

AUGUSTO BARBOSA REIS

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  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte – MG  
2012

AUGUSTO BARBOSA REIS

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DIFERENTES PROCESSAMENTOS  
HISTOLÓGICOS NA INTERPRETAÇÃO DE BIOPSIAS TESTICULARES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Medicina.

Área de Concentração: Cicatrização

Linha de Pesquisa: Estudo Clínico e Experimental dos Defeitos da Parede Abdominal

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Samesima Tatsuo

COORIENTADOR: Prof. Dr. Hélio Chiarini-Garcia

Belo Horizonte – MG

2012

## **AGRADECIMENTOS – AUXÍLIOS INSTITUCIONAIS**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Reitor:** Prof. Dr. Clélio Campolina Diniz

**Vice-Reitora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rocksane de Carvalho Norton

**Pró-Reitor de Pós-Graduação:** Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

**Pró-Reitor de Pesquisa:** Prof. Dr. Renato de Lima dos Santos

FACULDADE DE MEDICINA

**Diretor:** Prof. Dr. Francisco José Penna

**Vice-Diretor:** Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

**Coordenador do Centro de Pós-Graduação:** Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia**

Coordenador: Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Subcoordenadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivana Duval de Araújo

**Colegiado Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia:**

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivana Duval de Araújo

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Renato Santiago Gomes

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Sumara Marques Barral – representante discente

## DEDICATÓRIA

Aos meus amados Daniela e Arthur, meus grandes incentivadores.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Edson Samesima Tatsuo, pela confiança e serenidade durante toda a elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Hélio Chiarini Garcia, pela generosidade de me acolher no LABER e pela paciência no ensino das técnicas de interpretação da espermatogênese, mais do que tudo pela amizade que nos conduziu durante este período.

Ao Dr. Paulo Guilherme de Oliveira Salles, pela colaboração e opiniões, sem as quais este trabalho teria encontrado dificuldades maiores na sua concretização.

Ao Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis, pela sua fraterna amizade e incondicional disponibilidade na instrução do caminho das pedras no campo da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Aroldo Fernando Camargos, que continua sendo um incentivador constante da importância da investigação e pesquisa científica na prática da Medicina baseada em evidências.

Ao Prof. Carlos Conrardi Fonseca, por compreender, apoiar e permitir a minha ausência durante a elaboração deste trabalho.

Aos Professores Francisco de Paula Câmara, Adelmo Simões Pereira e Daniel Xavier Lima pela confiança depositada em mim e pela sua amizade.

Ao Médico e amigo Reginaldo Martello, modelo de profissional médico ético, pela oportunidade da convivência e pelo apoio durante todo este período.

Aos colegas médicos Frederico Álvares da Silva Salgado, Benjamim Godinho da Fonseca Neto e Marcelo Franca Neves, que possibilitaram o meu afastamento dos plantões da Urologia durante a realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório LABER, pelas preciosas lições sobre a morfologia testicular e por compartilharem as alegrias e frustrações.

A técnica Maria Luiza (Malu) cujo apoio técnico no preparo das biópsias testiculares foi essencial na realização dos meus experimentos, meus sinceros agradecimentos.

Aos colegas do Serviço de Urologia e Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da UFMG, por estimularem os meus estudos e entenderem a minha ausência.

Aos colegas da clínica Pró-Criar que me apoiaram e facilitaram a minha dedicação na condução e conclusão deste estudo.

Aos pacientes que com um ato de grande altruísmo permitiram a realização deste estudo.

Aos professores Fernando Marcos dos Reis, Vivian Resende e Clécio Piçarro pelas discussões valiosas sobre o conteúdo deste trabalho durante o exame de qualificação que muito contribuíram na finalização desta tese.

Aos meus queridos pais que apesar de toda dificuldade que passaram neste período compreenderam a importância deste trabalho na minha formação pessoal e profissional.

Aos meus queridos familiares Paola, Adriana, Wander e Bernardo que compreenderam a minha ausência e apoiaram meus pais durante todo este período.

A minha sogra Lúcia que cuidou tão bem do seu neto Arthur, nas muitas ocasiões em que eu não pude fazê-lo.

Às fundações financiadoras FAPEMIG e CNPq.

## ÍNDICE

1	RESUMO.....	XIII
2	ABSTRACT.....	XVI
3	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	1
3.1	Espermatogênese no homem.....	1
3.2	Biópsias testiculares.....	3
3.3	Padrões de classificação histopatológicos das biópsias testiculares.....	7
3.4	Justificativa.....	9
4	OBJETIVOS.....	10
4.1	Objetivo geral.....	10
4.2	Objetivos específicos.....	10
5	CASUÍSTICA E MÉTODO.....	11
5.1	Delineamento experimental.....	11
5.1.1	Modalidade de estudo.....	11
5.1.2	Principais desfechos.....	11
5.2	Considerações Éticas.....	11
5.3	Pacientes.....	11
5.4	Biópsia testicular.....	13
5.5	Processamento das amostras.....	13
5.5.1	Criopreservação de espermatozoides.....	13
5.5.2	Fixação em Bouin e inclusão em parafina.....	14
5.5.3	Fixação em glutaraldeído e inclusão em glicol metacrilato.....	14
5.6	Avaliação dos Escores de cinco padrões, Johnsen e Bergmann em Bouin/parafina e glutaraldeído/glicol-metacrilato.....	14
5.6.1	Escore de cinco padrões.....	15
5.6.2	Escore de Johnsen.....	16
5.6.3	Escore de Bergmann.....	17
5.7	Análises microscópicas e documentação fotográfica.....	18
5.8	Avaliação dos parâmetros clínicos não invasivos.....	18
5.8.1	Avaliação do volume testicular.....	18
5.8.2	Dosagem de Testosterona.....	19
5.8.3	Dosagem do Hormônio Folículo Estimulante (FSH).....	19
5.9	Estatística.....	19

6	RESULTADOS .....	21
6.1	Caracterização da amostra.....	21
6.2	Avaliação histopatológica comparativa entre os diferentes métodos de inclusão.....	21
6.3	Comparação entre diferentes colorações.....	24
6.4	Descrição morfológica das biópsias testiculares em cinco e 10 escores pelos dois métodos de inclusão.....	25
6.5	Análises comparativas dos diferentes escores em relação aos métodos de inclusão.....	26
6.5.1	Correlações em relação ao método de Cinco escores.....	39
6.5.2	Johnsen.....	39
6.5.3	Bergmann.....	40
6.6	Correlação dos dados clínicos e achados histopatológicos com a recuperação de espermatozoides na biópsia testicular para congelamento.....	41
6.6.1	Volume testicular.....	42
6.6.2	FSH.....	43
6.6.3	Testosterona.....	44
6.6.4	Escore 5.....	45
6.6.5	Escore de Johnsen.....	45
6.6.6	Escore de Bergmann.....	46
7	DISCUSSÃO.....	48
8	CONCLUSÕES.....	59
9	REFERÊNCIAS .....	60
10	ANEXOS .....	68
10.1	Anexo 1: Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	69
10.2	Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para congelamento de espermatozoides Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	70
10.3	Apêndice 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	74
10.4	Apêndice 2: Exemplo 1 do escore de Johnsen.....	75
10.5	Apêndice 3: Exemplo 2 do escore de Johnsen.....	76
10.6	Apêndice 4: Exemplo 3 do escore de Johnsen.....	77



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Etiologia da azoospermia dos 21 pacientes submetidos à biópsia testicular e suas respectivas idades .....	12
Tabela 2. Classificação histopatológica da espermatogênese segundo Bergmann e Kleisch (2011).....	17
Tabela 3: Padrão de referência do volume testicular em diferentes faixas.....	18
Tabela 4: Valores de referência da dosagem sérica de testosterona.....	19
Tabela 5: Valores de referência da dosagem sérica de FSH.....	19
Tabela 6: Volume testicular e concentração sérica de FSH e testosterona dos 21 pacientes em estudo, divididos em sem recuperação e com recuperação de espermatozoides das biópsias testiculares.....	22
Tabela 7. Comparação entre os artefatos citológicos encontrados nas biópsias testiculares, entre os diferentes métodos de fixação e inclusão.....	25
Tabela 8: Comparações entre os resultados obtidos das avaliações dos três escores histopatológicos empregados, para cada um dos 21 indivíduos em estudo, em relação às duas técnicas de processamentos empregadas .....	27
Tabela 9. Distribuição dos valores de FSH acima e abaixo do valor de corte 7 mUI/mL nos grupos 1 e 2.....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Sequência de células germinativas que compõem a espermatogênese do homem, segundo Clermont (1963). Ad: espermatogônia escura, Ap: espermatogônia pálida, B: espermatogônia do tipo B, L: espermatócito primário Leptóteno, Z: espermatócito primário Zigóteno, PS: espermatócito paquíteno, M: divisão meiótica, Sa-Sb1: espermátide arredondada, Sb2-Sc: espermátide em alongamento, Sd1-Sd2: espermátide alongada. (retirado de McLachlan, 2007).....	02
Figura 2: Fotomicrografias comparando morfológicamente as estruturas de testículo humano, obtidas de biópsias testiculares processadas por dois diferentes métodos de fixação e inclusão: Bouin/parafina (B/P) com coloração em HE e glutaraldeído/glicol metacrilato (G/GMA) com coloração em azul de toluidina-borato .....	29
Figura 3: Fotomicrografias comparando morfológicamente as estruturas do espaço intersticial do testículo humano, obtidas de biópsias testiculares processadas por dois diferentes métodos de fixação e inclusão: Bouin/parafina (B/P) com coloração em HE e glutaraldeído/glicol metacrilato (G/GMA) com coloração em azul de toluidina-borato.....	30
Figura 4 - Fotomicrografias comparando o efeito de dois tipos de colorações histológicas (hematoxilina e eosina e azul de toluidina-borato) sobre a histologia de biópsias testiculares quando estas foram processadas em Bouin/parafina e em glutaraldeído/glicol metacrilato.....	31
Figura 5: Fotomicrografias indicando as principais características histopatológicas para classificação das biópsias testiculares segundo o escore de Cinco Padrões (escore de 1 a 5), nos dois processamentos utilizados, B/P e G/GMA.....	33
Figura 6: Fotomicrografias indicando as principais características histopatológicas para classificação das biópsias testiculares, segundo os escores de 10 a 6 de Johnsen, nos dois processamentos utilizados, B/P e G/GMA.....	35
Figura 7: Fotomicrografias indicando as principais características histopatológicas para classificação das biópsias testiculares, segundo os escores de 5 a 1 de Johnsen, nos dois processamentos utilizados, B/P e G/GMA.....	37
Figura 8- Fotomicrografias com exemplos de alterações de resultados histopatológicos após avaliação pelo processamento G/GMA, que resultaram em mudança de diagnóstico clínico.....	38

Figura 9. Concordância entre os padrões histológicos testiculares e as técnicas de fixação e inclusão B/P e G/GMA avaliados pelo escore de cinco padrões, tendo como linhas de referência o ponto de corte 3 (padrão parada de maturação).....	39
Figura 10 Concordância entre os padrões histológicos testiculares e as técnicas de fixação e inclusão Bouin/parafina e glutaraldeído/glicol metacrilato avaliados pelo escore de Johnsen, tendo como linhas de referência o ponto de corte 5 (ausência de espermátides e presença de muitos espermatócitos).....	40
Figura 11. Concordância entre os padrões histológicos testiculares e as técnicas de fixação e inclusão Bouin/parafina e glutaraldeído/glicol metacrilato avaliados pelo escore de Bergman, tendo como linhas de referência o ponto de corte 0,5 (corresponde a nota 5 de Bergman, esta nota encontra-se dentro do padrão de túbulos seminíferos com espermatogênese e áreas de atrofia).....	41
Figura 12. Distribuição dos valores do volume testicular (mL) nos Grupos 1 (recuperação de espermatozoides) e 2 (sem recuperação de espermatozoides).....	42
Figura 13. Distribuição dos valores de FSH nos Grupos 1 (recuperação de espermatozoides) e 2 (sem recuperação de espermatozoides).....	43
Figura 14. Distribuição dos valores da testosterona total sérica nos Grupos 1 (recuperação de espermatozoides) e 2 (sem recuperação de espermatozoides).....	44
Figura 15. Distribuição dos padrões histológicos segundo o Escore de Cinco Padrões nos Grupos 1 (recuperação de espermatozoides) e 2 (sem recuperação de espermatozoides).....	45
Figura 16. Distribuição das notas médias dos padrões histológicos segundo o Escore de Johnsen nos Grupos 1 (recuperação de espermatozoides) e 2 (sem recuperação de espermatozoides).....	46
Figura 17. Distribuição dos padrões histológicos segundo o escore Bergmann nos Grupos 1 (recuperação de espermatozoides) e 2 (sem recuperação de espermatozoides).....	47

# 1 RESUMO

Para compreender melhor os processos histopatológicos que acometem o testículo do homem azoospérmico, o presente trabalho teve como objetivo comparar métodos de preparação histológica de biópsias testiculares. Para tanto, coletaram-se biópsias testiculares de 21 homens azoospérmicos que foram divididas em três fragmentos, sendo o primeiro deles processado pela técnica convencional (fixação em Bouin e inclusão em parafina), o segundo processado pelo método de fixação em glutaraldeído e inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato (GMA) e o terceiro utilizado para pesquisa de espermatozoides. As alterações histopatológicas foram descritas, comparativamente, em se considerando três diferentes escores: (i) de cinco padrões (mais utilizado na anatomia patológica), (ii) de Johnsen e (iii) de Bergmann. Além disto, foram coletados dados clínicos, como volume testicular, dosagem sérica de testosterona total e hormônio folículo estimulante. Todos os parâmetros avaliados basearam-se principalmente nas diferenças citológicas e na chance de se encontrar espermatozoides nas biópsias testiculares. Os resultados demonstraram que as duas técnicas de preparação histológica foram concordantes na avaliação das notas dos três diferentes tipos de escores utilizados, entretanto alguns indivíduos (21%) apresentaram melhora no diagnóstico histopatológico quando avaliados com a técnica de fixação em glutaraldeído e inclusão em GMA. Os padrões que mais apresentaram mudança foram de hipoespermatogênese para espermatogênese normal e atrofia ou esclerose testicular para parada de maturação. Esta melhora no escore dos pacientes relaciona-se com um aumento na chance de se encontrar espermatozoides em uma nova biópsia testicular. Ademais, o processamento glutaraldeído/GMA apresentou uma maior correlação entre os três escores - cinco padrões, Johnsen e Bergmann - com o achado de espermatozoides. Dentre os escores, o de Bergmann foi o que apresentou melhor correlação com o encontro de espermatozoides em cinco indivíduos (26%) dos 19 avaliados. Os dados clínicos, em relação ao volume testicular e dosagens hormonais, foram semelhantes entre os grupos com e sem espermatozoides nas biópsias testiculares. Em conclusão, o presente trabalho demonstrou que a preparação de biópsias testiculares com o método de glutaraldeído/GMA é mais preciso no diagnóstico de certas azoospermias, aumentando a chance de pacientes azoospérmicos, que poderiam ter sido considerados incapazes pelo método tradicional, de serem pais biológicos.

**Palavras-chave:** homens, infertilidade, azoospermia, testículo, biópsia testicular, histopatologia testicular, escore de cinco padrões, escore de Johnsen, escore de Bergmann, extração de espermatozoides.

## 2 ABSTRACT

To better understand the pathological processes that affect the azoospermic man's testicle, the present study aimed to compare methods of fixation of testicular biopsies. To do so, testicular biopsies were collected from 21 azoospermic men, and cut into three fragments. The first was processed by the conventional technique (Bouin / paraffin) while the second was processed by the method of fixation in glutaraldehyde and embedded in a plastic resin-based glycol methacrylate (GMA) and the third used to search for the presence of sperm. The histopathological changes were described comparatively considering three different scores: (i) five patterns (most commonly used in pathology), (ii) Johnsen and (iii) Bergmann. In addition, clinical data were collected such as testicular volume, blood samples for serum total testosterone and follicle stimulating hormone analysis. All parameters were evaluated based on cytological differences and chances of finding sperm in the testicular biopsies. The results showed that both techniques were similar in the grades evaluation of the three different types of scores used. However some individuals (21%) showed an improvement in the histopathological diagnosis when evaluated with the technique of fixation in glutaraldehyde and embedding in GMA. The patterns which showed the biggest changes were from hypospermatogenesis to normal spermatogenesis and from testicular atrophy or sclerosis to maturation arrest. This improvement in the patients' scores is related to an increased chance of finding sperm in a new testicular biopsy. Moreover, the glutaraldehyde / GMA, technique showed a higher correlation between the three scores - five patterns, Johnsen and Bergmann - and the presence of spermatozoa. Among the scores, Bergmann showed the best correlation with increased chance of finding sperm in five individuals (26%) out of the 19 evaluated. Concerning the clinical data, testicular volume and hormonal measurements were similar between the groups with or without the presence of sperm in testicular biopsies. In conclusion, the present study demonstrated that testicular biopsies preparation with the glutaraldehyde / GMA technique is more accurate in the diagnosis of certain azoospermia pathologies and improves the chance of azoospermic patients, which could have been considered incapable by the traditional method, to become biological parents.

**Keywords:** men, infertility, azoospermia, diagnosis, testicle, testicular biopsy, histopathology, five-score patterns, Johnsen, Bergmann, sperm extraction

Reis, Augusto Barbosa.  
R375e      Estudo comparativo entre diferentes processamentos histológicos na interpretação de biopsias testiculares [manuscrito]. / Augusto Barbosa Reis. - - Belo Horizonte: 2012.  
77f.: il.  
Orientador: Edson Samesima Tatsuo.  
Área de concentração: Cicatrização.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Infertilidade. 2. Azoospermia. 3. Biópsia. 4. Testículo. 5. Espermatozoides. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Tatsuo, Edson Samesima. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título

NLM: WP 565

### 3. INTRODUÇÃO E LITERATURA

#### 3.1 Espermatogênese no homem

A espermatogênese é um processo complexo pelo qual as células-tronco multipotentes primitivas se dividem seja para se autorenovar, ou para produzir células filhas que se transformam em espermatozoides. Esse processo ocorre no interior dos túbulos seminíferos, sendo que no homem o epitélio seminífero corresponde a até 80% do volume testicular (Esteves et al., 2011, Turek, 2010).

Os túbulos seminíferos são revestidos pelas células de Sertoli que se apóiam na membrana basal e se estendem para dentro do seu lúmen. Estas células são unidas por junções estreitas, designadas de junções de oclusão, que dividem o epitélio seminífero nos compartimentos basal e adluminal (França e Chiarini-Garcia, 2005; Russell e Griswold, 1993). Esta divisão espacial nos túbulos seminíferos forma a base para a estrutura da barreira de células de Sertoli, possibilitando que a espermatogênese ocorra em um local imunologicamente privilegiado. A formação deste ambiente tem importância significativa, pois, a produção de espermatozoides se inicia na puberdade, enquanto que o amadurecimento do sistema imunológico ocorre nos primeiros anos de vida, portanto os espermatozoides não são reconhecidos como próprios do organismo podendo desencadear uma reação tipo antígeno – anticorpo se forem reconhecidos fora da barreira de células de Sertoli (Meng et al, 2011).

As células de Sertoli participam ativamente da espermatogênese com função de nutrição, suporte, secreção, endocitose, espermição, entre outras (revisão revisões em França e Chiarini-Garcia, 2005; Russell e Griswold, 1993). Estas células expressam receptores para o hormônio folículo estimulante (FSH), que quando estimulado induz a produção da proteína ligadora de androgênio (ABP), que é secretada para o lúmen do túbulo seminífero. Esta proteína tem uma alta capacidade de se ligar a testosterona fazendo com que os níveis intraluminais deste hormônio sejam em torno de 20 a 50 vezes superior aos níveis séricos. Além disto, as células Sertoli quando em contato com as células do epitélio germinativo secretam a glicoproteína inibina, sendo a do tipo B a mais comum no homem. Esta substância está relacionada endocrinologicamente com a alça de inibição na hipófise anterior, regulando a produção de FSH.

Dentro do túbulo seminífero as células germinativas de dispõem, juntamente com as células de Sertoli, de forma altamente organizada formando o epitélio germinativo. Na base deste epitélio, no compartimento adluminal e em contato com a membrana basal, encontram-se as espermatogônias, que através de mitoses sucessivas vão manter a produção espermática. No homem, são três as gerações

espermatogoniais, as espermatogônias A escuras (consideradas as células-tronco de estoque) as espermatogônias A claras (consideradas as células-tronco em atividade) e as espermatogônias do tipo B (Clermont, 1966). Após as divisões mitóticas das espermatogônias B, formam-se os espermatócitos primários em preleptoteno, iniciando assim a meiose que segue formando os espermatócitos primários em leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno, que se divide formando os espermatócitos secundários. Estes, por sua vez, completam a o processo meiótico dividindo e formando as espermátides arredondadas (Clermont, 1963; Heller e Clermont, 1964). As espermátides arredondadas recém formadas, entram no processo de espermiogênese, quando mudam drasticamente sua morfologia para formar as espermátides alongadas, que serão liberadas no lúmen dos túbulos seminíferos, como espermatozoides (Fig. 1). As células germinativas não estão dispostas de forma aleatória no epitélio seminífero, mas sim organizadas formando o que é conhecido como "estádios do ciclo do epitélio seminífero". No homem são identificados até seis estádios (Clermont, 1963), ao contrário de outras espécies que servem de modelo experimental como camundongos e ratos onde são descritos de 12 e 14 estádios, respectivamente (Russell et al., 1990).

