



**Maria Inês Pinho dos
Santos Graça**

**Análise Quantitativa da Proliferação Celular no Epitélio
Seminífero Humano**



**Maria Inês Pinho dos
Santos Graça**

**Análise Quantitativa da Proliferação Celular no Epitélio
Seminífero Humano**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Mário Sousa do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto e da Professora Doutora Maria de Lurdes Pereira do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Professora Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Mário Manuel da Silva Leite de Sousa
Professor Catedrático do Laboratório de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira
Professora Associada com Agregação da Universidade de Aveiro.

Professora Doutora Ana Isabel Fernandes Grangeia
Investigadora Doutorada do Serviço de Genética, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

agradecimentos

Quero manifestar publicamente a minha dívida de gratidão a todos quanto contribuíram para tornar possível a concretização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Mário Sousa o meu agradecimento mais especial, por gentilmente me ter recebido e confiado em mim, pela orientação científica deste estudo, pela partilha de experiências e conhecimentos, pela ordenação de ideias, pela crítica e pela motivação constante, pela paciência interminável, por me ter sempre apoiado e incentivado a fazer mais e melhor, por ter desmitificado as minhas dúvidas, pela ajuda incansável e sobretudo pela amizade. Para sempre o meu muito obrigado.

À Professora Doutora Maria de Lurdes Pereira por me ter aceite como orientanda, por toda a ajuda e disponibilidade.

Ao Professor Doutor Alberto Barros por gentilmente me ter acolhido e cedido material proveniente do Centro da Genética da Reprodução, por forma a que eu pudesse concretizar a parte laboratorial deste estudo.

À Professora Doutora Margarida Cardoso por me ter dado apoio e orientação no tratamento estatístico dos resultados.

À Dra Rosália Sá por toda a ajuda, pela disponibilidade e pela amizade.

À Dra. Joaquina Silva, ao Dr. Paulo Viana e à Dra. Mariana por todo o apoio prestado, pelos conhecimentos que me transmitiram e pela constante disponibilidade.

À Elsa Oliveira e à Ângela Alves pela ajuda constante, pelo apoio incansável, pela motivação, pelo carinho com que me receberam, por acreditarem que eu era capaz e sobretudo pela grande amizade. Para sempre o meu obrigado.

À Oriana pelo incentivo e apoio irrestrito, pelas longas horas passadas ao microscópio comigo, por toda a ajuda prestada, por estar sempre disponível, por todas as conversas e críticas, pela amizade e cumplicidade e sobretudo por estar sempre presente. A ela o meu mais sincero e profundo obrigado.

À Ana Raquel e ao João, duas pessoas excelentes que tive oportunidade de conhecer e de iniciar uma amizade a qual espero que seja para toda a vida. A vocês um obrigado especial por todas as sugestões e críticas, pela ajuda e sobretudo pelas longas conversas.

À minha família e aos meus amigos pelo apoio, pelo interesse e pela amizade.

Ao João por ter estado ao meu lado, pela compreensão, pela ajuda, por ser a pessoa que é e pela constante motivação.

Finalizo com um eterno e sentido agradecimento aos meus pais, pois sem o seu apoio e compreensão incondicional, este projecto não teria sido possível. Para sempre o meu muito obrigado.

Palavras-Chave

Bromodeoxiuridina, Cultura de Túbulos Seminíferos Humanos, Diferenciação celular, Espermatogénese, Hormona Foliculo-Estimulante, Proliferação celular, Testosterona.

Resumo

Apesar de décadas de investigação básica na espermatogénese humana, pouco se sabe acerca da proliferação e diferenciação das células germinais humanas em termos quantitativos. Com este trabalho pretendeu-se estudar quantitativamente os efeitos temporais e específicos de cada estadio celular, da Hormona Foliculo Estimulante (FSH) e da testosterona (T) na capacidade proliferativa do epitélio seminífero humano normal sob condições de cultura de órgão. Para tal, fragmentos de túbulos seminíferos humanos foram mantidos em cultura durante 28 dias, usando-se a incorporação da 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) e a sua detecção por imunohistoquímica para aceder à proliferação celular. Os resultados quantitativos deste estudo mostraram uma perda gradual das células germinais meióticas e pós-meióticas ao longo do período de cultura, com uma boa manutenção da arquitectura geral dos túbulos e sem diminuição do número das células de Sertoli. Verificou-se que a taxa de proliferação das espermatogónias A dark era bastante baixa independentemente do suplemento hormonal. A proliferação das espermatogónias A, espermatogónias B e pré-leptótenos, foi máxima durante a primeira semana de cultura atingindo valores mais elevados quando induzida pelas hormonas (FSH e testosterona). Ao final da primeira semana houve diferenciação das espermatogónias e pré-leptótenos em espermatócitos em zigóteno e paquíteno e espermatócitos secundários, promovendo as hormonas uma aceleração da passagem de leptóteno para paquíteno em especial na concentração 50 U/L de FSH e 1 µmol/L de testosterona. A FSH + T aumentou a sobrevivência das células germinais, estimulou a proliferação das espermatogónias e a diferenciação das células germinais, durante a primeira semana de cultura. Com este estudo, foi possível quantificar pela primeira vez a proliferação e diferenciação das células germinais, utilizando uma metodologia bastante reprodutível e com resultados semelhantes aos *in vivo*.

Keywords

Bromodeoxyuridine, Cellular Differentiation, Cellular Proliferation, Follicle Stimulating Hormone, Seminiferous tubules culture, Spermatogenesis, Testosterone.

Abstract

In spite of decades in study of human spermatogenesis almost anything is known about germinal cell proliferation and differentiation in quantitative ways. The aim of this project was to study quantitatively the temporal and stage specific effects of Follicle Stimulating Hormone and testosterone on the proliferative capacity of the normal human seminiferous epithelium under organ culture conditions. Seminiferous tubules fragments were kept in culture during 28 days, and 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation was used followed by immunohistochemistry detection to achieve cellular proliferation. Quantitative data of this study demonstrated a gradual loss of meiotic and post-meiotic germinal cells during the culture period, no decrease on Sertoli cells number and a good maintenance of the seminiferous tubules general architecture. The rate of A dark spermatogonia proliferation was very low and was independently of hormonal supplement. Spermatogonia A, spermatogonia B and pre-leptotene spermatocytes proliferation was higher during the first week of culture, and reached its highest values in response to hormonal stimulation. At the end of the first week occurred differentiation of BrdU-labelled pre-leptotene spermatocytes into zygotene and pachytene spermatocytes and the presence of FSH and testosterone promoted an acceleration of leptotene spermatocyte into pachytene spermatocyte, especially when the 50 U/L of FSH and 1 μ mol/L of testosterone concentration were used. FSH + T increased germ cell survival, spermatogonial proliferation and germinal cell differentiation, during the first week of culture. In this study it was possible to quantify, for the first time germinal cell proliferation and differentiation, using a high reproducible methodology which gave results similar to *in vivo* conditions.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Sistema reprodutor masculino	1
1.1.1. Organização do testículo	1
1.1.2. Estrutura dos túbulos seminíferos	2
1.1.3. Epitélio seminífero	3
1.1.4. Espermatogénese.....	5
1.1.5. Caracterização Citomorfológica das células germinais masculinas.....	10
1.1.6. O Ciclo do Epitélio Seminífero.....	12
1.1.7. Células estaminais e progenitoras germinativas.....	13
1.1.8. Função das Hormonas na Espermatogénese	14
1.2. Cultura Celular.....	18
1.2.1. Breve Introdução ao Ciclo Celular.....	21
1.2.2. Proliferação Celular.....	21
1.2.3. Proliferação Celular na Espermatogénese.....	23
2. Objectivos.....	28
3. Material e Métodos.....	30
3.1. Material Biológico	30
3.2. Cultura de Órgão de túbulos seminíferos	30
3.3. Estudo da Proliferação Celular	30
3.4. Processamento Histológico das Biópsias testiculares.....	31
3.5. Tratamento das lâminas com Vectabond	32
3.6. Microtomia.....	32
3.7. Coloração com Hematoxilina	32
3.8. Análise Imunohistoquímica	33
3.9. Análise do tecido	34

3.10. Análise Estatística	34
4. Resultados	35
4.1. Análise da morfologia dos túbulos seminíferos.....	35
4.2. Evolução dos diferentes tipos celulares em cultura	36
4.2.1 Células de Sertoli	36
4.2.2. Espermatogónias A pale.....	38
4.2.3. Espermatogónias A dark	40
4.2.4. Total de Espermatogónias A	42
4.2.5. Espermatogónias B e Espermatócitos Leptótenos	44
4.2.6. Espermatócitos Zigótenos e Paquítenos.....	46
4.2.7. Espermatócitos Secundários.....	48
4.2.8. Espermatídeos Redondos	50
4.2.9. Espermatídeos Alongados	52
4.3. Análise da Proliferação e Diferenciação Celular	54
4.3. 1. Espermatogónias A pale.....	54
4.3. 2. Espermatogónias A dark	58
4.3. 3. Total de Espermatogónias A	61
4.3. 4. Espermatogónias B e espermatócitos primários Leptótenos.....	63
4.3. 5. Espermatócitos primários em Zigóteno e Paquíteno.....	67
4.3. 6. Espermatócitos Secundários.....	70
5. Discussão e Conclusão	73
6. Referências Bibliográficas	78
7. Anexos.....	86

Lista de Figuras

Figura 1 – Esquema representativo da anatomia do sistema reprodutor masculino.....	1
Figura 2 – Desenho esquemático da localização e disposição dos túbulos seminíferos no interior do testículo (figura da esquerda). Fotografia de um túbulo seminífero (x20) visto ao microscópio óptico.....	2
Figura 3 - Desenho esquemático do epitélio germinativo do túbulo seminífero.....	4
Figura 4 - Esquema representativo das três fases da espermatogênese.....	5
Figura 5 – Desenho esquemático da espermiogênese. N- Núcleo, M –Mitocôndria, C – Centríolo, CG – Complexo de Golgi, VA – Vesícula Acrosômica, A- Acrosoma, F – Flagelo e CR- Corpo Residual.....	9
Figura 6 – Desenho representativo de um espermatozóide.....	9
Figura 7 – Esquema representativo da regulação hormonal da espermatogênese. LH – hormona luteinizante, e FSH - hormona folículo-estimulante,	16
Figura 8 - Fórmula química do composto 5-bromo-2-deoxuridina.....	22
Figura 9 -Morfologia dos túbulos seminíferos nos dias 0 (9a), 7 (9b, e, i), 14 (9c, f, j), e 28 (9d, h, k) de cultura, das experiências controlo (9a – 9d), 50/1 (9e – 9h) e 500/10 (9i – 9k).	35
Figura 10 – Imagem ao microscópio óptico de um corte de um túbulo seminífero evidenciando espermatogónias A pale BrdU positivas (x100). 10 a) Imagem do controlo negativo apenas corado com Hematoxilina. 10 b,c,d) Imagem da Imunohistoquímica mostrando Espermatogónias A pale BrdU positivas (setas). LB – lâmina basal, PTC – célula peritubular, SC – célula de Sertoli, SGA pale – espermatogónia A pale, SGA dark – espermatogónia A dark, ST1 leptóteno – espermátócito primário em leptóteno (setas largas quando positivos), ST1 paquíteno – espermátócito primário em paquíteno, ST2 – espermátócito secundário, Sa – espermátídeo redondo, Sd – espermátídeo alongado.....	57
Figura 11 - Imagem ao microscópio óptico de um corte de um túbulo seminífero evidenciando espermatogónias A dark BrdU positivas (x100). 11 a) Imagem do controlo negativo apenas corado com Hematoxilina. 10 b,c,d) Imagem da Imunohistoquímica mostrando Espermatogónias A dark BrdU positivas (setas). LB – lâmina basal, PTC – célula peritubular, SC – célula de Sertoli, SGA pale – espermatogónia A pale, SGA dark –	

espermatogónia A dark, ST1 leptóteno – espermatócito primário em leptóteno, ST1 paquíteno – espermatócito primário em paquíteno..... 60

Figura 12 – Imagem ao microscópio óptico de um corte de um túbulo seminífero evidenciando espermatócitos em leptóteno BrdU positivos (x100). 12 a) Imagem do controlo negativo apenas corado com Hematoxilina. 12 b,c,d) Imagem da Imunohistoquímica mostrando Espermatócitos em leptóteno BrdU positivos (setas). LB – lâmina basal, PTC – célula peritubular, SC – célula de Sertoli, SGA pale – espermatogónia A pale, SGA dark – espermatogónia A dark, ST1 leptóteno – espermatócito primário em leptóteno, ST1 paquíteno – espermatócito primário em paquíteno, ST2 – espermatócito secundário, Sa – espermatídeo redondo, Sd – espermatídeo alongado. 66

Figura 13– Imagem ao microscópio óptico de um corte de um túbulo seminífero evidenciando espermatócitos em paquíteno BrdU positivos (x100). 13 a) Imagem do controlo negativo apenas corado com Hematoxilina. 13 b,c,) Imagem da Imunohistoquímica mostrando Espermatócitos em paquíteno BrdU positivos (setas). LB – lâmina basal, PTC – célula peritubular, SC – célula de Sertoli, SGA pale – espermatogónia A pale (cabeça de seta positivas), SGA dark – espermatogónia A dark, ST1 leptóteno – espermatócito primário em leptóteno (setas largas quando positivos), ST1 paquíteno – espermatócito primário em paquíteno, ST2 – espermatócito secundário, Sa – espermatídeo redondo, Sd – espermatídeo alongado..... 69

Figura 14 – Imagem ao microscópio óptico de um corte de um túbulo seminífero evidenciando espermatócitos secundários BrdU positivos (x100). 14 a) Imagem do controlo negativo apenas corado com Hematoxilina. 14 b,c,) Imagem da Imunohistoquímica mostrando Espermatócitos secundários BrdU positivos (setas). LB – lâmina basal, PTC – célula peritubular, SC – célula de Sertoli, SGA pale – espermatogónia A pale, SGA dark – espermatogónia A dark, ST1 leptóteno – espermatócito primário em leptóteno, ST1 paquíteno – espermatócito primário em paquíteno, ST2 – espermatócito secundário, Sa – espermatídeo redondo, Sd – espermatídeo alongado. 72

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Associações celulares em cada estadio do ciclo seminífero.....	12
Tabela 2 – Número médio de Células de Sertoli presentes na cultura, nos dias 0, 7, 14, e 28 das experiências: controle, 50/1 e 500/10.	36
Tabela 3 - Comparação entre o número médio de Células de Sertoli presentes na cultura, no dia 0 da experiência controle e no dia 7, 14, e 28 das experiências: controle, 50/1 e 500/10.	36
Tabela 4 – Número médio de Espermatogónias A pale presentes na cultura, nos dias 0, 7, 14 e 28 das experiências controle, 50/1 e 500/10.....	38
Tabela 5 - Comparação entre o número médio de Espermatogónias A pale presentes na cultura, no dia 0 da experiência controle e no dia 7, 14, e 28 das experiências: controle, 50/1 e 500/10.	38
Tabela 6 – Número médio de Espermatogónias A dark presentes na cultura, no dia 0 da experiência controle e no dia 7, 14, e 28 das experiências: controle, 50/1 e 500/10.	40
Tabela 7 - Comparação entre o número médio de Espermatogónias A dark presentes na cultura, no dia 0 da experiência controle e no dia 7, 14, e 28 das experiências: controle, 50/1 e 500/10.	40
Tabela 8 – Número médio do total de Espermatogónias A presentes na cultura, nos dias 0, 7, 14 e 28 das experiências controle, 50/1 e 500/10.....	42
Tabela 9 - Comparação entre o número médio do total de Espermatogónias A presentes na cultura, no dia 0 da experiência controle e no dia 7, 14, e 28 das experiências: controle, 50/1 e 500/10.....	42
Tabela 10 - Número médio de Espermatogónias B e espermatócitos primários em Leptótenos presentes na cultura, nos dias 0, 7, 14 e 28 das experiências controle, 50/1 e 500/10.	44
Tabela 11 - Comparação entre o número médio de Espermatogónias B e espermatócitos primários em Leptótenos presentes na cultura, no dia 0 da experiência controle e no dia 7, 14, e 28 das experiências: controle, 50/1 e 500/10.....	44
Tabela 12 – Número médio de espermatócitos primários em zigóteno e paquíteno presentes na cultura, nos dias 0, 7, 14, e 28 das experiências controle, 50/1 e 500/10. .	46

Tabela 13 - Comparação entre o número médio de espermatozóitos primários em zigóteno e paquíteno presentes na cultura, no dia 0 da experiência controle e no dia 7, 14, e 28 das experiências: controle, 50/1 e 500/10.....	46
Tabela 14 – Número médio de espermatozóitos secundários presentes na cultura nos dias 0, 7, 14, e 28 das experiências: controle, 50/1 e 500/10.....	48
Tabela 15 - Comparação entre o número médio de espermatozóitos secundários presentes na cultura, no dia 0 da experiência controle e no dia 7, 14, e 28 das experiências: controle, 50/1 e 500/10.....	48
Tabela 16 - Número médio de espermatozóitos redondos presentes na cultura, nos dias 0, 7, 14, e 28 das experiências controle, 50/1 e 500/10.....	50
Tabela 17 - Comparação entre o número médio de espermatozóitos redondos presentes na cultura, no dia 0 da experiência controle e no dia 7, 14, e 28 das experiências: controle, 50/1 e 500/10.....	50
Tabela 18 - Comparação entre o número médio de espermatozóitos alongados presentes na cultura, nos dias 0 dia 7, 14, e 28 das experiências controle, 50/1 e 500/10.....	52
Tabela 19 - Comparação entre o número médio de espermatozóitos alongados presentes na cultura, no dia 0 da experiência controle e no dia 7, 14, e 28 das experiências: controle, 50/1 e 500/10.....	52
Tabela 20 – Número médio de espermatogônias A pale positivas presentes na cultura, nos dias 0, 7, 14, e 28 das experiências: controle, 50/1 e 500/10.....	54
Tabela 21 - Comparação entre o número médio de espermatogônias A pale positivas presentes na cultura, no dia 0 da experiência controle e no dia 7, 14, e 28 das experiências: controle, 50/1 e 500/10.....	54
Tabela 22 – Número médio de espermatogônias A pale positivas presentes em cultura, nos dias 0, 7, 14, e 28 das experiências controle, 50/1 e 500/10.....	58
Tabela 23 - Comparação entre o número médio de espermatogônias A pale positivas presentes na cultura, no dia 0 da experiência controle e no dia 7, 14, e 28 das experiências: controle, 50/1 e 500/10.....	58
Tabela 24 – Número médio do total de espermatogônias A positivas presentes na cultura, nos dias 0, 7, 14, e 28 das experiências controle, 50/1 e 500/10.....	61
Tabela 25 - Comparação entre o número médio do total de espermatogônias A positivas presentes na cultura, no dia 0 da experiência controle e no dia 7, 14, e 28 das experiências: controle, 50/1 e 500/10.....	61

Tabela 26 - Número médio de espermatogónias B e espermatócitos primários em leptóteno positivos presentes na cultura, nos dias 0, 7, 14, e 28 das experiências controle, 50/1 e 500/10.....	63
Tabela 27 - Comparação entre o número médio de espermatogónias B e espermatócitos primários em leptóteno positivos presentes na cultura, no dia 0 da experiência controle e no dia 7, 14, e 28 das experiências: controle, 50/1 e 500/10.....	63
Tabela 28 - Número médio de espermatócitos primários em zigóteno e paquíteno positivos presentes na cultura, nos dias 0, 7, 14, e 28 das experiências controle, 50/1 e 500/10.....	67
Tabela 29 - Comparação entre o número médio de espermatócitos primários em zigóteno e paquíteno positivos presentes na cultura, no dia 0 da experiência controle e no dia 7, 14, e 28 das experiências: controle, 50/1 e 500/10.....	67
Tabela 30 - Número médio de espermatócitos secundários positivos presentes na cultura nos dias 0, 7, 14 e 28 das experiências controle, 50/1 e 500/10.....	70
Tabela 31 - Comparação entre o número médio de espermatócitos secundários positivos presentes na cultura, no dia 7 da experiência controle e no dia 7 das experiências 50/1 e 500/10.....	70

1. Introdução

1.1. Sistema reprodutor masculino

O sistema reprodutor masculino é composto por várias estruturas, divididas da seguinte forma: testículos, ductos genitais, glândulas acessórias e o pênis. A principal função deste sistema é produzir espermatozóides e introduzi-los no aparelho reprodutor feminino (Figura 1).

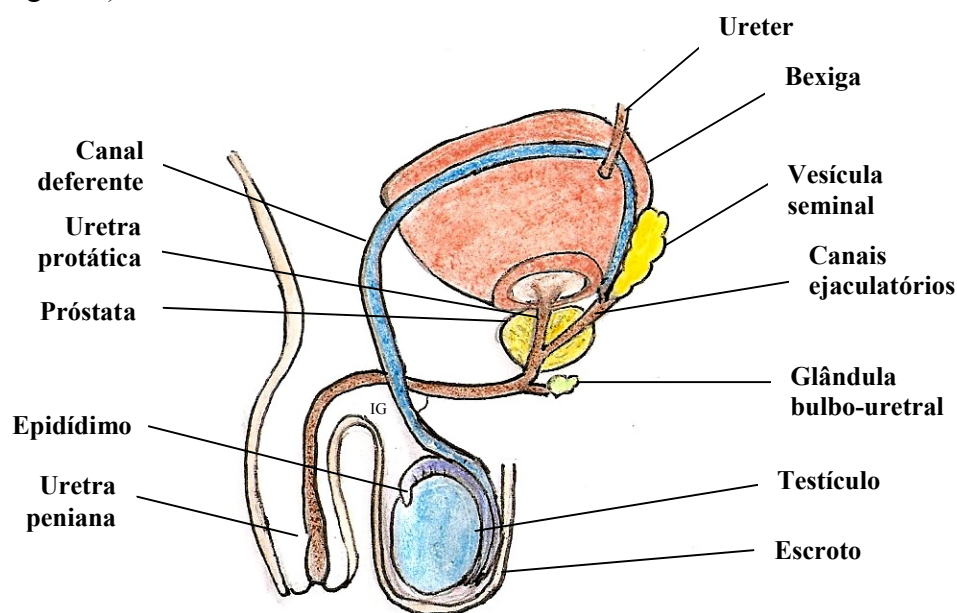


Figura 1 – Esquema representativo da anatomia do sistema reprodutor masculino

1.1.1. Organização do testículo

O testículo humano é uma glândula composta, com duas funções: reprodutiva e hormonal. Possui uma forma ovóide, com 2,5 x 4 cm de diâmetro, e encontra-se fora do abdômen, suspensos numa bolsa de pele, denominada escroto, situada abaixo e atrás do pênis. O escroto proporciona um ambiente especial, onde a temperatura é alguns graus abaixo (32 – 33°C) da temperatura corporal interna (37°C), sendo esta uma condição necessária para a espermatogênese. Estes órgãos desenvolvem-se dentro do abdômen, mas a cerca de dois meses antes do nascimento descem através da parede abdominal para o interior do escroto. Os testículos encontram-se rodeados por uma espessa e resistente cápsula de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea. Esta, na sua superfície posterior,

possui um espessamento, o *mediastinum* do testículo, através do qual entram os vasos sanguíneos e por onde os ductos eferentes deixam o órgão. Do *mediastinum* saem septos fibrosos, dividindo o órgão em cerca de 250 compartimentos piramidais, os lóbulos testiculares. Estes septos não são completos, permitindo inter-comunicações entre os lóbulos. Cada lóbulo é constituído por um a quatro túbulos seminíferos, bem como tecido intertubular (tecido conjuntivo laxo), rico em nervos, vasos sanguíneos e linfáticos e grupos de células endócrinas de Leydig. Cada testículo contém 250 a 1000 túbulos seminíferos.

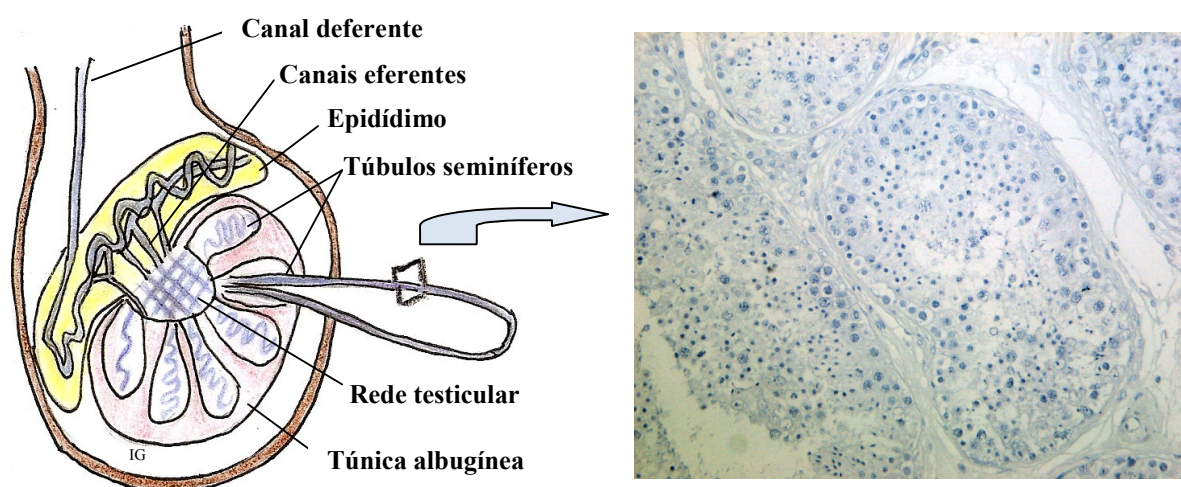


Figura 2 – Desenho esquemático da localização e disposição dos túbulos seminíferos no interior do testículo (figura da esquerda). Fotografia de um corte histológico de túbulos seminíferos visto ao microscópio óptico (x20).

1.1.2 Estrutura dos túbulos seminíferos

Cada túbulo seminífero tem cerca de 150 a 250 μm de diâmetro e 30 a 70 cm de comprimento. Estes túbulos encontram-se enrolados, iniciam-se em fundo cego e acabam em curtos túbulos, conhecidos como túbulos rectos, que conectam os túbulos seminíferos com um labirinto de canais anastomosados, a rede testicular (*rete testis*). A rede testicular encontra-se no *mediastinum* e está ligada à porção superior do epidídimo por 10 a 20 ductos eferentes.

Os túbulos seminíferos são formados pelo epitélio germinativo ou seminífero, pela lâmina própria e pela lâmina basal. A lâmina própria é formada por tecido conjuntivo denso composto por várias camadas de fibroblastos, possuindo na sua camada mais interna células peritubulares (mioepiteliais) com capacidade peristáltica (Bloom and Fawcett, 1994; Holstein *et al*, 2003; Junqueira and Carneiro, 2004).

1.1.3. Epitélio seminífero

O epitélio seminífero é constituído por dois tipos básicos de células: as Células de Sertoli ou de suporte e as células germinativas.

1.1.3.1. Células de Sertoli

As células de Sertoli (SC) são elementos fundamentais para a função testicular. São células somáticas, alongadas e piramidais, que se interdigitam com as células germinativas. O núcleo encontra-se, habitualmente, acima da linha das espermatogónias. Tem geralmente uma forma triangular e irregular, um nucléolo proeminente, numerosas reentrâncias e exhibe pouca cromatina visível. A base celular está inserida na lâmina basal dos túbulos seminíferos, e as terminações apicais encontram-se no lúmen dos túbulos.

As SC estão ligadas entre si por zonas especializadas, junções de hiato e desmossomas, que dividem o epitélio germinativo num compartimento basal e num compartimento adluminal. O compartimento basal forma a barreira hemato-testicular (*blood-testis barrier* BTB), que proporciona um ambiente selectivo para o desenvolvimento do espermatozóide maduro, ao restringir o acesso de iões, hormonas e nutrientes ao epitélio seminífero. Durante o seu desenvolvimento, as células germinativas passam através da BTB, do epitélio basal para o adluminal.

As SC também facultam suporte e regulação nutricional às células germinativas. As extensas ramificações das SC suportam fisicamente a associação das células germinativas que se encontram interligadas por pontes citoplasmáticas. Uma vez que os espermatócitos, os espermatídeos e os espermatozoides não têm contacto directo com o plasma, estas células dependem das SC para mediar a troca de nutrientes e metabolitos. Elas também participam na libertação dos espermatídeos maduros no lúmen do túbulo (espermição). O citoplasma das SC possui numerosos lisossomas, que assistem a SC na fagocitose e na digestão dos corpos residuais, derivados do excesso do citoplasma dos espermatídeos, e das células germinativas apoptóticas. Por último, as SC secretam um fluído nos túbulos seminíferos, que é conduzido em direcção aos ductos genitais e é usado no transporte dos espermatozoides em direcção ao epidídimo. As SC possuem receptores para a FSH (Hormona Folículo-estimulante) e a testosterona, que são as principais hormonas reguladoras da espermatogénese (Schulze, 1974; Holstein *et al*, 2003; Junqueira and Carneiro, 2004; Almog and Naor, 2008).

1.1.3.2. Células Germinativas

As células germinativas encontram-se em diferentes níveis, desde a base do túbulo até ao lúmen, estando rodeadas pelo citoplasma das SC. Incluem vários tipos morfológicos distintos: espermatogónias, espermatócitos primários e secundários, espermatídeos e espermatozóides, que representam estádios sucessivos num processo contínuo de diferenciação. As células germinativas desenvolvem-se num sincício, interligadas umas às outras por pontes intercelulares após cada divisão celular. Estas pontes intercelulares permitem a rápida comunicação entre as células assegurando o seu desenvolvimento sincronizado.

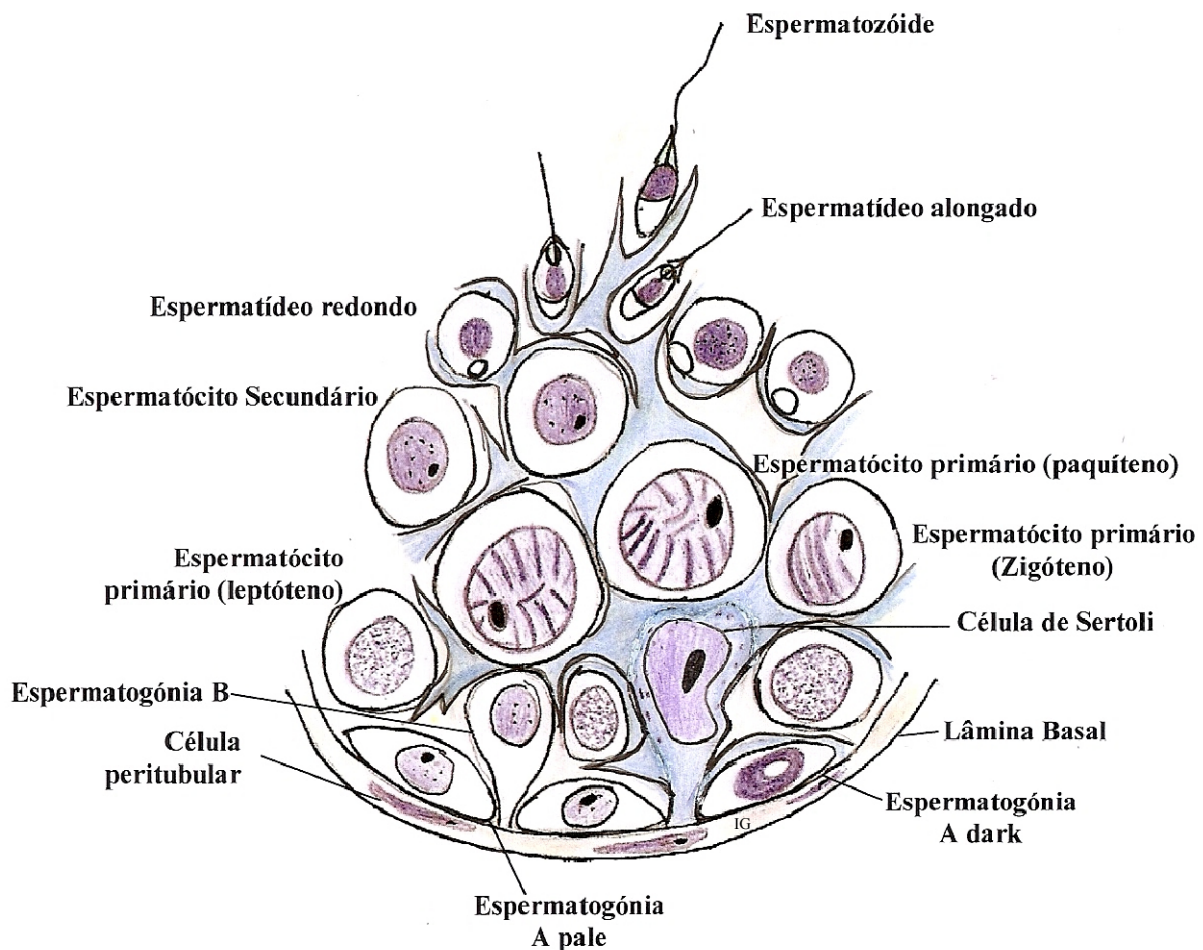


Figura 3 - Desenho esquemático do epitélio germinativo do túbulo seminífero.

1.1.4. Espermatogênese

A espermatogênese é um processo cíclico e contínuo, onde uma população interdependente de células germinativas produz espermatozoides através de uma série de eventos. Inicia-se na puberdade e continua durante toda a vida reprodutiva do homem.

A espermatogênese pode ser dividida em três fases, que são a espermacitogênese (divisões mitóticas sucessivas das espermatogônias para produzir espermatócitos primários), meiose (os espermatócitos sofrem duas divisões meióticas que reduzem o seu número de cromossomas para metade, assim como a sua quantidade de DNA, e produzem espermatídeos redondos) e a espermiogênese (citodiferenciação dos espermatídeos redondos para formar os espermatozoides) (Bloom and Fawcett, 1994; de Rooij and Russell, 2000; Holstein *et al*, 2003; Junqueira e Carneiro, 2004).

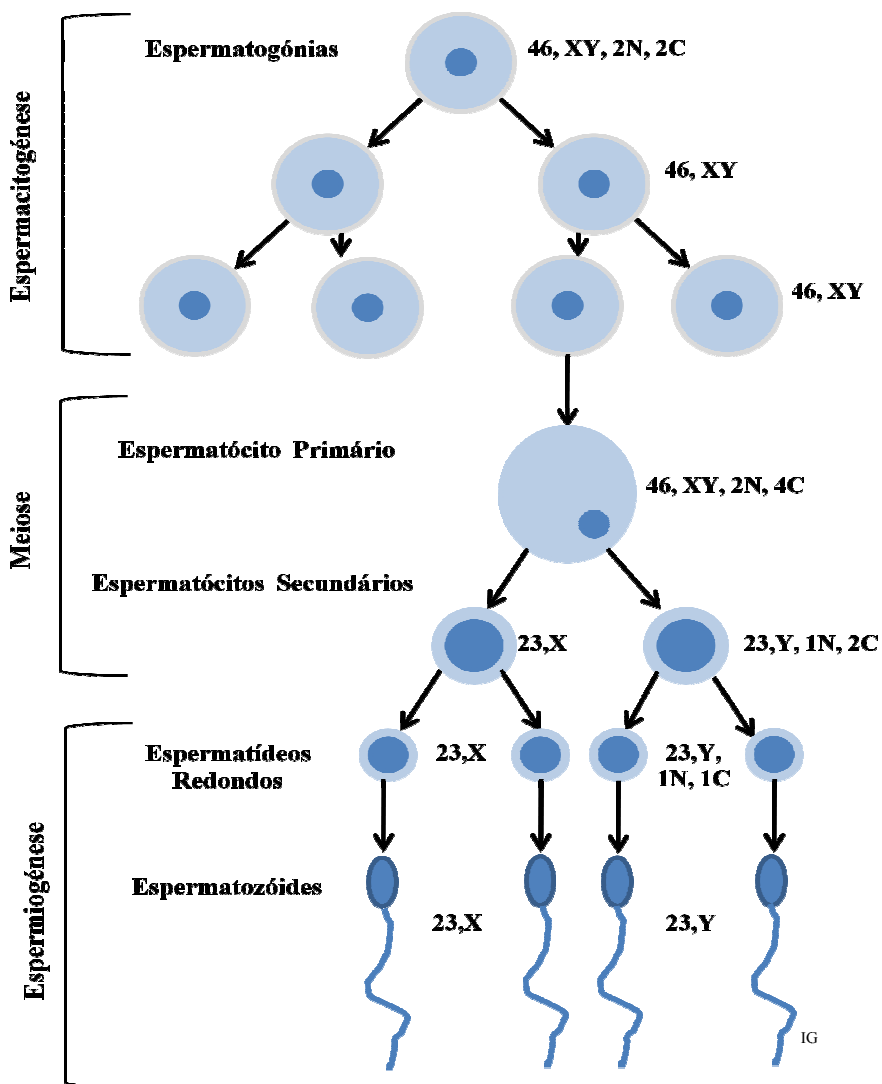


Figura 4- Esquema representativo das três fases da espermatogênese.

