

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**“Comparação entre parâmetros morfológicos e morfométricos do testículo humano após diferentes processamentos histológicos”**

**MIRNA YURI DA SILVA LIMA**

Belo Horizonte  
Março de 2014

**MIRNA YURI DA SILVA LIMA**

**“Comparação entre parâmetros morfológicos e morfométricos do testículo humano após diferentes processamentos histológicos”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Chiarini-Garcia  
Coorientadora: Profa. Dr<sup>a</sup>. Fernanda R.C.L. Almeida

Belo Horizonte  
Março de 2014

043

Lima, Mirna Yuri da Silva.

Comparação entre parâmetros morfológicos e morfométricos do testículo humano após diferentes processamentos histológicos [manuscrito] / Mirna Yuri da Silva Lima. - 2014.

63 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Hélio Chiarini-Garcia. Co-orientadora: Fernanda R.C.L. Almeida

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Espermatogênese - Teses. 2. Testículos - Técnicas histológicas - Teses. 3. Morfometria - Teses. 4. Escores histopatológicos. 5. Morfologia - Teses. I. Chiarini-Garcia, Hélio. II. Almeida, Fernanda Radicchi Campos Lobato de, 1967- III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.3



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE**

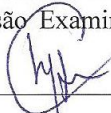
252/2014/07  
entrada  
1º/2012  
2012665076

**MIRNA YURI DA SILVA LIMA**

Às **quatorze horas** do dia **27 de março de 2014**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**Comparação entre parâmetros morfológicos e morfométricos do testículo humano após processamentos histológicos**", 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 (Orientador)	UFMG	aprovada
Dra. Fernanda R. C. L. de Almeida (Co-orientadora)	UFMG	aprovada
Dra. Gleydes Gambogi Parreira	UFMG	aprovada
Dr. Augusto Barbosa Reis	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, 27 de março de 2014.**

Dr. Hélio Chiarini Garcia (Orientador) 

Dra. Fernanda R. C. L. de Almeida (Co-orientadora) 

Dra. Gleydes Gambogi Parreira 

Dr. Augusto Barbosa Reis 

  
Prof. Cleida Aparecida de Oliveira  
COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO  
EM BIOLOGIA CELULAR (CB)/UFMG

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

Comparação entre parâmetros morfológicos e morfométricos do testículo humano após diferentes processamentos histológicos.

MIRNA YURI DA SILVA LIMA

Nível: Mestrado

Data da defesa: 27/03/2014

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais.

Comissão Examinadora formada pelos professores:

Prof. Dr. Hélio Chiarini-Garcia (Orientador) – ICB/UFMG

Profa. Dr<sup>a</sup>. Fernanda R.C.L. Almeida (Coorientadora) – ICB/UFMG

Prof. Dr<sup>a</sup>. Gleydes Gambogi Parreira – ICB/UFMG (titular)

Prof. Dr. Augusto Barbosa Reis – FM/UFMG (titular)

Prof. Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa – ICB/UFMG (suplente)

## **APOIOS**

**UFMG** – Universidade Federal de Minas Gerais

**FAPEMIG** – Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais

**CAPES** – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

*“Você nunca sabe a força que tem, até que a sua única alternativa é ser forte.”  
(Johnny Depp)*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus toda honra e glória! A Ele tudo o que tenho, tudo o que sou e o que vier a ser! Pois tenho vivido sob seu cuidado e amor imensurável, incondicional.

Obrigada mami por todo o seu amor, seu apoio, obrigada por acreditar em mim, por sempre me dar os melhores conselhos e palavras certas! Te amo!

Obrigada pela força de sempre minhas manas Mirtes Rocha, Marcia Lima e minha primuska Eliane Raquel.

Muito obrigada aos amigos que fiz no Laber: Luciana, Pati, Camilinha (pacote), Pati preta, Amandinha, André, Tati Fiúza, Malu, Reginaldo Martello, Fabíola Nihi, Fabíola, Andréia, Marininha, Isadora, Rafaela, Lílian e Laura. Pessoas mega especiais! Que sempre me receberam com um carinho imenso e me ajudaram muito. Isso é algo raro num meio de tanta competição. Enfim, no Laber a gente encontra muito carinho e apoio sincero.

Aos professores Fernanda Almeida, Helio Chiarini-Garcia, Gleydes Parreira e Augusto Reis que acreditaram em mim e mesmo com as minhas falhas tiveram paciência e souberam conduzir nossos trabalhos sempre de forma a contribuir com o meu crescimento. A vocês toda a minha admiração, meu carinho, minha amizade. Precisaria de muitas linhas pra agradecer e dizer o quanto devo essa vitória a vocês! Muito obrigada!

Agradeço também aos amigos de Belém! Que mesmo com a distância mantiveram a amizade por mim. Recebi o apoio de vocês pela internet, pelo celular e nas idas à terrinha. Muito obrigada à amiga Cristiane Costa, que escutou meu desespero nas altas madrugadas, esteve comigo em cada momento. Te amo demais amiga! Sempre juntas!!! Obrigada amiga Aline Viana, Márcia Batista, Emanuelle Pantoja, Juliane, Carol Cardoso, Alceu Silva, Ronald Cardoso. Vocês são a minha riqueza! Pois tenho certeza que poucas pessoas são abençoadas com amizades tão lindas e verdadeiras, que supera distâncias!

Obrigada a todas as pessoas que me receberam bem nessa cidade, com quem pude dividir uma parte da minha vida. Aprendi muito com todos vocês.

Muito obrigada a todo mundo que me deu essa força, por me ajudar a ser melhor a cada dia, por me fazer entender que a felicidade está na caminhada e não necessariamente na chegada. Sou muito abençoada e estou muito feliz por tudo!



*"Vivendo se aprende; mas o que se aprende mais é só a fazer outras maiores perguntas" (João Guimarães Rosa)*

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS -----	X
LISTA DE FIGURAS -----	XI
LISTA DE ABREVIATURAS -----	XII
RESUMO-----	XIII
ABSTRACT-----	XIV
1 INTRODUÇÃO -----	1
2 OBJETIVOS -----	3
2.1 Objetivo geral -----	3
2.2 Objetivos específicos -----	3
3 REVISÃO DA LITERATURA -----	4
3.1 Caracterização testicular. -----	4
3.2 O processo espermatogênico -----	5
3.2.1 Fase espermatogonial-----	7
3.2.2 A espermatogênese no homem idoso-----	8
3.3 O estudo de testículo sob microscopia de luz-----	9
3.3.1 Etapas no processamento histológico-----	11
4 MATERIAIS E MÉTODOS -----	14
4.1 Considerações Éticas-----	14
4.2 Coleta do material biológico-----	14
4.3 Processamento das amostras -----	16
4.3.1 Fixação em Bouin e inclusão em parafina (BP) -----	16
4.3.2 Fixação em glutaraldeído e inclusão em glicol metacrilato (GGMA) -	16
4.3.3 Fixação em glutaraldeído e inclusão em resina araldite (GA) -----	17
4.4 Análises morfológicas e morfométricas -----	17
4.4.1 Avaliação dos aspectos morfológicos -----	18
4.4.2 Avaliação dos escores histopatológicos testiculares -----	18
4.4.3 Avaliação do diâmetro tubular, diâmetro luminal, altura do epitélio seminífero e espessura da túnica própria.-----	22
4.4.4 Diâmetro médio dos núcleos das células germinativas, células de Sertoli e células de Leydig. -----	22

4.4.5 Número e apoptose de células germinativas e de mitoses espermatogoniais-----	22
4.4.6 Índices da espermatogênese -----	23
4.5 Análise estatística-----	24
5 RESULTADOS -----	25
5.1 Morfologia-----	25
5.2 Escores histopatológicos -----	30
5.3 Parâmetros tubulares -----	31
5.4 Diâmetros nucleares -----	32
5.5 Número e apoptose de células germinativas e de mitoses espermatogoniais. -----	34
5.6 Índices da espermatogênese -----	35
6 DISCUSSÃO-----	36
7 CONCLUSÕES -----	42
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	43
9 ANEXOS -----	53
Anexo I. Aprovação nos comitês de ética -----	53
Anexo II. Termo de consentimento livre e esclarecido-----	58
Anexo III. Ciclo do epitélio seminífero do homem (Heller e Clermont, 1964)---	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Grupo experimental de cinco homens sexualmente maduros e com paternidade comprovada.-----	15
<b>Tabela 2.</b> Classificação histopatológica da espermatogênese adaptado de Levin (1970). -----	19
<b>Tabela 3.</b> Classificação histopatológica da espermatogênese, segundo Johnsen (1970). -----	20
<b>Tabela 4.</b> Classificação histopatológica da espermatogênese (Bergmann e Kleich, 2010). -----	21
<b>Tabela 5.</b> Escores de Cinco Padrões, Johnsen e Bergmann após diferentes tratamentos histológicos.-----	30
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros dos túbulos seminíferos de homens após diferentes tratamentos histológicos.-----	31
<b>Tabela 7.</b> Diâmetros nucleares de células germinativas após diferentes tratamentos histológicos.-----	32
<b>Tabela 8.</b> Diâmetros nucleares de células somáticas de homens após diferentes tratamentos histológicos. -----	33
<b>Tabela 9.</b> Contagem das células germinativas, mitoses e apoptoses em estágio III de fragmentos testiculares submetidos a três diferentes tratamentos histológicos. -----	34
<b>Tabela 10.</b> Índices de etapas do processo espermatogênico do homem, após diferentes processamentos histológicos. -----	35

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotomicrografia comparativa da preservação tecidual e citológica de fragmentos testiculares processados pelos três diferentes métodos. ----- 25
- Figura 2.** Fotomicrografias de túbulos seminíferos de testículos de homem submetidos à fixação em solução Bouin e incluídos em parafina.----- 26
- Figura 3.** Fotomicrografias de túbulos seminíferos de testículos de homens submetidos à fixação em solução glutaraldeído e incluídos em glicol metacrilato. ----- 28
- Figura 4.** Fotomicrografia de túbulos seminíferos de testículos de homens submetidos à fixação em solução glutaraldeído e incluídos em araldite. ----- 29
- Figura 5.** Escores de Cinco Padrões, Johnsen e Bergmann nas técnicas histológicas de Bouin/parafina (BP), glutaraldeído/glicol metacrilato (GGMA) e glutaraldeído/araldite (GA).----- 31
- Figura 6.** Parâmetros dos túbulos seminíferos de homens após diferentes tratamentos. ----- 32
- Figura 7.** Diâmetros nucleares de células germinativas de homens após diferentes tratamentos histológicos. ----- 33
- Figura 8.** Diâmetros nucleares de células somáticas de homens após diferentes tratamentos histológicos. ----- 33
- Figura 9.** Número de células germinativas, mitoses e apoptoses presentes no estágio III do ciclo do epitélio seminífero de homens após diferentes tratamentos histológicos.----- 34
- Figura 10.** Índices de etapas do processo espermatogênico do homem, após diferentes processamentos histológicos. ----- 35

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{m}$  - micrômetro

MLAR - microscopia de luz de alta resolução

GMA - resina glicol metacrilato

CES - ciclo do epitélio seminífero

Ae - espermatogônia do tipo A escura

Ac - espermatogônia do tipo A clara

PI - espermátócito primário do tipo pré-leptóteno

Pq - espermátócito primário do tipo paquíteno

Sb1 - espermátide arredondada do tipo Sb1

S - célula de Sertoli

NS - núcleo de célula de Sertoli

ES - nucléolo de célula de Sertoli

Ld - célula de Leydig

NLd - núcleo de célula de Leydig

ELd - nucléolo de célula de Leydig

Vv% - proporção volumétrica

## RESUMO

Os estudos clássicos sobre a espermatogênese humana foram desenvolvidos na década de 1960 quando os testículos eram preservados com fixadores coagulantes e incluídos em parafina, produzindo cortes espessos e tecidos com baixa resolução. Atualmente, estudos correlatos estão sendo desenvolvidos com a utilização de fixadores que melhor preservam a estrutura tecidual e os componentes celulares e que são incluídos em resinas plásticas, tais como glicol metacrilato e araldite, que propiciam a obtenção de cortes histológicos semifinos. No entanto, seria possível comparar os resultados morfológicos e morfométricos obtidos dos estudos atuais com aqueles publicados no passado, levando em consideração a discrepância entre os processamentos histológicos? Desta forma, o presente estudo visa comparar resultados morfológicos e morfométricos (escores histopatológicos, parâmetros tubulares, diâmetros nucleares, número de células germinativas, somáticas, mitoses e apoptoses e índices de eficiência da espermatogênese) do testículo de homens submetidos à diferentes processamentos histológicos. Após orquiectomia subcapsular bilateral, o testículo de cinco homens idosos com câncer de próstata foram divididos em três partes e processados com (i) Bouin/parafina, (ii) glutaraldeído/glicol metacrilato e (iii) glutaraldeído/araldite. O presente estudo confirma que os processamentos histológicos têm interferência marcante na morfologia tecidual e, principalmente, na definição citológica. Em conjunto, os achados aqui obtidos mostram que os processamentos com fixação em glutaraldeído e inclusão nas resinas plásticas podem ser comparados quanto a dados morfométricos e morfológicos, à exceção de avaliações da biologia espermatogonial, que são apenas confiáveis após processamento com glutaraldeído/araldite. Já nos tecidos processados com Bouin/parafina, estas correlações morfométricas, e mesmo morfológicas, não podem ser feitas diretamente principalmente devido ao alto grau de retração tecidual. Verificou-se, ainda, que os dados morfométricos relativos aos números celulares não diferiram entre os vários processamentos, uma vez que as células foram identificadas, mesmo com prejuízos da qualidade morfológica. Por outro lado, quando foram comparados os achados relativos às medidas ( $\mu\text{m}$ ), tais como diâmetros tubulares, diâmetros celulares e altura do epitélio seminífero, as diferenças foram significativamente reduzidas após o processamento com Bouin/parafina, demonstrando que a retração tecidual interferiu nos achados morfométricos, comprometendo a comparação dos resultados dos diferentes processamentos sem a utilização de fatores de correção.

**Palavras-chave:** técnicas histológicas, espermatogênese, morfologia, escores histopatológicos, testículo, homem.

## ABSTRACT

The classical studies on human spermatogenesis were developed in the 1960's where the testes were preserved with coagulants fixatives and embedded in paraffin, producing thick sections and tissue with low-resolution. Currently, related studies are being developed with the use of fixatives that best preserve the tissue structure and cytology and embedded in plastic resins, such as glycol methacrylate and epoxy resins, which provide obtaining semithin histological sections. However, it is unclear whether it would be possible to compare the morphological and morphometric results of current studies with those published in the past, taking into account the discrepancy between histological processing. Thus, this study aims to compare morphological and morphometric results (histopathological scores, tubular parameters, nuclear diameters, number of germ cells, somatic, mitosis and apoptosis and rates of the spermatogenesis efficiency) of the testis of men undergoing different treatments. After bilateral subcapsular orchiectomy, the testicle from five elderly men with prostate cancer were divided into three parts and processed with (i) Bouin/paraffin, (ii) glutaraldehyde/glycol methacrylate and (iii) glutaraldehyde/araldite. The present study confirms that histological processing have remarkable interference in tissue morphology and especially the cytological definition. Together, the findings obtained here show that processing with glutaraldehyde fixation and inclusion in plastic resins can be compared based on morphometric data, and for the morphology, except for evaluation of spermatogonial biology, which are only reliable after processing with glutaraldehyde/araldite. On the other hand, when in Bouin/paraffin, these morphometric correlations, and even morphological data, cannot be made directly mainly due to the high degree of tissue retraction. It was found, moreover, that the morphometric data on cell number did not differ between the various processes, since the cells were identified, even with loss of morphological quality. On the other hand, when the findings relative to measurements ( $\mu\text{m}$ ) were compared, as tubular and cellular diameter and seminiferous epithelium height, the differences were significantly reduced demonstrating that tissue shrinkage affected the morphometric results, making it impossible to compare the results of different processing without the use of correction factors.

**Keywords:** histological techniques, spermatogenesis, morphology, histopathological score, testis, man.



## 1 INTRODUÇÃO

A escolha de uma técnica para melhor analisar um tecido torna-se tão essencial quanto à pergunta em estudo, exigindo de maneira equivalente que o pesquisador domine não só a fisiologia ou a morfologia do tecido, mas também o quanto a técnica escolhida pode interferir em suas análises. Assim também, questiona-se até onde podemos confrontar estudos em um mesmo tecido, mas submetidos a diferentes técnicas histológicas, por exemplo. Por isto, análises e comparações, mesmo em uma mesma linha de pesquisa, requerem cuidados para que alterações no decorrer do processo não contribuam para resultados equivocados.

