

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPERMÁTIDES EM TESTÍCULO HUMANO PELO MÉTODO DE
SONICAÇÃO PARA APLICAÇÃO EM REPRODUÇÃO ASSISTIDA**

Lilian Massara Martinelli

BELO HORIZONTE

Julho de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPERMÁTIDES EM TESTÍCULO HUMANO PELO MÉTODO DE
SONICAÇÃO PARA APLICAÇÃO EM REPRODUÇÃO ASSISTIDA**

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

Área de concentração: Biologia Celular

Mestranda: Lilian Massara Martinelli

Orientador: Prof. Dr. Hélio Chiarini-Garcia

Coorientador: Prof. Dr. Augusto Barbosa Reis

BELO HORIZONTE

Julho de 2016



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

LILIAN MASSARA MARTINELLI

284/2016
entrada
2º/2014
2014719653

Às **quatorze horas** do dia **29 de julho de 2016**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**IDENTIFICAÇÃO DE ESPERMÁTIDES EM TESTÍCULO HUMANO PELO MÉTODO DE SONICAÇÃO E SUA APLICAÇÃO EM REPRODUÇÃO ASSISTIDA**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Hélio 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. Hélio Chiarini-Garcia	UFMG	APROVADA
Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa	UFMG	APROVADA
Dr. André Gustavo de Oliveira	UFMG	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 29 de julho de 2016.**

Dr. Hélio Chiarini-Garcia (Orientador) 

Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa 

Dr. André Gustavo de Oliveira 

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


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

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Hélio Chiarini Garcia, por ter me acolhido no LABER tão bem e me orientado com dedicação; e que, com seu conhecimento, me conduziu à realização deste trabalho.

Ao meu coorientador, Dr. Augusto Barbosa Reis, por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse tema.

Ao Dr. Reginaldo Martello, sem o qual não teria sido possível realizar as coletas do meu material de pesquisa, e por toda dedicação ao longo desse trabalho.

À Prof. Fernanda Almeida, por ter acompanhado todo meu trabalho e que sempre estava à disposição para me ajudar.

Aos amigos do LABER, por tornarem meu dia a dia bem mais divertido e por toda ajuda.

A todos professores e colegas do Curso de Pós Graduação em Biologia Celular, pelo constante apoio.

À coordenação do Curso de Pós Graduação em Biologia Celular pela atenção e trabalho zeloso.

À secretaria do Curso de Pós Graduação em Biologia Celular pela ajuda e atenção prestados.

À minha querida mãe, meu exemplo de ser humano e profissional, por toda ajuda e apoio incondicionais. Você é o que eu sonho em ser um dia e serei eternamente grata, por todo seu envolvimento neste trabalho, o qual foi essencial. Dedico esse trabalho à você com todo meu amor e gratidão.

Ao meu querido pai, que me acompanhou desde o início neste trabalho, sempre disponível para tudo. Suas cobranças foram e serão sempre essenciais para mim. Seu carinho e amor me guiam em tudo que faço na vida. Obrigada por tudo papai.

À minha avó Wanda, por ser tão presente na minha vida e dedicada. Obrigada pelo carinho e por todo amor que a senhora tem comigo.

Ao meu irmão Danilo, por ser mais que irmão, ser um amigo fiel. Sempre divertindo os meus dias e disposto a me ajudar.

Ao André, seu cuidado e amor tornaram tudo mais leve. Tantas vezes me acalmou com seu carinho e me incentivou dizendo “você vai conseguir”.

RESUMO

Azoospermia é uma condição de infertilidade caracterizada pela ausência de espermatozoides no ejaculado. Em muitos casos, a paternidade só pode ser alcançada com o auxílio da reprodução assistida, isto é, com a extração de espermatozoides de fragmentos testiculares e posterior injeção intracitoplasmática dos mesmos (ICSI), processo conhecido como fertilização *in vitro*. Para extração dos espermatozoides têm-se utilizado métodos de busca sob microscópio de luz, através de fragmentação mecânica manual, muitas vezes sem sucesso. No entanto, não se sabe se o fato de não ter encontrado espermatozoides é por ausência dos mesmos no testículo ou por falha no método de busca. O presente estudo avaliou a eficácia do método de sonicação de fragmentos testiculares, que emprega dissociação do tecido testicular e degeneração de células, com exceção das cabeças de espermátides alongadas, visando determinar com mais acurácia a presença desse tipo celular nos testículos de pacientes com azoospermia. A análise histopatológica dos testículos mostrou que em todos os pacientes, os testículos apresentavam características semelhantes, típicas de hipoespermatogênese (escore de Johnsen \sim 8). A preservação das cabeças de espermátides após sonicação, em diferentes combinações de frequência e tempo, foi verificada pelo método de concentração, por Cytospin, do homogeneizado em lâmina, seguido de coloração com kit Panótico. A combinação de 60Hz por 90s de sonicação mostrou ser a melhor para manter íntegras as cabeças de espermátides e eliminar demais tipos celulares. Quando se realizou a predição da produção espermática a partir da contagem de cabeças de espermátides obtidas por sonicação, verificou-se que não houve diferença entre as diferentes combinações de frequência e tempo testadas, independente da microscopia utilizada para a contagem, fluorescência ou contraste de fase. Dessa forma, todas as combinações poderiam ser aplicadas, no entanto, levando-se em conta a maior preservação de espermátides íntegras isoladas, atestada pelo método do Cytospin, sugere-se a combinação 60Hz/90s para a predição da produção espermática.

ABSTRACT

Azoospermia is an infertility condition characterized by the absence of spermatozoa in the ejaculate. In many cases, paternity can only be achieved by assisted reproduction, i.e. with testicular sperm extraction and subsequent intracytoplasmic spermatozoa injection (ICSI), a process known as *in vitro* fertilization. For spermatozoa extraction manual mechanical fragmentation of testicular parenchyma and search of spermatozoa under light microscope are frequently used with no complete success. However, it is unknown whether the fact of not having found sperm is by their absence in the testis or failure in the search method. This study evaluated the efficacy of sonication method of testicular fragments, employing dissociation of testicular tissue and degeneration of cells, with the exception of elongated spermatid heads, in order to determine more accurately the presence of this cell type in the testis of patients with azoospermia. Histopathological analysis of the testes showed that in all patients, the testes were similar, with typical hypospermatogenesis (Johnsen score ~ 8). The preservation of the spermatid heads after sonication using different combinations of frequency and time, was verified by the method of concentration of the sonication product by Cytospin followed by staining with the kit Panotic. The combination 60Hz/90s of sonication proved to be the best to keep the integrity of the heads of spermatids besides the elimination of other cell types. When carried out the prediction of sperm production from spermatid heads counting, it was found that there was no difference between the different combinations of frequency and time tested, regardless of the microscopy used for counting, fluorescence or phase-contrast. Thus, all combinations could be applied, however, taking in account the better preservation of isolated intact spermatid heads, attested by Cytospin method, we suggest the combination 60Hz / 90s to predict sperm production.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Testículo Humano.....	01
1.2. Infertilidade Masculina.....	04
1.3. Técnicas de extração de espermatozoides.....	06
1.4. Sonicação de tecido testicular.....	08
2. JUSTIFICATIVA.....	10
3. OBJETIVO GERAL.....	11
3.1. Objetivos Específicos.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1. Pacientes.....	12
4.2. Orquiectomia.....	12
4.3. Delineamento Experimental.....	13
4.4. Processamento Histológico.....	14
4.5. Análise morfológica e escores histopatológicos da espermatogênese.....	14
4.6. Sonicação	15
4.7. Avaliação morfológica dos componentes presentes no sonicado.....	16
4.8. Número de espermátides obtido após fluorescência e contraste de fase.....	16
4.9. Método estatístico.....	18
5. RESULTADOS.....	19
5.1. Morfologia testicular e avaliação histopatológica da espermatogênese através dos escores de Johnsen e Bergmann...	19
5.2. Morfologia e frequência dos componentes do homogeneizado testicular.....	21
5.3. Morfologia das cabeças de espermátides nos homogeneizados, sob microscopia de fluorescência e de contraste de fase.....	24
5.4. Predição do número de espermátides por testículo: comparação entre diferentes tempos e frequências	

de sonicação	25
6. DISCUSSÃO.....	27
7. CONCLUSÕES.....	33
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
9. ANEXOS.....	38

1. INTRODUÇÃO

1.1. Testículo humano

As gônadas masculinas, os testículos, são responsáveis pela espermatogênese, processo no qual ocorre a formação dos espermatozoides, e pela esteroidogênese, que consiste na produção de hormônios sexuais masculinos (andrógenos). A espermatogênese e a esteroidogênese ocorrem em dois compartimentos testiculares morfológica e funcionalmente distintos, respectivamente o compartimento tubular, formado pelos túbulos seminíferos, e o compartimento intersticial ou intertubular, localizado entre os túbulos seminíferos e formado por conjuntivo contendo grupos de células produtoras de andrógenos, as células de Leydig. Para a produção adequada de espermatozoides, tanto quantitativa quanto qualitativa, é necessária a integridade dos dois compartimentos (Weinbauer *et al.*, 2010).

Cada testículo é dividido por septos conjuntivos em 250 a 300 lóbulos, no interior dos quais encontram-se de 1 a 3 túbulos seminíferos bastante enovelados. Em média, o testículo humano contém 600 túbulos seminíferos, que representam 60 a 80% do volume testicular total. Os túbulos seminíferos contêm as células germinativas e dois tipos diferentes de células somáticas, as células de Sertoli e as células peritubulares mioides. Células germinativas compõem, juntamente com as de Sertoli, o epitélio seminífero, um epitélio estratificado que reveste internamente o túbulo seminífero. É nesse epitélio que ocorrem as divisões das células germinativas para a formação de gametas, com as células de Sertoli fornecendo suporte estrutural e funcional para todo o processo. Células peritubulares mioides formam camadas concêntricas, intercaladas com colágeno, em torno dos túbulos seminíferos e constituem a túnica própria dos mesmos (Hess & França, 2007; Weinbauer *et al.*, 2010).

