilidade é resultado de uma associação entre fator masculino e fator feminino. Portanto o fator masculino é responsável direta e indiretamente por aproximadamente 50% da dificuldade de gestação nos casais inférteis (Kim e Lipshultz, 1999; Speroff, 1999).

Estima-se que cerca de 7% de todos os homens enfrentam problemas relacionados à reprodução. Uma cuidadosa e meticulosa avaliação da história clínica do paciente com infertilidade é de importância relevante na constatação da etiologia da infertilidade masculina, porque, por meio dela, pode se ter um diagnóstico presuntivo das causas em até um quarto dos casos (Turek, 2005; Shefi e Turek, 2006).

São descritas várias causas de infertilidade masculina tais como: disfunções de ereção peniana, varicocele, disfunções endócrinas, trauma, infecções, alterações imunológicas e genéticas (Neto et al., 2016).

Em estudo da distribuição geográfica da infertilidade masculina no estado de Minas Gerais (Taitson, 2007), feita a partir de um banco de dados de 12.074 homens inférteis, a infertilidade foi classificada em 16 etiologias. O tempo de infertilidade variou de 2,1 anos a 16,4 anos, com média de 6,7 anos. A idade dos indivíduos variou de 21 a 50 anos. A incidência de varicocele, infecções das glândulas sexuais acessórias, inadequação sexual/ejaculatória, anormalidades congênitas, anormalidades genéticas, fator imunológico, anormalidades do plasma seminal (fator isolado), causas

iatrogênicas, azoospermia obstrutiva e outras etiologias, não apresentaram diferenças significativas quando comparadas aos achados da Organização Mundial de Saúde (OMS).

Por outro lado, diferenças significativas foram observadas nas etiologias de causas sistêmicas, causas endócrinas e idiopáticas com sinais de disfunção como: teratozoospermia, oligospermia, astenozoospermia e necrozoospermia. As três primeiras etiologias - sistêmicas, endócrinas e idiopáticas com teratozoospermia - foram as que apresentaram as maiores discrepâncias na comparação com os dados da OMS. Belo Horizonte, com 3.200 relatos, foi o município com o maior número de casos de infertilidade (Taitson, 2007).

As causas da infertilidade masculina podem estar vinculadas a alterações em vários níveis no sistema genital masculino. Os testículos, as vias seminais e as glândulas anexas, bem como estruturas centrais como o hipotálamo e hipófise, podem sofrer danos e serem os responsáveis pela diminuição da fertilidade. Outras causas, como fatores ambientais, hábito de vida e medicamentos podem ser fatores determinantes (Sigman e Howards, 1998).

Pode também ser considerado como causa da infertilidade o desenvolvimento puberal, tanto a puberdade precoce, tal como a hiperplasia adrenal congênita, quanto o retardo do desenvolvimento puberal, como quadros de hipogonadismo idiopático, podendo resultar em alterações anatômicas estruturais com potencial para alterar a fertilidade (Werner, 1950; Smith e Bremmer, 1998; Schmidt, 2001; Tincani, et al., 2012).

Exposição a agentes externos também causam efeitos danosos na espermatogênese. O álcool em excesso produz alterações na esteroidogênese que podem resultar na redução da produção de espermatozoides (Baker, 1994). Estudos clínicos em homens mostraram a associação entre hábito tabágico e diminuição da densidade do esperma, mobilidade e aumento de alterações morfológicas nos espermatozoides (Coelho et al., 2009).

Algumas substâncias químicas podem causar infertilidade, tais como esteroides anabolizantes, que levam à diminuição da testosterona; a cimetidina, um antagonista dos receptores histamínicos que atua diretamente no eixo hipotalâmico-hipofisário como agente antiandrogênico; maconha e a cocaína, que são gonadotóxicos; a

exposição a organofosfatos e organoclorinas, herbicidas e fungicidas, como o dibromocloropropano, podem levar a quadros de infertilidade. A exposição à radiação também é lesiva à espermatogênese, sendo que doses acima de 6 centigray (cGy) podem causar infertilidade e doses acima de 200 cGy, pode levar à azoospermia permanente (Heikens et al., 1996).

Cerca de 3% dos casos de infertilidade são causados por endocrinopatias e densidades espermáticas inferiores a cinco milhões podem estar associadas ao fator endócrino (Augarten, 1991). As concentrações séricas do hormônio folículo estimulante (FSH) refletem o estado do epitélio germinativo, ou seja, o grau de espermatogênese. Níveis baixos de FSH podem apontar para deficiências hipotalâmicas ou hipofisárias (Schlatt e Ehmcke, 2014).

Existe atualmente um aumento no diagnóstico de anormalidades genéticas, as quais também estão sendo identificadas como uma das causadoras de infertilidade masculina. Os três fatores genéticos mais frequentemente relacionados à infertilidade masculina são: aberrações cromossômicas, mutações gênicas e microdeleções do cromossomo Y. Na população de homens inférteis, a incidência de alterações cromossômicas varia de 6 a 7%, aumentando à medida que diminui a concentração espermática (cerca de 16% nos homens azoospérmicos) (Carrara et al., 2006).

A síndrome de Klinefelter (47,XXY) é a mais freqüente das alterações cromossômicas entre os homens inférteis, atingindo 7 a 13% dos azoospérmicos, podendo haver indivíduos com esta síndrome e cariótipo em mosaico (46,XY/47,XXY e outros), com graus variáveis de comprometimento da espermatogênese (Carrara et al., 2006).

Cerca de 10% dos casos de infertilidade parecem apresentar todo o sistema genital sem problemas, mas mesmo assim são inférteis. Em muitos casos, existem anomalias moleculares dos espermatozoides. As anomalias nos espermatozoides podem causar incapacidade de fecundação, parada do desenvolvimento embrionário, perda da qualidade embrionária, falhas da implantação, abortamentos de repetição ou fetos com anomalias estruturais (Sousa et al., 2005).

Todos os fatores acima expostos podem afetar a produção espermática, chegando a casos extremos de ausência de espermatozoides no ejaculado, condição denominada azoospermia.

3.2. Azoospermia e biópsia testicular

A azoospermia caracteriza-se pela ausência de espermatozoides no ejaculado, confirmada no mínimo em dois espermogramas.

Encontram-se três formas correntes de classificação das azoospermias na literatura: (1) azoospermia secretora ou excretora (Pomerol e Arrondo, 1994; Martello e Camargos, 2001); (2) azoospermia pré-testicular, testicular e pós-testicular (Kim e Lipshultz, 1999; Neves, 2002) e (3) azoospermia obstrutiva ou não obstrutiva (Schlegel e Girardi, 1997; Silber, 2000, Glina et al., 2005; Pühse et al., 2011). Consideram-se como indivíduos com azoospermia obstrutiva homens (1) pós-vasectomizados, (2) portadores de agenesia bilateral dos ductos deferentes e (3) aqueles com obstrução dos ductos ejaculadores. Estes homens apresentam espermatogênese normal e lesão adquirida ou congênita, o que impede os espermatozoides produzidos alcançarem o ejaculado.

Na presença de obstrução a espermatogênese está geralmente preservada (Pühse et al., 2011) e encontram-se espermatozoides com qualidade e quantidade adequadas, quando recuperados do epidídimo e do testículo, para realização de fertilização *in vitro* com injeção intracitoplasmática de espermatozoides.

Para os homens com azoospermia não obstrutiva, a mais descrita na literatura atual, têm sido descritos pelo menos três padrões de produção alterada de espermatozoides a partir de biópsias testiculares: (1) agenesia de células germinativas, (2) parada de maturação e (3) hipoespermatogênese (Reis et al., 2010).

O diagnóstico definitivo da azoospermia não obstrutiva requer a realização da biópsia testicular, que também se torna importante para o diagnóstico de carcinoma *in situ* de células germinativas, tumor mais comum em homens com infertilidade (Jungwirth et al., 2012).

Segundo estudo retrospectivo de Abdel Raheem (2012), o diagnóstico histopatológico é o que apresenta a melhor correlação com a chance de identificação de espermatozoides na biópsia testicular no grupo de homens azoospermicos não obstrutivos, com melhora das chances de sucesso no tratamento destes pacientes, por meio da fertilização *in vitro* (FIV), com injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ISCI), oferecendo-lhes assim a possibilidade de tornarem-se pais biológicos. No

entanto, a possibilidade de se isolar estes espermatozoides depende da identificação morfológica precisa dos mesmos no testículo.

A biópsia testicular é um procedimento de rotina na investigação de pacientes azoospermicos. Pode ter finalidade prognóstica ou terapêutica (Pomerol e Arrondo, 1994; Glina et al., 2005).

O estudo anatomopatológico da biópsia testicular consiste:

a) na avaliação quantitativa do parênquima testicular representado pelo epitélio seminífero, determinando os estágios de evolução e as alterações marcantes no desenvolvimento das células germinativas;

b) no estudo qualitativo para documentação da morfologia das células da linhagem germinativa e outros componentes (células de Sertoli, células mioídes, células intersticiais, etc.)(Giagulli e Vermeulen, 1988), que pode também correlacionar o número de espermátides alongadas em uma área de secção histológica com o número de espermatozoides no ejaculado para avaliação da patência dos ductos excretorios (ductos eferentes, epidídimo e ducto deferente) - (Schlegel et al., 1997, Silber et al., 2000).

Portanto, a avaliação histopatológica realizada por meio de biópsias testiculares é sem dúvida importante para auxiliar no diagnóstico das causas da azoospermia não obstrutiva, diagnosticando o problema e permitindo a ação de condutas médicas que tornem estes homens pais biológicos (Glina et al., 2005).

O valor diagnóstico da biópsia testicular pode ser diminuído por fatores como manuseio inadequado dos fragmentos e pela interpretação incorreta por patologistas que não sejam totalmente familiarizados com a histopatologia do trato reprodutivo (Cooperberg, et al., 2005).

A padronização da fixação, inclusão e coloração das biópsias testiculares são fundamentais (McLachlan, 2007). Ao analisar os mais variados métodos de preparação histológica na avaliação da morfologia do testículo humano, com o intuito de auxiliar no diagnóstico clínico mais acurado das causas da infertilidade masculina, verificou-se que o tecido testicular fixado em glutaraldeído e incluído em glicol metacrilato, por apresentar melhor resolução e preservação citológica, proporciona diagnóstico histopatológico mais seguro quando comparado ao diagnóstico obtido com o método clássico de fixação em Bouin e inclusão em parafina. Desta forma,

sugere-se que esta técnica (fixação em glutaraldeído e inclusão em glicol metacrilato) deve ser indicada para pacientes que realizam biópsia testicular com a finalidade de definir se a causa da azoospermia é obstrutiva ou não obstrutiva (Reis, 2012; Chiarini-Garcia et al., 2017).

As quatro mais comuns etiologias conhecidas de azoospermia, duas delas obstrutivas (agenesia bilateral do ducto deferente e orquiepididimite) e duas não obstrutivas (varicocele e orquite por caxumba) foram avaliadas neste estudo.

3.3. Etiologia das azoospermias em estudo

3.3.1. Agenesia de ducto deferente (AD)

É geralmente assumido que a azoospermia e infertilidade em homens com ADD são devidas simplesmente à obstrução do sistema genital masculino e que a produção de espermatozoide é normal. Entretanto, em alguns trabalhos, há evidências que esta afirmativa pode não ser válida.

Okada et al. (1999) observaram que a espermatogênese não era significativamente afetada num grupo de 10 homens com ADD, avaliados através de biópsias testiculares. Porém, três destes homens apresentaram hipoespermatogênese demonstrada por baixo score de Johnsen, numa análise histopatológica do parênquima testicular. Em outros estudos foi reportada espermatogênese normal em sete homens, enquanto em dois outros também observou-se hipoespermatogênese em análise das biópsias testiculares (Goldstein e Schlossberg 1988).

Em estudo realizado por Meng et al. (2001), com 55 homens com ADD, 50% destes apresentavam espermatogênese normal. No restante, foram observadas alterações morfológicas, tais como: parada de maturação tardia, hipoespermatogênese e tecido testicular com padrão *Sertoli-only*.

Outro estudo em que foram avaliadas diferenças entre as biópsias de homens que passaram por vasectomia, um tipo de azoospermia obstrutiva (AO), e homens férteis, observou-se que aqueles com AO apresentavam no parênquima testicular menor quantidade de espermátides em comparação com o observado em homens férteis (McVicar et al., 2005).

De acordo com estes trabalhos citados acima, a maioria dos homens azoospérmicos com agenesia bilateral de ducto deferente possuem alterações brandas no processo espermato gênico. Apesar disso, estes pacientes têm sido utilizados como controle em diversos estudos sobre histopatologia do testículo humano.

3.3.2. Orquiepididimite (OE)

A orquiepididimite consiste em um processo inflamatório do testículo (orquite) e do epidídimo (epididimite). Esta condição corresponde a 15% dos casos de infertilidade masculina (Bachir e Jarvi, 2014). A epididimite é bem mais comum do que a orquite, e, na maioria dos casos, os dois fenômenos estão associados (Kaver, et al., 1990; Kadish e Bolte, 1998).

Embora a epididimite seja conhecidamente causada por químicos oriundos de refluxo de urina, um estudo publicado em 1979 mostrou que bactérias foram responsáveis pela maioria dos casos infecciosos (Berger et al., 1979). Este estudo também mostrou que o tipo de bactéria varia com a idade do paciente.

Em homens de 14 a 35 anos é mais comumente transmitida sexualmente por infecção com *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*; em homens mais novos que 14 anos ou com mais de 35 anos é geralmente causada por patógenos existentes no sistema urinário tal como *Escherichia coli*. Outras formas menos comuns de adquirir bactérias que podem causar este processo inflamatório são prática de sexo anal, por infecções secundárias ou até mesmo por anormalidades anatômicas (Kadish e Bolte 1998; Luzzi e O'Brien 2001; Trojian et al., 2009; Phillips et al., 2010; Hedger, 2011; Bachir e Jarvi 2014; Cornu e Bruyere 2015; Woldenberg et al., 2015).

O processo inflamatório pode ser agudo ou crônico. Embora a inflamação crônica ocorra geralmente após um insulto sintomático agudo, a mesma pode ocorrer no tecido sem um histórico conhecido de injúria ou insulto. Um processo inflamatório crônico no sistema reprodutor masculino é preocupante, visto que ao avaliar espécimes de tecido testicular de homens inférteis assintomáticos, observa-se infiltrado leucocitário em mais de 50% do material analisado (Schuppe, et al., 2008).

O impacto na fertilidade de algum processo inflamatório no sistema reprodutor masculino depende de muitos fatores, incluindo a natureza crônica ou aguda da doença e o tipo de patógeno invasor (Bachir e Jarvi, 2014). Sendo assim, um

processo inflamatório pode levar a disfunções no sistema reprodutor masculino e até mesmo a obstruções.

Dentre as alterações que podemos citar é a deficiência no processo espermatogênico e diminuição dos níveis plasmáticos de testosterona e hormônio luteinizante afetando o processo espermatogênico e esteroidogênico. Algumas citocinas liberadas no processo inflamatório (TNF- α e IL-1 α) levam à inibição da esteroidogênese pela célula de Leydig. Além disso, parece que o efeito da inflamação na espermatogênese é célula específica, já que espermátócitos e espermátides são afetadas, enquanto as espermatogônias são poupadas (Liew, et al., 2007).

O estresse oxidativo causado pelo processo inflamatório pode levar a danos significativos na membrana celular do espermatozoide e à redução da motilidade interferindo no processo de fertilização. Sendo assim, condições infecciosas e inflamatórias, como a orquitepididimite, podem levar a infertilidade devido a danos nos órgãos do trato reprodutor masculino afetando sua função ou alterando a produção e liberação de secreções requeridas para suportar a função espermática, como também devido a cicatrizes no delicado sistema de ductos e consequente obstrução anatômica, podendo levar a diminuição de volume de ejaculado e fertilidade diminuída (Weidner, et al., 1999; Dohle, 2003).

Vários estudos demonstram alterações na fertilidade em homens que apresentaram algum processo inflamatório tanto no epidídimo quanto no testículo, demonstrada através de análise seminal, estrutural e histopatológica (Weidner, et al., 1991; Krieger, et al., 1996; Pasqualotto, et al., 2000; Menkveld, et al., 2003; Nistal, et al., 2004; Nickel, et al., 2005; Ochsendorf, 2008; Val-Bernal, et al., 2010; Ruzs, et al., 2012; Domes, et al., 2012; Durglishvili e Galdava, 2013; Pilatz, 2013; Lang et al., 2013; Bachir e Jarvi, 2014; Pilatz, et al., 2014; Picard-Hagen, et al., 2015).

A azoospermia foi diagnosticada em quase 40% dos casos de orquitepididimite e a infertilidade foi observada em 56% dos homens avaliados (Bostrom & Andersson, 1971)

Em alguns modelos animais, a indução de processo inflamatório causa alterações significativas no testículo e epidídimo que comprometem a fertilidade. Algumas alterações histomorfológicas encontradas no tecido testicular de animais com instalação de processo inflamatório de natureza aguda e crônica foram:

desprendimento de células germinativas, presença de células inflamatórias no ambiente basal do túbulo seminífero, células inflamatórias no interstício, túbulos com diâmetros diminuídos, túbulos atróficos em lesão focal, fibrose intersticial, hialinização de túbulos e ausência de células de Leydig na lesão focal (Noguchi et al., 2013; Lu, et al., 2013; Śliwa, et al., 2014; Pilatz, et al., 2015).

3.3.3. Varicocele (VA)

A varicocele é a causa tratável mais comum de infertilidade masculina, sendo encontrada em 19 a 41% de homens inférteis. Consiste em dilatação anormal ou tortuosidade das veias do plexo pampiniforme testicular que drenam o sangue dos testículos.

A incidência de varicocele na população masculina é de aproximadamente 25% nos homens que apresentam qualquer alteração seminal e 11% nos homens com análise seminal normal (Masson e Brannigan, 2014). Na população de homens com infertilidade primária é de 35% – 40%, enquanto nos homens com infertilidade secundária este número sobe para 70% – 80%, evidenciando o caráter progressivo da lesão (Naughton et al., 2001; Neto et al., 2016).

A varicocele é encontrada mais comumente do lado esquerdo, embora haja grande variação entre a prevalência reportada de varicocele bilateral que varia de 30 a 80% (Gat, et al., 2004). A incidência maior de varicocele no lado esquerdo se dá por três motivos: (1) posição ortostática, (2) inserção da veia testicular esquerda em ângulo reto com a veia renal, (3) maior pressão intravascular na veia gonadal esquerda (Masson e Brannigan, 2014).

A varicocele é uma patologia considerada multifatorial. Os fatores incluem: a) diferenças anatômicas na drenagem venosa nos lados direito e esquerdo, sendo que neste último a veia testicular se insere na veia renal, resultando em maior pressão hidrostática a qual é transmitida ao plexo pampiniforme e b) ausência ou incompetência de válvulas venosas, resultando em refluxo do sangue venoso (Masson e Brannigan, 2014).