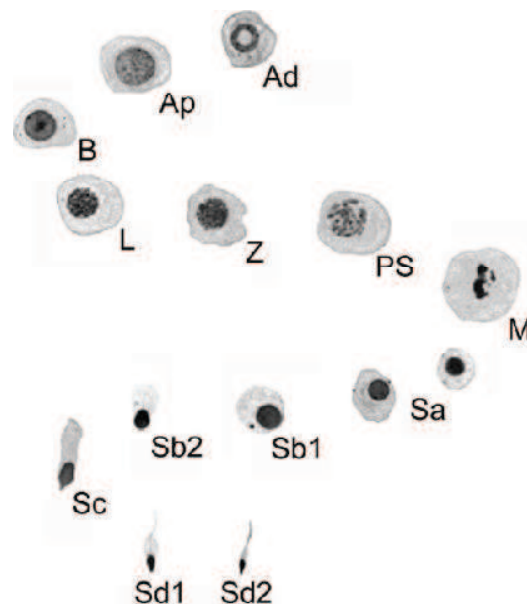


Figura 1: Sequência de células germinativas que compõem a espermatogênese do homem, segundo Clermont (1963). Ad: espermatogônia escura, Ap: espermatogônia pálida, B: espermatogônia do tipo B, L: espermatócito primário Leptóteno, Z: espermatócito primário Zigóteno, PS: espermatócito paquíteno, M: divisão meiótica, Sa-Sb1: espermátide arredondada, Sb2-Sc: espermátide em alongamento, Sd1-Sd2: espermátide alongada. (retirado de McLachlan, 2007)



### 3.2. Biópsias testiculares

A azoospermia caracteriza-se pela ausência de espermatozoides no ejaculado, confirmada no mínimo em dois espermogramas. Encontram-se três formas correntes de classificação na literatura: (1) azoospermia secretora ou excretora (Pomerol e Arrondo, 1994; Martello e Camargos, 2001); (2) azoospermia pré-testicular, testicular e pós-testicular (Kim e Lipshultz, 1999; Neves, 2002) e (3) azoospermia obstrutiva ou não obstrutiva (Schlegel e Girardi, 1997; Silber, 2000, Glina et al., 2005, Pühse et al., 2011). Esta última é a mais descrita na literatura atual. Consideram-se como indivíduos com azoospermia obstrutiva aqueles homens pós-vasectomia, portadores de agenesia bilateral dos ductos deferentes e também aqueles com obstrução dos ductos ejaculadores. Estes homens apresentam espermatogênese normal e lesão adquirida ou congênita que impede que os espermatozoides produzidos alcancem o ejaculado. Na presença de obstrução a espermatogênese está geralmente preservada (Pühse et al., 2011) e encontram-se espermatozoides com qualidade e quantidade adequadas quando recuperados do epidídimo e do testículo para realização de Fertilização *in vitro* com injeção intracitoplasmática de espermatozoides. Para os homens com azoospermia não obstrutiva têm sido descritos pelo menos três padrões de produção alterada de espermatozoides a partir de biópsias testiculares: (1) agenesia de células germinativas, (2) parada de maturação e (3) hipoespermatogênese (Reis et al, 2010).

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

Segundo o estudo retrospectivo de Abdel Raheem, em 2012, o diagnóstico histopatológico é o que apresenta a melhor correlação com a chance de identificação de espermatozoides na biópsia testicular no grupo de homens azoospérmicos não obstrutivos, com melhora das chances de sucesso no tratamento destes pacientes, por meio da Fertilização *in vitro* (FIV), com injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ISCI), oferecendo-lhes assim a possibilidade de tornarem-se pais biológicos. No entanto, a possibilidade de se isolar estes espermatozoides depende da identificação morfológica precisa dos mesmos no testículo. Mas os métodos rotineiramente empregados há décadas na anatomopatologia, que utilizam fixação em formalina ou Bouin e inclusão em parafina, produzem tecidos com baixa resolução (Chapin et al., 1984, Howroyd et al., 2005).

A literatura é bastante esclarecedora a respeito dos riscos e complicações advindos do processo de biópsia testicular, dentre os quais citam-se a ocorrência de

hematoma, inflamação, fibrose testicular, redução da vascularização das artérias testiculares e a possibilidade de deficiência androgênica.

Estas complicações estimularam a utilização de parâmetros não invasivos da presença de espermatozoides no testículo, o uso da dosagem sérica do hormônio folículo estimulante, testosterona e inibina B foram descritos na literatura.

Mas, até o presente momento o estudo anatomopatológico testicular é o método diagnóstico padrão ouro para avaliar a chance de sucesso do encontro de espermatozoides para realização de FIV com ICSI, em casais cujo diagnóstico de infertilidade, seja a azoospermia não obstrutiva (Abdel Raheem et al., 2012).

Nos dias atuais, nenhum parâmetro clínico e laboratorial, isoladamente, tem o poder de prever com precisão suficiente a chance de recuperação de espermatozoides na biópsia testicular, na avaliação da azoospermia não obstrutiva. Portanto estes testes clínicos e laboratoriais classificados por Carpi (2009), como não invasivos podem excluir um número significativo de homens que poderia realizar a FIV/ICSI. Boitrelle em 2011 propôs a realização de um escore associando os valores do FSH e a Inibina B na tentativa de predizer a chance de recuperação de espermatozoides (Tunc *et al.*, 2006, Carpi et al., 2009, Boitrelle., 2011).

Mesmo com as tentativas de aperfeiçoar a sensibilidade e especificidade dos testes não invasivos, as recomendações atuais no diagnóstico da azoospermia sugerem que ele deve-se basear nos achados histopatológicos, já que os parâmetros clínicos e laboratoriais (endócrinos) não apresentam acurácia suficiente para distinguir entre azoospermia obstrutiva e não obstrutiva (McLachlan, 2007, Carpi, et al. 2009).

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

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

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

Portanto, a avaliação histopatológica realizada por meio de biópsias testiculares é sem dúvida importante para auxiliar no diagnóstico das causas da azoospermia não obstrutiva, diagnosticando o problema e permitindo a ação de

condutas médicas que tornem estes homens pais biológicos. Os métodos rotineiramente utilizados durante décadas, na anatomopatologia, que utilizam fixação em formalina ou Bouin e inclusão em parafina, produzem tecidos que permitem o diagnóstico das alterações testiculares, entretanto, com baixa resolução e definição citológica, quando analisado sob a microscopia de luz.

Com o objetivo de facilitar e padronizar as alterações encontradas nas biópsias testiculares entre 1970 e 1980 observou-se tentativa de padronização do diagnóstico das alterações testiculares com uso de descrições quantitativas da espermatogênese (Skakkebaek e Heller, 1973) e outras semi-quantitativas (Jonhsen, 1970, Silber e Rodriguez-Rigau, 1981), com objetivo de facilitar e padronizar as alterações encontradas nas biópsias testiculares.

O valor diagnóstico da biópsia testicular pode ser diminuído por fatores como, manuseio inadequado dos fragmentos e pela interpretação incorreta por patologistas que não sejam totalmente familiarizados com a histopatologia do trato reprodutivo (Cooperberg, et al., 2005, Van Casteren, 2008). A padronização da fixação, inclusão e coloração das biópsias testiculares são fundamentais (McLachlan, 2007, van Casteren, 2008, Dohle et al., 2012). Para se conseguir um resultado confiável da avaliação histopatológica os cuidados iniciam-se na coleta da biópsia testicular, devendo ser uniformemente fornecidas ao o patologista. A fixação do espécime é importante, pois pode influenciar os padrões de coloração. Desta forma, a abordagem padronizada para a fixação e coloração da amostra é desejável para que haja uniformização dos resultados. O *European Germ Cell Cancer Consensus Group* defende o uso da solução de Stieve ou Bouin para fixação dos tecidos. A utilização da solução de Stieve pode auxiliar na preservação da morfologia, mas impede métodos de coloração intranucleares, se o processo de fixação é prolongado. A solução de Bouin permite boa fixação de tecido para avaliação histológica da espermatogênese, porém na Europa, sua utilização é rara, devido a sua toxicidade e ao tempo de validade ser curto (Latendresse, 2002). A formalina é comumente usada para fixação, mas pode causar artefatos de contração. Este artefato pode ser reduzido pelo uso de formaldeído tamponado neutro. No entanto, caso haja necessidade de se realizar alguma técnica imunoistoquímica, a qualidade dos resultados pode ser comprometida quando o tecido for fixado em solução de Bouin ou Stieve (Kap *et al.*, 2011). Portanto, para uma análise correta das biópsias testiculares, atenção deve ser tomada em uma série de fatores, incluindo a técnica da biópsia, o cuidado na manipulação do tecido biopsiado, a fixação deste tecido e o método de avaliação microscópica.

A avaliação das biópsias testiculares descrita por Holstein e Shcirren (1983) tornou-se um marco importante, uma vez que a inclusão em resina de epoxi, utilizada por eles, permitiu a realização de cortes semifinos, que possibilitaram uma avaliação

quantitativa e semi quantitativa mais precisa e detalhada do epitélio seminífero, células intersticiais e componentes vasculares (McLachlan, 2007). Entretanto por ser um método de processamento para microscopia eletrônica, mais difícil e oneroso, tem sido reservado para o estudo de pacientes com infertilidade masculina por discinesia ciliar primária relacionada ao defeito dos braços de dineína (Chemes et al., 1987).

No início da década de sessenta, o glicol metacrilato (GMA) foi introduzido para inclusão de materiais biológicos em estudos sob a microscopia eletrônica. No entanto, a dureza excessiva desta resina não permitiu seu uso em microscopia de luz. Em 1968, Feder e O'Brien utilizaram uma solução plastificadora, como agente amolecedor, que possibilitou o emprego desta resina para estudos histológicos, histoquímicos, enzimáticos, imunocitoquímicos e radioautográficos, na microscopia de luz.

Estudos prévios desenvolvidos por Amaral et al. (2004), em biópsias de endométrio eqüino, demonstraram que o tipo de fixador utilizado pode preservar diferentemente detalhes morfológicos. Estes autores demonstraram a superioridade da formalina em comparação ao Bouin, como fixador, e do glicol metacrilato em comparação com a parafina.

A inclusão de materiais biológicos em parafina, por usar xilol, (em altas temperaturas) e pela dificuldade de obter cortes de pequena espessura, é um método muito extrativo, grosseiro e demorado que prejudica a definição histológica dos tecidos (Howroyd et al., 2005). A inclusão em glicol metacrilato, 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 e (7) menor distorção e menos artefatos (Chapin et al., 1984, Chiarini-Garcia et al., 2011). De maneira geral, esta resina diminui os artefatos e melhora a resolução dos tecidos, ao microscópio. Ferreira & Chiarini-Garcia (1992) descreveram os efeitos de vários tipos de fixadores (paraformaldeído, Karnovsky modificado, Helly, Bouin, Carnoy e Mota) e de meios de inclusão (GMA e parafina) sobre a preservação histológica do intestino de peixe. As colorações de tecidos incluídos em GMA são as mesmas utilizadas para tecidos incluídos em parafina. Mas, segundo Chiarini-Garcia et al. (2011), existem vantagens nos tecidos incluídos em resina que são as seguintes: (a) os cortes não precisam ser hidratados antes da coloração, isto é, podem ser colocados diretamente no corante; (b) após coloração não é necessário a desidratação em álcool; os tecidos devem ser desidratados ao ar; aliás, deve-se evitar a passagem pelos alcoóis já que costumam enrugam os cortes e (c) para montar a lâmina em Entellan ou bálsamo, é optativa a passagem pelo xilol. Como o GMA é hidrossolúvel e inócuo, não interfere nas propriedades tintoriais dos tecidos. Normalmente, o tempo de coloração é maior já

que a penetração do corante não é tão rápida, quanto em cortes de tecidos incluídos em parafina.

A formalina é o fixador universalmente utilizado nas análises anatomopatológicas e é, entre os fixadores histológicos comumente utilizados, o fixador que apresenta a melhor relação custo-benefício. Todavia, quando há necessidade de uma fixação mais rápida, o líquido de Bouin (que também funciona como mordente) tem sido a escolha, permite o estudo adequado de estruturas mais sensíveis à degradação e que necessitam de uma fixação mais eficiente para o estudo de detalhes celulares, nucleares ou citoplasmáticos, além de uma melhor visualização de fenômenos apoptóticos.

A biópsia testicular para avaliação de infertilidade constitui o exemplo clássico dessa necessidade, inclusive, por que o diagnóstico incidental de neoplasia intratubular de células germinativas pode ser feito. Além disso, essas biópsias estão sujeitas a artefatos de esmagamento e de estiramento, pelo pinçamento do parênquima testicular no momento da biópsia e, portanto, a fixação rápida é importante para uma análise adequada. O líquido de Bouin e outros menos conhecidos em nosso meio, como o fluido de Davidson (ou o fluido de Davidson modificado) (Latendresse et al., 2002), estão entre os mais indicados para tal tarefa. Salienta-se, entretanto, que o líquido de Bouin pode levar a alterações em reações imunohistoquímicas, como expressão anômala ou aberrante de alguns anticorpos ou não reatividade de outros (Howroyd et al., 2005).

### **3.3. Padrões de classificação histopatológicos das biópsias testiculares**

Diversos sistemas de classificação histopatológica do testículo são descritos (Jonhsen, 1970, Levin, 1979, Bergmann et al., 1994, Silber et al., 1997, Abdel Raheem et al., 2012). A classificação de maior aceitação na literatura atual é baseada na descrição de cinco padrões histopatológicos da espermatogênese: (i) ausência de túbulos seminíferos (esclerose tubular), (ii) ausência de células germinativas dentro dos túbulos seminíferos (*Sertoli cell Only Syndrome*), (iii) espermatogênese incompleta, não além do estágio de espermátocitos (Parada de Maturação), (iv) todas as fases do epitélio germinativo preservadas com presença de espermatozoides, mas há um declínio no número de células germinativas (Hipoespermatogênese) e (v) espermatogênese normal.

Na prática, estas diferentes fases de espermatogênese existem, muitas vezes uma ao lado da outra, em uma única biópsia (padrão misto). O achado do padrão misto resultou em uma ampla variação de classificação da espermatogênese por

diferentes patologistas, alterando o valor do diagnóstico e prognóstico da biópsia testicular (Turek et al., 2005).

Um sistema de classificação amplamente citado é a avaliação quantitativa histopatológica chamada de pontuação de Johnsen (1970) (*Johnsen Score*). Resumidamente, realiza-se a avaliação histológica de pelo menos 25 túbulos seminíferos (Turek et al., 2005), e o nível de maturação do epitélio germinativo é classificado entre 1 e 10, de acordo com o tipo de célula germinativa mais avançada do túbulo. Os túbulos classificados são multiplicados pela sua nota e esta é somada. A pontuação total de Johnsen é determinada dividindo a pontuação total pelo número total de túbulos avaliados. Uma grande desvantagem do sistema de pontuação de Johnsen é que a pontuação média dos túbulos pode não refletir o verdadeiro estado da espermatogênese; por exemplo, um túbulo com espermatogênese normal pode ser encontrado em uma biópsia ao lado de túbulos com um padrão de aplasia de células germinativas. Isto resultará em uma média de pontuação que indica uma perturbação grave da espermatogênese. O sistema de pontuação de Johnsen não apresenta uma predição confiável quando o objetivo é o de recuperar espermatozoides na biópsia testicular de homens com azoospermia não obstrutiva. Alguns autores sugerem que esta técnica é mais trabalhosa não sendo recomendada para a prática clínica diária (Dohle et al., 2012).

Diante da necessidade de melhora na capacidade de predizer a presença de espermatozoides em homens com azoospermia não obstrutiva, este sistema de pontuação foi modificado pelo sistema de De Kretser e Holstein (1976). Ao utilizarem cortes semi-finos após inclusão em resina de epóxi, Holstein e Schirren (1983) obtiveram uma análise qualitativa e semi qualitativa mais precisa do epitélio germinativo do interstício testicular e das estruturas conjuntivo vasculares. Outros autores têm enfatizado a importância da associação da classificação histológica com a descrição de focos de espermatogênese como o achado de espermátides alongadas e espermatozoides na biópsia testicular de pacientes com azoospermia não obstrutiva. (Silber et al., 1997, Bergmann et al., 2010).

A classificação da espermatogênese baseada em padrões tem sofrido críticas recorrentes em publicações de autores de referência na área da patologia e andrologia. Estes autores sugerem que este sistema de padrões de espermatogênese deveria ser rejeitado na descrição das biópsias testiculares. Pesce et al. (1985) sugerem que os espécimes de biópsias testiculares deveriam ser descritos seguindo os achados descritos por Clermont (1963). Tal observação tem extrema importância pois nos seis estádios descritos por este autor como normais, encontram-se a ausência de espermátides alongadas em dois estádios que pela classificação em padrões seria descrita como parada de maturação em espermátides redondas

(Estádio III e IV). Estas críticas também foram descritas por Paniagua e Nistal (1999) no artigo de revisão intitulado "Interpretação contemporânea da biópsia testicular". Estes autores sugerem que termos descritos correntemente na literatura como hialinização tubular, testículo com "histologia normal", hipoespermatogênese, parada de maturação, apenas criam confusão na interpretação histopatológica e eles esperavam que, com o tempo, estes termos seriam abandonados. Na opinião destes estudiosos da área da histopatologia testicular, o ideal seria descrever as alterações da espermatogênese baseado em estudos quantitativos do epitélio seminífero, apesar de alguns dos termos anteriormente descritos ainda serem descritos com frequência na literatura atual. A importância desta mudança no modo de interpretar e descrever os achados histopatológicos de biópsias testiculares tem impacto direto na opção de tratamento dos pacientes azoospermicos. Dependendo destes achados, existem opções de tratamentos clínicos que poderiam aumentar a chance de uma futura gravidez ou reduzir a necessidade de tratamentos com auxílio de técnicas complexas de reprodução assistida (ex: ICSI com espermatozoides obtidos apenas por biópsia testicular).

### **3.4. Justificativa**

Diante do exposto, referente ao uso de técnicas de estudo histológicas mais sofisticadas, perguntamos se as avaliações anatomopatológicas de biópsias testiculares humanas poderiam ser melhores diagnosticadas. Para responder a esta questão, propõe-se nesta pesquisa, estudar e comparar, o processo espermatogênico em biópsias de testículo humano fixadas em Bouin e incluídas em parafina com biópsias fixadas em glutaraldeído e incluídas em glicol metacrilato. Acredita-se que esta metodologia possa trazer novas informações no diagnóstico médico da infertilidade masculina, resultados mais fidedignos e seguros permitem a escolha adequada entre as opções de tratamento dos pacientes azoospermicos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo geral**

Avaliar a histologia de biópsias testiculares de homens portadores de azoospermia obstrutiva e não obstrutiva comparando o método convencional de processamento em fixador de Bouin e inclusão em parafina com o método de fixação em glutaraldeído e inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato.

### **4.2. Objetivos específicos**

Comparar, morfológicamente, as alterações histopatológicas das biópsias testiculares incluídas em Bouin/parafina com aquelas incluídas em glutaraldeído/glicol metacrilato.

Avaliar morfológicamente três diferentes escores de diagnóstico histopatológico de biópsias testiculares - (i) de cinco padrões, (ii) Johnsen e (iii) de Bergmann - pelo processamento com fixação em glutaraldeído e inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato.

Correlacionar o diagnóstico histopatológico das biópsias testiculares incluídas em Bouin/parafina com aquelas incluídas em glutaraldeído/glicol metacrilato, em relação aos três diferentes escores utilizados.

Avaliar e comparar a capacidade de se achar espermatozoides nas biópsias testiculares em relação aos processamentos em Bouin/parafina e glutaraldeído/glicol metacrilato.

Correlacionar os parâmetros não invasivos da espermatogênese – tamanho testicular e concentração sérica dos hormônios folículo estimulante e testosterona – com achado de espermatozoides nas biópsias testiculares, em relação aos processamentos utilizados.



## **5. CASUÍSTICA E MÉTODO**

### **5.1. Delineamento experimental**

#### 5.1.1. Modalidades de estudo

- a) Estudo descritivo (histologia testicular em diferentes técnicas de fixação e inclusão)
- b) Estudo transversal (em homens inférteis)
- c) Estudo prospectivo e cego (avaliação independente dos examinadores)

#### 5.1.2. Principais desfechos

- a) Diferenças histológicas encontradas em biópsias testiculares submetidas a diferentes técnicas de fixação e inclusão.
- b) Mudanças dos diagnósticos histopatológicos de biópsias testiculares submetidas a diferentes técnicas de fixação e inclusão.

### **5.2. Considerações Éticas**

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), (Parecer nº ETIC 032/04) (Anexo 1) e pelos colegiados dos cursos de Pós-Graduação: Departamento de Cirurgia e Fisiologia e Farmacologia ICB-UFMG (25/05/04). Os pacientes foram recrutados entre aqueles homens azoospermicos que haviam sido encaminhados para o ambulatório de Andrologia do serviço de Urologia do Hospital das Clinicas da UFMG, com indicação de realizar a biópsia testicular para investigação da causa da azoospermia. Estes pacientes foram informados sobre o objetivo do estudo e aqueles que foram voluntários assinaram um termo de consentimento (Apêndice 1).

### **5.3. Pacientes**

Para o desenvolvimento desta pesquisa coleta-se prospectivamente do ano 2008 a 2012, biopsias de testículos de 21 homens sexualmente maduros, com idade variando de 29 a 50 anos e média de idade de  $36 \pm 6$  anos. Estes pacientes foram agrupados pela etiologia da azoospermia; oito de causa idiopática (37%), três com azoospermia por criptorquidia bilateral (14%), três com azoospermia pós orquite por

caxumba (14%), dois com azoospermia pós quimioterapia ou radioterapia (10%), dois com azoospermia relacionada a varicocele bilateral (10%), dois com azoospermia obstrutiva antes da vasovasostomia (10%) e um com azoospermia pós trauma testicular (5%) (Tabela 1).

Tabela 1. Etiologia da azoospermia dos 21 pacientes submetidos à biópsia testicular e suas respectivas idades.

<b>Pacientes</b>	<b>Etiologia</b>	<b>Idade (anos)</b>
P-1	Idiopática	29
P-2	Idiopática	36
P-3	Idiopática	40
P-4	Vasectomia e Quimioterapia	31
P-5	Idiopática	37
P-6	Orquite por caxumba	36
P-7	Criptorquia bilateral	29
P-8	Orquiepididimite	34
P-9	Vasovasostomia	42
P-10	Idiopática	32
P-11	Criptorquia bilateral	31
P-12	Varicocele bilateral	37
P-13	Idiopática	50
P-14	Trauma testicular	33
P-15	Varicocele bilateral	30
P-16	Orquite por caxumba	40
P-17	Quimioterapia e radioterapia na infância	31
P-18	Idiopática	39
P-19	Idiopática	48
P-20	Vasovasostomia	34
P-21	Orquite por caxumba	44

Com exceção de dois indivíduos (P-7 e P-16), todos os fragmentos de testículos foram obtidos por biópsia testicular bilateral.

Todos os testículos dos pacientes azoospermicos coletados para os estudos morfológicos, depois de incluídos em parafina e com a resina glicol metacrilato foram avaliados pelo doutorando Augusto Barbosa Reis e pelo Médico Patologista Dr. Paulo Guilherme de Oliveira Salles de forma independente e cega entre os dois examinadores. Após o término das avaliações, o Professor Hélio Chiarini-Garcia realizou uma terceira avaliação de todo material, em conjunto com os dois avaliadores e os resultados desta terceira avaliação foram utilizados para a análise estatística e descritiva deste trabalho.