1.1.4.1. Espermacitogenése

No embrião masculino, as SC e as células germinativas primordiais da crista genital são incorporadas nos cordões sexuais, e mantêm-se aí até à maturidade, quando os cordões sexuais se recanalizam para formar os túbulos seminíferos. Após a chegada à gónada, as células germinativas primordiais dividem-se e formam as espermatogónias tipo A (Gilbert, 2000; Holstein *et al*, 2003).

Espermatogónias são todas as células germinativas diplóides, relativamente inespecializadas nos testículos maduros.

No homem, a espermatogónia A dark é aceite como a verdadeira espermatogónia estaminal, com funções de reserva regenerativa e que possuem, em condições normais, uma actividade mitótica baixa. Por outro lado, a espermatogónia A pale é reconhecida como a célula progenitora da linha germinativa masculina.

As espermatogónias A dark dividem-se por mitose para se renovarem a si mesmas, e para originarem uma linha celular diferenciada, as espermatogónias A pale (divisão assimétrica). As espermatogónias A pale sofrem uma série de mitoses para originar um número elevado de células filhas, as espermatogónias tipo B, que se diferenciam para formarem espermatócitos primários. As divisões celulares das espermatogónias são, usualmente, incompletas, dado que as células filhas continuam interligadas por pontes citoplasmáticas. Um clone derivado de uma célula estaminal forma, pois, um sincício de células. As pontes citoplasmáticas permitem a comunicação entre todas as células germinais, das espermatogónias ao espermatócitos secundários derivados da mesma espermatogónia (Holstein and Roosen-Runge, 1981; Bloom and Fawcett, 1994; de Rooij and Russell, 2000; Holstein *et al*, 2003; Junqueira e Carneiro, 2004; Ehmcke *et al*, 2006).

1.1.4.2. Meiose

A meiose é caracterizada por mudanças na configuração da cromatina no núcleo após a última divisão das espermatogónias. Este processo inclui duas divisões meióticas e vai originar os espermatídeos redondos.

1.1.4.2.1. Meiose I

Os espermatócitos primários replicam o seu DNA, possuindo por isso 46 cromossomas ($2N = 44 + XY$) e uma quantidade de DNA de 4C por célula. Estas

células entram rapidamente na profase da primeira divisão meiótica, onde a célula atravessa quatro fases: leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno. Estas fases são distinguidas pelas diferenças na forma e na relação dos pares de cromossomas homólogos e pelo seu grau de condensação. Na fase de leptóteno, o DNA dos espermatócitos replica e os cromossomas aparecem como filamentos muito finos não emparelhados. Seguidamente, os cromossomas homólogos emparelham, num processo denominado sinapse, correspondendo à fase de zigóteno. Na fase de paquíteno, os pares de cromossomas contraem, longitudinalmente, e ficam mais espessados e curtos. Os dois membros de cada par sináptico sofrem recombinação homóloga (*crossing-over*) e separam-se longitudinalmente, dando origem a quatro cromátides paralelas, as tétradas. A fase seguinte, diplóteno, é caracterizada pela manutenção dos pontos de *crossing-over*, locais onde os segmentos correspondentes aos pares de cromossomas foram trocados (quiasmas). A partir desta altura, o invólucro nuclear sofre fragmentação e as tétradas aproximam-se numa placa metafásica. Na anafase I, ocorre a separação dos cromossomas homólogos para os pólos opostos do fuso mitótico. No final da primeira divisão meiótica formam-se os espermatócitos secundários, que possuem apenas 23 cromossomas ($1N = 22 + X$ ou $22 + Y$), e uma redução parcial da quantidade de DNA por célula ($2C$).

A profase desta primeira divisão meiótica é bastante prolongada, demorando habitualmente 22 dias. Visto que a grande maioria das células do epitélio seminífero está nesta fase, num corte transversal do túbulo seminífero, estas podem ser visualizadas em todos os estádios.

1.1.4.2.2.Meiose II

Os espermatócitos secundários permanecem na interfase por pouco tempo, e a segunda divisão meiótica não acarreta replicação de DNA. A divisão dos espermatócitos secundários resulta em espermatídeos redondos, que são células haplóides com 23 cromossomas ($1N = 22,X$ ou $22,Y$) e $1C$ de quantidade de DNA por célula. Isto ocorre porque não se dá a síntese do DNA (fase S) entre a primeira e a segunda divisão meiótica dos espermatócitos. As duas divisões meióticas de cada espermatócito resultam em quatro espermatídeos redondos (Holstein and Roosen-Runge, 1981; Bloom and Fawcett, 1994; Hess, 1998; Holstein *et al*, 2003; Junqueira e Carneiro, 2004)

1.1.4.3. Espermiogénese

A espermiogénese é a última fase da produção dos espermatozóides, e é o processo pelo qual os espermatídeos redondos se transformam em células altamente especializadas na transmissão do DNA masculino para o ovócito feminino.

A cabeça do espermatozóide dos mamíferos é constituída pelo núcleo e pelo acrosoma, rodeados por uma pequena porção de citoplasma.

A biogénese do acrosoma é um processo lento e contínuo, que apenas fica completo no final da espermiogénese e inicia-se na fase de espermatócito primário (paquíteno), com a produção pelo complexo de Golgi de pequenas vesículas que contêm no seu interior um material denso ou grânulos pró-acrosómicos. Na fase de espermatídeo redondo as vesículas pró-acrosómicas da rede trans-Golgi fundem-se umas com as outras para produzir a vesícula acrosómica que se vai ligar ao invólucro nuclear na futura terminação anterior do espermatozóide. A vesícula acrosómica sofre então um alongamento para recobrir o hemisfério anterior do núcleo. Durante este processo as proteínas acrosómicas condensam numa estrutura paracristalina, o grânulo acrosómico, que posteriormente vai formar a matriz acrosómica no espermatozóide maduro. A vesícula acrosómica condiciona polaridade à célula, ao sinalizar a segregação da região nuclear (anterior), da região caudal ou flagelar (posterior).

Enquanto o acrosoma se forma, os centríolos migram para a região posterior da célula. Um dos centríolos (distal) inicia a formação do axonema do flagelo espermatozóide, enquanto o outro centríolo (proximal) se liga à região basal do invólucro nuclear. Em simultâneo, forma-se um feixe de mitocôndrias que se liga à face lateral do núcleo (manchette). Este feixe de mitocôndrias, por polimerização e despolimerização, alonga o núcleo e o citoplasma em direcção à base. No citoplasma basal, as mitocôndrias enrolam-se em torno da porção anterior do axonema para formarem a peça intermédia do espermatozóide, enquanto que os outros organelos se agrupam num bolsa de citoplasma residual (corpo residual).

A porção do citoplasma dos espermatídeos que não foi utilizada na formação do espermatozóide, é então libertada da célula como corpo residual, sendo este posteriormente eliminado por fagocitose pelas células de Sertoli. No final da espermiogénese, observa-se uma perda das pontes citoplasmáticas, levando à separação dos espermatozóides. Os

espermatozoides são então libertados das invaginações apicais das células de Sertoli através da lise da sua região apical. São

depois libertados do epitélio seminífero por um processo denominado espermição, e transportados para o epidídimo pelo fluido testicular produzido pelas células de Sertoli e pelas células da rede testicular.

O espermatozóide continua a desenvolver-se e a amadurecer (maturação) durante o seu percurso pelo epidídimo, até se transformar num espermatozóide maduro (Russel *et al.*, 1990; Eddy and O'Brien 1994; Bloom and Fawcett, 1994; Junqueira e Carneiro, 2004).

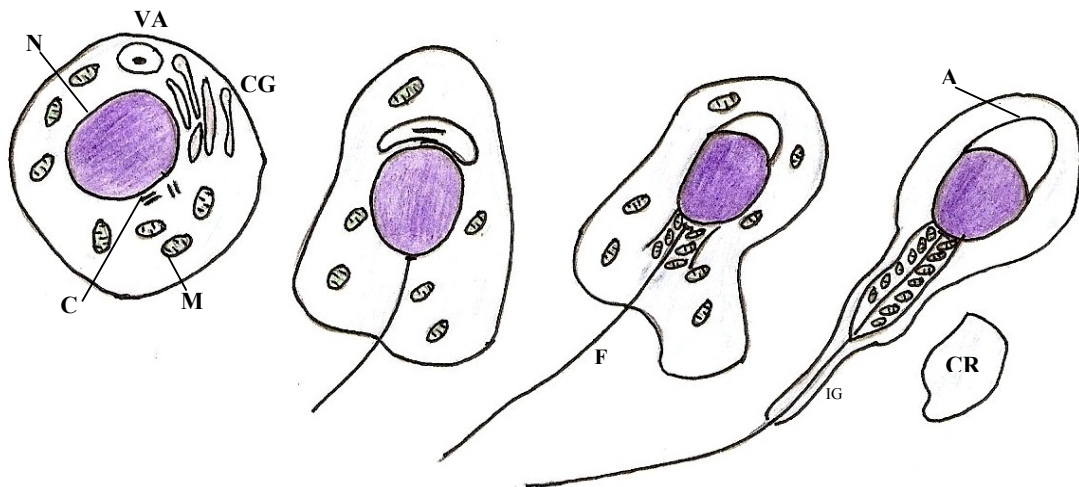


Figura 5 – Desenho esquemático da espermiogénese. N- Núcleo, M – Mitocôndria, C – Centríolo, CG – Complexo de Golgi, VA – Vesícula acrosômica, A- Acrosoma, F – Flagelo e CR- Corpo Residual.

1.1.4.4. Espermatozóide

Os espermatozóides são células altamente especializadas e condensadas que não crescem nem se dividem. O espermatozóide é constituído pela cabeça, que contém a informação hereditária paterna (DNA), e pela cauda, ou flagelo, que permite a mobilidade celular. O flagelo é constituído por três regiões: a peça intermédia, situada logo a seguir à cabeça, a peça principal e a peça terminal (Bloom and Fawcett, 1994; Hoogendijk *et al.*, 2007).

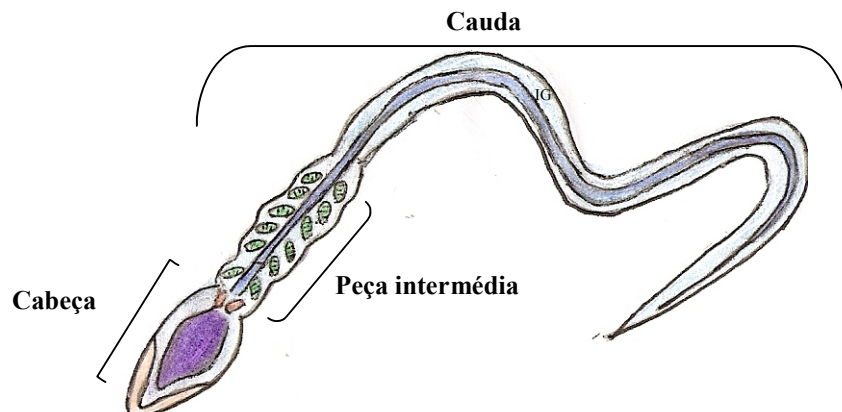


Figura 6 – Desenho representativo de um espermatozóide.

1.1.5. Caracterização Citomorfológica das células germinais masculinas

A caracterização das células germinais masculinas é feita sobretudo com base nas suas características nucleares, em especial quando coradas com um corante nuclear, a Hematoxilina.

1.1.5.1. Espermatogónias

No homem podem ser identificados os seguintes tipos de espermatogónias, que se encontram fortemente ligadas à lâmina basal:

A espermatogónia A dark (Ad) possui um núcleo esférico ou ovóide com cromatina homogénea, finamente granular e fortemente corada. No centro do núcleo encontra-se uma região pálida, e que, em alguns casos, tem um nucléolo no seu interior. O seu citoplasma é claro e não cora eosina.

A espermatogónia A pale (Ap) é caracterizada por um núcleo ovóide, com cromatina fina mas uniformemente granular e pálida. Pode ter um ou dois nucléolos localizados junto ao invólucro nuclear. O citoplasma desta célula é cromofóbico, tendo habitualmente, uma cor pálida.

A espermatogónia B é caracterizada por um núcleo esférico, com grânulos de cromatina finos e densos. Alguns dos grânulos, fortemente corados, aderem ao invólucro. Possui um nucléolo central rodeado por grumos de cromatina. O citoplasma é pálido, sendo cromofóbico.

1.1.5.2. Espermatócitos

Os espermatócitos em pré-leptóteno, têm um núcleo esférico com granulações de cromatina pálida e escura. Este tipo de células é bastante difícil de distinguir das espermatogónias B, especialmente quando estão localizados perto da lâmina basal.

Os espermatócitos em leptóteno são caracterizados por terem um núcleo com cromossomas filamentosos, muito finos e densamente corados, e por se encontrarem afastados da lâmina basal.

Os espermatócitos em zigóteno possuem um núcleo com cromossomas longos e emparelhados. Podem também apresentar uma configuração especial onde os cromossomas se acumulam num dos lados do núcleo.

Os espermatócitos em paquíteno contêm um núcleo que aumenta progressivamente de volume. Os cromossomas ficam mais espessos e curtos, devido ao processo de espiralização e aparece um grande nucléolo.

Na fase de diplóteno, que é muito curta, os cromossomas estão ainda mais espessos e contraídos. Após a primeira divisão de maturação, os espermatócitos primários dão origem aos espermatócitos secundários

Os espermatócitos secundários possuem um núcleo bastante mais pequeno do que o dos paquítenos. O núcleo é esférico com uma cromatina bem corada e com várias massas grandes, cromofílicas e globulares. Esta célula nem sempre é fácil de distinguir dos espermatídeos redondos, dado que completa rapidamente a segunda divisão de maturação para produzir espermatídeos.

1.1.5.3. Espermatídeos

O espermatídeo redondo, Sa₁, é caracterizado por um núcleo esférico e central, com uma cromatina pálida e granular com poucos grânulos cromofílicos. Na superfície apical do núcleo, é algumas vezes visível uma ou mais vesículas pró-acrosómicas. Esta célula possui um pequeno citoplasma à volta do núcleo e ainda não possui um flagelo visível.

O espermatídeo redondo Sa₂ é definido por um núcleo central com cromatina homogénea e densamente corada. O núcleo perde a sua forma redonda e começa a alongar-se, começa a aparecer um pequeno flagelo.

O espermatídeo Sb possui um núcleo ligeiramente alongado com a cromatina mais fortemente corada, e um flagelo visível. Se o núcleo se mantém numa posição central é classificado com Sb₁, caso o núcleo seja mais ovalado localizado na periferia da célula é referido com Sb₂.

O espermatídeo Sc tem um núcleo alongado e fortemente corado, com uma porção cónica apical coberta pela vesícula acrosómica, ocupando cerca de metade do núcleo e não corada, e uma porção globular caudal que atingiu o seu comprimento máximo e rodeia um flagelo visível. O núcleo, fortemente corado, encontra-se direccionado para a lâmina basal, e o citoplasma encontra-se ausente na zona mais apical da vesícula acrosómica.









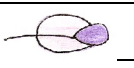





O espermatídeo Sd₁ contém um núcleo que sofreu condensação da cromatina e compressão dorso-ventral e diminuiu o seu tamanho, a vesícula ocupa agora mais de metade do núcleo. Esta célula ainda possui um corpo citoplasmático abundante ligado à região caudal ou posterior do núcleo e ao flagelo. O espermatídeo Sd₂ é caracterizado por

um núcleo idêntico ao d₁, mas a célula descartou a maioria do seu citoplasma, encontrando-se apenas no pólo posterior do núcleo (Clermont, 1963; Heller and Clermont, 1964; Sousa *et al.*, 1999).

1.1.6. O Ciclo do Epitélio Seminífero

As células germinais possuem uma predisposição inequívoca para formar associações celulares de composição fixa. Em cada região do epitélio seminífero, a mesma associação típica de células germinais nos humanos aparece a cada 16 dias. Este espaço de tempo é denominado Ciclo do epitélio seminífero. No homem foram descritas seis associações celulares, que foram denominadas estadios do ciclo do epitélio seminífero (tabela 1).

Tabela 1 - Associações celulares em cada estadio do ciclo seminífero.

		Estadios do Ciclo Seminífero					
		I	II	III	IV	V	VI
SGA d		+	+	+	+	+	+
SGA p		+	+	+	+	+	+
SGB		+	+	-	-	-	-
ST1 LEP		-	-	+	+	+	-
ST1 ZIG		-	-	-	-	-	+
ST1 PAQ		+	+	+	+	+	-
ST2		-	-	-	-	-	+
Sa ₁		+	+	-	-	-	-
Sa ₂		-	-	+	-	-	-
Sb		-	-	-	+	-	-
Sc		-	-	-	-	+	+
Sd ₁		+	-	-	-	-	-
Sd ₂		-	+	-	-	-	-
Sz		-	-	-	-	-	-

O processo da espermatogénese não ocorre simultaneamente e sincronizadamente em todos os túbulos seminíferos e ao longo do mesmo túbulo. Desta forma, diferentes áreas do mesmo túbulo, assim como secções de diferentes túbulos, exibem diferentes estádios do ciclo seminífero.

São necessários 4.6 ciclos para uma espermatogónia A desenvolver um espermatídeo maduro, o que corresponde a cerca de 74 dias. Este espermatídeo é transportado através do epidídimo durante 12 dias, sendo assim necessário cerca de 86 dias para completar todo o ciclo espermatogénético (Clermont, 1963; Heller and Clermont, 1964; Holstein *et al*, 2003; Junqueira e Carneiro, 2004).

1.1.7. Células estaminais e progenitoras germinativas

As células estaminais adultas são definidas pela sua função, e todas estas células partilham pelo menos duas características: são capazes de se auto-renovarem, mantendo a sua própria população, e de originarem células filhas com capacidade de diferenciação. Estas células não originam directamente células diferenciadas, elas fazem-no indirectamente através de células progenitoras que são um grupo de células intermédias que se encontra, normalmente, inserido entre as células estaminais e as diferenciadas. As células progenitoras possuem uma actividade mitótica bastante elevada, necessária para a expansão da sua própria população e para produzir as células filhas diferenciadas finais, imprescindíveis para a homeostasia dos tecidos. Ao contrário destas células, as células estaminais possuem uma actividade mitótica baixa produzindo um número reduzido de células progenitoras.

Na linha germinativa masculina, a função principal das células progenitoras é a elevada produção de células filhas diferenciadas que são obrigatórias para a produção diária e contínua de milhões de espermatozóides.

As espermatogónias mantêm o seu número por auto-renovação e dão origem a células germinativas diferenciadas. Das espermatogónias, a maioria das células diplóides germinativas são espermatogónias diferenciadas, que sofrem diversas divisões mitóticas antes de entrarem na profase meiótica (Ehmcke *et al.*, 2006 a, b; Ehmcke and Schlatt, 2006).

As espermatogónias podem ser reconhecidas e estudadas ao nível celular no que diz respeito à proliferação, diferenciação e à regulação das suas actividades. Contudo, a complexidade do epitélio seminífero dificulta os estudos dos aspectos moleculares da regulação do comportamento das espermatogónias estaminais devido à presença de vários tipos celulares que complicam a purificação das espermatogónias estaminais.

No epitélio seminífero normal, a razão entre a auto-renovação e a diferenciação das espermatogónias estaminais deve ser aproximadamente 1.0. Mais auto-renovação do que diferenciação reduziria o epitélio seminífero a apenas células estaminais, o que poderia originar um tumor. Se a diferenciação prevalecer, as células estaminais diminuiriam drasticamente o seu número, levando a túbulos seminíferos com apenas células de suporte, as células de Sertoli (Rooij, 2001).

1.1.8. Função das Hormonas na Espermatogénese

A espermatogénese é um processo dependente de hormonas, sendo estas críticas para a regulação do desenvolvimento das células germinais, para a proliferação e para o funcionamento das células somáticas. Nos testículos, as gonadotropinas, como a FSH (Follicle Stimulating Hormone), são críticas no início da espermatogénese, e a FSH e a testosterona são necessárias para a diferenciação das células germinais. Uma vez que as células germinais não possuem receptores para a FSH e testosterona, os sinais hormonais são transmitidos pelas células de Sertoli e pelas células peritubulares. Nos homens a expressão do receptor da FSH (FSH-R) encontra-se limitada às células de Sertoli, enquanto que os receptores para a LH (hormona luteinizante) são encontrados sobretudo nas células de Leydig (Holdcraft and Braun, 2004; Sá *et al.*, 2007).

1.1.8.1. FSH

A FSH é uma glicoproteína secretada pela hipófise anterior (Figura 7). Actua directamente sobre as células de Sertoli levando à acumulação da adenosina monofosfato cíclica, que, por sua vez, activa a transcrição de vários genes. Induz a activação da proteína cinase A e a produção de lactato, este último, essencial para a síntese do RNA nos espermatócitos, e a síntese da transferrina, e da proteína de ligação ao androgénio,

necessária para mediar a acção da testosterona nas células germinais bem como a síntese proteica e a transcrição de RNA, incluindo a expressão do *Stem cell factor* (SCF).

Na espermatogénese, a FSH previne a degeneração celular e estimula a proliferação e conversão das espermatogónias em espermatócitos em pré-leptóteno. Esta hormona também modela as divisões meióticas, previne a apoptose dos espermatócitos em paquíteno e dos espermatídeos redondos. Contudo, existem controvérsias quanto à sua função na maturação dos espermatídeos redondos, alguns autores reivindicando um efeito inibidor e outros um efeito estimulador.

No homem, esta hormona permite recuperar a espermatogénese, nos casos em que há supressão de gonadotropinas (reviewed in Sá *et al.*, 2007).

1.1.8.2. Testosterona

A Testosterona é secretada pelas células de Leydig, sobre a influência da LH e liga-se aos receptores de androgénio intracitoplasmáticos das células de Sertoli, que vão estimular a transcrição (Figura 7). A testosterona é 50 a 100 vezes mais concentrada nos testículos do que no soro, e níveis baixos ou mesmo intermédios do que este valor, levam à inibição da espermatogénese, o mesmo mudando com níveis excessivamente elevados.

A sua principal função é induzir e controlar a maturação dos espermatídeos redondos e a sua conversão para espermatídeos alongados. Para além disso, é também necessária na sobrevivência das células germinais, na indução da proliferação das espermatogónias, na diferenciação dos espermatócitos e na meiose.

A FSH e a testosterona regulam a espermatogénese sinergeticamente, estando a maioria das suas acções mediadas por intermediários secretados por tecidos extratesticulares sensíveis ao androgénio, esteróides locais ou outros factores parácrinos produzidos como resposta às hormonas pituitárias. A remoção destas hormonas induz a apoptose das células germinais, o que sugere que ambas hormonas actuam como factores de sobrevivência das células germinais (Holdcraft and Braun, 2004; Huleihel *et al.*, 2007; Sá *et al.*, 2007; Sofikitis *et al.*, 2008).

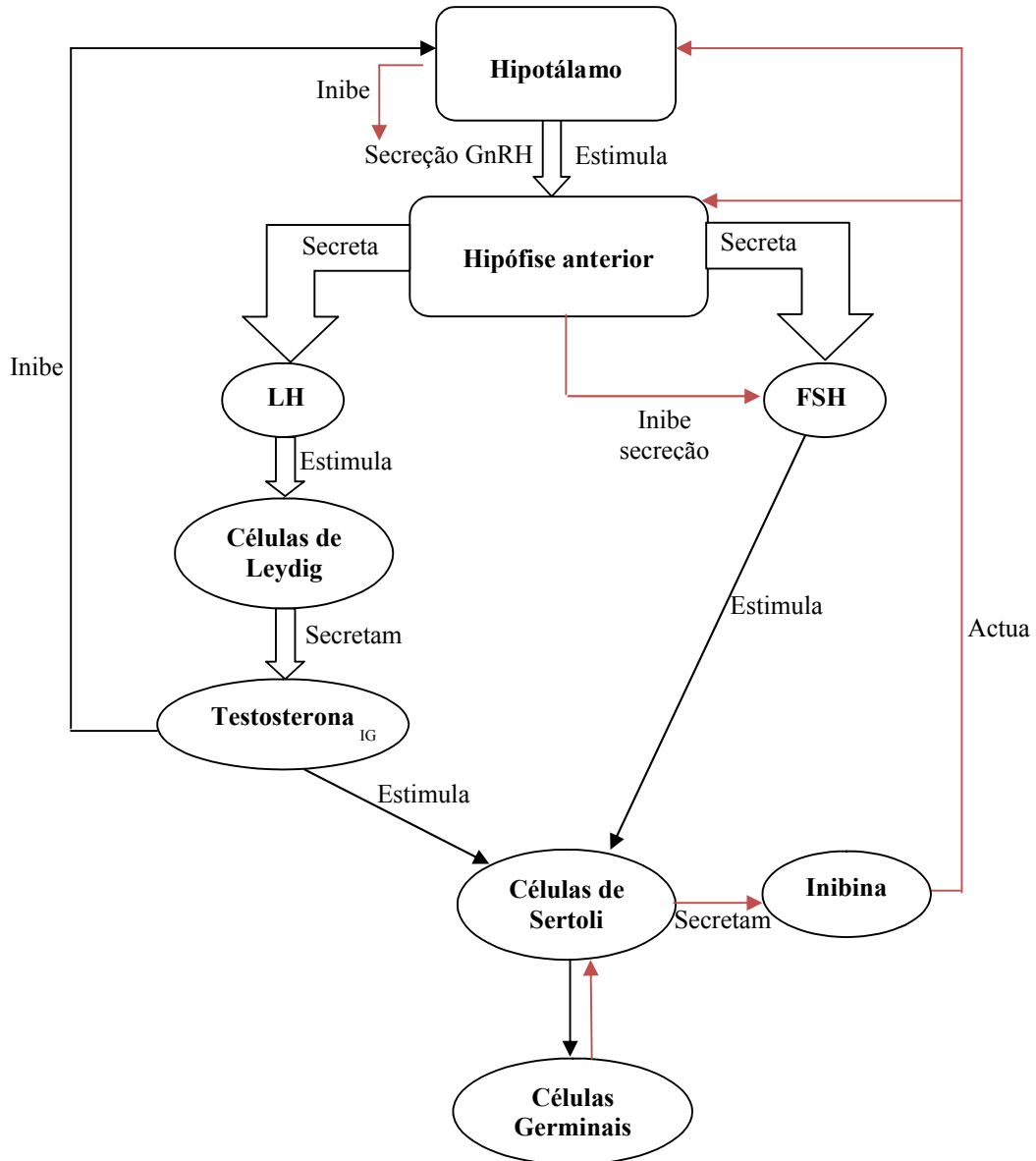


Figura 7 – Esquema representativo da regulação hormonal da espermatogénese. GnRH – Hormona libertadora de Gonadotropinas, LH – Hormona Luteinizante, e FSH - Hormona Folículo-Estimulante.

Foi provado que ambas as hormonas afectam a espermatogénese, não só *in vivo* mas também *in vitro*.

Estudos *in vivo*, com doentes com oligozoospermia tratados durante 3 meses com FSH, demonstraram que após o tratamento houve um aumento da população de espermatogónias e espermátocitos (Foresta *et al.*, 1998). Um estudo mais recente, utilizando biópsias testiculares de homens normais sujeitos à supressão das gonadotropinas, revelou que estas actuam como factores de sobrevivência das

espermatogónias, regulando a via intrínseca da apoptose mas não têm qualquer efeito sobre a proliferação celular, em homens normais (Ruwanpura *et al.*, 2008).

Estudos utilizando cultura *in vitro* de células germinais humanas, de doentes com paragem mitótica, suplementadas com altas concentrações de FSH e testosterona mostraram que a espermatogénese poderia ocorrer relativamente rápido, *in vitro*, dado que as células passaram por diferenciação trans e pós meiótica, originando espermatídeos redondos. Contudo, os gâmetas resultantes desta experiência foram morfológicamente anormais (Tesarik *et al.*, 1998). Uma experiência posterior, mostrou que a FSH induz a entrada das espermatogónias na meiose com subsequente estimulação da espermiogénese, usando co-culturas de células germinais humanas com células de Sertoli, sendo este efeito acentuado na presença de testosterona (Sousa *et al.*, 2002)

1.2. Cultura Celular

Nos homens, a eficácia da espermatogénesse parece ser relativamente baixa comparando com outras espécies, especialmente devido à perda de espermátócitos (Johnson *et al.*, 1992; Chaturvedi and Johnson, 1993).

A indução *in vitro* das alterações meióticas e pós-meióticas das células germinais masculinas tem sido alvo de várias investigações, desde a década de 60. Contudo, até à data, a criação de um sistema de cultura ideal, onde as espermatogónias estaminais possam ser mantidas e direccionadas para proliferar, sofrer meiose e completar a espermiogénesse não existe, o que se deve, maioritariamente, a dificuldades no isolamento e purificação de subpopulações de células germinais e ao estabelecimento de linhas celulares de células germinais masculinas. Este problema deve-se também ao facto de a espermatogénesse depender em grande parte do arranjo das associações celulares. Para além disso, não existe um conhecimento consensual sobre as condições bioquímicas óptimas em culturas a longo prazo que promovam a sobrevivência e a diferenciação das células germinais (Steinberger, 1975; Kierszenbaum, 1994; Sofikitis *et al.*, 2005; Sá *et al.*, 2007).

Apesar da investigação na espermatogénesse *in vitro* de mamíferos decorrer já há bastantes anos, tendo sido realizadas várias abordagens técnicas, ainda não existe um consenso na actual capacidade das células da espermatogénesse humana se dividirem e diferenciarem em cultura e no papel que as hormonas representam nestes processos.

O estudo dos sistemas *in vitro* pode potenciar o desenvolvimento de um meio de cultura mais eficiente, que possa servir de modelo para facilitar o isolamento de populações de células altamente purificadas, de forma a permitir o estudo da expressão genética e das vias sinalizadoras das células germinais. Estes sistemas podem ainda fornecer uma alternativa para desenvolver estratégias de terapia génica, que poderiam substituir a experimentação animal e ou ensaios clínicos preliminares *in vivo*. Várias tentativas têm sido feitas com esse fim.

Nos roedores, fragmentos de túbulos seminíferos, preservando o contacto entre as células germinais e as células de suporte, podem ser mantidos viáveis em cultura por vários meses com condições de 32°C de temperatura, 5% de CO₂ em ar, um pH de 7.2, na presença de vitaminas, aminoácidos, piruvato de sódio e 10% de soro fetal de bezerro. Após três semanas, contudo, verificou-se que apenas as células de Sertoli permaneciam

viáveis, enquanto que as espermatogônias e os espermatócitos tinham degenerado e não tinha ocorrido formação de espermatídeos redondos. O mesmo estudo foi aplicado em cultura de órgão de túbulos seminíferos humanos, e foi verificado que as células de Sertoli, as espermatogônias A pale e os espermatócitos sobreviviam pelo menos três semanas em cultura, enquanto que os espermatídeos degeneravam após poucos dias de cultura. Após quatro semanas, apenas as espermatogônias A pale e as células de Sertoli permaneciam viáveis (Steinberger *et al.*, 1964; Steinberger, 1967).

Outras experiências, usando cultura *in vitro* de segmentos de túbulos seminíferos de ratos mostraram que os espermatócitos em paquíteno terminaram a meiose I em dois a quatro dias, formando espermatócitos secundários. Estes terminaram a meiose II em dois a três dias, originando espermatídeos redondos. Estas experiências foram efectuadas sem a presença de hormonas, sugerindo os autores que os paquítenos mais avançados teriam toda a informação necessária para ambas as divisões meióticas e para o início da espermiogénese. Posteriormente, os mesmos autores utilizaram a cultura de órgão para mostrar que os espermatócitos em pré-leptóteno evoluíam para espermatócitos em zigóteno em três dias, e estes em paquíteno em sete dias. Mostraram, ainda, que eram necessários sete dias para os espermatócitos em paquíteno tardio evoluírem para espermatídeos redondos. O processo de maturação de espermatídeos redondos em alongados demorou cerca de quatro dias, mas originou células bastante anormais (reviewed in Sá *et al.*, 2007).

Um outro estudo, usando cultura de células de Sertoli e células germinais diplóides dissociadas, de rato, suplementada com vitaminas, FSH e testosterona, demonstrou que os espermatócitos em paquíteno se conseguiam diferenciar em espermatócitos secundários e depois em espermatídeos redondos, completando assim as duas divisões meióticas *in vitro* (Hue *et al.*, 1998). Estudos posteriores, com cultura de órgão, de rato, não suplementada com hormonas e com apenas 0,2% de soro fetal de bezerro, durante 4 semanas, demonstraram que era possível obter proliferação celular e diferenciação desde espermatogónia até espermatídeo redondo *in vitro*, com manutenção da morfologia normal das células, ao fim das 4 semanas. Contudo, também foi verificado uma perda substancial de células, ao longo da cultura, em especial espermatogônias e espermatócitos primários, bem como degeneração dos espermatídeos ao fim de 28 dias de cultura (Staub *et al.*, 2000).

Em humanos, a cultura *in vitro* do epitélio seminífero normal é ainda uma temática pouco explorada.

Num estudo inicial, que utilizou cultura de túbulos seminíferos humanos, foi verificado que os espermatócitos eram capazes de se desenvolver *in vitro*, desde a síntese de DNA até ao final da segunda divisão meiótica (Ghatnekar, 1974).

Mais recentemente, culturas de células de Sertoli com células germinais diplóides, de doentes inférteis, foram colocadas em cultura num meio com células Vero e suplementado com um substituto sintético do soro, FSH e testosterona demonstrando que ao fim de 2 a 3 semanas se tinham originado espermatídeos redondos e estes se diferenciaram em espermatídeos alongados (Sousa *et al.*, 2002).

Estudos recentes testaram a cultura de fragmentos de túbulos seminíferos humanos durante duas semanas, com o meio de cultura suplementado com piruvato de sódio, vitaminas, 10% de soro fetal de bezerro e hormonas (FSH e HCG) em atmosfera humidificada com 5% de CO₂ e a 34°C. Os autores verificaram uma perda gradual das células germinais meióticas e pós-meióticas ao longo da cultura e independentemente da presença de gonodotropinas. Contudo todas as células germinais se encontravam presentes por mais de 16 dias, algumas das quais continuavam a dividir e a diferenciar a um nível compatível com a situação *in vivo*. Em suma, os autores verificaram uma manutenção da arquitectura do tecido, associada a níveis quantificáveis de vários marcadores de células somáticas (Roulet *et al.*, 2006).