Braedel et al. (1994) em estudo do padrão venográfico de 659 homens com varicocele mostrou que 73% deles não tinham essas válvulas. Uma terceira teoria

aceita, ainda para explicar a ocorrência de varicocele, é a obstrução da veia espermática esquerda através da compressão da veia renal esquerda entre a aorta e a artéria mesentérica superior - efeito conhecido como "*nutcracker*" (Masson e Brannigan, 2014). Apesar de haver homens com varicocele que são férteis, esta patologia pode causar um declínio progressivo na fertilidade do indivíduo, podendo levar à infertilidade total.

Dentro da fisiopatologia da varicocele, podemos dizer que insultos e estresse ambientais, associados à predisposição genética, podem causar uma deficiência anatômica que leva a dilatação do plexo pampiniforme. Esta alteração pode levar a efeitos deletérios progressivos, tais como: alteração de fluxo sanguíneo, aumento de temperatura, estresse oxidativo e refluxo de metabólitos gonadotóxicos. Todas estas alterações podem provocar diminuição dos níveis de testosterona e desordem no processo espermatogênico, levando a alterações macroscópicas (atrofia testicular) e microscópicas (diminuição da qualidade espermática, alterações estruturais das células de Sertoli, espessamento da membrana basal, atrofia/ hiperplasia das células de Leydig, parada na maturação das células germinativas e espessamento luminal de vênulas/capilares) (Will et al., 2011).

A varicocele pode se apresentar em três graus diferentes, com base nos achados do exame físico. Varicoceles clínicas são definidas como aquelas que são palpáveis no exame físico e apenas estas têm sido associadas com infertilidade. Esta classificação quanto ao grau de varicocele tem correlação com os resultados pós-tratamento, ou seja, quanto maior o grau de varicocele, menor é a chance de sucesso na obtenção de gravidez, pós tratamento (Masson e Brannigan, 2014).

Porém, não existe consenso até então, de que o grau esteja diretamente relacionado ao padrão do sêmen e taxas de gravidez em pacientes inférteis (Masson e Brannigan, 2014). Estudos sugerem que existe boa correlação entre o escore de Johnsen de biópsias testiculares de homens inférteis com varicocele e contagem total de espermatozóides no ejaculado (Johnsen e Agger, 1978; Abdelrahim et al., 1993; Benoff e Gilbert, 2001;). Existem trabalhos que relatam uma melhora na contagem e motilidade espermática ao comparar biópsias de indivíduos com varicocele antes e

pós-cirurgia, além também de alterações histológicas no tecido testicular (Tulloch 1955; Abdelrahim et al., 1993; Jarow, 2001; Kadiogluet al., 2001; Evers e Collins, 2003; Pasqualotto et al., 2006; Lee et al., 2009; Will et al., 2011; Inci e Gunay, 2013; Masson e Brannigan, 2014; Coban et al., 2015; Cil et al., 2015; Ahmed et al., 2015).

Saleh et al. (2010) avaliaram biópsias de 37 homens azoospérmicos os quais foram divididos histopatologicamente em três grupos: com espermatogênese completa, com parada de maturação e com apenas células de Sertoli (padrão *Sertoli-only*). Verificou-se que a varicocele pode resultar numa deterioração progressiva das células de Sertoli, levando a liberação de espermatozoides imaturos e que o tamanho testicular, naqueles homens com espermatogênese completa é maior que nos outros padrões. O grau da varicocele não foi significativamente correlacionado com os padrões histopatológicos encontrados no estudo.

Outros estudos sugerem que a varicocele esteja associada com progressiva esclerose da lâmina basal. Um estudo imunohistoquímico e de microscopia eletrônica revelou perda de laminina e de colágeno tipo IV na lâmina basal em túbulos seminíferos de testículos de adolescentes com varicocele (Santoro et al., 2000).

Muitos estudos ainda relatam possíveis alterações moleculares nos espermatozoides e semên, tais como diminuição da motilidade e viabilidade espermática, além de severo dano no DNA do espermatozoide, que podem ocorrer em indivíduos com varicocele e que devem ser consideradas para avaliar a fertilidade do indivíduo. (Abd-Elmoaty et al., 2010; Agarwal et al., 2015a,b; Aquila et al., 2015; Mostafa et al., 2015; Razi e Malekinejad, 2015; Blevrakis et al., 2016).

3.3.4. Orquite por caxumba (OC)

A caxumba, também conhecida como papeira ou parotidite, é uma doença viral comum na infância e é caracterizada por edema da glândula parótida. A doença pode ser prevenida por vacina, que é quase universalmente usada em países desenvolvidos hoje em dia.

Comparado com outras doenças imunopreveníveis comuns, tais como o sarampo e tosse convulsiva, a caxumba é a mais benigna. O agente causador da caxumba é um vírus de RNA encapsulado pertencente ao gênero *Rubulavirus* e da

família *Paramixoviridae*. A caxumba é uma infecção de moderada a altamente contagiosa, limitada a seres humanos, e sua transmissão se dá por contato direto com gotículas de saliva, ou perdigotos contaminados. O período de incubação é de cerca de 20 a 24 dias (Hviid et al., 2008).

O vírus da caxumba tem afinidade com o epitélio glandular. A replicação viral na glândula parótida inclui o epitélio ductal conduzindo ao edema intersticial periductal e inflamação local, com infiltrado de linfócitos e macrófagos (Weller e Craig, 1949).

Uma imagem microscópica semelhante pode ser vista em pancreatite e orquite causadas pelo vírus da caxumba, podendo ocorrer uma hemorragia do interstício testicular (Feldstein et al., 1974). Levando em consideração que a túnica albugínea é inelástica, o aumento da pressão causada pelo edema pode levar a necrose e atrofia do epitélio germinativo, hialinização dos túbulos seminíferos e ocasionalmente o padrão *Sertoli-Only* (Wang et al., 2013), além de atrofia subsequente dos testículos (Gall, 1947; Bjorvatn, 1973; Manson, 1990; Jalal et al., 2004; Philip et al., 2006; Hviid et al., 2008).

Considerando as alterações no sistema reprodutor masculino causadas pelo *Paramixovirus*, os casos de epididimite e orquite surgem em 15-30% dos homens adultos que tiveram caxumba, sendo raro na puberdade (Candel, 1951; Bartak, 1973; Davis et al., 2010). Nos casos de orquite, ambos os testículos são afetados (Beard et al., 1977). A orquite manifesta-se geralmente 4-8 dias após a parotidite. O curso clínico começa com abrupto inchaço, calor que afeta o testículo, e inflamação do escroto. Epididimite está presente na maioria dos casos (Wharton et al., 2006).

Existe grande preocupação sobre as potenciais consequências da caxumba na fertilidade em homens. Algum grau de redução do tamanho testicular pode ser visto em metade dos pacientes afetados, além de anormalidades nos espermogramas (contagem, morfologia e motilidade espermática) encontradas em até 25% dos pacientes (Bartak, 1973; Lin et al., 1999).

A influência endócrina da caxumba nos testículos é ainda controversa. Em estudos feitos por Erpenbach (1991) e Le et al. (2003), observou-se diminuição na

concentração de testosterona e aumento de FSH, enquanto em outros estudos nenhuma alteração hormonal foi detectada (Ku et al., 1999).

Estudos para avaliar o efeito da orquite por caxumba na função endócrina são dificultados devido ao pequeno tamanho das amostras (Werner, 1950). Não há evidência para associação entre orquite por caxumba e risco de câncer testicular (Kaufman e Bruce, 1963; Hviid et al., 2008).

3.4. Espermatogênese no homem

Para avaliar os efeitos danosos de diferentes patologias sobre a morfologia testicular é importante que se entenda como funciona o processo espermatogênico no homem normal e como este processo é regulado.

A produção de espermatozoides maduros e funcionais depende de um processo complexo que envolve fatores moleculares e uma perfeita interação celular. Qualquer alteração no arcabouço de células e na interação entre elas altera sua funcionalidade, comprometendo a fertilidade masculina nos mais variados graus.

A espermatogênese é um processo complexo pelo qual as células-tronco se dividem, seja para se autorrenovar ou para produzir células filhas que se transformam em espermatozoides. Esse processo ocorre no interior dos túbulos seminíferos, sendo que no homem, o epitélio seminífero corresponde a até 80% do volume testicular (Turek, 2005).

Os túbulos seminíferos são revestidos pelas células de Sertoli que se apoiam na membrana basal e se estendem para dentro do seu lúmen. Estas células são unidas por junções estreitas, designadas de junções de oclusão, que dividem o epitélio seminífero nos ambientes basal e adluminal (Russell e Griswold, 1993; França e Chiarini-Garcia, 2005;). Esta divisão espacial nos túbulos seminíferos forma a base para a estrutura da barreira de células de Sertoli, possibilitando que a espermatogênese ocorra em um local imunologicamente privilegiado (França et al., 2016).

As células de Sertoli participam ativamente da espermatogênese com função de nutrição, suporte, secreção, endocitose e espermição, entre outras (Russell e Griswold, 1993; França e Chiarini-Garcia, 2005; França et al., 2016). Dentro do túbulo seminífero as células germinativas se dispõem, juntamente com as células de Sertoli,

de forma altamente organizada formando o epitélio germinativo ou seminífero, onde acontece a espermatogênese.

A espermatogênese pode ser dividida em três fases: (1) *fase proliferativa ou espermatogonial*, na qual as espermatogônias passam por sucessivas e rápidas divisões mitóticas; (2) *fase meiótica ou espermatocitogênica*, onde o material genético é duplicado, recombinado e segregado, sendo esta fase muito importante para a diversidade genética entre membros da mesma espécie; (3) *fase espermiogênica ou de diferenciação*, na qual células haploides, as espermatídes, se transformam em células altamente especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os ovócitos (Russell et al., 1990).

A fase proliferativa acontece no ambiente basal do epitélio seminífero, que está em contato direto com a membrana basal, onde encontram-se as espermatogônias, que através de mitoses sucessivas vão manter a produção espermática.

No homem, existem três gerações espermatogoniais: (1) as espermatogônias A escuras (Ae, consideradas as células-tronco de estoque), (2) as espermatogônias A claras (Ac, consideradas as células-tronco em atividade) e (3) as espermatogônias do tipo B (Clermont, 1966). O tamanho desta última população de células é controlado através do equilíbrio entre proliferação e apoptoses (Vornberger et al., 1994). Quando as espermatogônias Ac se dividem, uma das células filhas formadas continua como célula tronco e a outra fica comprometida com o processo espermatogênico. Esta célula comprometida se diferencia para se tornar espermatogônia diferenciada do tipo B. Estas por sua vez, formam os espermatócitos primários que iniciam o processo da meiose. Neste processo o espermatócito primário, após duas divisões, formam as espermatídes arredondadas. Estas passam por processo de diferenciação formando no final as espermatídes alongadas (Smith e Walker, 2014). Este evento é chamado de espermiogênese (Leblond e Clermont, 1952) e é a última etapa da espermatogênese, culminando com a liberação das espermatídes maduras no lúmen do túbulo seminífero passando a se chamar espermatozoides (Russell, 1993; Heller e Clermont, 1964).

As células germinativas estão dispostas de forma organizada ao longo dos túbulos seminíferos formando o que é conhecido como estádios do “ciclo do epitélio seminífero - CES”. No homem são identificados até VI estádios utilizando o método acrossômico (Clermont, 1963, Nihi et al., 2017), ao contrário de outras espécies que servem de modelo experimental, como camundongos e ratos, onde são descritos XII e XIV estádios do CES, respectivamente (Russell et al., 1990). Alterações em uma ou mais das etapas do processo espermatogênico (proliferativa/espermatogonial, meiótica/espermatocitaria e diferenciação/espermiogênica) podem afetar a produção espermática, chegando a casos extremos de ausência de espermatozoides no ejaculado ou azoospermia.

O processo espermatogênico não acontece aleatoriamente, sendo altamente regulado por um conjunto de hormônios e por fatores produzidos pelas células espermatogênicas responsáveis pelo processo, principalmente pelas células espermatogoniais, e que as afetam nos importantes processos de auto-renovação, proliferação e diferenciação que são essenciais para a manutenção da espermatogênese (Schlatt e Ehmcke, 2014).

3.5. Fatores que regulam o processo espermatogênico

A espermatogênese é um modelo clássico de sistema de autorrenovação e diferenciação por controle de células-tronco, neste caso conhecidas como “células-tronco espermatogoniais (CTE)”. O destino das CTE, relacionados com estoque, diferenciação e apoptose, é influenciado pelo microambiente composto de fatores de crescimento, que são fornecidos por diferentes populações de células testiculares, somáticas e germinativas.

Investigações ao longo das últimas duas décadas têm identificado fatores de nichos, incluindo citocinas, que regulam as funções das CTE e moléculas de adesão que influenciam as interações destas células. Há evidências que as células de Sertoli influenciam na formação e função dos nichos por secretarem fatores solúveis (Oatley et.al.; 2012). Estima-se que aproximadamente 2000 genes estejam associados na regulação da espermatogênese (Hargreave, 2000).

O controle do estado proliferativo das células germinativas é feito principalmente por fatores parácrinos secretados pelo ambiente somático testicular,

sendo que tal efeito tem início já no período fetal de diferenciação das células germinativas. Vários fatores estão associados a este controle, sendo alguns extensivamente estudados como os sistemas GDNF/GFR α 1 (fator neurotrófico derivado de célula glial e receptor alfa 1 da família GDNF, respectivamente) e o KIT/KL (receptor tirosina Kinase e ligante de KIT, respectivamente), ambos relacionados à regulação da expressão de receptores ligados à diferenciação e proliferação das células germinativas (Pesce et al., 2002; Campolo et al., 2013).

Outros marcadores importantes na regulação da espermatogênese são os de proliferação celular, principalmente das espermatogônias, que têm papel crítico na manutenção da espermatogênese e por consequência na fertilidade masculina contínua ao longo da vida do indivíduo (Zohni et al., 2012). Dentre estes marcadores, podemos citar o Ki67 e o MCM7, amplamente utilizados para medir a capacidade de proliferação espermatogonial.

A família MCM inclui sete proteínas: MCM2-MCM7 e MCM10 (Johnson et al., 2003). Elas podem ser consideradas componentes funcionais da fase-S do ciclo celular (Kearsey et al., 1996). A família MCM pode ser expressa, em proporções distintas, em diferentes fases do ciclo celular, e por isso pode ser usada como marcador de atividade do ciclo celular (Stoeber et al., 2001). Nos testículos, MCM7 pode estar envolvido com o processo de separação das fitas de DNA durante a replicação dos cromossomos, pois esta proteína é parte do complexo essencial da replicação do DNA cromossômico (Pacek and Walter, 2004). Portanto, a proteína MCM7 é expressa nos testículos durante o período de atividade de proliferação espermatogonial (Com et al., 2006).

A espermatogênese é regulada também por fatores endócrinos primariamente pelas gonadotrofinas, os hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), os quais são produzidos e secretados pela hipófise anterior. Fatores liberadores de gonadotrofinas, (GnRH) provenientes do hipotálamo, controlam a liberação destes hormônios hipofisários. Receptores para LH estão presentes nas células de Leydig, dispostas no compartimento testicular intersticial, estimulando a secreção de testosterona. Já o FSH estimula as células de Sertoli a exercerem suas múltiplas funções (Neto et al, 2016).

O conhecimento detalhado da regulação hormonal da espermatogênese é requerido para informar a avaliação e manutenção da fertilidade masculina e reciprocamente, para o desenvolvimento de uma contracepção hormonal masculina segura e reversível. Uma linha de estudo para isto é baseado no uso bem definido de modelos *in vivo* de privação de gonadotrofina/androgênio e restabelecimento da avaliação quantitativa do número de células germinativas usando técnicas estereológicas, além de estudos direcionados à etapas específicas da espermatogênese mostradas ser dependentes hormonais (MCLachlan et.al., 2002; Schlatt & Ehmcke, 2014).

Há boas evidências dos papéis sinérgico e separado para ambos, testosterona e FSH, em alcançar quantitativamente uma espermatogênese normal. Baseado em relativamente remoções seletivas e estudos de restabelecimento, FSH tem papel chave na progressão da espermatogônia tipo A em B, e em sinergia com a testosterona, na regulação da viabilidade da célula germinativa. Testosterona é um requerimento absoluto para a espermatogênese, sendo requerida para no mínimo quatro processos críticos durante a espermatogênese: manutenção da barreira hematotesticular, processo meiótico, adesão Sertoli-espermátide e liberação de espermatozoide (MCLachlan et.al., 2002; Smith e Walker, 2014). Dados em homens tratados com contraceptivos esteroidais indicam que um enfraquecimento da espermição é chave para alcançar azoospermia.

Nos últimos anos, há muitos estudos mostrando que as células peritubulares participam ativamente da regulação do processo espermatogênico, não sendo apenas células estruturais, mas também secretando fatores parácrinos, como por exemplo o fator PModS, que modula a função da célula de Sertoli, bem como contendo receptores de andrógenos fornecendo um sítio de sinalização para estes hormônios. (Vornberger et al., 1994; Zhou et al., 2002; Albrecht, 2009). Esta importante célula faz parte da estrutura que envolve o túbulo seminífero, a túnica própria.

3.6. Túnica própria e efeitos na espermatogênese

A túnica própria, também conhecida como lâmina própria ou tecido peritubular dos túbulos seminíferos, se estende desde a membrana basal do túbulo até uma distância variável no tecido intertubular que circunda o túbulo seminífero (De Kretser

et al., 1975; Haider et al., 1999).

Nos testículos humanos com espermatogênese normal, esta túnica mede aproximadamente de 4 a 7 μm de espessura e é composta por quatro a seis camadas de células mioides, com longos e fino processos citoplasmáticos, paralelos uns aos outros. O espaço extracelular entre estas células é constituído de fibras colágenas, microfibrilas e fibras elásticas (Haider et al., 1999).

A túnica própria possui papel fundamental na manutenção (Davidoff et al., 1990) e diferenciação do epitélio seminífero (Lustig et al., 2000). A integridade desta túnica própria é necessária para a manutenção da estrutura e função do epitélio seminífero e quando nela ocorrem modificações, podem contribuir para degeneração deste epitélio (Morales et al., 2004).

Vários distúrbios testiculares, assim como desordens espermatogênicas, induzidas por condições experimentais ou patológicas, são acompanhadas por alterações morfológicas na túnica própria (Bustos-Obregon, 1974; De Krester et al., 1975; Salomon e Hedinger, 1982; Passia et al., 1983; Amat et al., 1985; Haider et al., 1986; Holstein et al., 1988; Davidoff et al., 1990). A túnica própria passa por severas alterações durante a hialinização tubular.

A maciça infiltração de fibras colágenas dentro da túnica própria e do túbulo seminífero é característica do processo de hialinização tubular. Em hialinização tubular avançada, as células germinativas e Sertoli são completamente perdidas e o tecido testicular consiste apenas de fibrócitos e quantidades maciças de fibras de colágeno (Söderström, 1986; Haider et al., 1999).