#### **5.4. Biópsia testicular**

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

#### **5.5. Processamento das amostras após coleta do material**

O fragmento retirado durante a biópsia testicular foi recortado em três partes, respeitando a posição dos túbulos seminíferos em cortes transversais. Cada um dos fragmentos foi processado para (i) criopreservação de espermatozoides e inclusões pelos métodos de (ii) Bouin/parafina e (iii) glutaraldeído/glicol metacrilato.

##### **5.5.1. Criopreservação de espermatozoides**

Um dos fragmentos foi imerso em uma placa de Petri com meio de cultivo de *Dullbeco's* e imediatamente foi enviado para o laboratório de Reprodução Humana Professor Aroldo Fernando Camargos, no Hospital das Clínicas da UFMG. Os túbulos seminíferos foram macerados com uso de agulhas estéreis no meio de cultura. Esta alíquota foi examinada em um microscópio Olympus BX 41 com aumento de 400x. Quando foram encontrados espermatozoides foi oferecida a possibilidade de congelamento aos pacientes. Aqueles que concordaram, assinaram o termo de consentimento para criopreservação de gametas e tiveram as alíquotas congeladas no banco de sêmen para uso posterior. (Anexo 2).

### 5.5.2. Fixação em Bouin e inclusão em parafina

Um segundo fragmento foi fixado com solução de Bouin durante 24 horas, em seguida, armazenado em álcool etílico a 70% a 4°C. Posteriormente, foram desidratados em concentração crescentes de etanol, variando de 70% a 99% (30 min cada), depois foram imersos em xilol (2x30 min) e incluídos em parafina. Dos blocos foram obtidos cortes de 3 a 5µm de espessura que foram corados com hematoxilina-eosina ou azul de toluidina-borato de sódio. (Reis et al., 2010, Chiarini-Garcia et al., 2011).

### 5.5.3. Fixação em glutaraldeído e inclusão em glicol metacrilato

O terceiro fragmento foi fixado com glutaraldeído a 5% em tampão fosfato 0,05M pH 7,3, por 24 horas, sendo que o fixador foi renovado após 12 horas de fixação. Estes fragmentos foram mantidos a 4°C. No momento da inclusão, finos fragmentos de 1 a 2 mm de espessura foram recortados da superfície da biópsia. 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 obteve-se cortes histológicos de 3 e 5 µm de espessura que foram corados com azul de toluidina-borato e sódio ou hematoxilina-eosina.

## **5.6. Avaliação dos Escores de cinco padrões, Johnsen e Bergmann em Bouin/parafina e glutaraldeído/glicol-metacrilato**

Foram utilizados três diferentes padrões de avaliação da espermatogênese. Um deles, classicamente, utilizado na anatomia patológica, é o escore de cinco padrões de alterações da espermatogênese, baseado em Levin (1979) e revisto por McLachlan et al. (2007). Os outros dois foram os escores 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. Por último, o escore de Bergmann (Bergmann et al., 1994; revisão em Bergmann e Kliesch, 2010), que avalia as alterações da espermatogênese em relação à presença de espermátides alongadas no parênquima testicular.

Todas as leituras das lâminas ocorreram de maneira independente e cega entre os avaliadores. Todos os cortes fixados e incluídos pela combinação Bouin/parafina e glutaraldeído/glicol metacrilato foram avaliados utilizando os diferentes escores descritos abaixo.

#### 5.6.1. Escore de cinco padrões

A classificação dos cinco padrões, rotineiramente utilizada nos laboratórios de anatomia patológica e pelos andrologistas na avaliação das alterações testiculares, baseou-se na descrição dos padrões:

*Padrão 5 - Espermatogênese normal:* quando encontrou-se o epitélio germinativo completo em toda a área avaliada da biópsia associado ao tecido intertubular normal.

*Padrão 4 - Hipoespermatogênese:* quando todos os estágios da linhagem do epitélio germinativo foram identificados, mas, em alguns túbulos seminíferos ele encontrava-se reduzido em vários graus. Esta classificação incluiu os padrões mistos com túbulos com padrão de parada de maturação, aplasia de células germinativas e fibrose testicular quando estes estavam associados ao encontro de túbulos seminíferos com o epitélio germinativo completo.

*Padrão 3 - Parada de maturação:* este padrão descreve a parada total do epitélio germinativo em algum estágio particular da espermatogênese, sem a formação de espermátides alongadas.

*Padrão 2 - Aplasia de células germinativas:* este termo é usado exclusivamente para descrever o padrão de túbulos seminíferos com ausência completa de qualquer célula germinativa e apenas revestidos por células de Sertoli.

*Padrão 1 - 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).

Todos os cortes dos túbulos seminíferos das biópsias testiculares foram avaliados, inicialmente, com aumento de 200x, para avaliação geral do tecido testicular e, posteriormente, após aumento de 400x, para estudo mais detalhado das células do epitélio germinativo. Estes testículos receberam, então, um escore segundo a classificação descrita anteriormente para os cinco padrões histopatológicos da espermatogênese.

### 5.6.2. Escore de Johnsen

Este padrão de avaliação da espermatogênese avalia com mais detalhes as alterações do epitélio seminífero por determinar com exatidão principalmente onde ocorrem as aplasias ou paradas de maturação das células germinativas. Todas as seções tubulares de um corte foram examinadas sistematicamente e cada uma delas recebe um escore de 1 a 10 de acordo com os critérios abaixo.

*Escore 10* - Espermatogênese completa com muitas espermátides alongadas. Epitélio germinativo organizado com espessura preservada e a luz do túbulo livre.

*Escore 9* - Muitas espermátides alongadas estão presentes, mas, o epitélio germinativo está desorganizado com evidente descamação ou obliteração da luz do túbulo.

*Escore 8* - Apenas algumas espermátides alongadas (menos de cinco) presentes no corte transversal do túbulo seminífero.

*Escore 7* - Ausência de espermátides alongadas e presença de muitas espermátides em alongamento e arredondadas.

*Escore 6* - Ausência de espermátides alongadas e presença de poucas espermátides em alongamento e arredondadas (menos de cinco).

*Escore 5* - Ausência de espermátides e presença de muitos espermatócitos.

*Escore 4* - Presença de poucos espermatócitos (menos de cinco) e ausência de espermátides.

*Escore 3* - Espermatogônias são as únicas células germinativas presentes.

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

*Escore 1* - Ausência de células no corte transversal do túbulo seminífero.

Apenas os cortes transversais de túbulos seminíferos foram contados, em aumento final de 200x, seguindo as recomendações de Johnsen (1970). Os túbulos danificados não foram considerados na contagem enquanto aqueles túbulos completamente hialinizados, sempre eram 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 (ver exemplos nos Apêndices 2, 3 e 4).

### 5.6.3. Escore de Bergmann

A avaliação do critério de Bergman foi feita baseando-se na percentagem de túbulos seminíferos mostrando espermátides alongadas (Sd1 e Sd2; ver Fig. 1). 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 (ver exemplo nos Apêndices 2, 3 e 4).

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

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, ou seja, 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 apresentaram espermátides alongadas utilizou-se subclassificação com escore de 0,9 a 0,1 (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação histopatológica da espermatogênese segundo Bergmann e Kleisch (2011).

%*	Escore	Descrição histopatológica
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

### 5.7. Análises microscópicas e documentação fotográfica

As análises foram realizadas nos microscópios de transiluminação Olympus Bx-40 e para avaliação sob dupla observação num sistema da Olympus montado sob plataforma do microscópio CX-31. As fotomicrografias foram feitas utilizando máquina fotográfica digital Q-Color 3 acoplada a um microscópio Olympus BX-51. As imagens digitais foram transferidas para um computador através do programa Image-Pro Express (Media Cybernetics) e tratadas e montadas em pranchas utilizando-se o programa Adobe Photoshop e Adobe Illustrator, respectivamente.

### 5.8. Avaliação dos parâmetros clínicos não invasivos

Os parâmetros não invasivos avaliados no presente estudo foram (i) o volume testicular médio, (ii) dosagem de testosterona total e (iii) dosagem de hormônio folículo estimulante. A coleta do sangue foi realizada no período da manhã com os pacientes em jejum de 4 horas. Foram coletados 5 mL de sangue por punção venosa utilizando-se o sistema BD Vacutainer® com tubo de plástico para soro. As amostras foram encaminhadas para análise no Laboratório do Hospital das Clínicas da UFMG. Do soro foram determinadas as concentrações de testosterona e de hormônio folículo estimulante, descritas posteriormente.

#### 5.8.1. Avaliação do volume testicular

O volume testicular foi medido com um orquímetro. O equipamento consiste em um conjunto de orifícios elipsóides de tamanhos variados. O examinador compara o testículo a ser examinado com os orifícios e procura aquele que mais se aproxima ao volume encontrado. Os valores considerados padrões para as diferentes faixas etárias estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Padrão de referência do volume testicular em diferentes faixas etárias

<b>Volume testicular</b> (mL)	<b>Faixa etária</b> (anos)
0,5 – 2	0 – 11
2 – 5	12
5 – 10	13
10 – 12	14
15 – 25	16 – adulto

Adaptado de Chipkevitch E, 2001.



### 5.8.2. Dosagem de Testosterona

Foi utilizado o Kit de dosagem da Vitros immunodiagnostic (*Jonhson & Jonhson*) onde o método de dosagem da testosterona total sérica é calculado através de imunoensaio do tipo competitivo, que usa a tecnologia de quimioluminescência. O valor de referência para homens adultos encontra-se descrito na Tabela 4.

Tabela 4: Valores de referência da dosagem sérica de testosterona pelo KiT Vitros immunodiagnostic (*Jonhson & Jonhson*)

<b>Faixa etária de homens saudáveis</b> (anos)	<b>Testosterona total</b> (valores normais em ng/dL)
20 - 49	132 - 813
> 50	71,8 - 623

Adaptado do manual de características de desempenho Vitros Immunodiagnostic.

### 5.8.3. Dosagem do Hormônio Folículo Estimulante (FSH)

A concentração de FSH no soro foi determinada utilizando Kit da Vitros immunodiagnostic (*Jonhson & Jonhson*) que emprega método de imunoensaio imunométrico que usa a tecnologia de luminescência. O valor de referência para homens adultos encontra-se descrito na Tabela 5.

Tabela 5: Valores de referência da dosagem sérica de FSH pelo KiT Vitros immunodiagnostic (*Jonhson & Jonhson*)

<b>Homens</b> (anos)	<b>FSH - Intervalo</b> mUI/ml	<b>Mediana</b>	<b>Limite de detecção</b>
19 - 65	1,55 – 9,74	3,8	0,66 mUI/mL

Adaptado do manual de características de desempenho Vitros Immunodiagnostic

## 5.9. Estatística

As concentrações de FSH e testosterona, volume testicular, os escores de cinco parâmetros, Johnsen e Bergmann foram comparadas por estatística não paramétrica, uma vez que os histogramas mostraram distribuição irregular dos valores, incompatível com a curva normal. Os dados foram descritos como mediana  $\pm$  intervalo interquartil. A comparação entre os grupos foi feita por análise de variância não paramétrica. As diferenças com valor de  $p < 0,05$  foram consideradas significativas.

Utilizou-se também a correlação de *Spearman's (rho)* para analisar os parâmetros clínicos não invasivos; volume testicular, dosagem sérica de Testosterona e FSH em relação à chance de recuperação de espermatozoides na biópsia testicular. Esta mesma correlação foi utilizada para avaliar as notas e médias dos escores estudados, com a chance de recuperação de espermatozoides nas biopsias testiculares.

## 6. RESULTADO

### 6.1. Caracterização da amostra

Segundo a classificação do tipo de azoospermia entre obstrutiva e não obstrutiva e a classificação do tipo histopatológico pelo escore de cinco padrões, os pacientes apresentaram a seguinte distribuição: (i) um (01) indivíduo azoospérmico obstrutivo com o padrão da espermatogênese normal e (ii) vinte (20) indivíduos azoospérmicos não obstrutivos, sendo que destes, oito apresentaram testículos com padrão da espermatogênese de hipoespermatogênese, cinco com parada de maturação, cinco com aplasia de células germinativas e dois com fibrose testicular.

Quando estes indivíduos foram agrupados pelo critério de recuperação de espermatozoides das biópsias testiculares, com congelamento de espermatozoides no momento da biópsia, obteve-se a seguinte distribuição: nove indivíduos sem recuperação de espermatozoides, sendo que destes, o escore mais frequente foi o de agenesia de células germinativas (cinco indivíduos), seguido pela parada de maturação (dois indivíduos) e fibrose testicular (dois indivíduos). Os 12 indivíduos restantes apresentaram recuperação de espermatozoides e entre eles o padrão testicular mais comum foi o de hipoespermatogênese (07 indivíduos), seguido pelos padrões de espermatogênese normal e parada de maturação (dois indivíduos em cada grupo) e um indivíduo com o padrão de aplasia de células germinativas. (Tab. 6).

### 6.2. Avaliação histopatológica comparativa entre os diferentes métodos de inclusão

O método de preparação histológica interferiu diretamente na preservação morfológica das biópsias testiculares. Quando os fragmentos foram fixados com Bouin e incluídos em parafina, foi observada uma desorganização geral do tecido com retração entre os túbulos seminíferos e má definição entre os componentes intersticiais. De forma geral, o tecido tinha aparência granulada com baixa definição entre as diferentes estruturas e tipos celulares (Fig. 2A). No entanto, quando os fragmentos de biópsias foram fixados com glutaraldeído e incluídos em resina plástica

Tabela 6: Volume testicular e concentração sérica de FSH e testosterona dos 21 pacientes em estudo, divididos em sem recuperação e com recuperação de espermatozoides das biópsias testiculares.

Paciente	Volume Testicular (mL)			FSH	Recuperação Testicular		Testosterona
	TD	TE	VT Médio		TD	TE	
P-3	20	20	20,0	9,14	não	não	7865
P-5	25	25	25,0	4,38	não	não	5050
P-6	5	5	5,0	20,30	não	não	7890
P-7	6	6	6,0	17,19	não	não	2550
P-14	10	12	11,0	24,20	não	não	2740
P-15	15	15	15,0	12,38	não	não	4610
P-17	25	20	22,5	42,54	não	não	1340
P-19	na	na	na	na	não	não	na
P-20	10	5	7,5	30,87	não	não	4030
P-1	10	8	9,0	45,94	sim	não	3621
P-2	10	6	8,0	10,14	sim	não	2620
P-4	20	20	20,0	25,80	sim	sim	3670
P-8	20	15	17,5	16,40	sim	sim	2270
P-9	20	20	20,0	na	sim	sim	na
P-10	20	20	20,0	2,57	sim	sim	3910
P-11	10	10	10,0	34,19	sim	sim	7660
P-12	15	15	15,0	3,46	sim	sim	4400
P-13	15	15	15,0	3,71	sim	sim	4020
P-16	10	10	10,0	12,40	sim	não	1240
P-18	25	25	25,0	2,46	sim	sim	4100
P-21	20	10	15,0	17,42	sim	sim	3850

TD, testículo direito; TE, testículo esquerdo; VT Médio, volume testicular médio (mL); FSH, hormônio folículo estimulante (mUI/mL); Testosterona, dosagem sérica da testosterona total em ng/dL. na, não avaliado.

à base de glicol metacrilato, a aparência geral do tecido foi muito diferente. As estruturas se encontravam mais bem organizadas, com pouca retração entre seus componentes teciduais, sem granulação e com os tipos celulares bem definidos (Fig. 2B).

Nos túbulos seminíferos a túnica própria não apresentava distinção morfológica evidente entre seus componentes quando incluída em Bouin/parafina (B/P) (Fig. 2C), ao contrário do observado após preparação em glutaraldeído/glicol metacrilato (G/GMA) (Fig. 2D). Na maioria dos indivíduos estudados, foi observada nesta região a presença de uma camada hialinizada, de espessura variável, entre as células mióides e a lâmina basal do epitélio germinativo. Quando esta camada se apresentava delgada, só era possível de ser visualizada em biópsias incluídas em G/GMA.

As células de Sertoli, tanto o citoplasma quanto o núcleo, foram morfológicamente bem distintas após inclusão em G/GMA (Fig. 2D), o que não foi observado após inclusão em B/P (Fig. 2C). Em B/P, o citoplasma das células de Sertoli se apresentava vacuolado e o núcleo retraído e muito corado, sem definição das dobras do envelope nuclear e, em algumas biópsias, do próprio nucléolo.

As células germinativas em G/GMA apresentavam a cromatina nuclear, que é a estrutura usada para diferenciar estes tipos celulares, muito bem definida possibilitando a diferenciação, com bastante segurança, entre as espermatogônias, entre as diferentes fases da divisão meiótica, de pré-leptóteno a diplóteno e entre as fases da espermiogênese, desde as espermátides arredondadas até aquelas alongadas, próximas ao momento da espermição (Fig. 2F). Ao contrário, em B/P os detalhes morfológicos do núcleo foram mal visualizados, apesar de ser possível, mas com certa dificuldade, a distinção entre os diferentes tipos de células germinativas (Fig. 2E). Uma característica que chamou a atenção foi em relação à retração dos citoplasmas das células germinativas que apresentavam espaço vazio na região perinuclear, sugerindo esvaziamento citoplasmático. As figuras de mitose espermatogoniais, de meiose e de apoptose foram melhores visualizadas no tecido incluído em G/GMA devido a uma melhor definição da morfologia nuclear (Fig. 2G e 2H). Um artefato observado com mais frequência nas biópsias incluídas em B/P foi à retração do epitélio germinativo (Fig. 2A), deixando espaço vazio entre as células de Sertoli/germinativas e a lâmina basal. Foi rara a ocorrência deste artefato em G/GMA.

No espaço intersticial também foi observada maior desorganização das estruturas nas biópsias incluídas em B/P, quando comparadas com aqueles incluídas em G/GMA. As células de Leydig foram mal visualizadas e sua morfologia não se

apresentava bem preservada. Estas alterações dificultavam a identificação de detalhes celulares e, devido ao aspecto granuloso e a grande quantidade de espaços inter e intracelulares, não era bem distinta a separação entre o núcleo e o citoplasma. Não se conseguiu visualizar com definição a presença dos vasos linfáticos; ao contrário, foram vistos espaços vazios no interstício (Fig. 3A).

Por outro lado, as biópsias incluídas em G/GMA possibilitaram a identificação dos vasos linfáticos que apresentavam aspecto homogêneo. Nesta situação, as células de Leydig encontravam-se bem preservadas o que permitiu a visualização, com detalhes, da distinção entre citoplasma e o núcleo (Fig. 3B). Os vasos sanguíneos foram visualizados em ambas as inclusões, mas, foram mais facilmente visualizados e detalhados nas inclusões em G/GMA. A coloração em azul de toluidina facilitou muito a identificação dos mastócitos, independente do processo de inclusão utilizado.

### **6.3. Comparação entre diferentes colorações**

A coloração com hematoxilina e eosina tem sido utilizada como método de coloração de rotina em anatomia patológica, em biópsias fixadas em Bouin e incluídas em parafina. Em estudos com o glicol metacrilato, normalmente o azul de toluidina com borato de sódio, por proporcionar mais contraste entre os componentes teciduais, tem sido a coloração mais empregada. Para avaliação histopatológica, decidiu-se manter no presente trabalho os mesmos métodos que tem sido usado como rotina, isto é, o HE para inclusão em parafina e AT-borato para inclusão em GMA. No entanto, com o objetivo de verificar se a coloração poderia influenciar no diagnóstico, decidiu-se corar os tecidos incluídos em Bouin/parafina com AT-borato e aqueles incluídos em glutaraldeído/GMA com HE.

Quando as biópsias testiculares incluídas em Bouin/parafina foram coradas com AT-borato, não foram observadas diferenças significativas que pudessem alterar o diagnóstico histopatológico, quando comparadas com as mesmas lâminas coradas em HE. Figuras de divisão celular foram mais bem visualizadas quando coradas pelo AT-borato e os mastócitos, por se apresentarem metacromáticos, puderam ser facilmente identificados nesta coloração (Figs. 4A e B).

Nas biópsias incluídas em glutaraldeído/GMA e coradas em HE, também não foram encontradas diferenças significativas que pudessem alterar o diagnóstico histopatológico. O que mais chamou a atenção foi uma melhor identificação dos

componentes intersticiais e do citoplasma das células, o que propicia uma melhor visualização do tecido como um todo.

Detalhes das principais artefatos observados entre os dois métodos de processamento são descritos, de forma semiquantitativa, na Tabela 7 (Figs. 4C e D). Células inflamatórias são facilmente identificadas, principalmente os eosinófilos.

Tabela 7. Comparação entre os artefatos citológicos encontrados nas biópsias testiculares, entre os diferentes métodos de fixação e inclusão.

Método de preparação		
Artefatos	B/P	G/GMA
Contração tubular	++	-
Células de Leydig		
Agregação de cromatina	++	-
Retração citoplasmática	+++	-
Células Germinativas		
Agregação de cromatina	++	+
Retração citoplasmática	+++	-
Granulações citoplasmáticas	++	+
Identificação do acrossoma	+	++
Células de Sertoli		
Agregação de cromatina	++	-
Retração citoplasmática	+++	-

- ausente ou mínimo, + leve, ++ moderado, +++ intenso.

#### **6.4. Descrição morfológica das biópsias testiculares em cinco e 10 escores, pelos dois métodos de processamento histológico**

As 40 biópsias testiculares (21 indivíduos) utilizadas no presente estudo foram avaliadas histopatologicamente por três escores. Dois deles, dividem morfológicamente as alterações da espermatogênese em 5 (Levin, 1979) e em 10 (Johnsen, 1970) categorias. Estes métodos foram originalmente descritos em biópsias testiculares incluídas em parafina. O terceiro método (Bergmann e Kliesch, 1998), utiliza informações do escore de Johnsen para determinar a presença de espermátides alongadas nas biópsias testiculares. No presente estudo avaliou-se morfológicamente

os diferentes padrões de alterações patológicas da espermatogênese, em cinco e 10 escores, e documentou-se em fotomicrografias de forma comparativa entre os dois diferentes métodos de inclusão (Figs. 5 a 7).

#### **6.5. Análises comparativas dos diferentes escores em relação aos métodos de inclusão**

Apesar dos dois métodos de inclusão serem suficientes para classificar as azoospermias, o método de inclusão em G/GMA, por oferecer melhor resolução dos detalhes citológicos do epitélio seminífero, foi suficiente para provocar alterações no diagnóstico da azoospermia, quando comparado ao método de inclusão tradicional em parafina, nos três escores avaliados (Tab. 8).