Uma outra experiência, englobando cultura celular *in vitro* evidenciou que as células estaminais e progenitoras germinativas eram capazes de proliferar, os espermatócitos completar a meiose I (2 a 3 dias) e a meiose II (2 a 3 dias) e diferenciar-se em espermatídeos redondos tardios, em alongamento e alongados, em tempos similares aos *in vivo* em resposta à estimulação hormonal com FSH e testosterona (Sá *et al.*, 2008).

As experiências *in vitro* da espermatogénese de mamíferos revelaram que a maioria das células degenera muito rapidamente, em especial se há perda do contacto com as células de Sertoli. Os melhores resultados obtidos dão-se quando o contacto se mantém, o meio é suplementado com hormonas (FSH e testosterona), factores de crescimento e vitaminas, e é mudado regularmente (Sá *et al.*, 2007).

1.2.1. Breve Introdução ao Ciclo Celular

A principal função do ciclo celular é duplicar correctamente a vasta quantidade de DNA presente nos cromossomas e seguidamente segregá-las em duas células filhas geneticamente idênticas. O ciclo é composto por duas fases principais: a fase S (S de síntese), e a fase M (M de mitose). A duplicação dos cromossomas ou DNA ocorre durante a fase S e requer metade do tempo do ciclo celular de uma célula mamífera típica. Na fase M, os cromossomas replicados são segregados em núcleos individuais (mitose), e posteriormente a célula divide-se em duas, num processo denominado citocinese.

A maioria das células necessita de mais tempo para crescer e duplicar a sua massa de proteínas e organelos do que requerem para replicar o seu DNA e se dividirem. Existem fases intermédias na maioria dos ciclos celulares que fornecem às células mais tempo para o seu crescimento: a fase G₁, situada entre a fase M e a fase S, e a fase G₂, entre a fase S e a fase M. Assim, o ciclo celular eucariota é, tradicionalmente, dividido em quatro fases sequenciais: G₁, S, G₂ e M. Em conjunto, as fases G₁, S e G₂ são denominadas de interfase. Numa típica célula humana a proliferar em cultura, a interfase pode demorar cerca de 23 horas, de um ciclo celular de 24 horas, em que a hora restante é ocupada pela fase M (Alberts *et al.*, 2007b).

1.2.2. Proliferação Celular

Ao contrário das células em mitose e citocinese, que podem ser facilmente observadas e identificadas ao microscópio, as células em fase S não podem ser estudadas por uma simples observação. Contudo, podem ser reconhecidas adicionando-lhes moléculas que se incorporam no DNA recém-sintetizado, como ³H-timidina ou o análogo sintético da timidina, a Bromodeoxiuridina (BrdU). Os núcleos das células que incorporarem ³H-timidina são visualizados por autoradiografia, enquanto os que incorporarem BrdU são detectados com anticorpos anti-BrdU (Alberts *et al.*, 2007a, b).

A proliferação celular pode ser ainda estudada através da expressão do PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) e do Ki-67 e pela detecção do mRNA das Histonas. Contudo, estas análises são menos sensíveis e possuem mais limitações do que o uso da BrdU (Muskhelishvili *et al.*, 2003).

A Bromodesoxiuridina (5-bromo-2-deoxyuridine, muitas vezes abreviada como BrdU, BudR ou BrdUrd, é um nucleosídeo halogenado análogo da timidina, utilizado na detecção de células proliferativas em tecidos vivos (Figura 8).

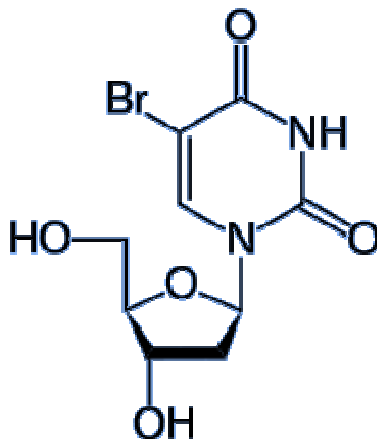


Figura 8 - Fórmula química do composto 5-bromo-2-deoxuridina.

O BrdU pode ser incorporado permanentemente no DNA recém-sintetizado de células em divisão durante a fase S do ciclo celular, substituindo a timidina durante a replicação do DNA.

A detecção do BrdU é efectuada por imunohistoquímica, usando anticorpos contra este químico, *in vitro* ou *in vivo*, permitindo assim, a identificação das células que se estavam a dividir durante o período de exposição ao composto.

Uma vez que o BrdU consegue substituir a timidina durante a replicação do DNA, pode causar mutações, sendo assim a sua utilização um potencial risco para a saúde, pelo que apenas é usado experimentalmente.

Habitualmente, numa população de células que proliferam rapidamente, mas de forma assíncrona, cerca de 30-40% estarão na fase S a qualquer momento, e tornar-se-ão marcadas por um breve pulso de ³H-timidina ou BrdU. Da proporção de células desta população que se encontram marcadas, pode-se estimar a duração da fase S como uma fracção da duração de todo o ciclo celular. Da mesma forma, a partir da proporção das células em mitose pode-se estimar a duração da fase M. Assim, ao dar um pulso de ³H-timidina ou BrdU e permitindo que estas continuem o ciclo celular por períodos mensuráveis de tempo, pode-se determinar quanto tempo leva para que uma célula na fase S progrida através da G2 para a fase M, através da fase M para a fase G1 e finalmente da fase G1 até à fase S.

O BrdU pode ser utilizado nas mesmas situações onde anteriormente se utilizava a ^3H -timidina. Em algumas situações, a utilização do BrdU em detrimento da ^3H -timidina é preferível, enquanto que em outras é limitante. O BrdU pode ser detectado muito rapidamente. A Imunohistoquímica para o BrdU é altamente reprodutível demorando cerca de um dia, enquanto que a autoradiografia para a detecção da ^3H -timidina é mais variável e tipicamente requer semanas de exposição. A marcação com BrdU revela detalhes acerca da morfologia nuclear enquanto que a autoradiografia com a ^3H -timidina não. Em contraste, na autoradiografia da ^3H -timidina é possível contar grânulos de prata da marcação o que permite pesquisar o número de divisões celulares que a célula sofreu desde que a ^3H -timidina foi incorporada. Diferenças no grau de marcação da imunohistoquímica para o BrdU, embora algumas vezes sejam aparentes, não são marcadores de confiança do número de divisões pelos quais a célula passou. Devido ao seu grupo bromino, o BrdU é potencialmente mais tóxico para a célula do que a ^3H -timidina.

Estudos em células neuronais revelaram que, *in vitro*, o BrdU pode integrar-se em células apoptóticas, como resultado, presumivelmente da lesão e reparação do DNA. Contudo, o padrão de marcação é diferente do das células em divisão mitótica, apresentando-se como escasso pontilhado nuclear em lugar de uma marcação difusa (Lin and Allison, 1993; Alberts *et al.*, 2007a, b; Magavi and Macklis, 2008).

1.2.3. Proliferação Celular na Espermatogénese

Durante a espermatogénese, o controlo da proliferação celular é de importância fundamental, assumindo mecanismos altamente coordenados entre as SC mitoticamente inactivas e as células germinais que sofrem mitose e meiose. A eficiência da espermatogénese depende da actividade proliferativa das espermatogónias e da perda de células germinais durante a meiose e a espermiogénese.

Distinguir as diferenças das células germinais em cultura é difícil, quando baseada apenas nas suas características histológicas, dado que no tecido inicial estão presentes todos os estadios das células germinais.

Nos humanos, o estudo da proliferação na espermatogénese foi primariamente efectuado pelo método de marcação com ^3H -timidina e autoradiografia. Como a síntese de DNA termina antes do estadio de leptóteno as células dos estadios iniciais incorporam a ^3H -timidina apenas durante um certo período de tempo, enquanto que a marcação dos

estádios mais avançados apenas reflectem a proliferação e diferenciação daquelas células iniciais. Desta forma, por autoradiografia, é possível seguir o destino de células em cultura (Steinberger, 1975).

Um estudo utilizou a marcação com ^3H -timidina em *whole mounts* (fragmentos) de túbulos seminíferos humanos, para avaliar a actividade mitótica das espermatogónias, e demonstrou que apenas algumas espermatogónias, dentro de uma mesma colónia, apareciam marcadas. Os autores sugeriram que este facto indicava falta de sincronia na actividade mitótica, explicando a distribuição irregular das associações celulares nos túbulos seminíferos humanos (Chowdhury, 1971).

Uma grande parte dos estudos realizados com a incorporação da ^3H -timidina nos humanos, tinham por objectivo verificar a evolução das células em diferentes meios de cultura (Steinberger and Steinberger, 1967; Ghatnekar, 1974; Steinberger 1975). Steinberger utilizou a ^3H -timidina para verificar se os espermatócitos apenas sobreviveram ou se houve formação de novos espermatócitos durante o período de cultura. Após 40 horas de exposição à ^3H -timidina encontraram espermatócitos em pré-leptóteno marcados, após uma semana verificaram que esses pré-leptótenos tinham evoluído para leptótenos e zigótenos, e após 2 e 3 semanas as células marcadas correspondiam a espermatócitos em paquíteno, concluindo assim, que os pré-leptótenos eram capazes de diferenciar *in vitro* em espermatócitos em paquíteno (Steinberger and Steinberger, 1967). Ghatnekar utilizou um sistema de cultura de órgão, de túbulos seminíferos humanos, com exposição durante 75 a 90 minutos à ^3H -timidina, encontrando ao fim de 14 dias células marcadas em pró-metáfase I, metáfase I, profase II e telofase II, concluindo assim, que os espermatócitos eram capazes de se desenvolver *in vitro*, desde a síntese de DNA até ao final da segunda divisão meiótica (Ghatnekar, 1974).

Heller e Clermont, usaram também esta técnica para determinar a duração da espermatogénese no homem e mostraram que um ciclo do epitélio seminífero demora pelo menos 16 dias, e toda a espermatogénese foi estimada em 64 dias. Utilizaram, ainda, este método para verificar a influência das hormonas na espermatogénese e concluindo que tanto uma hormona esteróide (norethandrolone) como a gonodotropina coriónica não possuem efeitos no nível de desenvolvimento das células germinais no homem (Heller and Clermont, 1963; Heller and Clermont, 1964).

Tal como com a incorporação de ^3H -timidina, a incorporação do BrdU é também comumente utilizada por alguns autores para verificar a evolução das células em diferentes meios de cultura (Weiss *et al.*, 1997; Izadyar *et al.*, 2003, Roulet *et al.*, 2006; Sá *et al.*, 2008). A detecção imunohistoquímica do BrdU incorporado tem resultados similares à localização por autoradiografia das células testiculares em fase S, possuindo ainda as vantagens de ser uma técnica não-radioactiva e permitir uma diminuição do longo tempo consumido pelos procedimentos técnicos. É, pois, uma técnica rápida, confiável e específica para demonstrar as células na fase S (Thoolen, 1990).

O uso do BrdU foi demonstrado ser uma técnica eficaz, precisa e rápida no estudo dos aspectos cinéticos da espermatogénese e na determinação da duração do ciclo celular em ratos e macacos, sendo uma abordagem apropriada para o estudo da eficácia da proliferação das células germinais no testículo (Rosiepen *et al.*, 1994, Rosiepen *et al.* 1997, Ehmcke *et al.*, 2005 a,b).

Nos macacos, após uma exposição de 3h ao BrdU, foi detectada marcação nas espermatogónias B e nos espermátocitos iniciais (pré-leptótenos, leptótenos e zigótenos). Ao fim de dez dias de exposição, as células positivas encontravam-se no estadió de paquítenos. As células peritubulares e intersticiais raramente foram positivas e as células de Sertoli foram sempre negativas para o BrdU. Estes autores estimaram o ciclo seminífero nesta espécie durava cerca de 10.47 ± 0.07 dias (Rosiepen *et al.*, 1997). Um outro estudo, em macacos, comprovou que a marcação das células pré-meióticas com BrdU é de facto um método eficaz para determinar a evolução destas células para células pós-meióticas, pois verificaram que 3h após a incorporação apenas as espermatogónias e os espermátocitos iniciais tinham marcação positiva, após 9 dias o BrdU encontrava-se localizado nos espermátocitos paquítenos e, ao fim de 18 dias, nos espermátódeos redondos (Weinbauer *et al.*, 1998).

Uma experiência posterior, utilizou o BrdU para analisar o papel da testosterona e da FSH na proliferação e diferenciação das espermatogónias A pale, no macaco Rhesus, e concluiu que a proliferação das espermatogónias A pale ocorre de forma independente das gonadotropinas enquanto que a sua diferenciação em espermatogónias B é absolutamente dependente de gonadotropinas e pode ser induzida quer pela FSH quer pela Testosterona não havendo diferenças significativas entre o tratamento com cada uma das hormonas separadamente, mas sendo o efeito da combinação de ambas mais eficiente. Este estudo

demonstrou ainda que menos de 2.5% das espermatogónias A dark incorporaram o BrdU, sugerindo os autores que os resultados obtidos vão de encontro à teoria de que este tipo celular corresponde às células estaminais de reserva (Marshall *et al.*, 2005).

Estudos recentes utilizaram o BrdU para detectar a existência de padrões de clones na proliferação e diferenciação das espermatogónias nas espécies *Macaca mulatta* e *Callithrix jacchus*, recorrendo à cultura de órgão e utilizando *whole mounts* de túbulos seminíferos, com dupla marcação para o BrdU e a acrosina em conjugação com microscopia confocal. Estes autores demonstraram a presença de clones de espermatogónias em proliferação, de vários tamanhos correspondentes ao estadio do ciclo do epitélio seminífero em que se encontravam, propondo um modelo para a expansão de clones de espermatogónias em macacos adultos. Estes autores postularam que 16 espermatogónias A pale proliferaram do estadio VII/VIII do ciclo, resultando numa duplicação da população das espermatogónias A pale no estadio VIII/IX. Esta divisão inicial ocorreu a partir de vários pares e quadripletos de espermatogónias que entraram em divisão no estadio VII. Após esta divisão inicial, as cadeias de quatro a oito células dividiram-se em metade. A duplicação das espermatogónias A pale leva à duplicação do número de clones com duas e quatro células. Assim, um terço destes clones permanecem mitoticamente quiescentes para replicar a população das espermatogónias A pale, enquanto que as restantes células se continuam a proliferar e diferenciar em espermatogónias B, entrando posteriormente no estadio XII do ciclo e dando origem a clones de 8 a 16 células de espermatogónias B₂ (Ehmcke *et al.*, 2005 a,b).

Um estudo que utilizou a cultura de órgão de túbulos seminíferos humanos, mostrou que no início da cultura apenas as espermatogónias e espermatócitos pré-leptotenos apresentavam marcação positiva e após uma semana os núcleos marcados tinham um tamanho maior, correspondendo ao estadio de paquíteno. Os autores verificaram que ao fim de 16 dias apesar de haver perda de células germinais, algumas células continuavam com capacidade de divisão e diferenciação a um nível semelhante à situação *in vivo* (Roulet *et al.*, 2006).

Um outro estudo que utilizou co-cultura de células germinais humanas com células Vero demonstrou que as hormonas FSH e testosterona tinham um efeito estimulante significativo na proliferação das células estaminais e progenitoras adultas testiculares. Como prova, ao dia 2 da cultura cerca de 4% das células germinais, mais especificamente

espermatogónias e pré-leptótenos eram BrdU positivas, estando por isso a replicar o seu DNA, ao dia 6 esse número diminuía para metade e ao dia 12 não era detectável. A maioria dos espermátocitos não incorporou o BrdU (Sá *et al.*, 2008).

Em humanos a investigação da proliferação e a expansão das espermatogónias bem como a diferenciação das células germinais e o papel das hormonas nestes eventos, em especial da FSH e da testosterona, é ainda um assunto pouco estudado, havendo por isso uma necessidade eminente de se prosseguirem estudos com esse fim.

2. Objectivos

A proliferação e a diferenciação celular, bem como o controlo de ambas, são de extrema importância para o normal desenvolvimento da espermatogénese nos humanos. O desenvolvimento de métodos para estudar a espermatogénese humana *in vitro* é crucial para esclarecer os mecanismos que controlam a proliferação, diferenciação e meiose das células germinais. Como já foi referido anteriormente, a proliferação das células germinais humanas é ainda um assunto pouco debatido e alvo de muitas controvérsias. Sabe-se que tanto através da incorporação de BrdU como de ³H-timidina as espermatogónias A têm capacidade proliferativa e que diferenciam em espermátocitos em paquíteno num *timing* semelhante ao da situação *in vivo* (Steinberger, 1967; Roulet *et al.*, 2006; Sá *et al.*, 2008).

Apesar dos vários anos de estudo na espermatogénese humana ainda não foram realizados estudos quantitativos da proliferação e diferenciação das células germinais.

Todos estes factos levam à necessidade de um estudo pormenorizado da quantificação da proliferação e diferenciação das células germinativas, bem como da função desempenhada pelas hormonas (FSH + Testosterona) nestes eventos.

O presente trabalho foi direccionado para a quantificação da proliferação das células germinais humanas recorrendo a um sistema de cultura que mantém as junções celulares, o mais próximo possível da situação *in vivo*. Para tal, procedeu-se à cultura de túbulos seminíferos em três meios de cultura diferentes, um sem suplemento de hormonas, e dois suplementados com diferentes concentrações de hormonas ao longo de 28 dias.

Este trabalho teve como objectivos:

- Quantificar os efeitos temporais e específicos para cada estadio das células germinais, da FSH e da testosterona, na capacidade proliferativa do epitélio seminífero humano normal, em condições de cultura de órgão.
- Avaliar a taxa de replicação espontânea, para cada estadio celular em cada tempo de cultura, ou seja, ao dia 0, 7, 14 e 28.
- Quantificar a taxa de proliferação das Células estaminais adultas testiculares (espermatogónias A dark) e Células proliferativas adultas testiculares (espermatogónias A pale) nos humanos.

- Quantificar a taxa de diferenciação das Células estaminais adultas testiculares (espermatogónias A dark) e Células proliferativas adultas testiculares (espermatogónias A pale) nos humanos.
- Verificar se houve um aumento, diminuição ou uma manutenção do *pool* replicativo no sistema de cultura utilizado.
- Analisar o efeito das hormonas FSH + T na taxa de proliferação e diferenciação celular.
- Estudar quais os efeitos das hormonas na população de células em geral.

3. Material e Métodos

3.1. Material Biológico

De acordo com a Lei e as normas do Comité de Ética Médico local, os fragmentos de túbulos seminíferos foram colhidos após consentimento informado dos doentes, de quatro casos, com hipoespermatogénese, cariótipo normal, ausência de microdelecções do cromossoma Y e espermatogénese conservada, que necessitaram de uma biópsia testicular aberta para recolha de espermatozóides testiculares durante ciclos de tratamento por microinjecção.

3.2. Cultura de túbulos seminíferos

O fragmento resultante da biópsia testicular foi colocado na incubadora a 32°C com 5% de CO₂ em ar humidificado, em 1 mL de SPM (Sperm Preparation Medium; SPM-Hepes; Medicult, Copenhagen, Denmark) enquanto se efectuavam os meios de cultura.

Foram realizadas três experiências, com meios de culturas diferentes: (1) SPM, não suplementado com hormonas, correspondendo à experiência controlo (2) SPM suplementado com 50 U/L de rFSH (recombinant human follicular stimulating hormone; Gonal-f, folitropina 2, Orgalutran; Organon, Oss, Netherlands) e 1 µM/L de testosterona (testosterone water-soluble; Sigma), (3) SPM suplementado com 500 U/L de rFSH e 10 µM/L de testosterona. Na experiência controlo (1), avaliou-se a cultura em quatro dias diferentes: 0, 7, 14 e 28, enquanto que, na experiência com as hormonas (2 e 3) a cultura foi avaliada ao dia 7, 14 e 28. O meio de cultura foi mudado a cada 48 horas.

3.3. Estudo da Proliferação Celular

Para medir a proliferação celular, preparou-se uma solução 5-Bromo-2-Deoxyuridine (BrdU, Sigma, Barcelone, Spain) a 10 mM em SPM, num tubo revestido com papel de prata, para que a solução não ficasse directamente exposta à luz. Posteriormente, foram revestidos com papel de prata e identificados 10 tubos, com o respectivo nome e o dia da experiência (ex. Se fosse dia 0 da experiência controlo o tubo era identificado, como Controlo d0; se fosse o dia 7 da experiência 2, seria 50/1 d7; ou se fosse o dia 14 da experiência 3, seria 500/10 d14).

Na experiência controlo, colocou-se 1 mL da solução SPM-BrdU em cada um dos 4 tubos. Nas experiências com as Hormonas, num tubo à parte, também revestido com papel de prata e devidamente identificado, à solução de SPM-BrdU foi adicionada a quantidade necessária de cada uma das hormonas para se obter a concentração acima referida, e posteriormente, foi distribuído 1 mL de cada solução em cada um dos respectivos tubos. Os 10 tubos foram colocados na incubadora, a 32°C com 5% de CO₂, durante 30 minutos, completamente fechados, antes de lhes terem sido adicionados os fragmentos. Durante estes 30 minutos, cortou-se o fragmento resultante da biópsia a meio, obtendo duas metades, e posteriormente cortou-se essas duas metades a meio, e assim sucessivamente, até se ter obtido 20 pequenos fragmentos.

Colocaram-se 2 fragmentos em cada tubo, e incubou-se no meio de cultura com BrdU, a 32°C com 5% de CO₂ em ar humidificado durante 18 horas, ao fim das quais os fragmentos foram lavados com SPM, e o meio de cada um dos tubos foi mudado para retirar o BrdU. Os meios foram mudados de dois em dois dias, até ao final da experiência. Nos dias 0, 7, 14 e 28, os fragmentos correspondentes foram retirados do meio e colocados em fixador. O protocolo da mudança de meios é semelhante ao descrito, com a excepção da não adição de BrdU ao SPM, e ambos se encontram detalhados no anexo I.

3.4. Processamento Histológico das Biópsias testiculares

Os fragmentos de túbulos seminíferos, após retirados do meio, foram fixados *overnight* em Bouin (Merck, Darmstadt, Germany) a 4°C. Seguidamente, foram lavados várias vezes em Etanol a 70% (Merck) durante 15 minutos cada, para retirar o excesso de Bouin. Posteriormente, procedeu-se à desidratação dos fragmentos, numa série ascendente de álcoois (Etanol a 70° - 15 minutos, Etanol a 90% - 30 minutos Etanol absoluto - 2x30 minutos) e à sua diafanização com Xilol (Merck, 2x15 minutos).

A impregnação foi realizada em dois banhos de parafina (parafina vertível, ponto de solidificação aproximadamente 56-58°C, Ph Eur, BP, Merk) a 60°C, o primeiro banho durante 1 Hora e o segundo durante 2 horas. De seguida, efectuou-se a inclusão dos fragmentos, em moldes metálicos, com parafina quente (60°C), colocando os dois fragmentos, de cada caso, lado a lado, na horizontal. Após a inclusão, deixou-se solidificar a parafina à temperatura ambiente (anexo II).

3.5. Tratamento das lâminas com Vectabond

As lâminas de vidro (Industrial Quality, Germany) foram imersas em Acetona (Merck) durante 5 minutos à temperatura ambiente, sendo logo de seguida escorridas e colocadas imediatamente em *Vectabond Reagent Solution* (Vector Laboratories, Burlingame, USA), durante 5 minutos. Deixou-se escorrer e eliminou-se o excesso de reagente imergindo, gentilmente, e sem criar bolhas as lâminas em água destilada durante 30 segundos, após os quais se colocou as lâminas, num suporte metálico, na estufa a 37°C durante 24 horas (Anexo III).

3.6. Microtomia

Num micrótomo rotatório, automático (Leica Microsystems, RM2255, Nussloch, Germany) realizaram-se 10 cortes sequenciais, de 3µm de espessura, de cada um dos blocos, com facas de aço (S35, FEATHER, Koln, Germany). Os cortes foram colocados numa tina de água destilada, à temperatura ambiente, para retirar possíveis estrias, e foram recolhidos no centro de uma lâmina tratada com Vectabond (Vector). A lâmina com o corte, foi depois imersa num banho quente (50°C), para que o corte ficasse completamente esticado e aderente à lâmina. As lâminas foram deixadas a secar ao ar por breves instantes, e seguidamente são colocadas em suportes metálicos e transferidas para a estufa a 56°C durante 24 horas (Anexo II).

3.7. Coloração com Hematoxilina

O primeiro corte de cada bloco foi corado com Hematoxilina (Vector) de forma a verificar a integridade e a quantidade dos túbulos seminíferos. Foi estabelecido que cada corte deveria ter pelo menos 20 túbulos seminíferos, para que se pudesse prosseguir o estudo.

Os cortes foram então, desparafinados em Xilol (3x3 minutos), rehidratados numa série decrescente de álcoois (Etanol absoluto – 2x3 minutos, Etanol a 95° - 1x3 minutos, Etanol a 70° - 1x3 minutos, Etanol a 50° - 1x3 minutos e água destilada 1x3 minutos) e corados com Hematoxilina (Vector) diluída 1:3 em água destilada, durante 5 segundos. De seguida, foram lavados em água destilada corrente, para diferenciar e retirar o excesso de corante, e foram desidratados numa série ascendente de álcoois (Etanol a 70% - 1x2

minutos, Etanol a 95 – 2x2 minutos, Etanol-Xilol (50:50, 1x2 minutos), diafanizadas em Xilol (2x2 minutos) e montadas em Entellan (Merck).

3.8. Análise Imunohistoquímica

A análise Imunohistoquímica foi realizada pelo método Streptavidina-Biotina, recorrendo ao sistema de detecção Vectastain universal quick kit (Vector). Primariamente, os cortes foram desparafinados e rehidratados conforme indicado acima para a coloração com Hematoxilina. Posteriormente, as lâminas foram colocadas numa tina humidificada e escura, e procedeu-se ao bloqueio das peroxidases endógenas (5 minutos, à temperatura ambiente) com uma solução de Peróxido de Hidrogénio (Hydrogen Peroxide 30%, Merk) a 3% em água destilada, seguida de uma lavagem em água destilada (5 minutos) e incubou-se numa solução de ácido Clorídrico (Hydrochloric acid Molecular Biology Grade 37%, Sigma) a 1M em água destilada (10 minutos, à temperatura ambiente) com o objectivo de desnaturar o DNA. De seguida, lavou-se em água destilada (5 minutos) e procedeu-se a um pré-tratamento enzimático com uma solução de Tripsina (Trypsin from porcine pâncreas, Sigma) a 0,01% em PBS (Phosphate buffered Saline, Biochrom AG Instamed, Berlin, Germany) durante 5 minutos à temperatura ambiente, após os quais se efectuou uma lavagem em água destilada, seguida de PBS (5 minutos cada). Incubou-se numa solução de soro normal de cavalo (Blocking Solution, Vectastain universal quick kit; Vector) em PBS (10 minutos, temperatura ambiente) de forma a bloquear os locais reactivos não específicos. Escorreu-se as lâminas, e incubou-se com uma solução de Avidina (Avidin D solution, Vector) seguida de uma solução de Biotina (Biotin Solution, Vector) ambas durante 15 minutos, ao fim dos quais se procedeu a uma lavagem em PSB (5 minutos) e à incubação com o anticorpo primário anti-BrdU (Monoclonal Anti-BrdU , Clone BU33, Immunohistology Grade, Sigma) diluído 1:200 em PBS contendo 1,5% de Blocking Serum, durante 1 hora a 37°C. Após uma lavagem em PBS (5 minutos) as preparações foram incubadas (10 minutos à temperatura ambiente) com um anticorpo secundário universal biotilado (Vectastain universal quick kit; Vector), seguido de uma lavagem em PBS (5 minutos) e de uma incubação (5 minutos à temperatura ambiente) num complexo Streptavidina-Peroxidase (Vectastain universal quick kit; Vector). Realizou-se mais uma lavagem em PBS (5 minutos) e procedeu-se à revelação da marcação utilizando como cromogénio a 3,3'diaminobenzidina (DAB Substract kit; Vector), até se visualizar uma

alteração mínima da cor do tecido. As lâminas foram lavadas em água destilada corrente durante 5 minutos, após os quais foram contrastadas com Hematoxilina (Vector) diluída 1:3 em água destilada, durante 5 segundos. Seguidamente, lavou-se em água destilada corrente e as lâminas foram desidratadas e montadas em Entellan (Merck), conforme acima indicado. Como controlo negativo, omitiu-se a incubação com o anticorpo primário (Anexo III).

3.9. Análise do tecido

As lâminas foram observadas num microscópio óptico (Leica DMRBE; Schmidheiny, Switzerland) acoplado a câmara CCD e sistema digital de imagem (Leica IM50, Switzerland) instalado num “desktop” (Processador Intel Pentium 4, com sistema operativo Microsoft Windows XP Professional).

Para cada lâmina foi contado o número total de túbulos, e para cada túbulo foi anotado o número total de células positivas e negativas dos seguintes tipos celulares: Células de Sertoli, Espermatogónias A pale e A dark, Espermatogónias B, Espermatócitos primários leptótenos, zigótenos e paquítenos, Espermatócitos secundários, Espermatídeos redondos e alongados. A identificação das células foi feita com base nos seus critérios morfológicos e posição no túbulo seminífero.

3.10. Análise Estatística

Para a análise estatística dos resultados utilizou-se o programa SPSS, para Windows (v.16.0).

Para cada tipo celular, acima descritos, foi calculado o número total de células e o número de células BrdU positivas por 1000 células de Sertoli, para cada paciente, sendo posteriormente calculada a média e o desvio padrão dos quatro. Após a análise descritiva dos resultados, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney U, para comparar cada um dos tipos celulares ao longo dos 28 dias, e verificar o efeito da suplementação hormonal. Utilizou-se este teste não paramétrico porque a amostragem tem um número de pacientes muito baixo. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, para ambos os testes.

4. Resultados

4.1. Análise da morfologia dos túbulos seminíferos.

Pela observação ao microscópio óptico, verificou-se que a morfologia geral dos túbulos seminíferos, bem como a integridade do tecido intersticial, se manteve durante os 28 dias de cultura, na ausência e na presença das hormonas (FSH +T). Contudo, a partir do dia 7, na experiência controlo, e do dia 14 nas experiências das hormonas, o número de células germinais pareceu sofrer uma diminuição. Devido à perda de células germinais, observou-se uma desorganização do epitélio seminífero, e em alguns casos a presença de vacúolos no seu interior. Apesar da perda de células germinais, todos os tipos celulares se encontravam presentes no final da cultura.

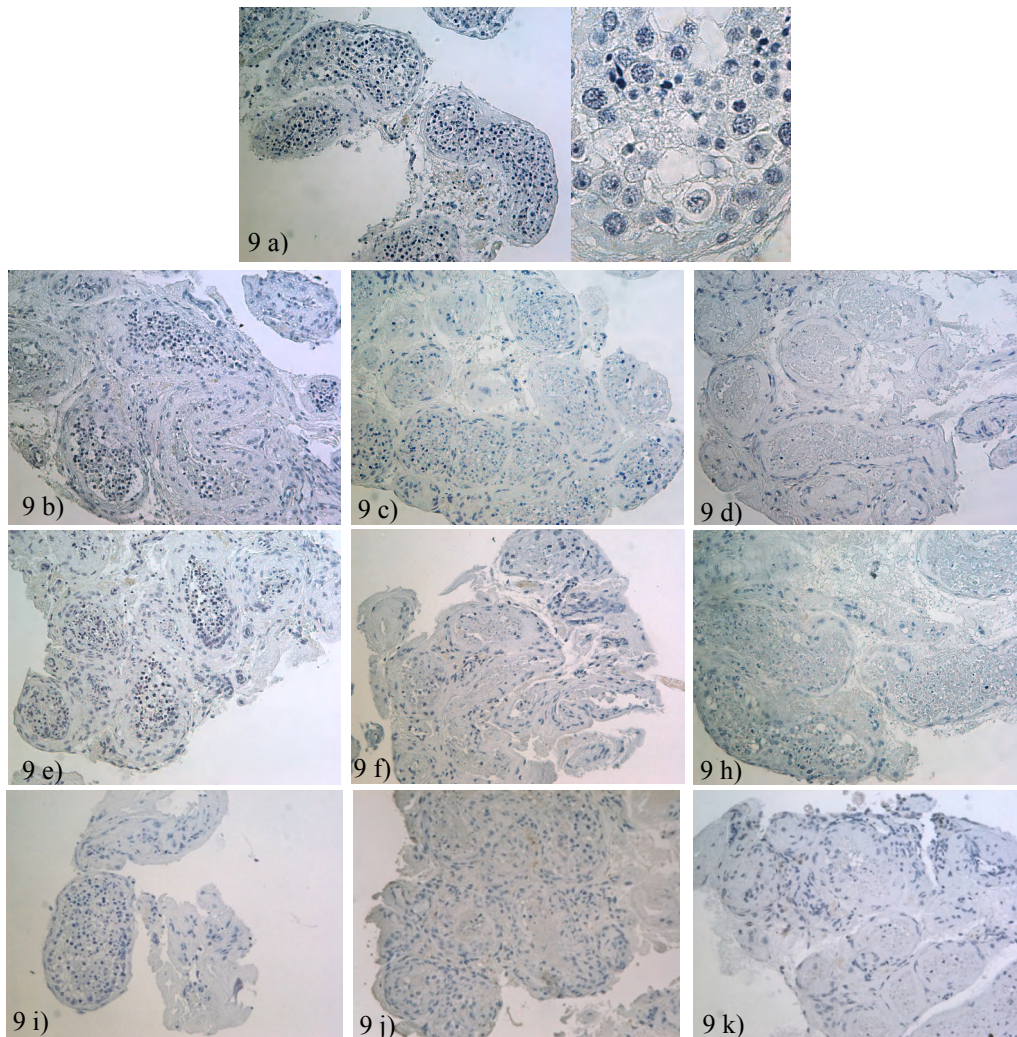


Figura 9-Morfologia dos túbulos seminíferos nos dias 0 (9a), 7 (9b, e, i), 14 (9c, f, j), e 28 (9d, h, k) de cultura, das experiências controlo (9a – 9d), 50/1 (9e – 9h) e 500/10 (9i – 9k) Note a subsequente perda de células ao longo dos 28 dias de cultura.

4.2. Evolução dos diferentes tipos celulares em cultura

Para verificar a existência de diferenças significativas na evolução dos diferentes tipos celulares em cultura ao longo dos 28 dias, bem como o efeito da suplementação hormonal do meio de cultura recorreu-se ao teste de Mann-Whitney U. Para ser mais acessível a experiência em que o meio de cultura foi suplementado com 50 U/L de FSH e 1 $\mu\text{mol/L}$ de testosterona foi denominada de experiência ou grupo 50/1 e a experiência em que o meio de cultura foi suplementado com 500 U/L de FSH e 10 $\mu\text{mol/L}$ de testosterona foi intitulada de 500/10. A experiência em que o meio de cultura não foi suplementado com hormonas foi designada experiência Controlo.

4.2.1 Células de Sertoli

Tabela 2 – Número médio de Células de Sertoli presentes na cultura, nos dias 0, 7, 14, e 28 das experiências: controlo, 50/1 e 500/10.

Tempo de cultura (dias)	Controlo	50/1	500/10
	Med \pm DP ^{b)} (n=4) ^{a)}	Med \pm DP (n=4)	Med \pm DP (n=4)
0	262 \pm 73.45	-	-
7	289 \pm 84.11	296 \pm 84.37	290.5 \pm 29.91
14	247 \pm 9.29	265.75 \pm 25.75	273 \pm 19.82
28	248 \pm 24,58	234 \pm 27.64	263.25 \pm 31.57

a) Número de pacientes.

b) Valores correspondem à média \pm desvio padrão.

