Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2007

Ana Luísa de Oliveira Garcia Ricardo

Expressão da Caspase-3 Activada no Epitélio Germinal de Pacientes com Azoospermia Obstrutiva

Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2007

Ana Luísa de Oliveira Garcia Ricardo

Expressão da Caspase-3 Activada no Epitélio Germinal de Pacientes com Azoospermia Obstrutiva

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ensino de Geologia e Biologia, 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 Lourdes Pereira do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Professor Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro.

Professor Doutor Alberto Manuel Barros da Silva
Professor Catedrático do Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

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

agradecimentos

A concretização deste projecto só foi possível com o importante apoio e preciosa colaboração de várias pessoas e instituições que contribuíram para a sua exequibilidade, quer a nível emocional, quer no plano material e funcional.
Ao Professor Doutor Mário Sousa, a minha menção especial por ter apadrinhado, vivido intensamente as minhas inquietações e objectivos, pela esclarecida orientação e acompanhamento crítico, pela exigência constante de fazer sempre mais e melhor e acima de tudo pelo contágio caloroso que me foi incutindo para o desenvolvimento deste projecto.
À Professora Doutora Lourdes Pereira, por ter dado toda a abertura e todo o apoio na escolha deste tema.
Ao Dr. Serafim Gomes por ter sido o mentor de todo o meu projecto e colocado no meu caminho o orientador desta dissertação.
Ao Professor Doutor Alberto Barros por me ter cedido material proveniente do Centro de Genética da Reprodução Prof. Alberto Barros e por me ter acolhido no Serviço de Genética da FMUP, por forma a que eu pudesse fazer a parte laboratorial do projecto.
Este trabalho foi realizado com todo o apoio da Dra. Carolina Almeida, a qual me ensinou e sempre me apoiou ao longo de todo o percurso, estando sempre muito presente, em todos os momentos necessários. O meu mais sincero obrigada!!
Ao Professor Eduardo Rocha por todo o apoio e aconselhamento dado ao desenvolvimento da minha tese, essencialmente ao nível da análise estatística e estereológica, durante todo o trabalho.
À Elsa Oliveira e à Ângela Alves pela simpatia, disponibilidade, ajuda e por todo o apoio incondicional que ao longo do trabalho me foram dando pois sem elas teria sido muito difícil tornar real este projecto. Para sempre obrigada!
À Sra. D. Teresa Barandela pela simpatia, disponibilidade, ajuda e paciência que teve comigo nos meu momentos de desespero em relação ao “meus tecidos”.
A todos os meus colegas e amigos, que de uma forma ou de outra, me foram acompanhando e incentivando, ao longo deste ano, em particular à Clara e à Marta, as minhas “companheiras de guerra” do mestrado, que sempre me apoiaram nesta caminhada tendo daí nascido uma amizade.
À minha amiga, professora de Biologia do ensino secundário, uma das incentivadoras pela opção da minha formação académica, Dra. Maria Manuela Couto, pelo apoio que me foi dando tanto a nível do mestrado como ao longo da minha carreira e também ao meu antigo professor Dr. Avelino Ribeiro pela simpatia e disponibilidade ao fazer uma revisão geral da dissertação.
Saliento o agradecimento profundo aos meus pais, os meus alicerces, o imutável pano de fundo familiar, por todo o sentimento de protecção e apoio. A eles devo tudo o que sou e tudo o que tenho. Eles foram-me transmitindo dignos valores pelos quais hoje me rejo, e por isso os saúdo!
À minha querida irmã, Manela, pela paciência, cumplicidade e por todos os sentimentos que nos têm unido cada vez mais. Por todo o apoio que me foi dando, tanto a nível emocional, científico e até mesmo operacional. E acima de tudo pela confortante dose de confiança que sempre depositou em mim.
Finalizo com um agradecimento ao meu marido, Ricardo, pelo apoio, incentivo e acompanhamento constantes o que foi crucial para ter desenvolvido e concluído este projecto. Para sempre o meu obrigada!