Em muitas desordens testiculares associadas com a depleção das células germinativas, o diâmetro tubular diminui enquanto a túnica própria passa por um processo progressivo de espessamento que termina na completa fibrose tubular (Söderström, 1986; Arena et al., 1997).

A fibrose está associada com o aumento no número de fibroblastos/miofibroblastos e um depósito excessivo de proteínas da matriz extracelular, e é característica de muitas doenças de pulmão, fígado, rim, coração, pele e testículo (Willis et al., 2006; Darby e Hewitson, 2007; Mucsi e Rosivall, 2007;

Gressner et al., 2008; Ruppert et al., 2008; Albrecht, 2009).

Alterações imunofenotípicas das células peritubulares mioídes e o aumento da secreção de componentes da matriz extracelular podem provocar fibrose (Santamaria et al., 1995; Morales et al., 2004). Mudanças morfológicas nas células peritubulares, como hipertrofia (Haider et al., 1999; Schell et al., 2010; Welter et al., 2013;), implicam em alterações das funções parácrinas e nas habilidades contráteis dessas células e consequentemente comprometimento do processo espermatogênico que podem levar a infertilidade masculina (Mayerhofer, 2013).

4. Material e Métodos

4.1. Pacientes

Para o desenvolvimento desta pesquisa foram obtidas 25 biópsias testiculares, coletadas de ambos os testículos de homens sexualmente maduros, mas azoospérmicos.

As coletas foram obtidas de pacientes tratados no Ambulatório de Andrologia do Setor de Urologia do Hospital das Clínicas da UFMG ou em hospitais ligados à UFMG, pacientes estes que concordaram em ceder esse material para a pesquisa, assinando Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (**Anexo 1**). Os procedimentos utilizados para as coletas das biópsias testiculares foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CEP) sob número ETIC 032/04 (**Anexo 2**).

Os pacientes foram agrupados pela etiologia da azoospermia em quatro grupos (**Tabela 1**): agenesia bilateral dos ductos deferentes (AD) com 9 pacientes; orquiepididimite (OE) com 5 pacientes; varicocele (VA) com 7 pacientes e orquite por caxumba (OC) com 4 pacientes. Os pacientes com AD foram considerados controles para a comparação com as outras etiologias estudadas.

4.2. Biópsia testicular

As biópsias foram do tipo aberta (cirúrgica), com o paciente em posição de decúbito dorsal. A desgermação da pele do escroto foi realizada com solução PVPI (Povidona-iodo) desgermante e antissepsia da mesma com tintura de PVPI. O bloqueio anestésico local por punção percutânea do escroto foi realizado com 7 mL de solução 1:1 de lidocaína 1% e bupivacaína 0,5% em cada cordão espermático e 1 mL desta solução sob a pele da região a ser incisada. O procedimento cirúrgico iniciou-se com a incisão escrotal de aproximadamente 1,5 cm, onde são expostas todas as camadas, desde a pele até a túnica albugínea. A hemostasia foi realizada com auxílio de um eletro-cautério, e foi retirado um fragmento de cada testículo, pesando aproximadamente 500 mg cada. A síntese foi realizada por planos de tecido com fio catgut cromado 4-0. O mesmo procedimento foi realizado no testículo contra lateral.

Tabela 1. Etiologia da azoospermia dos 25 pacientes utilizados no presente estudo bem como suas respectivas idades.

Pacientes	Etiologia	Idade (anos)
AD-1	Agenesia de ducto deferente	29
AD-2	Agenesia de ducto deferente	33
AD-3	Agenesia de ducto deferente	40
AD-4	Agenesia de ducto deferente	34
AD-5	Agenesia de ducto deferente	34
AD-6	Agenesia de ducto deferente	48
AD-7	Agenesia de ducto deferente	31
AD-8	Agenesia de ducto deferente	38
AD-9	Agenesia de ducto deferente	26
OE-1	Orquiepididimite	33
OE-2	Orquiepididimite	37
OE-3	Orquiepididimite	24
OE-4	Orquiepididimite	39
OE-5	Orquiepididimite	37
VA-1	Varicocele (G1)*	39
VA-2	Varicocele (G2)*	36
VA-3	Varicocele (G1)*	36
VA-4	Varicocele (G3)*	41
VA-5	Varicocele (G1)*	37
VA-6	Varicocele (G3)*	36
VA-7	Varicocele (G2)*	32
OC-1	Orquite por caxumba	40
OC-2	Orquite por caxumba	37
OC-3	Orquite por caxumba	44
OC-4	Orquite por caxumba	35

* Graus de varicocele (G1 a G3) de acordo com Masson & Brannigan (2014)

4.3. Processamento das biópsias testiculares

Os fragmentos retirados durante as biópsias testiculares foram fixados em solução de Karnovsky para análises morfológicas, morfométricas e ultraestruturais e em paraformaldeído para as avaliações imunohistoquímicas e histoquímicas, conforme descrito a seguir.

4.3.1. Processamentos para avaliações morfológicas e morfométricas

As avaliações morfológicas e morfométricas em microscopia de luz foram realizadas em biópsias testiculares fixadas em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em tampão fosfato 0,05 M pH 7,2) (Karnovsky, 1965) durante 24 horas. As biópsias foram desidratadas em série crescente de etanol e infiltradas em resina plástica à base de glicol metacrilato (Historesin, Leica) (Chiarini-Garcia et al., 2011). Secções histológicas (3 μm de espessura) foram coradas com azul de toluidina/borato de sódio. O processamento histológico considerado de boa resolução utilizado no desenvolvimento deste estudo foi escolhido com base em estudo desenvolvido por Chiarini-Garcia et al. (2017).

4.3.2. Processamento para avaliação ultraestrutural da túnica própria

Para avaliação ultraestrutural, alguns fragmentos foram fixados primeiro em solução de Karnovsky e em seguida pós-fixados em ósmio reduzido (1% de tetróxido de ósmio e 1,5% de ferrocianeto de potássio em água destilada) por 90 minutos. Posteriormente foram desidratados em série crescente de etanol e rotineiramente incluídos em resina epoxi Araldite (Chiarini-Garcia e Russell, 2002). Dos blocos de araldite foram obtidos cortes semifinos de 1 μm de espessura, que foram corados com azul de toluidina/borato de sódio 1% para determinar a região do corte a ser analisada no microscópio eletrônico. Na área determinada, foram obtidos cortes ultrafinos de 70 a 80 nm de espessura, para serem estudados sob microscopia eletrônica de transmissão (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 (CM), ambos da UFMG.

4.3.3. Processamento para avaliações imunohistoquímicas e histoquímicas

Fragmentos das biópsias testiculares foram fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,05M pH 7,2, por 24 horas, e posteriormente armazenados em tampão fosfato 0,05M pH 7,2, até o momento da inclusão. Após desidratação em série crescente de etanol, estes fragmentos foram incluídos de forma convencional em parafina (Histosec, Merck). As secções histológicas (5 μm de espessura) foram

utilizadas para a avaliação da (i) proliferação espermatogonial através da imunocoloração com MCM-7 e (ii) avaliação dos componentes teciduais da túnica própria dos túbulos seminíferos, através de colorações rotineiras com tricrômio de Gomori e ácido periódico de Schiff (PAS).

As análises morfológicas, morfométricas e imunohistoquímicas foram realizadas no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (LABER) do ICB/UFMG. Algumas análises foram realizadas diretamente sob microscópio Olympus BX-41 enquanto outras foram realizadas em imagens digitais capturadas no microscópio Olympus BX-51 no qual está acoplada câmera fotográfica digital Q-Color 3 (Olympus) e computador com o software Image Pro Express (Media Cybernetics), responsáveis pela captura e análise das imagens digitais.

4.4. Avaliações morfológicas e morfométricas

4.4.1. Morfologia

Para avaliação das biópsias testiculares foram consideradas as seguintes características morfológicas: organização do epitélio, presença das diferentes gerações de células germinativas, presença de fibrose e padrões de associações/ilhas de fibrose juntamente com túbulos com células germinativas, além da presença de padrão de túbulos seminíferos que apresentavam apenas células de Sertoli (*Sertoli-only*). Tais características foram observadas e registradas em fotomicrografias digitais obtidas com sistema descrito anteriormente, para avaliação e divulgação dos resultados. As imagens digitais foram tratadas com o programa Adobe Photoshop e montadas em pranchas, quando necessário, utilizando o programa Adobe Illustrator (Adobe Creative Suite 4).

4.4.2. Morfometria

Foram realizadas cinco diferentes determinações morfométricas procurando avaliar, de forma comparativa, os componentes testiculares em relação às diferentes causas da azoospermia aqui estudadas: (a) escores da espermatogênese, (b) diâmetro

tubular, (c) avaliação da percentagem de túbulos seminíferos considerando a célula germinativa mais avançada, (d) cálculo das áreas de epitélio seminífero, túnica própria e lúmen e (e) proporção volumétrica de componentes do parênquima testicular.

(a) Escores histopatológicos da espermatogênese

Foram utilizados três diferentes padrões de avaliação da espermatogênese. Um deles, classicamente utilizado na anatomia patológica, o escore de Cinco Padrões de alterações da espermatogênese, baseado em Levin (1979) e revisto por McLachlan et al. (2007).

Outro foi o escore de Johnsen (1970), que divide as alterações da espermatogênese em 10 escores, detalhando com mais informação o padrão de Cinco Escores, citado anteriormente, separando os diferentes tipos de hipoespermatogênese e parada de maturação.

O terceiro foi o escore de Bergmann (Bergmann et al., 1994; revisão em Bergmann e Kliesch, 2010), que avalia as alterações da espermatogênese em relação à presença de espermátides alongadas no parênquima testicular, tal como aplicado por Reis (2012). Abaixo descrição detalhada dos escores.

Escore de Cinco Padrões

A classificação dos Cinco Padrões, rotineiramente utilizada nos laboratórios de anatomia patológica e pelos andrologistas na avaliação das alterações testiculares, leva em consideração todos os cortes dos túbulos seminíferos das biópsias para assim classificar o testículo baseando-se na descrição dos padrões, segundo a **Tabela 2**.

Tabela 2. Classificação histopatológica da espermatogênese adaptado de Levin (1970).

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 ao encontro de 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).

Escore de Johnsen

Este padrão de avaliação da espermatogênese leva em consideração, com mais detalhes, as alterações do epitélio seminífero, determinando com mais exatidão onde ocorrem as aplasias ou paradas de maturação das células germinativas.

Seções transversais tubulares de todo o material, em cada uma das quatro etiologias de azoospermia consideradas neste estudo, foram examinadas sistematicamente e cada uma delas recebe um escore de 1 a 10 de acordo com os critérios na **Tabela 3**.

Tabela 3. Classificação histopatológica da espermatogênese, 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.

Apenas os cortes transversais de túbulos seminíferos foram contados, em aumento final de 200x, seguindo as recomendações de Johnsen (1970). Os túbulos danificados pelo processamento não foram considerados na contagem enquanto aqueles túbulos completamente hialinizados isto é, sem qualquer tipo celular presente, foram sempre contados quando devidamente identificados.

Quando foi necessário identificar o tipo celular mais detalhadamente, foram utilizados aumentos finais de 400x e 1000x. O cálculo do escore médio foi realizado multiplicando o número de túbulos contados pelo seu próprio escore, de um a dez. Todos estes valores foram somados e divididos pelo número total de túbulos contatos.

Escore de Bergmann

A obtenção de escores a partir do critério de Bergmann (Bergmann et al., 1994; revisão em Bergmann e Kliesch, 2010) foi feita baseando-se na percentagem de túbulos seminíferos que contem espermátides alongadas. Todos os túbulos seminíferos presentes nos cortes histológicos foram analisados e no final, o número

total de túbulos contendo espermátides alongadas (escores 8, 9 e 10 de Johnsen) foi dividido pelo número total de túbulos contados (Reis, 2012), conforme representado pela fórmula abaixo:

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

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

Este cálculo mostra a porcentagem de túbulos com espermátides alongadas, onde a nota 10 significa 100% de túbulos contendo espermátides alongadas e a nota 1 significa 10% de túbulos contendo espermátides alongadas. Quando menores de 10% (9% a 1%) utiliza-se subclassificação com escore de 0,9 a 0,1 (**Tabela 4**).

Tabela 4. Classificação histopatológica da espermatogênese (Bergmann e Kleich, 2010).

%*	Escore	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	Raros túbulos com espermátides alongadas, predomínio de atrofia do epitélio seminífero.
0	0	Aplasia de células germinativas, parada de maturação, atrofia testicular, túbulos hialinizados.

* Porcentagem de túbulos seminíferos com espermátides alongadas.

(b) Diâmetro tubular

Foi obtido o diâmetro tubular médio por paciente a partir da mensuração, ao acaso, de todas as secções transversais de túbulos seminíferos (variando de 18 a 30 túbulos por paciente) que apresentassem contorno o mais circular possível. Nos túbulos seminíferos ovais, foi obtida apenas a medida do menor diâmetro. Para isso, foram utilizadas imagens fotográficas digitais em aumento final de 20x. Para

mensuração das estruturas avaliadas foi utilizado o programa de análise de imagens Image-Pro Plus (Media Cybernetics).

(c) Avaliação da percentagem de túbulos seminíferos considerando a célula germinativa mais avançada

Cada túbulo seminífero nas biópsias testiculares foi classificado com base na célula germinativa mais avançada, a saber: (i) espermatócito, (ii) espermátide arredondada e (iii) espermátide alongada, bem como aqueles em que estavam presentes apenas (iv) células de Sertoli e (v) fibrose. A percentagem de cada túbulo acima mencionado foi calculada para todos os túbulos seminíferos nas secções de biópsia nos quatro grupos de etiologia de azoospermia estudados no presente estudo.

(d) Cálculo das áreas de epitélio seminífero, túnica própria e lúmen

Áreas (μm^2) de componentes tubulares (epitélio seminífero, túnica própria e lúmen) foram determinadas em túbulos seminíferos redondos e ovais (18 a 30 túbulos por paciente). Todas as medições de área foram feitas em micrografias digitais usando o software Image Pro-Express (Media Cybernetics).

(e) Proporções volumétricas (Vv%)

As proporções volumétricas de túbulo seminífero (epitélio seminífero, túnica própria, lúmen vazio, células no lúmen e fibrose) e intertúbulo testicular (vasos sanguíneos, célula do conjuntivo, célula de Leydig, mastócito e interstício) foram estimadas pelo método de contagem de pontos (Drumond et al., 2011). Denominamos de interstício o espaço linfático e o tecido conjuntivo frouxo juntos. Estes dados foram obtidos através de um microscópio óptico Olympus BX-41 com objetiva de 40x e utilizando um retículo contendo 441 intersecções numa ocular de 10x. As estruturas seleccionadas foram contadas em aproximadamente 4410 intersecções, distribuídas em dez campos seleccionados aleatoriamente por paciente. A densidade volumétrica (%) de cada um dos componentes avaliados foi determinada dividindo a soma dos pontos sobre o respectivo componente pelo número total de pontos sobre o tecido.

4.5. Avaliação imunohistoquímica

Para a avaliação da proliferação espermatogonial, realizou-se imunomarcagem com anticorpo anti-MCM7 (anticorpo Abcam anti-MCM7 - ab2360).

Os cortes empregados para esta avaliação foram rehidratados e incubados com peroxidase à 3% em metanol por 30 minutos. Para a recuperação antigênica as lâminas foram aquecidas no microondas em tampão citrato pH 6,0 por 8 minutos sem levantar fervura e resfriadas à temperatura ambiente. As temperaturas inicial e final da recuperação foram medidas e ficaram em torno de 90°C durante todo o processo. Em seguida, foi realizado o bloqueio com avidina e biotina (*avidin/biotin blocking kit*, Vector Laboratories) sendo cada bloqueio por 10 minutos e, posteriormente, o bloqueio foi feito com soro de cabra a 10% por 30 minutos, para evitar ligações não específicas. Os cortes foram incubados por 12 horas a 4°C em câmara úmida com o anticorpo primário diluído em BSA à 0,5%. As secções foram lavadas em PBS (tampão fosfato salino, 0,2mol/L, pH 7,4) e incubadas com o anticorpo secundário *anti-mouse* biotilado (Vector Laboratories) por 1h a temperatura ambiente, para posterior amplificação com kit Vectastain ABC Elite (Vector Laboratories) por 30 min. A reação foi revelada com 3,3'-diaminobenzidina, 1:400 (DAB, Vector Laboratories) que foi usada como substrato para a peroxidase. O tempo de revelação foi de 3 minutos. Os cortes foram lavados 3 vezes em PBS 0,2 mol/L entre todos os passos descritos acima, exceto antes do anticorpo primário. Utilizou-se, com as devidas adaptações para o material humano, o protocolo anteriormente descrito por (Albuquerque et al., 2013).

Em microscópio Olympus BX-51, foram contabilizadas espermatogônias em divisão (MCM7 +) e as que não estavam em divisão (MCM7-) em todos os túbulos seminíferos nas secções de biópsia, independentemente da posição dos perfis de corte histológico. Os números de espermatogônias obtidas foram corrigidos pela espessura da secção histológica utilizando a fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann e Almquist (1962). A seguir, o perímetro (mm) dos mesmos túbulos seminíferos foi medido em imagens digitais, utilizando o software Image Pro-Express (Media Cybernetics). Assim, foi possível calcular o número de espermatogônias por mm de compartimento basal do túbulo seminífero.

Adicionalmente, seguindo o mesmo processamento metodológico para comparação relativa entre patologias, calculou-se o índice de proliferação espermatogonial dividindo o número de espermatogônias MCM7 + pelo número total de espermatogônias (MCM7 + mais MCM7-) contadas pelo perímetro de túbulos seminíferos (milímetros). As distinções morfológicas das espermatogônias foram baseadas em características nucleares, como descrito previamente por Nihi et al. (aceito para publicação).

4.6. Avaliação hormonal

A análise hormonal (FSH, LH e testosterona) foi realizada em todos os pacientes. As amostras de sangue foram recolhidas nas manhãs antes da coleta das biópsias e os seus níveis séricos determinados com kits de imunoensaio de quimioluminescência (ECLIA, Hoffman-LaRoche Inc., Nutley, NJ).

A relação entre a concentração de testosterona e a concentração sérica de LH foi utilizada para demonstrar uma redução compensatória da função das células de Leydig após deficiências testiculares. Para tanto, foi avaliada a relação entre a testosterona e as concentrações de hormônio luteinizante (T/LH) para cada paciente (Tajar et al., 2010; Jorgensen et al., 2016).

4.7. Estatística

Todas as variáveis foram testadas quanto à normalidade antes das análises, utilizando o procedimento univariado do Sistema de Análise Estatística (SAS Institute, Cary, NC, EUA). As comparações dos dados morfométricos entre os grupos experimentais foram feitas por ANOVA.

No caso em que foram estabelecidos efeitos significativos do tratamento, foram realizadas comparações múltiplas utilizando a probabilidade de diferenças ajustadas por Tukey-Kramer (SAS, 2001), sendo $P < 0,05$ considerado significativo.