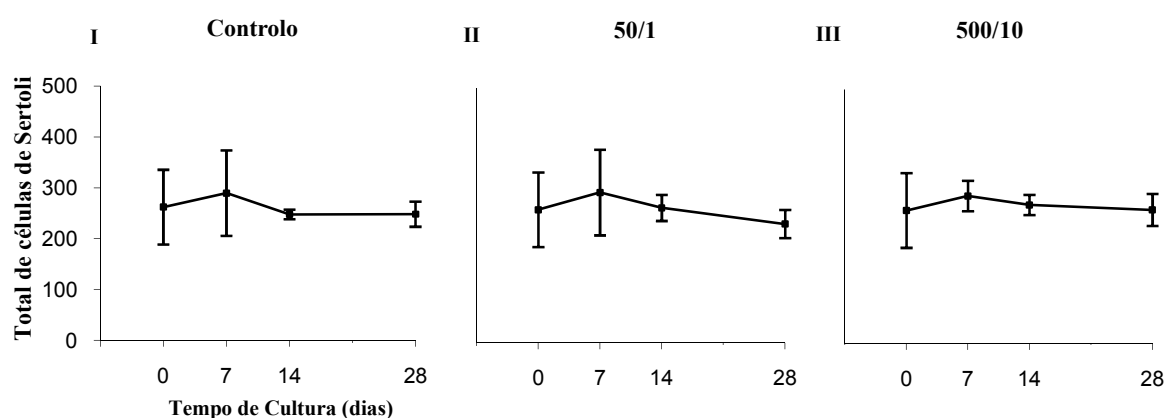


Gráfico 1 – Número médio de células de Sertoli presentes na cultura nos dias 0, 7, 14 e 28, no grupo controlo (I), no grupo 50/1 (II) e no grupo 500/10 (III). Os pontos correspondem à média \pm desvio padrão.

Ao analisar o total de células de Sertoli presentes na cultura, pelo teste de Mann-Whitney (Gráfico 2), não se verificaram diferenças significativas entre os dias nem entre os grupos de experiências, controle, 50/1 e 500/10 ($P \geq 0,114$).

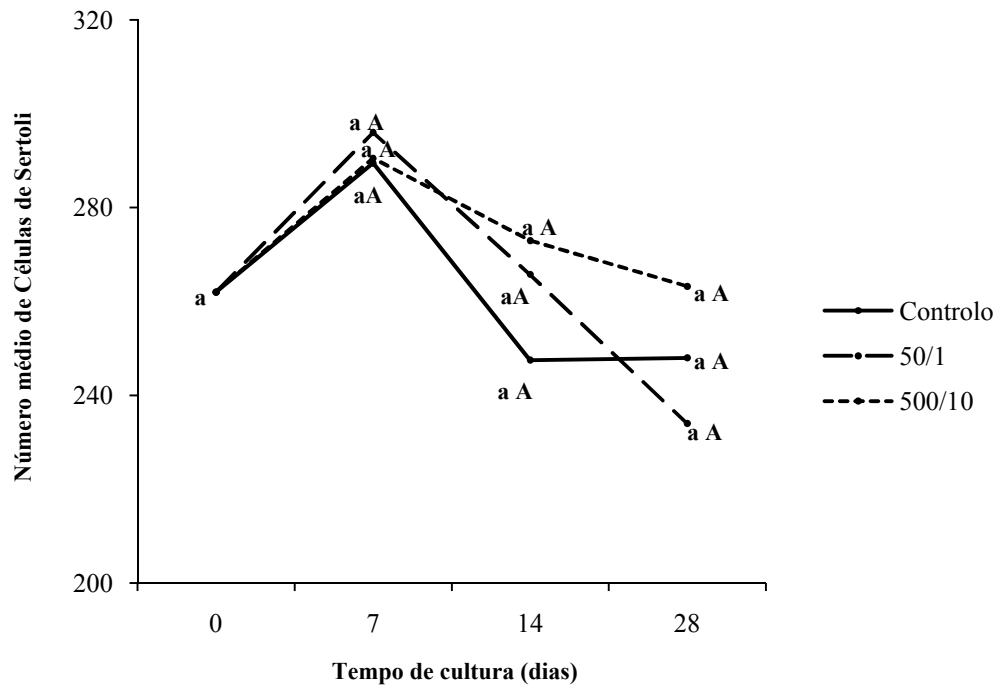


Gráfico 2 – Comparação do número médio de células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controle, experiência 50/1, e na experiência 500/10. (Letras minúsculas – comparação entre os dias do mesmo grupo. Letras maiúsculas- comparação entre os grupos)

As células de Sertoli mantiveram-se, assim, constantes ao longo da cultura e independentemente da presença de hormonas no meio de cultura.

Dado que não existiam diferenças significativas entre o número de células de Sertoli, o número de Células germinais foi calculado por 1000 células de Sertoli.

4.2.2. Espermatogónias A pale

Tabela 4 – Número médio de Espermatogónias A pale presentes na cultura, nos dias 0, 7, 14 e 28 das experiências controlo, 50/1 e 500/10.

Tempo de Cultura (dias)	Controlo	50/1	500/10
	Med ± DP ^{b)} (n=4) ^{a)}	Med ± DP (n=4)	Med ± DP (n=4)
0	972.23±281.14	-	-
7	408.60±59.26	868.59±226.62	795.28±165.69
14	383.84±44.16	428.64±14.93	403.60±92.88
28	158.52±40.27	395.49±3.23	403.67±79.48

a) Número de pacientes.

b) Valores correspondem à média ± desvio padrão.

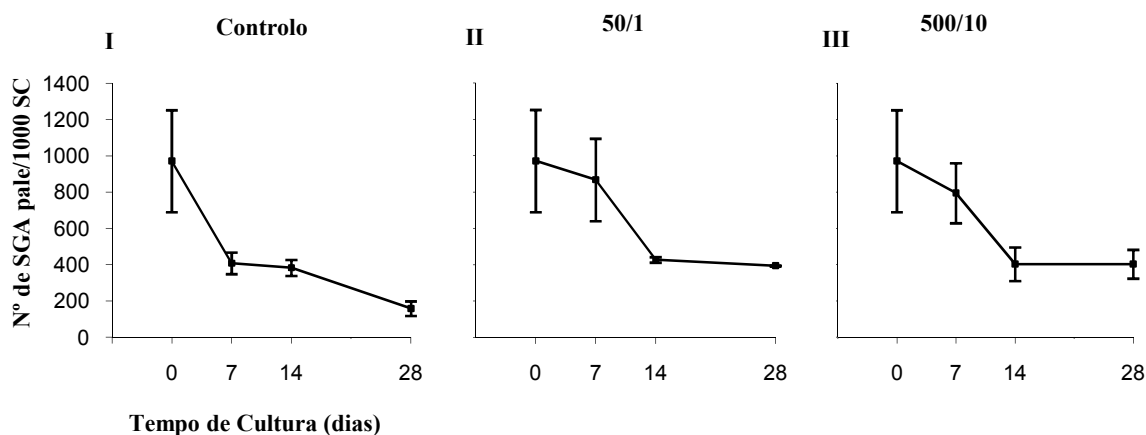


Gráfico 3 – Número médio de Espermatogónias A pale em cultura por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo (I), experiência 50/1 (II) e na experiência 500/10 (III). Os pontos correspondem à média ± desvio padrão.

Quando se analisou o total de espermatogónias A pale em cultura, pelo teste de Mann-Whitney U (Gráfico 4) verificou-se que no grupo controlo, houve uma diminuição significativa deste tipo celular do dia 0 para os dias 7, 14 e 28, ($P = 0.029$). Contudo, do dia 7 para o dia 14 não foi verificada uma alteração significativa no número de espermatogónias A pale ($P = 0.686$), mas do dia 14 para o dia 28 foi verificada uma diminuição significativa ($P = 0.029$).

Nas experiências 50/1 e 500/10, apenas não se verificou um decréscimo significativo no número de espermatogónias A pale entre o dia 0 e o dia 7 e entre o dia 14 e o dia 28 ($P \geq 0.200$).

Quando se comparou os diferentes grupos verificou-se que no dia 7 e no dia 28, o número de células do grupo controlo é significativamente inferior ao do grupo 50/1 e 500/10 ($P = 0.029$), mas entre estes dois últimos grupos, tal já não se verifica ($P \geq 0.343$). Contudo, no dia 14, não há diferenças significativas entre os três grupos ($P \geq 0.114$).

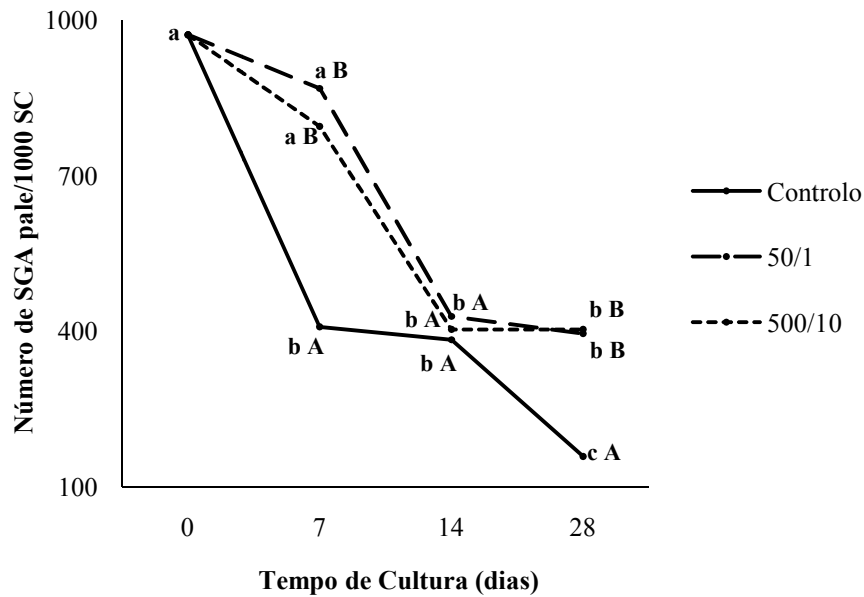


Gráfico 4 – Comparação pelo teste de Mann Whiney U do número médio de Espermatogónias A pale em cultura por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo, experiência 50/1 e na experiência 500/10. Os pontos correspondem à média. (Letras minúsculas – comparação entre os dias do mesmo grupo. Letras maiúsculas- comparação entre os grupos)

4.2.3. Espermatogónias A dark

Tabela 6 – Número médio de Espermatogónias A dark presentes na cultura, no dia 0 da experiência controlo e no dia 7, 14, e 28 das experiências controlo, 50/1 e 500/10.

Tempo de Cultura (dias)	Controlo	50/1	500/10
	Med ± DP ^{b)} (n=4) ^{a)}	Med ± DP (n=4)	Med ± DP (n=4)
0	266.21±65.7	-	-
7	92.8±17.18	204.34±43.69	205.43±43.25
14	65.68±1.4	79.11±3.06	67.43±13.42
28	33.42±2.6	65.64±18.73	57.19±4.04

a) Número de pacientes.

b) Valores correspondem à média ± desvio padrão.

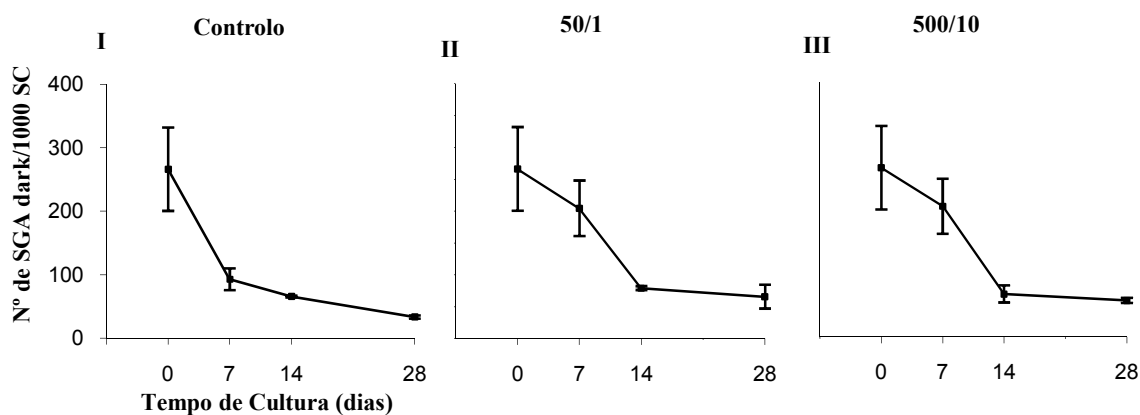


Gráfico 5- Número médio de Espermatogónias A dark em cultura por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo (I), experiência 50/1 (II) e na experiência 500/10 (III). Os pontos correspondem à média ± desvio padrão.

Quando se analisou o total de espermatogónias A dark em cultura, pelo teste de Mann-Whitney U (Gráfico 6), constatou-se que no grupo controlo, houve uma diminuição significativa deste tipo celular do dia 0 para os dias 7, 14 e 28 ($P = 0.029$).

Nas experiências 50/1 e 500/10 observou-se que do dia 0 para o dia 7 não houve uma alteração significativa no número de células ($P = 0.343$), mas passou a haver uma diminuição significativa deste tipo celular do dia 0 para os dias 14 e 28 ($P = 0.029$). Verificou-se ainda, uma redução significativa no número de espermatogónias A dark do dia 7 para os dias 14 e 28 ($P = 0.029$) mas não do dia 14 para o dia 28 ($P \geq 0.343$).

Pela análise do Gráfico 6 observou-se que no dia 7 e no dia 28, o número de células do grupo controlo foi estatisticamente inferior ao dos grupos 50/1 e 500/10 ($P = 0.029$). No dia 14, o número de espermatogónias A dark do grupo controlo era apenas estatisticamente

inferior ao do grupo 50/1 ($P = 0.029$). Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos 50/1 e 500/10 ao longo dos 28 dias ($P \geq 0.343$).

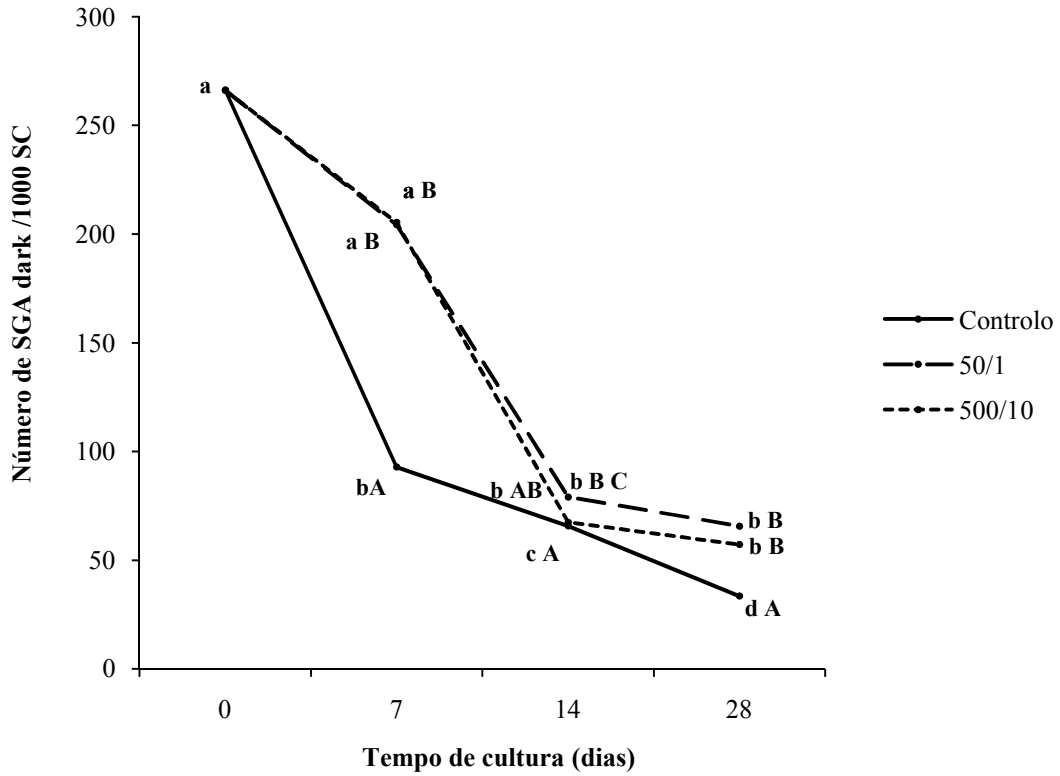


Gráfico 6 – Comparação do número médio de espermatogônias A dark por 1000 SC, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo, experiência 50/1, e na experiência 500/10 pelo teste de Mann-Whitney U. (Letras minúsculas – comparação entre os dias do mesmo grupo. Letras maiúsculas- comparação entre os grupos)

4.2.4. Total de Espermatogónias A

Tabela 8 – Número médio do total de Espermatogónias A presentes na cultura, nos dias 0, 7, 14 e 28 das experiências controlo, 50/1 e 500/10.

Tempo de Cultura (dias)	Controlo	50/1	500/10
	Med ± DP ^{b)} (n=4) ^{a)}	Med ± DP (n=4)	Med ± DP (n=4)
0	1210.69±340.69	-	-
7	482.83±65.08	1072.93±258.67	1000.71±206.91
14	436.34±44.12	507.74±16.3	471.29±98.15
28	185.96±38.04	461.13±18.02	461.67±85.56

a) Número de pacientes.

b) Valores correspondem à média ± desvio padrão.

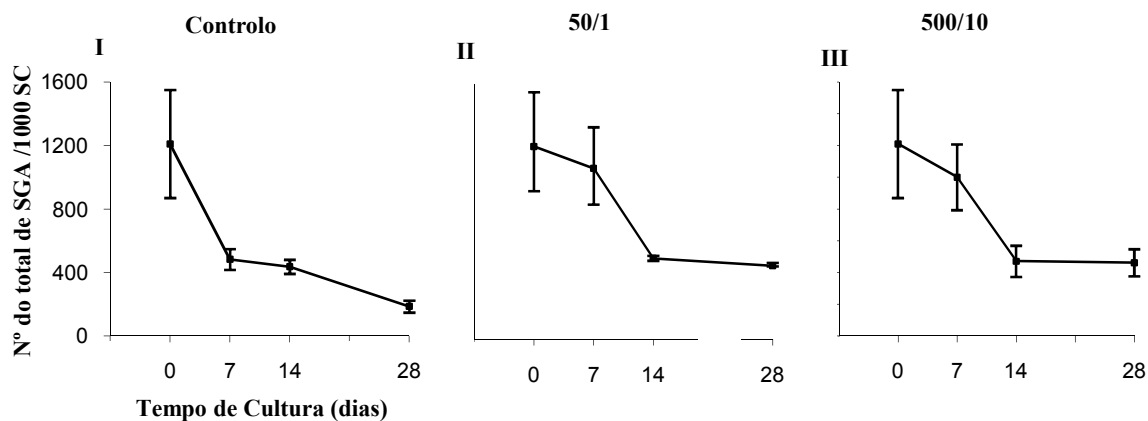


Gráfico 7 – Número médio do total de Espermatogónias em cultura por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo (I), experiência 50/1 (II) e na experiência 500/10 (III). Os pontos correspondem à média ± desvio padrão.

Ao observar o total de espermatogónias A ao longo dos dias do grupo controlo, verificou-se uma diminuição significativa no número destas células do dia 0 para os dias 7, 14, e 28 ($P = 0.029$). Do dia 7 para o dia 14 não houve uma alteração significativa no número destas células ($P = 0.686$), mas do dia 7 e do dia 14 para o dia 28 ocorreu uma redução estatisticamente significativa deste tipo celular ($P = 0.029$).

Nos grupos 50/1 e 500/10 não se verificou uma alteração significativa no número de espermatogónias A do dia 0 para o dia 7. Contudo, detectou-se uma redução significativa deste tipo celular do dia 7 para o dia 14 e 28 ($P = 0.029$) mas não foram detectadas diferenças significativas entre os dias 14 e 28 ($P \geq 0.057$).

Quando se comparou os grupos entre si observou-se que no dia 7 e no dia 28, o número de células do grupo controlo era estatisticamente inferior ao do grupo 50/1 e

500/10 ($P = 0.029$). No dia 14 o grupo controlo apresentou um número inferior de espermatogónias A comparativamente ao grupo 50/1. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos 50/1 e 500/10 ($P \geq 0.686$).

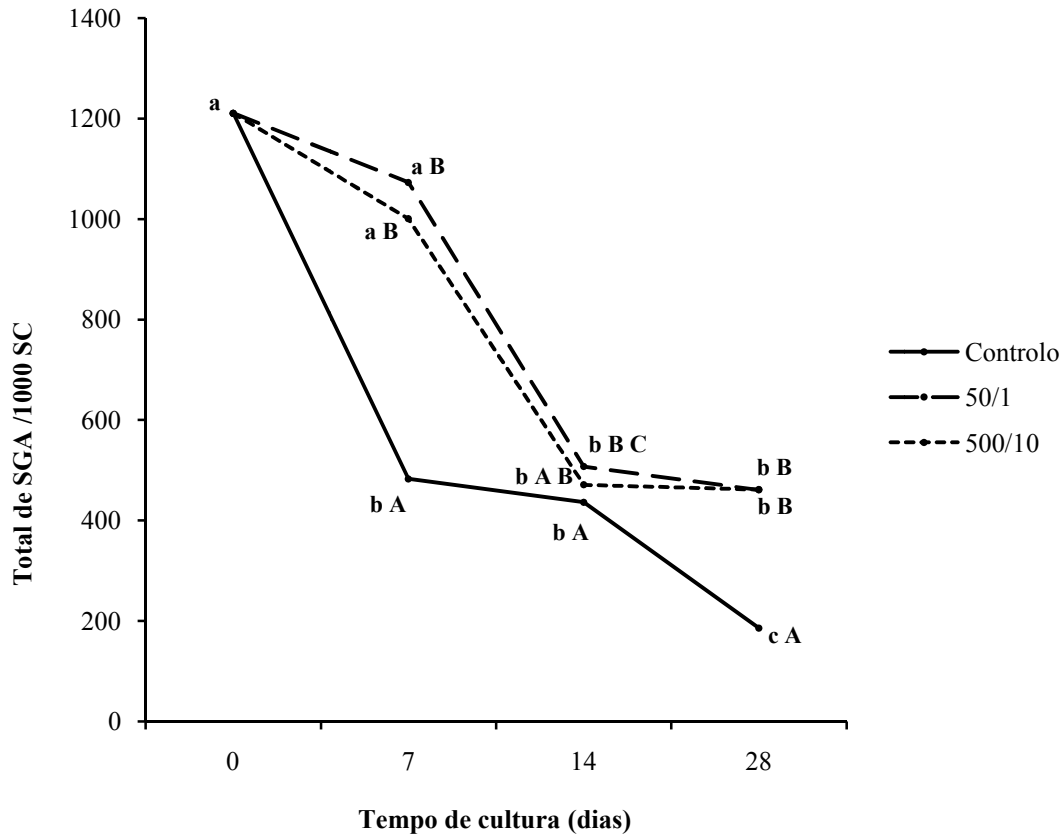


Gráfico 8- Comparação do número médio do total de espermatogónias A por 1000 SC, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo, experiência 50/1, e na experiência 500/10, pelo teste de Mann-Whitney U. (Letras minúsculas – comparação entre os dias do mesmo grupo. Letras maiúsculas- comparação entre os grupos)

4.2.5. Espermatogónias B e Espermatócitos Leptótenos

Tabela 10 - Número médio de Espermatogónias B e espermatócitos primários em Leptótenos presentes na cultura, nos dias 0, 7, 14 e 28 das experiências controlo, 50/1 e 500/10.

Tempo de Cultura (dias)	Controlo	50/1	500/10
	Med ± DP ^{b)} (n=4) ^{a)}	Med ± DP (n=4)	Med ± DP (n=4)
0	952.74±151.33	-	-
7	450.4±31.83	647.80±71	857.74±148.38
14	247.58±45.07	342.28±53.18	249.76±45.65
28	102.18±13	227.86±60.07	227.59±66.3

a) Número de pacientes.

b) Valores correspondem à média ± desvio padrão.

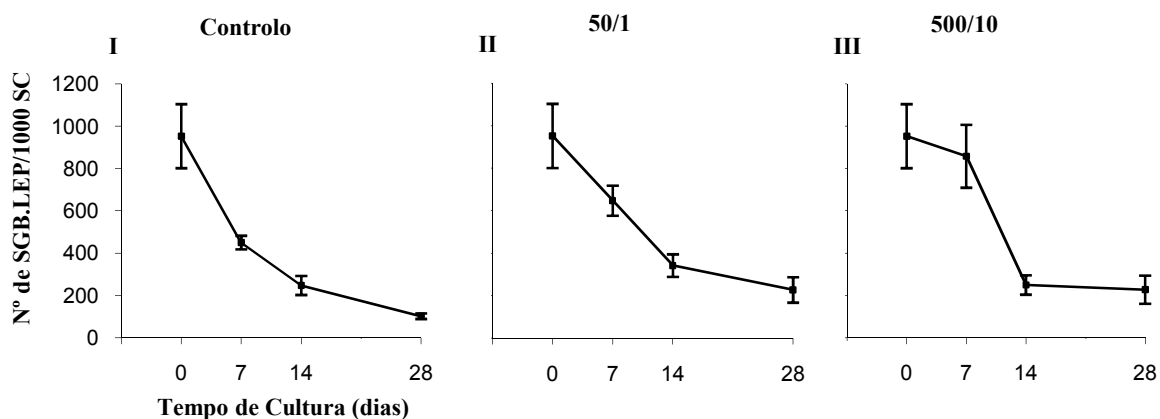


Gráfico 9- Número médio de Espermatogónias B e Espermatócitos primários em Leptóteno em cultura por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo (I), experiência 50/1 (II) e na experiência 500/10 (III). Os pontos correspondem à média ± desvio padrão.

Pela análise dos resultados constatou-se que o total de espermatogónias B e espermatócitos primários em leptóteno, no grupo controlo, diminuiu de forma significativa do dia 0 até ao dia 28 ($P = 0.029$).

No grupo 50/1 verificou-se um decréscimo significativo destas células em todos os dias, quando comparado com o dia 0 do controlo ($P = 0.029$). Entre o dia 7 e os dias 14 e 28 houve também uma diminuição significativa de células ($P = 0.029$), mas entre o dia 14 e o dia 28 tal já não se verificou ($P = 0.057$).

Na experiência 500/10 não se detectou uma redução significativa no número de espermatogónias B e espermatócitos em leptóteno do dia 0 para o dia 7 ($P = 0.486$) mas, a partir do dia 14 houve uma diminuição significativa no número destas células.

Quando se comparou o número de espermatogônias B e espermatócitos primários em leptóteno, entre os três grupos, notou-se uma diminuição estatisticamente significativa no dia 7 e no dia 28 no grupo controlo em relação aos grupos 50/1 e 500/10 ($P = 0.029$). Contudo, no dia 14 não se verificaram diferenças significativas entre os três ($P \geq 0.057$). Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos 50/1 e 500/10 ($P \geq 0.114$) ao longo dos 28 dias.

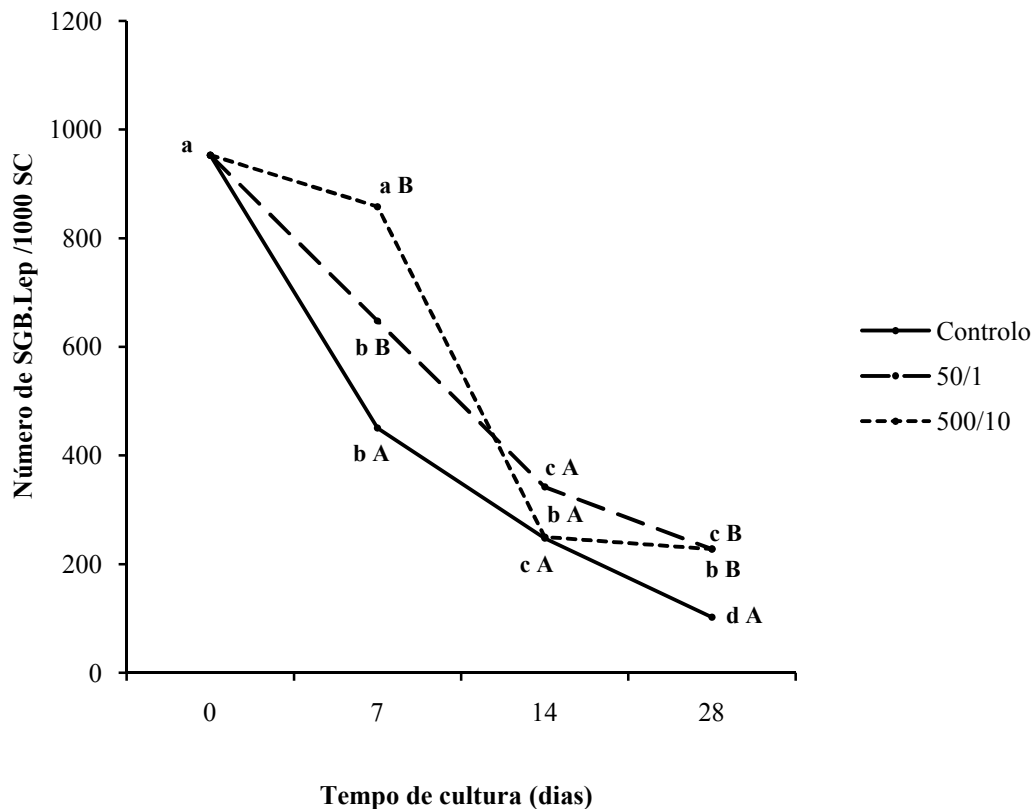


Gráfico 10- Comparação do número médio de espermatogônias B e espermatócitos primários em Leptóteno por 1000 SC, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo, experiência 50/1, e na experiência 500/10 pelo teste de Mann-Whitney U. (Letras minúsculas – comparação entre os dias do mesmo grupo. Letras maiúsculas- comparação entre os grupos)

4.2.6. Espermatócitos Zigótenos e Paquítenos

Tabela 12 – Número médio de espermatócitos primários em zigóteno e paquíteno presentes na cultura, nos dias 0, 7, 14, e 28 das experiências controle, 50/1 e 500/10.

Tempo de Cultura (dias)	Controlo	50/1	500/10
	Med ± DP ^{b)} (n=4) ^{a)}	Med ± DP (n=4)	Med ± DP (n=4)
0	1160.99±544.35	-	-
7	367.25±101.52	1214.21±348.81	916.33±14.76
14	494.11 ±79.14	664.24±158.8	416.01±54.96
28	120.47±22.08	283.96±37	267.25±49.57

a) Número de pacientes.

b) Valores correspondem à média ± desvio padrão

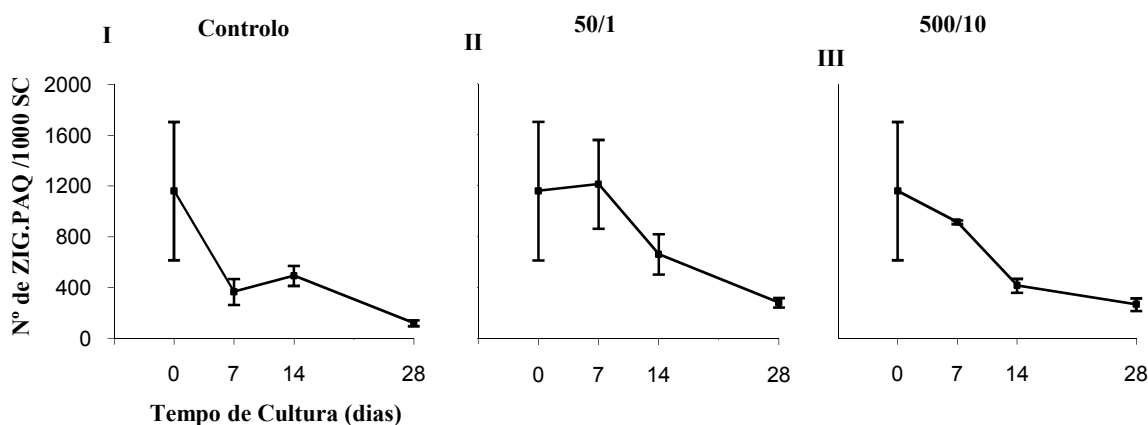


Gráfico 11 – Número médio de Espermatócitos primários em Zigóteno e Paquíteno em cultura por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controle (I), experiência 50/1 (II) e na experiência 500/10 (III). Os pontos correspondem à média ± desvio padrão.

O número de espermatócitos primários em zigóteno e em paquíteno em cultura, diminuiu significativamente no grupo controlo, do dia 0 até ao dia 28 ($P = 0.029$), apenas não se verificou diferenças significativas entre o dia 7 e o dia 14 ($P = 0.200$).

No grupo 50/1 verificou-se uma redução significativa no número destas células entre o dia 0 e o dia 28 e do dia 7 para os dias 14 e 28 ($P = 0.029$).

No grupo 500/10 observou-se uma diminuição significativa do dia 0 para o dia 14 e o dia 28, e entre os dias 7, 14 e 28 ($P = 0.029$).

Comparando os grupos entre si verificou-se que no dia 7 e no dia 28, o número de células do grupo controlo era significativamente inferior ao do grupo 50/1 e 500/10 ($P = 0.029$). No dia 14 apenas se detectou uma diminuição significativa no número de espermatócitos em zigóteno e paquíteno do grupo 500/10 em relação ao 50/1 ($P \geq 0.029$). Não se observaram diferenças significativas no número de espermatócitos em zigóteno e paquíteno nos dias 7 e 28 entre os grupos 50/1 e 500/10 ($P = 0.029$).

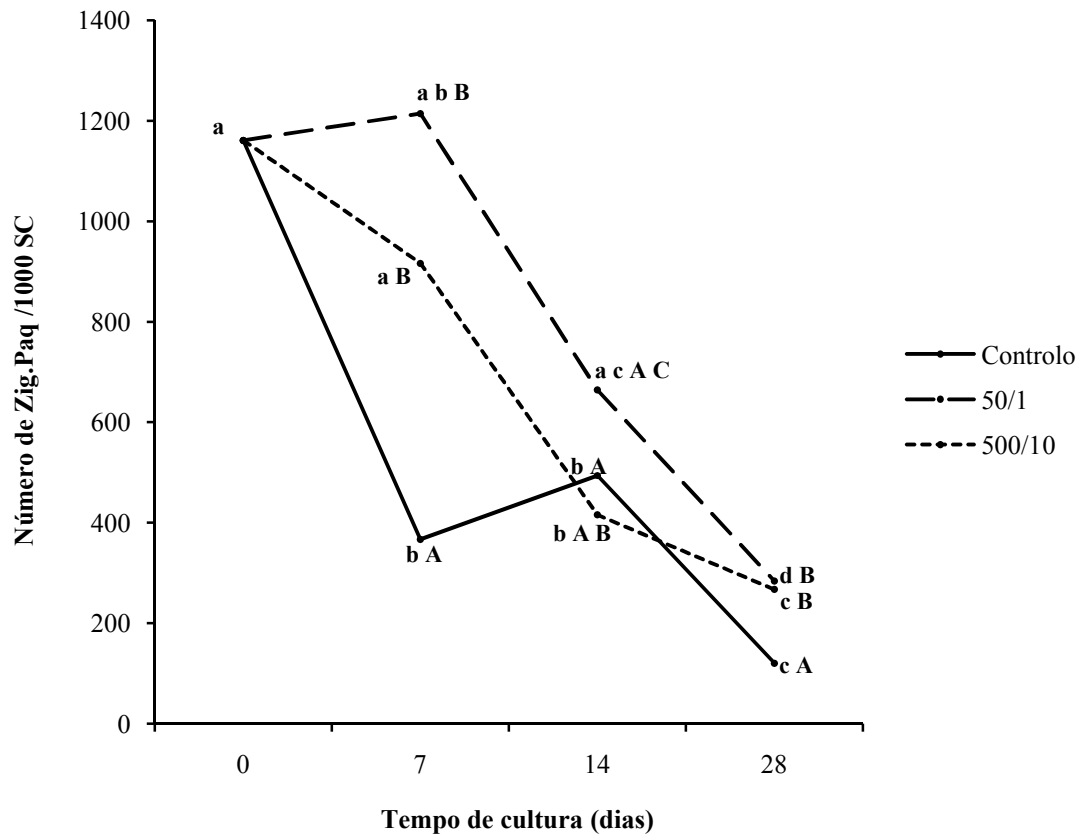


Gráfico 12 – Comparação do número médio de espermatócitos primários em zigóteno e paquíteno por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo, experiência 50/1, e na experiência 500/10 pelo teste de Mann-Whitney U. (Letras minúsculas – comparação entre os dias do mesmo grupo. Letras maiúsculas- comparação entre os grupos)

4.2.7. Espermatócitos Secundários

Tabela 14 – Número médio de espermatócitos secundários presentes na cultura nos dias 0, 7, 14, e 28 das experiências: controlo, 50/1 e 500/10.