A utilização de fixadores coagulantes, como o Bouin, tem sido aplicada como um procedimento de relativo sucesso na preservação histológica, favorecido pelo baixo custo da técnica de inclusão em parafina, fácil acesso aos reagentes e mais opções de análises diante de colorações e impregnações. No entanto, nota-se a presença de muitos artefatos que dificultam a observação de detalhes citológicos, além da dificuldade de obtenção de cortes mais finos. Com isso, outros pesquisadores optam pelo uso de fixadores não coagulantes e inclusões em resinas plásticas tanto para obtenção de cortes mais finos quanto para melhor preservação da amostra o mais próximo de seu estado natural, pois após o processo de fixação muitas moléculas de água permanecem ligadas ao tecido resultando em maior estabilização estrutural. Dentre esses fixadores podemos citar o glutaraldeído muito utilizado em microscopia eletrônica, mas que pode também ser empregado na microscopia de luz com muito êxito.

Neste contexto, o presente trabalho teve o objetivo de comparar aspectos morfológicos e morfométricos de diversos componentes do testículo humano, vistos à microscopia de luz, quando submetidos aos métodos mais comumente utilizados de preparação histológica. Os escolhidos foram fixação em Bouin e inclusão em parafina, fixação em glutaraldeído e inclusão em

resina plástica à base de glicol metacrilato e fixação em glutaraldeído e inclusão em resina epóxi araldite.

Considerando as diferenças nos processamentos histológicos para estudos do parênquima testicular sob a microscopia de luz, perguntamos se as avaliações morfológicas e morfométricas do testículo humano podem ser comparadas nas três técnicas mais utilizadas atualmente e, se não, se as diferenças são previsíveis a ponto de permitir interpretações semelhantes a partir de resultados obtidos de métodos diferentes de processamento.

Além de buscar fatores de correção entre as avaliações morfométricas visando comparar dados oriundos de materiais oriundos de diferentes processamentos histológicos, o presente trabalho também visa demonstrar comparativamente os diferentes métodos com o objetivo de apresentar aquele com melhor relação custo/benefício em relação ao objetivo da pesquisa e em relação ao diagnóstico histopatológico.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar de forma comparativa alguns parâmetros da espermatogênese humana através de abordagens morfológicas e morfométricas, após processamentos histológicos com diferentes fixadores e meios de inclusão e verificar o quanto eles mudam em relação às alterações provocadas pela qualidade do processamento histológico.

### 2.2 Objetivos específicos

Verificar as alterações provocadas pela qualidade do processamento histológico em relação aos seguintes aspectos:

- a) Avaliar a morfologia das células germinativas e somáticas do epitélio seminífero e do interstício testicular.
- b) Determinar os escores histopatológicos segundo cinco padrões, Johnsen e Bergmann
- c) Avaliar os parâmetros tubulares: diâmetro tubular, diâmetro de lúmen, altura do epitélio e espessura da túnica própria;
- d) Determinar o diâmetro médio dos núcleos de célula de Sertoli e Leydig, diâmetro médio do núcleo de células germinativas no estágio III do ciclo do epitélio seminífero (espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$ , espermatogônias  $A_{\text{claras}}$ , espermatócitos primários em preleptóteno (PI), espermatócitos primário em paquíteno (Pq) e espermátides Sb1
- e) Determinar índices para cálculo da eficiência da espermatogênese, tais como os mitóticos, meióticos, de suporte das células de Sertoli e eficiência geral da espermatogênese.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Caracterização testicular.

O testículo é um órgão com funções exócrina e endócrina, revestido externamente por cápsula, a albugínea, de onde partem septos de tecido conjuntivo para o interior do mesmo. Estes septos se abrem numa região denominada mediastino e dividem os testículos em lóbulos. Os lóbulos testiculares são constituídos por dois compartimentos: o intertubular e o tubular (Russell et al., 1990).

O compartimento intertubular contém vasos sanguíneos, linfáticos e nervos, além de células de Leydig e células do tecido conjuntivo, dentre as quais se destacam os macrófagos e os mastócitos. As células de Leydig localizam-se nos espaços angulosos entre os túbulos seminíferos e, com frequência, encontram-se associadas a vasos sanguíneos. Estas células, normalmente de forma poliédrica, possuem grande quantidade de retículo endoplasmático liso que está relacionada com a sua capacidade de produzir hormônios esteroides, principalmente a testosterona, que atua no aparecimento de caracteres sexuais secundários e manutenção da espermatogênese no homem e nos animais sexualmente maduros (Sharpe, 1994).

Os túbulos seminíferos, que constituem o compartimento tubular, são formados pela túnica própria, epitélio seminífero e lúmen. Internamente à túnica própria encontra-se um epitélio estratificado altamente complexo e especializado, denominado epitélio seminífero. Este epitélio é constituído por duas populações celulares: (1) uma população de células somáticas, as células de Sertoli; e (2) uma população de células germinativas, que se multiplicam e se diferenciam migrando progressivamente da base do epitélio em direção ao lúmen (Russell et al., 1990).

As células de Sertoli são células piramidais altas que se conectam às células germinativas por junções gap, o que possibilita a troca iônica e química entre as células, além disso as células de Sertoli se associam extensivamente umas às outras e à lâmina basal dos túbulos seminíferos através de junções de

oclusão baso-laterais, compartimentalizando o epitélio seminífero e constituindo a base morfológica e funcional da barreira de célula de Sertoli ou hematotesticular. Esta barreira forma dois compartimentos no epitélio seminífero: (a) o compartimento basal, onde se alojam as espermatogônias; e (b) o compartimento adluminal onde espermatócitos e espermátides permanecem em recessos das paredes laterais e do ápice das células de Sertoli. A barreira hematotesticular impede a passagem de moléculas grandes, protegendo assim as etapas mais avançadas da espermatogênese. Desta forma, as células de Sertoli desempenham funções de sustentação, nutrição, proteção, absorção, fagocitose e secreção de hormônios, que controlam a manutenção e diferenciação das células germinativas (França e Chiarini-Garcia, 2005).

As células germinativas não estão distribuídas ao acaso nos túbulos seminíferos de animais sexualmente maduros, mas sim organizadas numa série bem definida e cíclica de associações celulares - os estádios, ordenados de modo espécie-específico e constituindo o ciclo do epitélio seminífero (CES) (Russell et al., 1990).

### 3.2 O processo espermatogênico

A espermatogênese é um processo sincrônico pelo qual gerações sucessivas de células germinativas, dispostas em camadas concêntricas bem definidas, sofrem processos de mitoses, meiose, apoptoses e diferenciação celular, constituindo um evento biológico altamente eficiente. As células germinativas mais jovens são as espermatogônias, localizadas no compartimento basal do epitélio seminífero. Acima, no compartimento adluminal, estão presentes os espermatócitos primários, em várias fases de evolução da meiose e por fim as espermátides arredondadas e alongadas (Russell et al., 1990). Todo esse processo, que ocorre nos túbulos seminíferos, dura cerca de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos (França e Russell, 1998) e cerca de 72 dias no homem (Heller e Clermont, 1963), podendo ser dividido em três fases de acordo com mudanças morfológicas e bioquímicas dos componentes do citoplasma e núcleo (Courot et al., 1970): (1) fase proliferativa ou espermatogonial, na qual as espermatogônias passam por sucessivas e

rápidas divisões mitóticas, originando uma que vai manter a população de células-tronco e outra que vai se comprometer com a espermatogênese; (2) fase meiótica ou spermatocitogênica, onde o material genético é duplicado, recombinado e segregado, sendo uma fase muito importante para a diversidade genética entre membros da mesma espécie; (3) fase spermiogênica ou de diferenciação, na qual as spermatídes, que são células haplóides, se diferenciam em spermatozoides. Normalmente, quatro a cinco ciclos são necessários para que o processo spermatogênico se complete, ou seja, para que haja liberação dos spermatozoides no lume do túbulo seminífero a partir de uma spermatogônia (Amann e Schanbacher, 1983; França e Russell, 1998).

Embora a organização geral da espermatogênese seja essencialmente a mesma em todos os mamíferos, existem características particulares entre as diferentes espécies, relacionadas com o número de gerações spermatogoniais e os aspectos morfológicos das células germinativas presentes nas várias fases do processo spermatogênico (Russell et al., 1990). Por exemplo, o número de estádios que constituem o CES é variável para cada espécie, sendo dividido, dentre os primatas, em XII estádios no macaco rhesus (Clermont e Leblond, 1959), vervet (Clermont, 1969) e *stump-tailed* (Clermont e Antar, 1973), para o sagüi foram descritos IX estádios (Millar et al., 2000) e para o homem VI estádios (Clermont, 1963). Muciaccia e colaboradores (2013) sugeriram um novo arranjo no CES em humano, no caso XII estádios e não mais VI, com o intuito de facilitar comparações entre os estudos do CES de humanos e de animais de laboratório cujo ciclo é normalmente dividido em XII estádios. Mas, no presente trabalho, consideraremos a classificação feita por Clermont (1963).

Este arranjo em estádios do CES é segmentar na maioria das espécies, isto é, apenas um estágio é observado em cada corte transversal de túbulo seminífero (Leblond e Clermont, 1952; Russell et al., 1990). No entanto, em algumas espécies de primatas, como no homem, chimpanzé e sagüi, mais de um estágio pode ser observado por secção transversal tubular, sugerindo que os estádios estão distribuídos ao longo do comprimento do túbulo seminífero de forma não segmentar (Clermont, 1963; Sharpe, 1994; Millar et al., 2000; Leal e França, 2006).

Especificamente no homem, Clermont (1963) demonstrou que os VI estádios do CES, descritos pela evolução do sistema acrossômico, não são facilmente identificados e distinguíveis pela técnica de coloração com PAS, como o é para outras espécies, sendo tal particularidade atribuída a irregularidades na disposição das células germinativas. Como exemplo destas irregularidades: (1) associações celulares de diferentes estádios são encontradas em um mesmo corte transversal de túbulo seminífero, (2) em um conhecido estádio um determinado tipo de célula germinativa que deveria estar presente, não é observado ou é visto em pequeno número, (3) e alguns tipos celulares podem estar em fase mais adiantada ou atrasada em relação ao estádio dominante. A ação conjunta dos fatores citados dificulta a separação nítida dos VI estádios nos túbulos seminíferos do testículo humano.

### 3.2.1 Fase espermatogonial

É a fase inicial da espermatogênese, em que células-tronco denominadas espermatogônias, assim definidas a partir de um ponto funcional, atuam na manutenção da homeostase do epitélio seminífero devido à capacidade de se autorenovar e também se diferenciar em células progenitoras (Robey, 2000; Ehmcke et al., 2006). As espermatogônias perfazem cerca de 20% das células germinativas no túbulo seminífero e estão preferencialmente localizadas em um microambiente que desempenha papel importante para a sobrevivência e ativação destas células, denominado nicho espermatogonial, formado pelas células de Sertoli, células peritubulares, células germinativas adjacentes, e os componentes da membrana basal (Chiarini-Garcia et al., 2001, 2003). Estudos já demonstraram que o número de células de Sertoli determina a quantidade de nichos e também o tamanho da população de espermatogônias no túbulo seminífero (Ryu et al., 2003; Shinohara et al., 2003).

Em primatas, a fase espermatogonial apresenta-se diferenciada em relação aos demais mamíferos, dividindo-se apenas em espermatogônias A e B. Entre aquelas do tipo A foram identificadas  $A_{\text{escuras}}$ , consideradas espermatogônias-tronco; e  $A_{\text{claras}}$  que mantém o processo de auto-renovação (Clermont, 1969; revisões em de Rooij e Russell, 2000; Ehmcke e Schlatt,

2006; Dym, M. et al. 2009). Desta forma, as espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$  se dividem pouco durante os ciclos do epitélio seminíferos de um indivíduo normal (menos de 1%) e se mantêm como células quiescentes. Já as espermatogônias  $A_{\text{claras}}$  atuam como células progenitoras, mantendo o processo de autorenovação, produzindo novas  $A_{\text{claras}}$ . Estas se dividem uma ou duas vezes em cada ciclo do epitélio seminífero e dão origem diretamente às espermatogônias do tipo B (Heller e Clermont, 1963; Clermont, 1966a). Entre as do tipo B, em primatas não humanos, foram identificadas B1-B4 (Ehmcke et al., 2006; Hermann, B.P., et al., 2010). O número de gerações de espermatogônias do tipo B, por sua vez, é também variável entre diferentes espécies de primatas. São descritas 4 gerações de espermatogônias do tipo B ( $B_1$ - $B_4$ ) no macaco rhesus (Clermont e Antar, 1973) e apenas uma geração nos sagüis (Millar et al., 2000) e no homem (Clermont, 1963; Clermont, 1966).

### 3.2.2 A espermatogênese no homem idoso

O envelhecimento do organismo é geralmente caracterizado pela diminuição da capacidade de resposta a desafios à função orgânica. Esta diminuição de manter a homeostase do organismo é refletida de várias formas no tecido testicular, o qual se apresenta funcional desde a vida uterina e permanece na senescência. No entanto, devido ao gradual declínio de andrógenos e outros fatores, observa-se redução na produção espermática diária, no peso do parênquima testicular e na porcentagem de epitélio seminífero no homem idoso (Johnson, 1986).

O declínio androgênico no envelhecimento é caracterizado por progressiva desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-testículo, alterando os níveis de LH, FSH e testosterona no organismo (Morley e Perry, 1999; Hermann e Berger, 1999). Com a diminuição do número de células de Leydig, devido a idade, observa-se queda da testosterona total sérica e aumento de LH e FSH no sangue, o que afeta diretamente o processo espermatogênico conduzindo a quadros de hipoespermatogênese, parada de maturação ou mesmo túbulos seminíferos esclerosados.

Além disso, observa-se um espessamento da túnica própria e degeneração vascular com o avançar da idade e isso pode levar à atrofia



tubular (Soderstrom, 1986; Sasano e Ichijo, 1969; Suoranta, 1971) devido à dificuldade do fluxo de metabólitos para o epitélio seminífero e assim redução do potencial de produção espermática.

Alterações provocadas pela idade também podem ter início no próprio epitélio seminífero com a redução das funções e do número das células de Sertoli que pode causar redução no número de células germinativas e espessamento da túnica própria causando outros danos (Johnson et al., 1986).

Dessa forma, é difícil identificar causa e efeito no processo de envelhecimento. No entanto, pode-se identificar características morfológicas típicas de tal processo: (1) acúmulo excessivo de gotículas lipídicas e vacúolos citoplasmáticos em células de Sertoli devido à fagocitoses de restos de células germinativas (Schulze, 1984), (2) diminuição no número de células de Sertoli que pode enfraquecer a barreira hematotesticular e levar a formação de divertículos nos túbulos seminíferos (Harbitz, 1973; Nistal et al., 1988), (3) ocorrência de células germinativas multinucleadas (Holstein e Eckermann, 1986) e (4) ocorrência de megaloespermatócitos (Holstein e Eckmann, 1986).

### 3.3 O estudo de testículo sob microscopia de luz

A histologia é fundamental para as ciências biológicas e médicas, uma vez que se situa na intersecção entre a bioquímica, a biologia molecular e a fisiologia, de um lado, e os processos patológicos e seus efeitos, de outro (Stevens e Lowe, 2001). Dessa forma, destacamos aqui estudos histológicos em testículos, utilizando vários métodos de fixação e inclusão para o entendimento de sua biologia, seja dos elementos somáticos ou germinativos. Os trabalhos de Mori e Christensen (1980), em ratos, avaliaram as células de Leydig utilizando fixação em glutaraldeído e inclusão em glicol metacrilato, os de Hikim e col. (1989) estudaram as células de Sertoli de hamsters utilizando fixação em glutaraldeído e inclusão em resina araldite, além de estudos clássicos em células germinativas humanas, desenvolvidos por Clermont (1963, 1966), há 50 anos, utilizando fixação em Bouin/Zenker-formol e inclusão em parafina.