Células germinativas

A espermatogênese inicia-se com a divisão de espermatogônias, células tronco do epitélio seminífero, e termina com a formação de espermatozoides, os gametas maduros. Células germinativas em diferentes estágios de maturação estão arranjas em associações celulares típicas nos túbulos seminíferos, conhecidas como estádios espermatogênicos. O processo espermatogênico inteiro pode ser dividido em três fases:

(1) mitótica, que envolve a proliferação e diferenciação de células espermatogênicas diploides, as espermatogônias; (2) meiótica, que compreende a divisão meiótica de espermatócitos tetraploides para formar espermátides haploides; e (3) diferenciação ou fase espermiogênica, que é a transformação de espermátides em espermatozoides (Hess & França, 2007). As espermatogônias se encontram no chamado compartimento basal dos túbulos seminíferos e são as células mais indiferenciadas do epitélio. No homem constituem três populações, as espermatogônias A_{escuras} (Ae), as espermatogônias A_{claras} (Ac) e as espermatogônias do tipo B (B). As espermatogônias B constituem a última geração de espermatogônias e sofrem mitose para originarem os espermatócitos primários. Espermatogônias Ae não mostram atividade proliferativa sob condições normais e parecem se dividir raramente, sendo consideradas as células-tronco testiculares. Entretanto, sofrem mitose quando a população geral de espermatogônias é drasticamente reduzida, como por exemplo, devido à radiação (de Rooij, 1998). Em contraste, espermatogônias Ac proliferam continuamente durante cada ciclo espermatogênico. Ao se dividirem, podem renovar a si próprias, mantendo sua população, ou diferenciarem em duas espermatogônias B. (Clermont, 1966; Heller & Clermont, 1964; Ehmcke & Schlatt, 2006; Ehmcke *et al.*, 2006; Amann, 2008). Espermatócitos primários em preleptóteno derivam da mitose das espermatogônias B e iniciam a síntese de DNA para entrarem em divisão meiótica. Ao entrarem na prófase I, passam pelas fases de leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno. Após passarem pelas demais fases da primeira divisão meiótica (metáfase, anáfase e telófase), formam-se os espermatócitos secundários, os quais entram na prófase II para sofrerem a segunda divisão meiótica e formarem as espermátides. Estas são células haploides que passam pelo processo de diferenciação para se transformarem em espermatozoides. Espermátides são geralmente classificadas pelo sistema acrossômico, através do qual podem ser distinguidas três fases: (1) a fase de Golgi, quando brotam as vesículas acrossômicas e surge a simetria crânio caudal; (2) a fase de capuz, quando se tornam alongadas e o acrossoma se desenvolve, cobrindo a metade ou os dois terços craniais do núcleo; e (3) a fase acrossômica e de maturação, quando o núcleo celular se condensa e a célula continua a se alongar. Nessa fase o flagelo se torna maduro e parte do citoplasma da célula é expulso, dando origem aos corpos residuais. Espermatozoides são

então liberados, pelo processo denominado espermição, na luz dos túbulos seminíferos (Clermont, 1963; 1966; Heller & Clermont, 1964; Amann, 2008).

Células de Sertoli

São as células somáticas do epitélio seminífero, mitoticamente inativas no indivíduo adulto. Apoiam-se na membrana basal e se estendem até a luz do túbulo seminífero. São consideradas as células que dão suporte estrutural e funcional às células germinativas, acompanhando seus processos de diferenciação e maturação em toda a extensão do epitélio seminífero. Em geral, considera-se que células de Sertoli coordenam o processo espermatogênico, mas estudos mostram que células espermatogênicas, por sua vez, também controlam as funções das células de Sertoli (Pineau *et al.*, 1993; Guitton *et al.*, 2000; Chalmel *et al.*, 2014). As membranas basolaterais de células de Sertoli vizinhas apresentam especializações - junções de oclusão - que formam uma faixa de selagem entre as células, de forma a obliterar o espaço intercelular. Essa organização é parte constituinte da barreira hematotesticular, mais conhecida hoje como barreira de células de Sertoli, cuja formação coincide com o início da meiose das células germinativas e divide o epitélio seminífero em duas regiões anatômica e funcionalmente distintas, os compartimentos basal e o adluminal. No compartimento basal estão células germinativas iniciais, que durante seu desenvolvimento são deslocadas para o compartimento adluminal. Esse deslocamento é realizado através de processos sincronizados de dissolução e montagem das junções de oclusão, acima e abaixo da célula em migração. Uma importante função das células de Sertoli é a determinação do volume testicular e da produção de espermatozoides no indivíduo adulto. Cada célula de Sertoli está em contato e suporta funcionalmente um número definido de espermatozoides. No homem, por volta de 10 células germinativas ou 1,5 espermatozoides estão relacionados com uma célula de Sertoli (Zhengwei *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2008).

1.2. Infertilidade Masculina

Infertilidade é a incapacidade de um casal obter uma gravidez de sucesso em um ano de relação sexual regular e sem aplicação de método contraceptivo, sendo que essa condição afeta quase 15% dos casais no mundo, com o fator masculino sendo responsável por até 50% dos casos. Entretanto, a maioria dos casais antes definidos como inférteis são agora classificados como subférteis, pois podem conceber após um ano de relações sexuais regulares e são, portanto, tidos como saudáveis. No caso de indivíduos que não concebem mesmo após um ano nas condições aqui citadas, a infertilidade pode se apresentar em duas condições. A infertilidade absoluta é aquela que não pode ser tratada, uma vez que se caracteriza por ausência completa de espermatogênese. Já outros indivíduos inférteis podem alcançar a concepção por tratamento uma vez que o processo espermatogênico está afetado mas, em graus variáveis, pode ser observada a produção de espermatozoides. Nesses casos, a concepção envolve, muitas vezes, o uso de tecnologia de reprodução assistida (ART), como a extração cirúrgica de espermatozoides e ovócitos seguida pela injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). Indivíduos subférteis também podem optar por tratamento, mas nesse caso a ART iria, na melhor das hipóteses, apenas antecipar a concepção, que poderia ser alcançada por via natural (Esteves *et al.*, 2011; Jungwirth *et al.*, 2012; Anawalt, 2013).

A causa mais comum da infertilidade masculina é a disfunção testicular primária, ou seja, infertilidade causada por anormalidade no processo espermatogênico. A disfunção testicular primária, na maioria dos casos, não possui causa definida e é, por isso, denominada idiopática. Entretanto, existem muitas causas conhecidas para a disfunção testicular primária, como: dano testicular devido a tratamentos para o câncer local ou sistêmico como a quimioterapia e radiação pélvica, mutações genéticas entre elas a síndrome de Klinefelter, traumas testiculares, criptorquidismo, orquite causada por infecções como a caxumba, orquiepididimite, varicocele, destruição autoimune e drogas. Em adição à disfunção testicular primária, outras causas de infertilidade incluem desordens hormonais, doenças sexuais (disfunção erétil ou anorgasmia), exposição a toxinas ambientais e defeitos no transporte de espermatozoides, como a malformação congênita ou a obstrução de vias espermáticas (Esteves *et al.*, 2011; Anawalt, 2013; Bachir & Jarvi, 2014). Independentemente da causa da infertilidade, caso não se detecte

a presença de espermatozoides no ejaculado, essa condição é dita azoospermia, que será tratada mais detalhadamente a seguir.

Azoospermia

Condição de infertilidade caracterizada pela ausência de espermatozoides no ejaculado. É um fenômeno importante, que atinge 3% da população mundial masculina e representa 10 a 15% dos casos de infertilidade masculina (Esteves *et al.*, 2011; Wosnitzer & Goldstein, 2014). Existem dois tipos de azoospermia. A *azoospermia obstrutiva* ocorre em 40% dos casos e é determinada pela obstrução das vias espermáticas, que pode ocorrer em qualquer local ao longo do trato reprodutivo masculino (rede testicular, ductos eferentes, ducto epididimário, ducto deferente e ducto ejaculatório). Nessa condição, geralmente, os testículos têm tamanho normal e a espermatogênese também é normal. Entretanto, alguns outros sintomas podem aparecer, como o aumento do epidídimo, por causa do acúmulo de espermatozoides. As causas da obstrução podem ser variadas, como por exemplo a agenesia do ducto deferente, doenças infecciosas, traumas e vasectomia (Baker & Sabanegh, 2013; Wosnitzer & Goldstein, 2014). Já a *azoospermia não obstrutiva* é causada por fatores variados que prejudicam o processo espermatogênico e, portanto, a produção de espermatozoides, como ocorre em casos de orquite, varicocele, criptorquidismo, desordens hormonais e desordens genéticas (como a síndrome de Klinefelter), dentre outras. Nessas condições, os testículos são frequentemente pequenos e a produção de espermatozoides é nula ou reduzida, nesse último caso a condição sendo denominada hipoespermatogênese (Berookhim & Schlegel, 2014; Wosnitzer & Goldstein, 2014). O tipo de azoospermia é determinado clinicamente através de histórico clínico, exame físico (apalpação), exames laboratoriais (dosagem de hormônios) e, em alguns casos, através de biópsias e cariótipos. Os tratamentos para indivíduos com azoospermia são bastante variados e incluem reposição hormonal, intervenções cirúrgicas para desobstrução de vias e técnicas de extração de espermatozoides. Para o tratamento da azoospermia, dois procedimentos de sucesso se desenvolveram nas últimas décadas: as técnicas de extração de espermatozoides do epidídimo ou do testículo e a técnica de injeção intracitoplasmática do espermatozoide (ICSI), que é a chamada fertilização *in vitro*. No caso da extração de espermatozoides, a mesma possibilita que homens

considerados antes inférteis e que só poderiam ter filhos por inseminação da parceira com sêmen de um doador, possam ter filhos a partir de seus próprios espermatozoides (Esteves *et al.*, 2011; Wosnitzer & Goldstein, 2014). Considerando que o número de espermatozoides nesses pacientes inférteis é, muitas vezes, bastante reduzido, faz-se necessário o uso de métodos de busca dessas células cada vez mais elaborados, sendo os mais empregados atualmente descritos a seguir.

1.3. Técnicas de extração de espermatozoides

Existem diferentes técnicas de extração de espermatozoides para sua utilização em ICSI, a saber:

PESA

A aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo (PESA) é utilizada somente em casos de azoospermia obstrutiva, consiste da aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo. A técnica é realizada através de inserções de uma agulha na pele escrotal visando alcançar várias regiões do epidídimo. Segue-se com a aspiração do conteúdo intraductal do epidídimo, que é levado ao microscópio para a localização e isolamento dos espermatozoides. Importante ressaltar que, embora a região da cauda epididimária seja local de maior concentração de espermatozoides, em vista de sua função de armazenamento dessas células, a mesma contém, em condições normais, grande quantidade de espermatozoides de baixa qualidade e restos celulares, além de outras células, como macrófagos. Dessa forma, a aspiração é feita em diferentes regiões do epidídimo, garantindo a colheita de maior número de espermatozoides viáveis (Esteves *et al.*, 2011; Wosnitzer & Goldstein, 2014).

MESA

A aspiração microcirúrgica de espermatozoides do epidídimo (MESA) é realizada também em casos de azoospermia obstrutiva, trata da aspiração microcirúrgica de espermatozoides do epidídimo. A diferença em relação à PESA é que na MESA faz-se um corte na pele escrotal e na cápsula epididimária, de modo a expor o ducto epididimário, permitindo a seleção de regiões do ducto mais dilatadas, onde a presença de maior quantidade de espermatozoides é mais provável. A aspiração e colheita dos

espermatozoides são realizadas como na PESA (Esteves *et al.*, 2011; Wosnitzer & Goldstein, 2014).

TESA

A aspiração percutânea de espermatozoides do testículo (TESA) é geralmente utilizada quando PESA ou MESA mostram-se ineficazes para pacientes com azoospermia obstrutiva; e também em casos de hipoespermatogênese em azoospermia não obstrutiva. É um método bastante semelhante à PESA, porém a aspiração dos espermatozoides é feita diretamente no testículo (Esteves *et al.*, 2011; Wosnitzer & Goldstein, 2014).