Tempo de Cultura (dias)	Controlo	50/1	500/10
	Med ± DP ^{b)} (n=4) ^{a)}	Med ± DP (n=4)	Med ± DP (n=4)
0	386.45±130.61	-	-
7	108.35±51.56	342.45±113.45	149.53±32.21
14	95.9±3.12	97.6±10.28	96.21±21.19
28	14.56±8.08	37.93±23.22	30.46±9.97

a) Número de pacientes.

b) Valores correspondem à média ± desvio padrão

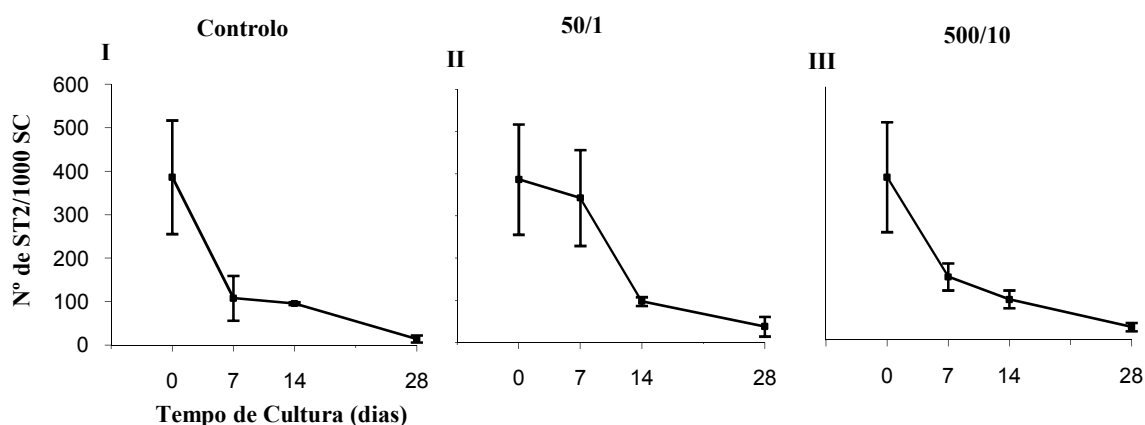


Gráfico 13 – Número médio de Espermatócitos Secundários em cultura por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo (I), experiência 50/1 (II) e na experiência 500/10 (III). Os pontos correspondem à média ± desvio padrão.

Quando se analisou o número de Espermatócitos secundários em cultura pelo teste de Mann-Whitney U, verificou-se uma diminuição significativa deste tipo celular ao longo dos 28 dias nos grupos controlo e 500/10 ($P = 0.029$).

No grupo 50/1 não se detectou uma alteração significativa no número destas células entre o dia 0 e o dia 7 ($P = 0.686$), mas ao longo dos restantes dias houve uma diminuição significativa deste tipo celular ($P = 0.029$).

No dia 7, o grupo 50/1 apresentou um número de espermatócitos secundários significativamente superior aos grupos controlo e 500/10, ao passo que no dia 14 não foram notadas diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos. No dia 28 não foi verificada uma alteração significativa do número de espermatócitos secundários entre

os grupos controlo e 50/1 e entre os grupos 500/10 e 50/1 ($P \geq 0.200$), mas o grupo controlo apresentou um número inferior de espermatócitos secundários em relação ao grupo 500/10 ($P = 0.029$).

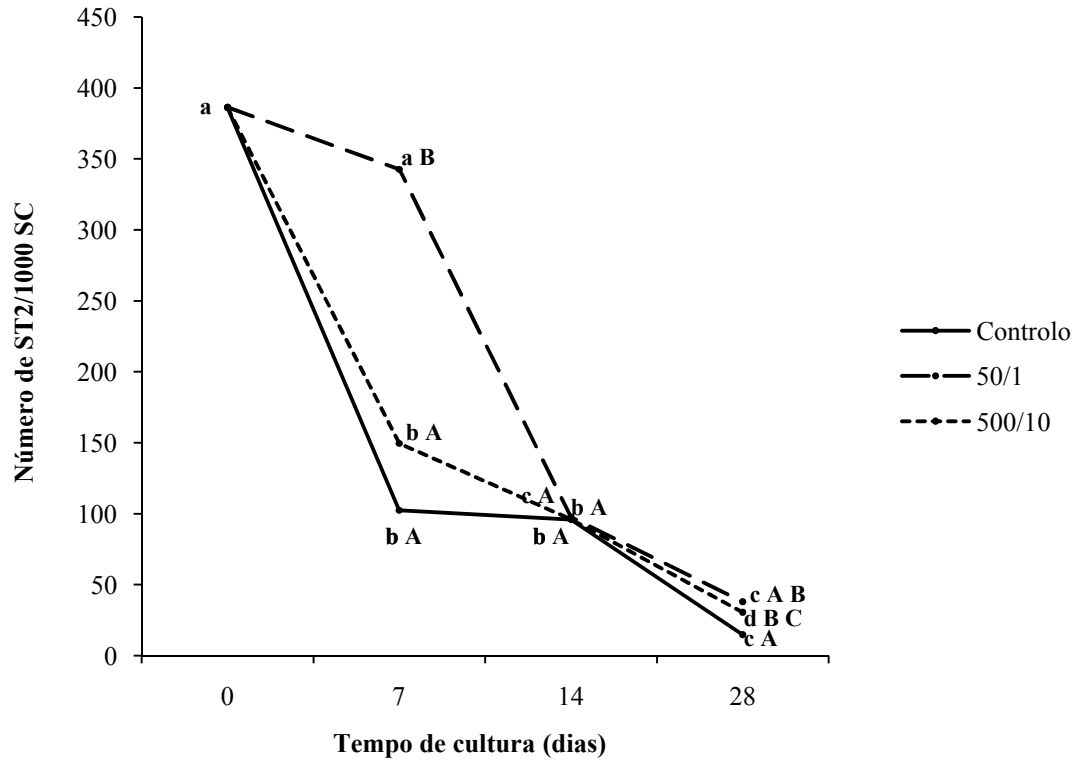


Gráfico 14 – Comparação do número médio de espermatócitos secundários por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo, experiência 50/1, e na experiência 500/10 pelo teste de Mann-Whitney U. (Letras minúsculas – comparação entre os dias do mesmo grupo. Letras maiúsculas- comparação entre os grupos)

4.2.8. Espermatídeos Redondos

Tabela 16 - Número médio de espermatídeos redondos presentes na cultura, nos dias 0, 7, 14, e 28 das experiências controlo, 50/1 e 500/10.

Tempo de Cultura (dias)	Controlo	50/1	500/10
	Med ± DP ^{b)} (n=4) ^{a)}	Med ± DP (n=4)	Med ± DP (n=4)
0	398.9±69.51	-	-
7	153.43±89.19	382.09±87.68	212.3±28.07
14	233.5±11.3	395.78±144.97	235.68±35.27
28	94.77±3.17	187.77±21.28	109.61±18.52

a) Número de pacientes.

b) Valores correspondem à média ± desvio padrão.

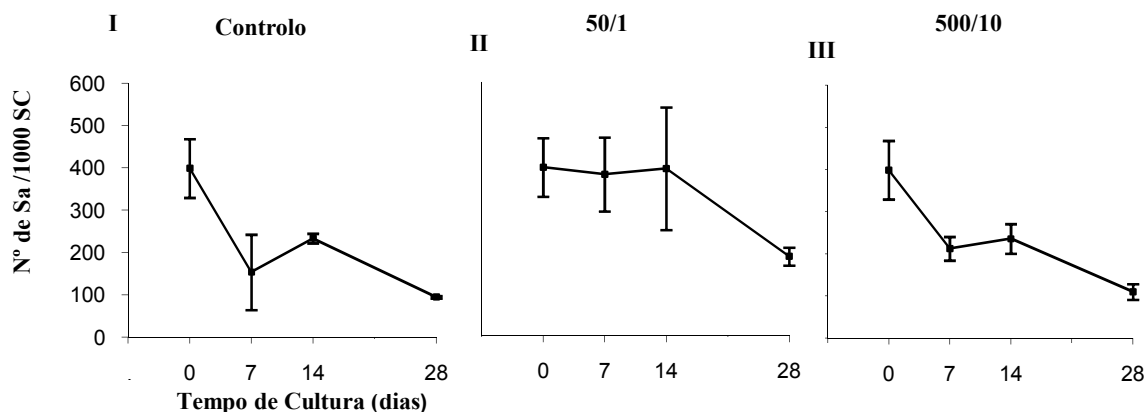


Gráfico 15 – Número médio de Espermatídeos Redondos em cultura por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo (I), experiência 50/1 (II) e na experiência 500/10 (III). Os pontos correspondem à média ± desvio padrão.

Pelo teste de Mann-Whitney U (Gráfico 16) verificou-se que na experiência controlo houve uma diminuição significativa do número de espermatídeos redondos do dia 0 para os dias 7, 14 e 28 ($P = 0.029$). Contudo, do dia 7 para os dias 14 e 28 não foram detectadas alterações significativas no número destas células ($P \geq 0.343$), houve apenas uma diminuição significativa do dia 14 para o 28 ($P = 0.029$).

Na experiência 50/1 não se observou uma alteração significativa no número destas células entre o dia 0 e os dias 7 e 14 ($P \geq 0.686$), mas deu-se uma diminuição significativa deste tipo celular entre o dia 0 e o dia 28 ($P \geq 0.029$).

Na experiência 500/10, tal como no grupo controlo, houve uma redução significativa do número de espermatócitos secundários ao longo dos 28 dias ($P = 0.029$), apenas não foram detectadas diferenças significativas do dia 7 para o dia 14 ($P = 0,343$).

Quando se comparou o total de espermatídeos redondos nas três experiências verificou-se que no dia 7 e no dia 28 a experiência controlo e 500/10 não apresentavam diferenças significativas entre si ($P \geq 0.343$), mas ambas apresentaram um número significativamente inferior destas células comparativamente à experiência 50/1. No dia 14, apenas o grupo controlo apresentou uma diminuição significativa do número de espermatídeos redondos em relação à experiência 50/1 ($P = 0.029$).

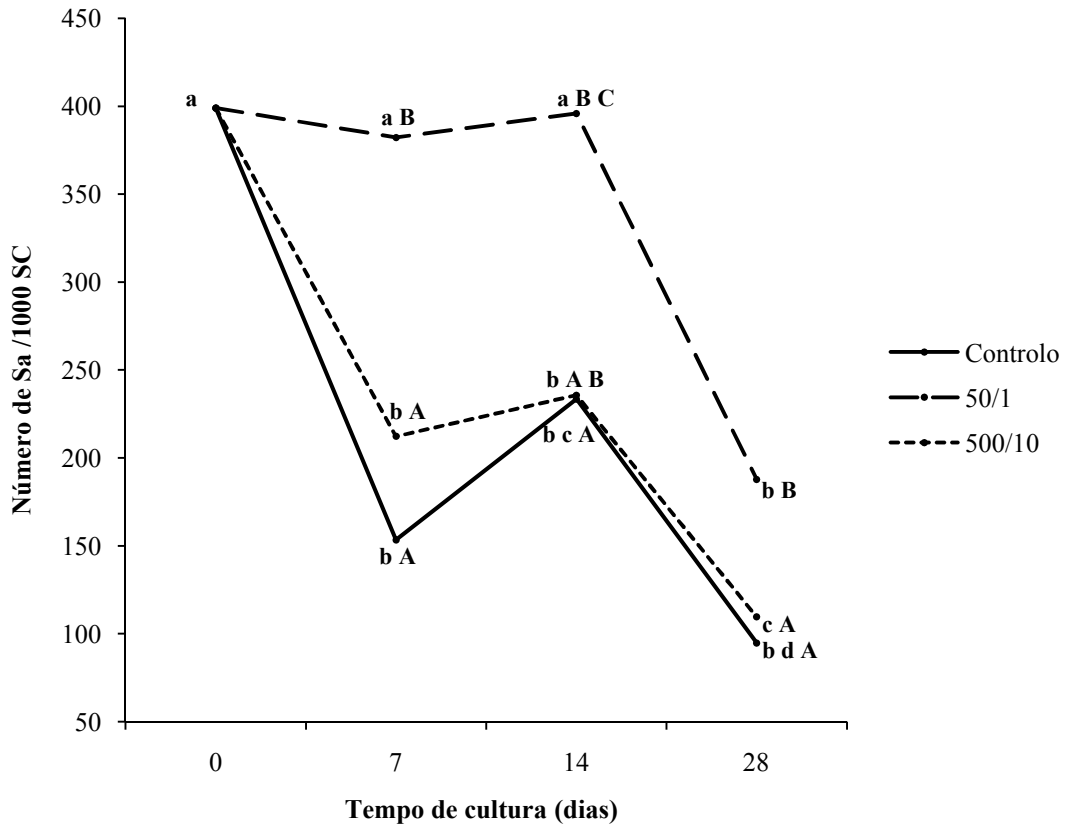


Gráfico 16 – Comparação do número médio de espermatídeos redondos por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo, experiência 50/1, e na experiência 500/10 pelo teste de Mann-Whitney U. (Letras minúsculas – comparação entre os dias do mesmo grupo. Letras maiúsculas- comparação entre os grupos)

4.2.9. Espermatídeos Alongados

Tabela 18 - Comparação entre o número médio de espermátides alongados presentes na cultura, nos dias 0,7, 14, e 28 das experiências controlo, 50/1 e 500/10.

Tempo de Cultura (dias)	Controlo	50/1	500/10
	Med ± DP ^{b)} (n=4) ^{a)}	Med ± DP (n=4)	Med ± DP (n=4)
0	482.91±176.67	-	-
7	168.44±52.73	590.1±254.4	193.86±11.29
14	155.51±13.85	519.74±179.91	174.94±42.88
28	137.52±20.33	335.83±117.81	139.41±8.85

a) Número de pacientes.

b) Valores correspondem à média ± desvio padrão.

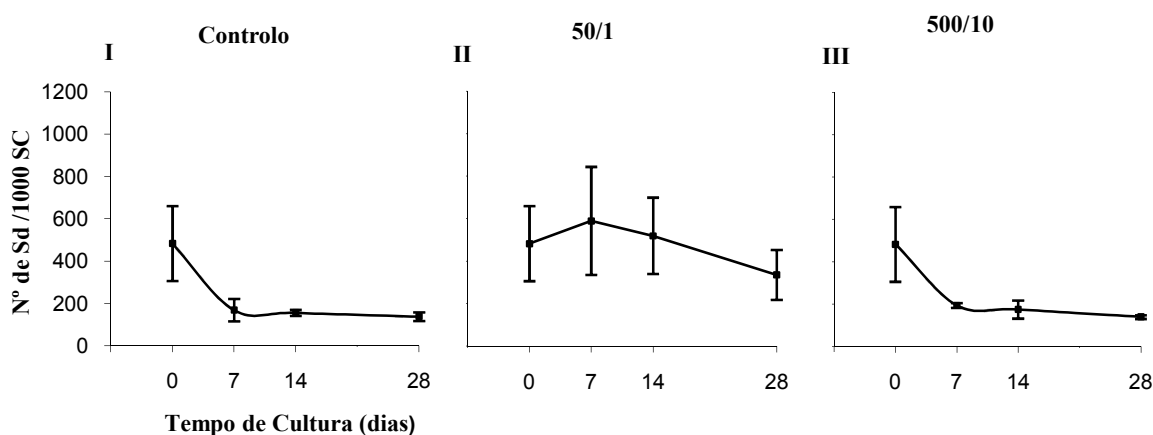


Gráfico 17- Número médio de Espermatídeos alongados em cultura por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo, experiência 50/1e na experiência 500/10. Os pontos correspondem à média ± desvio padrão.

Ao fazer uma análise do número de espermátides alongados em cultura, no grupo controlo verificou-se que em relação ao dia 0, os dias 7, 14 e 28 apresentaram uma diminuição significativa de células ($P = 0.029$). Contudo, não se verificaram diferenças no número destas células, entre os dias 7, 14 e 28 ($P \geq 0.200$).

Na experiência 50/1 não foram detectadas alterações significativas no número de espermátides alongados ao longo dos 28 dias ($P \geq 0,200$).

Na experiência 500/10, tal como no grupo controlo, houve uma redução significativa do número de espermátides alongados do dia 0 para os dias 7, 14 e 28 ($P = 0.029$), não se tendo detectado diferenças significativas entre os dias 7 e 14 e os dias 14 e 28 ($p \geq 0.200$).

Analisando gráfico 18, observa-se que nos dias 7, 14 e 28 o número de células do grupo controlo não era estatisticamente diferente do grupo 500/10 mas ambos eram significativamente inferiores ao número de células do grupo 50/1 (Gráfico 18).

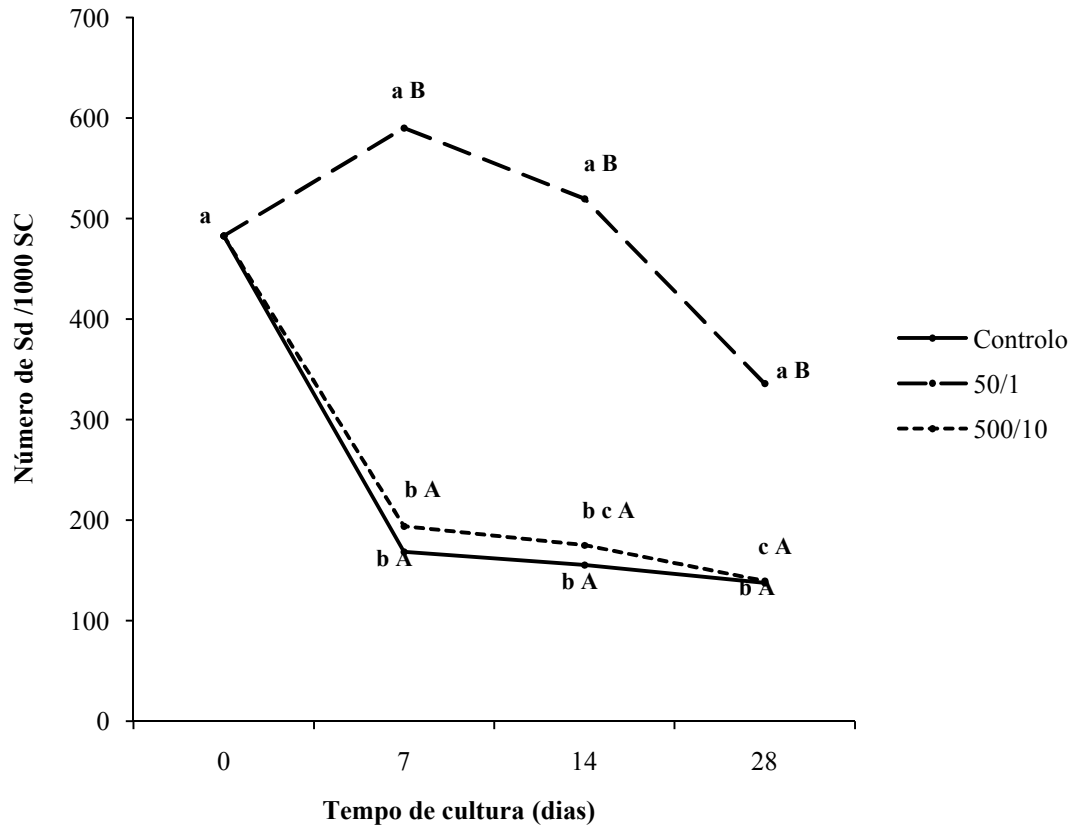


Gráfico 18- Comparação do número médio de espermatídeos alongados por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo, experiência 50/1, e na experiência 500/10 pelo teste de Mann-Whitney U. (Letras minúsculas – comparação entre os dias do mesmo grupo. Letras maiúsculas- comparação entre os grupos)

4.3. Análise da Proliferação e Diferenciação Celular

Para esclarecer se existiam diferenças significativas na proliferação e diferenciação celular ao longo dos 28 dias dentro de cada grupo, bem como a influência da suplementação hormonal do meio de cultura recorreu-se ao teste de Mann-Whitney U.

4.3. 1. Espermatogónias A pale

Tabela 20 – Número médio de espermatogónias A pale positivas presentes na cultura, nos dias 0, 7, 14, e 28 das experiências: controlo, 50/1 e 500/10.

Tempo de Cultura (dias)	Controlo	50/1	500/10
	Med ± DP ^{b)} (n=4) ^{a)}	Med ± DP (n=4)	Med ± DP (n=4)
0	183.36 ± 24.04	-	-
7	77.87 ± 17.2	175.26 ± 49.34	143.17 ± 30.45
14	63.02 ± 16.9	72.83 ± 49.34	70.33 ± 27.66
28	26.08 ± 5.71	48.31 ± 19.17	60.66 ± 11.73

a) Número de pacientes.

b) Valores correspondem à média ± desvio padrão.

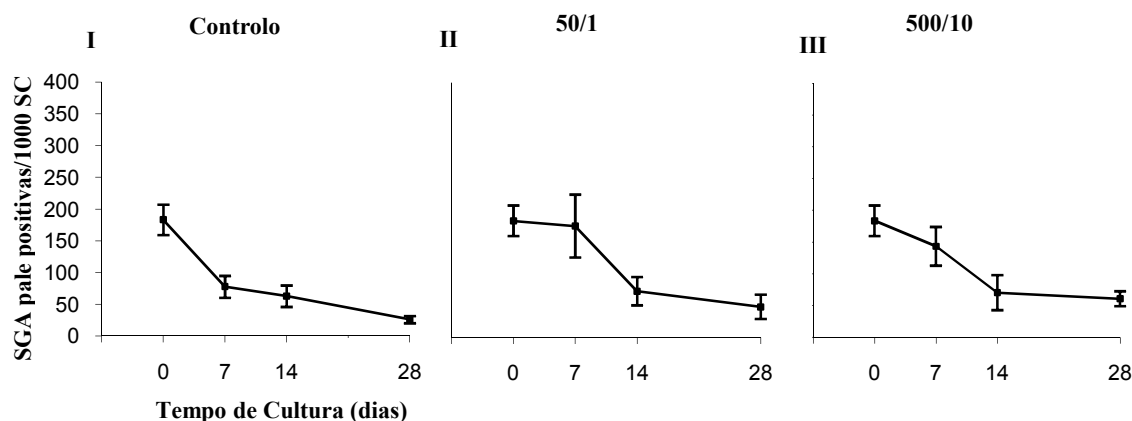


Gráfico 19 – Número médio de Espermatogónias A pale positivas por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo, experiência 50/1 e na experiência 500/10. Os pontos correspondem à média ± desvio padrão.

Ao analisar o total de espermatogónias A pale positivas em cultura, pelo teste de Mann-Whitney U (Gráfico 20), verificou-se que no grupo controlo, em comparação com o dia 0, houve uma diminuição significativa da proliferação das espermatogónias nos dias 7, 14 e 28 ($P = 0.029$). Não se verificou uma alteração significativa na proliferação destas células do dia 7 para o dia 14 ($P = 0.343$), mas dos dias 7 e 14 para o dia 28 notou-se uma diminuição significativa ($P = 0.029$).

Nos grupos 50/1 e 500/10 não se detectou uma alteração significativa no número de espermatogónias A pale a proliferar, do dia 0 para o dia 7 ($P \geq 0.200$) mas do dia 0 para

os dias 14 e 28 detectou-se uma diminuição significativa na proliferação deste tipo celular ($P = 0.029$). Verificou-se ainda uma diminuição significativa de espermatogónias A pale a proliferar, do dia 7 para os dias 14 e 28 ($P = 0,029$), mas do dia 14 para o dia 28 não houve uma alteração significativa no número de células positivas ($P = 0.343$).

Ao comparar os grupos verificou-se que no dia 7, o número de espermatogónias A pale positivas do grupo controlo era estatisticamente inferior ao das experiências 50/1 e 500/10 ($P = 0.029$). No dia 14, não se observaram diferenças significativas entre os três grupos ($P \geq 0.486$). No dia 28, apenas o grupo controlo apresentou um número significativamente inferior de células BrdU positivas em comparação com a experiência 500/10 ($P = 0.029$). Não foram detectadas diferenças significativas entre a experiência 500/10 e a experiência 50/1 ($P \geq 0.886$).

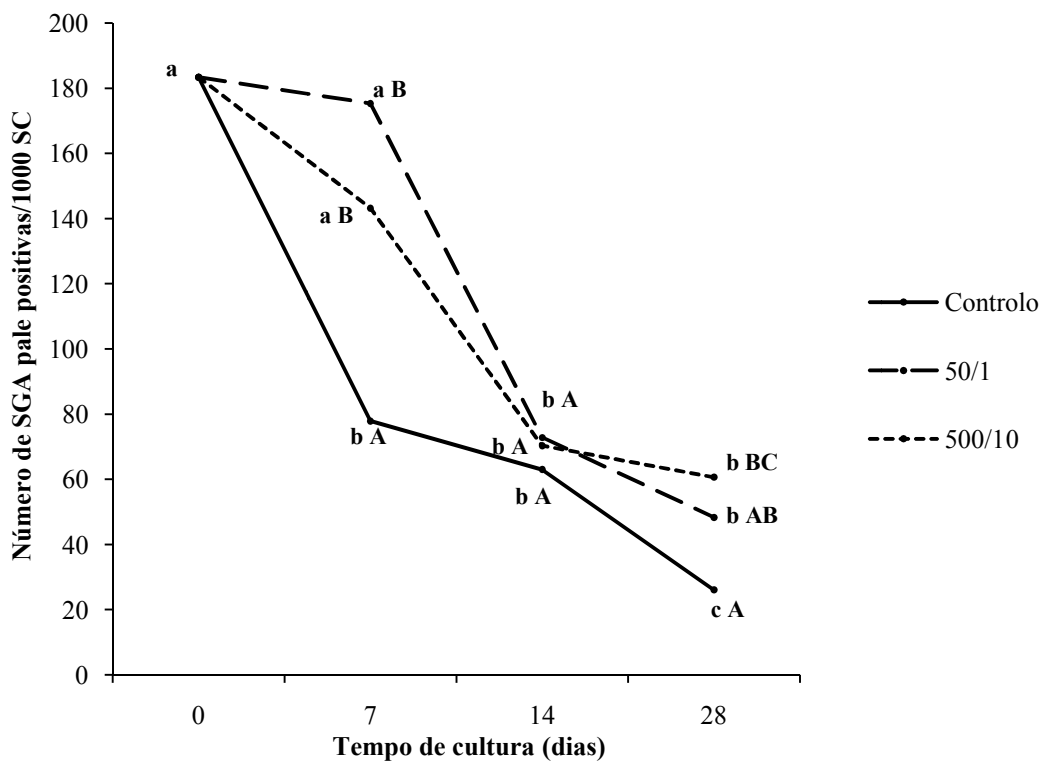
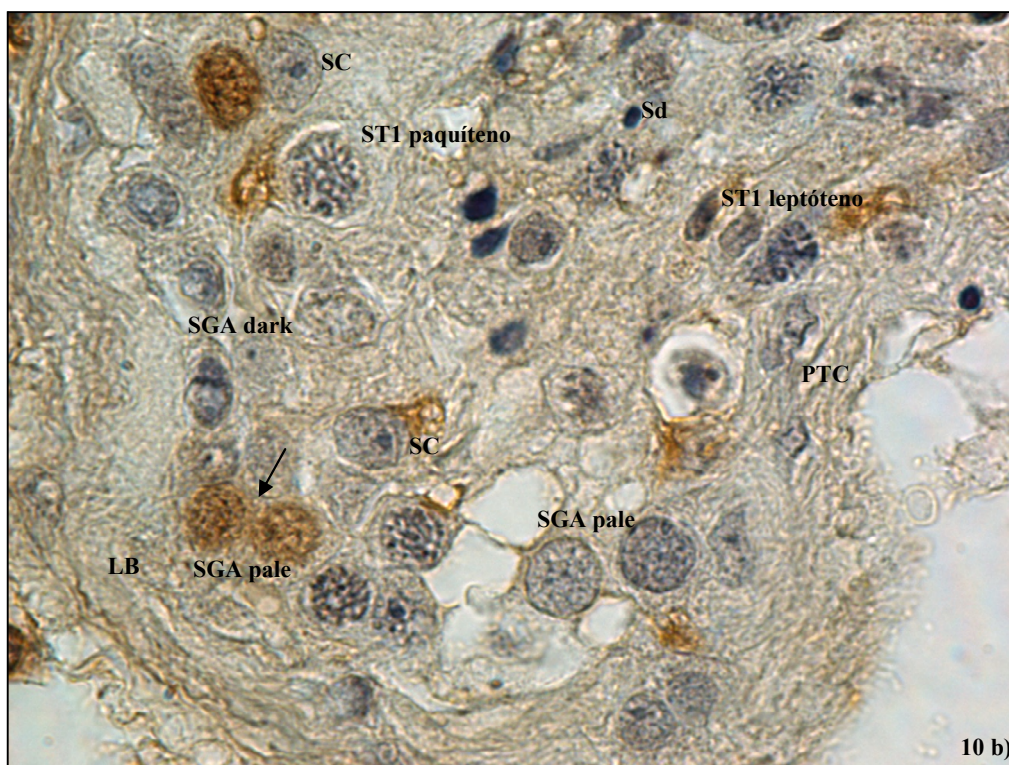
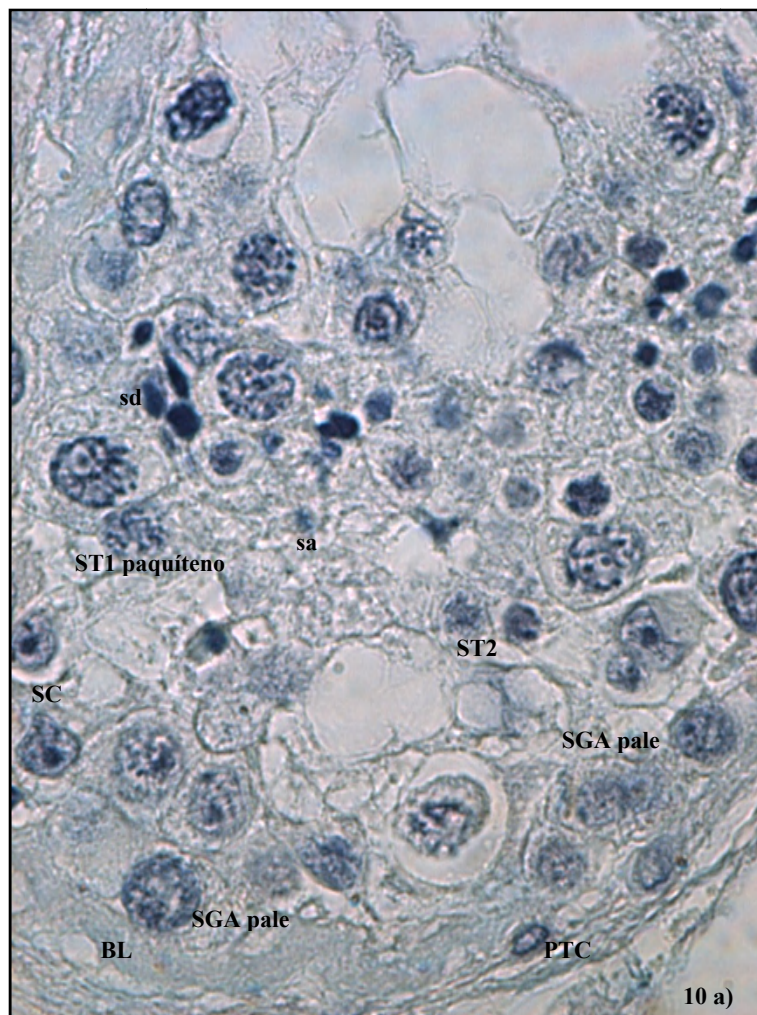


Gráfico 20 - Comparação do número médio de Espermatogónias A pale positivas por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo, experiência 50/1, e na experiência 500/10 pelo teste de Mann-Whitney U. (Letras minúsculas – comparação entre os dias do mesmo grupo. Letras maiúsculas- comparação entre os grupos).



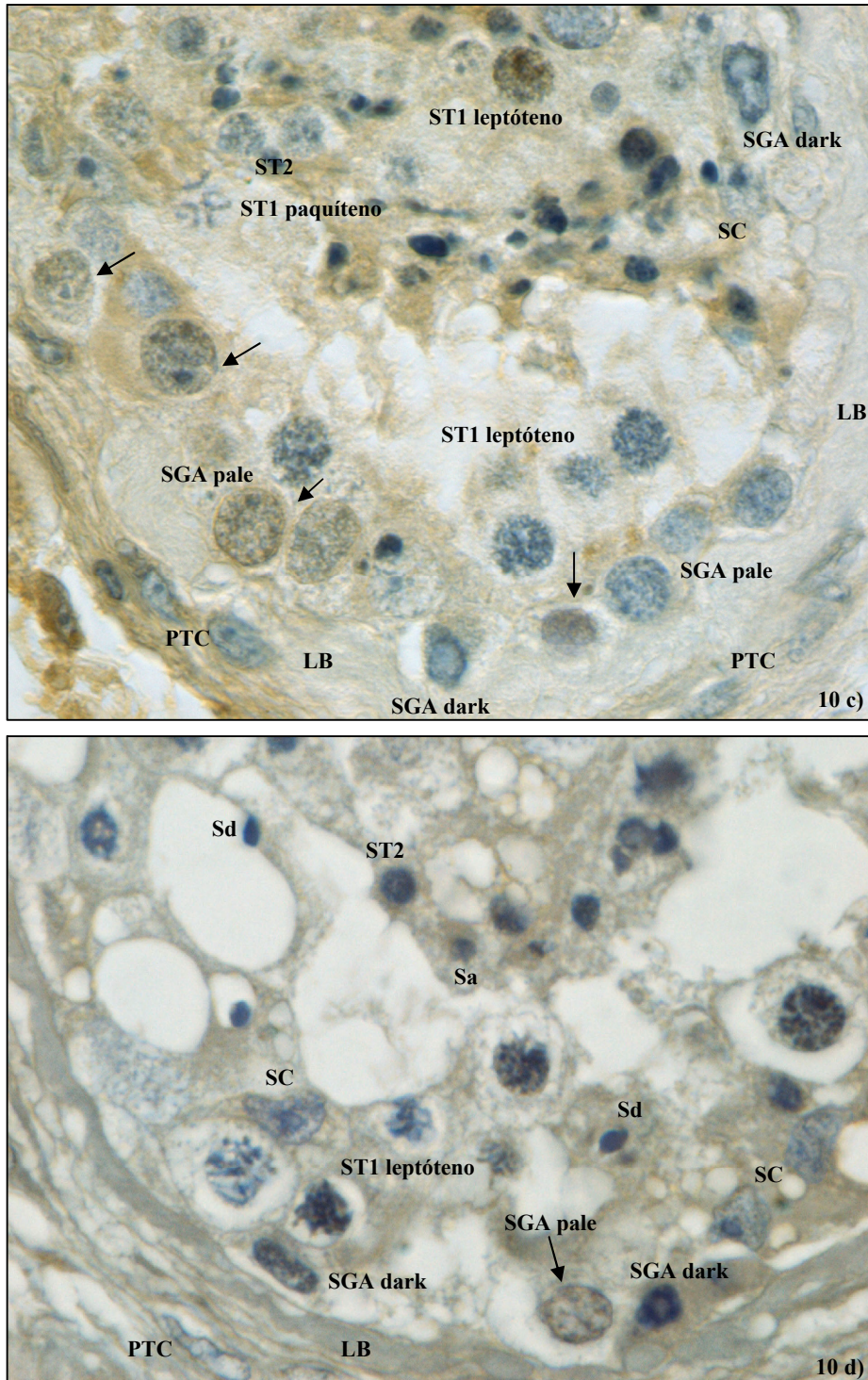


Figura 10 – Imagem ao microscópio óptico de um corte de um túbulo seminífero evidenciando espermatogônias A pale BrdU positivas (x100). 10 a) Imagem do controle negativo apenas corado com Hematoxilina. 10 b,c,d) Imagem da Imunohistoquímica mostrando Espermatogônias A pale BrdU positivas (setas). LB – lâmina basal, PTC – célula peritubular, SC – célula de Sertoli, SGA pale – espermatogônia A pale, SGA dark – espermatogônia A dark, ST1 leptóteno – espermatócito primário em leptóteno (setas largas quando positivos), ST1 paquíteno – espermatócito primário em paquíteno, ST2 – espermatócito secundário, Sa – espermatídeo redondo, Sd – espermatídeo alongado.