palavras-chave

Apoptose; Biópsias Testiculares Humanas; Caspase-3 Activa; Espermatogénese; Estereologia; Imunohistoquímica

resumo

Sabe-se que na espermatogénese humana a apoptose é um mecanismo muito importante na regulação do equilíbrio entre as células de suporte (células de Sertoli) e as células germinativas ao longo do desenvolvimento, existindo também vários trabalhos que indicam um aumento das taxas de apoptose em situações de patologia testicular, como a privação hormonal, a rádio-quimioterapia, as lesões obstrutivas (infecções, ausência congénita de canais excretores) e as lesões primárias do epitélio germinal (azoospermia secretora). Destes estudos, porém, nenhum utilizou métodos matematicamente correctos, pelo que os valores são muitas vezes contraditórios. Para resolver essa situação avaliamos por métodos estereológicos a presença de caspase-3 activa em biópsias testiculares de pacientes com espermatogénese conservada (controlos) e com azoospermia obstrutiva (casos). Os resultados demonstram que não existe um aumento global das taxas de apoptose na azoospermia obstrutiva. Na análise por tipo celular, os dados revelaram que na azoospermia obstrutiva as células de Sertoli e as células germinais diplóides são mais atingidas. Especificamente, as células de Sertoli apresentaram taxas superiores de apoptose do que qualquer tipo de célula germinativa, seguidas das espermatogónias, dos espermatócitos primários e dos espermatídeos redondos. Em conclusão, comparamos pela primeira vez, de modo quantitativo rigoroso por métodos estereológicos, as taxas de apoptose no epitélio germinal humano masculino na situação de azoospermia obstrutiva. Em relação aos controlos, os pacientes com azoospermia obstrutiva apresentam um maior atingimento das células germinais diplóides, sobretudo à custa dos espermatócitos primários.

keywords

Apoptosis; Human Testicular Biopsies; Active Caspase-3; Spermatogenesis; Stereology; Immunohistochemistry

abstract

It is known that apoptosis in human spermatogenesis is a very important mechanism for the regulation of the balance between the support cells (Sertoli cells) and germ cells throughout development. It is quoted in numerous articles that there is a rise in the rates of apoptosis in the presence of testicular pathology, as observed in hormonal deprivation, radio-chemotherapy, obstructive lesions (infections, congenital absence of excretory channels) and primary injuries of the germinal cell layer (secretory azoospermia).
However, the reported studies have not used accurate mathematical methods, and so the results are many times contradictory. To solve this situation we used stereological methods to ascertain for the presence of active caspase-3 in testicular biopsies of patients with conserved spermatogenesis (controls) and obstructive azoospermia (cases). Data shows that overall apoptosis in obstructive azoospermia is not increased. Per cell type analysis results indicate that in obstructive azoospermia both Sertoli and diploid germ Cells are by fare more involved. Specifically, Sertoli cells show a higher degree of apoptosis than any other germ cell type, followed by spermatogonia, primary spermatocytes and round spermatids. In conclusion, we compared for the first time, with precise quantitative stereological methods the apoptosis rate in the human male germ cell layer with obstructive azoospermia. When compared to controls, cases with obstructive azoospermia show higher rates of diploid germ cell injury, essentially due to involvement of primary spermatocytes.

ÍNDICE

1.	**INTRODUÇÃO**	**1**
1.1.	SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO	1
1.1.1.	TESTÍCULO	1
1.1.1.1.	ANATOMIA DO TESTÍCULO	1
1.1.1.2.	ESTRUTURA DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS	3
1.1.1.3.	EPITÉLIO GERMINATIVO	4
1.1.2.	O PROCESSO DE ESPERMATOGÉNESE	7
1.1.2.1.	CONSIDERAÇÕES GERIAS	7
1.1.2.2.	ESPERMATOGÉNESE OU FASE PROLIFERATIVA	8
1.1.2.3.	FASE MEIÓTICA	9
1.1.2.4.	ESPERMATOGÉNESE OU FASE DE DIFERENCIAÇÃO	11
1.1.3.	CÉLULAS ESTAMINAIS E CELULAS PROGENITORAS DA LINHA GERMINATIVA	16
1.1.4.	ESPERMOGRAMA	17
1.1.5.	AZOOSPERMIA	17
1.1.5.1.	AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA	18
1.1.5.2.	AZOOSPERMIA SECRETORA	18
1.2.	VIAS DA APOPTOSE	19
1.2.1.	CONSIDERAÇÕES GERAIS	19
1.2.2.	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.	20
1.2.3.	CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS	22
1.2.4.	SINAIS DE MORTE QUE ACTIVAM AS VIAS DE SINALIZAÇÃO	22
1.2.5.	PRINCIPAL FAMÍLIA DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA APOPTOSE	23
1.2.6.	VIAS DE SIANIZAÇÃO INTRÍNSECA E VIA EXTRÍNSECA	28
1.2.7.	AS MITOCONDRIAS COMO REGULADORES CENTRAIS DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRÍNSECOS DA APOPTOSE	31
1.2.8.	SINAIS INDUTORES DA APOPTOSE	32
1.2.9.	VIA DO FasL-FasR	33
1.2.10.	VIA DO p53	34
1.2.11.	FAMÍLIA DO Bcl2	35
1.2.12.	REGULAÇÃO DA APOPTOSE POR IAPs	43