TESE

A extração de espermatozoides do testículo (TESE) é aplicada quando os métodos anteriores falham em pacientes com azoospermia obstrutiva; e em casos de hipoespermatogênese em pacientes com azoospermia não obstrutiva. A extração de espermatozoides do testículo é feita através de uma ou mais biópsias testiculares. Após incisão da pele, túnica vaginal e albugínea testicular, um ou mais fragmentos do tecido testicular são colhidos e colocados em meio de cultura próprio para espermatozoides. Os fragmentos são passados através de um angiocateter para separação dos túbulos seminíferos, e, posteriormente, sob microscópio invertido, os mesmos são mecanicamente fragmentados, seguindo-se então com a busca dos espermatozoides. É comum o uso de soluções enzimáticas para facilitar o processo de fragmentação, o que aumenta a chance de encontrar espermatozoides nas biópsias (Esteves *et al.*, 2011; Wosnitzer & Goldstein, 2014).

MicroTESE

A extração microcirúrgica de espermatozoides do testículo (MicroTESE) é um processo semelhante à TESE, porém todo o procedimento cirúrgico é feito sob microscópio estereoscópico. O uso do microscópio durante todo o processo permite a escolha de uma área da albugínea menos vascularizada para incisão, de modo a evitar processos hemorrágicos importantes. Posteriormente, permite a seleção de regiões do tecido testicular onde os túbulos seminíferos aparecem dilatados e opacos, indicando,

uma maior quantidade de células germinativas e/ou espermatozoides na luz tubular, o que aumenta a chance de encontrá-los. Dessa forma, o número de biópsias pode ser reduzido a uma única, o que também contribui para menores complicações pós-operatórias (Esteves *et al.*, 2011; Wosnitzer & Goldstein, 2014; Deruyver *et al.*, 2014).

Poucos estudos sistemáticos têm sido conduzidos para comparar a eficiência desses métodos de extração de espermatozoides e as recomendações para o uso dos mesmos baseiam-se em evidências acumuladas, fornecidas por estudos descritivos, observacionais e controlados. A MicroTESE tem sido sugerida como o método de maior sucesso na obtenção de espermatozoides em pacientes azoospermicos, mesmo aqueles com redução importante do volume testicular (Berookhim & Schlegel, 2014; Bryson *et al.*, 2014). Por outro lado, em vista do menor custo envolvido no processo, um dos métodos mais utilizados atualmente é a TESE. Em ambos os métodos, é feita a fragmentação manual do tecido testicular para a busca de espermatozoides sob microscopia de luz invertida. Entretanto, essa forma de fragmentação não garante que a presença dos espermatozoides seja detectada em pacientes com número muito reduzido dessas células e, nesse caso, deve ser questionado se os pacientes realmente não possuem espermatozoides ou se estes estão presentes em número tão pequeno que não foram percebidos pelo examinador. Em vista do exposto, um método mais eficiente de busca poderia garantir maior sucesso na detecção de espermatozoides nas biópsias testiculares. A sonicação de fragmentos testiculares obtidos por biópsia, com busca de cabeças de espermátides sob microscópio seria um desses métodos.

1.4. Sonicação de tecido testicular

A sonicação trata-se de método de fragmentação, por ultrassom, do tecido. Normalmente é feita utilizando-se uma sonda de ultrassom, conhecida como sonicador. Dependendo da frequência e do tempo aplicados durante a sonicação, é possível o rompimento das células e separação de seus componentes (Priego-Capote & Castro, 2007). No que se refere ao tecido testicular, o processo da espermiogênese caracteriza-se por uma série de mudanças morfológicas, que incluem a compactação e reestruturação do núcleo da espermátide. A compactação nuclear é alcançada pela

progressiva expressão e deposição de proteínas de transição (Tnp) e protaminas (Prm), que deslocam a maioria das histonas antes presentes na estrutura do DNA (Johnson *et al.*, 2016). Essa condensação nuclear confere maior resistência dos núcleos das espermatídes ao processo de sonicação, permitindo que, em uma determinada combinação de frequência e tempo de ultrassom, ocorra a conservação dos mesmos, enquanto os núcleos das demais células presentes no tecido são destruídos (Meistrich *et al.*, 1976; Kuretake *et al.*, 1996).

A sonicação de tecido testicular é técnica comum em diferentes procedimentos. Para aplicação na clínica, a sonicação é sugerida como método de obtenção de espermatozoides sem cauda, pois sabe-se que nessas condições os gametas são mais estáveis para submissão à criopreservação (Kuretake *et al.*, 1996); e, também, que a imobilização de espermatozoides imediatamente antes da ICSI aumenta a taxa de sucesso de fertilização (Palermo *et al.*, 1996; Tateno *et al.*, 2000).

Em estudos científicos, a sonicação é utilizada para obtenção de cabeças de espermatozoides isoladas das caudas o que, segundo Amaral e colaboradores (2013), reduz a complexidade da amostra, possibilitando estudos mais direcionados e específicos para essas estruturas. Além disso, essa técnica tem sido aplicada satisfatoriamente para predição da produção espermática de testículo de camundongos que sofreram efeitos deletérios de tratamentos com agentes citotóxicos ou quimioterápicos sistêmicos (Meistrich, 1982; Drumond *et al.*, 2011) bem como de ratos que foram submetidos a restrição proteica desde o período gestacional (Melo *et al.*, 2013).

2. JUSTIFICATIVA

Existem diferentes técnicas para o tratamento de infertilidade em casos de azoospermia não obstrutiva. Entretanto, o sucesso na extração de espermatozoides em pacientes azoospermicos não é total, com estudos mostrando, por exemplo, uma média de taxa de extração de apenas 45% para TESE e 63% para MicroTESE (Donoso *et al.*, 2007; Berookhim & Schlegel, 2014). Nesses casos, a busca pelos espermatozoides é feita por um microscopista após fragmentação mecânica manual (com auxílio de enzimas ou não) sob microscopia invertida de campo claro. No entanto, muitas vezes, o fato do examinador não ter encontrado espermatozoides, utilizando esse tipo de busca, pode não implicar, necessariamente, na ausência de espermatozoides no testículo do paciente; e sim que o mesmo apresenta o processo espermatogênico grandemente prejudicado e, portanto, um número muito reduzido de espermatozoides, dificultando sua detecção. Desta forma, seria de grande aplicação um método que certificasse a presença de espermatozoides no testículo de pacientes nessa condição, de forma que a busca manual pelo microscopista poderia ser intensificada, favorecendo a obtenção de espermatozoides para aplicação na ICSI. É importante a determinação de um método que não só dependa da busca direta pelo examinador, mas procure responder esta questão de forma mais precisa. Um método que poderia ter esta aplicação, de identificar se o paciente possui espermatozoides, mesmo em número muito reduzido, seria o da sonicação. Estudos em roedores empregando a sonicação de fragmentos testiculares têm predito a produção espermática destas espécies em diferentes condições experimentais (Drumond *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2013). Em humanos, entretanto, essa técnica não tem sido aplicada com esse objetivo e, caso se comprove sua eficiência na busca de espermatozoides, poderia aumentar a probabilidade de pacientes com infertilidade mais severa serem pais biológicos.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso do método de sonicação de fragmento testicular como ferramenta para determinação da presença e do número de espermátides em testículos humanos

3.1. Objetivos específicos

Em fragmentos testiculares, pretende-se:

1. Avaliar morfológicamente o parênquima testicular e classificá-lo em escores histopatológicos do processo espermatogênico;
2. Verificar a presença e preservação morfológica de cabeças de espermátides após concentração dos homogeneizados, pelo método do Cytospin e coloração com kit Panótico, obtidos de diferentes fragmentos testiculares processados por sonicação em diferentes tempos e frequências;
3. Quantificar o número de cabeças de espermátides, em fragmentos testiculares obtidos de diferentes regiões do testículo, processados por sonicação em diferentes tempos e frequências, utilizando as microscopias de fluorescência e de contraste de fase;
4. Determinar o melhor método de identificação das cabeças de espermátides nos homogeneizados testiculares, comparando as microscopias de contraste de fase e fluorescência.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Pacientes

Os quatro pacientes que participaram desse estudo (P1 a P4) eram todos idosos, com idade entre 66 e 75 anos ($71,8 \pm 4$ anos), que foram submetidos à orquiectomia devido a câncer de próstata e sem nenhum tipo de tratamento, seja hormonioterapia, quimioterapia ou radioterapia. Foram utilizados ambos os testículos dos pacientes P2 e P4 e unilateral dos pacientes P1 e P3. Os procedimentos de coleta de material biológico foram realizados no Hospital das Clínicas da UFMG, sob supervisão do Dr. Reginaldo Martello. Os protocolos desse estudo foram aprovados pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, Parecer nº 189/2008 (**Anexo I**), pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, Parecer nº ETIC 117/2007 (**Anexo II**) e pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital das Clínicas – DEPE, Parecer nº 079/2007 (**Anexo III**). Todos os pacientes foram informados sobre o objetivo do estudo e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo IV**).

4.2. Orquiectomia

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

glutaraldeído a 5% em tampão fosfato 0,05M pH 7,2-7,4. O material foi então levado ao laboratório para processamento.

4.3. Delineamento experimental

Para alcance dos objetivos propostos neste projeto, foram realizados diferentes experimentos, delineados na **Figura 1**. De cada testículo, foi colhido um fragmento para confecção de lâmina para avaliação histopatológica. Além disso, para cada combinação de frequência e tempo de sonicação aplicada, foram processados quatro fragmentos testiculares, colhidos em diferentes regiões do testículo. Parte do homogeneizado, obtido por sonicação dos fragmentos, foi concentrado em lâmina pelo método de Cytospin, para análise da preservação das cabeças de espermátides. Outra parte do homogeneizado foi utilizada para contagem das cabeças de espermátides em câmara de Neubauer, sob microscópio de fluorescência e de contraste de fase.