As comparações entre o padrão histológico do escore 5 nas duas técnicas utilizadas, B/P e G/GMA, estão descritas na Tabela 8. Constatou-se mudança de diagnóstico em quatro dos casos (21%), dos dezenove avaliados, e em todos eles ocorreu aumento do valor do escore na biopsia testicular. Em dois dos casos, depois do diagnóstico ter sido dado como fibrose testicular quando o tecido foi incluído em B/P, houve mudança para parada de maturação quando incluído em G/GMA (Figs. 5 e 8 e Tab. 8). Os padrões que não se modificaram foram de espermatogênese preservada (padrão 5) e o de aplasia de células germinativas (*Sertoli cell Only*) (padrão 2).



Tabela 8: Comparações entre os resultados obtidos das avaliações dos três escores histopatológicos empregados, para cada um dos 21 indivíduos em estudo, em relação às duas técnicas de processamentos empregadas.

Biópsia	5 escores		Johnsen		Bergman	
	B/P	G/GMA	B/P	G/GMA	B/P	G/GMA
1	3	3,5	4,87	5,03	0	0,14
2	2	2	2	2	0	0
3	2	2	2	2	0	0
4	4	5	6,59	9,48	0,13	1
5	3	3	6,04	5,85	0	0
6	1	3	1,10	1,74	0	0
7	3	3	2,2	2,38	0	0
8	4	4	4,77	2,41	0,11	0,12
9	5	5	9,34	9,07	0,90	0,89
10	4	4	8,21	9,01	0,84	0,9
11	3	3	4,07	3,41	0	0,01
12	nc	4	nc	9,07	nc	1
13	4	4	8,8	6,73	0,88	0,66
14	1	3	1,51	2,05	0	0
15	2	2	1,94	1,95	0	0
16	4	4	4,25	8,25	0,25	0,75
17	2	2	1,87	2	0	0
18	4	4	9,79	8,54	0,97	0,83
19	2	2	2,02	2,16	0	0
20	3	3	2,83	3,99	0	0
21	nc	3,5	nc	7,79	nc	0,78

Tarjas amarelas demonstram aumento da nota do escore quando o material fixado em Bouin e incluído parafina foi comparado à aquele fixado com glutaraldeído e incluído em glicol metacrilato. A tarja verde demonstra diminuição da nota do escore. nc, biópsia não coletada.

**Figura 2.** Fotomicrografias comparando morfológicamente as estruturas de testículo humano, obtidas de biópsias testiculares processadas por dois diferentes métodos de fixação e inclusão: Bouin/parafina (B/P) com coloração em HE e glutaraldeído/glicol metacrilato (G/GMA) com coloração em azul de toluidina-borato (AT-borato).

**2A.** Note a desorganização geral do tecido com retração entre os túbulos seminíferos (Ts) e má definição entre os componentes intersticiais. Tecido com aparência granulada e baixa definição entre as diferentes estruturas e tipos celulares, além de retração do epitélio germinativo. Processamento B/P e coloração HE. L, células de Leydig. Barra: 80 µm

**2B.** Observe estruturas citológicas bem organizadas, pouca retração entre seus componentes teciduais, sem granulação e tipos celulares do epitélio germinativo e espaço intertubular bem definido. Ts, túbulo seminífero; Vs, vaso sanguíneo. Processamento G/GMA e coloração em AT-borato. Barra: 80 µm

**2C.** Observe que a túnica própria (TP) do túbulo seminífero (Ts) não apresenta distinção morfológica evidente entre seus componentes, que o citoplasma e o núcleo das células de Sertoli (S) não são distintos e que é nítida a retração (R) do citoplasma das células do epitélio germinativo. Processamento B/P e coloração HE. Barra: 28 µm

**2D.** Veja neste processamento presença de uma camada hialinizada (setas alinhadas), de espessura variável, entre as células mióides e a lâmina basal do epitélio germinativo, bem como boa distinção morfológica entre o núcleo e o citoplasma das células de Sertoli (S). Vs, vaso sanguíneo; Mc, mastócitos. Processamento G/GMA e coloração em AT-borato. Barra: 28 µm

**2E.** Observe que apesar de ser possível a distinção dos diferentes tipos de células germinativas, a granulação tecidual e a presença de retração celular (R) tornam sua identificação mais difícil. Ts, túbulo seminífero; S, célula de Sertoli. Barra: 28 µm. Processamento B/P e coloração HE.

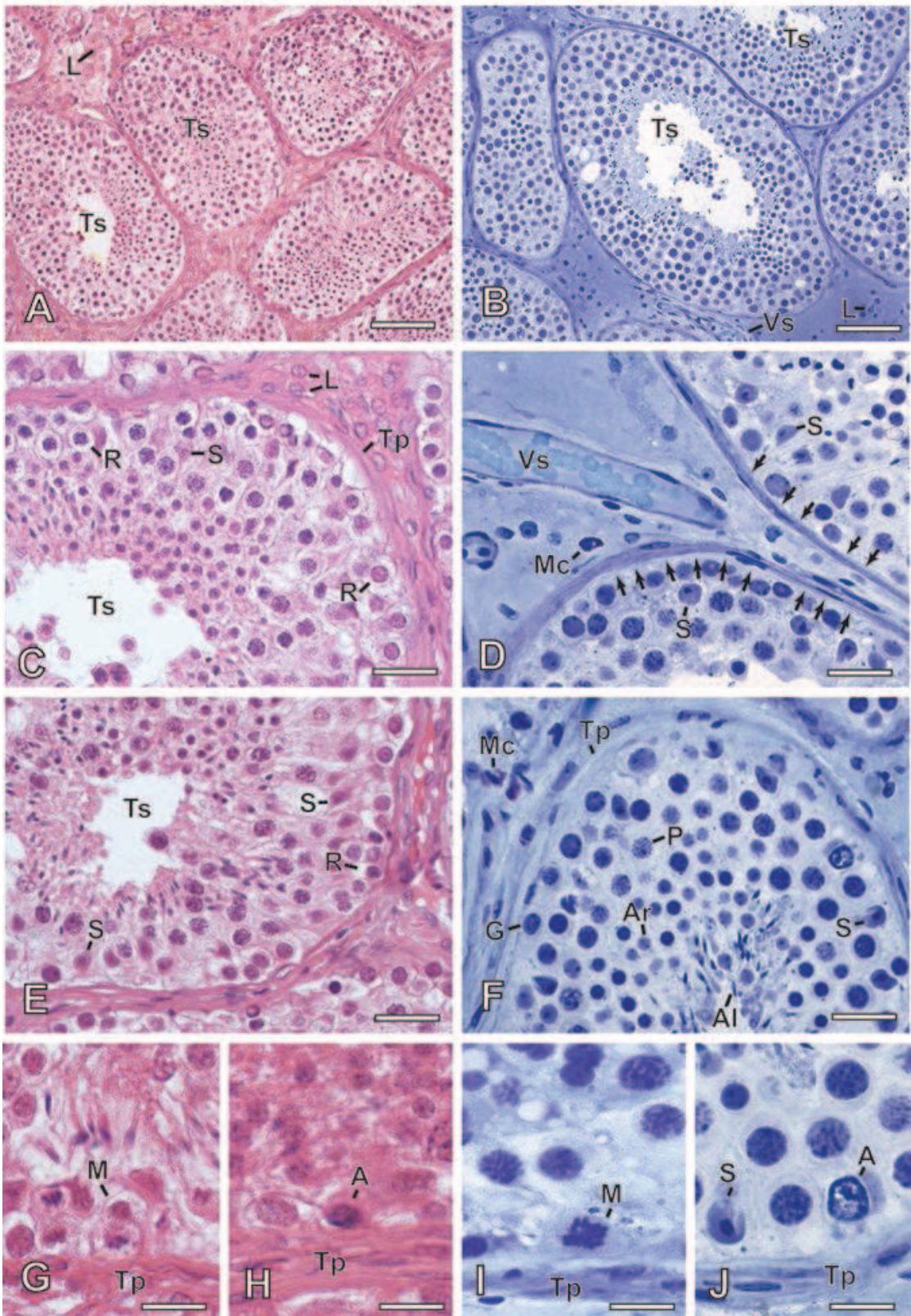
**2F.** Note que as células germinativas, em G/GMA apresentam a cromatina nuclear, muito bem definida possibilitando a diferenciação, entre as espermatogônias, entre as diferentes fases da divisão meiótica, de pré-leptóteno a diplóteno, e entre as fases da espermiogênese, desde as espermátides arredondadas (Ar) até aquelas alongadas (Al). TP, túnica própria; MC, mastócito; G, espermatogônia; P, espermatócito primário em paquíteno. Barra: 28 µm

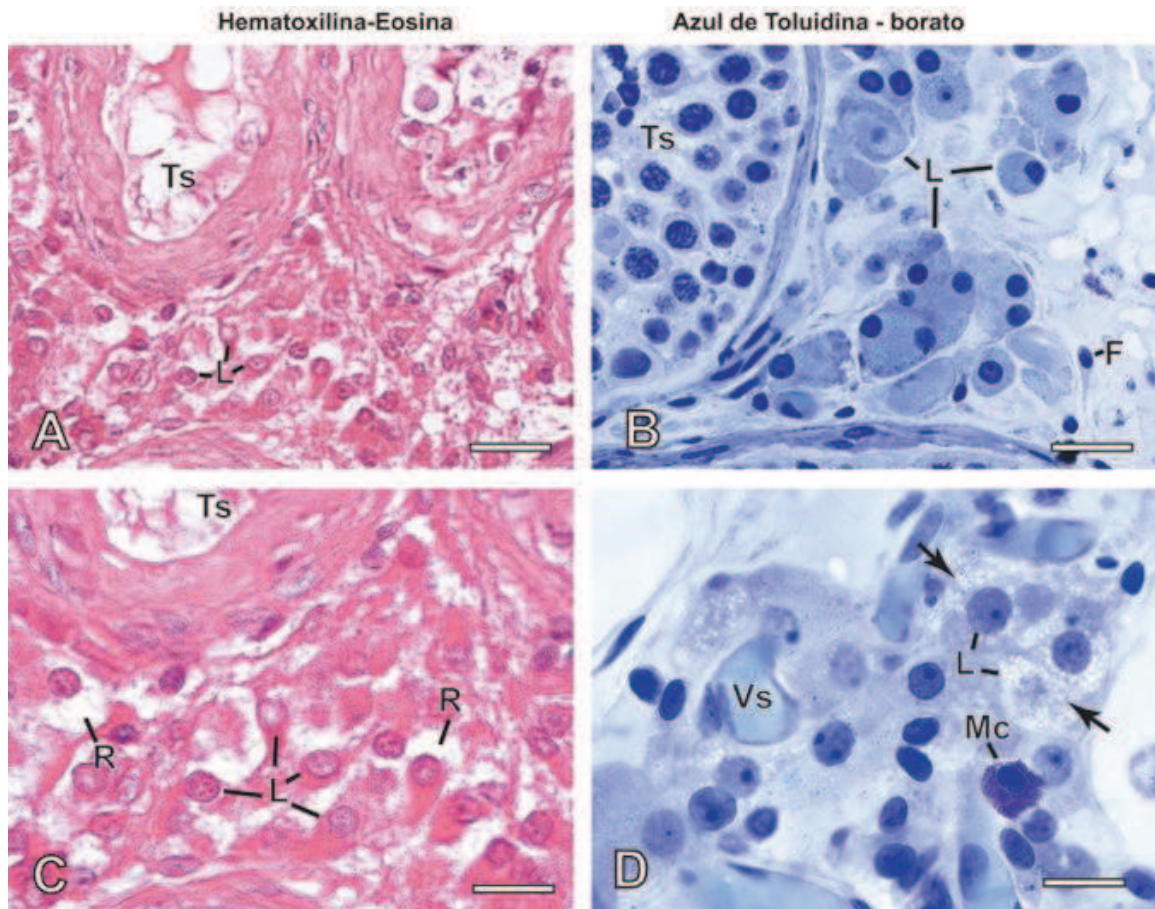
**2G-H.** Note que em tecido processado por B/P e colorado com HE, as figuras de mitose espermatogonial (2G) e de apoptose (2H), visualizadas próximo à membrana basal, são de difícil identificação. M, meiose; A, apoptose; TP; túnica própria. Barra: 16 µm

**2I-J.** Observe que em tecido processado por G/GMA e corado com AT-borato, as figuras de mitose espermatogonial (2I) e de apoptose (2J) são mais facilmente identificadas morfológicamente. S, célula de Sertoli; M, mitose; A, apoptose; TP, túnica própria. Barra: 16 µm

Hematoxilina-Eosina

Azul de Toluidina - borato





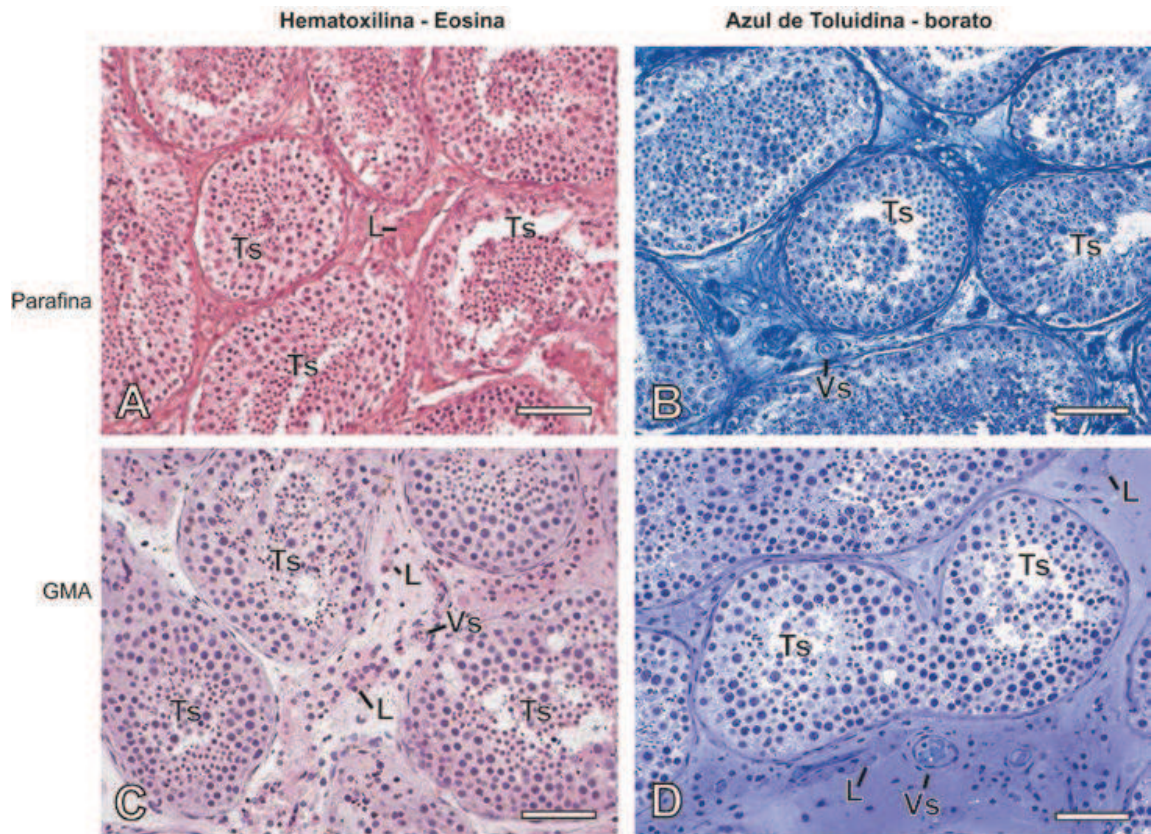
**Figure 3.** Fotomicrografias comparando morfologicamente as estruturas do espaço intersticial do testículo humano, obtidas de biópsias testiculares processadas por dois diferentes métodos de fixação e inclusão: Bouin/parafina (B/P) com coloração em HE e glutaraldeído/glicol metacrilato (G/GMA) com coloração em azul de toluidina-borato.

**3A.** Repare a desorganização das estruturas presentes no espaço intersticial no material incluído em B/P e corado com HE. Ts, túbulo seminífero; L, célula de Leydig. Barra: 28  $\mu$ m.

**3B.** Note como é mais evidente a melhor preservação das estruturas celulares no interstício testicular de biópsias processadas por G/GMA, facilitando a identificação das células de Leydig (L), fibroblastos (F) e mastócitos (Mc). Ts, túbulo seminífero. Barra: 28  $\mu$ m.

**3C.** Observe aspecto granuloso do espaço intersticial e nítida retração (R) do tecido intersticial e do citoplasma e núcleo das células de Leydig (L), dificultando a identificação de detalhes celulares, quando o material foi incluído em B/P. Ts, túbulo seminífero. Barra: 16  $\mu$ m.

**3D.** Veja interstício testicular com fácil identificação dos vasos sanguíneos, das células de Leydig (L), bem preservadas e com a visualização de gotículas lipídicas intracitoplasmáticas (setas), quando o material foi processado em G/GMA.



**Figura 4.** Fotomicrografias comparando o efeito de dois tipos de colorações histológicas (hematoxilina e eosina e azul de toluidina-borato) sobre a histologia de biópsias testiculares quando estas foram processadas em Bouin/parafina (B/P) e em glutaraldeído/glicol metacrilato (G/GMA).

**4A-B.** Observe que as biópsias testiculares incluídas em B/P, quando coradas em HE (4A) e AT-Borato (4B) apresentam aspecto morfológico semelhante, má preservação citológica e retração tecidual, tanto nos túbulos seminíferos quanto no interstício. Ts, túbulo seminífero; L, células de Leydig; Vs, vaso sanguíneo. Barra: 40  $\mu$ m.

**4C-D.** Note que a histologia testicular foi bem preservada, em relação a todos seus componentes, quando processada por G/GMA em ambas as colorações testadas, HE (4C) e AT-borato (4D). L, células de Leydig (L); Ts, túbulo seminífero; Vs, vaso sanguíneo. Barra: 40  $\mu$ m.

**Figura 5.** Fotomicrografias indicando as principais características histopatológicas para classificação das biópsias testiculares segundo o escore de Cinco Padrões (escore de 1 a 5), nos dois processamentos utilizados, B/P e G/GMA. As setas indicam as mudanças de diagnóstico depois de avaliadas em G/GMA. Número dentro dos círculos mostram quantas alterações foram detectadas entre as mudanças de escores indicadas. Barra: 40 µm

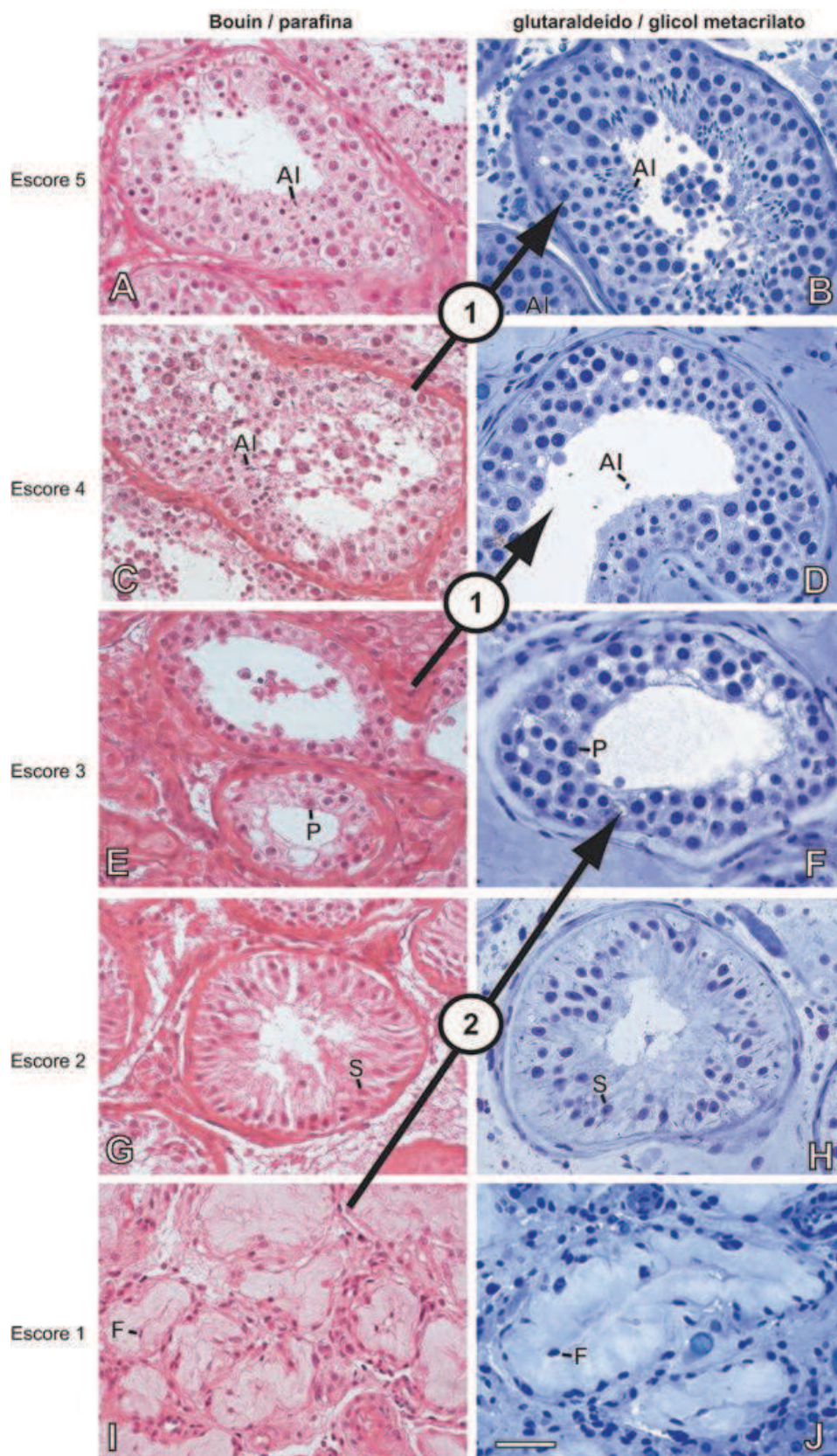
**5A-B.** *Escore 5* - Espermatogênese normal: esta classificação somente foi utilizada quando encontramos o epitélio germinativo completo em toda a área avaliada da biópsia associado ao tecido intertubular normal. 5A, processamento B/P e coloração HE e 5B. AI, espermátide alongada. Processamento G/GMA e coloração AT-borato.