1.2.13. PRINCIPAIS MÉTODOS DE ESTUDO DA OCORRENCIA DA APOPTOSE 44
1.2.14. APOPTOSE/DOENÇAS 45
1.3. APOPTOSE NA ESPERMATÓGENESE HUMANA 48
52
2. OBJECTIVO 54
54
3. MATERIAL E MÉTODOS 54
3.1. POPULAÇÃO 54
3.2. RECOLHA E PROCESSAMENTO DAS BIÓPSIAS TESTICULARES 54
3.3. TRATAMENTO DAS LÂMINAS COM VECTABOND 55
3.4. CORTES HISTOLÓGICOS 55
3.5. COLORAÇÃO HEMALÚMEN-EOSINA 55
3.6. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA 56
3.7. ANÁLISE ESTEREOLÓGICA 57
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA 59

4. RESULTADOS 61
4.1. HOMOGENEIDADE DA AMOSTRA 61
4.2. ESTEREOLOGIA 62
4.3. ESTATÍSTICA 67
4.3.1. TÚBULO 68
4.3.1.1. GRUPO OBSTRUTIVO 69
4.3.1.2. GRUPO CONTROLO 72
4.3.2. TESTÍCULO 74
4.3.2.1. GRUPO OBSTRUTIVO 75
4.3.2.2. GRUPO CONTROLO 77

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO 80

6. ABORDAGEM PEDAGÓGICA 95

7. PERSPECTIVAS FUTURAS 99

8. BIBLIOGRAFIA 100

9. ANEXOS 119

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Anatomia do sistema reprodutor masculino. Desenho esquemático (Cortesia do Prof. Dr. Mário Sousa).	1
Figura 2	Corte transversal de um testículo. Desenho esquemático.	2
Figura 3	Disposição dos túbulos seminíferos no testículo humano e dos canais excretores. Desenho esquemático (Cortesia do Prof. Dr. Mário Sousa).	3
Figura 4	Secção do epitélio germinativo no túbulo seminífero. Desenho esquemático (Cortesia do Prof. Dr. Mário Sousa).	4
Figura 5	Secção do epitélio germinativo no túbulo seminífero. Fotografia ao microscópio óptico (X100), 1- Lâmina basal, 2- Espermatogónia, 3- Célula de Sertoli, 4- Espermatócito primário, 5- Espermatócito secundário, 6- Espermatídeo redondo.	5
Figura 6	Secção de um túbulo seminífero. Desenho esquemático versus fotografia (x10).	7
Figura 7	Espermatogónias (Cortesia do Prof. Dr. Mário Sousa).	8
Figura 8	Esquema da espermatogénese. Desenho esquemático.	10
Figura 9	Espermiogénese. Diferenciação dos espermatídeos redondos iniciais (Sa1) a tardios (Sa2). Desenho esquemático (Cortesia do Prof. Dr. Mário Sousa).	12
Figura 10	Espermiogénese. Diferenciação dos espermatídeos em alongamento, inicial (Sb) e tardio (Sc). Diferenciação dos espermatídeos alongados, inicial (Sd1) e tardio (Sd2). Desenho esquemático (Cortesia do Prof. Dr. Mário Sousa).	13
Figura 11	Espermatozóide. Desenho esquemático (Cortesia do Prof. Dr. Mário Sousa).	15
Figura 12	Mecanismo proposto para controlo do número de células produzido na espermatogénese e para a eliminação de células danificadas.	21
Figura 13	Comparação dos processos de apoptose e de necrose.	21
Figura 14	Apoptose no *Caenorhabditis elegans.*	23
Figura 15	Ácido aspártico (aspartato).	24
Figura 16	Representação da estrutura e activação das caspases.	26
Figura 17	Esquema do gene Fas.	33
Figura 18	Membros da família Bcl2.	36
Figura 19	Regulação da apoptose pela família Bcl2.	40

Figura 20 Modelo funcional da família Bcl2. 42

Figura 21 Imunohistoquímica para a caspase 3 activa no paciente com Agenesia Bilateral dos Canais Deferentes (CBAVD). Pormenor de uma espermatogónia marcada (1) e não marcada (2) (Objectiva 100X). 63