Estes estudos desenvolvidos por Clermont (1963, 1966), processados com Bouin/Zenker-formol e inclusão em parafina, foram bastante conclusivos e

até hoje seus achados quanto aos estádios do ciclo do epitélio seminífero, tipos morfológicos, cinética espermatogonial e modelos de auto-renovação são considerados nos estudos atuais sobre a fisiologia testicular. No entanto, dependendo das técnicas de preparação, os resultados histológicos podem não fornecer detalhes suficientes para se estudar com profundidade e segurança os vários parâmetros do parênquima testicular. De fato, Ehmcke e Schlatt (2006) afirmam que é difícil identificar morfológicamente os diferentes tipos espermatogoniais em primatas não-humanos, pois a distinção entre espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$  e  $A_{\text{claras}}$  depende de fixação, inclusão e coloração adequadas, além de reconhecimento morfológico de delicados detalhes, introduzindo grandes variações (de 25% a 50%) nos resultados quantitativos encontrados, quando analisadas por diferentes observadores. Tais fatores podem então impossibilitar estudos funcionais seguros e dificultar a proposição de um modelo revisado e confiável de autorenovação espermatogonial, por exemplo.

No entanto, a inclusão de materiais biológicos em parafina, por usar xilol, por submeter o tecido a altas temperaturas e pela dificuldade de obter cortes de pequena espessura, é um método muito grosseiro e demorado que prejudica a definição histológica do material em estudo (Howroyd et al., 2005). A inclusão em resinas plásticas, por outro lado, tem sido usada por apresentar uma série de vantagens sobre os métodos usuais, que são: (1) processamento mais rápido, (2) são hidrossolúveis, (3) fácil de manejar, (4) obtém-se cortes semi-finos (0,5 a 12 $\mu\text{m}$ ), (5) melhor resolução ao microscópio de luz, (6) infiltração e polimerização à temperatura ambiente, (7) menor distorção e menos artefatos (Chapin et al., 1984, Chiarini-Garcia et al., 2011). Deve-se destacar também, o estudo feito por Ferreira e Chiarini-Garcia (1992) ao descreverem os efeitos de vários tipos de fixadores (paraformaldeído, karnovsky modificado, Helly, Bouin, Carnoy e Mota) e de meios de inclusão (parafina e GMA) sobre a preservação histológica do intestino de peixe.

Atualmente, outra técnica de microscopia de luz considerada de alta resolução, tem sido utilizada com sucesso. Utiliza-se fixação em glutaraldeído, inclusão em resina plástica araldite e cortes semifinos de 1 $\mu\text{m}$  de espessura (Chiarini-Garcia e Russell, 2001; Chiarini-Garcia et al., 2001, 2003; Bolden-Tiller et al., 2007; Nascimento et al., 2008; Chiarini-Garcia e Meistrich, 2008 e

Chiarini-Garcia et al., 2009, Drumond et al., 2011), possibilitando a identificação morfológica, com bastante precisão, dos diferentes tipos espermatogoniais, o que permite estudos mais seguros de vários parâmetros do tecido testicular, mesmo quando feito por diferentes observadores.

Portanto, para que possamos melhor analisar o testículo humano, com uma visão histológica mais moderna e com menor custo, precisamos, não só de novas metodologias, mas reavaliar a importância e melhor aplicação das principais técnicas em microscopia de luz utilizadas na atualidade para o entendimento do testículo: tanto interstício, quanto parâmetros do túbulo seminífero relacionados à morfologia e cinética.

### 3.3.1 Etapas no processamento histológico

O que se deseja avaliar ao microscópio é um preparado no qual os tecidos estejam perfeitamente preservados, apresentando a mesma estrutura e composição química que possuíam quando vivos (Junqueira & Carneiro, 2013). Os principais fatores relacionados com a preservação morfológica seriam o tipo de fixação e inclusão utilizado, por exemplo. Para isso, faz-se necessário seguir corretamente as etapas no processamento histológico para então obter-se um bom preparado permanente:

(1) *Coleta*: Dependendo do tipo de tecido e fixador deverá ser previamente reduzida em espessura para uma melhor penetração do fixador no tecido, além de ter um prévio conhecimento da anatomia do tecido em estudo para que o mesmo seja seccionado corretamente e analisado da melhor forma;

(2) *Fixação*: Imediatamente após a coleta do tecido, a fim de interromper o metabolismo celular e evitar a destruição das células por suas próprias enzimas ou por bactérias (Ross e Pawlina, 2011), deve-se fixá-lo por substâncias químicas, ou menos frequentemente por métodos físicos (utilizando o calor ou o frio), e assim tornar insolúveis as proteínas desse tecido. Na fixação química os tecidos podem ser imersos ou perfundidos por soluções de agentes desnaturantes ou de agentes que estabilizam as moléculas formando pontes com moléculas vizinhas. Nesta fase de processamento histológico deve-se levar em consideração a ação do fixador, se penetra no tecido de forma lenta ou rápida, deve-se considerar o tempo de

exposição a esse fixador, bem como a temperatura e o pH em que ele se encontra, pois tecidos mais delicados necessitam de uma penetração lenta e o mais indicado é o resfriamento do fixador entre 0°C e 6°C e pH entre 6 e 7 para que não ocorra maior retração do tecido e perda de características originais. De modo geral, tais soluções são constituídas de um agente fixador principal associado a outros, sendo que boas soluções fixadoras são constituídas por duas ou mais substâncias fixadoras, corrigindo uma as limitações da outra.

(3) *Desidratação*: Consiste na substituição da água presente nos tecidos vivos por um agente desidratante para que haja conservação do material. O agente desidratante mais utilizado é o etanol, mas há outros que podem ser empregados como: alcoóis butílico, metílico e isopropílico, a acetona, o éter, o clorofórmio e o óxido propileno (Michalant, 1988; Geneser, 2003). Este procedimento consiste na imersão do fragmento em solução desidratante de concentrações crescentes (70%, 80%, 95%, 100%) até a total remoção da água do tecido. Deve-se considerar o tamanho e a delicadeza da amostra na determinação do tempo de exposição às soluções.

(4) *Diafanização*: diafanizar é retirar as impurezas da amostra tecidual, deixando-a transparente, translúcida com a utilização de solventes. Esta etapa é definida de acordo com a próxima, a inclusão. Pois, caso o tecido seja incluído em parafina, deverá ser imerso em um produto químico em que o álcool e a parafina sejam solúveis (Geneser, 2003), pois essas substâncias não se misturam. Estes solventes, xilol, toluol, benzeno, óleo de cedro e solventes universais (acetato butílico, dióxido dietileno e benzoato metílico), tem ação clarificante sendo chamados diafanizadores. Caso seja adotado algum tipo de resina para inclusão, esta etapa faz-se desnecessária, pois resinas como glicol metacrilato e araldite são miscíveis em álcool.

(5) *Infiltração e inclusão*: Consiste em substituir o xilol por parafina, se for o caso, e emblocar o tecido em substância que confira rigidez e possibilite cortá-lo em espessuras bem finas, poucos micrômetros. Quando o meio de inclusão é a parafina, durante a infiltração (também chamada de impregnação), o xilol contido no material é completamente eliminado quando passado por banhos de parafina fundida em estufa a 60°C. Posteriormente, serão retirados da estufa e deixados à temperatura ambiente até que a parafina endureça e então conduzidos ao corte. Ao se utilizar resinas plásticas os fragmentos de

tecidos são desidratados em etanol e antes da inclusão, o material passa pelos processos de pré-infiltração e infiltração.

(6) *Microtomia*: Nesta etapa é usado um equipamento específico para obtenção de cortes de material incluído tanto em parafina quanto em resina, o micrótomo, que tem como unidade de medida o micrômetro ( $\mu\text{m}$ ) que corresponde à milésima parte do milímetro. Normalmente, um micrótomo faz cortes cuja espessura varia de 1 a 50  $\mu\text{m}$ , mas as espessuras mais utilizadas em microscopia óptica são de 3 a 6  $\mu\text{m}$  quando em parafina, mas podendo ser de 1 a 3  $\mu\text{m}$  quando em resina.

(7) *Coloração*: Para serem analisados ao microscópio, os cortes histológicos devem ser corados, pois, com raras exceções, a maioria dos tecidos é incolor. Dessa forma, foram desenvolvidos métodos de coloração que tornam evidentes os vários componentes dos tecidos e facilitam a distinção entre eles (Michalant, 1988; Bancroft e Stevens, 1996; Junqueira e Carneiro, 2013). As colorações de um modo geral se efetuam por processos físico-químicos ou puramente físicos. A maioria dos corantes se comporta como compostos ácidos ou básicos e tendem a formar ligações eletrostáticas (salinas) com radicais ionizados dos tecidos (Junqueira e Carneiro, 2013). De acordo com o número de cores conferidas às estruturas pelas colorações simples ou combinadas, estas tomam a denominação de colorações monocromáticas (uma cor), bicromáticas (duas cores), tricromáticas (três cores) e policromáticas (mais de três cores) (Burtiz e Ashwood, 1998; Silveira, 2006). A combinação mais comum de corantes usada em histologia e histopatologia é a Hematoxilina e Eosina (HE) que por associação de acidez e basicidade permite a diferenciação dos componentes celulares: a hematoxilina comporta-se como um corante básico e, portanto, cora o núcleo de modo basófilo e a eosina é um corante ácido e cora os elementos básicos da proteína do citoplasma de maneira acidófila. Outros corantes reagem com os componentes do tecido e os coram com uma cor diferente da cor da solução corante o que se chama metacromasia. O azul-de-metileno, o azul-de-toluidina e a tionina são exemplos de corantes simples que exibem metacromasia. O fenômeno da metacromasia não é totalmente compreendido, porém tem sido sugerido que é devido à polimerização das moléculas do corante. Julga-se que a presença de

macromoléculas com radicais eletronegativos no tecido facilita a polimerização e provoca a mudança de cor (Kiernan, 1989; Burtiz e Ashwood, 1998).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Considerações Éticas**

Este projeto de pesquisa foi um desmembramento do projeto “Avaliações morfofuncionais e moleculares da linhagem espermatozoidal humana antes e após tratamentos contra o câncer de próstata” que foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP) sob nº ETIC 117/07, no DEPE (Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital das Clínicas da UFMG), sob Processo nº 079/2007 e na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, sob Registro CONEP nº 14.250 (Anexo I). Como previsto pelo COEP e CONEP, os pacientes que doaram os testículos, recrutados no serviço de Urologia do Hospital das Clínicas da UFMG, foram informados sobre os objetivos do presente estudo e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II).

### **4.2 Coleta do material biológico**

Obteve-se fragmentos de testículos após orquiectomia subcapsular bilateral de cinco pacientes com câncer de próstata localmente avançado ou metastático, cujas idades variaram entre 65 e 90 anos e cujo tratamento indicado foi ablação hormonal cirúrgica, situação em que o material biológico retirado (parênquima testicular) seria totalmente descartado. Aqueles homens que não sofreram nenhum tipo de tratamento prévio para câncer de próstata antes da orquiectomia ou aqueles que foram tratados exclusivamente com prostatectomia radical foram considerados como portadores de testículos teoricamente normais e assim, utilizados neste estudo. No entanto, uma vez

que esse grupo de pacientes foi composto por homens idosos, alguns desses testículos (testículo esquerdo do paciente 3 e testículo direito do paciente 4) tiveram alterações degenerativas relacionadas com a idade, sendo estes não utilizados nesta pesquisa (Tabela 1).

**Tabela 1.** Grupo experimental de cinco homens sexualmente maduros e com paternidade comprovada.

<b>PACIENTES</b>	<b>IDADE (anos)</b>	<b>TESTÍCULOS UTILIZADOS NO ESTUDO</b>
1	71	Testículo direito/esquerdo
2	90	Testículo direito/esquerdo
3	77	Testículo direito
4	67	Testículo esquerdo
5	65	Testículo direito/esquerdo

A intervenção cirúrgica foi feita no Hospital das Clínicas da UFMG, sob coordenação de equipe médica do Serviço de Urologia do HC-UFMG. A indicação de orquiectomia subcapsular bilateral foi feita por médicos que trabalham na área de uro-oncologia, sem nenhuma influência do presente estudo na conduta médica para o tratamento do câncer de próstata.

Dessa forma, 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. Realizou-se bloqueio anestésico do funículo espermático por punção percutânea do escroto, utilizando-se seringa estéril de 20mL acoplada a uma agulha de 21-gauge, com infiltração de 7mL de solução 1:1 de lidocaína 1% e bupivacaína 0,5% em cada cordão espermático e 1mL dessa solução sob a pele e subcutâneo da região a ser incisada. Iniciou-se o procedimento cirúrgico com uma incisão da pele escrotal de aproximadamente 4cm, 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 teve toda sua túnica albugínea aberta da extremidade cranial a caudal, todo o parênquima testicular exposto, completamente liberado da albugínea com auxílio de uma gaze, este parênquima foi seccionado com um bisturi no nível da rede testicular. Nesse tempo cirúrgico novamente realizou-se hemostasia, com auxílio do eletrocautério e suturou-se a albugínea com catgut 2-0. O

mesmo fio foi usado na rafia dos outros planos separadamente até a pele. Realizou-se o mesmo procedimento no testículo contralateral.

#### 4.3 Processamento das amostras

Fragmentos testiculares foram colocados em soluções fixadoras para fins específicos. Os fragmentos fixados em solução de Bouin foram incluídos em parafina – BP (i) enquanto aqueles fixados em solução de glutaraldeído tiveram como objetivos as inclusões em resina plástica à base de glicol metacrilato – GGMA (ii) e araldite - GA (iii), esta última inclusão para estudos sob microscopia de luz de alta resolução. Os procedimentos técnicos específicos para cada um destes métodos estão brevemente descritos a seguir.

##### 4.3.1 Fixação em Bouin e inclusão em parafina (BP)

Após orquiectomia, fragmentos testiculares foram fixados durante 12 a 24 horas em solução de Bouin, sendo a seguir, armazenados em etanol a 70% à 4°C, até o momento da inclusão. Estes fragmentos foram então desidratados em série etanólica crescente até 100%, diafanizados em xilol e posteriormente incluídos em parafina. Destes blocos foram obtidos cortes histológicos de 4 e 7µm de espessura, corados pela técnica hematoxilina-eosina.

##### 4.3.2 Fixação em glutaraldeído e inclusão em glicol metacrilato (GGMA)

Outros fragmentos testiculares foram fixados por imersão em glutaraldeído a 5% em tampão fosfato 0,05M pH 7,3, por 24 horas. Estes fragmentos foram mantidos em tampão fosfato a 4°C até o momento da inclusão. No momento da inclusão, finos fragmentos de 1 a 2 mm de espessura foram recortados da superfície dos fragmentos testiculares. Estes fragmentos foram desidratados em série crescente de alcoóis e incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato (Historesina, Leica), conforme descrito por Chiarini-Garcia et al. (2011). Dos blocos foram obtidos cortes histológicos de 3 e 5µm de espessura que foram corados com azul de toluidina-borato de sódio.



#### 4.3.3 Fixação em glutaraldeído e inclusão em resina araldite (GA)

Outros fragmentos testiculares foram fixados por imersão em glutaraldeído a 5% em tampão fosfato 0,05M pH 7,3, por 10 a 15 minutos. Após ter adquirido certa consistência, estes fragmentos foram seccionados em pedaços menores e adicionalmente fixados por mais 12 a 24 horas a 4°C, com solução renovada de glutaraldeído. Após este período, da superfície destes fragmentos foram retiradas finas fatias, de aproximadamente 1mm de espessura, que foram armazenadas em tampão fosfato 0,05M pH 7,3 a 4°C até o momento da inclusão.

Após desidratação em série etanólica crescente e banhos de acetona, estes fragmentos foram incluídos em resina araldite (EMS), conforme protocolo já padronizado e em uso rotineiro no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (LABER) do ICB/UFMG. Dos blocos de araldite foram obtidos cortes semifinos de 1µm de espessura, que foram corados com azul de toluidina com borato de sódio e estudados sob microscopia de luz de alta resolução (Chiarini-Garcia e Meistrich, 2008).

#### 4.4 Análises morfológicas e morfométricas

Os estudos morfológicos e morfométricos foram analisados e comparados entre as técnicas de Bouin/parafina, glutaraldeído/glicol metacrilato e glutaraldeído/araldite e se constituem de: (1) avaliação dos aspectos morfológicos; (2) avaliação dos escores histopatológicos testiculares; (3) avaliação do diâmetro tubular e luminal e altura do epitélio seminífero e espessura da túnica própria; (4) diâmetro médio dos núcleos das células germinativas em estágio III bem como diâmetro médio nuclear de células de Sertoli e Leydig; (5) número e apoptose de células germinativas e de mitoses espermatogoniais; (6) de índices da espermatogênese.