**5C-D.** *Escore 4* - Hipoespermatogênese: quando todos os estágios da linhagem do epitélio germinativo foram identificados, mas, em alguns túbulos seminíferos ela encontra-se reduzida 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. 5C. AI, espermátide alongada. Processamento B/P e coloração HE e 5D, processamento G/GMA e coloração AT-borato.

**5E-F.** *Escore 3* - Parada de maturação: este padrão descreve a parada total do epitélio germinativo em algum estágio particular da espermatogênese, sem a formação de espermátide alongada. Processamento B/P e coloração HE. 5E, processamento B/P e coloração HE e 5F. AI, espermátide primária em paquíteno. Processamento G/GMA e coloração AT-borato.

**5G-H.** *Escore 2* - 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 revestido por células de Sertoli (S). 5A, processamento B/P e coloração HE e 5B, processamento G/GMA e coloração AT-borato.

**5I-J.** *Escore 1* - 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). 5I, processamento B/P e coloração HE e 5J, processamento G/GMA e coloração AT-borato. F, fibroblasto.



**Figura 6.** Fotomicrografias indicando as principais características histopatológicas para classificação das biópsias testiculares, segundo os escores de 10 a 6 de Johnsen, nos dois processamentos utilizados, B/P e G/GMA. Barra: 40 µm

**6A-B.** *Escore 10* - Espermatogênese completa com muitas espermátides alongadas, epitélio germinativo organizado com espessura preservada e a luz do túbulo livre. 6A, processamento B/P e coloração HE e 6B, processamento G/GMA e coloração AT-borato. Al, espermátide alongada.

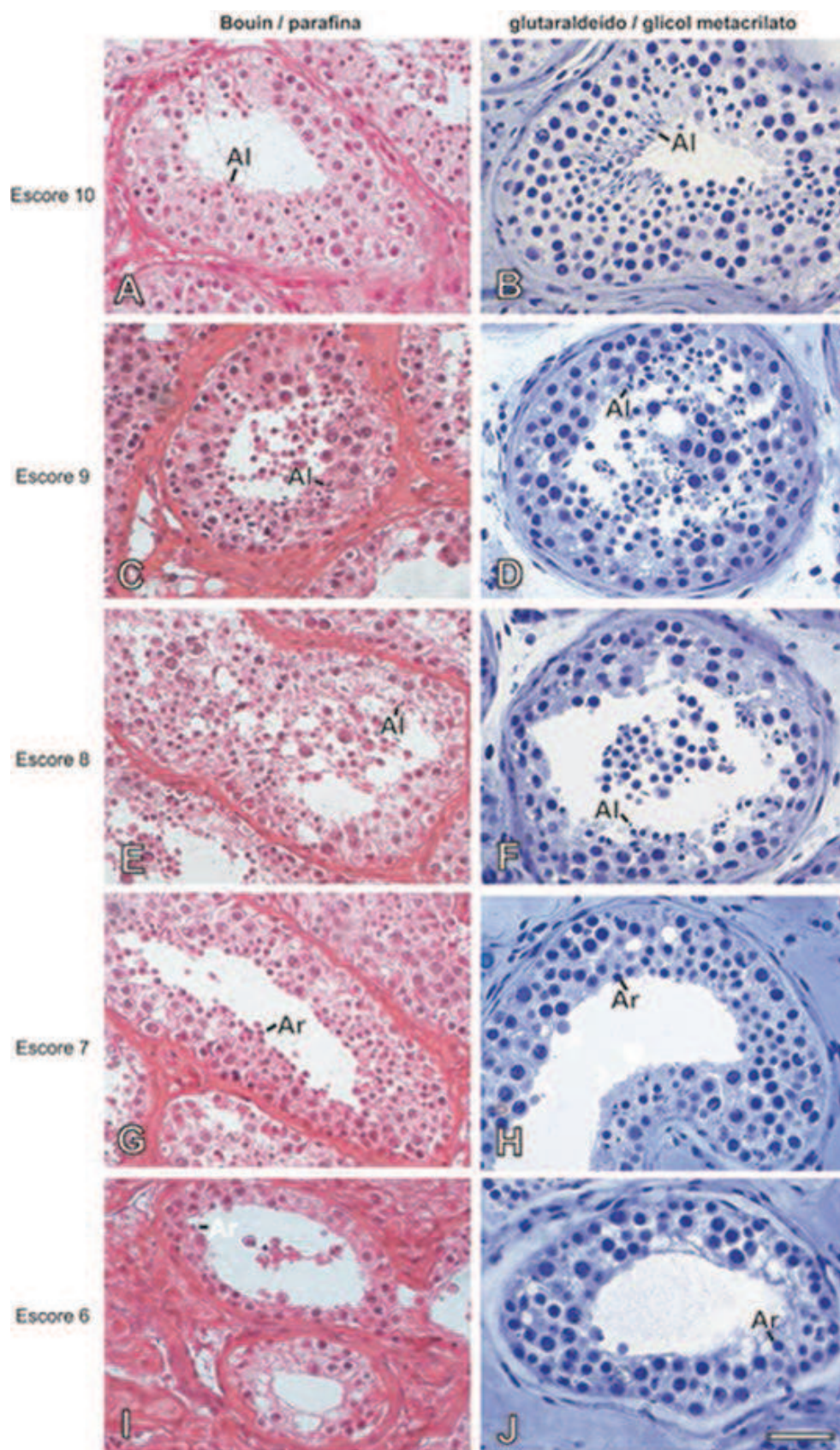
**6C-D.** *Escore 9* - Muitas espermátides alongadas estão presentes, mas, o epitélio germinativo está desorganizado com evidente descamação ou obliteração da luz do túbulo seminífero. 6C, processamento B/P e coloração HE e 6D, processamento G/GMA e coloração AT-borato. Al, espermátide alongada.

**6E-F.** *Escore 8* - Apenas algumas espermátides alongadas (menos de cinco) presentes nos cortes transversais dos túbulos seminíferos. 6E, processamento B/P e coloração HE e 6F, processamento G/GMA e coloração AT-borato. Al, espermátide alongada.

**6G-H.** *Escore 7* - Ausência de espermátides alongadas e presença de muitas espermátides em alongamento e arredondadas. 6G, processamento B/P e coloração HE e 6H, processamento G/GMA e coloração AT-borato. Ar, espermátide arredondada.

**6I-J.** *Escore 6* - Ausência de espermátides alongadas e presença de poucas espermátides em alongamento e arredondadas (menos de cinco). 6I, processamento B/P e coloração HE e 6J, processamento G/GMA e coloração AT-borato. Ar, espermátide arredondada.





**Figura 7:** Fotomicrografias indicando as principais características histopatológicas para classificação das biópsias testiculares, segundo os escores de 5 a 1 de Johnsen, nos dois processamentos utilizados, B/P e G/GMA. Barra: 40 µm

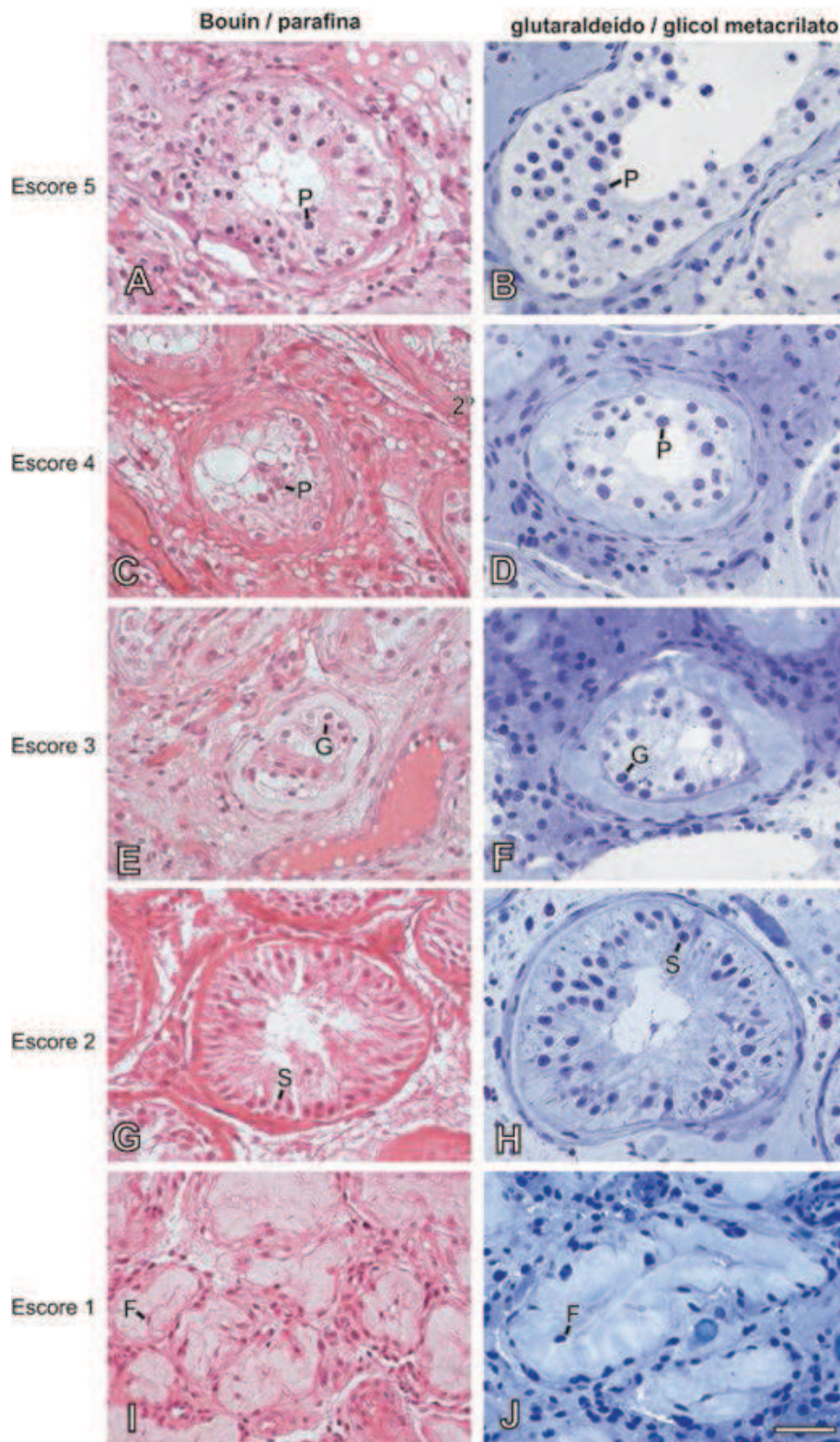
**7A-B.** *Escore 5* - Ausência espermatídes e presença de muitos espermatócitos. 7A, processamento B/P e coloração HE e 7B, processamento G/GMA e coloração AT-borato. P, espermatócito primário em paquíteno.

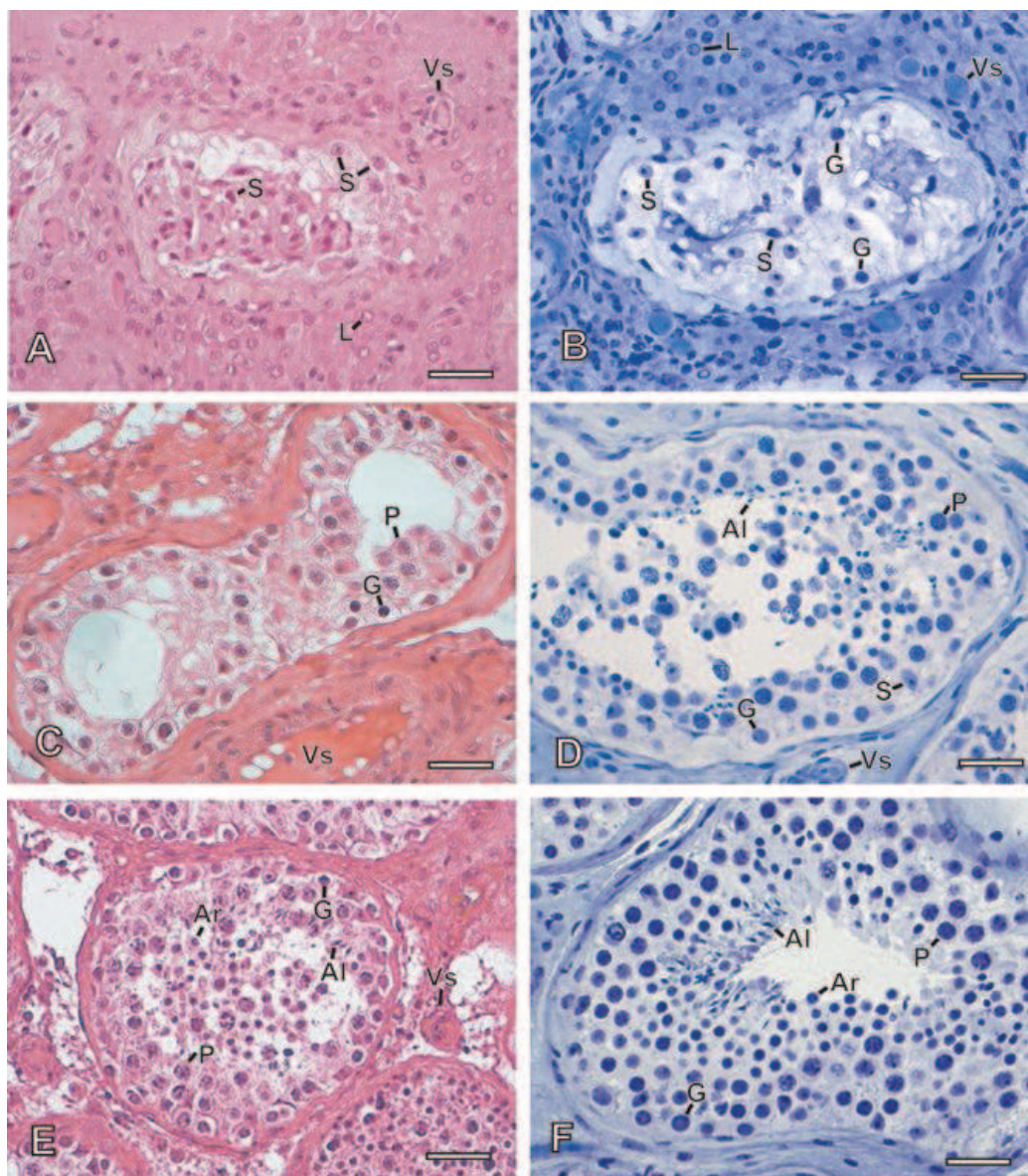
**7C-D.** *Escore 4* - Presença de poucos espermatócitos (menos de cinco) e ausência de espermatídes. 7C, processamento B/P e coloração HE e 7D, processamento G/GMA e coloração AT-borato. P, espermatócito primário em paquíteno.

**7E-F.** *Escore 3* - Espermatogônias são as únicas células germinativas presentes. 7E, processamento B/P e coloração HE e 7F, processamento G/GMA e coloração AT-borato. G, espermatogônias.

**7G-H.** *Escore 2* - Ausência de células germinativas e presença de apenas células de Sertoli (S). 7G, processamento B/P e coloração HE e 7H, processamento G/GMA e coloração AT-borato.

**7I-J.** *Escore 1* - Ausência de células no corte transversal do túbulo seminífero. 7I, processamento B/P e coloração HE e 7J, processamento G/GMA e coloração AT-borato. F, fibroblasto.





**Figura 8.** Fotomicrografias com exemplos de alterações de resultados histopatológicos após avaliação pelo processamento G/GMA, que resultaram em mudança de diagnóstico clínico.

**8A-B.** No indivíduo P6, observe em 8A o padrão histopatológico de aplasia de células germinativas após diagnóstico pelo processamento B/P e em 8B, pela técnica G/GMA, foi diagnosticado como parada de maturação em espermatogônias (G). S. células de Sertoli; L, células de Leydig; Vs, vaso sanguíneo. Barra: 40  $\mu$ m.

**8C-D.** No indivíduo P1, houve mudança do diagnóstico de parada de maturação quando processado em B/P (8C) para hipoespermatogênese quando processado em G/GMA (8D). G, espermatogônia; P, espermatócito primário em paquíteno; S, célula de Sertoli; Al, espermátide alongada; Vs, vaso sanguíneo. Barra: 40  $\mu$ m.

**8E-F.** O indivíduo P4, que foi diagnosticado com hipoespermatogênese, na técnica de B/P (8E), teve seu diagnóstico alterado para espermatogênese normal quando analisado pelo processamento com G/GMA (8F). G, espermatogônia; P, espermatócito primário em paquíteno; Ar, espermátide arredondada; Al, espermátide alongada; Vs, vaso sanguíneo. Barra: 40  $\mu$ m.

### 6.5.1. Correlações em relação ao método de Cinco Escores

Para facilitar a visualização de mudanças de diagnóstico ao se comparar as duas técnicas no escore de 5 padrões, optou-se por utilizar uma linha de referência no gráfico de correlações que corresponde ao padrão 3 (parada de maturação). A escolha deste ponto de referência foi baseada na descrição da literatura atual que os escores de 4 e 5 estão relacionados com chances aumentadas de recuperação de espermatozoides, enquanto que os escores abaixo de 3 estão relacionados a chances muito baixas de encontro de espermatozoides. Após distribuição dos indivíduos no gráfico, observou-se que não ocorreu mudança significativa na distribuição dos padrões testiculares (Fig. 9). Na análise estatística deste grupo, realizada com 19 indivíduos, evidenciou-se uma forte correlação entre os dois métodos estudados, com um índice de correlação de 0,83 e um  $p$  de 0,00001 (IC 95%).

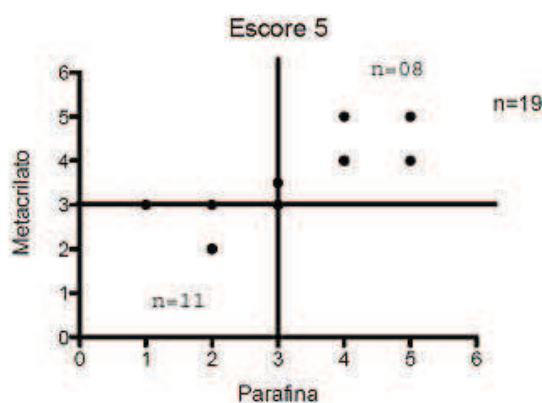


Figura 9. Concordância entre os padrões histológicos testiculares e as técnicas de fixação e inclusão B/P e G/GMA avaliados pelo escore de cinco padrões, tendo como linhas de referência o ponto de corte 3 (padrão parada de maturação).

### 6.5.2. Johnsen

Quando avaliadas as mudanças ocorridas na classificação dos padrões de espermatogênese com o critério de Johnsen (critério de 10 padrões), nas duas técnicas de fixação e inclusão utilizadas, identificou-se mudança de padrão em seis indivíduos. Deve-se ressaltar que neste critério a nota reflete uma média dos vários padrões descritos, portanto médias semelhantes podem trazer padrões de espermatogênese bem variados (Apêndices 2, 3 e 4). Ocorreu um aumento na média dos padrões quando o material incluído em B/P foi avaliado em G/GMA em quatro

indivíduos e uma queda da nota média de escore em três indivíduos. Estas alterações não foram coincidentes com aquelas descritas com o escore de 5 padrões (Tabela 8).

Utilizou-se a nota média de 5 como ponto de referência para se identificar as mudanças de diagnóstico ocorridas entre os dois métodos de inclusão avaliados. A escolha deste padrão seguiu o mesmo raciocínio utilizado para o critério anterior, com a escolha da parada de maturação com o ponto de referência. Ao analisar a Figura 10, identifica-se a presença de um indivíduo no quadrante superior esquerdo, indicando que ocorreu uma melhora do seu escore médio na avaliação com G/GMA. Este ponto corresponde ao paciente P-16 que teve seu escore médio de 4,25 na avaliação com B/P modificado para o escore médio de 8,25 no material fixado e incluído em G/GMA. Este achado confirma a melhora da nota média do seu escore, quando avaliado em G/GMA. Apesar desta diferença encontrada, há uma alta correlação (0,91 e  $p < 0,001$ ) entre os dois métodos de processamentos avaliados.

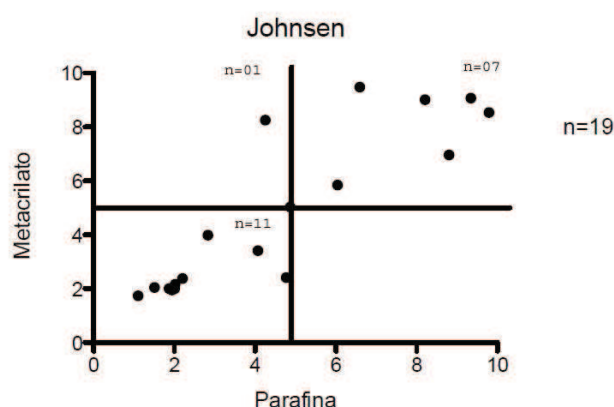


Figura 10. Concordância entre os padrões histológicos testiculares e as técnicas de fixação e inclusão Bouin/parafina e glutaraldeído/glicol metacrilato avaliados pelo escore de Johnsen, tendo como linhas de referência o ponto de corte 5 (ausência de espermátides e presença de muitos espermatócitos).

### 6.5.3. Bergmann

O escore de Bergmann é muito valorizado na prática clínica quando o objetivo é o encontro de espermatozoides em testículos de homens azoospérmicos para uso na FIV com ICSI. Na avaliação entre as duas técnicas de fixação e inclusão estudadas foram identificadas a mudança da nota de escore em cinco indivíduos, com um aumento da nota quando o material foi avaliado em G/GMA. Ressalta-se que em três dos cinco indivíduos a nota era zero quando a avaliação foi feita em tecido incluído em B/P.