Figura 22 Imunohistoquímica para a caspase 3 activa no paciente submetido a orquidectomia por motivo de alteração de sexo. Pormenor de células descamadas intensamente marcadas (3) (Objectiva 100X). 63

Figura 23 Imunohistoquímica para a caspase 3 activa no paciente Azoospermia obstrutiva secundária por Vasectomia. Pormenor de uma célula de Sertoli marcada (4) e de uma célula de Sertoli não marcada (5) (Objectiva 100X). 64

Figura 24 Imunohistoquímica para a caspase 3 activa no paciente com Agenesia Bilateral dos Canais Deferentes (CBAVD). Pormenor de um espermatócito primário marcado (6) e de um espermatócito primário não marcado (7) (Objectiva 100X). 64

Figura 25 Imunohistoquímica para a caspase 3 activa no paciente Azoospermia obstrutiva secundária por Vasectomia. Pormenor de um espermatócito secundário marcado (8) e de um espermatócito secundário não marcado (9) (Objectiva 100X). 64

Figura 26 Imunohistoquímica para a caspase 3 activa no paciente com Agenesia Bilateral dos Canais Deferentes (CBAVD). Pormenor de um espermatídeo redondo marcado (10) e de um não marcado (11). Espermatócitos primário (ST1), espermatócitos secundário (ST2), espermatócito redondo (Sa) (Objectiva 100X). 65

Figura 27 Imunohistoquímica para a caspase 3 activa no paciente com Agenesia Bilateral dos Canais Deferentes (CBAVD). Grelha multi-sistema usada para a contagem (Objectiva 100X), colocada sobre a imagem do monitor. 66

Figura 28 Imunohistoquímica para a caspase 3 activa no paciente submetido a orquidectomia. Integrationsplatte II, 100/25-lattice, grelha utilizada para contagem de pontos, inserida na ocular esquerda (Objectiva 10X) do microscópio. 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Membros das famílias das caspases.	24
Tabela 2	Discriminação dos pacientes versus patologia que lhe está associada.	57
Tabela 3	Valores do coeficiente de variação para os três grupos.	57
Tabela 4	Comparação entre a presença de caspase-3 activa nos grupos obstrutivo e controlo, no túbulo e no testículo.	63
Tabela 5	Comparação entre a presença de caspase-3 activa nos diferentes grupos de células, entre os grupos obstrutivo e controlo, no túbulo.	64
Tabela 6.I	Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as células de Sertoli e as células germinativas, no grupo Obstrutivos, no túbulo.	65
Tabela 6.II	Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as células de Sertoli, as células diplóides e as células haplóides, no grupo Obstrutivos, no túbulo.	65
Tabela 6.III	Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as diferentes células da linha germinativa, no grupo Obstrutivos, no túbulo.	65
Tabela 7.I	Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as células de Sertoli e as células germinativas, no grupo Obstrutivos, no túbulo.	68
Tabela 7.II	Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as células de Sertoli, as células diplóides e as células haplóides, no grupo Obstrutivos, no túbulo.	68
Tabela 7.III	Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as diferentes células da linha germinativa, no grupo Obstrutivos, no túbulo.	68
Tabela 8	Comparação entre a presença de caspase-3 activa nos diferentes grupos de células, entre os grupos obstrutivo e controlo, no testículo.	70
Tabela 9.I	Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as células de Sertoli e as células germinativas, no grupo Obstrutivos, no testículo.	71
Tabela 9.II	Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as células	71

	de Sertoli, as células diplóides e as células haplóides, no grupo Obstrutivos, no testículo.	
Tabela 9.III	Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as diferentes células da linha germinativa, no grupo Obstrutivos, no testículo.	71
Tabela 10.I	Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as células de Sertoli e as células germinativas, no grupo Controlo, no testículo.	73
Tabela 10.II	Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as células de Sertoli, as células diplóides e as células haplóides, no grupo Controlo, no testículo.	73
Tabela 10.III	Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as diferentes células da linha germinativa, no grupo Controlo, no testículo.	74

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Volume relativo (%) ocupado nos túbulos seminíferos pelos diferentes tipos celulares estudados, imunohistoquimicamente marcados contra caspase-3, no grupo obstrutivo.	66
Gráfico 2	Volume relativo (%) ocupado nos tubos seminíferos pelos diferentes tipos celulares estudados, imunohistoquimicamente marcados contra caspase-3 activa, no grupo controlo.	69
Gráfico 3	Volume relativo (%) ocupado no testículo pelos diferentes tipos celulares estudados, imunohistoquimicamente marcados contra caspase-3, no grupo obstrutivo.	72
Gráfico 4	Volume relativo (%) ocupado no testículo pelos diferentes tipos celulares estudados, imunohistoquimicamente marcados contra caspase-3, no grupo controlo.	75

1. INTRODUÇÃO

1.1. SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

O sistema reprodutor masculino está especialmente adaptado para produzir espermatozóides e inoculá-los no interior do corpo da mulher. É formado por um conjunto de órgãos, que pode ser dividido da seguinte forma: testículos, ductos genitais, glândulas anexas e o pénis (Fig. 1).