Escolheu-se para várias das avaliações o estágio III do ciclo do epitélio seminífero, segundo Heller e Clermont (1964) (ver detalhe no anexo III), pelo fato de nele serem encontradas células germinativas das diferentes etapas do processo espermatogênico (à exceção das espermátides alongadas), que

assim permitiram determinar com segurança avaliações morfométricas nas condições de processamento escolhidas.

#### 4.4.1 Avaliação dos aspectos morfológicos

Quanto à morfologia foram considerados níveis de preservação tecidual e citológica, comparando a presença ou ausência de artefatos gerados pelas técnicas, tal como a retração. Tais características foram observadas e registradas em fotomicrografias digitais obtidas com o auxílio de uma câmera fotográfica Q-Color 3 acoplada a um microscópio BX-51, ambos da Olympus. As fotomicrografias foram obtidas através do programa Image-Pro Express (Media Cybernetics), tratadas com o Adobe Photoshop e montadas em pranchas utilizando o programa Adobe Illustrator.

#### 4.4.2 Avaliação dos escores histopatológicos testiculares

Foram utilizados três diferentes padrões de avaliação da espermatogênese. Um deles, classicamente, utilizado na anatomia patológica, é o (1) escore de cinco padrões de alterações da espermatogênese, baseado em Levin (1979) e revisto por McLachlan et al. (2007). Outro foi o (2) escore de Johnsen (1970), que divide as alterações da espermatogênese em 10 escores, que detalha com mais informação o padrão de cinco escores, citado anteriormente, separando os diferentes tipos de hipoespermatogênese e parada de maturação. O terceiro (3) escore foi o de Bergmann (Bergmann et al., 1994; revisão em Bergmann e Kliesch, 2010), que avalia as alterações da espermatogênese em relação à presença de espermátides alongadas no parênquima testicular, tal como aplicado por Reis (2012) e Martello (2013). Abaixo descrição detalhada dos escores.

##### 4.4.2.1 Escore de Cinco Padrões

A classificação dos cinco padrões, rotineiramente utilizada nos laboratórios de anatomia patológica e pelos andrologistas na avaliação das alterações testiculares, leva em consideração todos os cortes dos túbulos

seminíferos das biópsias para assim classificar o testículo baseando-se na descrição dos padrões, segundo a Tabela 2.

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

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

#### 4.4.2.2 Escore de Johnsen

Este padrão de avaliação da espermatogênese leva em consideração, com mais detalhes, as alterações do epitélio seminífero por determinar com exatidão principalmente onde ocorrem as aplasias ou paradas de maturação das células germinativas. Seções transversais tubulares (em médias 100 seções por indivíduo), em cada uma das três técnicas consideradas neste estudo, foram examinadas sistematicamente e cada uma delas recebe um escore de 1 a 10 de acordo com os critérios na Tabela 3.

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

Escores	Aspectos morfológicos da espermatogênese
Escore 10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Espermatogênese completa com muitas espermátides alongadas. Epitélio germinativo organizado com espessura preservada e a luz do túbulo livre.</li> </ul>
Escore 9	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muitas espermátides alongadas estão presentes, mas, o epitélio germinativo está desorganizado com evidente descamação ou obliteração da luz do túbulo.</li> </ul>
Escore 8	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apenas algumas espermátides alongadas (menos de cinco) presentes no corte transversal do túbulo seminífero.</li> </ul>
Escore 7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausência de espermátides alongadas e presença de muitas espermátides em alongamento e arredondadas.</li> </ul>
Escore 6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausência de espermátides alongadas e presença de poucas espermátides em alongamento e arredondadas (menos de cinco).</li> </ul>
Escore 5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausência de espermátides e presença de muitos espermatócitos.</li> </ul>
Escore 4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presença de poucos espermatócitos (menos de cinco) e ausência de espermátides.</li> </ul>
Escore 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Espermatogônias são as únicas células germinativas presentes.</li> </ul>
Escore 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausência de células germinativas e presença de apenas células de Sertoli.</li> </ul>
Escore 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausência de células no corte transversal do túbulo seminífero.</li> </ul>

Apenas os cortes transversais de túbulos seminíferos foram contados, em aumento final de 200x, seguindo as recomendações de Johnsen (1970). Os túbulos danificados pelo processamento não foram considerados na contagem enquanto aqueles túbulos completamente hialinizados isto é, sem qualquer tipo celular presente, foram sempre contados quando devidamente identificados. Quando foi necessário identificar o tipo celular mais detalhadamente, foram utilizados aumentos finais de 400x e 1000x. O cálculo do escore médio foi realizado pela multiplicação do número de túbulos contados pelo seu escore de um a dez. Todos estes valores foram somados e divididos pelo número total de túbulos contados (Reis, 2012; Martello, 2013).

#### 4.4.2.3 Escore de Bergmann

A avaliação do critério de Bergmann foi feita baseando-se na percentagem de túbulos seminíferos que continham espermátides alongadas. Todos os túbulos seminíferos presentes nos cortes histológicos foram analisados e no final, o número total de túbulos contendo espermátides alongadas (escores 8, 9 e 10 de Johnsen) foi dividido pelo número total de túbulos contados (Reis, 2012; Martello, 2013).

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

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

Obteve-se então, a percentagem de túbulos com espermátides alongadas, onde a nota 10 significa 100% de túbulos contendo espermátides alongadas e a nota 1 significa 10% de túbulos contendo espermátides alongadas. Quando menos de 10% (9% a 1%) dos túbulos seminíferos apresentaram espermátides alongadas utiliza-se subclassificação com escore de 0,9 a 0,1 (Tabela 4).

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

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

\* Percentagem de túbulos seminíferos com espermátides alongadas.

#### 4.4.3 Avaliação do diâmetro tubular, diâmetro luminal, altura do epitélio seminífero e espessura da túnica própria.

O diâmetro tubular e luminal médio foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 50 secções transversais de túbulos seminíferos com contorno o mais circular possível. Nas mesmas secções, foi mensurada a altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada da membrana basal até a borda luminal. Para isso, foram utilizadas imagens fotográficas digitais, obtidas com o auxílio de uma câmara fotográfica digital Q-Color 3 acoplada a um microscópio Olympus BX-51. Para mensuração das estruturas avaliadas foi utilizado o programa de análise de imagens Image-Pro Express (Media Cybernetics). Em túbulos ovais, foram medidos os menores diâmetros e altura do epitélio.

#### 4.4.4 Diâmetro médio dos núcleos das células germinativas, células de Sertoli e células de Leydig.

Os diâmetros médios nucleares (soma dos diâmetros maior e menor dividido por dois) foram obtidos dos tipos celulares presentes no estágio III do ciclo do epitélio seminífero do homem (espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$ , espermatogônias  $A_{\text{claras}}$ , espermatócitos primário em preleptóteno, espermatócitos primário em paquíteno e espermátides arredondadas Sb1), bem como dos núcleos das células de Sertoli e Leydig. Para isto, usou-se régua graduada acoplada à ocular de um microscópio Olympus BX-41 em aumento de 1000X. Esta régua foi aferida em micrômetros através de uma régua micrométrica da Leitz. Mediu-se pelo menos 10 núcleos por indivíduo.

#### 4.4.5 Número e apoptose de células germinativas e de mitoses espermatogoniais

Os números de células germinativas (espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$ , espermatogônias  $A_{\text{claras}}$ , espermatócitos primário em preleptóteno, espermatócitos primário em paquíteno e espermátides arredondadas Sb1) de apoptoses e de mitoses espermatogoniais foram determinados pela razão entre o número obtido para cada célula em relação à 100 nucléolos de células de

Sertoli. As contagens foram realizadas em pelo menos 10 túbulos seminíferos escolhidos aleatoriamente, para cada indivíduo. As células em divisão celular contadas foram apenas aquelas presentes em posição justaposta à membrana basal dos túbulos seminíferos, correspondente ao compartimento basal dos túbulos seminíferos, onde estão localizadas as espermatogônias.

#### 4.4.6 Índices da espermatogênese

Com o objetivo de comparar a eficiência do processo espermatogênico e da célula de Sertoli, em relação às três técnicas aplicadas, foram contados todos os núcleos das células germinativas e nucléolos das células de Sertoli presentes no estágio III do ciclo do epitélio seminífero, caracterizado por Clermont (1966), em secções transversais de túbulos seminíferos que apresentaram formato o mais arredondado possível.

Essas contagens foram corrigidas para a espessura do corte histológico e para o diâmetro nuclear das células germinativas e nucleolar das células de Sertoli, de acordo com Abercrombie (1946) modificado por Amann (1962), tal como aplicado previamente por estudos realizados pelo nosso grupo (Melo et al., 2013; Martello, 2013).

A seguinte fórmula foi utilizada para obtenção do número corrigido:

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

Onde: NC: número corrigido de um determinado tipo celular

NO: número obtido deste mesmo tipo celular

EC: espessura do corte histológico

DM: diâmetro médio do núcleo ou nucléolo

A partir da obtenção das contagens corrigidas das células presentes no epitélio seminífero no estágio III (espermatogônias  $A_{\text{escura}}$ , espermatócitos primários em preleptóteno, espermatócitos primários em paquíteno, espermátides arredondadas Sb1 e nucléolos de células de Sertoli), foram obtidas as seguintes razões:

1) Índice mitótico: número de espermatócitos primários em preleptóteno dividido pelo número de espermatogônias  $A_{\text{escura}}$ , para se determinar o coeficiente de eficiência das mitoses espermatogoniais;

2) Índice meiótico: número de espermátides arredondadas (Sb1) dividido pelo número de /espermatócitos primários em paquíteno, para se estimar o rendimento celular obtido durante a fase meiótica;

3) Eficiência das células de Sertoli: número de espermátides arredondadas (Sb1) dividido pelo número de nucléolos de célula de Sertoli, para se estimar o número de espermatozoides que poderiam ser suportados por cada célula de Sertoli e,

4) Eficiência da espermatogênese: número de espermátides arredondadas (Sb1) dividido pelo número de espermatogônias tipo A<sub>escura</sub>, para determinar o número de espermátides obtidas após os processos mitótico e meiótico, estimando-se assim o rendimento geral da espermatogênese.

#### 4.5 Análise estatística

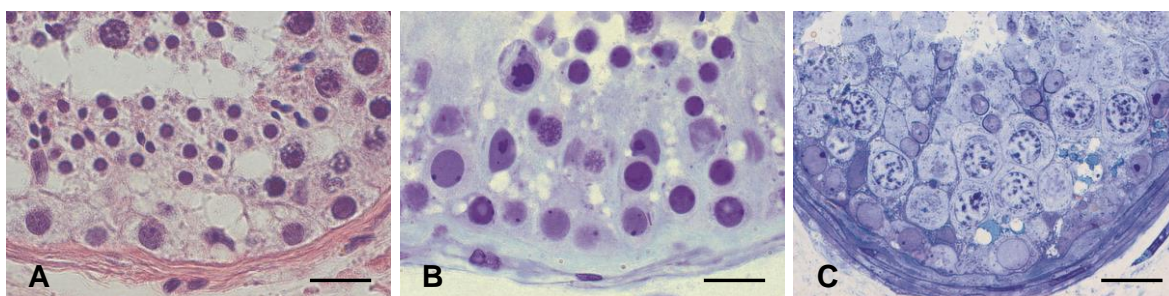
Todos os parâmetros medidos foram testados quanto à normalidade antes da análise, usando o procedimento univariado do programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute, Cary, NC, EUA). Os dados foram analisados como um delineamento inteiramente ao acaso e o modelo estatístico incluiu pacientes como fatores fixos e a morfologia das células como fator aleatório. Os efeitos dos tratamentos sobre a morfometria e a morfologia celulares e tubulares foram analisados utilizando o modelo linear geral (GLM) do SAS. Os eventos nos quais os tratamentos foram significativos, comparações múltiplas foram realizadas utilizando-se a probabilidade de diferenças (pdiff) entre médias de quadrados mínimos, ajustadas pelo teste Tukey-Kramer (SAS, 2001), com  $P < 0,05$  sendo considerado significativo. Nas tabelas e gráficos, os dados são apresentados como médias  $\pm$  erro padrão da média.



## 5 RESULTADOS

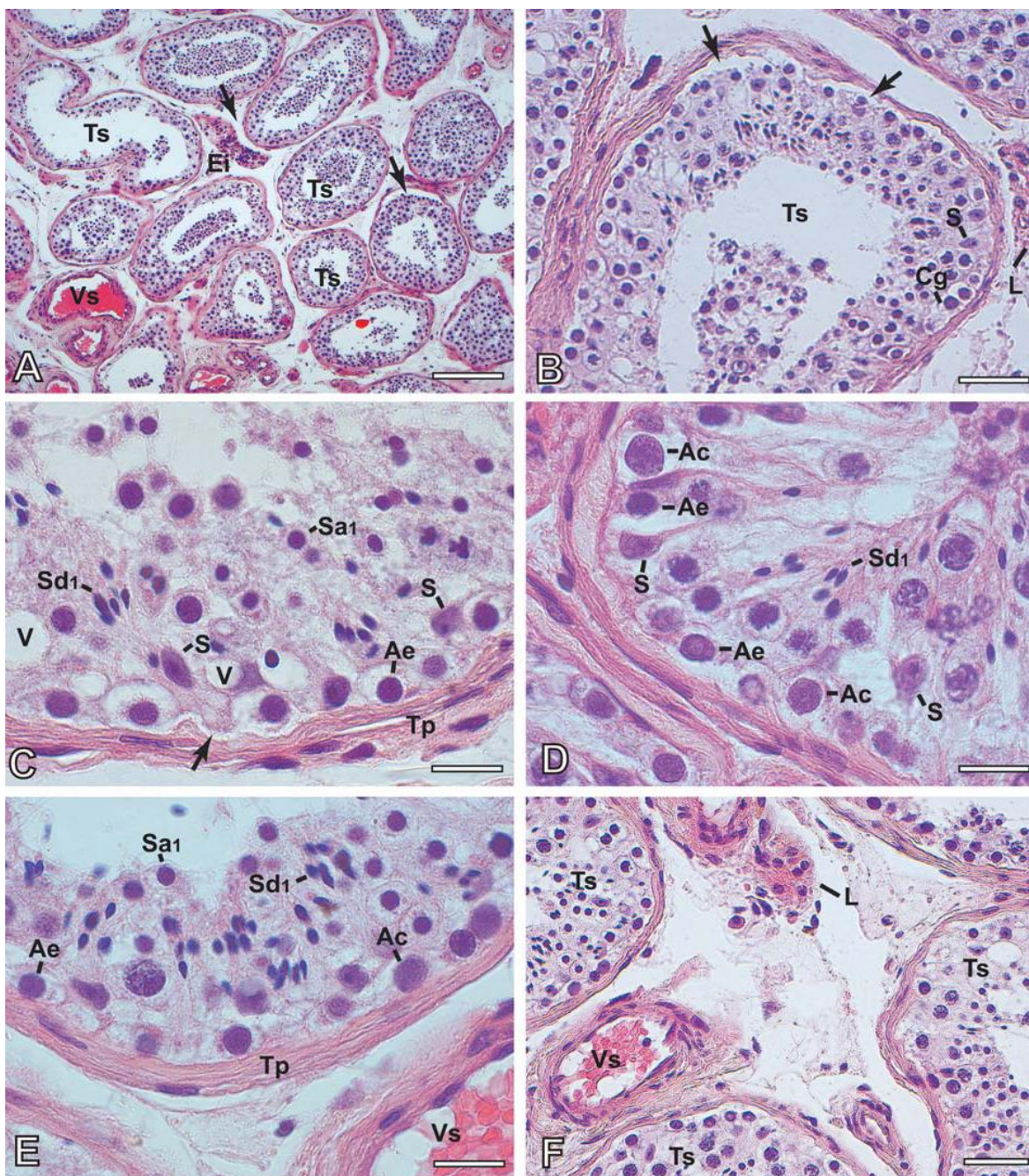
### 5.1 Morfologia

Ao avaliar as características morfológicas das células germinativas e somáticas do epitélio seminífero e do interstício testicular de homens, nos quais os fragmentos testiculares foram submetidos a diferentes processamentos histológicos, verificaram-se diferenças expressivas na preservação tecidual (Figura 1).