Usando uma linha de referência para comparação da mudança dos escores com as técnicas avaliadas optou-se pelo ponto 0,5 que corresponde a nota 5 de Bergmann (Figura 11). Esta nota encontra-se dentro do padrão de túbulos seminíferos com espermatogênese e áreas de atrofia. Este padrão apresenta um amplo intervalo que varia de 1 a 7. Valores abaixo do elegido apresentam baixas taxas de sucesso de recuperação de espermatozoides enquanto que valores acima dele apresentam chances aumentadas de recuperação de espermatozoides. No campo superior esquerdo do gráfico encontram-se dois pontos que correspondem aos indivíduos P-4 e P-16, evidenciando a melhora da nota destes dois homens quando foi utilizada a fixação em glutaraldeído e a inclusão em glicol metacrilato. Na avaliação estatística visando à correlação das técnicas empregadas neste estudo encontrou-se uma correlação alta entre o B/P e o G/GMA com índice de correlação de 0,84 e o  $p$  de 0,001.

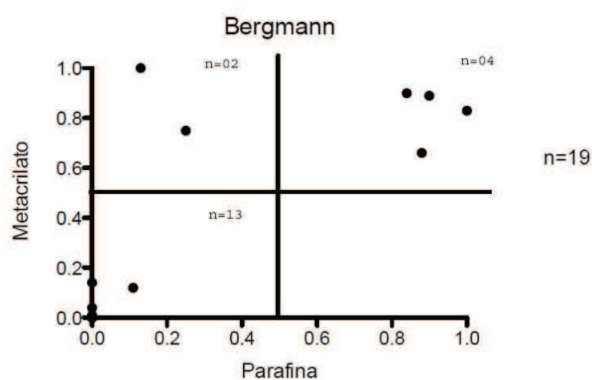


Figura 11. Concorrência entre os padrões histológicos testiculares e as técnicas de fixação e inclusão Bouin /parafina e glutaraldeído/glicol metacrilato avaliados pelo escore de Bergman, tendo como linhas de referência o ponto de corte 0,5 (corresponde a nota 5 de Bergman, esta nota encontra-se dentro do padrão de túbulos seminíferos com espermatogênese e áreas de atrofia).

#### **6.6. Correlação dos dados clínicos e achados histopatológicos com a recuperação de espermatozoides na biópsia testicular para congelamento.**

Analisou-se a relação entre os indivíduos em que foi possível recuperar espermatozóides das biópsias testiculares, ou não, com os parâmetros não invasivos (volume testicular, dosagem sérica de FSH e testosterona total) e com os diferentes escores (Cinco padrões, Johnsen e Bergmann). Para facilitar esta análise, distribuíram-se os indivíduos em dois grupos: (Tabela 6)

Grupo 1: indivíduos com recuperação de espermatozoides na biópsia testicular (11 indivíduos). (cor branca na tabela 6)

Grupo 2: indivíduos sem recuperação de espermatozoides na biópsia testicular (9 indivíduos). (cor roxa na tabela 6)

Devido à distribuição não paramétrica dos fatores diagnósticos não invasivos e invasivos, distribuíram-se os valores em intervalos inter-quartil e calcularam-se as medianas de todos os parâmetros citados anteriormente para a análise estatística.

Os pacientes do Grupo 1 não diferiram significativamente do Grupo 2 em termos da concentração sérica de FSH, testosterona total sérica e volume testicular. (FSH: mediana de 16,4 mUI/mL (min:2,46 e Max: 45,9), Testosterona, mediana de 391 ng/mL (min:124 e max: 789), Volume testicular médio, mediana de 15 mL (min:5 e max: 25).

#### 6.6.1. Volume testicular

Ao compararmos os volumes testiculares dos indivíduos dos Grupos 1 e 2, observou-se uma variabilidade aumentada na distribuição dos volumes testiculares do Grupo 2, mas, não encontram-se diferença significativa entre as medianas dos dois grupos avaliados, conforme demonstrado na Figura 11. A mediana calculada do volume testicular dos dois grupos foi de 15 mL (Min:5 e Max:25).

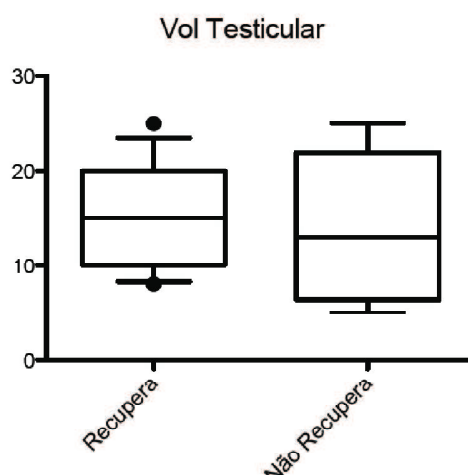


Figura 12. Distribuição dos valores do volume testicular (mL) nos Grupos 1 (recuperação de espermatozoides) e 2 (sem recuperação de espermatozoides).



### 6.6.2. FSH

Apesar das dosagens de FSH apresentarem uma alta amplitude de variação nos dois grupos: Grupo 1 variando do valor mínimo de 2,46 mUI/mL ao valor máximo de 45,9 mUI/mL e no Grupo 2 variando do valor mínimo de 4,3 mui/ml ao valor máximo de 42,5mUI/mL, realizou-se a análise estatística descritiva em 19 indivíduos dos Grupos 1 e 2. No grupo 1 o FSH médio foi de 15,8 mui/mL (Min: 2,46 e Max: 45,9). No Grupo 2 o FSH médio foi de 20,1 mui/mL (Min: 4,3 e Max: 42,5), não se encontrou diferença entre os valores das medianas de FSH nos Grupos 1 e 2. (Figura 12).

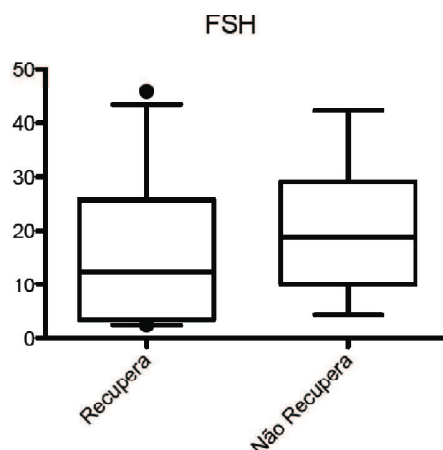


Figura 13. Distribuição dos valores de FSH nos Grupos 1 (recuperação de espermatozoides) e 2 (sem recuperação de espermatozoides).

Realizou-se então o teste exato de Fisher utilizando como ponto de corte o valor sugerido na literatura para normalidade do FSH de 7,0 mui/ml para homens com azoopermia obstrutiva, na tentativa de avaliar se haveria diferença na distribuição dos valores de FSH nos Grupos 1 e 2. Após a distribuição dos grupos encontrou-se sete de 14 indivíduos (50%) com FSH maior que 7mui/mL no Grupo 2 e tiveram quatro de cinco indivíduos (90%) com FSH menor que 7 mui/mL no Grupo 1. Após a análise com teste exato de Fisher o  $p$  encontrado foi de 0,33, portanto não houve diferença na distribuição dos valores de FSH entre os dois grupos analisados (com e sem recuperação de espermatozoides) com o ponto de corte escolhido. (Figura 13)

Tabela 9. Distribuição dos valores de FSH acima e abaixo do valor de corte 7 mUI/mL nos Grupos 1 (com achado de espermatozoide) e 2 (sem achado de espermatozoides).

	FSH (mUI/mL)	
	< 7	>7
Grupo 1	4 indivíduos	7 indivíduos
Grupo 2	1 indivíduo	7 indivíduos

### 6.6.3. Testosterona

Nos indivíduos avaliados encontrou-se dois valores séricos baixos de testosterona total (<200 ng/dl), correspondentes aos indivíduos P16 e P17 respectivamente dos Grupos 2 e 1. Distribuídos os valores da dosagem sérica de testosterona em intervalo inter-quartil e calculadas as medianas de cada grupo, no Grupo 1 a mediana da testosterona total sérica foi de 385 ng/dL (min: 124 e max: 766), no Grupo 2 a mediana foi de 432 ng/dL (min:134 e Max:789) não houve diferença entre estas medianas nos grupos avaliados (Figura 14).

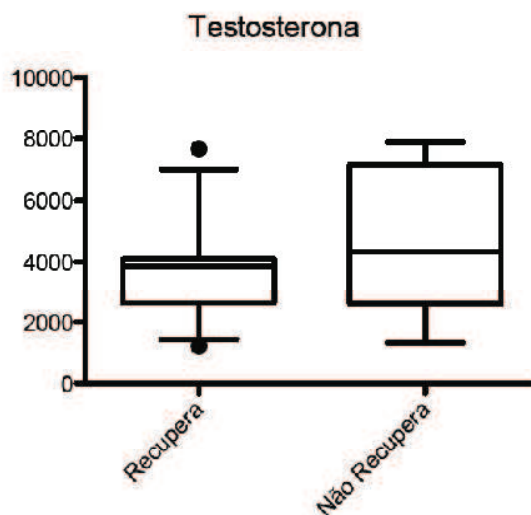


Figura 14. Distribuição dos valores da testosterona total sérica nos Grupos 1 (recuperação de espermatozoides) e 2 (sem recuperação de espermatozoides).

#### 6.6.4. Escore 5

A histopatologia testicular avaliada pelo escore de Cinco Padrões demonstrou uma alta correlação com a possibilidade de recuperação de espermatozoides nas biopsias testiculares. Os escores mais elevados 4 e 5 se mostraram mais frequentes no Grupo 1 e nenhum destes dois padrões foi encontrado no Grupo 2. No Grupo 2 os padrões mais comuns foram um, dois e três. Ocorreu uma sobreposição dos padrões histológicos dois e três entre os Grupos 1 e 2, mas ao comparar as medianas destes dois grupos observou-se uma diferença significativa. Esta diferença encontrada entre os Grupos 1 e 2 foi encontrada tanto na fixação e inclusão com Bouin e parafina (Grupo 1 com mediana de 4 e mediana de 2 para o grupo 2) como no glutaraldeído e glicol metacrilato (Grupo 1 com mediana de 3 e mediana de 2 para o grupo 2) como demonstrado na Figura 15.

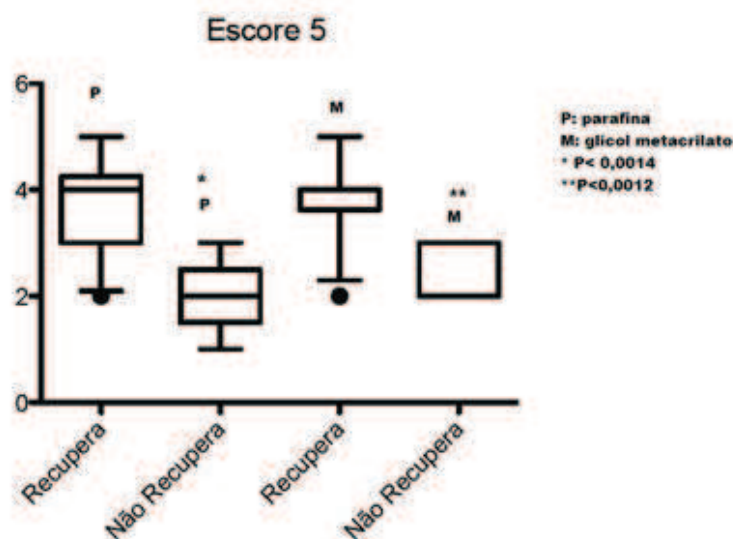


Figura 15. Distribuição dos padrões histológicos segundo o escore de Cinco Padrões nos Grupos 1 (recuperação de espermatozoides) e 2 (sem recuperação de espermatozoides).

#### 6.6.5. Escore de Johnsen

As notas das médias dos padrões histológicos determinados pelo escore de Johnsen demonstraram uma distribuição bem diferente entre os Grupos 1 e 2, com uma mediana das médias das notas do escore na faixa de 5,73 no material incluído em B/P no Grupo 1 e mediana em torno de dois no Grupo 2. Esta diferença foi

significante. Quanto ao material incluído e fixado em G/GMA a mediana das notas do escore de Johnsen ficou em torno de 8,25 no Grupo 1 e 2,05 no Grupo 2, com diferença significativa. Não houve diferença estatística entre os dois métodos de inclusão e fixação conforme demonstrado na Figura 16.

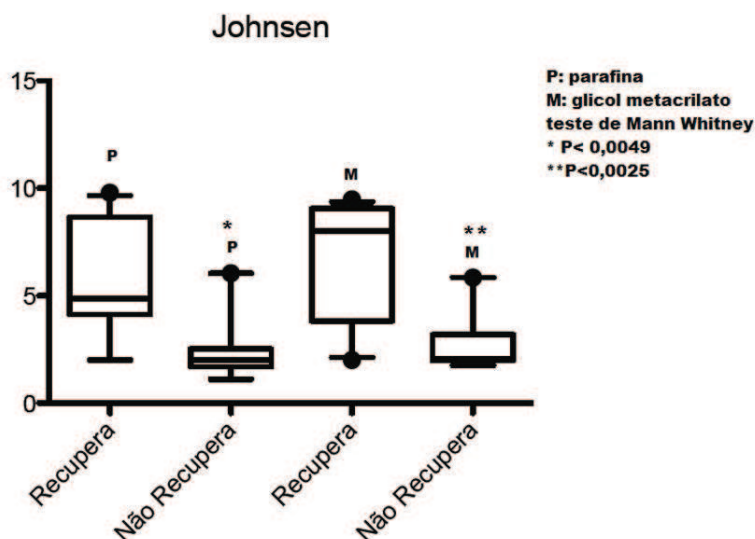


Figura 16. Distribuição das notas médias dos padrões histológicos segundo o Escore de Johnsen nos Grupos 1 (recuperação de espermatozoides) e 2 (sem recuperação de espermatozoides).

#### 6.6.6. Escore de Bergmann

Ao analisar a distribuição das notas do escore de Bergmann nos Grupos 1 e 2 observou-se uma alta associação deste escore com a chance de encontro de espermatozoides na biopsia testicular. A mediana encontrada no Grupo 1 foi de 0,19 e mediana de zero no Grupo 2 no material preparado em B/P. No material preparado em G/GMA a mediana do Grupo 1 foi de 0,77 enquanto que a mediana do Grupo 2 foi de zero. Nas duas técnicas de fixação e inclusão houve diferença significativa entre as medianas se comparar os Grupos 1 e 2, mas não houve diferença entre os dois métodos (Fig. 17).

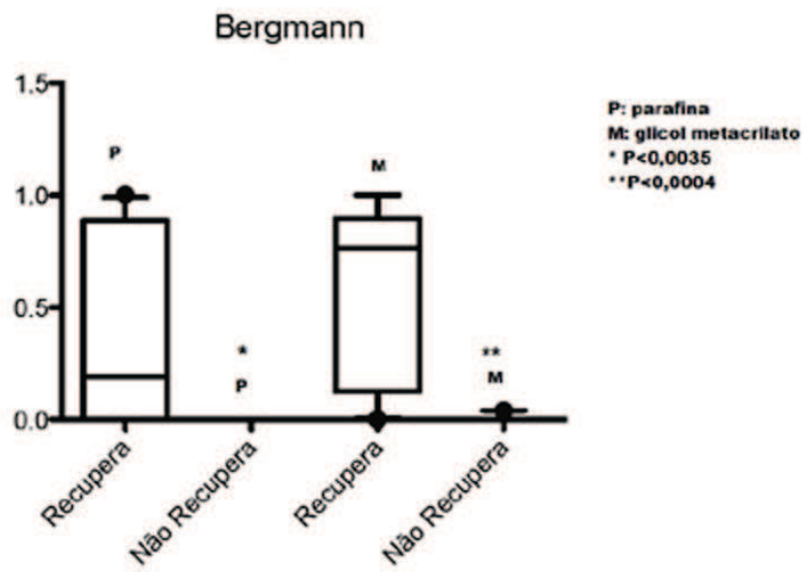


Figura 17. Distribuição dos padrões histológicos segundo o escore Bergmann nos Grupos 1 (recuperação de espermatozoides) e 2 (sem recuperação de espermatozoides).

## 7. DISCUSSÃO

Desde as primeiras descrições da aplicação da biópsia testicular (Clorny, 1940, Hatchkiss, 1944) na investigação do fator masculino na infertilidade conjugal até atualmente (McLachlan et al., 2007), persiste a ideia de que ela é tão essencial no exame clínico do homem infértil como a fundoscopia no diabético (McLachlan et al., 2007). Portanto a confirmação de um método que possibilite uma melhor definição citológica dos diferentes tipos celulares somáticos e germinativos do testículo, que levem a uma melhor definição do diagnóstico histopatológico e que ofereça mais segurança para o diagnóstico clínico, por si só, justificariam o emprego de métodos de fixação e inclusão mais sofisticados que o utilizado atualmente. Mesmo que mais dispendiosos e laboriosos em sua execução.

A segurança que o glutaraldeído e o GMA proporcionam no diagnóstico histopatológico de biópsias do testículo humano, como demonstrado no presente trabalho, pode ter papel relevante na condução dos casos clínicos de infertilidade. Esta relevância não era tão importante há duas décadas, pois naquela época, homens com azoospermia não obstrutiva eram considerados estéreis, ou seja, incapazes de gerar um filho biológico e, portanto as descrições com uso do glutaraldeído como fixador e a inclusão em resinas (Bergmann et al., 1994) foram pouco valorizadas.

As indicações da biópsia testicular no estudo da infertilidade masculina vêm mudando nas últimas décadas, desde em que ela se tornou uma ferramenta importante de propedêutica (Engle, 1950, Charny, 1963). Desde o ano 1940, antes do desenvolvimento do diagnóstico das alterações genéticas por determinação do cariótipo e das dosagens séricas hormonais, a biópsia testicular foi amplamente usada na propedêutica de pacientes azoospérmicos com testículos extremamente reduzidos (volume testicular inferior a 8 mL), que na histopatologia testicular, apresentavam um padrão predominante de esclerose e hialinização dos túbulos seminíferos. Hoje, sabemos que estes indivíduos com hipogonadismo hipergonadotrófico (volume testicular e dosagem de testosterona diminuídos, aumento das gonadotrofinas; hormônio luteinizante e hormônio folículo estimulante) são considerados portadores da síndrome de Klinefelter, uma trissomia dos cromossomos sexuais com o padrão 47, XXY (Levin, 1979).

Nas décadas seguintes, os pesquisadores tentavam correlacionar a diminuição da concentração de espermatozoides no sêmen com os diferentes padrões

da espermatogênese testicular (Johnsen, 1970), Devido à baixa correlação encontrada entre a avaliação da concentração de espermatozoides no esperma e as alterações testiculares, no final do século passado os pesquisadores passaram a limitar a indicação a biópsia testicular para o estudo de homens azoospérmicos, principalmente para diferenciar homens com azoospermia obstrutiva daqueles com azoospermia não obstrutiva (Silber, 1997).

Os tratamentos que ofereciam chances de gravidez antes de 1993 limitavam-se as reconstruções cirúrgicas do ducto deferente e a vasoepididimoplastia (*by-pass* do ducto deferente para o epidídimo), que eram oferecidas apenas para aqueles homens com azoospermia obstrutiva. Os homens com azoospermia não obstrutiva, considerados como estéreis, passaram a ter chance de se tornarem pais biológicos após o advento da ICSI (Palermo, 1992), fato ocorrido após as primeiras descrições de crianças nascidas com uso deste procedimento, devido ao uso de espermatozoides coletados diretamente do testículo (Schoysman *et al.*, 1993, Devroey *et al.*, Silber *et al.*, 1994). Esta técnica de reprodução assistida mudou completamente a abordagem clínica dos homens inférteis com azoospermia. A partir de então, a determinação da histologia testicular, por meio da avaliação das biópsias testiculares voltou a ter um importante papel na decisão de tratamentos destes pacientes (Tournaye *et al.*, 1996, Silber, 1997, Su *et al.*, 1999).

Com a melhora das técnicas cirúrgicas de extração de espermatozoides testiculares, alguns autores (Ramasamy *et al.*, 2009, Kalsi *et al.*, 2011, Ramasamy *et al.*, 2011) começaram a questionar a necessidade da biópsia testicular em homens com azoospermia não obstrutiva, quando o objetivo seria apenas conseguir espermatozoides para realizar uma ICSI. Entretanto, a indicação da biópsia testicular na avaliação do homem com azoospermia não obstrutiva não deve apenas ter como foco o encontro de espermatozoides para ICSI, mas também deve ter como objetivo a busca de possíveis doenças testiculares (Pushe *et al.*, 2011). Segundo a literatura, a chance de encontrar espermatozoides no testículo de homens azoospérmicos, com o uso de diferentes técnicas de extração de espermatozoides, fica em torno de 50% (Zitzmann *et al.*, 2006, Kalsi *et al.*, 2011, Ramasamy *et al.*, 2011, Marcini *et al.*, 2012). Segundo Zitzmann *et al.* (2006), de fato, esta chance é próxima àquela de escolher um lado de uma moeda jogada para cima.

As taxas de sucesso no tratamento de homens com azoospermia não obstrutiva são limitadas e a avaliação histopatológica testicular, atualmente, ainda é o melhor fator preditor de sucesso (Cooperberg *et al.*, 2005, Carpi *et al.*, 2009, Pushe.,

et al., 2011, Shiraishi et al., 2012). Esta última afirmação valoriza a importância dos resultados do nosso estudo, pois ao melhorarmos a confiança do diagnóstico histopatológico da espermatogênese com uso da fixação das biópsias testiculares em glutaraldeído e inclusão em glicol metacrilato, oferecemos a este grupo de pacientes um diagnóstico mais uniforme, diminuindo a chance de variabilidade na interpretação das biópsias testiculares pelo patologista.

O método de preparação com o fixador Bouin e a inclusão em parafina, apesar de menos eficiente na resolução citológica, por apresentar mais artefatos, mantém sua popularidade nos laboratórios de patologia. Atribui-se esta preferência, principalmente, devido à premissa que este método oferece condições suficientes para identificar as alterações testiculares e por acreditar-se que tenha menor custo de execução (McLahlan et al., 2007). No entanto, apesar da baixa resolução, deve-se ressaltar que o processamento com Bouin e parafina é adequadamente empregado, quando pretende-se realizar técnicas de imunohistoquímica no material processado.

Na área experimental, observou-se a substituição do fixador de Bouin pelo de Zenker, em testículos incluídos em parafina, para o estudo da espermatogênese. Mas, conforme revisto por Chiarini-Garcia et al. (2011), este processo de preservação histológica foi mais adequado para descrever o sistema de acrossomas quando submetidos à coloração em PAS, o que permitia diferenciar com mais facilidade os estádios do ciclo do epitélio seminífero, mas que ainda não preservavam de forma adequada os aspectos morfológicos das células da linhagem germinativa. Chiarini-Garcia et al. (2011) descrevem que a inclusão em GMA, associada a um fixador adequado, tem permitido o estudo de vários parâmetros testiculares sob diferentes condições devido à boa resolução obtida ao utilizar este processamento. Quando se inclui testículos fixados com glutaraldeído em resina araldite, que é um tipo de resina plástica epóxi, a resolução é nitidamente menor que quando incluída em GMA (Chiarini-Garcia e Meistrich, 2008), como será discutido à seguir.