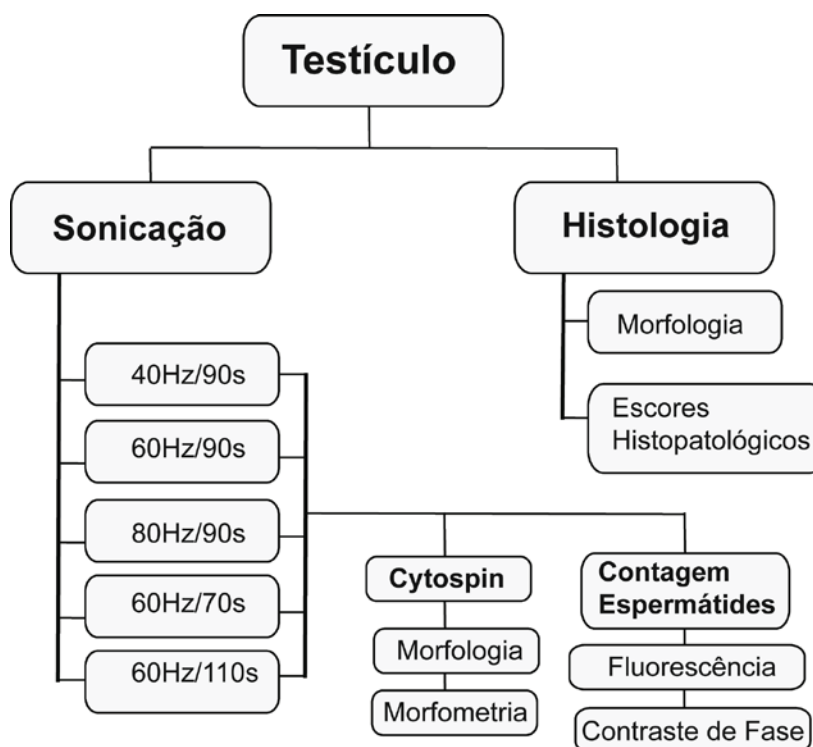


Figura 1. Delineamento experimental

4.4. Processamento histológico

Fragmentos testiculares foram fixados em glutaraldeído a 5% (Electron Microscopy Science, biological grade) em tampão fosfato 0,05M pH 7,3 por 1 hora e depois de recortados em fragmentos menores foram mantidos na solução fixadora por uma noite, sendo então transferidos para o mesmo tampão, onde permaneceram até o momento da inclusão. Para inclusão, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol e incluídas em resina à base de glicol metacrilato, segundo Chiarini-Garcia e colaboradores (2011). Dos blocos, foram obtidos cortes de 3µm de espessura, utilizando-se navalha de vidro e micrótomo rotativo automático. Os cortes foram corados com azul de toluidina em borato de sódio a 1%, montados com lamínula de vidro e analisados por microscopia de luz.

4.5. Análise morfológica e escores histopatológicos da espermatogênese

Para avaliação da condição do processo espermatogênico dos pacientes, foi realizada análise de secções histológicas de testículo. A partir dessa análise foram aplicados dois métodos para classificação do epitélio seminífero em escores histopatológicos, o método de Johnsen (1970) que avalia os diferentes tipos de hipoespermatogênese e parada de maturação, e o método de Bergmann (Bergmann *et al.*, 1994; Bergmann & Kliesch, 2010), que avalia as alterações da espermatogênese em relação à presença de espermátides alongadas no parênquima testicular. Para o método de Johnsen, as alterações da espermatogênese foram classificadas em 10 escores, de acordo com os critérios abaixo:

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 - Ausência de espermátides e presença de poucos espermatócitos (menos de cinco).

Escore 3 - Espermatogônias são as únicas células germinativas presentes.

Escore 2 - Ausência de células germinativas e presença apenas de células de Sertoli.

Escore 1 – Ausência de células germinativas ou somáticas no corte transversal do túbulo seminífero.

Para se obter o escore de Johnsen, multiplicou-se o número de túbulos contados em cada um dos escores, de um a dez, pelo valor do seu escore. Os valores obtidos de todos os escores foram somados e divididos pelo número total de túbulos seminíferos contatos (**Anexo V**).

O escore de Bergmann foi determinado dividindo o número de túbulos contendo espermátides alongadas (escores de 8 a 10 de Johnsen) pelo número total de túbulos contados (**Anexo V**).

Para avaliação de ambos os escores, apenas os cortes transversais de túbulos seminíferos foram contados, em aumento final de 400x.

4.6. Sonicação

Em quatro diferentes regiões de cada testículo, foram coletados 5 fragmentos frescos (não fixados), pesando cada um 0,05g, totalizando 20 fragmentos. Cada fragmento era imerso em 1 mL de água destilada em tubo tipo Eppendorf e levado ao processador ultrassônico (Cole Parmer, modelo GE 130PB; Vernon Hills, IL, EUA). Os fragmentos das quatro diferentes regiões dos testículos foram submetidos a diferentes testes de sonicação (40Hz/90seg; 60Hz/90seg; 80Hz/90seg; 60Hz/70seg e 60Hz/110seg) (**Figura 1**). Os homogeneizados resultantes foram utilizados para contagem de cabeças de espermátides sob microscópio de fluorescência e de contraste de fase e para análise morfológica e morfométrica das células espermatogênicas após aplicação do método de Cytospin e coloração com kit Panótico.

4.7. Avaliação morfológica dos componentes presentes no sonificado

Para cada homogeneizado, 500 µL foram concentrados sobre lâmina histológica, pelo método do Cytospin, como se segue. Após preparado o conjunto lâmina/filtro/suporte /prendedor, o volume de homogeneizado foi aplicado no suporte da amostra, com auxílio de pipeta e sem tocar no filtro. O conjunto foi corretamente fechado e levado à centrifuga, a 450 rpm por 5 minutos. Após centrifugação as lâminas eram deixadas secar por 24h, à temperatura ambiente, e coradas com o kit Panótico de coloração. Sobre o material na lâmina eram colocadas, sequencialmente, as seguintes soluções: solução 1, composta de triarilmetano a 0,1%; solução 2, composta de xanteno a 0,1% ; e solução 3, composta de tiazina a 0,1%. Todas as soluções eram aplicadas por 5 a 10 segundos e, após a última solução, a lâmina era lavada em água corrente. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico de campo claro.

Nos preparados obtidos pelo método de Cytospin, para cada combinação de frequência e tempo, foi avaliado um total de 100 células e calculadas as frequências de (1) núcleos de espermátides, (2) núcleos fragmentados e (3) núcleos de outras células.

As cabeças de espermátides foram identificadas pelo seu formato “em gota” ou arredondado, típico da espécie humana. Na porção cranial do núcleo observa-se um capuz de coloração mais intensa que corresponde ao acrossoma.

4.8. Número de espermátides obtido após fluorescência e contraste de fase

Os núcleos das cabeças de espermátides, contidas no homogeneizado obtido pela sonicação, foram marcados com fluorescência pelo marcador DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol). Foram utilizados 50µL do homogeneizado obtido por sonicação, aos quais foram adicionados 50µL do marcador DAPI, diluído 1:1000 em PBS, deixando agir por 5 minutos. O homogeneizado era então transferido para câmara de Neubauer e levado ao microscópio Olympus BX-51, equipado com sistema de análise por fluorescência e por contraste de fase.

Após o tempo para marcação com DAPI do homogeneizado, 10 µL do mesmo eram transferidos para cada um dos dois retículos da câmara de Neubauer (**Figura 2**) e levados ao microscópio. A contagem foi feita com objetiva de 40X e foram contadas as células presentes em cinco divisões da área central de cada retículo. Para cada retículo,

contava-se as cabeças de espermátides tanto por microscopia de fluorescência, quanto por microscopia de contraste de fase. Todo o processo era realizado em duplicata, totalizando a contagem de quatro retículos da câmara de Neubauer por homogeneizado. Após a contagem, para cada tipo de microscopia utilizada, calculava-se a média das cinco divisões contadas, para cada retículo. Procedia-se então com o cálculo da média dessas médias, obtendo-se um valor médio das contagens realizadas nos quatro retículos. O valor obtido era corrigido devido a diluição com DAPI (multiplicado por 2) e aplicado na seguinte fórmula (Carvalho, 1983):

$$VP = (M \cdot 25 \cdot 10 \cdot 10^3) \cdot \left(VD + \frac{m}{d} \right)$$

Onde: VP: Valor procurado (número de células no homogeneizado)

M: média dos valores contados nos 4 retículos

25: número total de quadrados num volume de $0,1 \text{ mm}^3$

10: para converter $0,1 \text{ mm}^3$ em 1 mm^3 ($1 \mu\text{L}$)

10^3 : para converter de μL para mL

VD: volume do diluente em mL

m: peso do fragmento em gramas

d: densidade do tecido (testículo = 1,05)

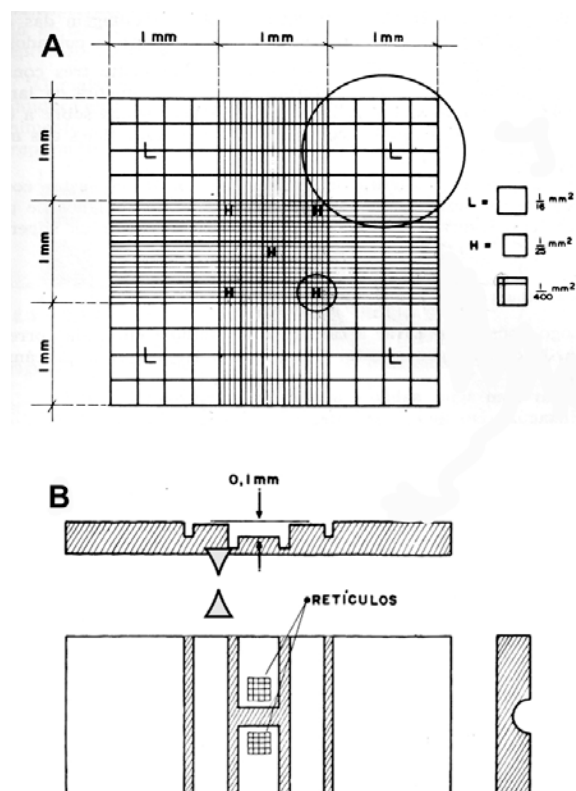


Figura 2: Câmara de Neubauer. A: esquema das subdivisões do retículo. B: posição dos dois retículos em relação à câmara e a altura da base da câmara até a lamínula

Uma vez obtido o número de células no homogeneizado, contido em 0,05g de testículo, o mesmo era corrigido para o peso total do órgão, determinando o número total de espermátides por testículo.

4.9. Método estatístico

Todos os parâmetros avaliados foram testados quanto à normalidade antes da análise. Os dados foram analisados como um delineamento inteiramente ao acaso. Uma vez que os dados não estavam distribuídos normalmente nem foram normalizáveis, foram aplicados os métodos não paramétricos de Mann-Whitney, para comparação entre dois grupos, e de Kruskal Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn, para comparação de mais de dois grupos. Foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Morfologia testicular e avaliação histopatológica da espermatogênese através dos escores de Johnsen e Bergmann

A morfologia dos testículos de homens idosos com câncer de próstata e que não sofreram nenhum tipo de tratamento se assemelha a de testículo com hipoespermatogênese (**Figura 3**). Muitos túbulos seminíferos apresentavam epitélio mais baixo (**Figuras 3A e 3B**) e com poucas espermatídes alongadas. Numa avaliação citológica mais detalhada, foram identificados os VI estádios do ciclo do epitélio seminífero e os túbulos apresentavam mais de um estágio por secção transversal. As células germinativas, incluindo espermatogônias até as espermatídes, apresentavam morfologia aparentemente normal. Em alguns túbulos não foram observadas células germinativas em determinados estádios onde eram previstas, enquanto em outros foi observada a presença de células em estádios onde normalmente não seriam frequentes. Muitos túbulos apresentaram o lúmen obstruído por células descamadas, associado com a presença de espaços no epitélio seminífero (**Figura 3C**). As células de Sertoli, por sua vez, apresentaram-se com morfologia típica. Em relação ao compartimento intertubular, foram observadas, além de fibras e células típicas do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, leucócitos e mastócitos. Ainda, foram observadas numerosas células de Leydig (**Figura 3D**), muitas delas com citoplasma preenchido por gotículas lipídicas.