**Figura 1.** Fotomicrografia comparativa da preservação tecidual e citológica de fragmentos testiculares processados pelos três diferentes métodos: A. Bouin/pafarina, B. glutaraldeído/glicol metacrilato e C. glutaraldeído/araldite. Barras: 15 µm.

Quando os fragmentos foram fixados com solução de Bouin e incluídos em parafina, verificou-se nítida retração tecidual com aumento de espaços entre as células germinativas e aumento de espaço no interstício fazendo com que os túbulos seminíferos se apresentassem distantes uns dos outros (Figs. 2A e 2B). Quanto os túbulos, foram frequentes desprendimentos do epitélio seminífero em relação à túnica própria bem como para o lúmen tubular (Figs. 2A-2B). Em relação ao aspecto citológico, detectou-se nítida retração citoplasmática e nuclear tanto das células germinativas quanto somáticas (Figs. 2C-2E), que se apresentavam com aspecto bastante granuloso. As células de Sertoli não apresentaram nucléolo tão evidente e, apesar do formato irregular do núcleo, não puderam ser observadas as dobras da membrana nuclear características deste tipo celular. Houve dificuldade na identificação dos



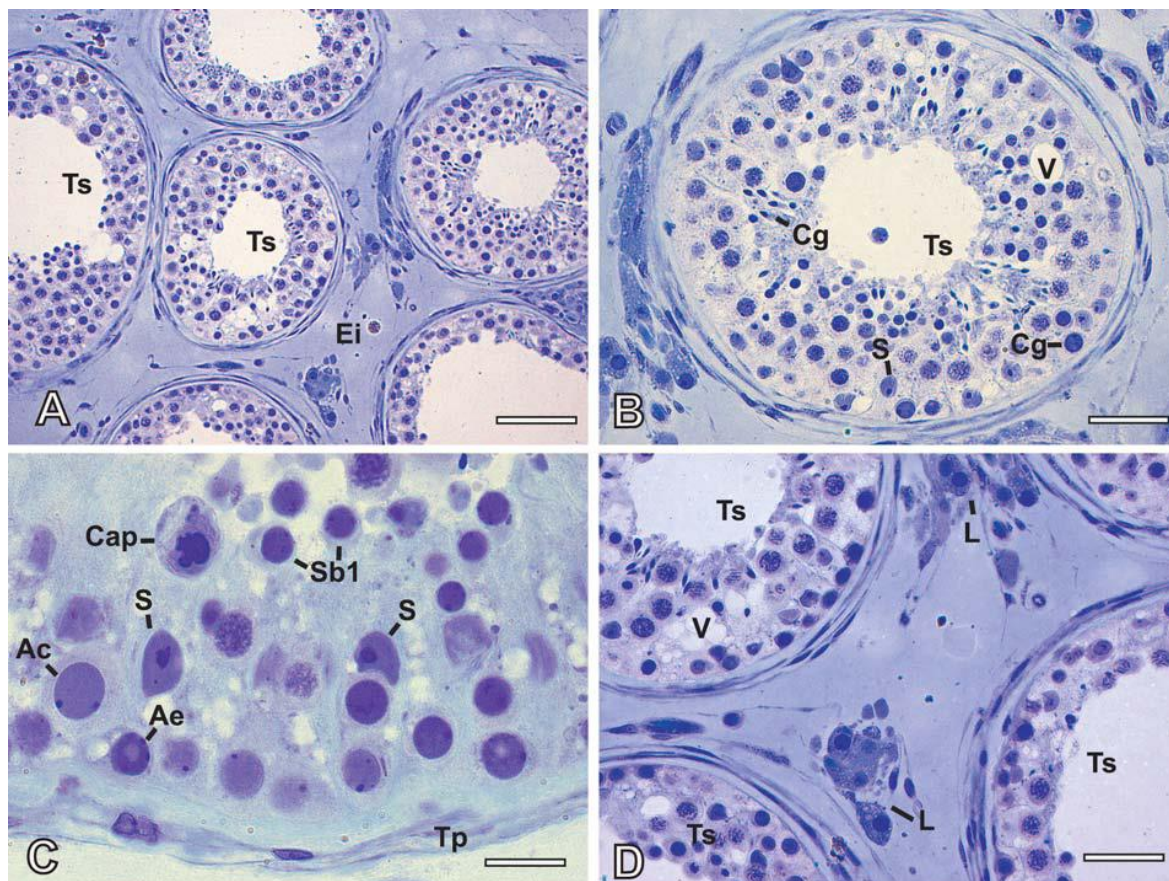
**Figura 2.** Fotomicrografias de túbulos seminíferos de testículos de homem submetidos à fixação em solução Bouin e incluídos em parafina. Em A, observa-se panorâmica de tecido testicular com presença de vaso sanguíneo (Vs) no espaço intersticial (Ei) e cortes de túbulos seminíferos (Ts), ambos retraídos (setas). Em B, tem-se retração do epitélio seminífero (setas) e retração citoplasmática de células de Sertoli (S) e célula germinativa (Cg). Observa-se em C: túbulo seminífero com espessa túnica própria (Tp), retração do epitélio (seta), presença de vacúolos (V), espermatogônia escura (Ae), espermatídes arredondadas do tipo Sa1 e em alongamento do tipo Sd1, além de células de Sertoli (S) com vários formatos. Em D e E evidencia-se espermatogônias escuras (Ae) com e sem vacúolo, espermatogônias claras (Ac), espermatídes arredondadas do tipo Sa1 e em alongamento do tipo Sd1, além de células de Sertoli (S). Em F, imagem da região intersticial evidenciando células de Leydig (L) e vaso sanguíneo (Vs). Barras: A, 150 $\mu$ m; B,F, 40 $\mu$ m; C-E, 15 $\mu$ m.



diferentes tipos de espermatogônias ( $A_{\text{escuras}}$ ,  $A_{\text{claras}}$  e B) devido à preservação morfológica das mesmas. Estas se apresentavam muito coradas, com pequena definição da cromatina nuclear e alteração da forma nuclear, sendo que muitas espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$  se apresentavam arredondadas e não ovais, como era esperado (Fig. 2D). Tal característica dificultou também a diferenciação destas

espermatogônias com espermatócitos em preleptóteno também localizados no compartimento basal do epitélio seminífero. Da mesma forma, a identificação das espermátides arredondadas (Sa1, Sa2, Sb1 e Sb2) ficou comprometida, pois a vesícula acrossômica que caracteriza tais células nos estádios do ciclo do epitélio seminífero não foi de fácil visualização (Fig. 2E) e, a classificação dessas células acabou sendo determinada pela posição no epitélio seminífero e pela associação com as outras células germinativas. No interstício, foram evidentes as retrações e as células de Leydig, encontradas em grupos, foram visualizadas sem boa definição morfológica (Fig. 2F).

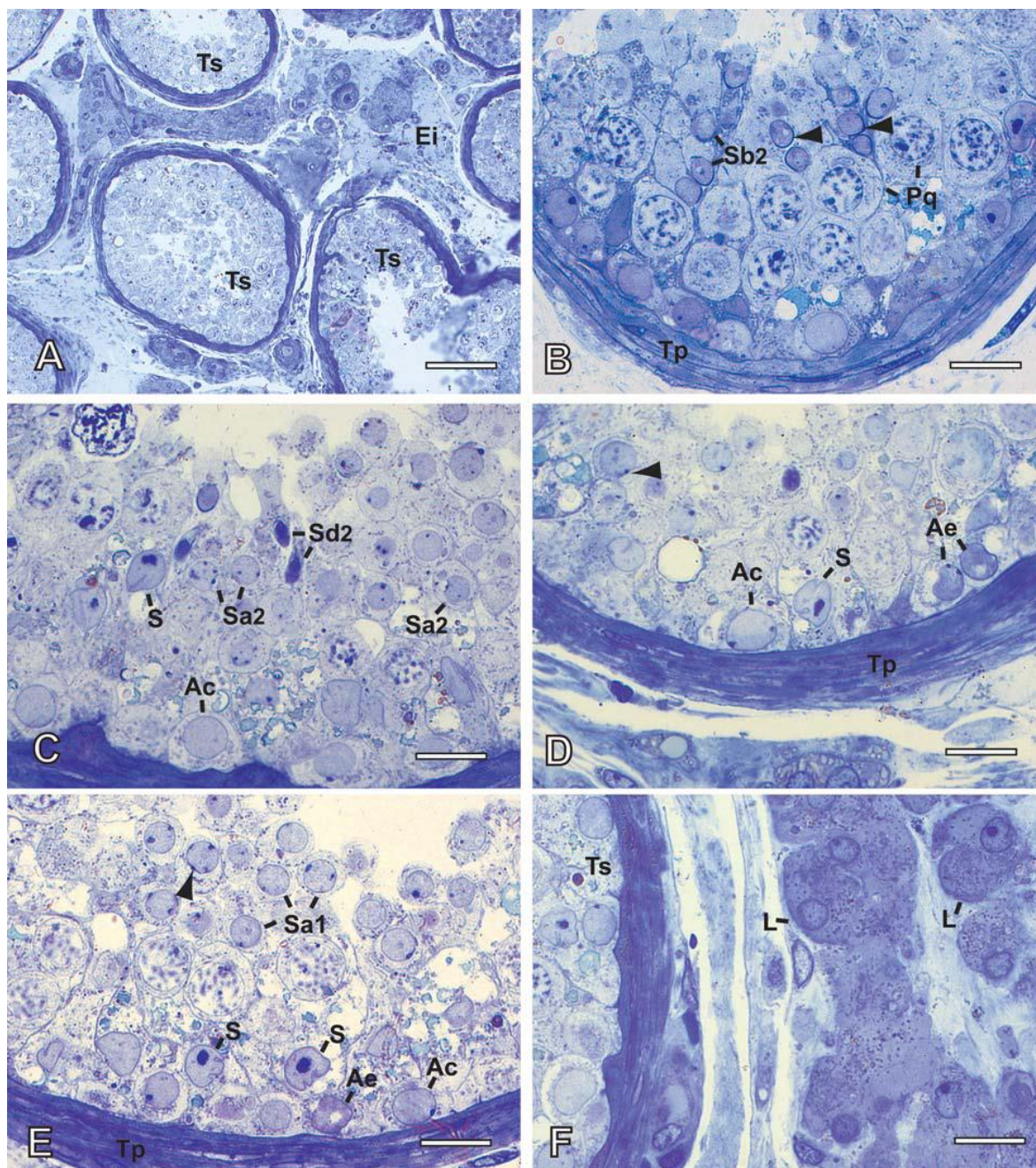
Já nos fragmentos fixados em glutaraldeído e incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato, foi evidente a melhora na preservação morfológica do tecido como um todo, evidenciando detalhes da morfologia das células germinativas e somáticas. Os túbulos seminíferos não se apresentavam retraídos em relação ao interstício e se encontravam mais agrupados (Fig. 3A). As células germinativas e somáticas se apresentavam aparentemente maiores que aquelas processadas com Bouin/parafina. Quanto à citologia, este método demonstrou melhor preservação sendo que as células se apresentavam com aspecto mais homogêneo e com pouca granulosidade citoplasmática e nuclear. No epitélio seminífero a retração tecidual foi pequena (Fig. 3B). As células de Sertoli apresentaram nucléolo bem evidente e menor retração citoplasmática e nuclear (Fig. 3C). Neste processamento histológico, as espermatogônias foram mais facilmente identificadas, visto que as características nucleares (heterocromatina) foram bem preservadas assim como o formato característico dessas células. (Fig. 3C). Foram raros os artefatos no interstício e os agrupamentos das células de Leydig foram mais evidentes.



**Figura 3.** Fotomicrografias de túbulos seminíferos de testículos de homens submetidos à fixação em solução glutaraldeído e incluídos em glicol metacrilato. Em A, observe panorâmica de tecido testicular com espaço intersticial (Ei) e cortes de túbulos seminíferos (Ts) bem preservados. Em B, tem-se corte transversal de túbulo seminífero (Ts) com diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero, evidenciando células de Sertoli (S), células germinativas (Cg) e vacúolo (V) compondo o epitélio. Em C, tem-se um maior aumento em epitélio seminífero, apoiado na túnica própria (Tp) e que evidencia espermatogônias escuras (Ae) e claras (Ac), espermátides arredondadas em Sb1, corpo apoptótico (Cap) e células de Sertoli (S). Observa-se em D túbulos seminíferos (Ts) e interstício com células de Leydig (L). Barras: A, 75 $\mu$ m; B,D, 40 $\mu$ m; C, 15 $\mu$ m.

O processamento empregando o glutaraldeído como fixador e a resina epóxi araldite como meio de inclusão, foi o que melhor preservou as características morfológicas do tecido testicular com pouca retração intersticial (Fig. 4A). Após este processamento histológico foi nítida e melhora na resolução citológica (Fig. 4B). Nas células de Sertoli foi possível visualizar as dobras nucleares (Figs. 4C-4E), nas células de Leydig foram evidentes as gotículas lipídicas (Fig. 4F) e nas células germinativas era possível ver detalhes nucleares que possibilitaram a diferenciação entre os tipos de espermatogônias  $A_{\text{escura}}$ ,  $A_{\text{clara}}$  e B, que confere segurança para estudos relacionados com a





**Figura 4.** Fotomicrografia de túbulos seminíferos de testículos de homens submetidos à fixação em solução glutaraldeído e incluídos em araldite. Em A, observa-se panorâmica de tecido testicular com espaço intersticial (Ei) e cortes de túbulos seminíferos (Ts) bem preservados. Em B, tem-se corte transversal de túbulo seminífero (Ts) evidenciando a túnica própria (Tp) e epitélio em estágio IV: espermatídes em alongamento do tipo Sb2 com formação de vesícula acrossômica característica (cabeça de seta) e espermatócito em paquíteno (Pq). Em C, tem-se imagem em maior aumento de epitélio seminífero em estágio II: espermatogônia clara (Ac), espermatídes arredondadas Sa2, espermatídes alongadas Sd2 e célula de Sertoli (S). Em D e em E tem-se evidência de túnica própria (Tp) e epitélio seminífero com espermatogônia clara (Ac), escura (Ae), célula de Sertoli (S) e espermatíde com formação da vesícula acrossômica (cabelça de seta), evidenciando espermatídes arredondadas Sa1 na imagem E. Em F, observa-se túbulos seminíferos (Ts) e interstício com células de Leydig (L). Barras: A, 75 $\mu$ m; B-F, 15 $\mu$ m.

biologia desse tipo celular (Figs. 4B-4E). Além de detalhes citoplasmáticos, tais como complexos de Golgi e mitocôndrias, este método possibilitou excelente visualização do processo de formação da vesícula acrossômica nas espermatídes, podendo acompanhar com bastante detalhe todo o processo espermiogênico (Figs. 4B-4E).

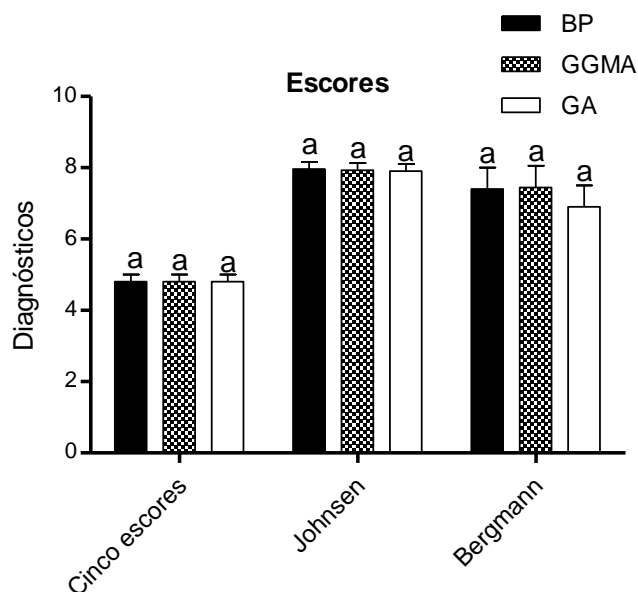
## 5.2 Escores histopatológicos

A Tabela 5 e a Figura 5 representam os resultados dos escores histopatológicos de Cinco Padrões, de Johnsen e de Bergmann. Após a aplicação dos três processamentos histológicos propostos, constatou-se que os valores dos escores não foram significativamente diferentes em relação aos pacientes utilizados neste trabalho, isto é, indivíduos idosos com câncer de próstata e que não sofreram qualquer tipo de tratamento até o momento da orquiectomia.