A aplicação do glutaraldeído como fixador é comum na avaliação das células germinativas, principalmente as espermatogônias, sob a microscopia eletrônica de transmissão (Chiarini-Garcia e Russell, 2002) e a microscopia de luz de alta resolução (Chiarini-Garcia e Meistrich, 2008). Com o uso da microscopia de luz de alta resolução, que emprega glutaraldeído como fixador e inclusão em resina araldite, bem como cortes histológicos semifinos de 1 micrômetros de espessura, a resolução citológica sob a microscopia de luz foi tão pequena que possibilitou diversos estudos sob a biologia espermatogonial em diferentes espécies de mamíferos sob condições



normais (Chiarini-Garcia and Russell, 2001; Chiarini-Garcia et al, 2001, Chiarini-Garcia et al., 2003, Chiarini-Garcia et al., 2009; Drumond e al., 2011a) e experimentais (Russell et al., 2002; Boulden-Tiller et al., 2007; Nascimento et al., 2008; Drumond et al., 2011b), que não seriam possíveis de ser realizadas sob as técnicas convencionais. Utilizando este método, Chiarini-Garcia e colaboradores (Chiarini-Garcia et al., 2001, 2003) descreveram pela primeira vez a disposição das espermatogônias em regiões específicas dos túbulos seminíferos, conhecidas como nichos espermatogoniais. Mesmo utilizando uma resina plástica que proporciona menor resolução (GMA ao invés de araldite), de fato, este estudo confirmou estas vantagens citológicas, também no estudo histopatológico da espermatogênese humana, chamando a atenção para mudanças na abordagem técnica atual, visando um melhor diagnóstico histopatológico do homem com azoospermia não obstrutiva.

Neste momento vivemos a chamada era da ICSI, onde o encontro de um único espermatozoide vivo pode oferecer a chance de um homem com azoospermia não obstrutiva de tornar-se pai biológico. O início desta era ocorreu em 1993 com o relato de Schoysman (1993) sobre a primeira gravidez conseguida com uso da ICSI e espermatozoides extraídos do testículo. Passamos a vivenciar um momento onde a definição de se ter ou não espermatozoides no testículo passou a ser muito valorizada. Neste contexto, a fixação em glutaraldeído com inclusão em GMA tornou-se uma opção válida, por oferecer uma fixação tecidual que permite fácil reconhecimento das células do epitélio germinativo como demonstrado neste trabalho. O Bouin, apesar do seu uso rotineiro não é o melhor fixador de biópsias testiculares uma vez que ele é um fixador coagulante que precipita permanentemente as proteínas celulares modificando a sua estrutura original, o que prejudica a visualização de detalhes citológicos (Chiarini-Garcia et al., 2011)

O patologista deve estar treinado para reconhecer cada célula da espermatogênese. Esse reconhecimento é possível pelos detalhes diferenciais e peculiares entre cada tipo celular. As vantagens que observamos na fixação em glutaraldeído sobre o Bouin foram a de oferecer uma uniformidade das características histológicas, devido à ausência de retração tecidual comparada ao Bouin. Esta diminuição da retração refletiu-se nos detalhes celulares com a preservação dos limites celulares entre o citoplasma e o núcleo que são essenciais para diferenciar os diferentes tipos celulares do processo espermatogênico, tais como os diferentes tipos espermatogoniais, as várias alterações dos espermátocitos durante o processo meiótico e todo o processo de transformação das espermátides arredondadas se

transformando em alongadas e, por fim, formando os espermatozoides. A possibilidade de melhor distinguir os tipos celulares, certamente, diminui a possibilidade de diferentes interpretações entre patologistas, como descrito por Cooperberg (2005).

Nota-se também que os túbulos seminíferos por apresentarem menor retração na fixação com glutaraldeído e inclusão em GMA permitem uma interpretação mais segura do diâmetro tubular, este parâmetro tem sido utilizado por alguns autores nos estudos de técnicas de imagem para interpretação da espermatogênese no homem (Najari, 2012).

A avaliação do túbulo seminífero na fixação em glutaraldeído permite a visualização do processo de espessamento da membrana basal em um momento que ela se apresenta muito delgada, o que não foi observado na fixação com Bouin. Richardson (1995) correlacionou esse espessamento da membrana basal com um sinal inicial da degeneração do epitélio germinativo. Gulkesen (2006), em um elegante estudo avaliando a expressão de proteínas da matriz extracelular e de vimetina em testículos de homens azoospermicos, corroborou os achados de Richardson (1995), descrevendo que a espessura da parede do túbulo seminífero aumenta, formando uma camada acelular entre as células peritubulares e a membrana basal em pacientes inférteis. Como descrito no nosso estudo, à fixação em glutaraldeído com a inclusão em GMA conseguiu demonstrar alterações da espessura da membrana basal que não foram encontradas no material processado em Bouin e parafina nos estágios iniciais, confirmando sua superioridade na avaliação desta alteração. Se esta correlação entre espessamento da membrana basal com alteração da espermatogênese for realmente confirmada, nosso achado é de fundamental importância pois, o diagnóstico precoce, com o uso de G/GMA pode antecipar a indicação de tratamentos.

A melhora da qualidade tecidual com a fixação em glutaraldeído e inclusão em GMA foi essencial na diferenciação da hipoespermatogênese da espermatogênese normal. Ela permitiu uma visualização detalhada da diminuição da população celular com a diminuição da altura e desorganização do epitélio germinativo. Estes detalhes citológicos foram difíceis de serem percebidos na fixação com Bouin devido à intensa retração do epitélio germinativo. O *European Association of Urology Guidelines on male Fertility: The 2012 update*, sugere atualmente a realização da biópsia testicular diagnóstica em casos de homens com azoospermia com volume testicular normal e hormônios reprodutivos dentro da normalidade com o objetivo de confirmar o diagnóstico diferencial entre azoospermia obstrutiva (espermatogênese normal) e

azoospermia não obstrutiva (hipoespermatogênese e outros padrões). De fato, nosso estudo demonstrou que os detalhes citológicos e a preservação do arranjo do epitélio germinativo dentro do túbulo seminífero, proporcionados pelo preparo em glutaraldeído e GMA, foram importantes na diferenciação entre espermatogênese normal e hipoespermatogênese, superando a técnica de preparo com Bouin e parafina.

Para se caracterizar uma alteração histopatológica do testículo, como parada de maturação é fundamental que se descreva precisamente qual o último tipo de célula germinativa presente no epitélio seminífero, indicando em que momento a espermatogênese foi interrompida. No presente trabalho, dois indivíduos tiveram diagnóstico inicial de atrofia testicular quando a biópsia foi processada com B/P, mas que tiveram o diagnóstico alterado para parada de maturação, quando parte da mesma biópsia foi processada com G/GMA. E um indivíduo classificado com parada de maturação no preparo com B/P, devido à identificação de focos de espermatogênese com espermátides alongadas foi reclassificado com o padrão de hipoespermatogênese no preparo com G/GMA. Apesar de se saber que o número de biópsias e a quantidade de tecido retirado nestas biópsias pode aumentar a chance de mudança nos padrões da espermatogênese (Carpi, 2009), é consenso de que uma biópsia simples certamente não reflete toda a histologia de um testículo, pois os focos de alteração da espermatogênese nos testículos de homens inférteis são com frequências heterogeneamente distribuídos pelo seu parênquima (Cooperberg, 2005). Mas independente desta limitação, uma técnica que permita segurança na avaliação histológica é muito importante para o planejamento da infertilidade.

As características citológicas das células de Sertoli podem diferenciar diferentes padrões de aplasia das células germinativas (*Sertoly cell Only*), entre eles, (i) o padrão do tipo congênito, em que os gonócitos originados no saco vitelino não migram para a crista genital no período intra-fetal. Nestes indivíduos, as células de Sertoli são imaturas e apresentam o nucléolo diminuído e (ii) o padrão adquirido em que as células germinativas passaram por processo de degeneração (Aniballo et al., 2000). A identificação destas diferenças pode auxiliar no diagnóstico e na avaliação de tratamento destes pacientes, pois geralmente, no padrão adquirido podem ser encontradas áreas com espermatogênese (Aniballo et al., 2000). Baseado nos resultados presentes neste estudo, demonstrou-se que a fixação em glutaraldeído preservou com muito mais detalhes as estruturas celulares da célula de Sertoli em comparação ao Bouin. Estudos utilizando-se este tipo de metodologia fazem-se

necessários para discernir morfológicamente estes dois subtipos de aplasia do epitélio germinativo, sem a necessidade de recorrer ao uso da imunohistoquímica para identificação de filamentos de vimentina e a presença de citoqueratina como realizado nos dias atuais (Steger 1996).

Na presente amostra não se identificaram células de carcinoma *in situ*. Sabe-se que a literatura correlaciona este achado com a infertilidade masculina, principalmente, com alteração da espermatogênese e que os pacientes com passado de criptorquia apresentam um risco de câncer de testículo aumentado em relação à população masculina (McLachlan et al., 2007). As células de carcinoma *in situ* são morfológicamente semelhantes aos gonócitos embrionários (Jorgensen et al., 1995). Acredita-se que a melhora obtida no detalhamento celular, após fixação com glutaraldeído e inclusão em GMA, possa facilitar a identificação destas células e o diagnóstico histopatológico, em relação ao material incluído em Bouin.

Dajani (1998) citou que os métodos de inclusão em resinas plásticas apresentam uma rotina laboratorial trabalhosa e pesada e que resultados obtidos por técnicas de microscopia eletrônica não demonstraram vantagem sobre técnicas simples de fixação em Bouin e inclusão em parafina, com uso da microscopia óptica. Concordamos que os métodos de inclusão relacionados com a microscopia eletrônica, que usam glutaraldeído e resinas epóxi, não são adequados para o uso em rotina diagnóstica laboratorial. Mas, o uso de glutaraldeído associado à inclusão em GMA não é um processamento para microscopia eletrônica e sim para microscopia de luz. O GMA é uma resina hidrofílica, de fácil manejo e, ao contrário do que se imagina, de baixo custo. No seu processamento de inclusão, em nenhum momento se usa xilol e estufa e a coloração é feita diretamente sobre o corte histológico, sem a necessidade de baterias de coloração (Chiarini-Garcia et al., 2011). Desta forma, é um método viável de ser empregado no diagnóstico histopatológico do testículo uma vez que, como demonstramos, pode ser determinante no diagnóstico, quando comparado com o método tradicional utilizando Bouin/parafina.

Uso de escores na avaliação do diagnóstico da disfunção testicular tenta diminuir um fator de confusão que é a falta de uniformidade na descrição das alterações da espermatogênese. Várias tentativas de confeccionar algoritmos de interpretação da espermatogênese foram publicadas nas últimas décadas, segundo Cooperberg (2005). Durante a revisão de literatura deste trabalho, detectamos que os escores considerados de uso mais comum na literatura foram os de Johnsen (1970), Levin (1979), e Bergmann e Kliesch (2010).

Destes, o critério de Johnsen (1970) é o que menos se aplica ao uso prático na clínica. Na descrição original da técnica de avaliação, Johnsen (1970) sugere a avaliação mínima de pelos menos 100 túbulos seminíferos e no presente trabalho procuramos sempre seguir esta recomendação. Como em alguns casos onde os cortes da biópsia testicular não apresentavam este número mínimo de túbulos, seguimos então as recomendações de Coopberg (2005), que sugere pelo menos a leitura de 25 cortes transversais de túbulos seminíferos. McLachan (2006) já descrevia falhas no escore de Johnsen, mostrando que padrões bem diferentes apresentam no final o mesmo escore. Como exemplo, as três situações descritas a seguir, todas com escore 5: (i) testículo com uma parada de maturação em espermatócitos primários em todos os túbulos seminíferos, (ii) testículo apresentando combinação de padrão de espermatogênese normal em 50% dos túbulos e aplasia germinativa nos outros 50% e (iii) testículo com a presença de vários padrões da espermatogênese no mesmo tecido. Neste estudo, encontramos a mesma dificuldade de interpretação desta média de escores. Entretanto quando se visualizou a tabela de preenchimento dos 10 padrões do escore de Johnsen, obteve-se uma descrição objetiva da proporção destes vários escores no tecido avaliado, como descrito no exemplo anterior. Baseado na objetividade que esta tabela de escore oferece, sugere-se que nos laudos de descrição patológica ela receba mais atenção que a nota das médias do escore de Johnsen e seja sempre fornecida. Concorda-se com outros autores (McLachlan et al., 2006, Coopberg et al., 2005) que a simples descrição da nota média do escore de Johnsen causa apenas confusão na interpretação da histopatologia dos túbulos, devendo ser evitada ou abandonada. Apesar de não ser considerado o método mais adequado para o diagnóstico histopatológico testicular, as vantagens na identificação citológica e estrutural das células do epitélio germinativo, observadas no processamento com glutaraldeído e GMA, permitiram uma definição mais segura dos dez escores de Johnsen (1970), quando comparadas com a preparação das biópsias testiculares utilizando Bouin/parafina.

O escore resumido de cinco escores, que é uma modificação de Levin (1979), tem sido o mais utilizado no nosso meio e frequentemente é citado nos estudos atuais que tratam das disfunções da espermatogênese (Kalsi et al., 2012, Esteves et., 2011, Haimov-Kochman et al., 2009, McLahlan 2006., Pasqualotto et al., 2006, Cooperberg et al., 2005). Este escore tem a vantagem de ser simplificado e descrever as várias disfunções da espermatogênese em cinco padrões principais, a saber; (i) espermatogênese normal, (ii) hipoespermatogênese, (iii) parada de maturação, (iv) aplasia de células germinativas (*Sertoly cell only*) e (v) atrofia testicular. O maior

problema encontrado é que, nem sempre os critérios para se classificar os padrões são obedecidos conforme as recomendações do artigo original (Levin, 1979). Esta falta de normalização pode causar confusão na comparação de resultados de biópsias testiculares conforme descrito por Coopberg (2005). No presente estudo seguiram-se as recomendações do escore de Levin (1979) que não descreve o padrão da síndrome de Klinefelter, o padrão misto de aplasia de células germinativas, a espermatogênese focal bem como o padrão de testículo imaturo. Não se encontrou dificuldade de classificar os achados histopatológicos nos cinco padrões descritos. O material incluído em glutaraldeído e fixado em GMA ofereceu mais segurança nesta classificação devido aos detalhes citológicos encontrados e a melhor preservação das estruturas testiculares em comparação ao material fixado em Bouin e inclusão em parafina. Este maior detalhamento citológico dos diferentes tipos celulares da espermatogênese possibilitou a identificação de espermatogônias no indivíduo P6 e a presença de espermatócitos no indivíduo P14, que não haviam sido identificados no material com preparo em B/P. Outra importante observação foi que a qualidade do material das biópsias testiculares fixado em glutaraldeído e incluído em GMA permitiu uma diferenciação mais segura dos padrões de hipoespermatogênese e espermatogênese normal, o que permite um aumento da confiança na diferenciação dos diagnósticos de azoospermia obstrutiva e não obstrutiva.

O escore de Bergmann, descrito por Bergmann e Kliesch (1998), é vantajoso frente aos anteriores quando a proposta da biópsia testicular é apenas a de avaliar a chance de extração de espermatozoides. A forma de leitura dos túbulos seminíferos é muito semelhante à descrita por Johnsen (1970), mas ao contrário deste, o escore não é dado pela média das notas de todos os túbulos do tecido avaliado. Bergmann propõe a realização de uma proporção do número de túbulos com espermátides alongadas divididos pelo número de todos os túbulos contatos na biópsia testicular (conforme fórmula descrita no material e método). Este foi o escore que mais apresentou diferenças entre o material preparado com B/P e G/GMA. Destas diferenças devem-se destacar os indivíduos P1 e P11. No material fixado em B/P o escore destes pacientes foi zero indicando ausência de espermatogônias e espermatócitos e espermátides alongadas, estas células foram identificadas no processamento com G/GMA. Como este escore tem o objetivo de selecionar pacientes com maior chance de extração de espermatozoides para técnica de reprodução assistida (ICSI), percebe-se a importância clínica da identificação das espermátides como descrito no material fixado em glutaraldeído e incluído em GMA

Avaliou-se neste estudo o volume testicular, e as dosagens hormonais de testosterona total e hormônio folículo estimulante a fim de demonstrar se estes parâmetros poderiam diferenciar a possibilidade de encontro ou não de espermatozoides na biópsia testicular. A literatura é controversa sobre o papel destes parâmetros na avaliação da chance de achado de espermatozoides na biópsia testicular. Bergmann (1983) encontrou correlação dos valores do FSH com os seus padrões de espermatogênese, descrevendo que homens com espermatogênese histologicamente normal (azoospermia obstrutiva) apresentavam FSH dentro dos valores de referência da normalidade e valores elevados foram encontrados nos pacientes com aplasia de células germinativas (*Sertoli cell only*). Entretanto, nos padrões morfológicos que se encontravam entre estes dois extremos existia uma ampla variabilidade das dosagens de FSH. Schill (2003) descreveu que encontrou correlação com valores de FSH baixos, testosterona sérica e volume testicular aumentados no grupo com azoospermia obstrutiva quando comparada ao grupo com azoospermia não obstrutiva. Mitchell (2010) descreveu que em um grupo de pacientes azoospermicos, todos com FSH normal (abaixo de 10mUI/mL) e submetidos à extração de espermatozoides para realização de ICSI, 56% deles apresentavam defeitos da espermatogênese e em 14,9% das biopsias não foram encontrados espermatozoides. Ele não encontrou correlação do volume testicular com o padrão de espermatogênese sendo que o material foi fixado em Bouin e incluído em parafina e o escore utilizado foi o de cinco padrões. O que chamou atenção foi o ponto de corte utilizado para caracterizar o volume testicular de normal ( $\geq 30$  mL), muito superior ao utilizado no nosso meio ( $\geq 15$  mL). Com este valor de corte ele conseguiu encontrar correlação do volume testicular com o encontro de espermatozoides, mostrando volume de  $28,3 \pm 8,38$  mL no grupo com recuperação de espermatozoides e  $23,98 \pm 5,52$  no grupo sem recuperação de espermatozoides. Este autor concluiu que mesmo com os dados clínicos e hormonais dos pacientes, alguns casos não foram puderam ser categorizados com acurácia. Zitzmann (2006) utilizando um modelo de curva de probabilidade para prever a chance de gravidez clínica e nascimento de crianças para ICSI com espermatozoides extraídos do testículo descreveu que o valor do FSH associado ao padrão da espermatogênese encontrada na biópsia testicular está relacionado à probabilidade de nascidos vivos após a ICSI. Mas o único fator preditor de sucesso para recuperação de espermatozoides e sucesso consecutivo da ICSI foi à histopatologia. Mesmo utilizando método mais preciso de avaliação histopatológica, as alterações de diagnóstico não foram suficientes para o desenvolvimento de comparações entre cada padrão histológico com os critérios não invasivos de

avaliação, tais como volume testicular e as dosagens de FSH e testosterona total, Para determinar se há correlação entre estes parâmetros e os padrões de espermatogênese classificados no material fixado em Bouin e incluído em GMA, estudos complementares fazem-se necessários.

Deve-se novamente ressaltar que o objetivo deste estudo não se limitou a procurar método mais moderno visando apenas à melhora das chances de encontro de espermatozoides para realização de ICSI. Como salientado por Levin (1979) acredita-se, que se os endocrinologistas e urologistas confiassem exclusivamente em análises séricas de hormônio folículo estimulante, hormônio luteinizante e de testosterona, em conjunto com a determinação do tamanho testicular e espermograma, para avaliar todos os casos de disfunção da espermatogênese, haveria uma perda considerável de conhecimento sobre a biologia humana testicular e sobre a resposta dos testículos aos produtos químicos e agentes hormonais.

Seguindo esta linha de pensamento de Levin, resalta-se que o papel da biópsia testicular nunca se limitará apenas a responder sobre a existência ou não de espermatozoides para uso exclusivo em técnicas de reprodução. A compreensão dos mecanismos que levam às alterações morfológicas da espermatogênese podem permitir a aplicação de recursos atuais, hoje disponíveis como os da biologia molecular ou mesmo o uso de células tronco na correção destas disfunções.



## 8. CONCLUSÃO

- A amostra de tecido testicular fixada em glutaraldeído e incluída em glicol metacrilato, por apresentar melhor resolução e preservação citológica, proporciona diagnóstico histopatológico mais seguro quando comparado ao diagnóstico obtido com o método clássico de fixação em Bouin e inclusão em parafina.
- Em relação ao escore de Bergmann, o uso de G/GMA é determinante uma vez que permite a localização de espermatozoides, que não foram visualizados quando processadas por B/P.
- A técnica de preparo das biópsias testiculares com a fixação em glutaraldeído e inclusão em glicol metacrilato permite a identificação precoce do espessamento da membrana basal.
- Os parâmetros clínicos não invasivos; (i) volume testicular, (ii) dosagem sérica de testosterona e (iii) hormônio folículo estimulante são inferiores em diferenciar as biópsias testiculares com ou sem recuperação de espermatozoides, independente do processamento utilizado.
- A técnica de fixação em glutaraldeído e inclusão em glicol metacrilato deve ser indicada para pacientes que realizam biópsia testicular com a finalidade de definir se a causa da azoopermia é obstrutiva ou não obstrutiva.

## 9. REFERÊNCIAS

Abdel Raheem A, Garaffa G, Rushwan N, De Luca F, Zacharakis E, Raheem TA, Freeman A, Serhal P, Harper JC, Ralph D. Testicular histopathology as a predictor of a positive sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia. *BJU Int.* 2012;5: 1-7.

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

Anniballo R, Ubaldi F, Cobellis L, Sorrentino M, Rienzi L, Greco E, Tesarik J. Criteria predicting the absence of spermatozoa in the Sertoli cell-only syndrome can be used to improve success rates of sperm retrieval. *Hum Reprod.* 2000; 15:2269-2277.

Alves A. Análises histopatológicas: porque demoram os resultados. *SPCV.* 2002;10: 239-247.

Belker AM, et al. Results of 1,469 microsurgical vasectomy reversals by the Vasovasostomy Study Group. *J Urol.* 1991;145: 505-511.