Os dados de proliferação espermatogonial e hormonais foram expressos como medianas e intervalos interquartis e as medianas do grupo foram comparadas com o teste de Kruskal-Wallis (GraphPad Prism Software, La Jolla, CA, EUA). Os demais dados são apresentados como médias e erro padrão da média (EPM).

5. Resultados

5.1. Morfologia testicular

Ao avaliar as características morfológicas das células germinativas e somáticas do epitélio seminífero, bem como do interstício testicular de homens azoospérmicos devido às quatro diferentes etiologias avaliadas no presente estudo, verificamos algumas características específicas de cada etiologia.

5.1.1. *Agenesia de ducto deferente*

Ao analisar os testículos dos indivíduos azoospérmicos com agenesia de deferente (AD), observou-se epitélio completo, contendo todas as células germinativas, de espermatogônias à espermátides alongadas. No entanto, em algumas regiões estas células se apresentavam de maneira desorganizada sendo que na maioria dos túbulos células germinativas estão destacadas do epitélio e se encontram livres no lúmen tubular. As células livres no lúmen podem ser até espermátócitos primários. Não foram observados neste grupo, indivíduos com epitélio fibrosado e nem com padrão *Sertoli-only* (**Figura 1**).

5.1.2. *Orquiepididimite*

Os pacientes com orquiepididimite (OE) possuem um padrão morfológico muito parecido com o do grupo de AD, porém apresentam algumas características peculiares. O epitélio seminífero da maioria dos pacientes deste grupo apresentou-se completo, porém mais desorganizado. Foram frequentes os túbulos com epitélio seminífero baixo, às vezes faltando gerações de células germinativas, associados à presença de grandes vacúolos neste epitélio. Observou-se, em alguns pacientes, a presença de pequenas ilhas de túbulos seminíferos (TS) fibróticos. Estes túbulos fibrosados eram menores em relação àqueles com células germinativas e apresentavam aumento visível da espessura na túnica própria (**Figura 2**).

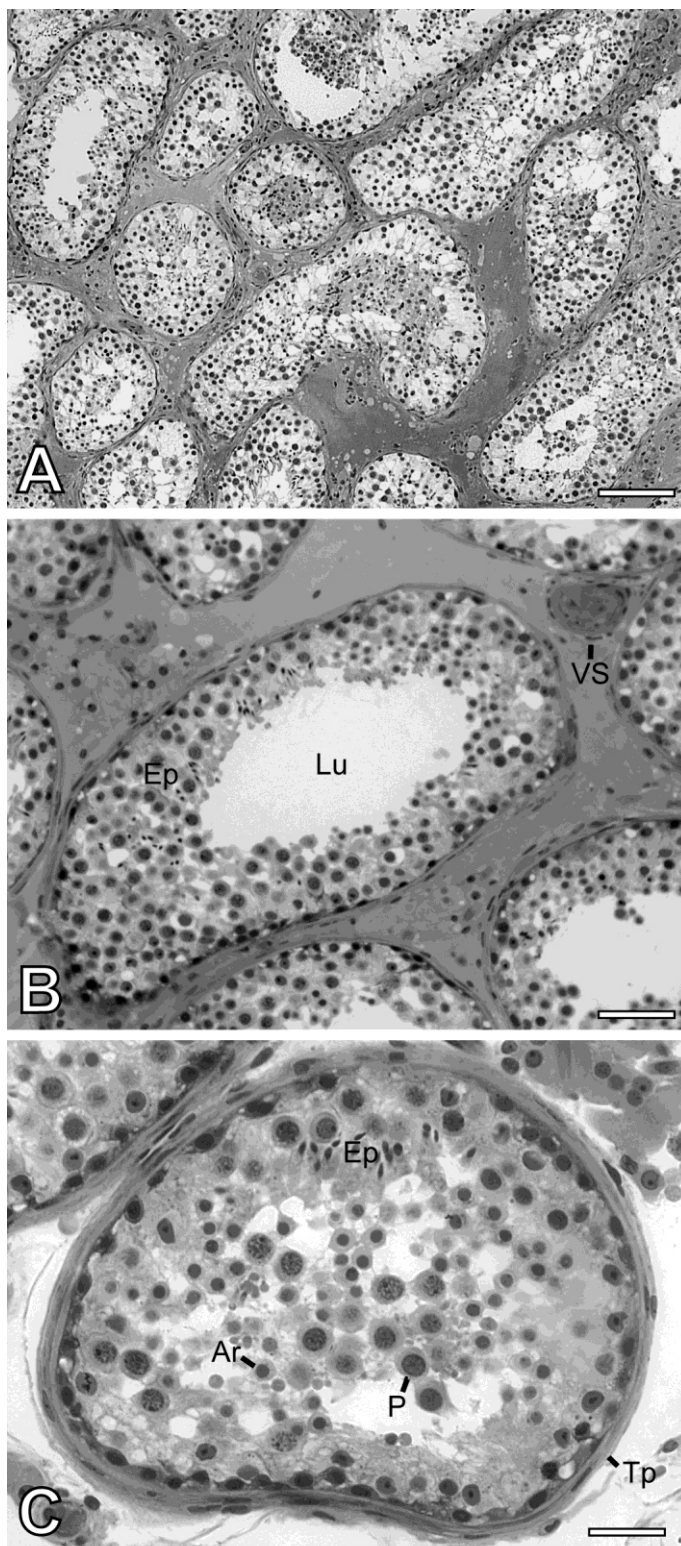


Figura 1. Fotomicrografias de testículos de homens com agenesia de ducto deferente. Em A, uma visão panorâmica de corte transversal de túbulos seminíferos com e sem lúmen mostrando epitélio seminífero (Ep) com presença de todos os tipos de células germinativas. Em B e C, cortes transversais de túbulos seminíferos com ausência (B) e presença (C) de células germinativas livres no lúmen (Lu). P, paquíteno; Ar, espermatíde arredondada; Tp, túnica própria; VS, vaso sanguíneo. Barras: A: 130 μ m; B: 65 μ m; C: 30 μ m.

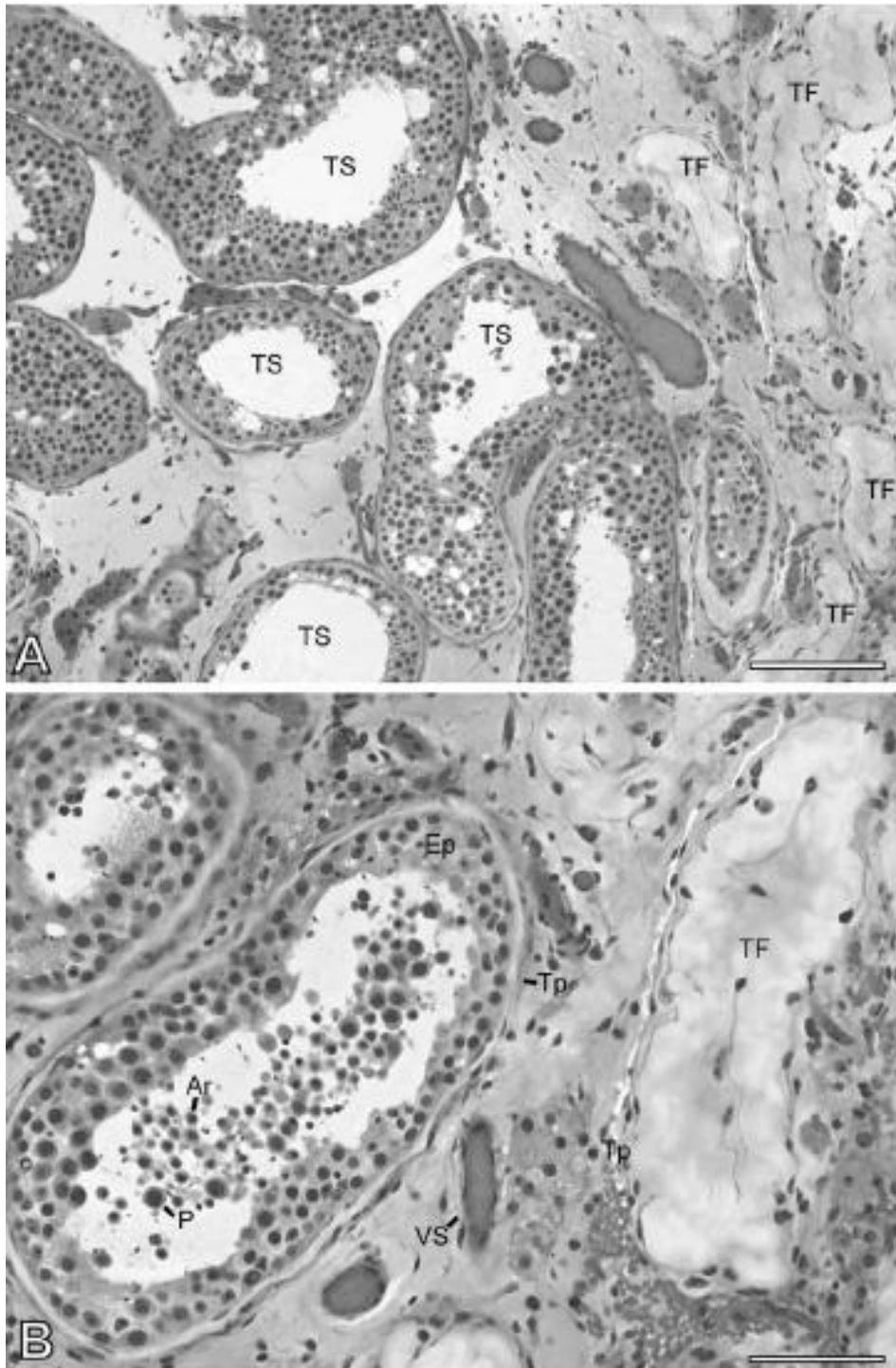


Figura 2. Fotomicrografias de testículos de homens com orquiepididimite. Em A, notar a presença de ilhas de fibrose juntamente com túbulos seminíferos (TS) com epitélio germinativo completo. Em B, observar um túbulo seminífero com células livres no lúmen (TS) e outro totalmente fibrosado/hialinizado (TF). P, paquíteno; Ar, espermatíde arredondada; Tp, túnica própria; VS, vaso sanguíneo. Barras: A: 150 μ m; B: 75 μ m.

5.1.3. Varicocele

Os indivíduos do grupo de varicocele são bastante heterogêneos, com o parênquima testicular apresentando diferentes características morfológicas. Alguns pacientes apresentaram a maioria dos túbulos seminíferos com epitélio completo, apesar de desorganizado e sem lúmen, sendo considerados pacientes com varicocele de grau 1. Outros apresentaram testículo com predomínio de túbulos seminíferos com padrão *Sertoli-only* em praticamente todo o campo avaliado e presença de ilhas de túbulos com espermatogênese, descritos como paciente com varicocele de grau 2. E por fim, outros pacientes observa-se túbulos seminíferos com ausência de epitélio seminífero e presença de fibrose em vários graus em todo o tecido testicular, com varicocele de grau 3.

De fato, quanto à gravidade da varicocele na espermatogênese dos sete pacientes avaliados, três são classificados como grau 1 (leve), dois como grau 2 (médio) e dois como grau 3 (grave). Enquanto os pacientes com espermatogênese de grau 1 são pouco afetados, naqueles de grau 3 os túbulos fibróticos são predominantes. Essa variabilidade explica a enorme heterogeneidade morfológica e morfométrica do epitélio seminífero destes pacientes (**Figura 3**).

5.1.4 Orquite por caxumba

O grupo de indivíduos com orquite pós-caxumba é o que morfológicamente se apresentou mais alterado, em relação aos outros grupos estudados. Todos os indivíduos deste grupo apresentaram fibrose testicular em graus variáveis. Em um dos pacientes observaram-se poucas e pequenas ilhas de túbulos com epitélio germinativo completo, apesar de desorganizado e com grande número de vacúolos no epitélio. Em outro paciente os túbulos seminíferos se apresentaram no padrão *Sertoli-only*, com túnica própria espessada, como observado nos túbulos fibrosados (**Figura 4**). Nos outros dois pacientes, os túbulos seminíferos eram todos fibróticos. Em um paciente, que não foi utilizado neste estudo, o testículo era constituído por massa conjuntiva, com o diagnóstico histopatológico de calcificação.

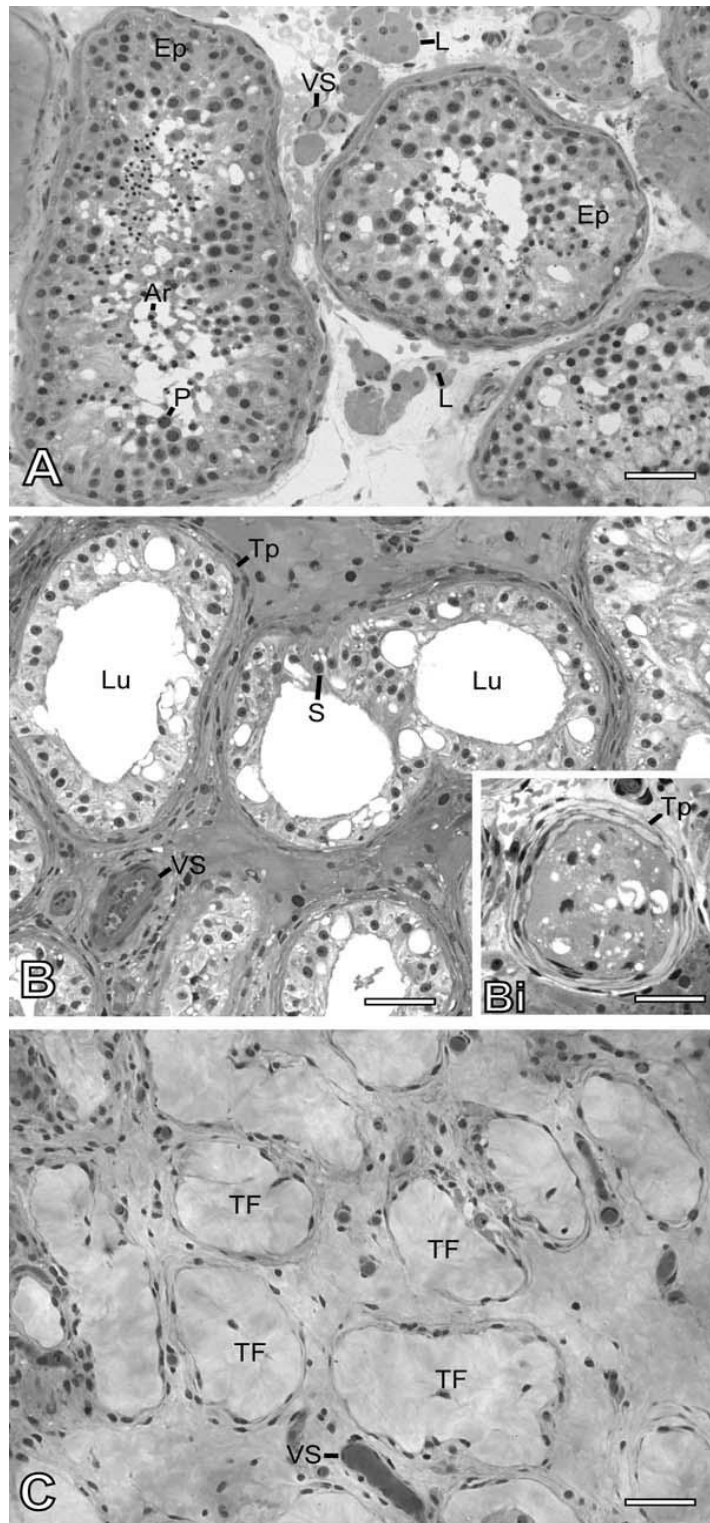


Figura 3. Fotomicrografias de testículos de homens com varicocele mostrando a variabilidade morfológica do tecido testicular. Em A, corte de túbulos seminíferos parcialmente obliterados e com epitélio (Ep) completo. Em B, túbulos seminíferos com padrão *Sertoli-only* e no detalhe (Bi) notar túbulo com túnica própria (Tp) espessada. Em C, parênquima testicular com túbulos fibrosados (TF). S, célula de Sertoli; P, paquíteno; Ar, espermátide arredondada; Tp, túnica própria; L, células de Leydig; VS, vaso sanguíneo. Barras: A, B, C: 58 μ m.

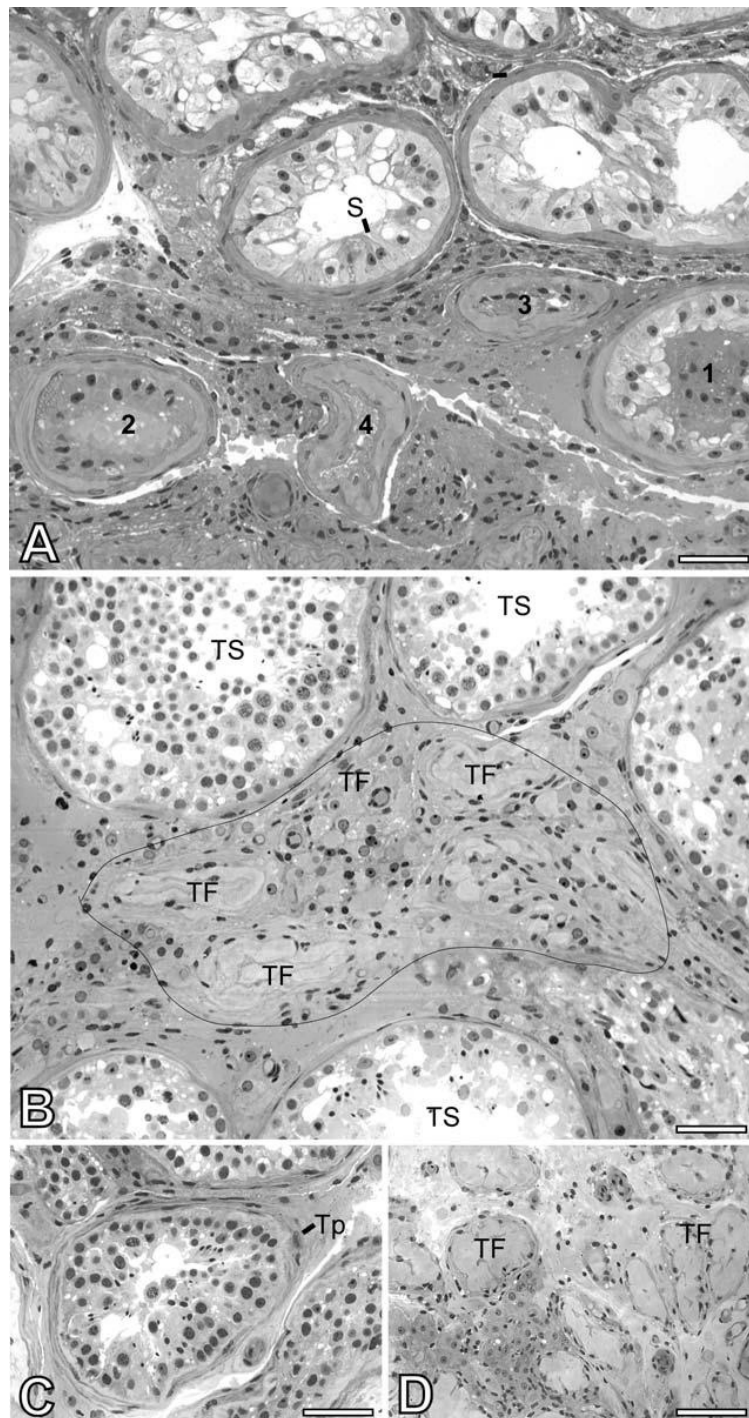


Figura 4: Fotomicrografias de testículos de homens com orquite por caxumba. Em A, observa-se túbulos seminíferos com padrão *Sertoli-only* em conjunto com túbulos em degeneração fibrótica (1 a 4, do menor para o maior grau de degeneração). Em B, corte de túbulos seminíferos com epitélio seminífero completo (Ep) associados à túbulos fibrosados (TF). Em C, nota-se túnica própria (Tp) espessa em túbulo seminífero com célula germinativa. Em D, parênquima testicular com apenas túbulos fibrosados (TF). S, célula de Sertoli. Barras: A, B: 55 μ m; C, 54 μ m; D, 110 μ m.