**Tabela 5.** Escores de Cinco Padrões, Johnsen e Bergmann após diferentes tratamentos histológicos.

Grupo	5 Escores	Johnsen	Bergmann
BP	4,8 ± 0,2 a	7,96 ± 0,2 a	7,40 ± 0,6 a
GGMA	4,8 ± 0,2 a	7,93 ± 0,2 a	7,45 ± 0,6 a
GA	4,8 ± 0,2 a	7,90 ± 0,2 a	6,90 ± 0,6 a

BP, Bouin/parafina; GGMA, glutaraldeído/glicol metacrilato; GA, glutaraldeído/araldite  
 Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.



**Figura 5.** Escores de Cinco Padrões, Johnsen e Bergmann nas técnicas histológicas de Bouin/parafina (BP), glutaraldeído/glicol metacrilato (GGMA) e glutaraldeído/araldite (GA). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

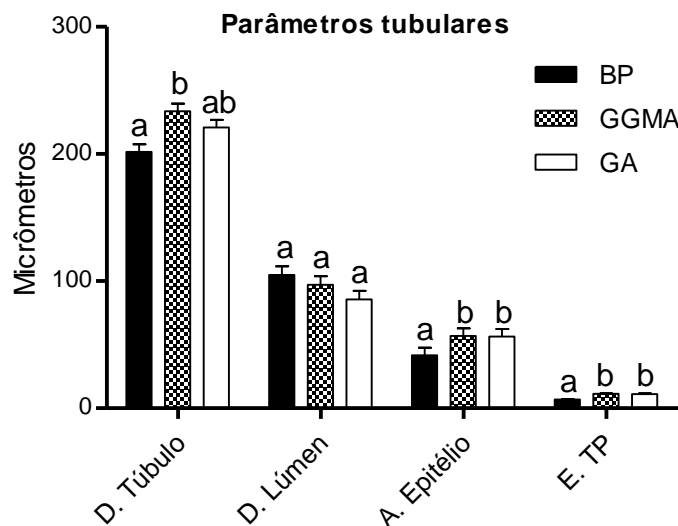
### 5.3 Parâmetros tubulares

Após os diferentes processamentos histológicos, constatou-se que houve retração nos diâmetros tubulares (cerca de 8%), na altura do epitélio (cerca de 26%) e na espessura da túnica própria (cerca de 39%) nos fragmentos tratados com BP em relação aos tratados com GGMA e GA. Quanto ao diâmetro do lúmen, os grupos não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Por outro lado, os grupos GGMA e GA apresentaram características semelhantes, com melhor preservação do parênquima testicular (Tab. 6 e Fig. 6).

**Tabela 6.** Parâmetros dos túbulos seminíferos de homens após diferentes tratamentos histológicos.

Grupo	Diâmetro do Túbulo	Diâmetro do Lúmen	Altura do Epitélio	Espessura da Túnica Própria
BP	201,6 ± 6,0 a	104,8 ± 6,7 a	41,6 ± 6,0 a	6,8 ± 0,3 a
GGMA	233,6 ± 6,0 b	97,2 ± 6,7 a	56,8 ± 6,0 b	11,4 ± 0,3 b
GA	220,8 ± 6,0 ab	85,6 ± 6,7 a	56,4 ± 6,0 b	11,2 ± 0,3 b

BP, Bouin/parafina; GGMA, glutaraldeído/glicol metacrilato; GA, glutaraldeído/araldite  
Diferentes letras na mesma coluna P < 0,05



**Figura 6.** Parâmetros dos túbulos seminíferos de homens após diferentes tratamentos. Diâmetro tubular (D. Tubular), diâmetro do lúmen (D. Lúmen), altura do epitélio (A. Epitélio) e espessura da túnica própria (E. TP). BP, Bouin/parafina; GGMA, glutaraldeído/glicol metacrilato; GA, glutaraldeído/araldite. Diferentes letras para o mesmo parâmetro significa diferença estatística de  $P < 0,05$ .

#### 5.4 Diâmetros nucleares

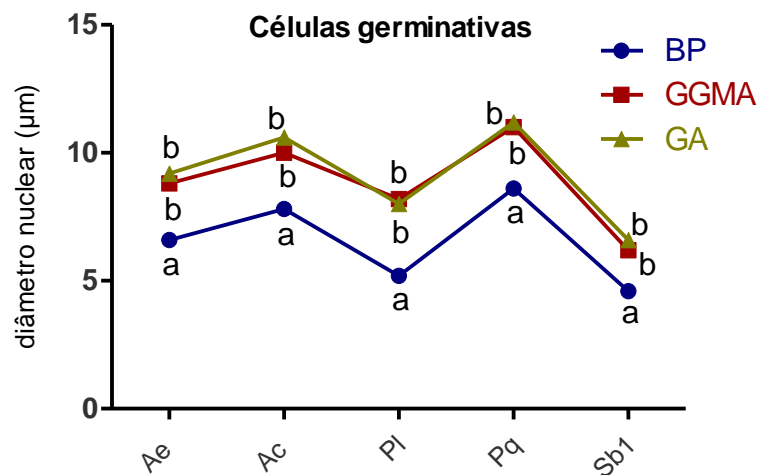
Nas análises de diâmetro nuclear, tanto de células germinativas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides) quanto de células somáticas (Sertoli e Leydig), não foram encontradas diferenças significativas após processamento em GGMA e GA, diferente do que ocorreu após processamento em BP. As células germinativas quando em BP apresentaram maior retração (30% em média) em comparação às células somáticas (cerca de 15%) quando comparadas a GGMA e GA. (Tabs. 7-8; Figs. 7-8).

**Tabela 7.** Diâmetros nucleares de células germinativas após diferentes tratamentos histológicos.

Grupo	Aescura	Aclara	Preleptóteno	Paquíteno	Espermátide Sb1	Mitose	Apoptose
BP	21 ± 2,7 a	20,1 ± 3,8 a	48,3 ± 5,2 a	30,0 ± 5,5 a	174,0 ± 13,4 a	1,2 ± 1,2 a	4,4 ± 1,0 a
GGMA	25 ± 2,7 b	22,8 ± 3,8 b	42,0 ± 5,2 b	40,5 ± 5,5 b	159,4 ± 13,4 b	3,5 ± 1,2 b	7,1 ± 1,0 b
GA	18 ± 2,7 b	16,6 ± 3,8 b	31,7 ± 5,2 b	31,0 ± 5,5 b	101,7 ± 13,4 b	1,7 ± 1,2 b	5,8 ± 1,0 b

BP, Bouin/parafina; GGMA, glutaraldeído/glicol metacrilato; GA, glutaraldeído/araldite  
Diferentes letras na mesma coluna  $P < 0,05$



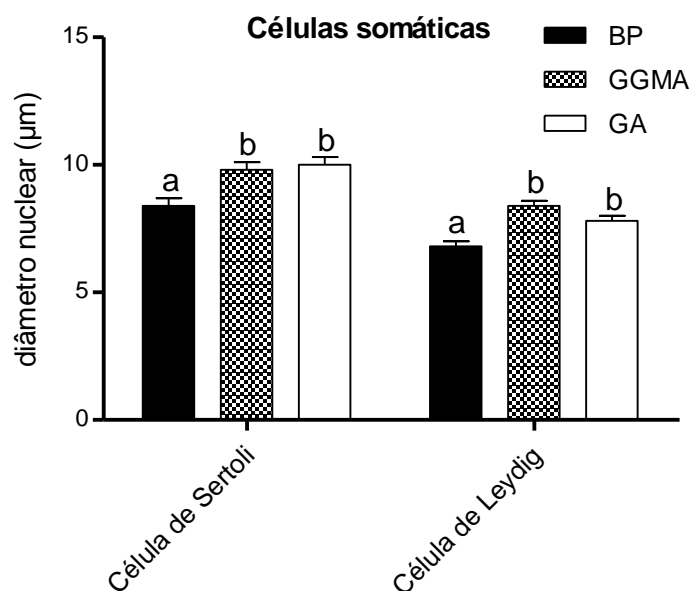


**Figura 7.** Diâmetros nucleares de células germinativas de homens após diferentes tratamentos histológicos. Ae, espermatogônia A<sub>escura</sub>; Ac, espermatogônia A<sub>clara</sub>; P1, preleptóteno; Pa, paquíteno; Sb1, espermátide Sb1. BP, Bouin/parafina; GGMA, glutaraldeído/glicol metacrilato; GA, glutaraldeído/araldite. Diferentes letras para o mesmo tipo celular significa diferença estatística de  $P < 0,05$ .

**Tabela 8.** Diâmetros nucleares de células somáticas de homens após diferentes tratamentos histológicos.

Grupo	Núcleo de Cel. Sertoli	Núcleo de Cel. Leydig
BP	8,4 ± 0,3 a	6,8 ± 0,2 a
GGMA	9,8 ± 0,3 b	8,4 ± 0,2 b
GA	10,0 ± 0,3 b	7,8 ± 0,2 b

BP, Bouin/parafina; GGMA, glutaraldeído/glicol metacrilato; GA, glutaraldeído/araldite  
Diferentes letras na mesma coluna  $P < 0,05$



**Figura 8.** Diâmetros nucleares de células somáticas de homens após diferentes tratamentos histológicos. BP, Bouin/parafina; GGMA, glutaraldeído/glicol metacrilato; GA, glutaraldeído/araldite. Diferentes letras para o mesmo tipo celular significa diferença estatística de  $P < 0,05$ .

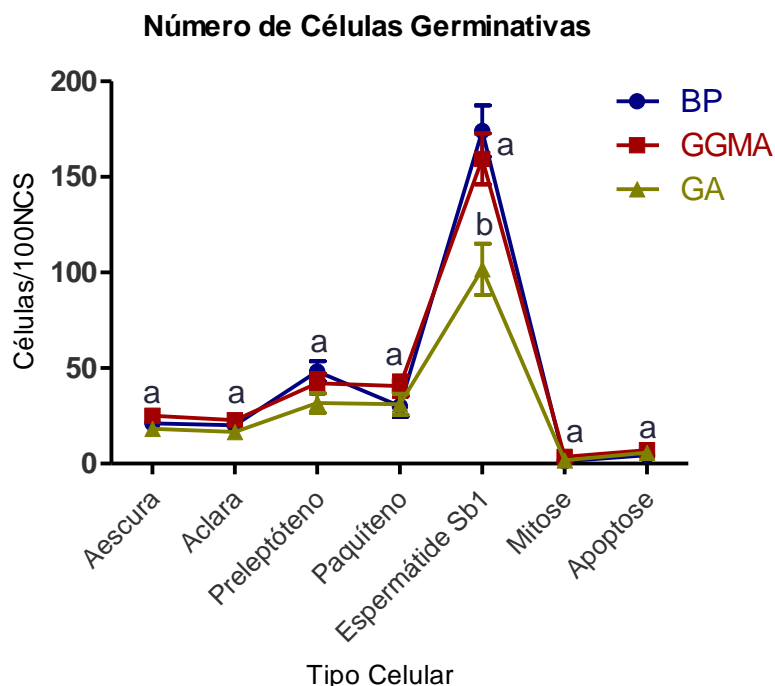
## 5.5 Número e apoptose de células germinativas e de mitoses espermatogoniais.

A contagem do número de células presentes no estágio III do ciclo do epitélio seminífero do testículo de homens após os três processamentos histológicos mostrou um mesmo padrão para a maioria das células diferindo apenas na contagem de espermátides arredondadas Sb1, onde os tratamentos em BP e GGMA apresentaram-se semelhantes e diferentemente de GA. Além disso, não houve diferença significativa na contagem de mitoses e apoptoses após os três processamentos (Tab. 9 e Fig. 9).

**Tabela 9.** Contagem das células germinativas, mitoses e apoptoses em estágio III de fragmentos testiculares submetidos a três diferentes tratamentos histológicos.

Grupo	Aescura	Aclara	Preleptóteno	Paquíteno	Espermátide Sb1	Mitose	Apoptose
BP	21 ± 2,7 a	20,1 ± 3,8 a	48,3 ± 5,2 a	30,0 ± 5,5 a	174,0 ± 13,4 a	1,2 ± 1,2 a	4,4 ± 1,0 a
GGMA	25 ± 2,7 a	22,8 ± 3,8 a	42,0 ± 5,2 a	40,5 ± 5,5 a	159,4 ± 13,4 a	3,5 ± 1,2 a	7,1 ± 1,0 a
GA	18 ± 2,7 a	16,6 ± 3,8 a	31,7 ± 5,2 a	31,0 ± 5,5 a	101,7 ± 13,4 b	1,7 ± 1,2 a	5,8 ± 1,0 a

BP, Bouin/parafina; GGMA, glutaraldeído/glicol metacrilato; GA, glutaraldeído/araldite  
Diferentes letras na mesma coluna P < 0,05



**Figura 9.** Número de células germinativas, mitoses e apoptoses presentes no estágio III do ciclo do epitélio seminífero de homens após diferentes tratamentos histológicos. BP, Bouin/parafina; GGMA, glutaraldeído/glicol metacrilato; GA, glutaraldeído/araldite. Diferentes letras para o mesmo tipo celular significam diferença estatística de P<0,05.

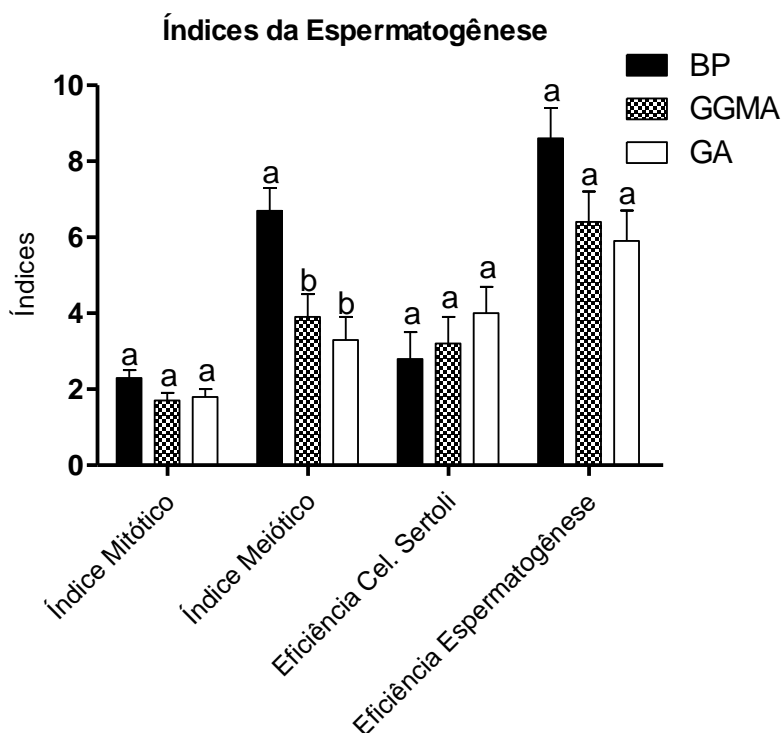
## 5.6 Índices da espermatogênese

Os diferentes tratamentos histológicos não afetaram a maioria dos índices da espermatogênese de forma significativa. Observou-se apenas um maior índice meiótico, com uma diferença de ~50% no tratamento com BP em comparação aos demais tratamentos (Tab. 10 e Fig. 10). Este índice corresponde à razão entre o número de espermátides (Sb1) em relação ao número de espermatócitos (paquíteno), presentes no estágio III do ciclo do epitélio seminífero.

**Tabela 10.** Índices de etapas do processo espermatogênico do homem, após diferentes processamentos histológicos.

Grupo	Índice Mitótico	Índice Meiótico	Eficiência da Célula de Sertoli	Eficiência da Espermatogênese
BP	2,3 ± 0,2 a	6,7 ± 0,6 a	2,8 ± 0,7 a	8,6 ± 0,8 a
GGMA	1,7 ± 0,2 a	3,9 ± 0,6 b	3,2 ± 0,7 a	6,4 ± 0,8 a
GA	1,8 ± 0,2 a	3,3 ± 0,6 b	4,0 ± 0,7 a	5,9 ± 0,8 a

BP, Bouin/parafina; GGMA, glutaraldeído/glicol metacrilato; GA, glutaraldeído/araldite  
Diferentes letras na mesma coluna P < 0,05



**Figura 10.** Índices de etapas do processo espermatogênico do homem, após diferentes processamentos histológicos. BP, Bouin/parafina; GGMA, glutaraldeído/glicol metacrilato; GA, glutaraldeído/araldite. Diferentes letras para o mesmo índice significa diferença estatística de P<0,05.