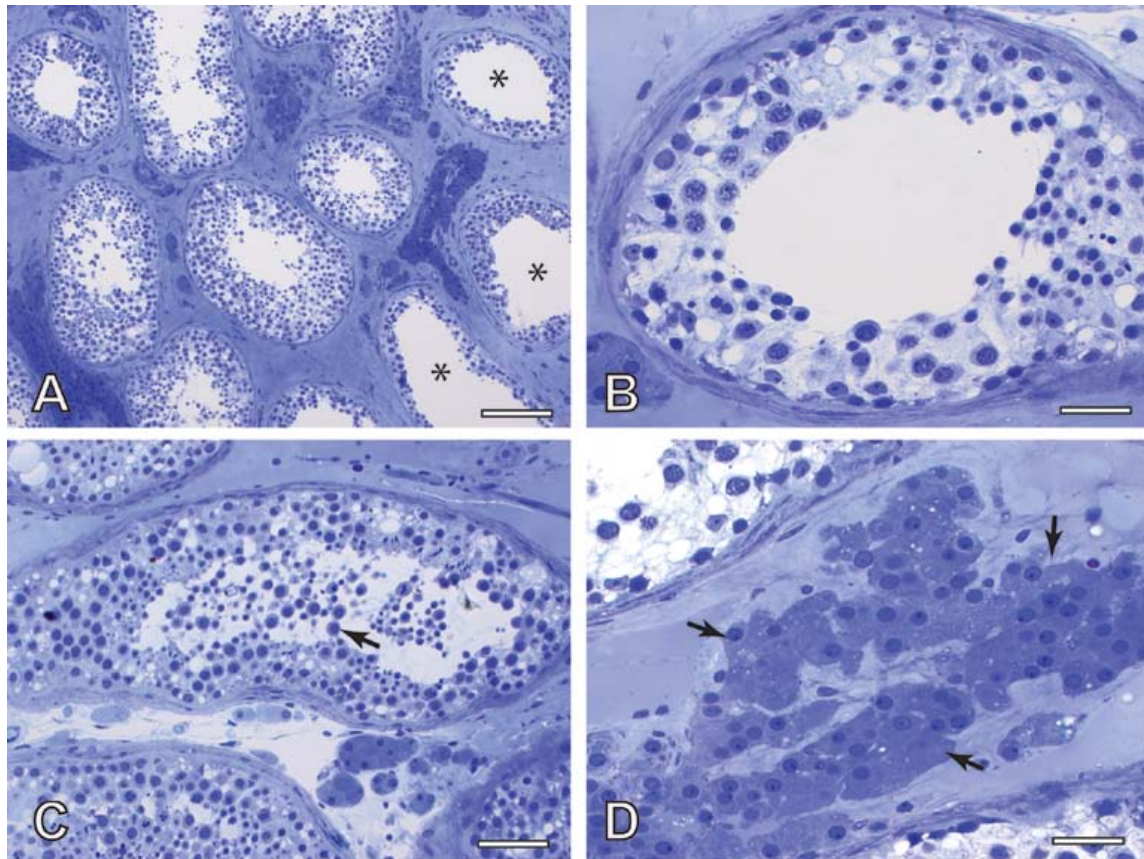


Figura 3. Fotomicrografias de secções de testículo de paciente idoso com câncer de próstata. A. Visão panorâmica dos túbulos seminíferos, onde se observa alguns túbulos com epitélio seminífero mais baixo, típico de hipoespermatogênese (asteriscos); B. Detalhe de um túbulo seminífero, em corte transversal, onde se observa epitélio seminífero com altura caracteristicamente mais baixa devido à presença de poucas células germinativas; C. Túbulo seminífero com células germinativas descamadas no lúmen (seta); D. Tecido intertubular com numerosas células de Leydig (setas). Coloração com azul de toluidina. Barras: A = 140 μm ; B e D = 35 μm ; C = 70 μm .

Ao avaliar os testículos pelos escores histopatológicos da espermatogênese segundo Johnsen (1970) e Bergmann e colaboradores (1994), verificou-se que os escores médios dos pacientes foram muito semelhantes, demonstrando que o grupo de pacientes utilizado no presente estudo foi bastante homogêneo (**Tabela 1**).

Tabela 1. Escores histopatológicos testiculares, segundo Johnsen (1970) e Bergmann e colaboradores (1994).

Pacientes	Escore de Johnsen		Escore de Bergmann	
	TD	TE	TD	TE
P1	7,92	-	0,68	-
P2	8,64	8,58	0,93	0,93
P3	-	7,87	-	0,63
P4	8,24	7,78	0,75	0,65

5.2. Morfologia e frequência dos componentes do homogeneizado testicular

Para avaliar a preservação e a morfologia das cabeças de espermátides no homogeneizado, após sonicação dos fragmentos testiculares, foram confeccionadas lâminas com concentração do homogeneizado pelo método do Cytospin e coloração com o kit Panótico, para todos os testículos dos pacientes avaliados. Quanto à morfologia, observou-se que o concentrado na lâmina histológica apresentou diversos restos celulares e grumos amorfos heterogêneos e dispersos, cuja frequência variou em dependência da combinação de frequência (Hz) e tempo (seg) de sonicação (**Figura 4**).

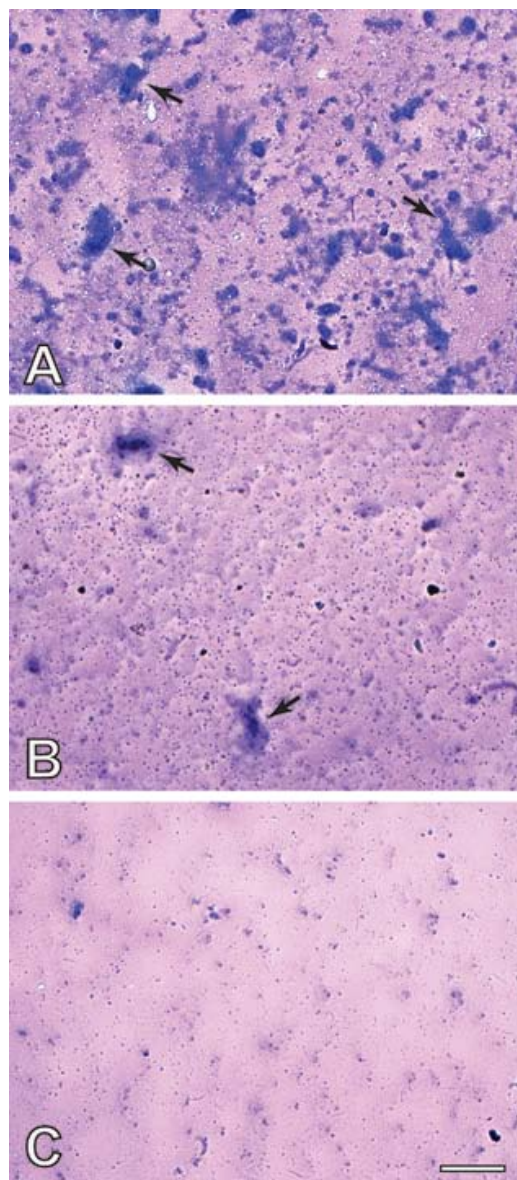


Figura 4. Fotomicrografias do homogeneizado após concentração por Cytospin e coloração por kit Panótico. A. Homogeneizado preparado a 60Hz/70s, com grande quantidade de material heterogêneo e grumos (setas); B. Homogeneizado preparado a 60Hz/90s, com alguns grumos de material amorfo (setas); C. Homogeneizado preparado a 60Hz/110s onde o material heterogêneo mostra-se bastante reduzido. Barra = 145 μ m.

Entre esse material, foi possível identificar alguns elementos celulares, que se encontravam íntegros ou fragmentados, em todas as combinações de frequência e tempo de sonicação utilizadas. Dos componentes celulares que resistiram à sonicação, alguns foram mais frequentes e puderam ser identificados, dentre eles núcleos de espermatídes, núcleos fragmentados e núcleos de outras células (**Figura 5**).

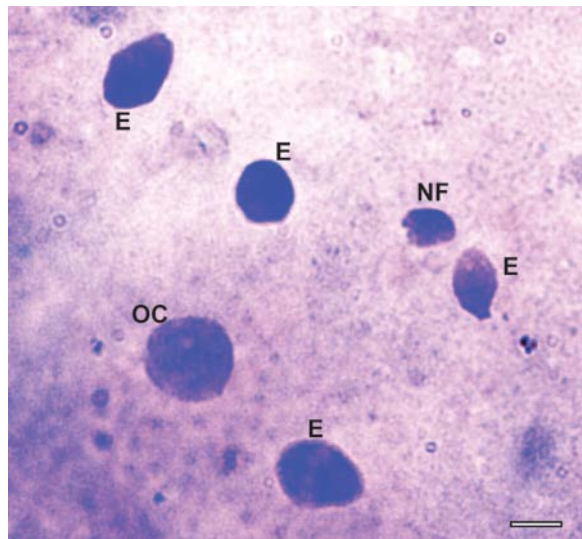


Figura 5. Fotomicrografia de concentrado de homogeneizado sobre lâmina, preparado pelo método de Cytospin e corado com kit Panótico. Podem ser identificados: núcleos de espermatídes (E), núcleos de outras células (OC) e núcleos fragmentados (NF). Barra= 4 μ m.

Quando se comparou as frequências desses elementos entre os diversos processamentos, verificou-se que não houve diferenças entre as mesmas, exceto quando se comparou a combinação 60Hz/90s com a combinação 60Hz/110s. A combinação 60Hz/90s mostrou maior frequência de núcleos de espermatídes íntegros em relação à combinação 60Hz/110s. Por outro lado, a frequência de núcleos fragmentados foi maior quando o tempo de sonicação foi de 110 segundos (60Hz/110s) comparado com o tempo de 90 segundos (60Hz/90s) (**Figura 6**). Em relação às outras combinações, não foram observadas diferenças significativas em relação aos dados morfométricos através da análise após Cytospin.