5.2. Escores histopatológicos da espermatogênese

Visando verificar morfologicamente o nível de maturação do epitélio germinativo, o parênquima testicular foi avaliado levando em consideração três 3 clássicos escores histopatológicos da espermatogênese. Verificou-se que os pacientes com AD e OE apresentavam escores histopatológicos maiores do que aqueles com VA e OC, apesar da significância variável (**Figura 5**). Estas diferenças entre os escores dos pacientes azoospermicos, entre as diferentes etiologias, refletem diretamente nos padrões morfológicos descritos no item anterior (item 5.1).

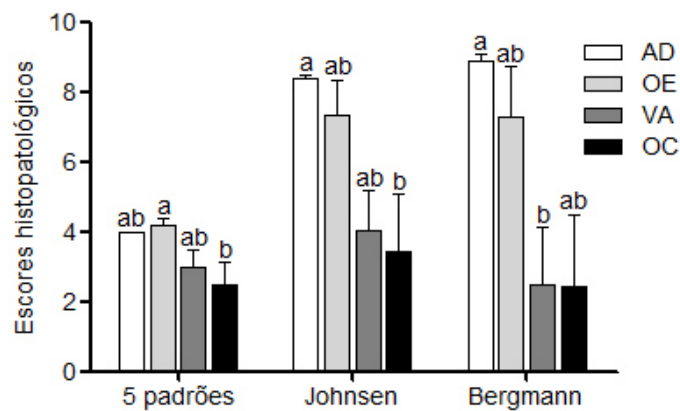


Figura 5: Comparação de três padrões de escores em homens azoospermicos com agenesia bilateral do ducto deferente (AD), orquiepididimite (OE), varicocele (VA) e orquite por caxumba (OC). As barras representam o erro padrão da média. Letras diferentes nas linhas representam diferença significativa ($P<0,05$).

5.3. Parâmetros tubulares

5.3.1. Diâmetro tubular

O diâmetro médio dos túbulos seminíferos nas diferentes etiologias analisadas é apresentado na **Figura 6**. Verificou-se redução deste diâmetro nos pacientes com VA e OC, quando comparado com os pacientes AD e OE.

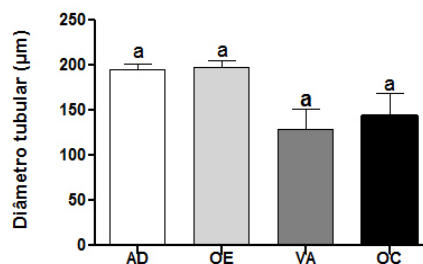


Figura 6: Avaliação comparativa dos diâmetros tubulares em homens azoospermicos com agenesia bilateral do ducto deferente (AD), orquiepididimite (OE), varicocele (VA) e orquite por caxumba (OC). As barras representam o erro padrão da média. Letras diferentes nas linhas representam diferença significativa ($P<0,05$).

5.3.2. Avaliação da percentagem de túbulos seminíferos considerando a célula germinativa mais avançada

A quantidade de túbulos com as células germinativas mais avançadas (espermátides alongadas) foi reduzida em pacientes com VA e OC (**Figura 7**) e mostrou percentual aumentado de túbulos fibrosados e *Sertoli-only*, confirmando um maior comprometimento da espermatogênese. Entre eles, os pacientes com OC foram os que tiveram o epitélio seminífero mais danificado, apresentando um aumento significativo ($P<0,05$) na quantidade de túbulos fibrosados em comparação com aqueles com AD. Estes resultados corroboram com os resultados de baixos escores nestes mesmos grupos (VA e OC). No caso dos pacientes com AD e OE, na maioria dos túbulos seminíferos as células germinativas mais alcançadas alcançam a diferenciação em espermátides alongadas.

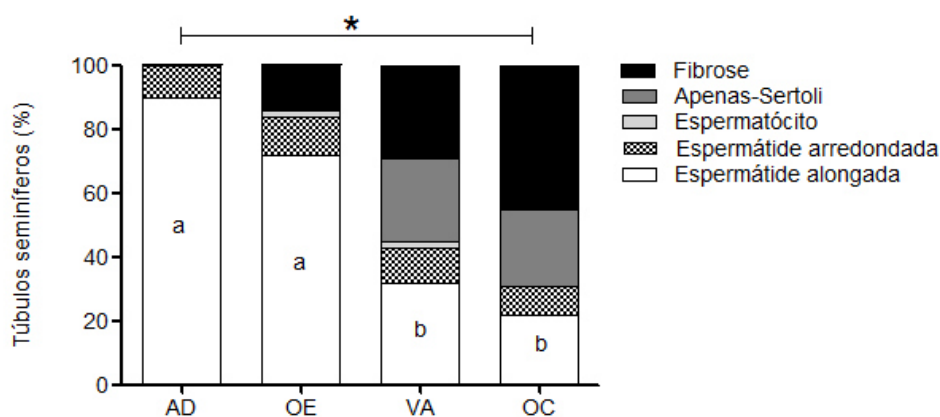


Figura 7: Avaliação comparativa da presença de túbulos seminíferos com células germinativas, túbulos com apenas células de Sertoli e os fibrosados em homens azospérmicos com agenesia bilateral do ducto deferente (AD), orquiepididimite (OE), varicocele (VA) e orquite por caxumba (OC). * Diferença significativa estatisticamente. Letras diferentes nas linhas representam diferença significativa ($P<0,05$).

5.3.3. Áreas de epitélio seminífero, túnica própria e lúmen

A **Figura 8** mostra de forma comparativa áreas do epitélio seminífero em relação ao epitélio, túnica própria e lúmen, considerando as quatro etiologias em estudo. Podemos observar a diminuição gradativa e significativa da área do epitélio germinativo entre os grupos estudados. As áreas de epitélio dos pacientes com VA e OC, não diferem entre si e são significativamente menores que naqueles pacientes com AD e OE, corroborando com resultados morfométricos anteriores. Para a área de lúmen nota-se redução significativa nas etiologias não obstrutivas (VA e OC) em relação aos grupos menos afetados (AD e OE).

Para a área de túnica foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados, sendo que nos indivíduos com OE, VA e OC, a túnica se apresentou espessa em relação aos indivíduos com AD (**Figura 8**).

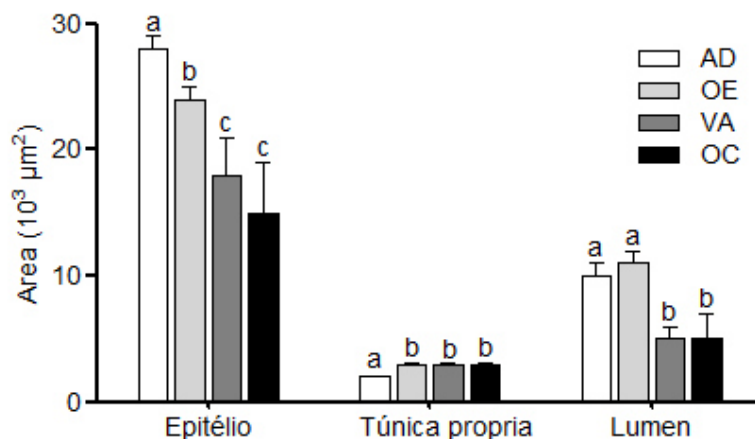


Figura 8: Avaliação comparativa das áreas de epitélio, túnica própria e lúmen em homens azoospermicos com agenesia bilateral do ducto deferente (AD), orquiepididimite (OE), varicocele (VA) e orquite por caxumba (OC). As barras representam o erro padrão da média. Letras diferentes nas linhas representam diferença significativa ($P < 0,05$).

5.3.4. Proporções volumétricas (Vv%)

Comparando a proporção volumétrica dos dois compartimentos testiculares (túbulos seminíferos e interstício) em relação às quatro etiologias estudadas, verificou-se que os pacientes com VA e OC tiveram redução percentual significativa dos túbulos seminíferos em relação àqueles com AD (**Tabela 5**). Em relação a este parâmetro testicular, os pacientes com OE apresentaram proporção de túbulos e interstício semelhante aos outros grupos, não diferindo dos outros pacientes, independente da etiologia.

Em relação aos componentes específicos dos túbulos seminíferos (epitélio, túnica própria, células no lúmen, lúmen vazio e fibrose)(**Tabela 5**), constatou-se redução significativa do percentual de epitélio seminífero e aumento do percentual de túnica própria nos pacientes com OE, VA e OC em relação àqueles com AD (**Tabela 5**). Além disto, observou-se que os lumens nas quatro etiologias não foram diferentes, independente se estavam vazios ou com células soltas no seu interior. Quanto a fibrose, verificou-se maior

percentual nos pacientes com OE, VA e OC em relação àqueles com AD, porém o aumento foi significativo apenas naqueles que tiveram OC.

Já em relação aos componentes intertubulares (vasos sanguíneos, células de Leydig, mastócitos, células do conjuntivo e interstício), nenhuma alteração significativa foi observada quando se compara os componentes avaliados de forma individual. No entanto, em conjunto a proporção de intertúbulo foi significativamente maior nos pacientes com VA e OC, como descrito anteriormente.

Tabela 5. Proporção volumétrica dos componentes tubulares e intertubulares em pacientes azoospérmicos com agenesia de deferente (AD), Orquiepididimite (OE), Varicocele (VA) e orquite por caxumba (OC).

	AD	OE	VA	OC
Parâmetros testiculares (%)				
Túbulo Seminífero	70,14 ± 2,79 ^a	51,09 ± 4,95 ^{ab}	50,25 ± 6,01 ^b	43,38 ± 7,08 ^b
Intertúbulo	29,85 ± 2,79 ^a	48,90 ± 4,95 ^{ab}	49,74 ± 6,01 ^b	56,61 ± 7,08 ^b
Túbulos Seminíferos (%)				
Túnica própria	4,73 ± 0,31 ^a	10,45 ± 4,67 ^b	10,10 ± 1,72 ^b	10,13 ± 5,81 ^{ab}
Epitélio	75,26 ± 1,31 ^a	59,35 ± 26,54 ^b	51,45 ± 8,89 ^b	38,03 ± 13,46 ^b
Células no lúmen	15,24 ± 1,32 ^a	13,97 ± 6,24 ^a	16,25 ± 5,24 ^a	10,81 ± 5,49 ^a
Lúmen vazio	4,52 ± 1,63 ^a	8,71 ± 3,89 ^a	8,01 ± 4,62 ^a	5,30 ± 4,25 ^a
Fibrose	0,22 ± 0,22 ^a	7,50 ± 3,35 ^{ab}	14,15 ± 12,92 ^{ab}	35,70 ± 21,58 ^b
Intertúbulo (%)				
Vaso sanguíneo	4,96 ± 0,90 ^a	4,00 ± 1,01 ^a	3,68 ± 0,94 ^a	3,73 ± 1,21 ^a
Célula de Leydig	3,42 ± 0,57 ^a	2,44 ± 0,47 ^a	3,34 ± 0,63 ^a	3,19 ± 1,63 ^a
Mastócito	0,14 ± 0,04 ^a	0,30 ± 0,16 ^a	0,15 ± 0,05 ^a	0,07 ± 0,04 ^a
Célula do conjuntivo	1,91 ± 0,43 ^a	1,11 ± 0,39 ^a	1,56 ± 0,36 ^a	1,83 ± 0,34 ^a
Interstício	89,54 ± 1,50 ^a	92,13 ± 1,71 ^a	91,25 ± 1,36 ^a	91,16 ± 2,60 ^a

^{a,b} Letras diferentes nas linhas representam diferença significativa (P<0,05)

5.4. Avaliação da túnica própria

Em pacientes com OE, VA e OC, houve espessamento da túnica própria conforme dados morfométricos mostrados anteriormente (**Figura 8 e Tabela 5**). Através de estudos histoquímicos e ultraestruturais demonstrou-se que este espessamento se deve ao aumento da camada fibrilar de fibras de colágeno, posicionados logo abaixo da membrana basal, quando comparados com a túnica própria dos pacientes com AD. Esse espessamento foi demonstrado através de observações ultraestruturais (**Figura 10A-B**) e

coloração com tricrômio de Gomori (**Figura 9A-C**). De forma oposta, observou-se redução da espessura da membrana basal (**Figura 10A-B**) em pacientes com VA e OC, confirmado pela coloração com PAS (**Figura 9B-D**). Nos pacientes com VA e OC foram frequentes os túbulos fibrosados com ausência de células germinativas e células de Sertoli associadas à deposição de colágeno (**Figura 9E**) e ausência de componentes PAS + (**Figura 9F**).

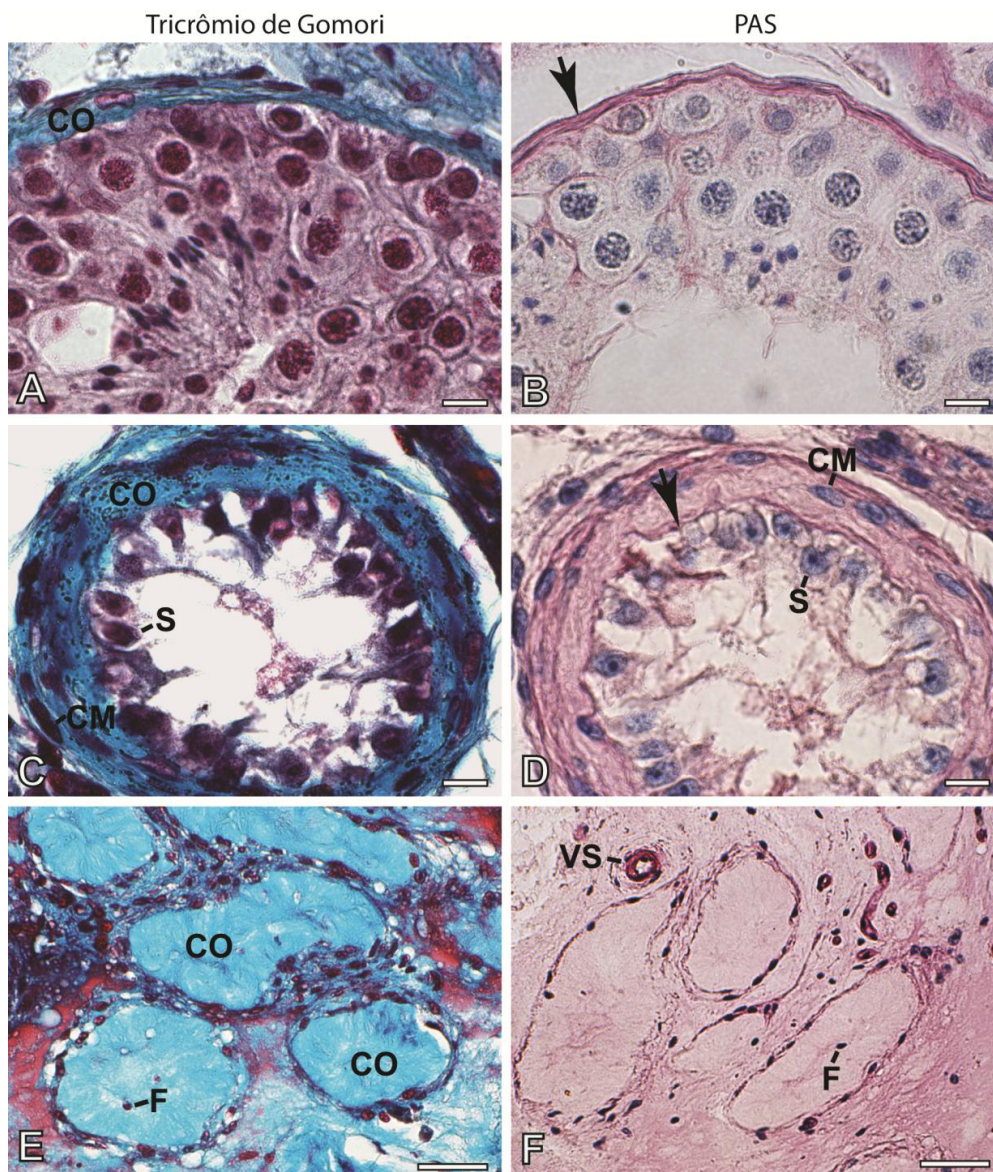


Figura 9. Fotomicrografia de túbulos seminíferos de homens marcados com tricrômio de Gomori (A, C, E) e PAS (B, D, F) mostrando deposição de colágeno (coloração azul) e membrana basal (PAS + / coloração púrpura). A e B mostram túbulos seminíferos preservados com delgada túnica própria com pouca deposição de colágeno (A, CO) e membrana basal PAS + fortemente corada (B, seta). Em C e D, os túbulos só com células de Sertoli com túnica própria espessa com muito depósito de colágeno espesso (CO) e membrana basal PAS + fracamente corada (seta), respectivamente. Em E e F, mostrando um padrão de túbulos fibrosados com deposição total de colágeno (E, azul) e ausência de coloração com PAS (F). CM, célula mioide; S, célula de Sertoli; F, fibroblasto; VS, vaso sanguíneo. Barras: A-D, 10 μ m e E-F, 40 μ m.