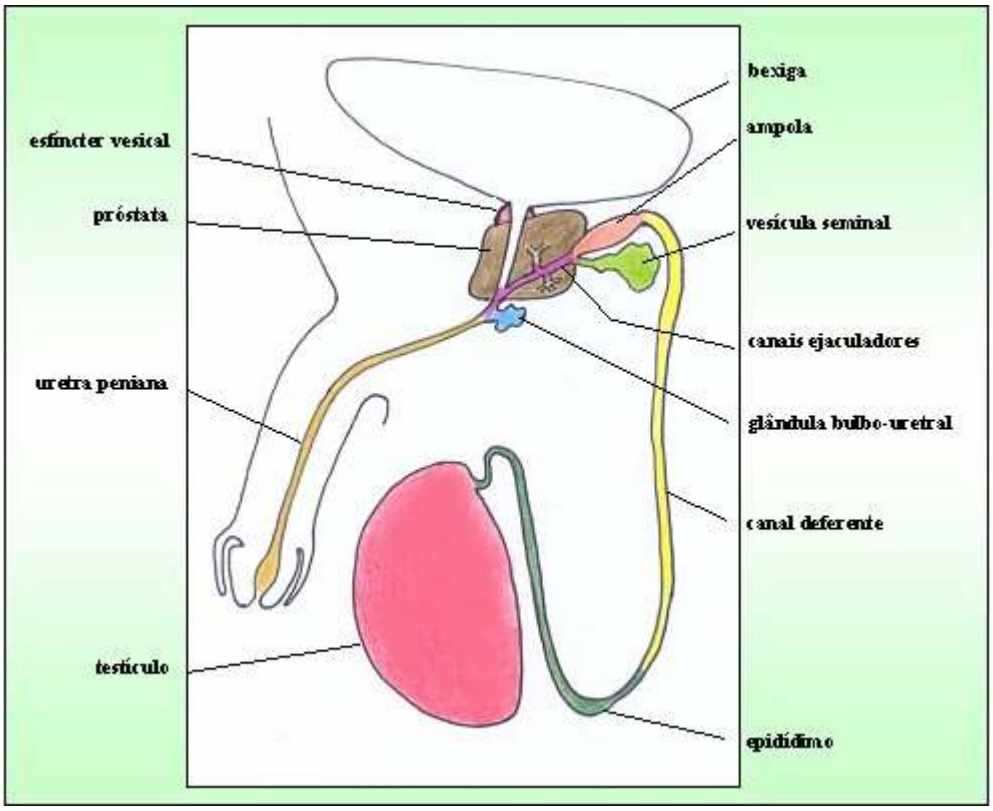


Figura 1: Anatomia do sistema reprodutor masculino. Desenho esquemático (Cortesia do Prof. Dr. Mário Sousa).

1.1.1. TESTÍCULO

1.1.1.1. ANATOMIA DO TESTÍCULO

Os testículos humanos são dois órgãos de forma elipsóide, com diâmetro aproximado de 2,5 x 4 cm envolvidos por uma cápsula, denominada por túnica albugínea (Fig. 2).