4.3. 2. Espermatogónias A dark

Tabela 22 – Número médio de espermatogónias A pale positivas presentes em cultura, nos dias 0, 7, 14, e 28 das experiências controlo, 50/1 e 500/10.

Tempo de Cultura (dias)	Controlo	50/1	500/10
	Med ± DP ^{b)} (n=4) ^{a)}	Med ± DP (n=4)	Med ± DP (n=4)
0	17.74 ± 8.34	-	-
7	18.57 ± 10.66	14.03 ± 5.92	25.42 ± 6.89
14	12.13 ± 0.45	7.42 ± 3.85	7.36 ± 0.56
28	5.98 ± 2.01	5.2 ± 3.88	4.4 ± 2.18

a) Número de pacientes.

b) Valores correspondem à média ± desvio padrão.

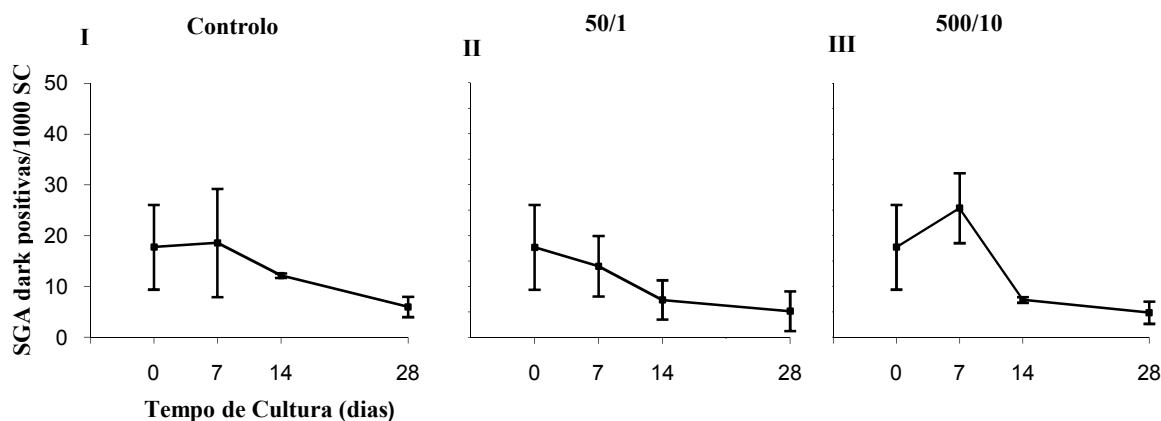


Gráfico 21 – Número médio de Espermatogónias A dark positivas por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo (I), experiência 50/1 (II) e na experiência 500/10 (III). Os pontos correspondem à média ± desvio padrão.

Quando se analisou o número de espermatogónias A dark BrdU positivas em cultura, pelo teste de Mann-Whitney U (Gráfico 22) não foi verificada uma alteração significativa no número de espermatogónias A dark em proliferação entre o dia 0 e os restantes dias do controlo e das experiências 50/1 e 500/10 ($P \geq 0.057$).

No grupo controlo não se detectaram diferenças significativas entre o dia 7 e o dia 14 ($P = 0.343$), mas dos dias 7 e 14 para o dia 28 houve uma diminuição estatisticamente significativa na proliferação destas células ($P = 0.029$).

Na experiência 50/1 não se verificaram diferenças significativas ao longo dos 28 dias ($P = 0.029$).

Na experiência 500/10 detectou-se uma diminuição significativa das células BrdU positivas entre os dias 7 e 14 e 7 e 28 ($P = 0.029$), mas não foram notadas alterações significativas entre os dias 14 e 28 ($P = 0.200$).

Ao analisar o Gráfico 22 não se verificaram nos dias 7 e 28 diferenças significativas no número de espermatogónias A dark a proliferar entre os três grupos ($P \geq 0.114$). Contudo no dia 14 as experiências em que o meio de cultura foi suplementado com hormonas apresentaram um número estatisticamente inferior de espermatogónias A dark em proliferação do que a experiência controlo ($P = 0.029$).

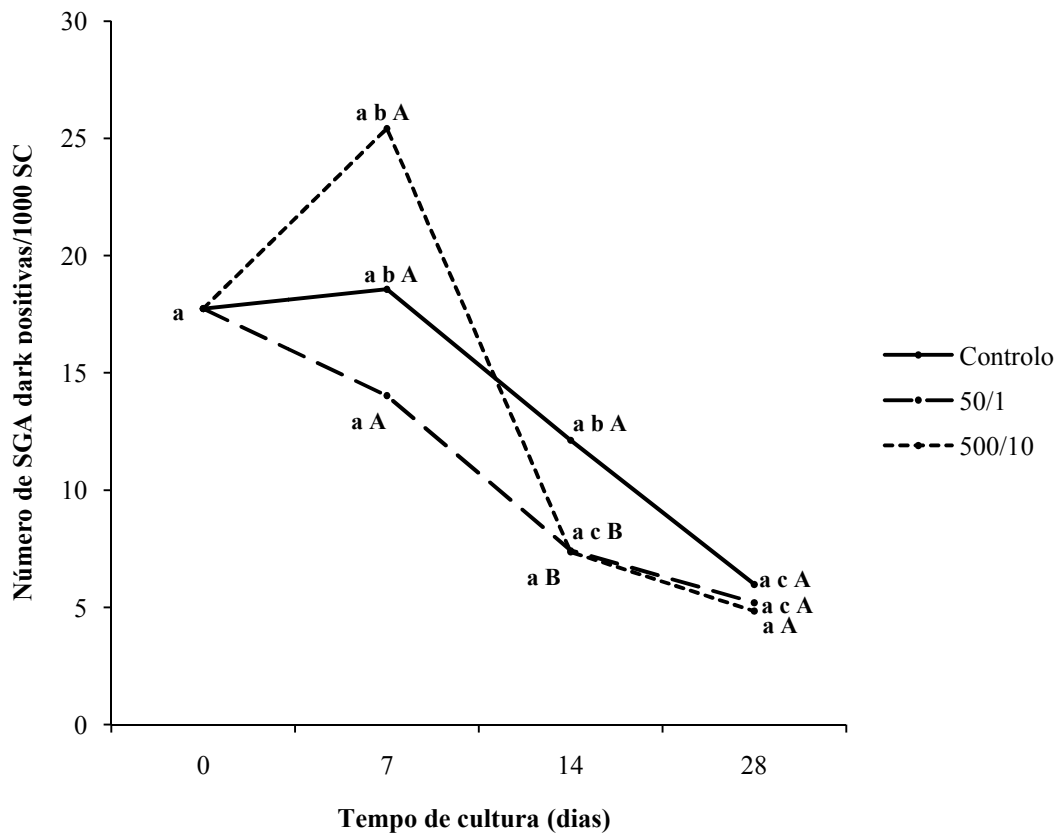


Gráfico 22 - Comparação do número médio de Espermatogónias A dark positivas por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo, experiência 50/1, e na experiência 500/10 pelo teste de Mann-Whitney U. (Letras minúsculas – comparação entre os dias do mesmo grupo. Letras maiúsculas- comparação entre os grupos).

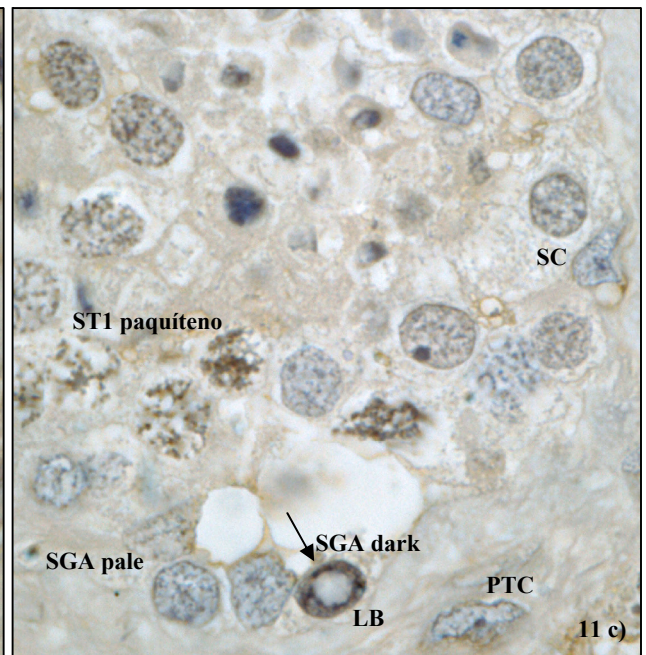
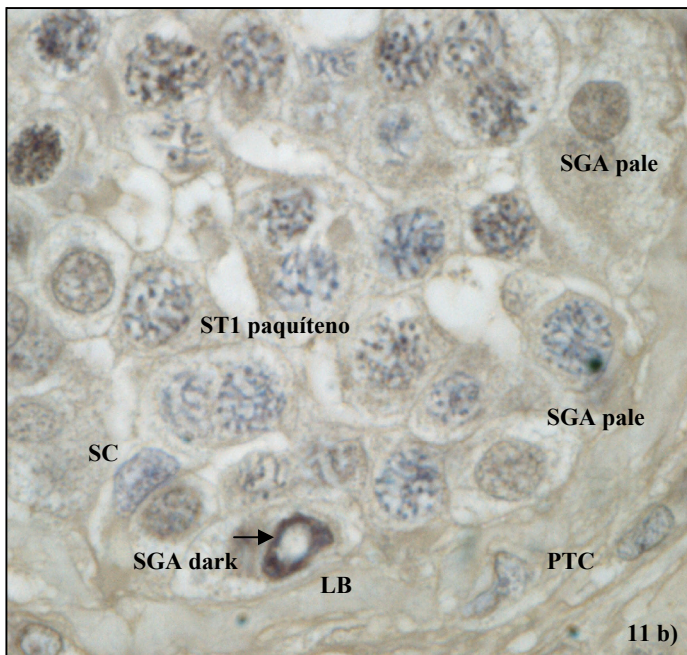
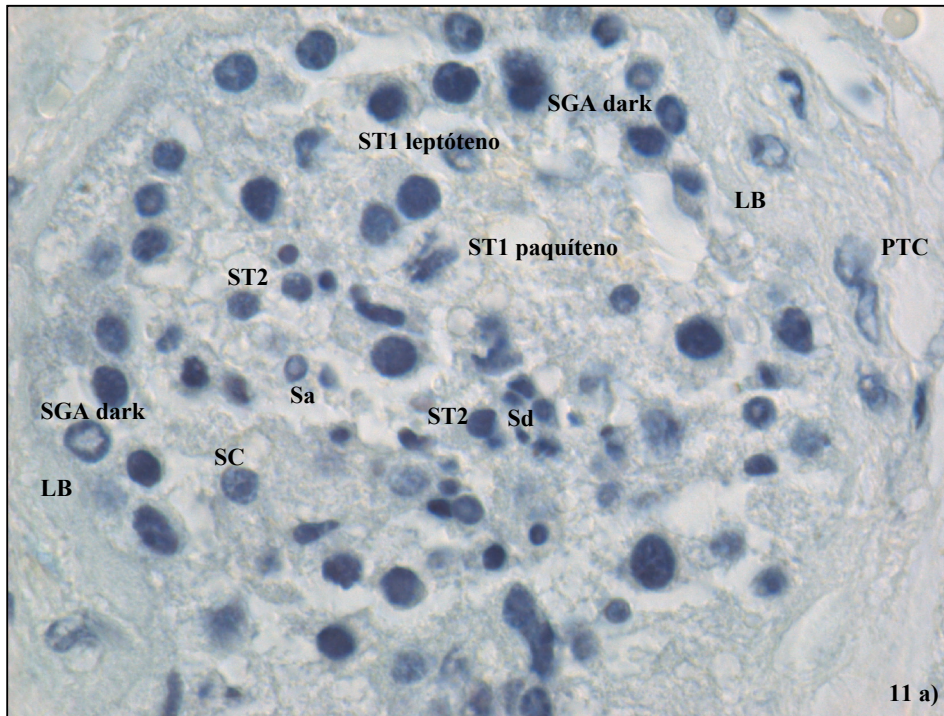


Figura 11- Imagem ao microscópio óptico de um corte de um túbulo seminífero evidenciando espermatogônias A dark BrdU positivas (x100). 11 a) Imagem do controle negativo apenas corado com Hematoxilina. 10 b,c,d) Imagem da Imunohistoquímica mostrando Espermatogônias A dark BrdU positivas (setas). LB – lâmina basal, PTC – célula peritubular, SC – célula de Sertoli, SGA pale – espermatogônia A pale, SGA dark – espermatogônia A dark, ST1 leptóteno – espermátócito primário em leptóteno, ST1 paquíteno – espermátócito primário em paquíteno.

4.3. 3. Total de Espermatogónias A

Tabela 24 – Número médio do total de espermatogónias A positivas presentes na cultura, nos dias 0, 7, 14, e 28 das experiências controlo, 50/1 e 500/10.

Tempo de Cultura (dias)	Controlo	50/1	500/10
	Med ± DP ^{b)} (n=4) ^{a)}	Med ± DP (n=4)	Med ± DP (n=4)
0	201.1 ± 28.5	-	-
7	96.45 ± 24.89	189.29 ± 44.25	168.58 ± 37.73
14	75.15 ± 12.27	81.19 ± 30.14	75.95 ± 22.46
28	32.06 ± 7.7	53.51 ± 16.75	65.61 ± 11.37

a) Número de pacientes.

b) Valores correspondem à média ± desvio padrão.

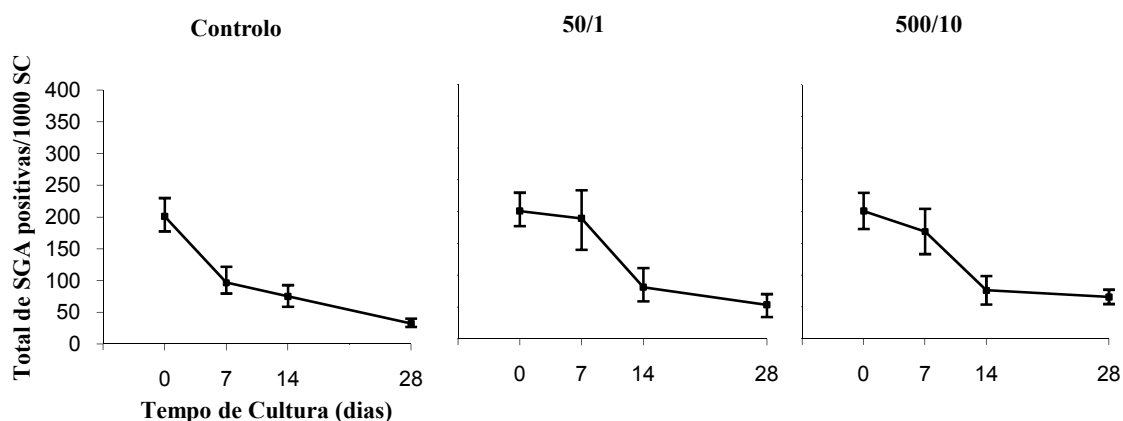


Gráfico 23- Número médio do total de Espermatogónias A positivas por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 1 e 28, na experiência controlo (I), experiência 50/1 (II) e na experiência 500/10 (III). Os pontos correspondem à média ± desvio padrão.

Pela análise do número total de espermatogónias A em proliferação na cultura, pelo teste de Mann-Whitney U (Gráfico 24), verificou-se que no grupo controlo houve uma diminuição significativa da proliferação do total das espermatogónias A nos dias 7, 14 e 28 ($P = 0.029$) em comparação com o dia 0. Contudo, não se verificou uma alteração significativa no número de células a proliferar do dia 7 para o dia 14 ($P = 0.343$), mas dos dias 7 e 14 para o dia 28 notou-se uma diminuição significativa ($P = 0.029$).

Nos grupos 50/1 e 500/10 não foi detectada uma alteração significativa do número total de espermatogónias A a proliferar, do dia 0 para o dia 7 ($P \geq 0.200$) mas do dia 0 para os dias 14 e 28 houve uma diminuição significativa no número de espermatogónias A positivas ($P = 0.029$). Verificou-se ainda, um decréscimo significativo de células BrdU positivas do dia 7 para os dias 14 e 28 ($P = 0.029$), mas entre o dia 14 e o dia 28 não se observou uma alteração significativa da proliferação das espermatogónias A ($P \geq 0.343$).

Ao comparar os grupos verificou-se que no dia 7, o número de espermatogónias A positivas do controlo era estatisticamente inferior ao das experiências 50/1 e 500/10 ($P = 0.029$). No dia 14, não se observaram diferenças significativas entre os três grupos ($P \geq 0.886$). No dia 28 o grupo controlo apresentou um número significativamente inferior de células BrdU positivas em comparação com a experiência 500/10. Não foram detectadas diferenças significativas entre a experiência 500/10 e a experiência 50/1 ($P \geq 0.343$).

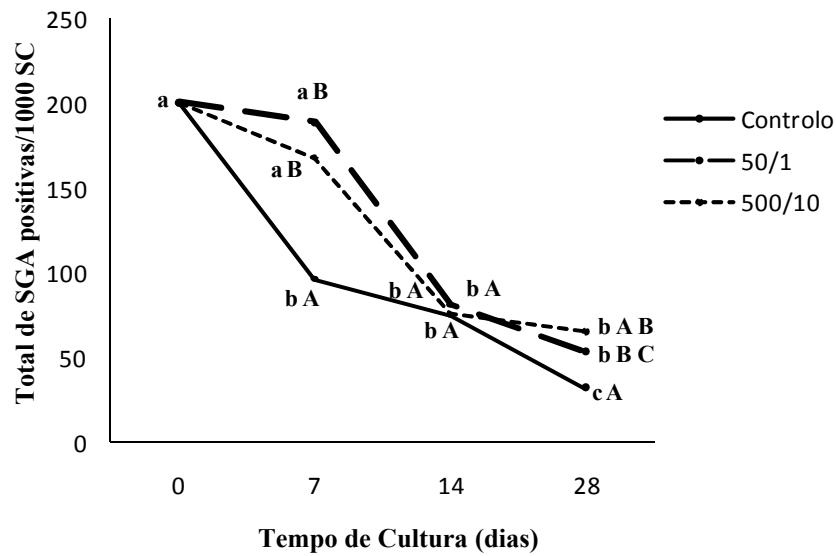


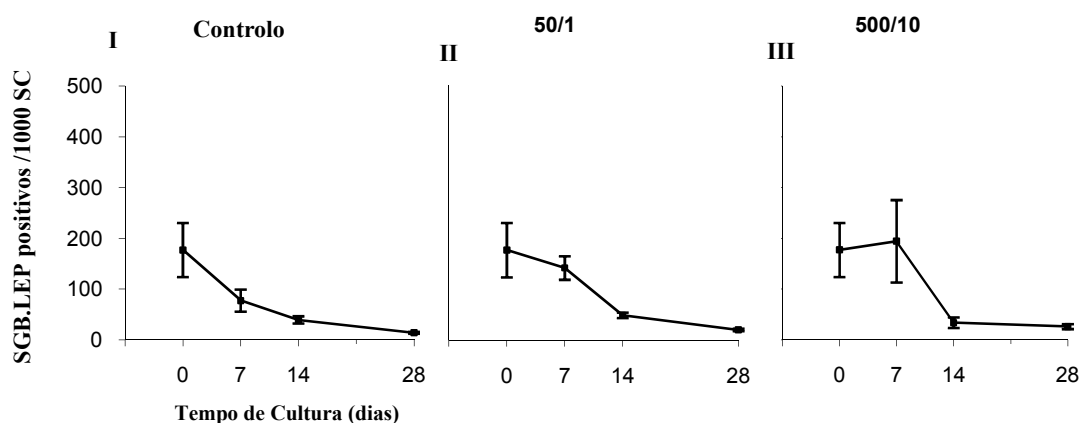
Gráfico 24 – Comparação do número médio do total de Espermatogónias A por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo, experiência 50/1, e na experiência 500/10 pelo teste de Mann-Whitney U. (Letras minúsculas – comparação entre os dias do mesmo grupo. Letras maiúsculas- comparação entre os grupos)

4.3. 4. Espermatogónias B e espermatócitos primários Leptótenos

Tabela 26 - Número médio de espermatogónias B e espermatócitos primários em leptóteno positivos presentes na cultura, nos dias 0, 7, 14, e 28 das experiências controlo, 50/1 e 500/10.

Tempo de Cultura (dias)	Controlo	50/1	500/10
	Med \pm DP ^{b)} (n=4) ^{a)}	Med \pm DP (n=4)	Med \pm DP (n=4)
0	177.28 \pm 53.49	-	-
7	77.53 \pm 21.72	142.15 \pm 23.04	194.48 \pm 81.1
14	39.53 \pm 7.19	49.25 \pm 5.48	34.02 \pm 10.51
28	14.11 \pm 1.81	20.41 \pm 2.34	26.38 \pm 4.8

a) Número de pacientes.

b) Valores correspondem à média \pm desvio padrão.Gráfico 25- Número médio de Espermatogónias B e espermatócitos primários em leptóteno positivos por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo (I), experiência 50/1 (II) e na experiência 500/10 (III). Os pontos correspondem à média \pm desvio padrão.

Pelo teste de Mann-Whitney U (Gráfico 26) verificou-se uma significância marginal entre o dia 0 e o dia 7 ($P = 0.057$) do controlo e uma diminuição significativa do número de espermatogónias B e leptótenos BrdU positivos entre o dia 0 e os dias 14 e 28 ($P = 0.029$). Verificou-se ainda uma redução significativa de células BrdU positivas do dia 7 para os dias 14 e 28 e do dia 14 para o dia 28 ($P = 0.029$).

Em relação aos grupos 50/1 e 500/10 não se detectou uma alteração significativa no número de células positivas no dia 7 comparativamente ao dia 0 ($P \geq 0.114$), mas notou-se uma diminuição significativa de células positivas a partir do dia 14 ($P = 0.029$).

Na experiência 50/1 detectou-se um decréscimo significativo do número de células BrdU positivas ao do dia 7 até ao dia 28 ($P = 0.029$).

Na experiência 500/10 verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa de células positivas do dia 7 para os dias 14 e 28 ($P = 0.029$), mas entre o dia 14 e o dia 28 não foram notadas diferenças significativas ($P = 0.486$).

Quando se comparou os grupos entre si, verificou-se que nos dias 7 e 28 o número de espermatogónias B e espermatócitos em leptóteno BrdU positivos do grupo controlo era estatisticamente inferior ao das experiências 50/1 e 500/10 ($P = 0.029$). Não foram detectadas diferenças significativas entre os resultados da experiência 50/1 e 500/10 ($P \geq 0.057$). No dia 14 não verificou alteração no número de células BrdU positivas nas três experiências ($P \geq 0.057$).

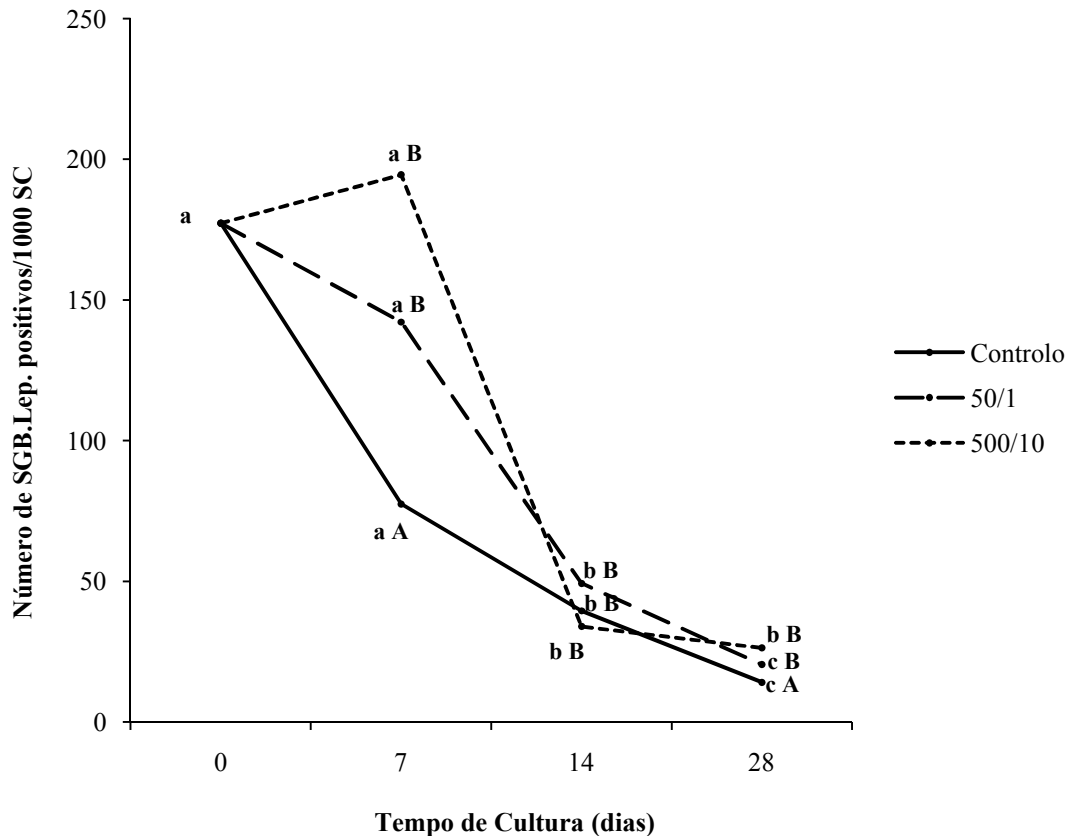


Gráfico 26 – Comparação do número médio do total de Espermatogónias B e espermatócitos em leptóteno por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo, experiência 50/1, e na experiência 500/10 pelo teste de Mann-Whitney U. (Letras minúsculas – comparação entre os dias do mesmo grupo. Letras maiúsculas- comparação entre os grupos).

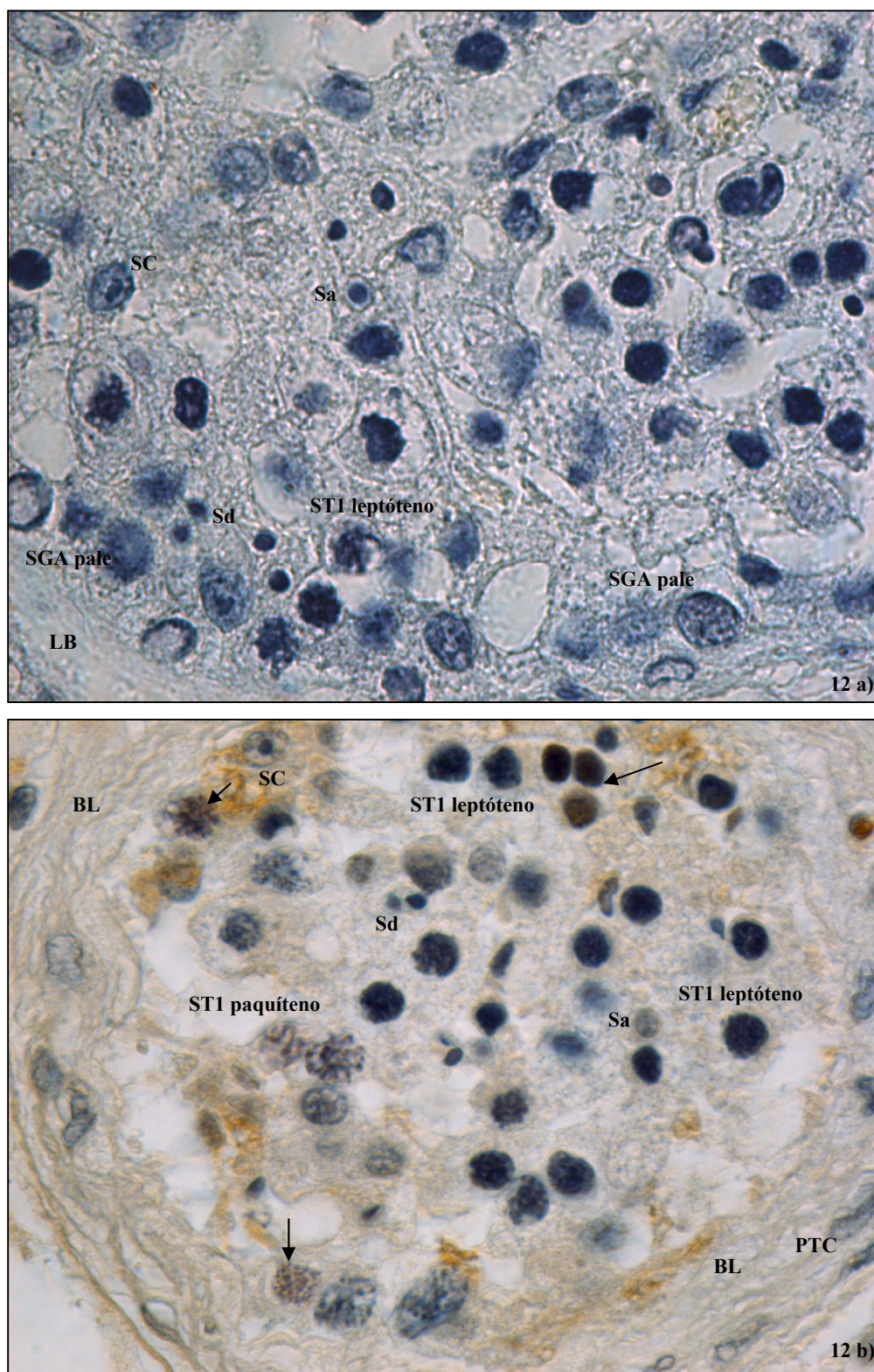


Figura 12 – Imagem ao microscópio óptico de um corte de um túbulo seminífero evidenciando espermatócitos em leptóteno BrdU positivos (x100). 12 a) Imagem do controle negativo apenas corado com Hematoxilina. 12 b), Imagem da Imunohistoquímica mostrando Espermatócitos em leptóteno BrdU positivos (setas).

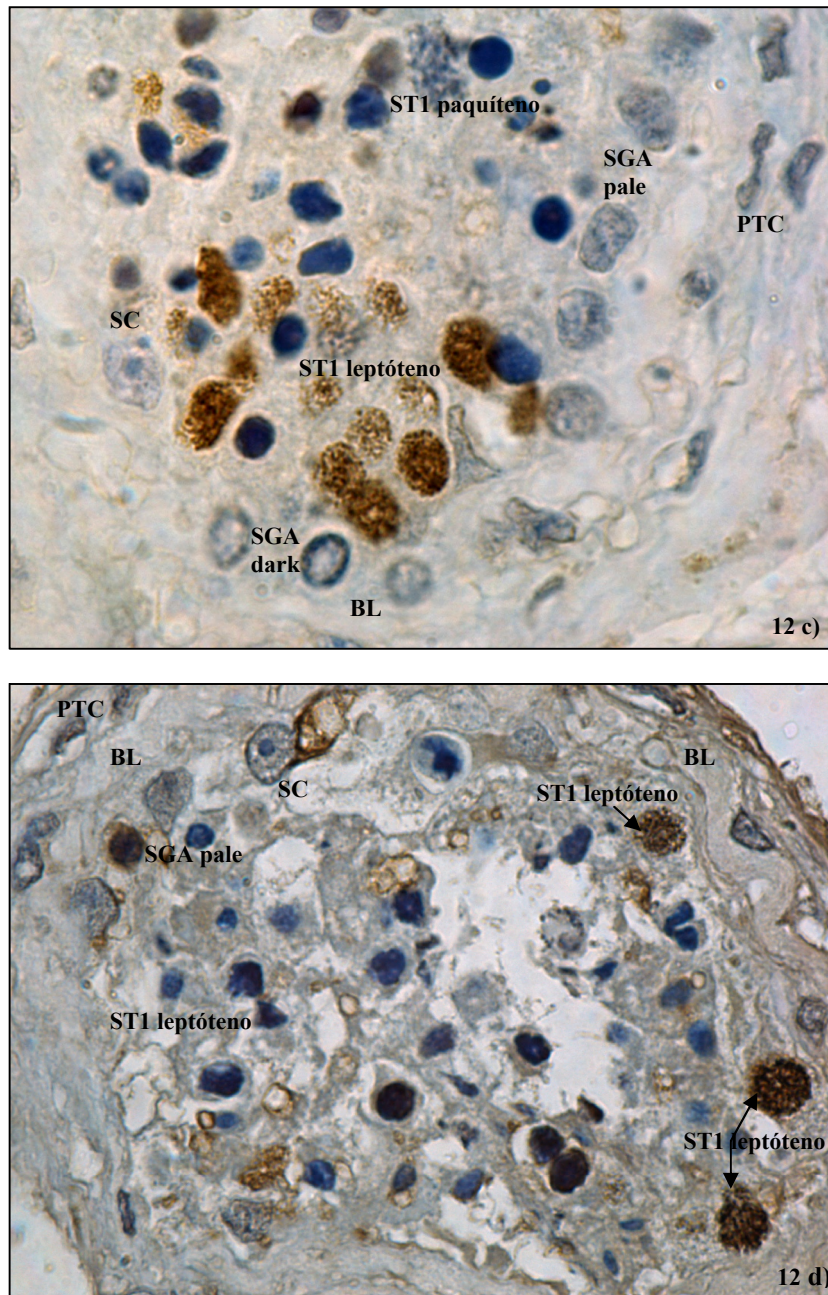


Figura 13 – Imagem ao microscópio óptico de um corte de um túbulo seminífero evidenciando espermatócitos em leptóteno BrdU positivos (x100). 12 a) Imagem do controlo negativo apenas corado com Hematoxilina. 12 b,c,d) Imagem da Imunohistoquímica mostrando Espermatócitos em leptóteno BrdU positivos (setas). LB – lâmina basal, PTC – célula peritubular, SC – célula de Sertoli, SGA pale – espermatogónia A pale, SGA dark – espermatogónia A dark, ST1 leptóteno – espermatócito primário em leptóteno, ST1 paquíteno – espermatócito primário em paquíteno, ST2 – espermatócito secundário, Sa – espermátídeo redondo, Sd – espermátídeo alongado.

4.3. 5. Espermatócitos primários em Zigóteno e Paquíteno

Tabela 28 - Número médio de espermatócitos primários em zigóteno e paquíteno positivos presentes na cultura, nos dias 0, 7, 14, e 28 das experiências controle, 50/1 e 500/10.