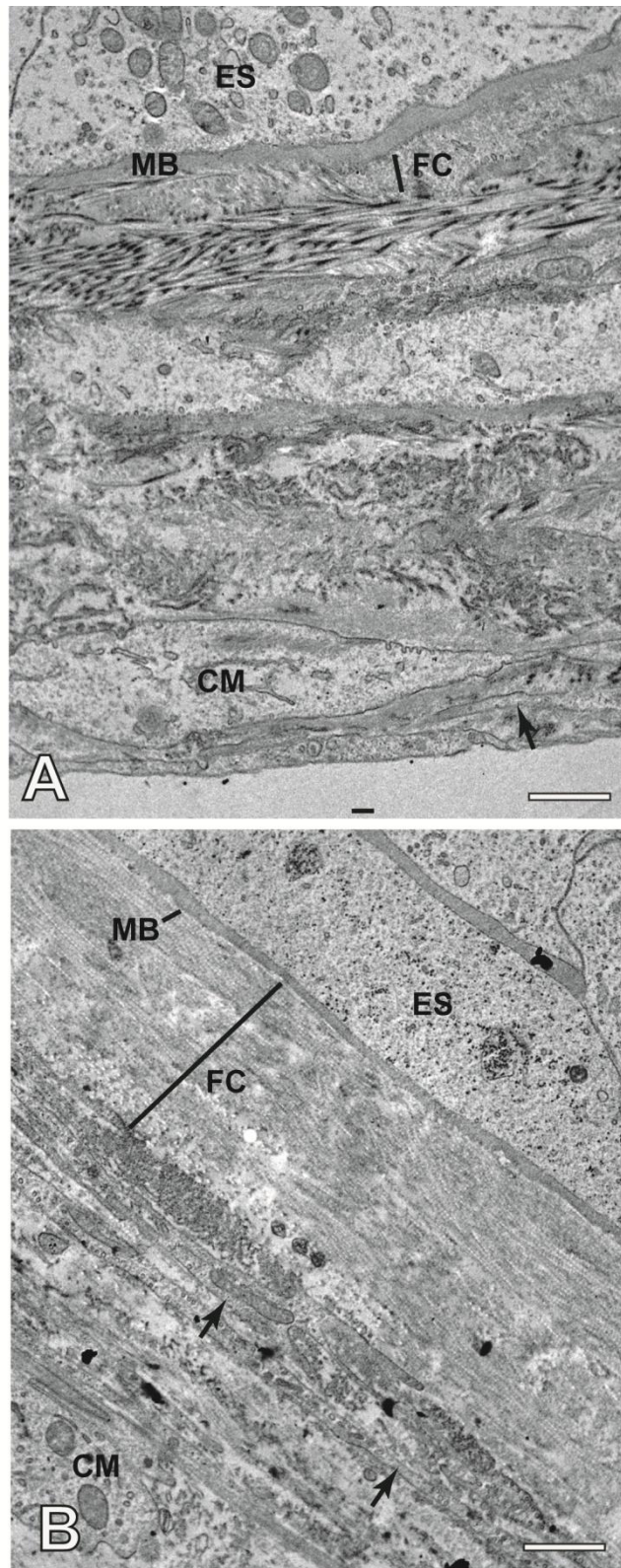


Figura 10. Eletromicrografia comparando a túnica própria de pacientes com agenesia de ducto deferente - AD (A) e varicocele - VA (B) FC, fibras colágenas; ES, epitélio seminífero; CM, células mioídes; Seta, prolongamentos citoplasmáticos da célula mioíde. Barra: 1 μ m.

5.5. Avaliação da proliferação espermatogonial

Para verificar como as diferentes condições patológicas interferem no número e na proliferação espermatogonial, mantendo sua capacidade de suportar o processo espermatogênico, estes parâmetros foram determinados através da expressão do marcador proliferativo MCM7. De forma relativa, constatou-se que o número total de espermatogônias/mm de túbulos seminíferos foi reduzido nos pacientes com VA e OC quando comparados com AD e OE (**Tabela 6**). Apesar de tais achados terem demonstrado efeitos deletérios no número de espermatogônias nos pacientes com VA e OC, a capacidade de proliferação não foi significativamente afetada ($P > 0,05$), uma vez que o índice proliferativo foi mantido. (**Tabela 6**).

Tabela 6. Número total de espermatogônia e índice de proliferação (mediana e interquartis) após marcação imunohistoquímica (MCM7) em pacientes azoospermicos com agenesia de ducto deferente (AD), orquiepididimite (OE), varicocele (VA) e orquite por caxumba (OC).

	AD	OE	VA	OC
Número de espermatogônia				
Total de espermatogônia/mm	6,09 ^a (4.21-8.98)	4,52 ^a (3.30-5.02)	1,55 ^b (0.00-3.91)	0,00 ^b (0.00-3.41)
Índice de proliferação	0,16 ^a (0.005-0.25)	0,14 ^a (0.00-0.24)	0,00 ^a (0.00-0.20)	0,00 ^a (0.00-0.23)

^{a,b} Letras diferentes nas linhas representam diferença significativa ($P < 0,05$)

5.6. Avaliação hormonal

Os níveis de FSH e LH estavam aumentados nos pacientes VA e OC quando comparados com os pacientes com AD e OE, enquanto a concentração sérica de testosterona permaneceu inalterada após a avaliação dos quatro grupos estudados (**Tabela 7**). Apesar dos níveis séricos normais de testosterona em pacientes com VA e OC, o nível de LH tendeu a aumentar com consequente redução da razão T/LH, uma condição conhecida como redução compensada da função das células de Leydig. Com base nestas proporções, o presente estudo mostra que a VA e OC provocam maior prejuízo para a atividade das células de Leydig, mostrando uma relação T/LH reduzida, principalmente naqueles pacientes com OC.

Tabela 7. Medianas e quartis 1 e 3 (entre parênteses) do hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), testosterona e relação testosterona/LH em pacientes azoospérmicos com agenesia de ducto deferente (AD), orquiepididimite (OE), varicocele (VA) e orquite por caxumba (OC).

	AD	OE	VA	OC
FSH (mUI/mL)	3,18 ^a (1.69-5.80)	2,18 ^{ab} (1.68-10.71)	10,58 ^b (4.29-40.41)	15,69 ^b (12.79-19.58)
LH (mUI/mL)	2,25 ^a (1.41-2.79)	2,31 ^a (1.70-2.90)	5,06 ^{ab} (2.11-15.59)	8,58 ^b (5.67-14.89)
Testosterona (ng/dL)	428 ^a (248-451)	311 ^a (250-390)	341 ^a (163-445)	328 ^a (161-688)
Razão (Testosterona/LH)	124 ^a (110-267)	151 ^{ab} (89-267)	88 ^{ab} (27-121)	56 ^b (14-83)

^{a,b} Letras diferentes nas linhas representam diferença significativa (P<0.05)

6. Discussão

Os pacientes selecionados para este estudo procuraram voluntariamente ajuda médica para tentar verificar o motivo do casal não alcançar a gravidez. Foram diagnosticados como azoospérmicos, isto é, com ausência de espermatozoides no ejaculado. A avaliação morfofuncional do parênquima testicular destes pacientes demonstrou que as causas etiológicas que provocaram a azoospermia foram variadas, sendo algumas por obstrução de parte da via espermática enquanto outras por depleção da espermatogênese devido ao efeito de diversos agentes externos. Investigando a literatura relacionada com este tema verificamos que as publicações abordam principalmente diagnóstico clínico da azoospermia, não determinando os locais dentro do sistema reprodutor masculino diretamente afetados pelos agentes etiológicos (Okada et al, 1999; Chen et al., 2004; Lee et al., 2009; Davis et al., 2010; Yung et al., 2011; Yu et al., 2012; Mo et al., 2013; Pilatz et al., 2013; Pilatz et al., 2014; Bachir e Jarvi, 2014; Neto et al., 2016)

A análise pormenorizada do parênquima testicular, avaliando a integridade dos componentes tubulares e intertubulares, assim como a funcionalidade das células germinativas e somáticas, poderia apontar para os locais específicos em que estariam comprometendo a homeostasia testicular. A determinação do local afetado poderia auxiliar em um diagnóstico e tratamento mais assertivos o que aumentaria a esperança destes indivíduos de se tornarem pais biológicos. Neste sentido, o presente estudo avaliou detalhes do parênquima testicular, através de avaliações morfológicas, morfométricas e funcionais, procurando determinar de forma mais específica onde estaria comprometida a função testicular.

Para avaliar as alterações morfológicas e morfométricas da espermatogênese humana num nível citológico mais acurado, foi selecionado métodos de processamento de qualidade compatível. As biópsias testiculares foram fixadas em glutaraldeído e incluídas em resina plástica à base de glicol metacrilato demonstra ser mais seguro no diagnóstico de escores histopatológicos da espermatogênese (Reis, 2012). Reforçando esta escolha, estudo recente (Chiarini-Garcia et al., 2017) tem demonstrado que quando comparado aos processamentos clássicos, com fixação em formalina ou solução em Bouin e inclusão em parafina, os resultados morfológicos e morfométricos obtidos podem ser comparados,

desde que se utilize para alguns parâmetros, fatores de correção. De fato, comparando os resultados com os da literatura, devido à melhor qualidade citológica, mostrou-se neste estudo, com mais detalhe e confiança as diferentes alterações da espermatogênese nas patologias estudadas, possibilitando um diagnóstico citológico mais confiável.

São inúmeras as causas que levam à azoospermia, mas para o presente estudo foram selecionadas aquelas mais comumente encontradas. Duas delas devido à azoospermia obstrutiva, na qual os pacientes possuem agenesia bilateral de ducto deferente (AD) impedindo a passagem dos espermatozoides para o ejaculado e a orquiepididimite (OE), onde alguma parte da via espermática pode ser obstruída devido à infecção bacteriana do testículo e/ou epidídimo. Outras duas foram azoospermias não obstrutivas, devido à varicocele (VA), que provoca aumento da temperatura do testículo em consequência de alteração da vascularização e orquite por caxumba (OC), inflamação provocada por vírus.

Ao avaliar os testículos destes pacientes utilizando os mesmos métodos aplicados na patologia clínica, foi determinado três diferentes tipos de escores histopatológicos da espermatogênese. A determinação destes escores teve como objetivo criar parâmetro da classificação histopatológica clínica destes pacientes para posterior comparação com os resultados morfológicos, morfométricos e funcionais determinados nos testículos destes mesmos pacientes. Foram eles: os escores de Cinco Padrões (Levin, 1979; McLachlan et al., 2007), o mais empregada no Brasil nas avaliações histopatológicas do testículo, bem como os escores de Johnsen (1970) e de Bergmann (Bergmann et al., 1994; Bergmann e Kliesch, 2010). As avaliações histopatológicas demonstraram, de forma comparativa, que as quatro etiologias aqui estudadas foram evidentemente diferentes. Nos pacientes com azoospermia obstrutiva (AD e OE) os escores foram maiores (Cinco padrões- 4, Johnsen-8 e Bergmann-8), caracterizando espermatogênese relativamente bem preservada, mas com um certo grau de hipospermatogênese. Por outro lado, os pacientes com azoospermia não-obstrutiva (VA e OC) tiveram escores significativamente mais baixos, ou tendiam para ele (Cinco padrões-3, Johnsen-4 e Bergmann-3), demonstrando maior comprometimento do epitélio seminífero. Esses achados, por si, predizem prognósticos específicos entre as diferentes patologias considerando a probabilidade destes pacientes poderem ou não se tornar pais biológicos através da reprodução assistida. Mas, como já discutido anteriormente, estes escores apesar de indicarem comprometimento da função testicular

de forma diferenciada entre as patologias, não fornecem informações detalhadas sobre componentes de tecido e/ou células testiculares que foram prejudicadas. Desta forma, apesar dos escores indicarem alterações diferenciadas do testículo, eles não permitem uma compreensão adequada dos locais afetados, considerando a intrincada complexidade do parênquima testicular e da espermatogênese.

Avaliações morfológicas e quantitativas do parênquima testicular mostraram que o impacto negativo de cada etiologia avaliada seguiu um padrão peculiar. Em pacientes azoospermicos, devido apenas à interrupção da passagem do espermatozoide pela ausência do canal deferente (AD), os testículos apresentam parâmetros quase normais, mostrando predominância do epitélio seminífero com espermatogênese completa. No entanto, quanto à OE bacteriana, causa da azoospermia devido à obstrução de partes da via espermática, a área de epitélio germinativo foi reduzida em associação com o espessamento da túnica própria. Diferentemente do observado por outros (Lu et al., 2013; Sliwa et al., 2014), no presente estudo os pacientes com OE não apresentaram túbulos seminíferos com presença apenas de células de Sertoli. Achados similares foram observados em testículos de roedores submetidos à inflamação aguda e crônica experimental que caracterizam a fisiopatologia da orquiepididimite (Noguchi et al., 2013, Pilatz et al., 2013, Śliwa et al., 2014). Apesar de apresentar diferenças, essas duas etiologias (AD e OE) apresentam bom prognóstico de recuperação de espermatozoides via cirúrgica ou por aspiração, uma vez que o epitélio seminífero permanece bem preservado com as células germinativas atingindo o estágio de espermátides alongadas e produzindo grande quantidade de espermatozoides.

Nos pacientes com azoospermia não-obstrutiva devido a VA e OC, os efeitos deletérios sobre a espermatogênese foram graves, semelhantes ao descrito previamente por outros (Albrecht, 2009, Davis et al., 2010), mas que nestes casos foram descritos principalmente por avaliações clínicas. No o presente estudo, observou-se as alterações histológicas, em ambas as patologias, estão relacionadas principalmente à redução significativa da área do epitélio seminífero e o aumento da espessura da túnica própria. Além disso, observou-se nestes casos um número reduzido de túbulos seminíferos nos quais as células germinativas mais avançadas alcançam espermátides alongadas, associadas a altas proporções de fibrose tubular. Especificamente em relação aos pacientes com VA, essas alterações foram variáveis no parênquima testicular entre os pacientes,

estando diretamente associadas ao grau de severidade da alteração vascular, diferentemente do observado anteriormente por Saleh et al., (2010) que não determinou correlação entre o grau da VA com o grau de comprometimento histopatológico. Já em pacientes com OC, demonstramos morfológicamente, de forma inédita, que todos os pacientes tinham o parênquima testicular severamente afetado, com um claro aumento no número de túbulos seminíferos fibróticos. . Vale ressaltar, que em um dos pacientes com OC avaliado foram encontradas ilhas de túbulos seminíferos com espermatogênese completa e aleatoriamente espalhadas pelo parênquima testicular, demonstrando que alguns pacientes podem não ter depleção completa da espermatogênese. Nestes casos, ainda existe alguma chance de recuperação de espermatozoides através de busca cirúrgica destes focos de espermatogênese pelo método de micro-Tese.

É bem sabido que as alterações típicas na composição da túnica própria estão relacionadas com a deficiência de espermatogênese (Albrecht, 2009; Mayerhofer, 2013). Desta forma, o espessamento da túnica própria tem sido uma característica da infertilidade masculina, embora não esteja claro se a hipertrofia da túnica é de fato a base da infertilidade ou apenas o resultado de outros eventos primários. No presente estudo, comparando as alterações testiculares devido às diferentes etiologias, demonstrou-se que a obstrução da liberação de espermatozoide por si só não causa alterações da túnica própria, uma vez que em pacientes com AD ela estava bem preservada. No entanto, nos demais grupos avaliados, nos quais os pacientes sofreram lesões devido a efeitos externos (OE, VA e OC), a túnica própria foi significativamente mais espessa, com extenso depósito de fibras de colágeno. De fato, estes resultados confirmam estudos prévios mostrando alterações da túnica própria em pacientes com VA (Santoro et al., 2000) e descrevem, pela primeira vez, seu espessamento em pacientes após infecção viral por OC. Adicionalmente demonstramos, pela primeira vez, que a inflamação bacteriana do testículo, que leva à OE e obstrução de parte das vias espermáticas, também provoca espessamento da túnica própria, apesar do comprometimento leve da espermatogênese.

A fase proliferativa da espermatogênese, que contém as células tronco espermatogoniais, é diretamente responsável pela manutenção do número de espermatozoides produzidos por mitoses espermatogoniais (Phillips et al., 2010). Assim, uma maneira eficaz de prever a capacidade dos testículos para produzir espermatozoides seria através da avaliação da capacidade destas células espermatogoniais de se dividirem.

Comparando o número de espermatogônias e sua capacidade de proliferação, os pacientes com azoospermia obstrutiva e não-obstrutiva apresentaram resultados diferentes. Em pacientes obstrutivos portadores de AD e OE o número de espermatogônias foi de aproximadamente 5,3/mm enquanto que em pacientes não-obstrutivos, com VA e OC, o número médio foi de 0,75/mm mostrando redução significativa na população espermatogonial. Embora não se relacionem com origem etiológica específica, os estudos desenvolvidos por Steger et al. (1998) e Bar-Shira Maymon et al. (2003) mostraram baixa eficiência espermatogênica em homens inférteis justamente devido à diminuição da atividade mitótica de espermatogônias. Desta forma, o presente estudo mostrou que os efeitos mais deletérios sobre a atividade proliferativa espermatogonial foram devido ao aumento da temperatura testicular (VA) e de infecções virais (OC), embora não tenham sido suficientemente graves para extinguir por completo sua capacidade de se dividir. De fato, alguns focos de túbulos seminíferos com espermatogônias foram vistos em pacientes com VA e OC, alguns deles com a espermatogênese atingindo a produção de espermatozoides. Apesar de um mal prognóstico, a manutenção da capacidade proliferativa abre uma janela de esperança para aqueles homens que querem se tornar pais biológicos, isolando e cultivando as espermatogônias restantes à procura de técnicas de reprodução assistida. De fato, estudos recentes (He et al., 2010, Nickkholgh et al., 2014, Yango et al., 2014, Mirzapour et al., 2016) trouxeram alguma luz a essa possibilidade.

A detecção de níveis séricos elevados de FSH e LH nos pacientes com VA e OC sugere deficiências das células de Sertoli e Leydig, respectivamente. Sabe-se que o FSH suporta a espermatogênese (Walker e Cheng, 2005) e, nos seres humanos, altos níveis de FSH estão correlacionados com a baixa eficiência da espermatogênese (Johnson et al., 1990, Kula, 1991). No presente estudo, nossos dados mostram que os defeitos vasculares com elevação da temperatura testicular e infecção por vírus podem afetar severamente a funcionalidade das células de Sertoli prejudicando sua capacidade de responder ao FSH e, portanto, não mantendo a espermatogênese funcionando adequadamente. No caso das células de Leydig, observou-se que, embora a concentração sérica de testosterona fosse normal em pacientes com VA e OC, a concentração de LH estava aumentada. Assim, assumimos que para manter a testosterona num nível normal nesses pacientes, foi necessária maior concentração sérica de LH o que resulta em redução da razão T/ LH, indicando hiperfunção compensada das células de Leydig. Esse mecanismo de compensar

deficiência da atividade das células de Leydig também foi demonstrado em pacientes idosos (Tajar et al., 2010) e oligospérmicos (Andersson et al., 2004; Jorgensen et al., 2016).