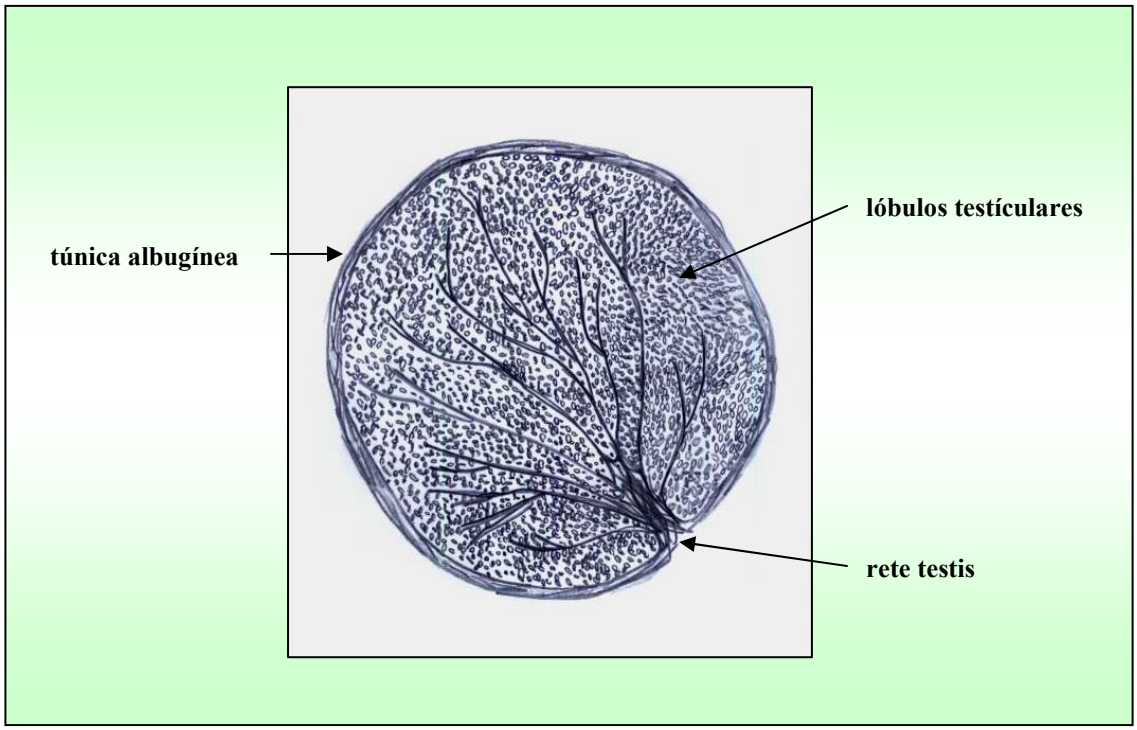


Figura 2: Corte transversal de um testículo. Desenho esquemático.

Os testículos encontram-se fora do abdómen, suspensos numa bolsa chamada escroto. Os testículos desenvolvem-se dentro do abdómen, mas cerca de dois meses antes do nascimento, descem através da parede abdominal para o interior do escroto, onde a temperatura é mantida alguns graus abaixo (33ºC) da temperatura do corporal interna (37ºC).

A túnica albugínea projecta-se para o interior formando o mediastinum do testículo e dele partem septos fibrosos, dividindo o órgão em 200 a 370 lóbulos testiculares. Os septos não são completos, pelo que frequentemente inter-comunicam entre os lóbulos (Fig. 2 e 3). Cada lóbulo é constituído por 1 a 4 túbulos seminíferos e tecido intertubular (tecido conjuntivo laxo), rico em vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e células intersticiais (Fig. 3), também conhecidas por células de Leydig (Russell *et al*, 1990; Sadler, 2001; Holstein *et al*, 2003).

Os testículos têm uma importantíssima função de produzir espermatozóides e hormonas sexuais masculinas.