Tempo de Cultura (dias)	Controlo	50/1	500/10
	Med ± DP ^{b)} (n=4) ^{a)}	Med ± DP (n=4)	Med ± DP (n=4)
0	41.59 ± 22.27	-	-
7	80.19 ± 16.56	352.88 ± 135.67	194.74 ± 18.41
14	150.99 ± 29.51	173.89 ± 31.24	130.24 ± 33.86
28	16.03 ± 3.85	50.78 ± 11.78	28,84 ± 12.37

a) Número de pacientes.

b) Valores correspondem à média ± desvio padrão.

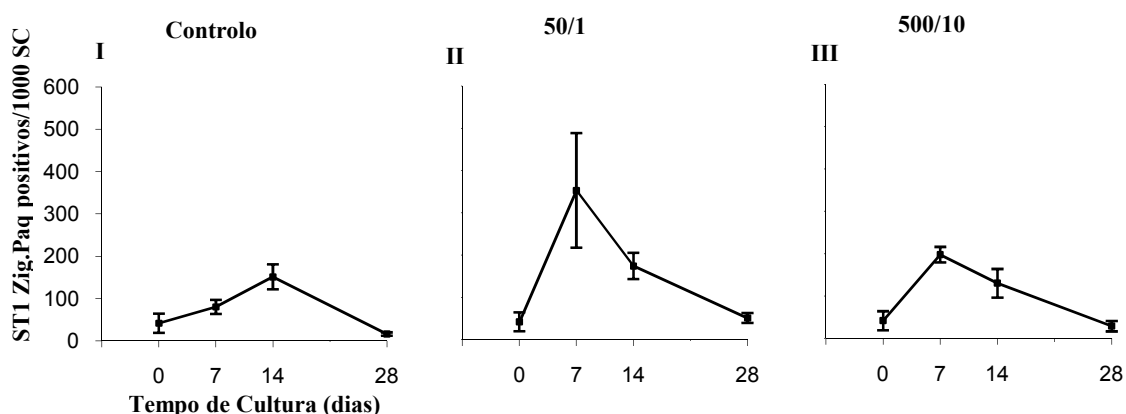


Gráfico 27- Total de espermatócitos primários em zigóteno e paquíteno positivos por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo (I), experiência 50/1 (II) e na experiência 500/10 (III). Os pontos correspondem à média ± desvio padrão.

Através do teste de Mann-Whitney U (Gráfico 28) observou-se um aumento significativo de zigótenos e paquítenos BrdU positivos do dia 0 para os dias 7 e 14 em todos os grupos ($P = 0.029$). No dia 28 verificou-se uma redução significativa de células positivas entre o dia 0 e o dia 28 apenas no grupo controlo ($P = 0.029$).

No grupo controlo detectou-se um aumento significativo de zigótenos e paquítenos BrdU positivos do dia 7 para o dia 14 e uma redução significativa destas células do dia 14 para o dia 28 ($P = 0.029$).

Nos grupos 500/10 e 50/1 verificou-se uma diminuição significativa no número de células positivas do dia 7 para os dias 14 e 28 e do dia 14 para o dia 28 ($P = 0.029$).

Comparando os grupos, verifica-se que no dia 7 o número de células positivas, do grupo 50/1 é significativamente superior ao das experiências controlo e 500/10, tendo sido

o do grupo controlo inferior ao do grupo 500/10. Contudo no dia 14, não se verificaram alterações significativas entre os grupos. No dia 28, o número de espermatócitos zigótenos e paquítenos é estatisticamente superior no grupo 50/1 em relação ao grupo controlo ($P = 0.029$), não sendo ambos significativamente diferentes do grupo 500/10 ($P \geq 0.057$).

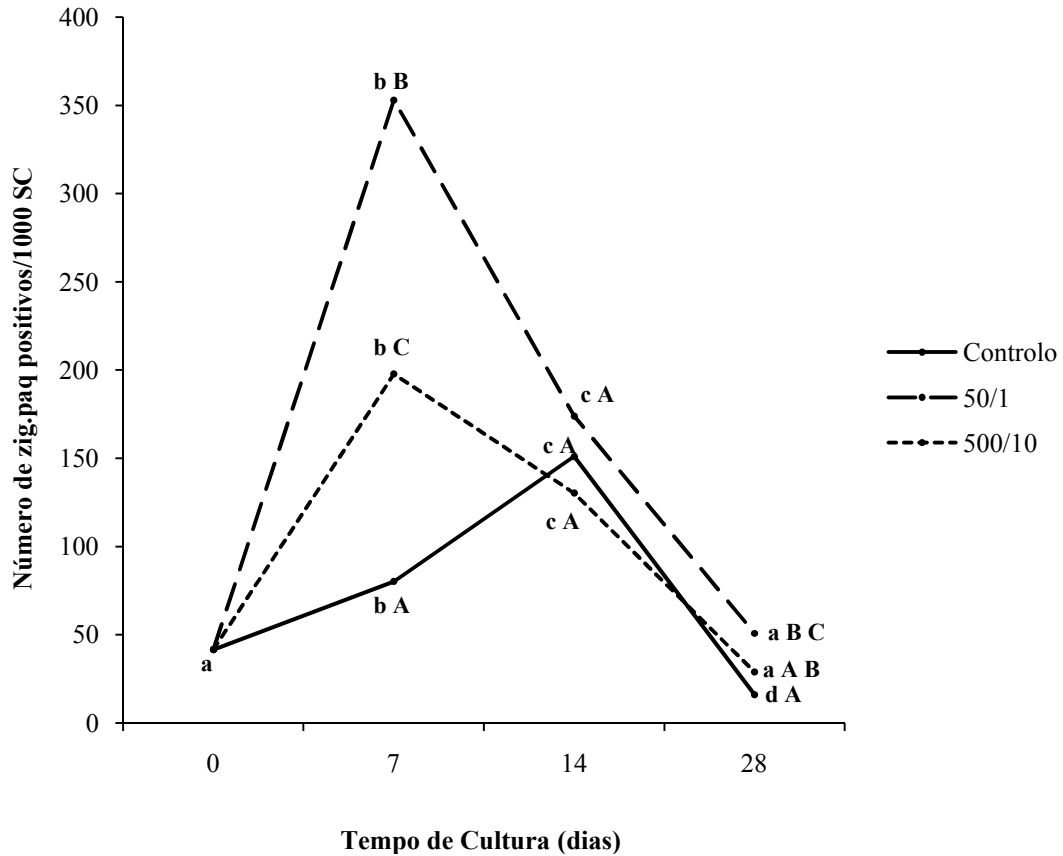


Gráfico 28 - Comparação do número médio de espermatócitos em zigóteno e paquíteno por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo, experiência 50/1, e na experiência 500/10 pelo teste de Mann-Whitney U. (Letras minúsculas – comparação entre os dias do mesmo grupo. Letras maiúsculas- comparação entre os grupos)

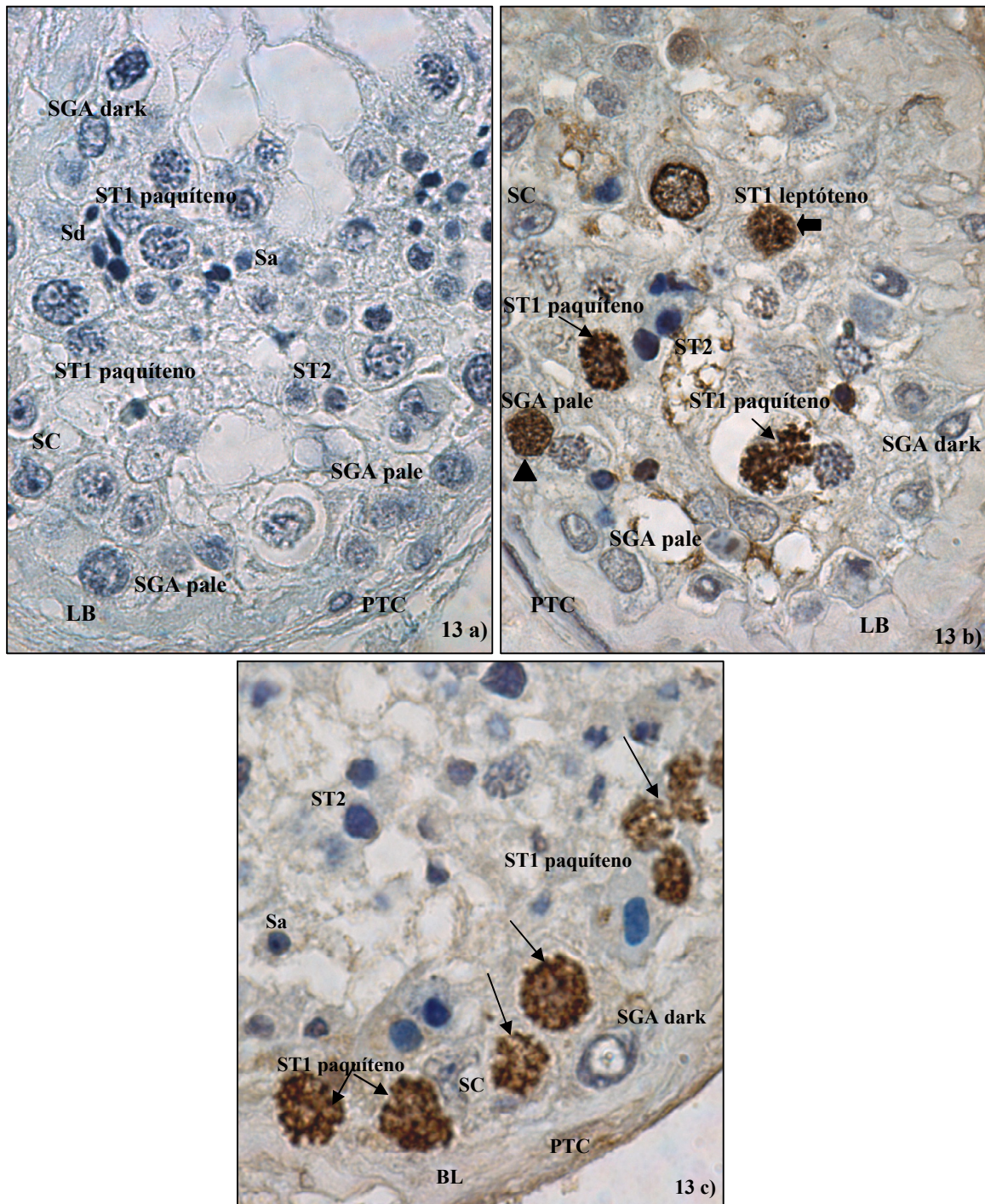


Figura 14 – Imagem ao microscópio óptico de um corte de um túbulo seminífero evidenciando espermátocitos em paquíteno BrdU positivos (x100). 13 a) Imagem do controlo negativo apenas corado com Hematoxilina. 13 b,c,) Imagem da Imunohistoquímica mostrando Espermátocitos em paquíteno BrdU positivos (setas). LB – lâmina basal, PTC – célula peritubular, SC – célula de Sertoli, SGA pale – espermatogónia A pale (cabeça de seta positivas), SGA dark – espermatogónia A dark, ST1 leptóteno – espermátocito primário em leptóteno (setas largas quando positivos), ST1 paquíteno – espermátocito primário em paquíteno, ST2 – espermátocito secundário, Sa – espermátide redondo, Sd – espermátide alongado.

4.3. 6. Espermatócitos Secundários

Tabela 30 - Número médio de espermatozóitos secundários positivos presentes na cultura nos dias 0, 7, 14 e 28 das experiências controle, 50/1 e 500/10.

Tempo de Cultura (dias)	Controle	50/1	500/10
	Med ± DP ^{b)} (n=4) ^{a)}	Med ± DP (n=4)	Med ± DP (n=4)
0	0	0	0
7	6.03 ± 4.03	9.94 ± 1.35	7.24 ± 4.71
14	0	0	0
28	0	0	0

a) Número de pacientes.

b) Valores correspondem à média ± desvio padrão.

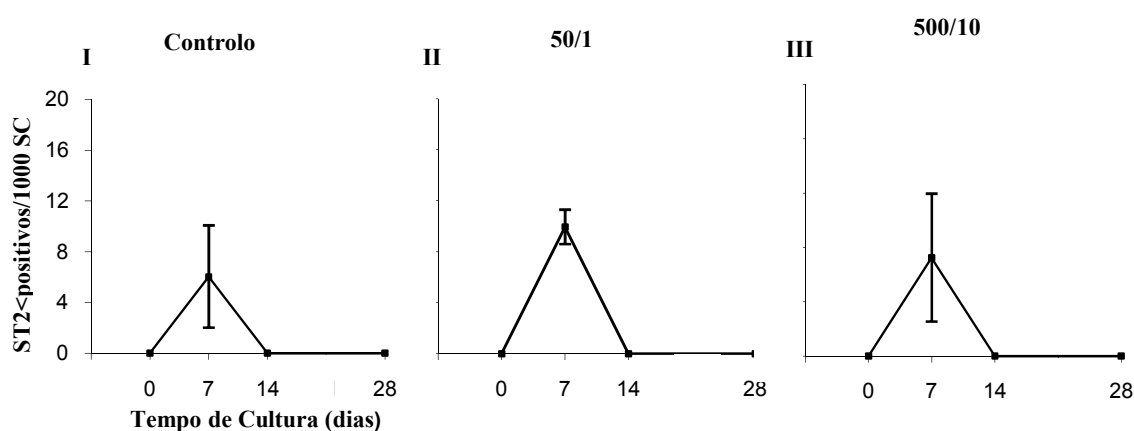


Gráfico 29- Total de espermatozóitos secundários positivos por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controle (I), experiência 50/1 (II) e na experiência 500/10 (III). Os pontos correspondem à média ± desvio padrão.

Pelo teste de Mann-Whitney U, (Gráfico 30) não se verificaram diferenças significativas no número de espermatozóitos secundários BrdU positivos entre o dia 7 do grupo controle e o dia 7 dos grupos 50/1 e 500/10 ($P \geq 0.343$). Após o dia 7 até ao final da experiência não se encontraram mais espermatozóitos secundários BrdU positivos.

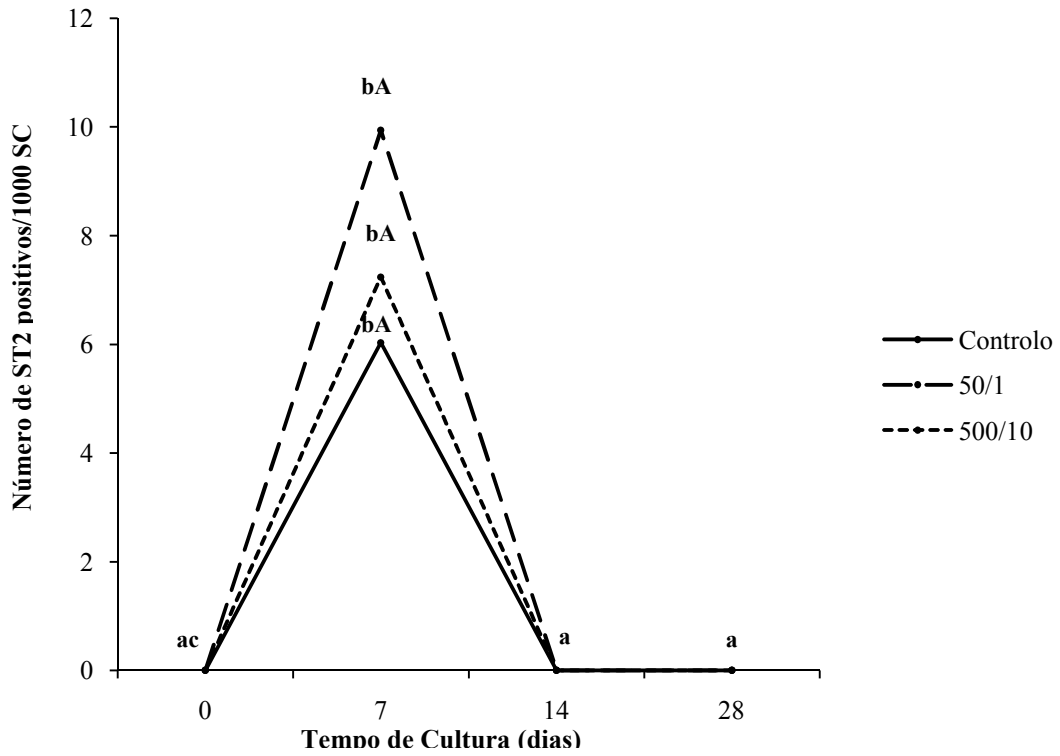


Gráfico 30 – Comparação do número médio de espermátocitos secundários por 1000 células de Sertoli, nos dias 0, 7, 14 e 28, na experiência controlo, experiência 50/1, e na experiência 500/10 pelo teste de Mann-Whitney U. (Letras minúsculas – comparação entre os dias do mesmo grupo. Letras maiúsculas- comparação entre os grupos).

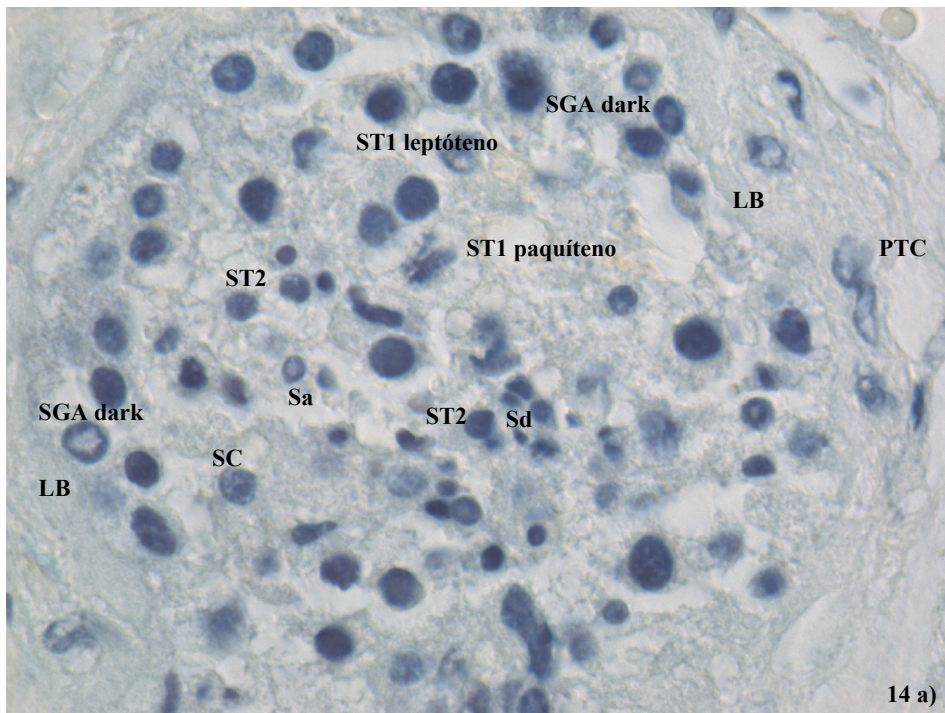


Figura 15 – Imagem ao microscópio óptico de um corte de um túbulo seminífero evidenciando espermátocitos secundários BrdU positivos (x100). 14 a) Imagem do controlo negativo apenas corado com Hematoxilina.

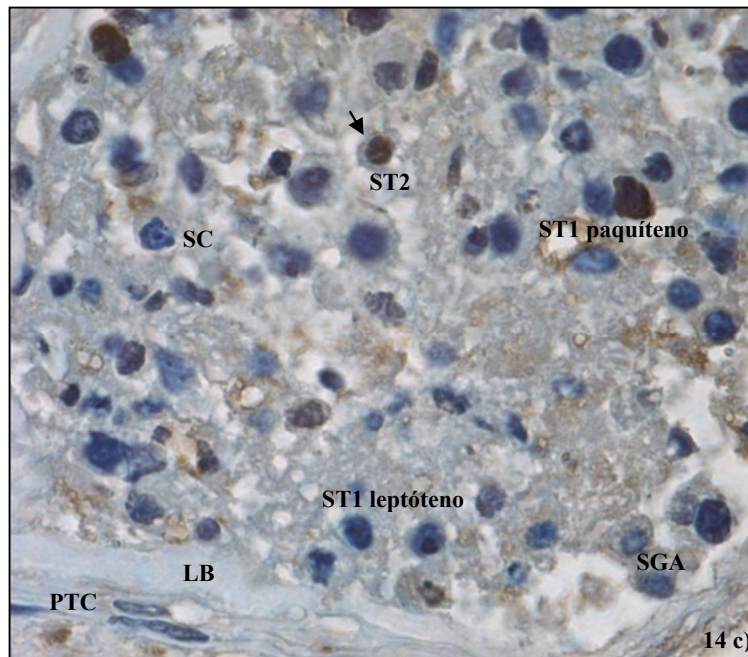
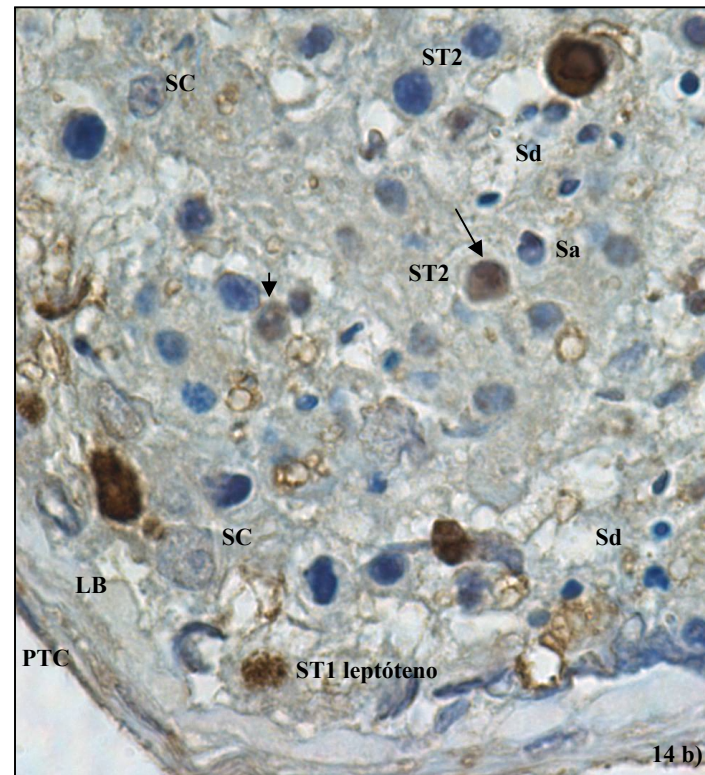


Figura 16 – Imagem ao microscópio óptico de um corte de um túbulo seminífero evidenciando espermatócitos secundários BrdU positivos (x100). 14 a) Imagem do controle negativo apenas corado com Hematoxilina. 14 b,c.) Imagem da Imunohistoquímica mostrando Espermatócitos secundários BrdU positivos (setas). LB – lâmina basal, PTC – célula peritubular, SC – célula de Sertoli, SGA pale – espermatogónia A pale, SGA dark – espermatogónia A dark, ST1 leptóteno – espermatócito primário em leptóteno, ST1 paquíteno – espermatócito primário em paquíteno, ST2 – espermatócito secundário, Sa – espermatídeo redondo, Sd – espermatídeo alongado.

5. Discussão e Conclusão

O desenvolvimento de um sistema de cultura eficiente para as células germinais humanas é deveras importante pois pode levar à descoberta de novas terapias para alguns homens inférteis e doentes com risco de infertilidade por atravessarem ciclos de quimioterapia e radioterapia. Para além das aplicações clínicas são também relevantes para o desenvolvimento de investigação básica e para a necessidade de estudar a influência de alguns factores ambientais na função testicular. O sucesso da cultura destas células e em especial das células estaminais adultas testiculares está dependente da percepção dos mecanismos celulares e moleculares que estão por detrás da auto-renovação e diferenciação destas células.

Como já foi referido anteriormente, a completa diferenciação das células germinais masculinas *in vitro*, com início nas células estaminais adultas testiculares e a sua passagem pela meiose para formar gâmetas maduros, ainda não foi atingida de forma completamente eficaz. Um dos primeiros trabalhos a ser desenvolvido com esse âmbito foi o do grupo de Steinberger, que através da observação da morfologia das células germinais que incorporaram a ^3H -timidina, em pequenos fragmentos de túbulos seminíferos em cultura na interface entre o ar e o meio de cultura, verificou que as células de Sertoli e as espermatogónias se mantinham vivas em cultura por várias semanas, ocorrendo diferenciação dos espermátócitos primários do estadio de pré-leptóteno para paquíteno. Contudo, os espermátídeos degeneraram durante os primeiros dias, independentemente dos suplementos adicionados ao meio (Steinberger, 1967). Recentemente, vários grupos têm trabalhado neste âmbito, usando diferentes meios de cultura, onde algumas células germinais têm capacidade de se diferenciar sofrer meiose e completar a espermiogénese *in vitro*. Continua a haver várias opiniões controversas, especialmente no que se refere ao tempo que as células germinais humanas demoram a diferenciar *in vitro* (Ghatnekar *et al.*, 1974; Tesarik *et al.*, 1998, Cremades *et al.*, 2001; Sousa *et al.*, 2002, Sá *et al.*, 2008) e a necessidade de o meio de cultura ser ou não suplementado com hormonas, em especial FSH e testosterona (Tesarik *et al.*, 1998, Cremades *et al.*, 2001; Sousa *et al.*, 2002, Roulet *et al.*, 2006; Sá *et al.*, 2008).

Clermont efectuou vários trabalhos na espermatogénese humana *in vivo*, e a maioria dos estudos nesta área baseia-se nas descobertas deste investigador. Um dos seus estudos

mais importantes foi a estimativa da duração da espermatogénese. Através de injeções intra-testiculares de ^3H -timidina em homens, ele estimou que toda a espermatogénese humana demorasse mais de 64 dias (Heller and Clermont, 1963).

Apesar dos vários estudos na espermatogénese humana, ainda nenhum incidiu sobre a sua quantificação, em termos de proliferação e diferenciação das células germinais. No presente trabalho foram realizadas culturas de fragmentos de túbulos seminíferos, dado que este sistema conserva as interações entre as células germinais e de suporte no interior dos túbulos seminíferos com o compartimento intersticial, esperando-se uma maior viabilidade das células, durante 28 dias, com o objectivo de quantificar a proliferação e a diferenciação celular, nos túbulos seminíferos humanos normais, numa situação semelhante à *in vivo*. Os dados quantitativos dos 28 dias de cultura dos túbulos seminíferos humanos revelaram que as células germinais foram capazes de proliferar e sofrer diferenciação *in vitro*. Durante este processo as células estaminais adultas testiculares, e especialmente as células progenitoras adultas testiculares proliferaram, na presença e na ausência de hormonas.

Ao dia 0, após 18 horas de exposição ao BrdU, a grande maioria de células BrdU positivas encontradas eram espermatogónias A pale (média de 183 espermatogónias por 1000 células de Sertoli), espermatogónias B e espermatócitos primários em Leptóteno (cerca de 177 células positivas por 1000 células de Sertoli).

No presente trabalho, quando se analisou as células estaminais adultas testiculares (SGA dark) verificou-se que a sua taxa de proliferação era bastante baixa, detectando-se apenas 25 espermatogónias A dark BrdU positivas em cada 1000 células de Sertoli, não se observando diferenças entre o grupo controlo e os grupos com suplementação hormonal. Estes resultados estão de acordo com a descrição de Ehmcke, que refere que as espermatogónias A dark possuem uma actividade mitótica baixa, sendo células de reserva regenerativa, facto que comprovou com um estudo no macaco Rhesus, onde encontrou um nível de marcação destas células inferior a 1% (Ehmcke *et al.*, 2005a,b; Ehmcke *et al.*, 2006 a, b).

A proliferação das espermatogónias A, espermatogónias B e pré-leptótenos, foi máxima durante a primeira semana de cultura atingindo valores mais elevados quando induzida pelas hormonas FSH e testosterona (de 96 espermatogónias A positivas no controlo para 189 células positivas em 1000 células de Sertoli quando a cultura foi

suplementada hormonalmente). Não foram verificadas diferenças significativas entre as diferentes concentrações hormonais utilizadas. Após a primeira semana ocorreu uma diminuição acentuada dos níveis da proliferação que é explicada pela redução do número total de espermatogónias A em cultura. Uma proliferação máxima das espermatogónias (cerca de 4%) na primeira semana de cultura, tinha já sido descrita, nos humanos, embora utilizando um sistema de cultura diferente (Sá *et al.*, 2008). Dado que entre dia 0 e o dia 7 das culturas suplementadas com FSH e testosterona o número de espermatogónias a proliferar foi muito semelhante mas bastante superior ao do dia 7 do controlo, há uma sugestão de que na presença de FSH e testosterona as células se mantêm em proliferação por períodos mais alargados de tempo.

Ao fim de uma semana verificou-se que houve diferenciação das espermatogónias e leptótenos marcados em espermatócitos zigótenos e paquítenos e espermatócitos secundários. Também se verificou que nas experiências com suplementação hormonal houve uma aceleração da passagem de espermatócito em leptóteno para espermatócito em zigóteno e paquíteno, pois, enquanto que na experiência controlo o pico de espermatócitos em paquíteno positivamente marcados foi visualizado ao final da segunda semana de cultura (151 paquítenos positivos por 1000 células de Sertoli) nos meios de cultura suplementados com hormonas esse pico verificou-se ao dia 7 (cerca de 352 espermatócitos em zigóteno e paquíteno BrdU positivos em 1000 células de Sertoli). Quando se comparou as diferentes concentrações hormonais, verificou-se que, no final da primeira semana, o meio suplementado com 50 U/L de FSH e 1 $\mu\text{mol/L}$ de testosterona é mais eficaz na diferenciação de espermatócitos em leptóteno para espermatócitos em zigóteno e paquíteno do que o meio suplementado com 500 U/L de FSH e 10 $\mu\text{mol/L}$ de testosterona, porém, nas semanas seguintes este facto já não se verifica. A presença de espermatócitos secundários BrdU positivos apenas foi detectada ao final da primeira semana, o que corresponde ao pico do número total destas células em cultura, pois após a primeira semana, há um decréscimo acentuado no número destas células. Não foram verificados efeitos da suplementação hormonal na diferenciação destas células.

A presença de gonadotropinas em culturas de tecido foi descrita por alguns autores como sem efeito na espermatogénese *in vitro* (Steinberger and Steinberger, 1967; Roulet *et al.*, 2006). Contudo, os dados do presente trabalho mostraram que a testosterona e a FSH são factores essenciais para a sobrevivência das células germinais humanas. O presente estudo

comprova que a FSH e a testosterona são necessárias para a proliferação das espermatogónias, a diferenciação celular e para a manutenção das células germinais, em especial as diplóides, em cultura. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores, embora em sistemas de cultura diferentes, utilizando suspensões celulares e células isoladas (Tesarik *et al.*, 1998; Tesarik *et al.*, 2002; Sá *et al.*, 2008). A FSH está descrita como estimuladora da proliferação das espermatogónias, do aumento do número de espermatócitos e de espermatídeos redondos, na redução da apoptose das células germinais e de Sertoli. A testosterona potencia os efeitos da FSH na passagem de espermatídeos redondos a espermatídeos alongados e estimula o final os passos finais da maturação dos espermatídeos (Erkkila *et al.*, 1997; Foresta *et al.*, 1998; Tesarik *et al.*, 1998).

Apesar de não se ter efectuado um estudo quantitativo da apoptose nos túbulos seminíferos, a sua presença foi verificada, em especial nos espermatócitos primários e nas células mais diferenciadas, começando os túbulos seminíferos a ser ocupados por pequenos vacúolos a partir do dia 7 de cultura, independentemente da presença de hormonas, e com um aumento gradual ao longo dos dias. Contudo, observou-se que na ausência de FSH e testosterona, a presença de figuras apoptóticas nos túbulos seminíferos foi mais acentuada. Estes achados estão de acordo com os descritos por Roulet, que descreve que o número de células apoptóticas aumenta ao longo do período de cultura, afectando maioritariamente as células germinais mais diferenciadas, confirmando que os sistemas *in vitro* são muito adversos à meiose e espermiogénese (Roulet *et al.*, 2006).

No presente trabalho, com base na morfologia celular das células germinais, observou-se uma diferenciação dos leptótenos positivamente marcados com BrdU em paquítenos e espermatócitos secundários durante a primeira e segunda semana de cultura. Estes resultados são compatíveis com, os obtidos pelo grupo de Roulet, e com a duração da espermatogénese humana *in vivo*, onde os pré-leptótenos se diferenciam em paquítenos em 7 a 14 dias (Clermont, 1963). A presença de espermatócitos primários em paquíteno positivamente marcados no dia 14 demonstra claramente que as células se continuam a replicar e diferenciar ao longo das duas semanas de cultura. Apesar de ser em número muito reduzido, foram encontradas células positivas ao dia 28, em especial espermatogónias A pale, o que indica que ao final de um mês este sistema, embora de forma muito ténue, ainda consegue manter a proliferação e a diferenciação celular. Pela análise da cultura verificou-se que quando o meio era suplementado com hormonas, havia

um aumento da proliferação e diferenciação celular, das espermatogónias aos espermatócitos em paquíteno, em relação ao grupo controlo, durante a primeira semana de cultura. Quando se comparou as diferentes concentrações de hormonas durante essa semana, verificou-se que apenas havia diferenças na diferenciação dos espermatócitos em paquíteno, sendo a concentração de 50 U/L de FSH e 1 μ mol/L de testosterona mais eficaz que a de 500 U/L de FSH e 10 μ mol/L de testosterona. Por este motivo sugere-se que futuras análises da proliferação e diferenciação celular das células germinais sejam efectuadas em cultura de túbulos seminíferos suplementadas com uma concentração de 50 U/L de FSH e 1 μ mol/L de testosterona e por um período de sete dias.

Concluindo, com este sistema de cultura que permitiu manter os túbulos seminíferos em cultura durante um mês, sem ocorrer perda significativa de células somáticas ou de Sertoli, com manutenção da integridade dos túbulos seminíferos e do compartimento intersticial, e com a presença até ao final da cultura de todos os tipos de células germinais, algumas das quais ainda com capacidade proliferativa e de diferenciação foi possível quantificar pela primeira vez a espermatogénese humana, em termos de proliferação e diferenciação, utilizando uma metodologia muito reprodutível e que detecta a proliferação celular com resultados semelhantes aos *in vivo*.

6. Referências Bibliográficas

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2007a) Molecular Biology of the Cell. Chapter 5. DNA Replication, Repair and Recombination. 5th Edition, *Garland Science, Taylor & Francis Group*. pp. 284-286.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2007b) Molecular Biology of the Cell. Chapter 17. The Cell Cycle. *Garland Science, Taylor & Francis Group*. pp. 1053-1071.
- Almog, T. and Naor, Z. (2008) Mitogen activated protein kinases (MAPKs) as regulators of spermatogenesis and spermatozoa functions. *Mol. Cell. Endocrinol.* **282**: 39-44.
- Chatuverdi, P.K. and Johnson, L. (1993) Architectural arrangement of stages of the spermatogenic cycle within human seminiferous tubules is related to efficiency of spermatogenesis. *Cell Tissue Res.* **273**: 65-70.
- Chowdury, A.K. (1971) Thymidine-³H labelling of spermatogonia in rat and human seminiferous tubules mounted in toto. *Cell Tiss. Res.* **273**: 65-70.
- Clermont, Y. (1963) The Cycle of the Seminiferous Epithelium in Man. *Am. J. Anat.* **112**: 35-51.
- Clermont, Y. (1966) Spermatogenesis in Man: A Study of the Spermatogonial Population. *Fertil Steril* **17**: 705-721.
- Cremades, N., Sousa, M., Bernabeu, R. and Barros, A. (2001) Developmental potential of elongating and elongated spermatids obtained after in-vitro maturation of isolated round spermatids. *Hum. Reprod.* **16**: 1938-1944.
- De Rooij, D.G. and Russel, L.D. (2000) All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J. Androl.* **21**: 776-798.