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

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

Boitrelle F, Robin G, Marcelli F, Albert M, Leroy-Martin B, Dewailly D, Rigot JM, Mitchell V. A predictive score for testicular sperm extraction quality and surgical ICSI outcome in non-obstructive azoospermia: a retrospective study. *Hum Reprod.* 2011; 26:3215-3221.

Bolden-Tiller OU, Chiarini-Garcia H, Poirier C, Alves-Freitas D, Weng CC, Shetty G, Meistrich ML. Genetic factors contributing to defective spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion (Utp14bjsd) mice. *BiolReprod.* 2007;77: 237-246.

Carpi A, Sabanegh E, Mechanick J. Controversies in the management of nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril.* 2009; 91: 963-970.

Chapin RE, Ross MD, Lamb JC. Immersion fixation methods for glycol methacrylate-embedded testes. *Toxicol Pathol.* 1984; 12:221-227.

Charny, CW. Reflections on testicular biopsy. *Fert. Steril.* 1963; 14:610-616.

Chemes HE, Brugo S, Zanchetti F, Carrere C, Lavieri JC. Dysplasia of the fibrous sheath: an ultrastructural defect of human spermatozoa associated with sperm immotility and primary sterility. *Fertil Steril.* 1987;48:664-669.

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

Chiarini-Garcia H, Freitas DA, Barbosa IS, Almeida FRLC. Evaluation of the seminiferous epithelial cycle, spermatogonial kinetics and niche in donkeys (*Equus asinus*). *Anim Reprod Sci.* 2009;116:139-154.

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

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

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

Chiarini-Garcia H, Russell LD. High-resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biol Reprod.* 2001;65:1170-1178.

Chiarini-Garcia H, Hornick JR., Griswold MD, Russell L.D. Distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random. *Biol Reprod.* 2001;65:1179-1185.

Chipkevitch E. Clinical assessment of sexual maturation in adolescents. *J Pediatr.* 2001;77:S135-S142.

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

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

Coburn M, Wheller T, Lipshultz LI. Testicular biopsy. It's use and limitations. *Urol Clin North Am.* Elsevier; 1987; 14: 551-561.

Cooperberg MR, Chi T, Jad A, Cha I, Turek PJ. Variability in testis biopsy interpretation: implications for male infertility care in the era of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2005;84:672-677.

Dajani YF. How we report biopsies: Testicular biopsy: an update. *Current Diagnosis Pathology.* 1998;5:17-22.

De Kretser DM, Holstein AF. Testicular biopsy and abnormal germ cells. In: Hafez ESE (ed) *Human semen and fertility regulation in men.* Mosby;1976;332-343.

Devroey P, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Silber SJ, Van Steirteghem AC. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1994;62:639-641.

Drumond AL, Weng CC, Wang G, Chiarini-Garcia H, Eras-Garcia L, Meistrich ML. Effects of multiple doses of cyclophosphamide on mouse testes: assessing the germ cells lost, and the functional damage of stem cells. *Reprod Toxicol.* 2011;32:395-406.

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

Engle, ET. The testis biopsy in infertility. *J Urol.* 1947; 57:789-798.

Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. Sperm retrieval techniques for assisted reproduction. *Int Braz J Urol.* 2011; 37:570-583.

Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics. Review.* 2011; 66 :691-700.

Feder N, O'Brien TP. Plant microtechnique: some principles and new methods. *Am. J. Bot.* 1968; 55: 123-142.

Ferreira RMA, Chiarini-Garcia H. Efeito da fixação e do meio de inclusão na preservação histológica do intestino da traíra *Hoplias malabaricus*. *Rev Bras Ciên Morf.* 1992; 9:32-37.

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

Frungieri MB, Calandra RS, Lustig L, Meineke V, Köhn FM, Vogt HJ, Mayerhofer A. Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men. *Fertil Steril*. 2002;78:298-306.

Giagulli VA, Vermeulen A. Leydig cell function in infertile men with idiopathic oligospermic infertility. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988;66:62-67.

Glina S, Soares JB, Antunes N Jr, Galuppo AG, Paz LB, Wonchockier R. Testicular histopathological diagnosis as a predictive factor for retrieving spermatozoa for ICSI in non-obstructive azoospermic patients. *Int Braz J Urol*. 2005;31:338-341.

Goldstein M, Li PS, Matthews GJ. Microsurgical vasovasostomy: The microdot technique of precision suture placement. *J Urol*. 1998;159:188-190.

Guarch R, Pesce C, Puras A, Lázaro J. A quantitative approach to the classification of hypospermatogenesis in testicular biopsies for infertility. *Hum Pathol*. 1992;23:1032-1037.

Gülkesen KH, Erdoğan T, Sargin CF, Karpuzoğlu G. Expression of extracellular matrix proteins and vimentin in testes of azoospermic man: an immunohistochemical and morphometric study. *Asian J Androl*. 2002;4:55-60.

Haimov-Kochman R, Lossos F, Nefesh I, Zentner BS, Moz Y, Prus D, Bdolah Y, Hurwitz A. The value of repeat testicular sperm retrieval in azoospermic men. *Fertil Steril*. 2009; 91:1401-1403.

Hargreave TB. Genetic Basis of male fertility. *Brain Med Bull*. 2000; 56:650-671.

Heller CH, Clermont Y. Kinetics of the Germinal Epithelium in Man. *Recent Prog Horm Res*. 1964;20:545-575.

Holstein AF, Schirren C. Histological evaluation of testicular biopsies. In: *Diagnostic Aspects in Andrology*. 1983;108-117.

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

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

Johnson BH, Ewing LL. Follicle-stimulating hormone and regulation of testosterone secretion in rabbit testis. *Scienc.* 1971;173:635-637.

Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C. European Association of Urology Guidelines on Male Infertility: The 2012 Update. *Eur Urol* (2012). Disponível em [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com). Acesso em: 01 set. 2012.

Kahraman S, Yakin K, Samli M, Vanlioğlu F, Karlikaya G, Sertyel S, Dönmez E. A comparative study of three techniques for the analysis of sperm recovery: touch-print cytology, wet preparation, and testicular histopathology. *J Assist Reprod Genet.* 2001;18:357-63.

Kalsi J, Thum MY, Muneer A, Abdullah H, Minhas S. In the era of micro-dissection sperm retrieval (m-TESE) is an isolated testicular biopsy necessary in the management of men with non-obstructive azoospermia? *BJU Int.* 2011;109:418-424.

Kap M, Smedts F, Oosterhuis W, Winther R, Christensen N, Reischauer B, Viertler C, Groelz D, Becker KF, Zatloukal K, Langer R, Slotta-Huspenina J, Bodo K, de Jong B, Oelmüller U, Riegman P. Histological assessment of PAX gene tissue fixation and stabilization reagents. *PLoS One.* 2011;6:e27704:1-10.

Kim ED, Lipshultz LI. Evaluation and imaging of the infertile male. In: *Reprod Clin North Am*, 1999;10:377-409.

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

Levin HS. Testicular biopsy in the study of male infertility: its current usefulness, histologic techniques, and prospects for the future. *Hum Pathol.* 1979;10:569-584.

Martello R, Camargos AF. Propedêutica básica da infertilidade conjugal. In: *Ginecologia Ambulatorial.* 2001; 505-517.

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

Meng J, Greenlee AR, Taub CJ, Braun RE. Sertoli cell-specific deletion of the androgen receptor compromises testicular immune privilege in mice. *Biol Reprod.* 2011; 85:254-260.

Meyer JM, Roos M, Rumpler Y. Statistical study of a semiquantitative evaluation of testicular biopsies. *Arch Androl.* 1988;20:71-79.

Mitchell V, Robin G, Boitrelle F, Massart P, Marchetti C, Marcelli F, Rigot JM. Correlation between testicular sperm extraction outcomes and clinical, endocrine and testicular histology parameters in 120 azoospermic men with normal serum FSH levels. *Int J Androl.* 2011;34:299-305.

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

Nascimento H.F., Drumond A.L., França L.R., Chiarini-Garcia H. Spermatogonial morphology, kinetics and niches in hamsters exposed to short- and long-photoperiod. *Int. J Androl.* 2009; 32:486-497.

Neves PA. Espermograma e correlações clínicas. In: *Infertilidade Masculina.* 2002; 59-69.

Nistal M, Paniagua R. Testicular biopsy. Contemporary interpretation. Review. *Urol Clin North Am.* 1999; 26: 555-593.

Palermo GD, et al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoa into oocyte. 1992;340:347.

Nistal M, Paniagua R. Testicular biopsy. Contemporary interpretation. Review. In: *Urol Clin North Am.* 1999;26:555-593.

Pasqualotto FF, Sobreiro BP, Hallak J, Pasqualotto EB, Lucon AM. Induction of spermatogenesis in azoospermic men after varicocele repair: an update. *Fertil Steril.* 2006; 85:635-639.

Pomerol JM, Arrondo JL. Azoospermia. In: *Prática Andrológica.* 1994; 35-41.

Pühse G, Hense J, Bergmann M, Kliesch S. Bilateral histological evaluation of exocrine testicular function in men with obstructive azoospermia: condition of spermatogenesis and andrological implications? *Hum Reprod.* 2011;26: 2606-2612.

Ramasamy R, Lin K, Gosden LV, Rosenwaks Z, Palermo GD, Schlegel PN. High serum FSH levels in men with nonobstructive azoospermia does not affect success of microdissection testicular sperm extraction. *Fertil Steril.* 2009;92:590-593.

- Ramasamy R, Fisher ES, Ricci JA, Leung RA, Schlegel PN. Duration of microdissection testicular sperm extraction procedures: relationship to sperm retrieval success. *J Urol.* 2011;185:1394-1397.
- Reis AB, Araújo FC, Pereira VM, Dos Reis AM, Santos RA, Reis FM. Angiotensin (1-7) and its receptor Mas are expressed in the human testis: implications for male infertility. *J Mol Histol.* 2010;41:75-80.
- Richardson LL, Kleinman HK, Dym M. The effects of aging on basement membrane in the testis. *J Androl.* 1995;16:118-126.
- Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. *Histological and histopathological evaluation of the testis.* 1ed. 1990.
- Russell LD, Chiarini-Garcia H, Korsmeyer SJ, Knudson CM. Bax dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *BiolReprod.* 2002;66: 950-958.
- Russell LD, Griswold MD. *The Sertoli Cell.* 1ed. 1993.
- Schlegel PN, Girardi SK. In vitro fertilization for male factor infertility. *Clin Endocrinol Metab.* 1997;83: 709-716.
- Schlegel PN, Palermo GD, Goldstein M, Menendez S, Zaninovic N, VeeckLL, Rosenwaks Z. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia. *Urology.* 1997;49:435-440.
- Schill T, Bals-Pratsch M, Kúpker W, Sandmann J, Johannisson R, Diedrich K. Clinical and endocrine follow-up of patients after testicular sperm extraction. *Fertil Steril.* 2003; 79: 281-286.
- Shiraishi K, Ohmi C, Shimabukuro T, Matsuyama H. Human chorionic gonadotrophin treatment prior to microdissection testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 2012; 27:331-339.
- Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal L, Segal-Bertin G, Geerts L, van Roosendaal E, Schoysman D. Pregnancy after fertilization with human testicular spermatozoa. *Lancet.* 1993; 13:342:1237.
- Skakkebaek NE, Heller CG. Quantification of human seminiferous epithelium. Histological studies in twenty-one fertile men with normal chromosome complements. *J Reprod Fertil.* 1973;32:379-389.



Silber SJ. Sperm granuloma and reversibility of vasectomy. *Lancet*. 1977;2: 588.

Silber SJ, Rodriguez-Rigau LJ. Quantitative analysis of testicle biopsy: determination of partial obstruction and prediction of sperm count after surgery for obstruction. *Fertil Steril*. 1981; 36:480-485.

Silber SJ. Evaluation and treatment of male infertility. *Clin Obstet. Gynecol*. 2000;43: 854-888.

Silber SJ, Nagy Z, Devroey P, Tournaye H, Van Steirteghem AC. Distribution of spermatogenesis in the testicles of azoospermic men: the presence or absence of spermatids in the testes of men with germinal failure. *Hum Reprod*. 1997;12:2422-2428.

Speroff I, Glass RH, Kase NG. *Clinical Endocrinology and Infertility*, 5 ed. In *Endocrinology*. 1999;128:1918-1926.

Steger K, Rey R, Kliesch S, Louis F, Schleicher G, Bergmann M. Immunohistochemical detection of immature Sertoli cell markers in testicular tissue of infertile adult men: a preliminary study. *Int J Androl*. 1996;19:122-128.

Su LM, Palermo GD, Goldstein M, Veeck LL, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia: testicular histology can predict success of sperm retrieval. *J Urol*. 1999; 161:112-116.

Thomas Jr AJ, Sabanegh ES, Nagler HM. Complex reconstruction for obstruction of the vas deferens and epididymis. In: Thomas Jr AJ, Nagler HM, (eds). *Atlas of surgical management of male infertility*. 1995; 71.

Tournaye H, Liu J, Nagy PZ, Camus M, Goossens A, Silber S, Van Steirteghem AC, Devroey P. Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. *Hum Reprod*. 1996;11:127-132.

Tunc L, Kirac M, Gurocak S, Yucel A, Kupeli B, Alkibay T, Bozkirli I. Can serum Inhibin B and FSH levels, testicular histology and volume predict the outcome of testicular sperm extraction in patients with non-obstructive azoospermia? *Int Urol Nephrol*. 2006; 38:629-635.

Turek PJ. Infertilidade masculina. In: Tanagho EA, *Urologia geral de Smith*. 17 ed. Monole; 2010.

Zitzmann M, Nordhoff V, von Schönfeld V, Nordsiek-Mengede A, Kliesch S, Schüring AN, Luetjens CM, Kamischke A, Cooper T, Simoni M, Nieschlag E. Elevated follicle-stimulating hormone levels and the chances for azoospermic men to become fathers after retrieval of elongated spermatids from cryopreserved testicular tissue. *Fertil Steril*. 2006; 86:339-347.

## 10. ANEXOS E APÊNDICES

### ANEXO 1 – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

UFMG

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

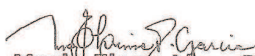
Parecer nº. ETIC 032/04

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

#### DECISÃO


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

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


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

## 10. ANEXOS E APÊNDICES

### ANEXO 2 - Formulário de consentimento para congelamento de sêmen



**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Hospital das Clínicas**  
**Laboratório de Reprodução Humana Prof. Aroldo**  
**Fernando Camargos**



### **TERMO DE CONSENTIMENTO PARA CONGELAMENTO DE SÊMEN**

Eu, \_\_\_\_\_, portador do RG nº \_\_\_\_\_  
 E CIC nº \_\_\_\_\_, natural de \_\_\_\_\_ UF \_\_\_\_\_  
 Residente na cidade de \_\_\_\_\_, no  
 \_\_\_\_\_

Autorizo o congelamento do meu sêmen no serviço de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas – UFMG para futuro descongelamento, mediante as condições abaixo:

#### **PRIMEIRO**

É de inteira responsabilidade deste serviço analisar, criopreservar e armazenar as amostras obtidas. Somente serão criopreservadas amostras consideradas adequadas para tal. Esta avaliação será realizada por especialista do Laboratório de Reprodução Humana.

#### **SEGUNDO**

O sêmen deve ser mantido congelado enquanto eu não autorizar o seu uso nos procedimentos de Reprodução Assistida.

## **10. ANEXOS E APÊNDICES**

### **ANEXO 2 - Formulário de consentimento para congelamento de sêmen**

#### **TERCEIRO**

O sêmen terá por finalidade ser utilizado nos procedimentos de Reprodução Assistida, visando à obtenção de gravidez da minha esposa. A equipe médica do Laboratório de Reprodução terá total autonomia para decidir se o sêmen descongelado está adequado para a realização ou não das técnicas de reprodução assistida.

#### **QUARTO**

Em caso de meu falecimento, sendo eu solteiro ou casado, o sêmen congelado será imediatamente descartado.

#### **QUINTO**

O serviço de Reprodução Humana do Hospital das clínicas – UFMG não se responsabiliza em nenhuma hipótese em relação a problemas que venham ocorrer durante as gestações ou a saúde da criança proveniente da utilização das amostras armazenadas.

#### **SEXTO**

Estou ciente que após o descongelamento da amostra poderá ocorrer perda significativa da qualidade do sêmen.

**10. ANEXOS E APÊNDICES****ANEXO 2 - Formulário de consentimento para congelamento de sêmen**

Tendo lido com atenção e compreendido todas as informações contidas neste documento, recebido informações adicionais e esclarecimentos completos, autorizo a realização do congelamento do meu sêmen.

Por ser verdade todo o exposto, firmo o presente instrumento em 02 (duas) vias de igual teor e forma, na presença de duas testemunhas, para que produza seus jurídicos e legais efeitos.

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Paciente: \_\_\_\_\_ RG nº \_\_\_\_\_

**Testemunhas:**

\_\_\_\_\_  
Nome Assinatura RG nº \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome Assinatura RG nº \_\_\_\_\_

## **10. ANEXOS E APÊNDICES**

### **Apêndice 1 - Formulário de consentimento livre e esclarecido**

#### **I. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA**

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

#### **II. SIGILO DOS DADOS**

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

#### **III. BENEFÍCIOS DA PESQUISA**

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

#### **IV. RISCOS**

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

#### **V. RESSARCIMENTO DAS DESPESAS**

Não está prevista qualquer forma de remuneração para os voluntários. Todas as despesas específicas relacionadas ao estudo são de responsabilidade do laboratório

de Endocrinologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

#### VI. DEMAIS ESCLARECIMENTOS

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

#### VII. TERMO DE CONSENTIMENTO

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

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

---

Assinatura do voluntário:

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

Dr. Augusto Barbosa Reis: 8897 4776



## 10. ANEXOS E APÊNDICES

### Apêndice 2- Exemplo 1 escore de Johnsen

#### Classificação histopatológica do testículo nos diferentes escores.

Paciente: exemplo 1  
 Técnica de processamento: GMA  
 Examinador: Augusto

Testículo: TD

#### 1) Critério de 5 escores:

5	4	3	2	1
	X			

#### 2) Critério de Johnsen

Escores	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	Totais
Nº de túbulos por escore	0	16	7	6	15	13	18	14	16	0	105
NºT x escore	0	144	56	42	90	65	72	42	32	0	Escore médio <b>5,2</b>

Observações:  $543 / 105 = 5,2$

3) **Critério de Bergmann** Somatório do nº de túbulos com escores de Johnsen de 8 a 10 / Nº total de túbulos seminíferos contados:  $23 / 105 = 0,21$

## 10. ANEXOS E APÊNDICES

### Apêndice 3- Exemplo 2 escore de Johnsen

#### Classificação histopatológica do testículo nos diferentes escores.

Paciente: exemplo 2  
 Técnica de processamento: GMA  
 Examinador: Augusto

Testículo: TD

#### 1) Critério de 5 escores:

5	4	3	2	1
		X		

#### 2) Critério de Johnsen

Escores	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	Totais
Nº de túbulos por escore	0	0	0	20	15	48	12	0	0	3	101
NºT x escore	0	144	56	140	90	240	48	0	0	3	Escore médio <b>5,1</b>

Observações:  $521 / 101 = 5,15$

3) **Critério de Bergmann** Somatório do nº de túbulos com escores de Johnsen de 8 a 10 / Nº total de túbulos seminíferos contados:  $0 / 101 = 0$

## 10. ANEXOS E APÊNDICES

### Apêndice 4- Exemplo 3 escore de Johnsen

#### Classificação histopatológica do testículo nos diferentes escores.

Paciente: exemplo 3  
 Técnica de processamento: GMA  
 Examinador: Augusto

Testículo: TD

#### 1) Critério de 5 escores:

5	4	3	2	1
	X			

#### 2) Critério de Johnsen

Escores	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	Totais
Nº de túbulos por escore	0	13	1	0	2	4	0	2	0	9	31
NºT x escore	0	117	8	0	12	20	0	6	0	9	Escore médio 5,5

Observações:  $172 / 31 = 5,5$

3) **Critério de Bergmann** Somatório do nº de túbulos com escores de Johnsen de 8 a 10 / Nº total de túbulos seminíferos contados:  $14 / 31 = 0,45$



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



## DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores Edson Samesima Tatsuo /Orientador, Hélio Chiarini Garcia, Vivian Resende, Bernardo Almeida Campos, Sidney Glina e Humberto Elias Lopes, aprovou a defesa da Tese intitulada: **“ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DIFERENTES PROCESSAMENTOS HISTÓLOGICOS NA INTERPRETAÇÃO DE BIÓPSIAS TESTICULARES.”**, apresentada pelo Doutorando **AUGUSTO BARBOSA REIS**, para obtenção do título de Doutor em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 01 de Novembro de 2012.

Prof. Edson Samesima Tatsuo

Orientador

Prof. Hélio Chiarini Garcia

Co-orientador

Profa Vivian Resende

Prof. Bernardo Almeida Campos

Prof. Sidney Glina

Prof. Humberto Elias Lopes



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE **AUGUSTO BARBOSA REIS**,  
nº de registro 2009965096.

Às quatorze horas do dia 01 de novembro de dois mil e doze, reuniu-se na Faculdade de Medicina Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora de tese indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **"ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DIFERENTES PROCESSAMENTOS HISTÓLOGICOS NA INTERPRETAÇÃO DE BIÓPSIAS TESTICULARES."**, requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Edson Samesima Tatsuo, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Edson Samesima Tatsuo/Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof. Hélio Chiarini Garcia/ Co-orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>aprovado</u>
Profa Vivian Resende	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof. Bernardo Almeida Campos	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADO</u>
Prof. Sidney Glina	Instituição: FMABC	Indicação: <u>APROVADO</u>
Prof. Humberto Elias Lopes	Instituição: UFJF	Indicação: <u>Aprovado</u>

Pelas indicações, o candidato foi considerado APROVADO.

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 01 de novembro de 2012.

Prof. Edson Samesima Tatsuo/Orientador \_\_\_\_\_  
Prof. Hélio Chiarini Garcia \_\_\_\_\_  
Profa. Vivian Resende \_\_\_\_\_  
Prof. Bernardo Almeida Campos \_\_\_\_\_  
Prof. Sidney Glina \_\_\_\_\_  
Prof. Humberto Elias Lopes \_\_\_\_\_  
Prof. Marcelo Dias Sanches/Coordenador \_\_\_\_\_

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

Prof. Marcelo Dias Sanches  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia  
Faculdade de Medicina/UFMG