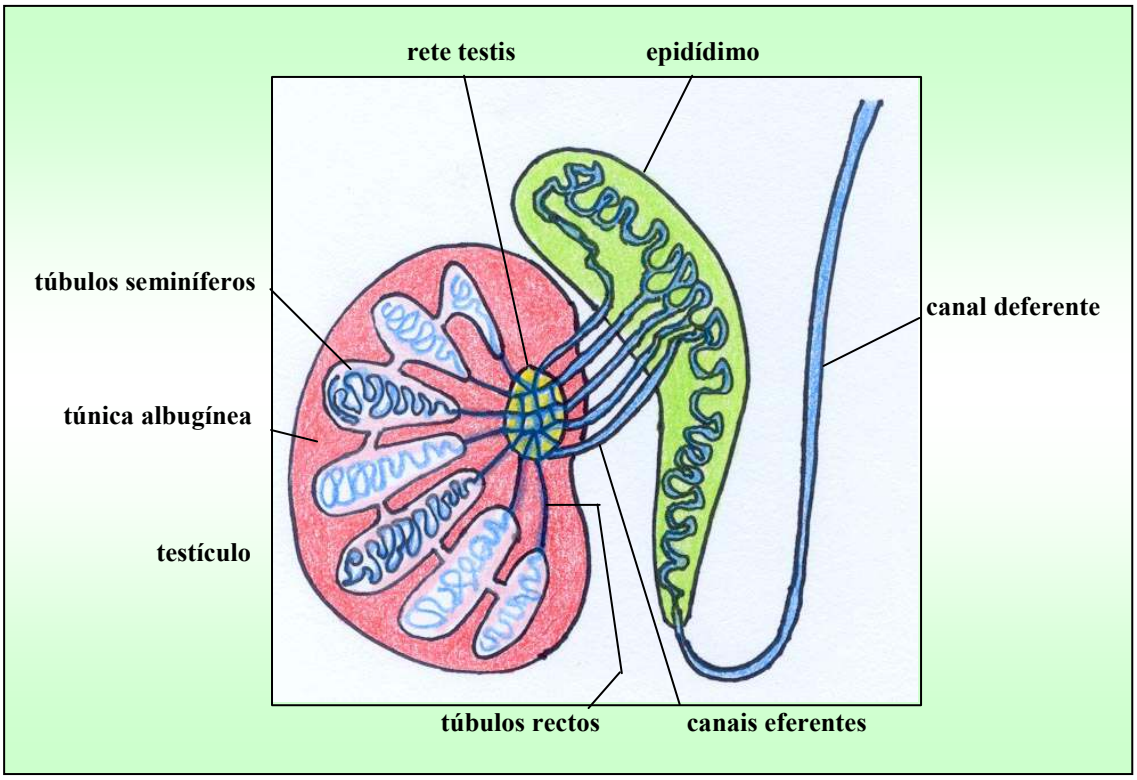


Figura 3: Disposição dos túbulos seminíferos no testículo humano e dos canais excretores. Desenho esquemático (Cortesia do Prof. Dr. Mário Sousa).

1.1.1.2. ESTRUTURA DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS

Os túbulos seminíferos são constituídos por um epitélio germinativo, pela lâmina basal e por uma túnica de tecido conjuntivo denso. Em média, o diâmetro de cada túbulo seminífero é de aproximadamente 150 a 250 µm, e 30 a 70 cm de comprimento. Estão enrolados em forma de rede em que cada túbulo pode ter ou não ramificações. Os túbulos seminíferos reúnem-se formando os túbulos rectos, que posteriormente anastomosam e formam uma rede de túbulos, a rede testicular (rete testis) (Fig.2). A rete testis está localizada no tecido conjuntivo central do testículo, o mediastinum, e contacta com a porção superior do epidídimo por 10 a 20 ductos eferentes (Fig.3).

1.1.1.3. EPITÉLIO GERMINATIVO

O epitélio germinativo é constituído por células germinativas que se encontram em diferentes estadios de desenvolvimento, nomeadamente, espermatogónias, espermatócitos primários e secundários e espermatídeos, localizadas em invaginações das células de Sertoli (Fig. 4 e 5).