- Eddy, E., O'Brien, D. (1994) The spermatozoon. In: Knobil E and Neill J. eds. *Physiology of Reproduction*. New York, Raven Press: 29-77.
- Ehmcke, J. and Schlatt, S. (2006) A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates. *Soc. Reprod. Fétil. Suppl.* **132**: 673-680.
- Ehmcke, J., Hübner, K., Schöler, H.R. and Schlatt, S. (2006 a) Spermatogonia: origin, physiology and prospects for conservation and manipulation of the male germ line. *Reprod. Fertil. Dev.* **18**: 7-12.
- Ehmcke, J., Luetjens, CM., Schlatt, S. (2005 a) Clonal organization of proliferating spermatogonial stem cells in adult males of two species of non-human primates, *Macaca mulatta* and *Callithrix jacchus*. *Hum. Reprod.* **72**: 293-300.
- Ehmcke, J., Simorangkir, D.R. and Schlatt, S. (2005 b) Identification of the starting point for spermatogenesis and characterization of the testicular stem cell in adult male rhesus monkeys. *Hum. Reprod.* **20**: 1185-1193.
- Ehmcke, J., Wistuba, J. and Schlatt, S. (2006 b) Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Hum. Reprod. Update* **12**: 275-282.
- Erkkila, K., Henriksen, K., Hirvonen, V., Rannikko, S., Salo, J., Parvinen, M., Dunkel, L. (1997) Testosterone regulates apoptosis in adult human seminiferous tubules in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* **82**: 2314-21.
- Fawcett, D.W. (1994) Bloom and Fawcett: A Textbook of Histology. 12th Edition, *Chapman & Hall*, New York, London, pp. 768-815.
- Foresta, C., Bettella, A., Ferlin, A., Garolla, A. and Rossata, M. (1998) Evidence for a stimulatory role of follicle-stimulating hormone on the spermatogonial population in adult males. *Fertil. Steril.* **69**: 636-642.
- Ghatnekar, R., Lima-de-Faria, A., Rubin, S. and Menander, K. (1974) Development of human male meiosis in vitro. *Hereditas* **78**: 265-272.

- Gilbert, S.F. (2003) *Developmental Biology*. Chapter 19. The saga of the germ line. 7th Edition, *Sinauer Associates, Inc.*, Sunderland, MA, pp.371-389.
- Heller, C. G. and Clermont, Y. (1964) Kinetics of the Germinal Epithelium in Man. *Recent Prag. Horm. Res.* **20**: 545-575.
- Heller, C.G. and Clermont, Y. (1963) Spermatogenesis in Man: An Estimate of Its Duration. *Science* **140**: 184-185.
- Hess, R.A. (1998) Effects of environmental toxicants on the efferent ducts, epididymis and fertility. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **53**:247-59.
- Holdcraft, R.W. and Braun, R.E. (2004) Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int J Androl.* **27**: 335-342.
- Holstein, A.F. and Roosen-Runge, E.C. (1981) *Atlas of Human Spermatogenesis*. *Grosse Verlag*, Berlin.
- Holstein, A.F., Schulze, W. and Davidoff, M. (2003) Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **1**: 107-123.
- Hoogendijk, C. and Kruger, T. (2007) Anatomy and molecular morphology of the spermatozoon. In Oehninger, S., Kruger, T. eds *Male Infertility Diagnosis and Treatment*. United Kingdom: Informa UK ltd. pp. 3-12.
- Hue, D., Staub, C., Perrard-Sapori, M.H., Weiss, M., Nicolle, J.C., Vigier, M. and Durand, P. (1998) Meiotic differentiation of germinal cells in three-week cultures of whole cell population from rat seminiferous tubules. *Biol. Reprod.* **59**: 379-387.
- Huleihel, M., Abulhija, M. and Lunenfeld, E. (2007) In vitro culture of testicular germ cells: Regulatory factors and limitations. *Growth Factors* **25**: 236-252.

- Izadyar, F., den Ouden, K., Creemers, L.B., Posthuma, G., Parvinen, M. and de Rooij, D.G. (2003) Proliferation and Differentiation of Bovine Type A Spermatogonia During Long-Term Culture. *Biol. Reprod.* **68**: 272-281.
- Johnson, L., Chaturverdi, P.K. and Williams, J.D. (1992) Missing generations of spermatocytes and spermatids in seminiferous epithelium contribute to low efficiency of spermatogenesis in humans. *Biol. Reprod.* **47**: 1091-1098.
- Johnson, L., Petty, C.S. and Neaves, W.B. (1983) Further Quantification of Human Spermatogenesis: Germ Cell Loss During Postprophase of Meiosis and its Relationship to Daily Sperm Production. *Biol. Reprod.* **29**: 207-215.
- Junqueira, L.C. e Carneiro, J. (2004) *Histologia Básica – Texto e Atlas*. Capítulo 21. Aparelho Reprodutor Masculino. 10ª Edição, Editora Guanabara Koogan, S.A., pp. 415-431.
- Kierszenbaum, A.L. (1994) Mammalian spermatogenesis in vivo and in vitro: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. *Endocr. Rev.* **15**: 116-134.
- Lin, P. and Allison, D.C. (1993) Measurement of DNA Content and of a Tritiated Thymidine and Bromodeoxyuridine Incorporation by the Same Cells. *J. Histochem. Cytochem.* **41**: 1435-1439.
- Magavi, S.S. and Macklis, J.D. (2008) Identification of Newborn Cells by BrdU Labeling and Immunocytochemistry in Vivo. *Methods Mol. Biol.* **438**: 335-343.
- Marshall, G.R., Ramaswamy, S. and Plant T.M. (2005) Gonadotropin-Independent Proliferation of the Pale Type A Spermatogonia in the Adult Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*). *Biol. Reprod.* **73**: 222-229.
- Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Chan, E.K., Wessel, G.M. and Schatten, G. (2000a) The Golgi apparatus segregates from the lysosomal/acrosomal vesicle during rhesus spermiogenesis: structural alterations. *Dev. Biol.* **219**: 334-49.

- Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Sutovsky, P., Chan, E.K. and Schatten, G. (2000b) Vesicular traffic and golgi apparatus dynamics during mammalian spermatogenesis: implications for acrosome architecture. *Biol. Reprod.* **63**: 89-98.
- Muskhelishvili, L., Latendresse, J.R., Kodell, R.L. and Henderson, E.B. (2003) Evaluation of Cell Proliferation in Rat Tissues with BrdU, PCNA, Ki-67 (MIB-5) Immunohistochemistry and In Situ Hybridization for Histone mRNA. *J. Histochem. Cytochem.* **51**: 1681-1688.
- Paniagua, R., Rodríguez, M.C., Nistal, M., Fraile, B. and Amat, P. (1987) Changes in the lipid inclusion/Sertoli cell cytoplasm area ratio during the cycle of the human seminiferous epithelium. *J. Reprod. Fertil.* **80**: 335-341.
- Rosiepen, G., Arslan, M., Clemen, G., Nieschlag, E., Weinbauer, G.F. (1997) Estimation of the duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the non-human primate *Macaca mulatta* using the 5-bromodeoxyuridine technique. *Cell Tiss. Res.* **228**: 365-369.
- Rosiepen, G., Weinbauer, G.F., Schlatt, S., Behre, H.M., Nieschlag, E. (1994) Duration of the cycle of the seminiferous epithelium, estimated by the 5-bromodeoxyuridine technique, in laboratory and feral rats. *J. Reprod. Fertil.* **100**: 299-306.
- Roulet, V., Denis, H., Staub, C., Le Tortorec, A., Delaleu, B., Satie, A.P., Patard, J.J., Jégou, B. And Dejucq-Rainsford, N. (2006) Human testis in organotypic culture: application for basic or clinical research. *Hum. Reprod.* **6**: 1564-1575.
- Ruwanpura, S.M., McLachlan, R.I., Matthiesson, K.L. and Meachem S.J. (2008) Gonadotrophins regulate germ cell survival, not proliferation, in normal adult men. *Hum. Reprod.* **23**: 403-411.

- Sá, R., Sousa, M., Cremades, N., Alves, C., Silva, J., Barros, A. (2007) *In vitro* maturation of spermatozoa. In Oehninger, S., Kruger, T. eds Male Infertility Diagnosis and Treatment. United Kingdom: Informa UK Ltd. pp. 425-452.
- Sá, R., Neves, R., Fernandes, S., Alves, C., Carvalho, F., Silva, J., Cremades, N., Malheiro, I., Barros, A. and Sousa, M. (2008) Cytological and expression studies and quantitative analysis of the temporal and stage-specific effects of follicle-stimulating hormone and testosterone during cocultures of normal human seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.* **79**: 962-975.
- Schulze, C. (1974) On the Morphology of the Human Sertoli Cell. *Cell Tiss. Res.* **153**: 339-355.
- Sofikitis, N., Giotitsas, N., Tsounapi, P., Baltogiannis, D., Giannakis, D. and Pardalidis, N. (2008) Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **109**: 323-330.
- Sofikitis, N., Pappas, E., Kawatani, A., Baltogiannis, D., Loutradis, D., Kanakas, N., Giannakis, D., Dimitriadis, F., Tsoukanelis, K. and Georgiou, I. (2005) Efforts to create an artificial testis: culture systems of male germ cells under biochemical conditions resembling the seminiferous tubular biochemical environment. *Hum. Reprod. Update* **11**: 229-259.
- Sousa, M., Barros, A., Takahashi, K., Oliveira, C., Silva, J. and Tesarik, J. (1999) Clinical efficacy of spermatid conception: analysis using a new spermatid classification scheme. *Hum. Reprod.* **14**: 1279-1286.
- Sousa, M., Cremades, N., Alves, C., Silva, J. and Barros, A. (2002) Developmental potential of human spermatogenic cells co-cultured with Sertoli cells. *Hum. Reprod.* **17**: 161-172.
- Sousa, M., Cremades, N., Silva, J., Oliveira, C., Ferraz, L., Teixeira da Silva, J., Viana, P. and Barros, A. (2002) Predictive value of testicular histology in secretory

- azoospermic subgroups and clinical outcome after microinjection of fresh and frozen-thawed sperm and spermatids. *Hum. Reprod.* **17**: 1800-1810.
- Staub, C. Hue, D., Nicolle JC., Perrard-Sapori, MH., Segretain, D. and Durand, P. (2000) The Whole Meiotic Process Can Occur in Vitro in Untransformed Rat Spermatogenic Cells. *Exp. Cell Res.* **260**: 85-95.
 - Steger, K., Aleithe, I., Behre, H. and Bergmann, M. (1998) The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an imunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. *Mol. Hum. Reprod.* **4**: 227-233.
 - Steinberger, A. (1975) In Vitro Techniques for the Study of Spermatogenesis. *Methods Enzymol.* **39**: 283-296.
 - Steinberger, A., Steinberger, E. and Perloff, W.H. (1964) Mammalian testes in organ culture. *Exp. Cell Res.* **36**: 19-27.
 - Steinberger, E. (1967) Maintenance of adult human testicular tissue in culture. *Anat. Rec.* **157**: 327-328.
 - Tanaka, A., Nagayoshi, M., Awata, S., Mawatari, Y., Tanaka, I. And Kusunoki, H. (2003) Completion of meiosis in human primary spermatocytes through in vitro culture with Vero cells. *Fertil. Steril.* **79**: 795-801.
 - Tesarik, J., Guido, M., Mendoza, C. and Greco, E. (1998) Human spermatogenesis in vitro: Respective Effects of Follicle-Stimulating Hormone and Testosterone on Meiosis, Spermiogenesis, and Sertoli Cell Apoptosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**: 4467-4473.
 - Thoolen, B. (1990) BrdU labeling of S-phase cells in testes and small intestine of mice, using microwave irradiation for immunogold-silver staining: an immunocytochemical study. *J Histochem Cytochem.* **38**:267-73.

- Weinbauer, G.F., Schubert, J., Yeung, C.H., Rosiepen, G. and Nieschlag, E. (1998) Gonadotrophin-releasing hormone antagonist arrests premeiotic germ cell proliferation but does not inhibit meiosis in the male monkey: a quantitative analysis using 5-bromodeoxyuridine and dual parameter flow cytometry. *J. Endocrinol.* **156**: 23-34.
- Weiss, M., Vigier, M., Hue, D., Perrard-Sapori, MH., Marret, C., Avallet, O., Durand, P. (1997) Pre- and postmeiotic expression of male germ cell-specific genes throughout 2-week cocultures of rat germinal and Sertoli cells. *Biol. Reprod.* **57**: 68-76.

7. Anexos

Anexo I

Protocolo de Cultura de Túbulos Seminíferos

Protocolo de Cultura de Túbulos Semíniferos

Preparação das soluções

5-BROMO-2'-DEOXYURIDINE

- Sigma, B5002
- Sólido 1 g
- MW 307.1
- Trabalhar na Câmara de Fluxo, usando bata, touca, máscara e luvas. Ter muito cuidado para que o reagente não seja exposto à luz.

- **Preparação da solução de BrdU**

- 307.10 g ----- 1000 mL ----- 1M
- 307100 mg ----- 1000 mL ----- 1000 mM
- 3071 mg ----- 1000 mL ----- 10 mM
- 30.71 mg ----- 10 mL ----- 10 mM

- **Preparação de 20 mL de solução de BrdU a 10 mM em SPM**

- 30.71 mg = 0,03071 g

- 0.03071 g ----- 10 mL

$$x \text{ ----- } 20 \text{ mL}$$

$X = 0.0620 \text{ g}$

- 0.0620 g de BrdU em 20 mL de SPM

rFSH

- Gonal-f, folitropina 2, orgalutran
- 900 UI/1.5mL
- Seringa pronta a usar.
- Trabalhar na Câmara de Fluxo do laboratório de Andrologia, usando bata, touca, máscara e luvas.

Preparação de rFSH a 50 UI/L

$$\begin{array}{l} \circ \quad 900 \text{ UI} \text{ ----- } 1,5 \text{ mL} \\ \quad \quad \quad x \quad \text{ ----- } 1 \text{ mL} \end{array}$$

$$X = 600 \text{ UI}$$

$$\begin{array}{l} \circ \quad 50 \text{ UI} \text{ ----- } 1000 \text{ mL} \\ \quad \quad \quad x \quad \text{ ----- } 1 \text{ mL} \end{array}$$

$$X = 0.050 \text{ UI}$$

$$\begin{array}{l} \circ \quad 600 \text{ UI} \text{ ----- } 1 \text{ mL} \\ \quad \quad \quad 0.050 \text{ UI} \text{ ----- } x \end{array}$$

$$X = 0.0833 \mu\text{L} \approx 0,10 \mu\text{L}$$

- A 10 mL da solução Mãe de SPM-BrdU adicionar 1 μL de rFSH.
 - Volume final 10 mL e concentração 50 UI/L.
- Distribui-se 1 mL por cada um dos 3 tubos, resultando em 1 mL/tubo (50 UI/L).
- **Nota: a testosterona deve ser adicionada antes de se distribuir pelos 3 tubos.**

Preparação de rFSH a 500 UI/L

$$\begin{array}{l} \circ \quad 900 \text{ UI} \text{ ----- } 1,5 \text{ mL} \\ \quad \quad \quad x \quad \text{----- } 1 \text{ mL} \end{array}$$

$$X = 600 \text{ UI}$$

$$\begin{array}{l} \circ \quad 500 \text{ UI} \text{ ----- } 1000 \text{ mL} \\ \quad \quad \quad x \quad \text{----- } 1 \text{ mL} \end{array}$$

$$X = 0.50 \text{ UI}$$

$$\begin{array}{l} \circ \quad 600 \text{ UI} \text{ ----- } 1 \text{ mL} \\ \quad \quad \quad 0.50 \text{ UI} \text{ ----- } x \end{array}$$

$$X = 0.833 \mu\text{L} \approx 1 \mu\text{L}$$

- A 3 mL da solução Mãe de SPM-BrdU adicionar 3 μL de rFSH.
 - Volume final 3 mL e concentração 500 UI/L.
- Distribui-se 1 mL por cada um dos 3 tubos, resultando em 1 mL/tubo (500 UI/L).
- **Nota: a testosterona deve ser adicionada antes de se distribuir pelos 3 tubos.**

Testosterona hidrosolúvel

- Sigma, T-5035
- Sólida 100 mg (0.1g) - 1g sólido corresponde a 103 mg de testosterona
- Cell culture tested.
- MW da testosterona: 288.4
- Trabalhar na Câmara de Fluxo do laboratório de Andrologia, usando bata, touca, máscara e luvas. Ter muito cuidado no manuseamento deste produto pois ele é cancerígeno.

Preparação da testosterona

- 1 g de pó - 103 mg de testosterona
- 1 g de pó - 0.103 g de testosterona
- 0.1 g de pó - 0.0103 g de testosterona
- Peso molecular para a testosterona pura = **288.4**

- **Solução Stock A**

- 288.4 g ----- 1000 mL ----- 1000 mM
- 0.2884 g ----- 1 mL ----- 1000 mM
- 0.0029 ----- 1 mL ----- 10 mM

- 0.1 g de pó ----- 0.0103 g de testosterona
 x pó ----- 0.0029 g de testosterona

x = 0.0282 g de pó

- **Solução Stock A:**

- A 0.0282 g de pó juntar 1 mL de SPM.BrdU.
- A concentração final de testosterona é 10 mM/L.

- **Solução Stock B:**

- 1 mL SPM.BrdU ----- 10.000 μM (=10 mM)

x ----- 1000 μM

x = 100 μL

- **Solução stock B:**

- 100 μL da solução A + 900 μL de SPM.BrdU
- Volume final de 1 mL e uma concentração de testosterona de 1000 μM/L.

- **Preparação de testosterona a 1 μM /L**

- 1000 μL da solução stock B ----- 1000 $\mu\text{M/L}$ de testosterona

$$x \text{ ----- } 1 \mu\text{M}$$

$X = 1 \mu\text{L}$

- Aos 10 mL de SPM-BrdU (50 UI/L) adicionar 10 μL da solução stock B de testosterona.
- Distribui-se 1 mL por cada um dos 3 tubos, resultando em 1 mL/tubo (50 UI/L de rFSH e 1 $\mu\text{M/L}$ de testosterona).

- **Preparação de testosterona a 10 μM /L**

- 1000 μL da solução stock B ----- 1000 $\mu\text{M/L}$ de testosterona

$$x \text{ ----- } 10 \mu\text{M}$$

$X = 10 \mu\text{L}$

- Aos 3 mL de SPM-BrdU (500 UI/L) adicionar 30 μL da solução stock B de testosterona.
- Distribui-se 1 mL por cada um dos 3 tubos, resultando em 1 mL/tubo (500 UI/L de rFSH e 10 $\mu\text{M/L}$ de testosterona).

Procedimento:

- Pretende-se uma biópsia com espermatogénese completa e com boa concentração de cada tipo celular.
- Após se ter verificado ao microscópio a presença destas células noutros fragmentos da mesma biópsia, coloca-se um fragmento intacto num tubo com SPM e coloca-se na incubadora 32°C.

- Preparar as soluções conforme indicado anteriormente:
 1. Preparar a solução SPM-BrdU num tubo revestido com papel de prata.
 - a. Pesar 0,0620 g de BrdU e adicionar 20 mL de SPM.
 - b. Agitar até o pó ficar completamente dissolvido.
 2. Revestir os 10 tubos com papel de prata para que o seu interior não seja exposto à luz.
 3. Os tubos devem estar identificados da seguinte forma:
 - Experiência controle:
 - Tubo 1 – controle T0
 - Tubo 2 – controle d7
 - Tubo 3 – controle d14
 - Tubo 4 – controle d28

 - Experiência com 50 UI/L de rFSH e 1µM/L de testosterona
 - Tubo 1 – 50/1 - d7
 - Tubo 2 – 50/1- d14
 - Tubo 3 – 50/1 - d28

 - Experiência com 500 UI/L de rFSH e 10µM/L de testosterona
 - Tubo 1 – 500/10 - d7
 - Tubo 2 – 500/10 - d14
 - Tubo 3 – 500/10 - d28

4. Na experiência controle colocar 1 mL da solução SPM-BrdU em cada um dos 4 tubos.
5. Nas experiências com suplemento hormonal:
 - a. Preparar as soluções conforme descrito anteriormente, num tubo à parte, também revestido com papel de prata e devidamente identificado.
 - i. 50 UI/L de rFSH e 1 μ M/L de testosterona**
 1. A 10 mL de SPM-BrdU adicionar 1 μ L de rFSH e 10 μ L da solução stock B de testosterona.
 2. Colocar 1 mL em cada um dos 3 tubos.
 - ii. 500 UI/L de rFSH e 10 μ M/L de testosterona**
 1. A 3 mL de SPM-BrdU adicionar 3 μ L de rFSH e 30 μ L da solução stock B de testosterona.
 2. Colocar 1 mL em cada um dos 3 tubos.
6. Colocar os 10 tubos na incubadora a 33°C, durante 30 minutos, antes de lhes ser adicionados os fragmentos.
 - a. Se o meio for SPM: os tubos devem ser colocados na incubadora completamente fechados.
 - b. Se o meio for IVF: os tubos devem ser colocados na incubadora apenas meio fechados.
7. Á lupa cortar o fragmento resultante da biópsia a meio, obtendo duas metades. Cortar essas duas metades a meio, e assim sucessivamente, até se obter 20 pequenos fragmentos.
8. Colocar 2 fragmentos em cada tubo e colocar na incubadora a 33°C.
9. Mudar o meio no dia seguinte para retirar o BrdU.
10. Lavar com SPM.
11. Os meios devem depois ser mudados de 2 em 2 dias até ao final da experiência.

Protocolo de mudança de Meios

Preparação dos meios de cultura

rFSH

- Gonal-f, folitropina 2, orgalutran
- 900 UI/1.5mL
- Seringa pronta a usar.
- Trabalhar na Câmara de Fluxo do laboratório de Andrologia, usando bata, touca, máscara e luvas.

Preparação de rFSH a 50 UI/L

$$\begin{array}{r} \circ \quad 900 \text{ UI} \text{ ----- } 1,5 \text{ mL} \\ \quad \quad \quad x \quad \text{-----} 1 \text{ mL} \end{array} \quad \boxed{X = 600 \text{ UI}}$$

$$\begin{array}{r} \circ \quad 50 \text{ UI} \text{ ----- } 1000 \text{ mL} \\ \quad \quad \quad x \quad \text{-----} 1 \text{ mL} \end{array} \quad \boxed{X = 0.050 \text{ UI}}$$

$$\begin{array}{r} \circ \quad 600 \text{ UI} \text{ ----- } 1 \text{ mL} \\ \quad \quad \quad 0.050 \text{ UI} \text{ ----- } x \end{array} \quad \boxed{X = 0.0833 \mu\text{L} \approx 0,10 \mu\text{L}}$$

- A 10 mL de SPM adicionar 1 μL de rFSH.
 - Volume final 10 mL e concentração 50 UI/L.
- Distribui-se 1 mL por cada um dos 3 tubos, resultando em 1 mL/tubo (50 UI/L).
- **Nota: a testosterona deve ser adicionada antes de se distribuir pelos 3 tubos.**

Preparação de rFSH a 500 UI/L

$$\begin{array}{l} \circ \quad 900 \text{ UI} \text{ ----- } 1,5 \text{ mL} \\ \quad \quad x \quad \text{----- } 1 \text{ mL} \end{array}$$

$$X = 600 \text{ UI}$$

$$\begin{array}{l} \circ \quad 500 \text{ UI} \text{ ----- } 1000 \text{ mL} \\ \quad \quad x \quad \text{----- } 1 \text{ mL} \end{array}$$

$$X = 0.50 \text{ UI}$$

$$\begin{array}{l} \circ \quad 600 \text{ UI} \text{ ----- } 1 \text{ mL} \\ \quad \quad 0.50 \text{ UI} \text{ ----- } x \end{array}$$

$$X = 0.833 \mu\text{L} \approx 1 \mu\text{L}$$

- A 3 mL de SPM adicionar 3 μL de rFSH.
 - Volume final 3 mL e concentração 500 UI/L.
- Distribui-se 1 mL por cada um dos 3 tubos, resultando em 1 mL/tubo (500 UI/L).
- **Nota: a testosterona deve ser adicionada antes de se distribuir pelos 3 tubos.**

Testosterona hidrosolúvel

- Sigma, T-5035
- Sólida 100 mg (0.1g) - 1g sólido corresponde a 103 mg de testosterona
- Cell culture tested.
- MW da testosterona: 288.4
- Trabalhar na Câmara de Fluxo do laboratório de Andrologia, usando bata, touca, máscara e luvas. Ter muito cuidado no manuseamento deste produto pois ele é cancerígeno.

Preparação da testosterona

- 1 g de pó - 103 mg de testosterona
- 1 g de pó - 0.103 g de testosterona
- 0.1 g de pó - 0.0103 g de testosterona
- Peso molecular para a testosterona pura = **288.4**

- **Solução Stock A**

- 288.4 g ----- 1000 mL ----- 1000 mM
- 0.2884 g ----- 1 mL ----- 1000 mM
- 0.0029 ----- 1 mL ----- 10 mM
- 0.1 g de pó ----- 0.0103 g de testosterona
x pó ----- 0.0029 g de testosterona

$x = 0.0282 \text{ g de pó}$

- **Preparação da solução Stock A:**

- A 0.0282 g de pó juntar 1 mL de SPM.
- A concentração final de testosterona é 10 mM/L.
- Aliquotar em 5 eppendorfs 200 μL desta solução e colocar no frigorífico de investigação a -20°C .

- **Solução Stock B:**

- 1 mL SPM ----- 10.000 μM (=10 mM)

$$x \text{ ----- } 1000 \mu\text{M}$$

$x = 100 \mu\text{L}$

- **Preparação da solução stock B:**

- 100 μL da solução A + 900 μL de SPM.
- Volume final de 1 mL e uma concentração de testosterona de 1000 $\mu\text{M/L}$.

- **Preparação de testosterona a 1 μM /L**

- 1000 μL da solução stock B ----- 1000 $\mu\text{M/L}$ de testosterona

$$x \text{ ----- } 1 \mu\text{M}$$

$X = 1 \mu\text{L}$

- Aos 10 mL de SPM (50 UI/L) adicionar 10 μ L da solução stock B de testosterona.
- Distribui-se 1 mL por cada um dos 3 tubos, resultando em 1 mL/tubo (50 UI/L de rFSH e 1 μ M/L de testosterona).

• **Preparação de testosterona a 10 μ M /L**

- 1000 μ L da solução stock B ----- 1000 μ M/L de testosterona

$$x \text{ ----- } 10 \mu\text{M}$$

$X = 10 \mu\text{L}$

- Aos 3 mL de SPM (500 UI/L) adicionar 30 μ L da solução stock B de testosterona.
- Distribui-se 1 mL por cada um dos 3 tubos, resultando em 1 mL/tubo (500 UI/L de rFSH e 10 μ M/L de testosterona).

Procedimento:

- Preparar as soluções na câmara de fluxo do laboratório, conforme indicado anteriormente.
- Após preparadas as soluções retirar os tubos com os fragmentos da incubadora e levá-los para a câmara de fluxo e proceder à mudança de meio.
 1. Com uma pipeta de Pasteur de 3 mL retirar o meio de cada um dos tubos, até ficarem só os fragmentos.
 2. Na experiência controle colocar 1 mL de SPM em cada um dos 4 tubos.
 3. Nas experiências com as Hormonas:
 - a. Preparar as soluções conforme descrito anteriormente, num tubo à parte devidamente identificado.
 - i. 50 UI/L de rFSH e 1 μ M/L de testosterona**
 1. A 10 mL de SPM adicionar 1 μ L de rFSH e 10 μ L da solução stock B de testosterona.
 2. Colocar 1 mL em cada um dos 3 tubos.
 - ii. 500 UI/L de rFSH e 10 μ M/L de testosterona**
 1. A 3 mL de SPM adicionar 3 μ L de rFSH e 30 μ L da solução stock B de testosterona.
 2. Colocar 1 mL em cada um dos 3 tubos.
 4. Colocar os 10 tubos completamente fechados na incubadora a 33°C.
 5. Os meios devem ser mudados de 2 em 2 dias até ao final da experiência.

Anexo II

Processamento dos fragmentos de túbulos seminíferos para Microscopia Óptica

Processamento de biópsia testicular para Microscopia Óptica

1. Fixação

- Fixar em Bouin overnight a 4°C.

2. Lavagem

- Lavar várias vezes em álcool a 70% durante 15 minutos para retirar o excesso de Bouin.

3. Desidratação

- Álcool a 70° durante 15 minutos
- Álcool a 90% durante 30 minutos
- Álcool a 100° durante 30 minutos
- Álcool a 100° durante 30 minutos
- Xilol durante 15 minutos
- Xilol durante 15 minutos

4. Impregnação

- Parafina I – 1 hora a 60°C
- Parafina II – 2 horas a 60°C

5. Inclusão em parafina

6. Corte

- Realizar cortes sequenciais de 3µm no micrótomo.
- Colocar o corte numa tina de água destilada à temperatura ambiente e com uma lâmina centrar o corte numa lâmina tratada com Vectabond.
- Imergir a lâmina com o corte num banho quente (50°C), para que este fique completamente esticado e aderido à lâmina).
- Deixar secar ao ar.
- Colocar na estufa a 56°C durante 24 horas.

Anexo III

Protocolos para a realização da Técnica de Imunohistoquímica

Preparação das lâminas com VECTABOND

Preparação do VECTABOND:

- Adicionar 1mL de *Vectabond Reagent Solution* a 50mL de acetona. Esta solução está apta para preparar 500 lâminas e possui um tempo de $\frac{1}{2}$ vida de 30 dias.
- Deve ser preparada num copo vertical com ranhuras, de 50 mL e com tampa.

Protocolo:

1. Imergir as lâminas numa tina com acetona durante 5 minutos.
2. Escorrer as lâminas e colocá-las imediatamente *em Vectabond Reagent Solution*, durante 5 minutos.
3. Escorrer as lâminas.
4. Eliminar o excesso de reagente imergindo, gentilmente, sem criar bolhas as lâminas numa tina com água destilada durante 30 segundos.
5. Secar as lâminas na estufa a 37°C durante 24 horas.
6. Guardar as lâminas numa caixa.

Preparação das soluções para Imunohistoquímica

Ácido Clorídrico a 1M

- **Composição:**
 - 8.30mL de HCL a 12M
 - *Hydrochloric acid fuming 37% - 137007 MERCK*
 - MW 36.45
 - Armário de reagentes à temperatura ambiente.
 - 91.67mL de água destilada.

Solução de Tripsina

- **tripsina 0.01% em PBS.**
- **Composição:**
 - *Trypsin from porcine pancreas*, Sigma-Aldrich, T7409, lyophilized powder, Type II-S.
 - Sólida (10g).
- **Preparação de 100 mL de solução:**
 - Pesar 0.01 g de Tripsina.
 - Adicionar 100 mL de PBS.

PBS

- Phosphate buffered saline, Alfredo Carneiro.
- 9.55g/L
- pH 7.5
- **Preparação de 500 mL de solução:**
 - Pesar 4.775 g de PBS
 - Adicionar água destilada até perfazer os 500 mL.
 - Medir e acertar o pH.

Anticorpo primário

- *Monoclonal Anti-BrdU antibody produced in mouse, Clone BU 33 ascites fluid, immunohistology grade, Sigma, B2531.*
- Quantidade 200µL.
- **Preparação:** diluir o anticorpo 1:200 em PBS contendo 1.5% de blocking serum.

Protocolo de Imunohistoquímica em cortes de parafina

Realizar em técnica em câmara húmida e escura.

1. Desparafinizar e re-hidratar os cortes.

- a. 3x Xilol – 3 minutos cada
- b. 2x Etanol absoluto – 3 minutos cada
- c. Etanol a 95° - 3 minutos
- d. Etanol a 70° - 3 minutos
- e. Etanol a 50° - 3 minutos
- f. Água destilada – 3 minutos

2. **Inibição das peroxidases endógenas:** Colocar numa solução 3% H₂O₂ em água destilada [100µl 30% H₂O₂ em 900µl H₂O], durante 5 minutos, numa tina humidificada e escura (150µl/lâmina);

3. Lavar em água destilada durante 5 minutos.

4. **Desnaturação do DNA:** Incubar com Ácido Clorídrico 1 M durante 10 minutos à temperatura ambiente.

5. Lavar em água destilada durante 5 minutos.

6. **Pré-tratamento enzimático:** Incubar com solução de Tripsina (tripsina 0.01% em PBS) durante 5 minutos à temperatura ambiente.

7. Lavar em água destilada durante 5 minutos.

8. Lavar em tampão PBS durante 5 minutos.

9. Escorrer e limpar as lâminas à volta da secção;

10. Incubar em Blocking Solution [25µl Blocking Serum + 1 ml PBS], durante 10 minutos, numa tina humidificada e escura (150µl/lâmina);

11. Escorrer o excesso de soro e limpar as lâminas à volta da secção;
12. Incubar com Avidin D solution (usar directamente) durante 15 minutos;
13. Lavar em tampão PBS, durante breves segundos;
14. Incubar com Biotin solution (usar directamente) durante 15 minutos;
15. Lavar em tampão PBS, durante breves segundos;
16. Escorrer o excesso de tampão e limpar as lâminas à volta da secção;
17. Incubar com anticorpo primário diluído em tampão contendo 1,5% Blocking Serum (150µl/lâmina), 1 hora, numa tina humidificada e escura;

Anticorpo	Diluição	Controlo
Monoclonal Anti-BrdU (Sigma)	1:200	Sem anticorpo 1°
	1 µl anticorpo em 199 µl tampão	
Tampão	1 ml PBS + 15µl Blocking serum	

18. Lavar em tampão PBS durante 5 minutos;
19. Incubar com anticorpo secundário universal biotinilado (2 gotas de Blocking Serum + 1 gotas de anticorpo 2° + 1 ml PBS), durante 10 minutos, numa tina humidificada e escura (150µl/lâmina);
20. Lavar em tampão PBS durante 5 minutos;
21. Incubar com complexo Streptavidina/Peroxidase (25µl Complex Stock Solution + 1 ml PBS), durante 5 minutos, numa tina humidificada e escura (150µl/lâmina);
22. Lavar em tampão PBS durante 5 minutos;
23. Incubar com DAB, numa tina humidificada e escura até se observar a cor desejada (150µl/lâmina):

- A 2.5 ml de água destilada adicionar 1 gota de Buffer Stock Solution e agitar bem
 - Adicionar 2 gotas de DAB Stock Solution e agitar bem
 - Adicionar 1 gota de Hydrogen Peroxidase Solution e agitar bem
 - Tempo de incubação:
- 24.** Lavar com água destilada corrente durante 5 minutos;
- 25.** Cobrir a secção de parafina com VECTOR Hematoxylin QS counterstain diluída 1:3 em água destilada e incubar muito rapidamente (1 segundo), numa tina humidificada e escura (1gota);
- 26.** Lavar com água destilada corrente até a água sair sem cor;
- 27.** Desidratação e diafanização:
- a. Água destilada – 2 minutos
 - b. Etanol a 70° - 2 minutos
 - c. 2 x Etanol a 95° - 2 minutos cada
 - d. 2 x Etanol a 100° - 2 minutos cada
 - e. Etanol a 100° + Xilol (1:1) – 3 minutos
 - f. 2 x Xilol – 2 minutos cada
- 28.** Escorrer e limpar as lâminas à volta da secção e colocar uma gota de Entellan sobre a amostra;
- 29.** Colocar gentilmente a lamela de forma a dispensar homogeneamente o meio de montagem;
- 30.** Deixar secar antes de observar ao microscópio.