## 6 DISCUSSÃO

O testículo humano é um órgão que desempenha tanto função hormonal, na produção de andrógenos, quanto na produção de espermatozoides, através de um complexo processo de divisões mitóticas e meiótica. Diferente da gônada feminina, os testículos são mais suscetíveis a impactos, lesões, agentes tóxicos ambientais ou terapêuticos que podem até comprometer a espermatogênese do indivíduo (Lellei et al., 2001; Boekelheide, 2005). Nos trabalhos desenvolvidos até o momento que abordam os efeitos experimentais e patológicos sobre o testículo, alguns dos pontos principais de avaliação testicular estão vinculados aos parâmetros morfológicos e morfométricos dos túbulos seminíferos (Pannocchia et al., 2008). Estas alterações qualitativas e quantitativas dos componentes testiculares demonstram que alterações detectadas nos parâmetros tubulares, bem como no número e distribuição das células germinativas e de Sertoli ao longo do ciclo do epitélio seminífero estão relacionadas a impactos negativos que podem provocar alterações na função testicular e ainda demonstrar como podemos interferir no processo espermatogênico na tentativa de amenizar estes diversos efeitos deletérios.

Os resultados destes estudos, desde aproximadamente 1950, tem sido obtidos de testículos submetidos aos mais diferentes métodos de processamento histológicos. A fixação do material biológico é uma das etapas mais críticas na preparação histológica, principalmente em testículo (Pannocchia et al., 2008). Inicialmente foram utilizados o Zenker-formol (Clermont e Leblond, 1955; Clermont, 1963; Heller e Clermont, 1964; Heller et al., 1969; ) e o Bouin (Roosen-Runge, 1956; Clermont, 1966a,b), com inclusão em parafina. Nestes estudos foram feitas as primeiras e bem primorosas descrições morfológicas e morfométricas do testículo humano, demonstrando o ciclo do epitélio seminífero, a duração do processo espermatogênico bem como a biologia espermatogonial.

Posteriormente, na década de 1960, foi introduzido o glutaraldeído como fixador primário para microscopia eletrônica (revisão em Bozzola e Russell, 1999). Por sua propriedade não coagulante e de preservar as proteínas

celulares, este fixador, que é um aldeído glutárico de alta pureza, melhorou significativamente a preservação citológica tanto no nível da microscopia de luz quanto eletrônica. Nesta época também foram introduzidas as resinas plásticas, tanto as epóxi (araldite) quanto o glicol metacrilato. Desta forma, a associação entre melhores métodos de fixação e inclusão (Chiarini-Garcia e Meistrich, 2008; Chiarini-Garcia et al., 2011) melhoraram significativamente a preservação morfológica sob qualquer tipo de microscopia, inclusive ao nível da microscopia de luz. A associação entre fixação com glutaraldeído e inclusão em resina araldite e avaliação em cortes semifinos de 1 $\mu$ m de espessura produziram tanta resolução no nível da microscopia de luz que o método tem sido chamado de microscopia de luz de alta resolução (Chiarini-Garcia e Meistrich, 2008). Inúmeros estudos foram desenvolvidos por Chiarini-Garcia e colaboradores em indivíduos normais (Chiarini-Garcia e Russell, 2001; Chiarini-Garcia et al., 2001, 2003, 2009; Drumond et al., 2011), submetidos a tratamentos experimentais (Nascimento et al., 2008) e sob condições patológicas (Russell et al., 2002; Bolden-Tiller et al., 2007), principalmente relacionados com a biologia espermatogonial.

Utilizando outro tipo de resina plástica para inclusão testicular, o glicol metacrilato, mesmo com a fixação com glutaraldeído a preservação morfológica apresentou menor resolução em relação àquela observada no processamento glutaraldeído/araldite (Chiarini-Garcia et al., 2011). No entanto, foi de qualidade morfológica bem superior à daqueles testículos incluídos em parafina. O glutaraldeído associado ao glicol metacrilato, por uma questão de custo x benefício, tem sido usado com bastante sucesso para estudos diversos da espermatogênese (Drumond et al., 2011; Melo et al., 2013; Albuquerque et al., 2013), onde a distinção entre subtipos espermatogoniais não são determinantes no estudo.

Os artigos de décadas passadas continuam importantes para o entendimento da espermatogênese dos homens e são frequentemente revisitados como base de conhecimento para estudos atuais, principalmente para estudos em indivíduos sob diferentes tratamentos, condições ambientais ou patológicas. No entanto, cuidados devem ser tomados quando se compara os resultados destes trabalhos onde os testículos sofreram diferentes tipos de processamentos, principalmente no que se refere aos achados morfométricos.

Consultado a literatura pertinente, não encontramos estudo que avaliasse no homem o impacto destes diferentes processamentos nos achados morfométricos e que permitissem, através de fatores de correção, extrapolar os achados oriundos de dados semelhantes obtidos de testículos que sofreram diferentes processamentos.

Tal como demonstrado por outros autores (Howroyd et al., 2005; Silveira, 2006; Pannocchia et al., 2008; Junior, 2010; Reis, 2012), o presente estudo confirma que os processamentos histológicos têm interferência marcante na morfologia tecidual e, principalmente, na definição citológica no nível da microscopia de luz. Enquanto nos fragmentos testiculares processados com GA foi possível distinguir com segurança os diferentes tipos espermatogoniais humanos, nos outros dois processamentos, principalmente naquele que empregou BP, a distinção entre estes tipos celulares foi comprometida. Isto certamente dificulta estudos morfométricos confiáveis, principalmente quando se avalia a biologia espermatogonial. De fato, uma série de estudos desenvolvidos por Chiarini-Garcia e colaboradores, em relação à biologia espermatogonial só foram possíveis quando os testículos foram processados com GA (Chiarini-Garcia e Meistrich, 2008).

O fato de não ter sido encontradas diferenças significativas em relação aos escores histopatológicos se deve, a nosso ver, ao grupo homogêneo de pacientes que foi utilizado no presente trabalho. Isto é, foram cinco indivíduos com câncer de próstata que não foram submetidos a qualquer tipo de tratamento até o momento da orquiectomia e apresentavam uma espermatogênese relativamente bem preservada. Acreditamos que esta pequena diferença entre eles possa não ter sido suficiente para detectar o quanto o processamento possa interferir no diagnóstico. Estudo desenvolvido por Reis (2012) demonstrou que o processamento histológico pode interferir no diagnóstico histopatológico, mas que esta mudança de diagnóstico foi mais evidente principalmente em indivíduos nos quais a espermatogênese está mais comprometida, tal como nos casos de parada de maturação em espermatócitos e principalmente em espermatogônias e ainda no diagnóstico preciso de indivíduos com *Sertoli cell only*. Visto que esse tipo de análise em escores evidencia principalmente a presença ou ausência de espermátides alongadas, e nos homens por nós estudados a espermatogênese estava bem preservada,

este pode ter sido o fato das diferentes técnicas histológicas não terem interferido no diagnóstico histopatológico.

Os parâmetros tubulares, tais como diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero têm sido utilizados com muita frequência para predizer o estado do processo espermatogênico de um indivíduo (França e Russell, 1998). Quando, no presente estudo, comparamos estes parâmetros em relação aos três métodos de inclusão empregados, verificamos que foram significativamente reduzidos o diâmetro tubular, a altura do epitélio e a espessura da túnica própria quando os fragmentos testiculares foram incluídos em BP em comparação com aqueles incluídos pelos processamentos em glutaraldeído e inclusões nas duas resinas plásticas. Este achado demonstra, como observado por outros autores (Reis, 2012; Silveira, 2006), que os tecidos incluídos em BP sofrem redução expressiva causada pelo processamento, retração esta causada pelo uso de fixador coagulante (Bouin), uso de diafanização (xilol) e altas temperaturas no processo de inclusão (parafina) (Amaral et al., 2004; Chiarini-Garcia et al., 2011). Diante disto, o presente estudo propõe que comparações de dados obtidos de estudos onde foram utilizados processamentos diferentes, fatores de correção devem ser utilizados para que os dados possam ser numericamente comparados. Estes fatores devem levar em consideração que houve retração dos parâmetros tubulares na faixa de 8% para o diâmetro tubular, 26% para a altura do epitélio e de 39% para a espessura da túnica própria daqueles fragmentos que foram incluídos em BP, em relação aos processados em GGMA e GA.

Os efeitos da fixação com Bouin e inclusão em parafina são bem conhecidos por retraírem bastante os tecidos e células (Amaral et al., 2004). Mas, o presente trabalho demonstra, e pela primeira vez, o quanto os diâmetros nucleares das células germinativas e somáticas do testículo não sofrem interferência após as inclusões em glicol metacrilato e araldite. Este achado mostra que o valor numérico do diâmetro nuclear pode ser diretamente comparado entre estudos que utilizaram estes dois métodos de preparação histológica, sem a necessidade da utilização de fatores de correção. No entanto, para se fazer estas correlações morfométricas entre estes dois métodos de fixação, com glutaraldeído e inclusão em resinas plásticas em relação ao método que se utiliza Bouin e parafina, fatores de correção devem

ser utilizados. Verificamos que para as células germinativas deve-se considerar uma redução de 30% no diâmetro dos seus núcleos enquanto para as células somáticas esta redução nuclear deve ser de 15%.

Em relação ao número de células germinativas verificou-se que não houve alteração do seu número, quando a contagem foi feita nos três processamentos, à exceção do número de espermátides Sb1. Quando o testículo foi processado com GA, o número de espermátides Sb1 foi significativamente menor quando comparado com seu número obtido após os outros dois processamentos. É sabido que a espessura de corte interfere no aparecimento de células num corte histológico e, desta forma, pode interferir no seu número durante sua contagem. No nosso estudo, as espessuras de corte foram de 5, 3 e 1 micrometros para os processamentos BP, GGMA e GA, respectivamente. Para ajustar esta discrepância de espessura de corte e possibilitar a determinação do número real de células, aos dados brutos obtidos foi aplicada a fórmula de Abercrombie (1944), modificada por Amann (1962). À exceção das espermátides Sb1, esta correção foi suficiente para equalizar os valores para todas as outras células germinativas, tais como espermatogônias  $A_{\text{escuras}}$ , espermatogônias  $A_{\text{claras}}$ , espermátocito primário em preleptóteno e em paquíteno, além do número de mitoses e apoptoses espermatogoniais. Não sabemos exatamente o motivo pelo qual o número de espermátides arredondadas Sb1 não foi equalizado, mas acreditamos que possa estar relacionado com o menor número de espermátides contados após este processamento com GA uma vez que neste caso as áreas analisadas são pequenas. Outros fatores, talvez em associação com o anterior, poderiam ser o fato de estas células serem muito pequenas e ter ocorrido um erro amostral ou mesmo a ocorrência de descamação em alguns túbulos, ocasionados pela coleta ou pelo fator idade dos indivíduos.

Nossos achados mostram que os índices mitóticos, eficiência das células de Sertoli e a eficiência geral da espermatogênese podem ser morfométricamente comparados a partir de trabalhos que empregaram os mesmos métodos de processamento. No entanto, o índice meiótico foi expressivamente elevado nos testículos processados com BP. Como este índice correlaciona o número de espermátides Sb1 com o número de espermátocitos primários em paquíteno, mais uma vez a contagem das



espermátides pode estar interferindo no resultado. De fato, analisando os achados em relação aos números celulares, pode-se verificar que os testículos processados com BP realmente apresentaram menor número de paquíteno e maior número de espermátides Sb1, o que resulta num alto índice meiótico. Para determinar se estes achados morfométricos que envolvem a contagem de espermátides estão corretos, estudos complementares fazem-se necessários. Os primeiros passos seriam aumentar o número de células contadas e/ou aumentar o número de pacientes a ser analisados.

Em conjunto, os achado aqui obtidos mostram que os processamentos com fixação em glutaraldeído e inclusão nas resinas plásticas podem ser comparados quanto a dados morfométricos, e relativamente quanto à morfologia, à exceção de avaliações da biologia espermatogonial, que são apenas confiáveis após processamento com glutaraldeído/araldite. Já nos tecidos processados com Bouin/parafina, estas correlações morfométricas, e mesmo morfológicas, não podem ser feitas diretamente principalmente devido ao alto grau de retração tecidual.

Verificou-se, ainda, que os dados morfométricos relativos aos números celulares não diferiram entre os vários processamentos, uma vez que a maioria das células foram identificadas, mesmo com prejuízos da qualidade morfológica. Por outro lado, quando foram comparados os achados relativos aos diâmetros tubulares, do epitélio seminífero e celulares, as diferenças foram significativas reduzidas demonstrando que a retração tecidual interferiu no resultado morfométrico, impossibilitando a comparação dos resultados dos diferentes processamentos sem a utilização de fatores de correção.

## 7 CONCLUSÕES

- O processamento com glutaraldeído e resinas plásticas preservou melhor a morfologia tecidual e citológica do testículo, principalmente quando se usa a inclusão em araldite.
- Após processamento com Bouin/parafina a qualidade morfológica, principalmente a retração prejudicaram a avaliação de detalhes citológicos.
- A distinção entre diferentes tipos espermatozoniais só foi possível após processamento com glutaraldeído/araldite
- É possível de se fazer comparações morfométricas ao se aplicar os três diferentes métodos quando se correlaciona dados numéricos.
- Quando se compara dados morfométricos relacionados com distâncias (diâmetro, altura, largura e etc), aqueles dados obtidos após processamento com glutaraldeído/resinas plásticas podem ser comparados entre si, mas não com aqueles obtidos após Bouin/parafina, desde que utilizados critérios de correção.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abercrombie M. 1946. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec* 94:239-47.

Albuquerque, A.V.; Almeida, F.R.; Weng, C.C.; Shetty, G.; Meistrich, M.L.; Chiarini-Garcia, H. 2013. Spermatogonial behavior in rats during radiation-induced arrest and recovery after hormone suppression. *Reproduction*. 146(4):363-76. doi: 10.1530/REP-12-0494.

Amann, R.P.; Almquist, J.O. 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. Effect of unilateral vasectomy and ejaculation frequency on sperm reserves; aspects of epididymal physiology. *J Reprod Fertil* 3:260-8.

Amann, R.P.; Schanbacher, B.D. 1983. Physiology of male reproduction. *Janim sci. jul*;57 suppl 2:380-403.

Amaral, D.; Chiarini-Garcia, H.; Vale Filho, V.R.; Allen, W.R. 2004. Efeito dos fixadores formalina e Bouin na preservação do endométrio de éguas após inclusão em resina plástica. *Arq.Bras. Med. Vet. Zootec.* 56:7-12.

Bancroft, J.D.; Stevens, A. 1996. Theory and practice of histological techniques. 5th ed. Churchill Livingstone, 776 p..

Bergmann, M.; Behre, H.M.; Nieschlag, E. 1994. Serum FSH and Testicular morphology in male infertility. *Clinical Endocrinology*. 40:133-136.

Bergmann, M.; Kliesch, S. 2010. Testicular biopsy and histology. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (eds). *Andrology—Male Reproductive Health and Dysfunction*. Springer; 155–172.

Boekelheide, K. 2005. Mechanisms of toxic damage to spermatogenesis. *J Natl Cancer Inst Monogr.* (34):6-8.

Bolden-Tiller , O.U.; Chiarini-Garcia, H.; Poirier, C.; Alves-Freitas, D.; Weng, C.C.; Shetty, G.; Meistrich, M.L. 2007. Genetic factors contributing to defective spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion (Utp14b/jsd) mice. *Biology of Reproduction*, 77(2): 237-246.

Bozzola, J.J; Russell, L.D. 1999. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists.* 2<sup>o</sup>Ed. Jones & Bartlett Learning. 670p.

Burtiz, C. A.; Ashwood, E. R. 1998. *Fundamentos de química clínica.* 4<sup>o</sup> edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan,

Chapin, R.E.; Ross, M.D.; Lamb, J.C. 1984. Immersion fixation methods for glycol methacrylate-embedded testes. *Toxicol Pathol.* 12:221-227.