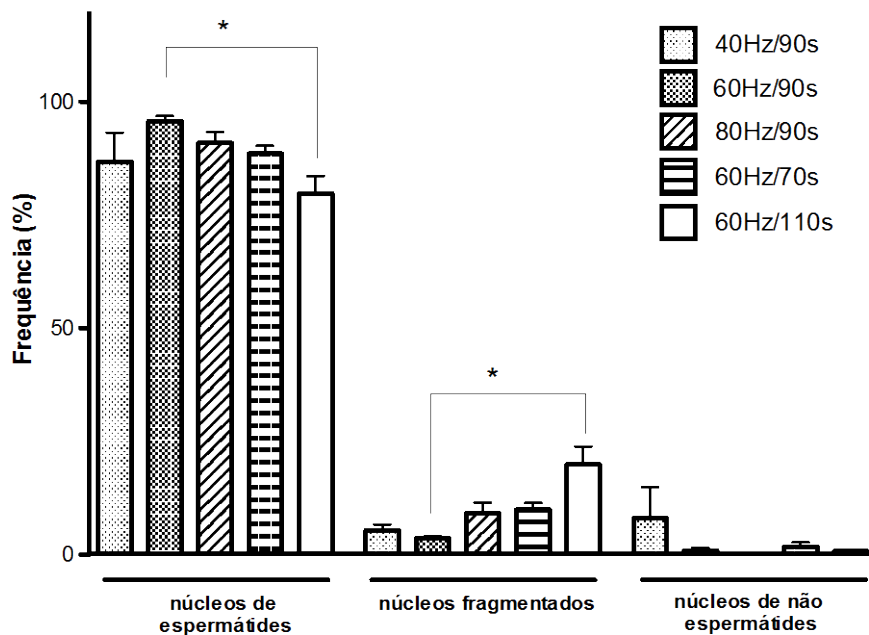


Figura 6. Frequência (%) de células em homogeneizados de tecido testicular de quatro pacientes, concentrados por Cytospin e corados pelo kit Panótico (* $p < 0,05$).

5.3. Morfologia das cabeças de espermátides nos homogeneizados, sob microscopia de fluorescência e de contraste de fase

Quanto ao aspecto morfológico das cabeças de espermátides, obtidas após sonicação dos fragmentos testiculares e observadas sob a microscopia de fluorescência, as mesmas apresentaram núcleos fortemente fluorescentes pelo DAPI, com fácil identificação. Restos celulares, ou debris, do homogeneizado raramente eram vistos no plano de fundo da preparação (**Figura 7A**). Já sob a microscopia de contraste de fase, as cabeças de espermátides eram vistas, frequentemente, misturadas a restos celulares presentes no homogeneizado, tornando sua identificação mais difícil (**Figura 7B**). Em um mesmo campo, observado pelos dois tipos de microscopias, foram detectadas espermátides cujos núcleos fluorescentes não eram percebidos pela microscopia de contraste de fase, e espermátides cujos núcleos eram percebidos por contraste, mas que não emitiram fluorescência (**Figuras 7A e 7B**).

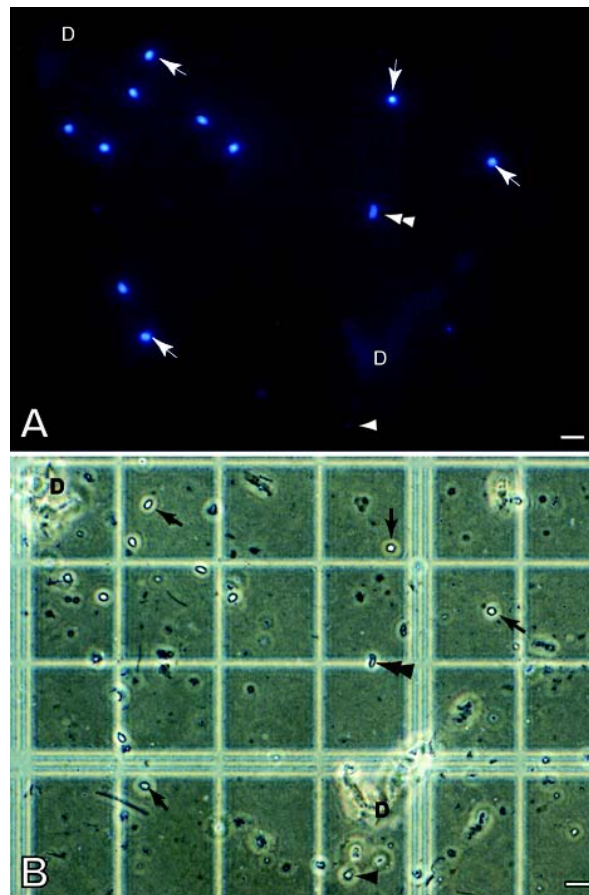


Figura 7. Fotomicrografias de homogeneizado em câmara de Neubauer, mostrando mesmo campo visto sob microscópio de fluorescência (A) e de contraste de fase (B). As setas indicam núcleos de espermátides, vistos em ambas as microscopias. Cabeças de setas simples indicam cabeças de espermátides identificadas por contraste de fase, mas cujos núcleos não fluorescem; cabeças de setas duplas indicam núcleos fluorescentes que não foram identificados como espermátides sob contraste de fase. D= debris. Barras= 12 μ m.

5.4. Predição do número de espermátides por testículo: comparação entre diferentes tempos e frequências de sonicação

Quanto ao número de espermátides por testículo, estimado através de uma amostra testicular de 0,05 gramas, sob a microscopia de fluorescência, os seguintes valores foram obtidos: 414×10^6 à 40Hz/90s, 512×10^6 à 60Hz/90s, 312×10^6 à 80Hz/90s, 347×10^6 à 60Hz/70s e 305×10^6 espermátides/testículo à 60Hz/110s. Sob a microscopia de contraste de fase, os seguintes valores foram obtidos: 368×10^6 à 40Hz/90s, 482×10^6 à 60Hz/90s, 296×10^6 à 80Hz/90s, 306×10^6 à 60Hz/70s e 269×10^6 espermátides/testículo à 60Hz/110s.

Ao comparar-se o número de espermátides obtido após diferentes frequências e tempos de sonicação, não foram observadas diferenças significativas, em nenhuma das microscopias utilizadas. Também não houve diferenças significativas quando se

comparou a microscopia de fluorescência com a de contraste de fase, em uma mesma combinação de frequência e tempo (**Figura 8**).

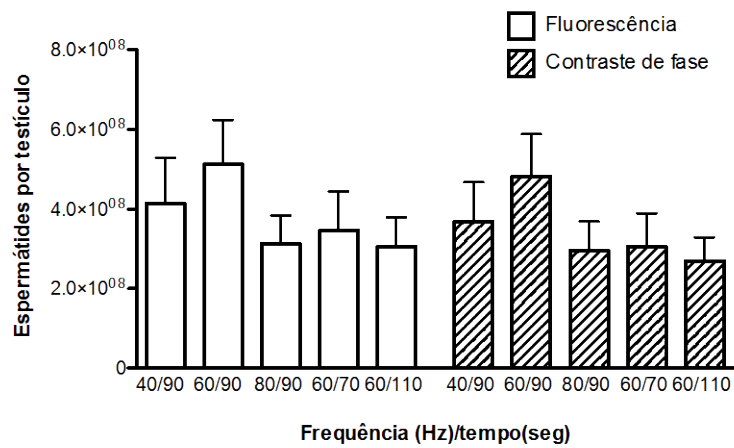


Figura 8. Comparação do número de espermátides por testículo obtido após diferentes frequências (Hz) e tempos (seg) de sonicação e avaliação pelo método de fluorescência (DAPI) ou contraste de fase (* $p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Um dos procedimentos frequentemente usados para a determinação da presença de espermatozoides em testículos de pacientes com azoospermia, que desejam ser pais através da fertilização *in vitro*, é a extração dessas células de biópsias testiculares. Os espermatozoides encontrados são então isolados e utilizados para a injeção em ovócitos, técnica conhecida como injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Nijs & Elst, 2000; Esteves *et al.*, 2011; Wosnitzer & Goldstein, 2014). A busca pelos espermatozoides é normalmente realizada por fragmentação mecânica manual, sob microscópio, dos componentes do parênquima testicular, o que, muitas vezes não garante o sucesso na obtenção dessas células, principalmente quando o paciente possui quantidade reduzida de espermatozoides no testículo (Donoso *et al.*, 2007; Berookhim & Schlegel, 2014; Bryson *et al.*, 2014). Dessa forma, torna-se de grande interesse o estabelecimento de um método mais eficaz na detecção de espermatozoides em biópsias testiculares, aumentando as chances de que pacientes, mesmo aqueles com reduzida produção espermática, possam alcançar o objetivo de se tornarem pais.

A sonicação de tecidos trata-se de método em que ondas ultrassônicas são aplicadas ao tecido, normalmente imerso em líquido, causando a separação de seus componentes, possibilitando assim o isolamento dos mesmos. O grau de separação dos componentes depende da frequência e do tempo de sonicação e esses dois parâmetros são então determinados conforme os objetivos do procedimento (Priego-Capote & Castro 2007). No caso do tecido testicular, sabe-se que é possível a obtenção exclusiva de cabeças de espermátides pela sonicação, uma vez que os núcleos das mesmas são mais resistentes ao processo, quando comparados com os núcleos dos demais tipos celulares. Sabe-se que no processo de espermiogênese ocorre compactação nuclear pela associação de diferentes proteínas ao DNA, o que confere essa maior resistência (Meistrich *et al.*, 1976; Kuretake *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 2016).

Para a clínica, o método de sonicação vem sendo sugerido como ferramenta para separação das cabeças de espermátides alongadas ou espermatozoides de suas caudas, uma vez que tem sido demonstrado que a cabeça isolada possui maior estabilidade para a ICSI (Kuretake *et al.*, 1996; Palermo *et al.*, 1996; Tateno *et al.*, 2000). Apesar de estudos prévios indicarem que a sonicação pode causar alterações importantes na estrutura do espermatozoide, como o estabelecimento de aberrações

cromossômicas (Martin *et al.*, 1988), sabe-se atualmente que a sonicação por si só não é prejudicial para o cromossoma, mas sim a exposição prolongada da célula ao meio externo utilizado no procedimento (Tateno *et al.*, 2000).

Já em estudos científicos, a sonicação tem sido utilizada, com o objetivo, entre outros, de predizer a produção espermática testicular através da contagem, em câmara de Neubauer, de cabeças de espermátides (Meistrich, 1982; Drumond *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2013). Entretanto, tal método não foi, até o momento, avaliado para aplicação com esse objetivo em humanos.

Nesse estudo, foi avaliada a utilização do método de sonicação de fragmentos de testículo humano, para obtenção de cabeças de espermátides e, através da contagem das mesmas, predição da produção espermática, com possível aplicação em reprodução assistida. Foram utilizados testículos de pacientes idosos com câncer de próstata, mas que não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento que pudesse comprometer de forma contundente a produção espermática, o que os tornaria inaptos ao estudo proposto. Apesar de não serem pacientes saudáveis, por estarem acometidos pelo câncer de próstata, os testículos desses pacientes passaram por uma avaliação histopatológica, incluindo a classificação do processo espermatogênico em escores, a fim de verificar seu grau de comprometimento e, também, se os pacientes poderiam compor um grupo homogêneo para o presente estudo. Quanto à análise histopatológica, verificou-se que em todos os pacientes, os testículos apresentavam muitos túbulos seminíferos com epitélio mais baixo e com poucas espermátides alongadas. Ainda, muitos túbulos possuíam o lúmen obstruído por células descamadas, associado com a presença de espaços no epitélio seminífero. Este aspecto morfológico demonstra que os testículos destes pacientes possuem processo espermatogênico normal, mas em estado de hipoespermatogênese compatível com a idade. Já está bem estabelecido que em indivíduos idosos, em comparação com indivíduos adultos, o parênquima testicular apresenta-se com menor peso e com redução tanto da porcentagem relativa de epitélio seminífero quanto da produção espermática diária. Os túbulos seminíferos de homens idosos caracterizam-se por apresentarem estágios progressivos de involução, com redução do número de espermátides alongadas e presença de anomalias morfológicas nas células germinativas, o que caracteriza a hipoespermatogênese (Johnson, 1986; Paniagua *et al.*, 1987).