Portanto, avaliando pacientes de uma população específica, o presente estudo demonstrou de forma comparativa e seguindo método padronizado de processamento e análise, que os testículos de pacientes azoospérmicos de diferentes origens etiológicas apresentaram peculiaridades morfofuncionais. A azoospermia obstrutiva (AD e OE) foi menos prejudicial para a espermatogênese e a funcionalidade das células de Sertoli e Leydig, com bom prognóstico para obtenção de espermatozoides, enquanto a azoospermia não obstrutiva (VA e OC) causou graves danos ao epitélio seminífero, prejudicando a espermatogênese e reduzindo a chance de se obter espermatozoides para a reprodução assistida. Em relação à funcionalidade espermatogonial, embora VA e OC tenham interferido negativamente na proliferação das espermatogônias, sua capacidade de divisão não se extinguiu por completo, mantendo, pelo menos em alguns pacientes focos de túbulos seminíferos com espermatogênese em andamento. Tais focos de túbulos seminíferos poderiam, neste pacientes, ser alcançados por método cirúrgico de micro-Tese para pesquisa direta de espermatozoides ou isolamento de espermatogônias para proliferação *in vitro*.

7. Conclusões

- As azoospermias obstrutivas (AD e OE) foram menos prejudiciais para a espermatogênese com bom prognóstico para obtenção de espermatozoides para a reprodução assistida;

- As azoospermias não-obstrutivas (VA e OC) provocaram depleção severa da espermatogênese com baixa produção espermática em alguns pacientes enquanto em outros nenhuma e, desta forma, com pior prognóstico para obtenção de espermatozoides;

- As células de Sertoli e de Leydig tiveram suas funcionalidades alteradas nos pacientes com VA e OC;

- O número de espermatogônias e sua capacidade de proliferar foram preservados nos pacientes com AD e OE e estando reduzidas ou ausentes nos pacientes com VA e OE;

- O impacto negativo da VA na espermatogênese foi proporcional ao grau de comprometimento da vascularização testicular;

- Os pacientes que sofreram lesões devido a efeitos externos (OE, VA e OC), tiveram a tunica propria significativamente mais espessa, com extenso depósito de fibras de colágeno.

- A OC foi a que apresentou processo espermatogênico mais prejudicado, com pior prognóstico na recuperação de espermatozoides.

- Os pacientes com OC apesar de terem o testículo severamente afetado, ainda apresentam alguns poucos focos de espermatogênese normal, possibilitando a coleta de espermatozoides para serem aplicados na reprodução assistida, que poderia torná-los pais biológicos.

8. Referências Bibliográficas

- Abdel Raheem A, Garaffa G, Rushwan N, De Luca F, Zacharakis E, Raheem TA, Freeman A, Serhal P, Harper JC & Ralph D** 2012 Testicular histopathology as a predictor of a positive sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia. *BJU Int.* **5** 1-7.
- Abd-Elmoaty MA, Saleh R, Sharma R & Agarwal A** 2010 Increased levels of oxidants and reduced antioxidants in semen of infertile men with varicocele. *Fertil Steril* **94** 1531-1534.
- Abdelrahim F, Mostafa A, Hamdy A, Mabrouk M, el-Kholy M & Hassan O** 1993 Testicular morphology and function in varicocele patients: pre-operative and post-operative histopathology. *Br J Urol* **72** 643-647.
- Abercrombie M** 1946 Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec* **94** 239-247.
- Agarwal A, Sharma R, Durairajanayagam D, Ayaz A, Cui Z, Willard B, Gopalan B & Sabanegh E** 2015a Major protein alterations in spermatozoa from infertile men with unilateral varicocele. *Reprod Biol Endocrinol* **13** 8.
- Agarwal A, Sharma R, Durairajanayagam D, Cui Z, Ayaz A, Gupta S, Willard B, Gopalan B & Sabanegh E** 2015b Differential proteomic profiling of spermatozoal proteins of infertile men with unilateral or bilateral varicocele. *Urology* **85** 580-588.
- Ahmed AF, Abdel-Aziz AS, Maarouf AM, Ali M, Emar AA & Gomaa A** 2015 Impact of varicocelectomy on premature ejaculation in varicocele patients. *Andrologia* **47** 276-281.
- Albrecht M** 2009 Insights into the nature of human testicular peritubular cells. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger* **191** 532-540.
- Albuquerque AV, Almeida FR, Weng CC, Shetty G, Meistrich ML & Chiarini-Garcia H** 2013 Spermatogonial behavior in rats during radiation-induced arrest and recovery after hormone suppression. *Reproduction* **146** 363-376.
- Amann R & Almquist J** 1962 Reproductive Capacity of Dairy Bulls. VIII. Direct and Indirect Measurement of Testicular Sperm Production 1, 2, 3. *Journal of Dairy Science* **45** 774-781.
- Amat P, Paniagua R & Montero J** 1985 Seminiferous tubule degeneration in human cryptorchid testes. *J Androl* **6** 1-9.
- Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR & Daszak P** 2004 Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol Evol* **19** 535-544.
- Aquila S, Montanaro D, Guido C, Santoro M, Perrotta I, Gervasi S, De Amicis F & Lanzino M** 2015 Human sperm molecular anatomy: the enzyme 5 α -reductase (SRD5A) is present in the sperm and may be involved in the varicocele-related infertility. *Histochemistry and cell biology* **144** 67-76.
- Arenas MI, Bethencourt FR, De Miguel MP, Fraile B, Romo E & Paniagua R** 1997 Immunocytochemical and quantitative study of actin, desmin and vimentin in the peritubular cells of the testes from elderly men. *J Reprod Fertil* **110** 183-193.

- Augarten A, Weissenberg R, Pariente C & Sack J** 1991 Reversible male infertility in late onset congenital adrenal hyperplasia. *Journal of endocrinological investigation* **14** 237-240.
- Bachir BG & Jarvi K** 2014 Infectious, inflammatory, and immunologic conditions resulting in male infertility. *Urol Clin North Am* **41** 67-81.
- Baker H.** 1994 Life-threatening conditions associated with male infertility" *Clinical Male Infertility. Reprod. Fert Dev. Jarrow JP: Urol Clin North Am.* **21** 409-15.
- Bar-Shira Maymon B, Yogev L, Yavetz H, Lifschitz-Mercer B, Schreiber L, Kleiman SE, Botchan A, Hauser R & Paz G** 2003 Spermatogonial proliferation patterns in men with azoospermia of different etiologies. *Fertil Steril* **80** 1175-1180.
- Bartak V** 1973 Sperm count, morphology and motility after unilateral mumps orchitis. *Journal of reproduction and fertility* **32** 491-494.
- Beard C, Benson Jr R, Kelalis P, Elveback L & Kurland L.** 1977. The incidence and outcome of mumps orchitis in Rochester, Minnesota, 1935 to 1974. In *Mayo Clinic Proceedings*, pp. 3-7.
- Benoff S & Gilbert BR** 2001 Varicocele and male infertility: part I. *Human reproduction update* **7** 47-54.
- Berger R, Alexander E, Harnisch J, Paulsen C, Monda G, Ansell J & Holmes KK** 1979 Etiology, manifestations and therapy of acute epididymitis: prospective study of 50 cases. *The Journal of urology* **121** 750-754.
- Bergmann M, Behre HM & Nieschlag E** 1994 Serum FSH and testicular morphology in male infertility. *Clin Endocrinol (Oxf)* **40** 133-136.
- Bergmann M & Kliesch S** 2010. Testicular biopsy and histology. In *Andrology*, pp. 155-167.
- Bjorvatn B** 1973 Mumps virus recovered from testicles by fine-needle aspiration biopsy in cases of mumps orchitis. *Scandinavian journal of infectious diseases* **5** 3-5.
- Blevrakis E, Chatzidarellis E, Anyfantakis D, Sakellaris G, Raissaki M, Zoras O, Mamoulakis C, Sofras F & Chrysos E** 2016 Impact of varicocele on biological markers of gonadal function. *Hernia* **20** 435-439.
- Boström K & Andersson L** 1971 Creatine phosphokinase relative to acid phosphatase, lactate dehydrogenase, zinc and fructose in human semen with special reference to chronic prostatitis. *Scandinavian journal of urology and nephrology* **5** 123-132.
- Braedel HU, Steffens J, Ziegler M, Polsky MS & Platt ML** 1994 A possible ontogenic etiology for idiopathic left varicocele. *J Urol* **151** 62-66.
- Bustos-Obregon E & Courot M** 1974 Ultrastructure of the lamina propria in the ovine seminiferous tubule. Development and some endocrine considerations. *Cell Tissue Res* **150** 481-492.
- Candel S** 1951 Epididymitis in mumps, including orchitis: further clinical studies and comments. *Ann Intern Med* **34** 20-36.
- Campolo F, Gori M, Favaro R, Nicolis S, Pellegrini M, Botti F, Rossi P, Jannini EA & Dolci S** 2013 Essential role of Sox2 for the establishment and maintenance of the germ cell line. *Stem Cells* **31** 1408-1421.

- Carrara R, Yamasaki R, Braganca W, Raskin S, Sartorato E & Pina-Neto J** 2005 Etiologic investigations on male infertility before intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Genetic counseling (Geneva, Switzerland)* **17** 385-389.
- Chen CH, Lee SS, Chen DC, Chien HH, Chen I, Chu YN, Liu JY, Chen WH & Wu GJ** 2004 Apoptosis and kinematics of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. *Journal of andrology* **25** 348-353.
- Chiarini-Garcia H, Lima MY, Reis AB, Martello R, Nihl F, Gomes ML & Almeida FR** 2017 Influence of three different histological methods on the morphology and morphometrical data in human testis. *Histol Histopathol* **32** 27-34.
- Chiarini-Garcia H, Parreira GG & Almeida FR** 2011 Glycol methacrylate embedding for improved morphological, morphometrical, and immunohistochemical investigations under light microscopy: testes as a model. *Methods Mol Biol* **689** 3-18.
- Chiarini-Garcia H & Russell L** 2002 Characterization of mouse spermatogonia by transmission electron microscopy. *Reproduction* **123** 567-577.
- Clermont Y** 1963 The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Developmental Dynamics* **112** 35-51.
- Clermont Y** 1966 Renewal of spermatogonia in man. *Developmental Dynamics* **118** 509-524.
- Cil AS, Bozkurt M, Bozkurt DK & Gok M** 2015 Investigating the relationship between persistent reflux flow on the first postoperative day and recurrent varicocele in varicocelectomy patients. *Journal of clinical medicine research* **7** 29.
- Coban S, Keles I, Biyik I, Guzelsoy M, Turkoglu AR & Ocak N** 2015 Does varicocele correction lead to normalization of preoperatively elevated mean platelet volume levels? *Canadian Urological Association Journal* **9** E5.
- Coelho, C** 2009 Tabaco e infertilidade masculina. *Acta Med Port* **22** 753-758.
- Com, E.& A. D. Rolland** 2006 Identification, molecular cloning, and cellular distribution of the rat homolog of minichromosome maintenance protein 7 (MCM7) in the rat testis. *Mol Reprod Dev* **73** 7 866-877.
- Cooperberg MR, Chi T, Jad A, Cha I & Turek PJ** 2005 Variability in testis biopsy interpretation: implications for male infertility care in the era of intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and sterility* **84** 672-677.
- Cornu J-N & Bruyère F** 2015 Acute epididymitis: what you think is not always what you get. *European urology* **68** 436-437.
- Darby IA & Hewitson TD** 2007 Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *International review of cytology* **257** 143-179.
- Daudin M, Bieth E, Bujan L, Massat G, Pontonnier F & Mieusset R** 2000 Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counseling. *Fertil Steril* **74** 1164-1174.

- Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF & Seidl K** 1990 Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res* **262** 253-261.
- Davis NF, McGuire BB, Mahon JA, Smyth AE, O'Malley KJ & Fitzpatrick JM** 2010 The increasing incidence of mumps orchitis: a comprehensive review. *BJU Int* **105** 1060-1065.
- De Kretser D, Kerr J & Paulsen C** 1975a The peritubular tissue in the normal and pathological human testis. An ultrastructural study. *Biology of reproduction* **12** 317-324.
- Dohle G** 2003 Inflammatory-associated obstructions of the male reproductive tract. *Andrologia* **35** 321-324.
- Domes T, Lo KC, Grober ED, Mullen JBM, Mazzulli T & Jarvi K** 2012 The incidence and effect of bacteriospermia and elevated seminal leukocytes on semen parameters. *Fertility and sterility* **97** 1050-1055.
- Drumond AL, Meistrich ML & Chiarini-Garcia H** 2011 Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: a high-resolution light microscopy approach. *Reproduction* **142** 145-155.
- Durglishvili G & Galdava G** 2013 Influence of epididymitis on reproductive function. *Georgian Med News* **78** 32-35.
- Erpenbach K** 1991 Systemic treatment with interferon-alpha 2B: an effective method to prevent sterility after bilateral mumps orchitis. *The Journal of urology* **146** 54-56.
- Evers JL & Collins JA** 2003 Assessment of efficacy of varicocele repair for male subfertility: a systematic review. *The Lancet* **361** 1849-1852.
- Feldstein JD, Johnson FR, Kallick CA & Doolas A** 1974 Acute hemorrhagic pancreatitis and pseudocyst due to mumps. *Annals of surgery* **180** 85.
- França LR & Chiarini-Garcia H** 2005 Célula de Sertoli. In: Carvalho HF, Collares-Buzato CB. Células: uma abordagem multidisciplinar. Manole. **24** 302-324.
- Franca LR, Hess RA, Dufour JM, Hofmann MC & Griswold MD** 2016 The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology* **4** 189-212.
- Gall EA** 1947 The histopathology of acute mumps orchitis. *The American journal of pathology* **23** 637.
- Gat Y, Bachar GN, Zukerman Z, Belenky A & Gornish M** 2004 Varicocele: a bilateral disease. *Fertility and sterility* **81** 424-429.
- Giagulli V & Vermeulen A** 1988 Leydig cell function in infertile men with idiopathic oligospermic infertility. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **66** 62-67.
- Glina S, Soares JB, Antunes Jr N, Galuppo AG, Paz LB & Wonchockier R** 2005 Testicular histopathological diagnosis as a predictive factor for retrieving spermatozoa for ICSI in non-obstructive azoospermic patients. *International braz j urol* **31** 338-341.
- Goldstein M & Schlossberg S** 1988 Men with congenital absence of the vas deferens often have seminal vesicles. *The Journal of urology* **140** 85-86.

Gorelick JI & Goldstein M 1993 Loss of fertility in men with varicocele. *Fertil Steril* **59** 613-616.

Gressner OA, Rizk MS, Kovalenko E, Weiskirchen R & Gressner AM 2008 Changing the pathogenetic roadmap of liver fibrosis? Where did it start; where will it go? *Journal of gastroenterology and hepatology* **23** 1024-1035.

Haider SG, Passia D, Servos G & Hettwer H 1986 Electron microscopic evidence for deep invaginations of the lamina propria towards the seminiferous tubule lumen in a patient with varicocele. *Int J Androl* **9** 27-37.

Haider SG, Talati J & Servos G 1999 Ultrastructure of peritubular tissue in association with tubular hyalinization in human testis. *Tissue Cell* **31** 90-98.

Hargreave T 2000 Genetic basis of male fertility. *British Medical Bulletin* **56** 650-671.

He Z, Kokkinaki M, Jiang J, Dobrinski I & Dym M 2010 Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. *Biol Reprod* **82** 363-372.

Hedger MP 2011 Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. *Journal of andrology* **32** 625-640.

Heikens J, Behrendt H, Adriaanse R & Berghout A 1996 Irreversible gonadal damage in male survivors of pediatric Hodgkin's disease. *Cancer* **78** 2020-2024.

Heller C & Clermont Y 1964 Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent progress in hormone research* **20** 545-575.

Hentrich A, Wolter M, Szardening-Kirchner C, Lüers GH, Bergmann M, Kliesch S & Konrad L 2011 Reduced numbers of Sertoli, germ, and spermatogonial stem cells in impaired spermatogenesis. *Modern Pathology* **24** 1380-1389.

Holstein AF, Schulze W & Davidoff M 1988 Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* **1** 107.

Hviid, A. & S. Rubin 2008 Mumps. *Lancet* 371**9616**: 932-944.

Inci, K. & L. M. Gunay 2013 The role of varicocele treatment in the management of non obstructive azoospermia. *Clinics (Sao Paulo)* **68** Suppl **1** 89-98.

Jalal, H. & G. Bahadur 2004 Mumps epididymo-orchitis with prolonged detection of virus in semen and the development of anti-sperm antibodies. *J Med Virol* **73** **1** 147-150.

Jarow, J. P 2001 Effects of varicocele on male fertility. *Hum Reprod Update* **7** **1** 59-64.

Johnsen, S. G. & P. Agger 1978 Quantitative evaluation of testicular biopsies before and after operation for varicocele. *Fertil Steril* **29** **1** 58-63.

Johnsen GJ 1970 Testicular Biopsy Score Count – A method for Registration of Spermatogenesis in Human Testes: Normal Values and Results in 335 Hypogonadal Males. *Hormones*.**12-25**.

- Johnson, L. & J. S. Grumbles** 1990 Increased germ cell degeneration during postprophase of meiosis is related to increased serum follicle-stimulating hormone concentrations and reduced daily sperm production in aged men. *Biol Reprod* 42 2 281-287.
- Johnson, E. M. & Y. Kinoshita** 2003 A new member of the MCM protein family encoded by the human MCM8 gene, located contrapodal to GCD10 at chromosome band 20p12.3-13. *Nucleic Acids Res* 31 11 2915-2925.
- Jorgensen, N. & U. N. Joensen** 2016 Compensated reduction in Leydig cell function is associated with lower semen quality variables: a study of 8182 European young men. *Hum Reprod* 31 5 947-957.
- Kadioglu, A. & A. Tefekli** 2001 Microsurgical inguinal varicocele repair in azoospermic men. *Urology* 57 2 328-333.
- Kadish, H. A. & R. G. Bolte** 1998 A retrospective review of pediatric patients with epididymitis, testicular torsion, and torsion of testicular appendages. *Pediatrics* 102 1 Pt 1 73-76.
- Kaver, I. & H. Matzkin** 1990 Epididymo-orchitis: a retrospective study of 121 patients. *J Fam Pract* 30 5 548-552.
- Karnovsky, MJA** 1965 A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27 137A-138A.
- Kaufman, J. J. & P. T. Bruce** 1963 Testicular atrophy following mumps. A cause of testis tumour? *Br J Urol* 35 67-69.
- Kearsey, S. E. & D. Maiorano** 1996 The role of MCM proteins in the cell cycle control of genome duplication. *Bioessays* 18 3 183-190.
- Kim ED & Lipshultz LI** 1999) Evaluation and imaging of the infertile male. In: *Reprod Clin North Am.* 10 377-409.
- Krieger, J. N. & R. E. Berger** 1996 Seminal fluid findings in men with nonbacterial prostatitis and prostatodynia. *J Androl* 17 3 310-318.
- Ku, J. H. & Y. H. Kim** 1999 The preventive effect of systemic treatment with interferon alpha2B for infertility from mumps orchitis. *BJU Int* 84 7 839-842.
- Kula, K.** 1991 Hyperactivation of early steps of spermatogenesis compromises meiotic insufficiency in men with hypergonadotropism. A possible quantitative assay for high FSH/low testosterone availabilities. *Andrologia* 23 2 127-133.
- Lang, T. & M. Dechant** 2013 Structural and functional integrity of spermatozoa is compromised as a consequence of acute uropathogenic E. coli-associated epididymitis. *Biol Reprod* 89 3 59.
- Le Goffic & R., T. Mouchel** 2003 Mumps virus decreases testosterone production and gamma interferon-induced protein 10 secretion by human leydig cells. *J Virol* 77 5 3297-3300.
- Leblond, C. P. & Y. Clermont** 1952 Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci* 55 4 548-573.