Chiarini-Garcia, H.; Russell, L.D. 2001. High resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biol. Reprod.*, 65, 1175-1178.

Chiarini-Garcia, H.; Hornick, J.R.; Griswold, M.D.; Russell, L.D. 2001. The distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random. *Biol. Reprod.*, 65, 1179-1185.

Chiarini-Garcia, H.; Raymer, A.M.; Russell, L.D. 2003. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction*, 126, 669-680.

Chiarini-Garcia, H.; Meistrich, M.L. 2008. High-resolution light microscopic characterization of spermatogonia. *Methods in Molecular Biology*, 450: 95-107.

Chiarini-Garcia, H.; Alves-Freitas, D.; Barbosa, I.S.; Almeida, F.R. 2009. Evaluation of the seminiferous epithelial cycle, spermatogonial kinetics and niche in donkeys (*Equus asinus*). *Anim Reprod Sci.* 116(1-2): 139-154.

Chiarini-Garcia, H.; Parreira, G.G.P.; Almeida, R.C.L. 2011. Glycol Methacrylate embedding for improved morphological, morphometrical, and immunohistochemical investigations under light microscopy: Testes as a model. *Methods Mol Biol.* 689:3-18.

Clermont, Y.; Leblond, C.P. 1955. Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the periodic acid-Schiff technique. *Am J Anat.* Mar;96(2):229-53.

Clermont, Y. ; Leblond, P. 1959. Differentiation and renewal of spermtogonia in thee monkey *Macaca rhesus*. *Am. J. Anat.*, 104, 237-273.

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

Clermont, Y. 1966a. Renewal of spermatogonia in man. *Am J. Anat*, 118, 509-524.

Clermont, Y. 1966b. Spermatogenesis in man. A study of the spermatogonial population. *Fertil. Steril.*, 17, 705-721.

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

Clermont, Y. ; Antar, M. 1973. Durantion of the cycle of the seminiferous epithelium and the spermatogonial renewal in the monkey *Macaca arctoides*. *Am. J. Anat.*, 136, 153-165.

Courot, M.; Hochereau-de-Reviere, M.T.; Ortavant, R. 1970. Spermatogenesis. In: Johnson, A.D., Gomes, W.R., Vandemark, N.L. (ed). *The testis*. New York: Academic Press. v.1, p. 339-432.

de Rooij, D.G.; Russell, LD. 2000. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl.* 21(6): 776-798.

Drumond, A.L.; Meistrich, M.L.; Chiarini-Garcia, H. 2011. Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: a high-resolution light microscopy approach. *Reproduction (Cambridge)*. 142:154-155.

Dym, M.; Kokkinaki, M.; He, Z. 2009. Spermatogonial stem cells: mouse and human comparisons. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews* 87 27-34.

Ehmcke, J.; Schlatt, S. 2006. A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates. *Reproduction*. 132(5): 673-680.

Ehmcke, J.; Wistuba, J.; Schlatt, S. 2006. Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Hum Reprod Update*, 12(3), 275-82.

Ferreira, R.M.A.; Chiarini-Garcia, H. 1992. Efeito da fixação e do meio de inclusão na preservação histológica do intestino da traíra *Hoplias malabaricus*. *Ver. Bras. Ciên.Morfol.* 9. 32-37.

França, L.R.; Russell, L.D. 1998. The testis of domestic animals. In: *Reproduction- a multidisciplinary overview*. Matinez F, Regadera, J. (eds.). Churchill Livingstone, Madri, 197-219.

França, L.R.; Chiarini-Garcia, H. 2005. Célula de sertoli. In: Carvalho HF, Collares-Buzato CB. *Células: uma abordagem multidisciplinar*. Manole. 24;302-324.

Geneser, R.J. *Histologia*. 3ª edição. Rio de Janeiro: Editora: Guanabara Koogan S.A. 2003.

Harbitz, T.B. 1973. Morphometric studies of the Sertoli cells in elderly men with special reference to the histology of the prostate. An analysis in an autopsy series. *Acta Pathol Microbiol Scand* 81:703-14.

Heller, C.G.; Clermond, Y. 1963. Spermatogenesis in man: an estimate of its duration. *Science*, 140, 184-186.

Heller, C.H.; Clermont, Y. 1964. Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent Prog Horm Res.* 1964;20:545-75.

Heller, C.G.; Heller, G.V.; Rowley, M.J. 1969. Human spermatogenesis: an estimate of the duration of the each cell association and of each cell type. *International Congress Series.* 184, 1012-1018.

Hermann, M.; Berger, P. 1999. Aging of the male endocrine system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 139:89-122.

Hermann, B.P.; Sukhwani, M.; Hansel, M.C.; Orwig, K.E. 2010. Spermatogonial stem cells in higher primates: are there differences from those in rodents? *Reproduction.* 139(3): 479-943.

Hikim, A.P.; Amador, A.G.; Klemcke, H.G.; Bartke, A.; Russell, L.D. 1989. Correlative morphology and endocrinology of Sertoli cells in hamster testes in active and inactive states of spermatogenesis. *Endocrinology.* Oct;125(4):1829-43.

Holstein, A.F.; Eckmann, C. 1986. Multinucleated spermatocytes and spermatids in human seminiferous tubules. *Andrologia* 18:5-16.

Holstein, A.F.; Eckmann, C. 1986. Megalospermatocytes: indicators of disturbed meiosis in man. *Andrologia* 18:601-9.

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

Johnsen, G.J. 1970. 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.

Johnson, L. 1986. Spermatogenesis and aging in the human. *J Androl* 7:331-54.

Johnson, L.; Petty, C.S.; Neaves, W.B. 1986. Age-related variation in seminiferous tubules in men. A stereologic evaluation. *J Androl* 7:316-22. doi: 10.1002/j.1939-4640.1986.tb00939.x

Junior, J.C.S. 2010. Título: Controle de qualidade em lâminas histológicas: importância da metodologia de H/E no diagnóstico médico. Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas/Bacharelado. Faculdades Integradas Fafibe. 36p.

Junqueira, L.C.; Carneiro, J. 2013. *Histologia Básica*. 12<sup>o</sup> Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 556p.

Kiernan, J. H. 1989. *Histological and histochemical methods. Theory and practice*. 2nd Ed. Oxford, Pergamon Press.

Leblond, C.P.; Clermont, Y. 1952. Definitions of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 55, 548.

Leal, M.C.; França, L.R. 2006. The seminiferous epithelium cycle length in the black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) is similar to humans. *Biol Reprod*. 74(4): 616-624.

Lellei, I.; Magyar, E.; Erdei, E. 2001. Histological evaluation of multiple testicular biopsies helping assisted reproduction. *Pathol Res Pract*. 197(11):727-33.



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

Martello, R. 2013. Título: Efeitos da radioterapia e hormonioterapia na espermatogênese de pacientes com câncer de próstata. Tese de doutorado em Ciências aplicadas à cirurgia e à oftalmologia. Faculdade de medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. 96p.

Melo, M.C.; Almeida, F.R.; Caldeira-Brant, A.L.; Parreira, G.G.; Chiarini-Garcia, H. 2013. Spermatogenesis recovery in protein-restricted rats subjected to a normal protein diet after weaning. *Reprod Fertil.* doi: 10.1071/RD13032.

Michalant, J. 1988. Operações fundamentais da técnica histológica. In: *Técnica Histológica em Anatomia Patológica*. São Paulo: Editora Michalany LTDA, cap. II, p. 24-31.

McLachlan, R.I.; De Meyts, E.R.; Kretser, D.M. 2007. Histological evaluation of the human testis-approaches to optimizing the clinical value of the assessment: Mini Review. *Hum Reprod.* 22:2-16.

Millar, M.R. ; Sharpe, R.M. ; Weinbauer, G.F. ; Fraser, H.M. ; Saunders, P.T. 2000. Marmoset spermatogenesis : organizational similarities to the human. *Int. J. Androl.*, 23, 266-277.

Morley, J.E.; Perry, H.M. 1999. 3rd. Androgen deficiency in aging men. *Med Clin North Am* 83:1279-89.

Mori, H.; Christensen, A.K. 1980. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *J Cell Biol.* Feb;84(2):340-54.

Muciaccia, B.; Boitani, C.; Berloco, B.P.; Nudo, F.; Spadetta, G.; Stefanini, M.; de Rooij, D.G.; Vicini, E. 2013. Novel stage classification of human spermatogenesis based on acrosome development. *Biol Reprod.* Sep 19;89(3):60.

Najari, B.B. ; Ramasamy, R. ; Sterling, J. ; Aggarwal, A. ; Sheth, S. ; Li, P.S. ; Dubin, J.M. ; Goldenberg, S. ; Jain, M. ; Robinson, B.D. ; Shevchuk, M. ; Scherr, D.S. ; Goldstein, M. ; Mukherjee, S. ; Schlegel, P.N. 2012. Pilot study of the correlation of multiphoton tomography of ex vivo human testis with histology. *J Urol.* 188:538-43.

Nascimento, H.F.; Drumond, A.L.; França, L.R.; Chiarini-Garcia, H. 2008. Spermatogonial morphology, kinetics and niches in hamsters exposed to short- and long-photoperiod. *Int J Androl.* 32(5): 486-497.

Nistal, M.; Santamaria, L.; Regadera, J.; Paniagua, R. 1988. Diverticula of human seminiferous tubules in the normal and pathologic testis. *J Androl* 9:55-61.

Pannocchia, M.A.; Borella, M.I.; de Camargo, A.C.M.; Gilio, J.M.; Silva, C.A. 2008 Estratégia efetiva de fixação do testículo de ratos Wistar para avaliar os parâmetros morfológicos e morfométricos do epitélio seminífero. *ConScientiae Saúde.* 7(2):227-233p.

Reis, B.A. 2012. Título: Estudo comparativo entre diferentes processamentos histológicos na interpretação de biopsias testiculares. Tese de doutorado em Ciências aplicadas à cirurgia e à oftalmologia. Faculdade de medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. 80p.

Robey, P.G. 2000. Series Introduction: Stem cells near the century mark. *J Clin Invest.* 105(11):1489–1491p.

Ross, M.H.; Pawlina, W. 2011. *Histologia texto e atlas em correlação com biologia celular e molecular.* Ed. Guanabara Koogan. 987p.

Roosen-Runge, E.C. 1956. Quantitative investigations on human testicular biopsies. *Fertility and sterility*. 7: 251-261p.

Russell, L.D.; Ettlín, R.A.; Sinha Hikim, A.P.; Clegg, E.D. 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River Press. 286 p.

Russell, L.D.; Chiarini-Garcia, H.; Korsmeyer, S.J.; Knudson, C.M. 2002. Bax dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *BiolReprod*. 66: 950-958.

Ryu, B.Y.; Orwig, K.E.; Avarbock, M.R.; Brinster, R.L. 2003. Stem cell and niche development in the postnatal rat testis. *Developmental Biology* 263 253 -263.

Sasano, N.; Ichijo, S. 1969. Vascular patterns of the human testis with special reference to its senile changes. *Tohoku J Exp Med* 99:269-80.

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

Söderström, K.O. 1986. Tubular hyalinization in human testis. *Andrologia* 18:97-103.

Suoranta, H. 1971. Changes in the small blood vessels of the adult human testis in relation to age and to some pathological conditions. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat* 352:165-81.

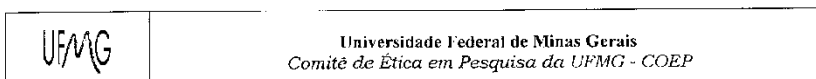
Shinohara, T.; Orwig, K.E.; Avarbock, M.R.; Brinster, R.L. 2003. Restoration of spermatogenesis in infertile mice by Sertoli cell transplantation. *Biol Reprod* 68 1064 -1071.

Schulze, C. 1984. Sertoli cells and Leydig cells in man. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 88:1-104.

Stevens, A.; Lowe, J. 2001. Histologia Humana. 2ª edição. São Paulo: Editora Manole.

## 9 ANEXOS

### Anexo I. Aprovação nos comitês de ética



#### Parecer nº. ETIC 117/07


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

#### DECISÃO

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

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

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

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





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

**UFMG**

Belo Horizonte, 19 de outubro de 2007.

**PROCESSO Nº 079/2007**

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

Sr(a) Pesquisador(a):

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

Solicitamos enviar à DEPE relatório parcial ou final, após um ano.

Atenciosamente,

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

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



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

#### **Apresentação do Protocolo**

O protocolo está devidamente instruído.

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

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

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

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

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

#### **Local de Realização do Estudo**

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

#### **Comentários**

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

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

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

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

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

A metodologia é adequada aos fins desejados.

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



Cont. Parecer CONEP 182/2008

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.

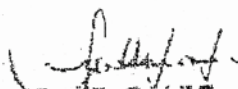
**Considerações sobre a análise das respostas ao Parecer CONEP Nº 013/2007, relativo ao projeto de pesquisa em questão:**

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

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

Situação: Projeto aprovado

Brasília 07 de abril de 2008.

  
 Syzelle Saadi Tanneus  
 Coordenadora da CONEP/CNS/MS

## Anexo II. Termo de consentimento livre e esclarecido

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****Hospital das Clínicas****Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução****Termo de Consentimento Livre e Esclarecido*****“Reavaliação da espermatogênese humana à luz de modernos métodos de estudo morfológicos e funcionais”*****INTRODUÇÃO:**

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

**INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA**

A pesquisa visa o estudo das células tronco dos testículos. Como estas células são as responsáveis por manter o indivíduo fértil por toda a sua vida adulta, alterações e doenças relacionadas com estas células tronco podem levar o indivíduo à sub-fertilidade ou mesmo à infertilidade. Apesar dos grandes avanços na área médica, ainda sabe-se muito pouco como estas células funcionam em um indivíduo normal e, muito menos ainda, como elas são afetadas em diferentes doenças. Diante disto, pretendemos neste projeto de pesquisa, estudá-las em homens portadores de câncer avançado de próstata, nos quais a indicação médica foi a retirada dos testículos. Estes homens serão

divididos em grupos levando-se em consideração àqueles que não sofreram nenhum tratamento prévio contra o câncer de próstata e aqueles que se submeteram a diferentes tratamentos. Pequenos pedaços dos testículos que seriam desprezados serão preservados em formol e estudados em laboratórios de pesquisa. Estes estudos serão desenvolvidos principalmente no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG. Parte do material será enviada, sem nenhuma identificação dos dados pessoais do paciente, para o Departamento de Radiação Oncológica Experimental da Universidade do Texas nos Estados Unidos, onde serão desenvolvidos experimentos relacionados com as células tronco.

### **SIGILO DOS DADOS**

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

### **BENEFÍCIOS DA PESQUISA**

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

### **RISCOS**

Pelo fato de estarmos utilizando testículos retirados para auxiliar no tratamento do câncer prostático, e que seria totalmente descartado, isso não acarreta nenhum risco adicional a esses pacientes além daquele já esperado para a cirurgia. A coleta da amostra de sangue periférico, que será utilizada para dosagens hormonais, com uma seringa acoplada a agulha para punção venosa, pode ocasionalmente causar dor, hematoma (mancha roxa abaixo da

pele) e irritação (mancha avermelhada que pode coçar) no local da retirada do sangue do seu braço. A quantidade de sangue retirada não trará nenhuma alteração ao seu sistema circulatório, sendo que em 24 horas seu organismo, por si só, recompõem esta pequena quantidade de sangue coletada.

### **RESSARCIMENTO DAS DESPESAS**

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

### **DEMAIS ESCLARECIMENTOS**

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

**TERMO DE CONSENTIMENTO**

Eu,

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

Nome completo do paciente:

Nº Registro do paciente:

Assinatura do paciente ou representante legal:

Local e data:

Nome da pessoa que obteve o Consentimento Livre e Esclarecido:

Assinatura da Pessoa que obteve o consentimento Livre e esclarecido:

Local e data:

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

Telefones para contato:

Pesquisadores:

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

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

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

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

Prof. Dr. Denny

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

Endereço do Comitê de Ética:

Comitê de Ética em Pesquisa – UFMG

Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005

Av. Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha

31.270-901 – Belo Horizonte – MG

Telefone: (31) 3409.4592

Anexo III. Ciclo do epitélio seminífero do homem (Heller e Clermont, 1964).