Quanto à classificação do processo espermatogênico, o fato de todos os pacientes terem um escore de Johnsen médio de 8,17 com desvio padrão de apenas 0,37, comprova a homogeneidade entre eles, nesse aspecto. O escore de Johnsen em aproximadamente 8 indica que predominam, nesses pacientes, túbulos nos quais são observadas “apenas algumas espermátides alongadas (menos de cinco) presentes por corte transversal do túbulo seminífero”. Este escore está de acordo com nosso achado morfológico, confirmando que são pacientes com testículos em estado de hipoespermatogênese, compatível com a idade. Avaliando os testículos dos mesmos pacientes segundo o escore de Bergmann (Bergmann *et al.*, 1994), que foca na presença de espermátides alongadas, onde o escore varia entre 0 (ausência de espermátides alongadas) e 1 (presença de muitas espermátides alongadas no epitélio seminífero), verificamos que os pacientes apresentaram média de $0,73 \pm 0,11$. Mais uma vez demonstrou-se que, apesar da espermatogênese estar ativa, a redução no número de espermátides alongadas foi evidenciada pelos escores apresentados, o que seria esperado para testículo de pacientes idosos. No caso do escore de Bergmann, um dos pacientes teve um melhor desempenho. Enquanto o paciente P2 apresentou escore de 0,93 demonstrando uma espermiogênese bem preservada, para os outros três pacientes o escore variou de 0,63 a 0,75. Importante ressaltar que, apesar de muitas vezes questionados por não refletirem de maneira fiel e detalhada a condição do processo espermatogênico, os escores de Johnsen e de Bergmann são amplamente utilizados na clínica para classificação da espermatogênese (Bergmann & Kliesch, 2010; Dohle *et al.*, 2012) e, considerando a possível aplicação do método de sonicação na clínica, resolveu-se por seguir esse padrão de classificação. Apesar dos pacientes apresentarem hipoespermatogênese evidente, verificou-se a presença de espermátides alongadas em túbulos seminíferos, o que os tornava adequados para o estudo em questão, ou seja, a contagem de cabeças de espermátides após sonicação do fragmento testicular. Inclusive, o baixo número deste tipo celular, se detectado pelo método proposto, comprovaria, pelo menos em parte, sua eficiência.

Para a sonicação dos fragmentos testiculares de humanos, foram utilizadas diferentes frequências e tempos, determinadas a partir de diferentes combinações descritas em estudos utilizando o mesmo método (Meistrich *et al.*, 1976; Meistrich, 1982; Kuretake *et al.*, 1996; Drumond *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2013). Este cuidado foi

tomado uma vez que a resistência das cabeças de espermátides ao processo de sonicação pode diferir entre as espécies (Tateno *et al.*, 2000), devendo ter-se cautela na determinação da frequência e do tempo utilizados. O método do Cytospin, seguido de coloração com o kit Panótico, para análise do homogeneizado, permitiu verificar a eficiência das diferentes combinações de frequência e tempo de sonicação para a obtenção de cabeças de espermátides isoladas e íntegras. Observou-se que quando utilizava-se a combinação 40Hz/90s, apesar de não haver diferença significativa nas contagens em relação às demais combinações, o homogeneizado apresentava grande quantidade de grumos amorfos e heterogêneos, o que prejudicava sobremaneira a análise das células preservadas. Ainda, foi observada uma maior frequência de células preservadas que não possuíam a morfologia de espermátides, o que poderia comprometer a contagem das mesmas em câmara de Neubauer, principalmente quando se utilizasse o método de fluorescência, já que o DAPI cora indiscriminadamente núcleos celulares. A composição deste homogeneizado (40Hz/90s) demonstra que a frequência de 40Hz não foi suficiente para destruir por completo os outros tipos celulares que não as espermátides. Por outro lado, ao se utilizar a combinação 60Hz/110s, verificou-se grande destruição de células, incluindo espermátides. A frequência de núcleos fragmentados nessa combinação foi, inclusive, significativamente maior em relação à combinação 60Hz/90s. Este achado demonstra que, quanto à morfologia das cabeças de espermátides, o aumento do tempo de sonicação – de 90 para 110 segundos – provocou a destruição das mesmas, quando a frequência foi mantida constante (60Hz). Desta forma, indica que o tempo de sonicação máximo deve ser de 90 segundos. Já as combinações de 80Hz/90s e 60Hz/70s, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação às demais combinações - pela análise morfológica e morfométrica do homogeneizado concentrado pelo método de Cytospin - indicando que qualquer uma dessas combinações poderia ser utilizada para o isolamento de cabeças de espermátides por sonicação de tecido testicular humano. Entretanto, observa-se que o valor da predição espermática testicular obtida quando se utiliza a combinação de 60Hz/90s é maior em relação às demais combinações, indicando que essa possa ser a melhor combinação a ser utilizada. Para comprovação dessa indicação, estudos adicionais, incluindo maior número de pacientes, são necessários.

Finalmente, quando se realizou a predição da produção espermática a partir da contagem de cabeças de espermátides obtidas por sonicação, verificou-se que não houve diferença entre as diferentes combinações de frequência e tempo testadas, independente da microscopia utilizada para a contagem. Dessa forma, todas as combinações poderiam ser aplicadas para tal predição. Entretanto, considerando a avaliação da integridade e isolamento das cabeças de espermátides pelo método do Cytospin, considera-se prudente a eliminação das combinações 40Hz/90s e 60Hz/110s, uma vez que as mesmas poderiam, por preservarem outras células além de espermátides e por destruírem parte das espermátides, respectivamente, levarem a conclusões incorretas sobre a produção espermática do paciente. Quanto ao tipo de microscopia a ser empregado, uma vez que não houve diferença entre a contagem sob microscópio de fluorescência e sob microscópio de contraste de fase, deve-se levar em consideração a viabilidade do método e disponibilidade do equipamento. A contagem através da microscopia de contraste de fase não demanda nenhuma preparação especial do material, como acontece na contagem através do método de fluorescência e, além disto, não requer equipamento com sistema de fluorescência, o que poderia dificultar uma vez que nem todos os laboratórios de reprodução assistida possuem ou podem adquirir este tipo de equipamento.

Quando o laboratório não possui microscópio com sistema de contraste de fase, pode-se fazer contagem num microscópio de pesquisa que possua acessórios para ajustes de seu sistema de luz através do método proposto por Koehler (1894). Neste caso, deve-se aplicar o método e posteriormente, de forma anormal, baixar o condensador e fechar o seu diafragma. Apesar de não ser o ideal, pode-se desta forma observar as linhas da câmara de Neubauer e identificar cabeças de espermátides. No entanto, neste tipo de microscopia a resolução é grande e não permite certificar se o tipo celular observado seria mesmo cabeças de espermátides ou restos celulares.

Esse estudo trata pela primeira vez da sonicação de fragmentos testiculares humanos para obtenção de cabeças de espermátides para contagem, com o objetivo de verificar a possibilidade do uso desse método para verificação da presença de espermátides em testículos de indivíduos azoospermicos e predizer a produção espermática testicular nos mesmos. Nossos dados apontam para uma eficácia do método nesse sentido, uma vez que, em pacientes caracterizados por apresentarem

hipoespermatogênese, ou seja, baixa produção de espermatozoides, em todas as amostras analisadas foi possível a detecção de cabeças de espermátides. Entretanto, estudos adicionais para validação do método de sonicação na busca de cabeças de espermátides em pacientes azoospermicos, em que a procura manual não teve sucesso, bem como na predição da produção espermática, fazem-se necessários.

7. CONCLUSÕES

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

- A frequência de 60Hz mostrou-se a melhor para obtenção de cabeças de espermátides com morfologia íntegra em homogeneizados obtidos a partir da sonicação de fragmentos de testículo humano.
- O tempo de 90s, associado à frequência de 60Hz, mostrou-se o melhor para obtenção de cabeças de espermátides com morfologia íntegra em homogeneizados obtidos a partir da sonicação de fragmentos de testículo humano.
- A microscopia de contraste de fase mostrou-se a mais aplicável para a contagem de cabeças de espermátides em homogeneizados obtidos a partir da sonicação de fragmentos de testículo humano.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amann RP. The Cycle of the Seminiferous Epithelium in Humans: A Need to Revisit? *J. Androl.* 29: 469–487, 2008.
- Amaral A, Castillo J, Estanyol JM, Ballesca JL, Ramalho-Santos J, Oliva R. Human Sperm Tail Proteome Suggests New Endogenous Metabolic Pathways. *Molecular & Cellular Proteomics.* 12: 330-342, 2013.
- Anawalt BD. Approach to Male Infertility and Induction of Spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 98(9): 3532–3542, 2013.
- Bachir BG, Jarvi K. Infectious, Inflammatory, and Immunologic Conditions Resulting in Male Infertility. *Urol Clin N Am.* 41: 67–81, 2014.
- Baker K, Sabanegh E. Obstructive azoospermia: reconstructive techniques and results. *Clinics.* 68(S1): 61-73, 2013.
- Bergmann M, Behre HM, Nieschlag E. Serum FSH and testicular morphology in male infertility. *Clin Endocrinol.* 40:133-6, 1994.
- Bergmann M, Kliesch S. Testicular biopsy and histology. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (Eds). *Andrology – Male Reproductive Health and Dysfunction.* Berlin: Springer. 155-72, 2010.
- Berookhim BM, Schlegel PN. Azoospermia due to Spermatogenic Failure. *Urol Clin N Am.* 41: 97–113, 2014.
- Bryson CF, Ramasamy R, Palermo MSGD, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Severe Testicular Atrophy does not Affect the Success of Microdissection Testicular Sperm Extraction. *J. Urol.* 191: 175-178, 2014.
- Carvalho, EF. *Técnicas médicas de hematologia e imunohematologia.* 3ed. Belo Horizonte, Coop. Ed. Cult. Médica. 272p., 1983.
- Chalmel F, Com E, Lavigne R, Hernio N, Teixeira- Gomes AP, Dacheux JL, Pineau C. An Integrative Omics Strategy to Assess the Germ Cell Secretome and to Decipher Sertoli-Germ Cell Crosstalk in the Mammalian Testis. *PlosOne.* 9 (8): e104418, 2014.
- Chiarini-Garcia H, Parreira GG, Almeida FRCL. Glycol Methacrylate Embedding for Improved Morphological, Morphometrical, and Immunohistochemical Investigations Under Light Microscopy: Testes as a Model. In: H. Chiarini-Garcia, R.C.N. Melo (eds.), *Light Microscopy, Methods in Molecular Biology.* 689:3-18, 2011.
- Clermont Y. Spermatogenesis in man. A study of the spermatogonial population. *Fertility and Sterility.* 17(6): 705-721, 1966.

- Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *American Journal of Anatomy*, 112: 35-51, 1963.
- De Rooij DG. Stem cells in the testis. *Int J Exp Pathol*. 79(2):67-80, 1998.
- Deruyver Y, Vanderschueren D, Van der Aa F. Outcome of microdissection TESE compared with conventional TESE in non-obstructive azoospermia: a systematic review. *Andrology*. 2(1):20-24, 2014.
- Dohle GR, Elzanaty S, van Casteren NJ. Testicular biopsy: clinical practice and interpretation. *Asian Journal of Andrology*. 14: 88–93, 2012.
- Donoso P, Tournaye H, Devroey P. Which is the best sperm retrieval technique for non-obstructive azoospermia? A systematic review. *Human Reproduction Update*. 13 (6): 539–549, 2007.
- Drumond AL, Weng CC, Wang G, Chiarini-Garcia H, Eras-Garcia L, Meistrich ML. Effects of multiple doses of cyclophosphamide on mouse testes: Accessing the germ cells lost, and the functional damage of stem cells. *Reproductive Toxicology*. 32: 395-406, 2011.
- Ehmcke J, Schlatt S. A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates. *Reproduction*, 132: 673–680, 2006.
- Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S. Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Human Reproduction Update*. 12 (3): 275–282, 2006.
- Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics*. 66 (4): 691-700, 2011.
- Guitton N, Touzalin AM, Sharpe RM, Cheng CY, Pinon- Lataillade G, Méritte H, Chenal C, Jégou B. Regulatory influence of germ cells on Sertoli cell function in the pre-pubertal rat after acute irradiation of the testis. *International Journal of Andrology*. 23: 332-339, 2000.
- Heller CG, Clermont Y. Kinetics of germinal epithelium in man. *Recent Progress in Hormone Research*. 20: 545-575, 1964.
- Hess RA, França LR. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: Cheng CY (ed). *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. Austin, Landes Bioscience, cap 2, p. 1-15, 2007.
- Johnsen SG. Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*. 1:2-25, 1970.
- Johnson GD, Jodar M, Pique-Regi R, Krawetz SA. Nuclease Footprints in Sperm Project Past and Future Chromatin Regulatory Events. *Scientific Reports*: 6:25864, 2016.

- Johnson L, Thompson Jr DL, Varner DD. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Animal Reproduction Science*. 105: 23-51, 2008.
- Johnson L. Spermatogenesis and aging in the human. *J Androl*. 7:331-54,1986.
- Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Kopa TDZ, Dohle G, Krausz C. European Association of Urology Guidelines on Male Infertility: The 2012 Update. *European Urology*. 62: 324-332, 2012.
- Koehler. "New Method of Illumination for Photomicrographical Purposes". *Journal of the Royal Microscopical Society* 14: 261–262,1984.
- Kuretake S, Kimura Y, Hoshi K, Yanagimachi R. Fertilization and Development of Mouse Oocytes Injected with Isolated Sperm Heads. *Biology of Reproduction*. 55: 789-795,1996.
- Martin RH, Ko E, Rademaker A. Human sperm chromosome complements after microinjection of hamster eggs. *J.Reprod. Fert*. 84: 179-186, 1988.
- Mayor G, Zingg EJ. *Atlas de Operaciones Urológicas, Indicaciones, técnicas y tratamiento postoperatorio*. Barcelona:Ediciones Toray S.A.490-1,1975.
- Meistrich LM, Reid BO, Barcellona WJ. Changes in sperm nuclei during spermiogenesis and epididymal maturation. *Experimental Cell Research* 99: 72-78, 1976.
- Meistrich ML. Quantitative Correlation Between Testicular Stem Cell Survival, Sperm Production, and Fertility in the Mouse After Treatment With Different Cytotoxic Agents. *American Society of Andrology*. 3: 58-68, 1982.
- Melo MC, Almeida FRCL, Brant ALC, Parreira GG, Chiarini-Garcia H. Spermatogenesis recovery in protein-restricted rats subjected to a normal protein diet after weaning. *Reproduction, Fertility and Development*. 26(6): 787-96, 2013.
- Nijs MMH, Van Der Elst JCJ. Biological aspects of testicular sperm extraction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 92: 1-6, 2000.
- Palermo GD, Schlegel PN, Colombero LT, Zaninovic N, Moy F, Rosenwaks Z. Aggressive sperm immobilization prior to intracytoplasmic sperm injection with immature spermatozoa improves fertilization and pregnancy rates. *Human Reproduction*. 11(5): 1023-1029, 1996.
- Paniagua R, Nistal M, Amat P, Rodriguez MC, Martin A. Seminiferous tubule involution in elderly men. *Biol Reprod*. 36:939-47, 1987.
- Pineau C, Syed V, Bardin CW, Jégou B, Cheng CY. Germ Cell-Conditioned Medium Contains Multiple Factors that Modulate the Secretion of Testis, Clusterin, and Transferrin by Sertoli Cells. *Journal of Andrology*. 14 (2): 87-98, 1993.
- Priego-Capote F, Luque de Castro MD. Ultrasound-assisted digestion: A useful alternative in sample preparation. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 70: 299–310, 2007.

- Tateno H, Kimura Y, Yanagimachi R. Sonication Per Se Is Not as Deleterious to Sperm Chromosomes as Previously Inferred. *Biology of Reproduction*. 63: 341-346,2000.
- Weinbauer GF, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E. Physiology of Testicular Function. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S. (eds). *Andrology - Male Reproductive Health and Dysfunction*. New York, Springer Heidelberg Dordrecht, cap 2, p.11-59, 2010.
- Wosnitzer MS, Goldstein M. Obstructive Azoospermia. *Urol Clin N Am*. 41: 83–95, 2014.
- Zhengwei Y, Wreford NG, Royce P, Kretser DM, McLachlan RI. Stereological Evaluation of Human Spermatogenesis after Suppression by Testosterone Treatment: Heterogeneous Pattern of Spermatogenic Impairment. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 83 (4): 1284–1291, 1998.

Anexo I



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

PARECER N° 189/2008

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

CAAE – 0117.0.203.000-07 Processo nº. 25000.147565/2007-36
Projeto de Pesquisa: "Avaliações Morfofuncionais e Moleculares da linhagem espermatogonial humana antes e após tratamentos contra o câncer de próstata."
Pesquisador Responsável: Dr. Hélio Chiarini Garcia
Instituição: Instituto de Ciências Biológicas /Universidade Federal de Minas Gerais – (Centro Único)
CEP de origem: COEP/UFMG
Área Temática Especial: Reprodução Humana; Cooperação Estrangeira
Patrocinador: A ser definido (Instituição/Agências Financiadoras/ Próprios)

Sumário Geral do Protocolo

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

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

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

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

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

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

Apresentação do Protocolo

O protocolo está devidamente instruído.

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

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

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

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

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

Local de Realização do Estudo

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

Comentários

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

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

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

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

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

A metodologia é adequada aos fins desejados.

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

Cont. Parecer CONEP 182/2005

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

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

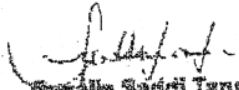
Considerações sobre a análise das respostas ao Parecer CONEP Nº 913/2007, relativo ao projeto de pesquisa em questão:


1. Foi informado pelo pesquisador a orquiectomia contínua sendo o tratamento padrão ouro.
2. A incidência dessa prática na instituição em pauta foi de 21 procedimentos em 2005 e 37 em 2006.
3. O TCLE foi revisado conforme solicitado:
 - a. O TCLE (Anexo 4) foi incorporado ao protocolo;
 - b. Quanto à orientação para o direito de reabilitação (possibilidade de colocação de prótese) foi esclarecido que é feita apenas a orquiectomia bilateral subcasular (e não a total), onde é retirado apenas o parênquima testicular e cujo resultado final é melhor do que a colocação de uma prótese.

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

Situação: Projeto aprovado

Brasília 07 de abril de 2008.


Sybilie Sadi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

	<p style="text-align: center;">Universidade Federal de Minas Gerais Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP</p>
---	--

Parecer nº. ETIC 117/07


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

DECISÃO

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

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

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


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





Belo Horizonte, 19 de outubro de 2007.

Anexo III

PROCESSO Nº 079/2007

TÍTULO: “Avaliações morfofuncionais e moleculares da linhagem espermatogonial humana antes e após tratamento contra o câncer de próstata.”

Sr(a) Pesquisador(a):

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

Atenciosamente,


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

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Hospital das Clínicas
Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

I. INTRODUÇÃO:

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

II. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

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

III. SIGILO DOS DADOS

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

IV. BENEFÍCIOS DA PESQUISA

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

V. RISCOS

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

VI. RESSARCIMENTO DAS DESPESAS

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

DEMAIS ESCLARECIMENTOS

Você dispõe de liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante a pesquisa. Você poderá recusar-se a participar deste estudo e/ou abandoná-lo a qualquer momento, sem precisar justificar. A aceitação ou não da participação neste estudo não influenciará no seu tratamento. Nesta pesquisa utilizaremos o testículo retirado cirurgicamente, conforme indicação médica e que seria, depois, desprezado. No momento da retirada do testículo será coletada também amostra de sangue da veia braquial de um dos braços do paciente. O consentimento em participar deste projeto não acarretará coleta de nenhum outro material adicional nem mudanças no tratamento indicado. Não serão utilizados outros tecidos e não serão realizados quaisquer outras manipulações, experimentos ou intervenções diretas com o paciente.

VII. TERMO DE CONSENTIMENTO

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

Nome completo do paciente: _____ Nº Registro do paciente: _____

Assinatura do paciente ou representante legal: _____

Local e data: _____

Nome da pessoa que obteve o Consentimento Livre e Esclarecido: _____

Assinatura da Pessoa que obteve o consentimento Livre e esclarecido: _____

Local e data: _____

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

TELEFONES PARA CONTATO:

Pesquisadores:

Prof. Hélio Chiarini-Garcia - Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução, UFMG – (31) 3409.2807 ou 9186.1848

Profª Fernanda RCL Almeida - Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução, UFMG – (31) 3409.2992

Laura Toledo Vellez – Pesquisadora, Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução, UFMG – (31) 3409.2994 ou 9362.2263

Lilian Massara Martinelli - Pesquisadora, Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução, UFMG – (31) 3409.2994 ou 9996.0696

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

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

Dr. Marcos de Lucca Moreira Gomes, Pesquisador - Laboratório Biologia Estrutural e Reprodução - (31) 3409.2994 ou (31) 9416.7035

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

Endereço do Comitê de Ética:

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – UFMG

Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005

Av. Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha

31.270-901 – Belo Horizonte – MG

Telefone: (31) 3409.4592

Anexo V

Classificação histopatológica do testículo nos diferentes escores.

Paciente: P1

Testículo: Direito

1) Critério de Johnsen

Escores	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	Totais
Nº de túbulos por escore	1	45	22	17	7	8	0	0	0	0	100
NºT x escore	10	405	176	119	42	40	0	0	0	0	Escore médio 7,92

2) Critério de Bergmann Somatório do nº de túbulos com escores de Johnsen de 8 a 10 / Nº total de túbulos seminíferos contados: $68 / 100 = 0,68$