- Lee, R. & P. S. Li** 2009 A decision analysis of treatments for nonobstructive azoospermia associated with varicocele. *Fertil Steril* 92 1 188-196.
- Levin, H. S** 1979 Testicular biopsy in the study of male infertility: its current usefulness, histologic techniques, and prospects for the future. *Hum Pathol* 10 5 569-584.
- Lin, Y. M. & C. C. Hsu** 1999 Successful testicular sperm extraction and fertilization in an azoospermic man with postpubertal mumps orchitis. *BJU Int* 83 4 526-527.
- Lu Y, Bhushan S, Tchatalbachev S, Marconi M, Bergmann M, Weidner W, Chakraborty T & Meinhardt A** 2013 Necrosis is the dominant cell death pathway in uropathogenic *Escherichia coli* elicited epididymo-orchitis and is responsible for damage of rat testis. *PLoS ONE* 8 e52919.
- Lustig, L. & B. Denduchi** 2000 Passive immunization with anti-laminin immunoglobulin G modifies the integrity of the seminiferous epithelium and induces arrest of spermatogenesis in the guinea pig. *Biol Reprod* 62 6 1505-1514.
- Liew, S. H. & S. J. Meachem** 2007 A stereological analysis of the response of spermatogenesis to an acute inflammatory episode in adult rats. *J Androl* 28 1 176-185.
- Luzzi, G. A. & T. S. O'Brien** 2001 Acute epididymitis. *BJU Int* 87 8 747-755.
- Manson, A. L.** 1990 Mumps orchitis. *Urology* 36 4 355-358.
- Masson, P. & R. E. Brannigan** 2014 The varicocele. *Urol Clin North Am* 41 1 129-144.
- Martello R & Camargos AF** 2001 Propedêutica básica da infertilidade conjugal. In: *Ginecologia Ambulatorial*. 505-517.
- McLachlan RI, De meyts ER & Kretser DM** 2007 Histological evaluation of the human testis-approaches to optimizing the clinical value of the assessment: Mini Review. *Hum Reprod*. 22 2-16.
- McLachlan** 2002 Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Progress in Hormone Research*. 57 1 ,149-179.
- McVicar, C. M. & D. A. O'Neill** 2005 Effects of vasectomy on spermatogenesis and fertility outcome after testicular sperm extraction combined with ICSI. *Hum Reprod* 20 10 2795-2800.
- Mayerhofer, A** 2013 Human testicular peritubular cells: more than meets the eye." *Reproduction* 145 5 R107-R116.
- Maymon, B. B. & L. Yogev** 2002 Sertoli cell maturation in men with azoospermia of different etiologies." *Fertil Steril* 77(5): 904-909.
- Meng, M. V. & L. D. Black** 2001 Impaired spermatogenesis in men with congenital absence of the vas deferens. *Hum Reprod* 16 3 529-533.
- Menkveld, R. & P. Huwe** 2003 Morphological sperm alternations in different types of prostatitis. *Andrologia* 35 5 288-293.

- Mirzapour, T. & T. Tengku Ibrahim** 2016 Morphological and ultrastructural studies of human spermatogonial stem cells from patients with maturation arrest. *Andrologia*
- Mo, B. & V. Garl** 2013 A case of congenital unilateral absence of the vas deferens. *Int Med Case Rep J* **6** 21-23.
- Morales, E. & R. Horn** 2004 Involution of seminiferous tubules in aged hamsters: an ultrastructural, immunohistochemical and quantitative morphological study. *Histol Histopathol* **19** **2** 445-455.
- Mostafa, T. & L. A. Rashed** 2015 Seminal plasma oxytocin and oxidative stress levels in infertile men with varicocele. *Andrologia* **47** **2** 209-213.
- Mucsi, I. & Rosivall, L** 2007 Epithelial–mesenchymal transition in renal tubular cells in the pathogenesis of progressive tubulo-interstitial fibrosis. *Acta Physiol.Hung.* **94** **(1–2)** 117–131.
- Naughton, C. K. & A. K. Nangia** 2001 Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update* **7** **5** 473-481.
- Neto, F. T. & P. V. Bach** 2016 Spermatogenesis in humans and its affecting factors." *Semin Cell Dev Biol* **59**: 10-26.
- Neves PA** 2002 Espermograma e correlações clínicas. In: *Infertilidade Masculina* 59-69.
- Nickel, J. C.& J. M. Teichman** 2005 Prevalence, diagnosis, characterization, and treatment of prostatitis, interstitial cystitis, and epididymitis in outpatient urological practice: the Canadian PIE Study. *Urology* **66** **5** 935-940.
- Nickkholgh, B. & S. C. Mizrak** 2014 Enrichment of spermatogonial stem cells from long term cultured human testicular cells. *Fertil Steril* **102** **2** 558-565 e555.
- Nihi, F.; Gomes, M.L.M.; Carvalho, F.A.R.; Reis, A.B.; Martello, R.; Melo, R.C.N.; Almeida, F.R.C.L.; Chiarini-Garcia, H.** Revisiting the seminiferous epithelium cycle in human. *Human Reproduction* (aceito para publicação).
- Nistal, M.& P. Gonzalez-Peramato** 2004 Xanthogranulomatous funiculitis and orchiepididymitis: report of 2 cases with immunohistochemical study and literature review. *Arch Pathol Lab Med* **128** **8** 911-914.
- Noguchi, J.& M. Nakai** 2013 Early regression of spermatogenesis in boars of an inbred Duroc strain caused by incident orchitis/epididymo-orchitis. *J Reprod Dev* **59** **3** 273-281.
- Oatley, J M, Brinster, R L** 2012 The germline stem cell niche unit in Mammalian testes. *Physiological Reviews.* **2**,577-595.
- Ochsendorf, F. R** 2008 Sexually transmitted infections: impact on male fertility. *Andrologia* **40**(2): 72-75.
- Okada, H., K. Yoshimura** 1999 Assisted reproduction technology for patients with congenital bilateral absence of vas deferens. *J Urol* **161** **4** 1157-1162.
- Pacek, M. & J. C. Walter** 2004 A requirement for MCM7 and Cdc45 in chromosome unwinding during eukaryotic DNA replication. *EMBO J* **23** **18** 3667-3676.

- Papatsoris, A. G., F. A. Mpadra** 2002 Endemic brucellar epididymo-orchitis: a 10-year experience. *Int J Infect Dis* 6 4 309-313.
- Pasqualotto, F. F., R. K. Sharma** 2000 Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Urology* 55 6 881-885.
- Pasqualotto, F. F., B. P. Sobreiro** 2006 Induction of spermatogenesis in azoospermic men after varicocelectomy repair: an update. *Fertil Steril* 85 3 635-639.
- Passia, D., Behrendt, H., Hilscher, B., Hilscher, W., Hofmann, N. and Haider, S.G** 1983 Histological, enzyme histochemical and electron microscopic studies on the testis of infertile patients. *Acta Histochem., Suppl.* 28 303–308.
- Pesce M, Klinger FG, De Felici M** 2002 Derivation in culture of primordial germ cells from cells of the mouse epiblast: phenotypic induction and growth control by Bmp4 signalling. *Mech Dev* 112 15–24.
- Phillips, J. T., D. Giebaly** 2010 Urological management of acute epididymo-orchitis in sexually active young men: too great a public health risk? *Sex Transm Infect* 86 4 328.
- Picard-Hagen, N., X. Berthelo** 2015 Contagious epididymitis due to *Brucella ovis*: relationship between sexual function, serology and bacterial shedding in semen. *BMC Vet Res* 11: 125.
- Pilatz, A., F. Wagenlehner** 2013 Acute epididymitis in ultrasound: results of a prospective study with baseline and follow-up investigations in 134 patients. *Eur J Radiol* 82 12 e762-768.
- Philip, J., D. Selvan** 2006 Mumps orchitis in the non-immune postpubertal male: a resurgent threat to male fertility?" *BJU Int* 97 1 138-141.
- Pilatz, A., H. Hossain** 2014 Acute Epididymitis Revisited: Impact of Molecular Diagnostics on Etiology and Contemporary Guideline Recommendations. *Eur Urol*.
- Pilatz, A., I. Ceylan** 2015 Experimental *Escherichia coli* epididymitis in rats: assessment of testicular involvement in a long-term follow-up. *Andrologia* 47 2 160-167.
- Pomerol JM & Arrondo JL** 1994 Azoospermia. In: *Prática Andrológica*. 1994; 35-41.
- Pühse G, Hense J, Bergmann M, Kliesch S.** 2011 Bilateral histological evaluation of exocrine testicular function in men with obstructive azoospermia: condition of spermatogenesis and andrological implications? *Hum Reprod.* 26 2606-2612.
- Razi, M. & H. Malekinejad** 2015 Varicocele-Induced Infertility in Animal Models. *Int J Fertil Steril* 9 2 141-149.
- Reis AB, Araújo FC, Pereira VM, Dos Reis AM, Santos RA, Reis FM.** 2010 Angiotensin (1-7) and its receptor Mas are expressed in the human testis: implications for male infertility. *J Mol Histol.* (41):75-80.
- Reis, A.B.** 2012 Estudo comparativo entre diferentes processamentos histológicos na interpretação de biópsias testiculares. Tese de doutorado. Departamento de Cirurgia: Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia. Faculdade de Medicina da UFMG. 75p.
- Ruppert, C., Markart, P., Wygrecka, M., Preissner, K.T., Gunther, A** 2008 Role of coagulation and fibrinolysis in lung and renal fibrosis. *Hamostaseologie* 28 (1–2) 30–32, 34–36.

- Rusz, A. & A. Pilatz** 2012 Influence of urogenital infections and inflammation on semen quality and male fertility. *World J Urol* 30 1 23-30.
- Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP & Clegg ED** 1990 Histological and histopathological evaluation of the testis. 1ed.
- Russell, L.D. & Griswold, MD** 1993 The Sertoli Cell. *Clearwater: Cache River Press*, 1993. 801p.
- Russell LD** 1993 Form, dimensions and cytology of mammalian Sertoli cells. In: Russell LD, Griswold MD, editors. The Sertoli cell. Clearwater, FL: Cache River Press; 1993. p. 1–38.
- Russell LD** 1993 Role in spermiation In:Russell LD,Griswold MD,editors. The Sertoli cell. Clearwater, FL: Cache River Press; 1993. p. 269–302.
- Saleh, R. & R. Z. Mahfouz** 2010 Histopathologic patterns of testicular biopsies in infertile azoospermic men with varicocele. *Fertil Steril* 94 6 2482-2485, 2485 e2481-2482.
- Salomon, F. & C. E. Hedinger** 1982. Abnormal basement membrane structures of seminiferous tubules in infertile men. *Lab Invest* 47 6 543-554.
- Santamaria, L. & R. Martin** 1995 Myoid cell proliferation in rat seminiferous tubules after ischaemic testicular atrophy induced by epinephrine. Morphometric and immunohistochemical (bromodeoxyuridine and PCNA) studies. *Int J Androl* 18 1 13-22.
- Santoro, G., C. Romeo** 2000 Ultrastructural and immunohistochemical study of basal lamina of the testis in adolescent varicocele. *Fertil Steril* 73 4 699-705.
- Schell C, Albrecht M, Spillner S, Mayer C, Kunz L, Kohn FM, Schwarzer U & Mayerhofer A** 2010 15-Deoxy-delta 12-14-prostaglandin-J2 induces hypertrophy and loss of contractility in human testicular peritubular cells: implications for human male fertility. *Endocrinology* 151 1257–1268.
- Schlatt, S. & J. Ehmcke** 2014 Regulation of spermatogenesis: an evolutionary biologist's perspective. *Semin Cell Dev Biol* 29 2-16.
- Schlegel PN & Girardi SK** 1997) In vitro fertilization for male factor infertility." *Clin Endocrinol Metab.* 83 709-716.
- Schmidt, VB** 2001Hipogonadotrófico e anosmia: síndrome de Kallmann. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 67 (6): 880-4.
- Schuppe, H. C. & A. Meinhardt** 2008 Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility? *Andrologia* 40 2 84-91.
- Shefi S & Turek PJ** 2006 Definition and current evaluation of subfertile men. *Int Braz J Urol.* 32 4 385-97.
- Smith, L. B. & W. H. Walker** 2014 The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin Cell Dev Biol* 30: 2-13.
- Söderström, K.O** 1986 Tubular hyalinization in human testis. *Andrologia* 18, 97–103.

- Stoeber, K., T. D. Tlsty** 2001 DNA replication licensing and human cell proliferation. *J Cell Sci* 114(Pt 11): 2027-2041.
- Sigman, M, Howards, SS** 1998 Male Infertility. In PC Walsh and MF Campbell, Campbell's Urology. 7ed. Philadelphia: Saunders. p. 1287-1301.
- Silber SJ** 2000 Evaluation and treatment of male infertility. *Clin Obstet. Gynecol.* **43** 854-888.
- Smith C.M. & Bremner W. J** 1998 Klinefelter Syndrome. *Arch Intern Med.* **158** 1309-1314.
- Śliwa, L. & B Macura** 2014 Lack of TCR $\alpha\beta$ + CD8+ and TCR $\gamma\delta$ + Lymphocytes Ameliorates LPS Induced Orchitis in Mice—Preliminary Histological Observations. *Folia biologica* 62(1): 65-69.
- Sousa M & Sá R, Barros A** 2005 Manual do casal infértil." In: www.apfertilidade.org/web/causas-de-infertilidade-masculina.5 Acessado em 02 fev. 2013.
- Speroff I & Glass RH, Kase NG** 1999) Clinical Endocrinology and Infertility In Endocrinology. **128** 1918-1926.
- Steger, K.& I. Aleithe** 1998 The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. *Mol Hum Reprod* 4(3): 227-233.
- Taitson, PF** 2007 The geographic distribution of male infertility in Minas Gerais State. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.* 29 **3**-165.
- Tajar, A. & G. Forti** 2010 Characteristics of secondary, primary, and compensated hypogonadism in aging men: evidence from the European Male Ageing Study. *J Clin Endocrinol Metab* 95 **4** 1810-1818.
- Tincani, BJ** 2012 Síndrome de Klinefelter: diagnóstico raro na faixa etária pediátrica *J. Pediatr.* (Rio J.), Porto Alegre. 88 **4** . Disponível em www.scielo.br. Acesso em 02 fev.2013.
- Turek PJ** 2005 Practical approaches to the diagnosis and management of male infertility. *Nat Clin Pract Urol.* 2 **5** 226-38.
- Trojian, T. H., T. S. Lishnak** 2009 Epididymitis and orchitis: an overview. *Am Fam Physician* 79 **7** 583-587.
- Tulloch, W. S** 1955 Varicocele in subfertility; results of treatment. *Br Med J* 2(4935): 356- 358.
- Val-Bernal, J. F., P. Gonzalez-Marquez** 2010 Concurrent xanthogranulomatous orchiepididymitis and seminoma in the same testis. *Pathol Int* 60(1): 55-58.
- Vornberger, W., G. Prins** 1994 Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology* 134 **5** 2307-2316.
- Walker, W. H. & J. Cheng** 2005 FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* 130(1): 15-28.
- Wang, X. X., P. Ying** 2013 Altered protein prenylation in Sertoli cells is associated with adult infertility resulting from childhood mumps infection. *J Exp Med* 210 **8** 1559-1574.
- Werner CA** 1950 Mumps orchitis and testicular atrophy *Ann Intern Med.* **32** 1066.

- Weidner, W., C. Jantos** 1991 Semen parameters in men with and without proven chronic prostatitis. *Arch Androl* 26 3 173-183.
- Weidner, W. & W. Krause** 1999 Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis. *Hum Reprod Update* 5 5 421-432.
- Weller, T. H. & J. M. Craig** 1949 The isolation of mumps at autopsy. *Am J Pathol* 25 5 1105-1115.
- Welter H, Kampfer C, Lauf S, Feil R, Schwarzer JU, Kohn FM & Mayerhofer A** 2013 Partial loss of contractile marker proteins in human testicular peritubular cells in infertility patients. *Andrology* 1 318324.
- Wharton, I. P., A. H. Chaudhry** 2006 A case of mumps epididymitis. *Lancet* 367 9511 702.
- Will, M. A., J. Swain** 2011 The great debate: varicocele treatment and impact on fertility. *Fertil Steril* 95 3 841-852.
- Willis, B.C., duBois, R.M., Borok, Z.** 2006 Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 3 (4): 377–382.
- Woldenberg, N., M. K. Patel** 2015 Tuberculous Epididymitis: A Case of Tuberculous Epididymitis That Was the Presenting Manifestation of Extrapulmonary and Pulmonary Tuberculoses. *Ultrasound Q.*
- World Health Organization.** 1999 WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction." Cambridge: Cambridge University Press.
- Yango, P., E. Altman** 2014 Optimizing cryopreservation of human spermatogonial stem cells: comparing the effectiveness of testicular tissue and single cell suspension cryopreservation. *Fertil Steril* 102 5 1491-1498 e1491.
- Yu, J., Z. Chen** 2012 CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systemic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 27 1 25-35.
- Yung, C. F., N. Andrews** 2011 Mumps complications and effects of mumps vaccination, England and Wales, 2002-2006. *Emerg Infect Dis* 17 4 661-667; quiz 766.
- Zohni K, Zhang X, Tan SL, Chan P & Nagano M** 2012 CD9 is expressed on human male germ cells that have a long-term repopulation potential after transplantation into mouse testes. *Biology of reproduction* 87 27.
- Zhou, Q. & R. Nie** 2002 Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J Androl* 23 6 870-881.

9. Anexos

ANEXO 1 – Formulário de consentimento livre e esclarecido

I. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

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

II. SIGILO DOS DADOS

Todos os seus dados serão confidenciais, sua identidade não será revelada

publicamente em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a essas informações, que serão utilizadas somente para fins de pesquisa.

III. BENEFÍCIOS DA PESQUISA

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

IV. RISCOS

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

V. RESSARCIMENTO DAS DESPESAS

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

VI. DEMAIS ESCLARECIMENTOS

Você dispõe de liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante a pesquisa. Você poderá recusar-se a participar deste estudo e/ou abandoná-lo a qualquer momento, sem precisar justificar. A aceitação ou não da participação não influenciará no seu tratamento. Nesta pesquisa utilizaremos somente parte do tecido testicular retirado durante a biópsia de testículo para a realização de estudo anatomopatológico e a amostra de sangue coletada no dia do procedimento cirúrgico.

Não serão utilizados outros tecidos, não sendo realizado qualquer tipo de manipulação, experimento ou intervenção direta com o paciente.

VII. TERMO DE CONSENTIMENTO

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

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

Assinatura do voluntário:

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

Dr. Augusto Barbosa Reis: 8897 4776

ANEXO 2 - Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

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