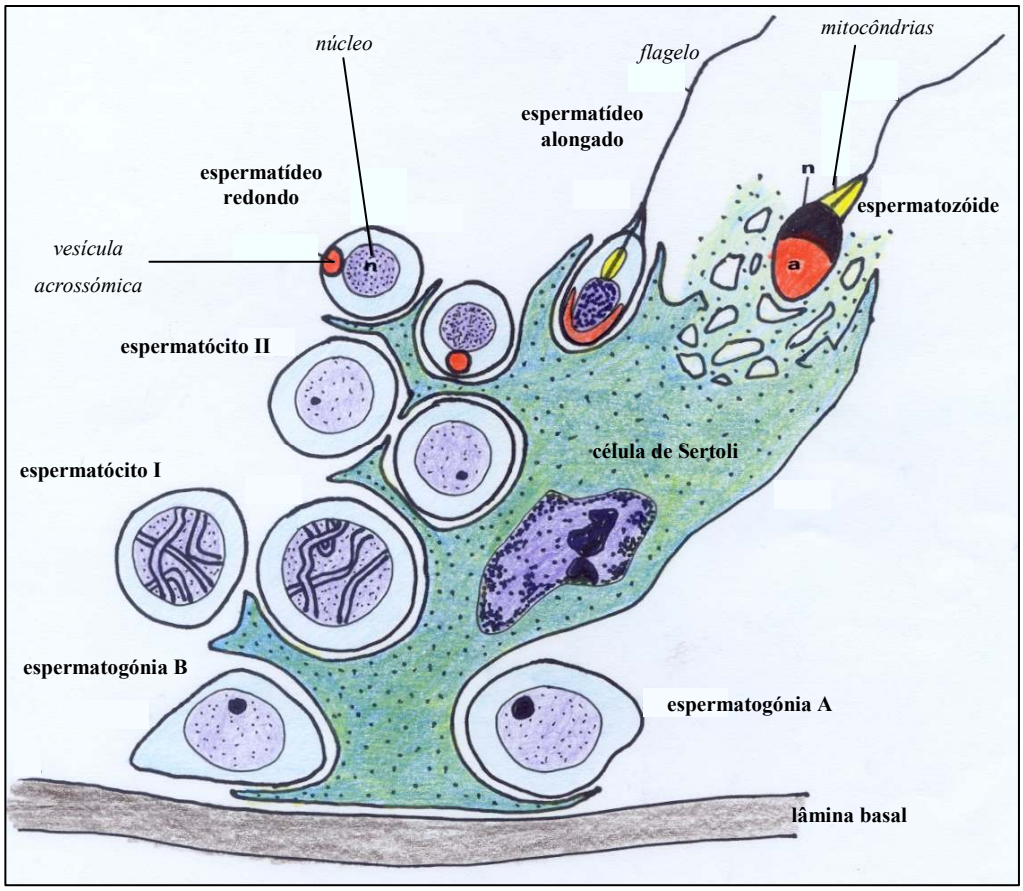


Figura 4: Secção do epitélio germinativo no túbulo seminífero. Desenho esquemático (Cortesia do Prof. Dr. Mário Sousa).

As células de Sertoli são células somáticas que assentam na lâmina basal do túbulo seminífero e cuja zona apical atinge o lúmen do túbulo seminífero. São basicamente prismáticas ou piramidais, com cerca de 70 µm de altura. Estas células encontram-se em intercomunicação com as células da linha germinativa (Sadler, 2001; Holstein *et al*, 2003).

Todas as células da linha germinativa, desde as espermatogónias aos espermatídeos, atravessam as junções das células de Sertoli, e passam da zona da

lâmina basal ao lúmen. Os espermatócitos e os espermatídeos encontram-se localizados nas invaginações das margens laterais e apicais das células de Sertoli. Estas reentrâncias e prolongamentos da célula fazem como que estas células apresentam uma morfologia bastante irregular (Fig.4 e 5). Estas células encontram-se ligadas entre si através de junções de hiato e desmossomas, que proporciona uma comunicação por iões e pequenas moléculas.

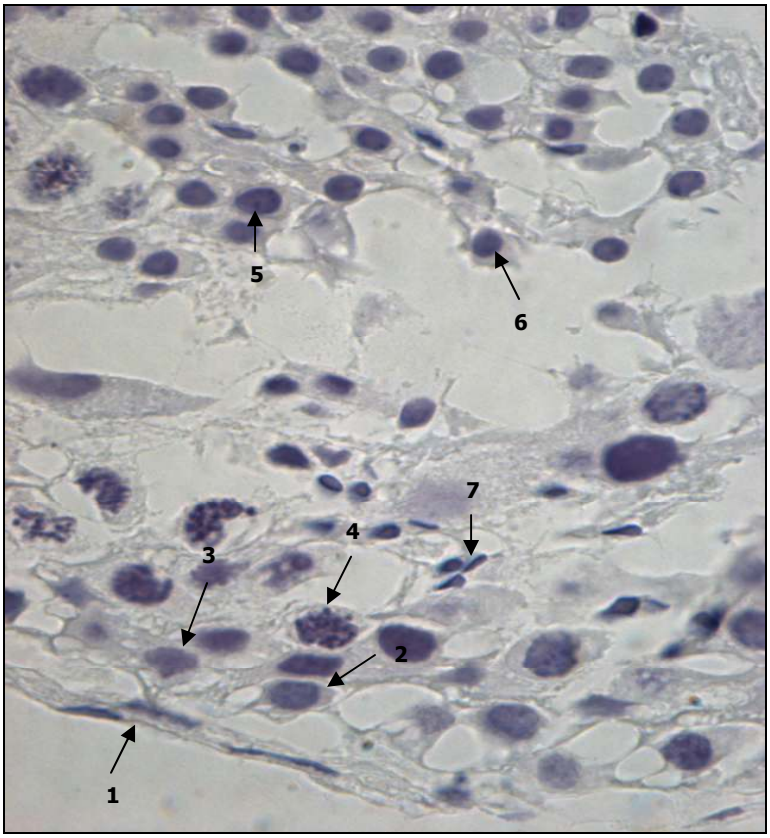


Figura 5: Secção do epitélio germinativo no túbulo seminífero. Fotografia ao microscópio óptico (X100), 1- Lâmina basal, 2- Espermatogónia, 3- Célula de Sertoli, 4- Espermatócito primário, 5- Espermatócito secundário, 6- Espermatídeo redondo, 7- Espermatídeo alongado.

As células de Sertoli apresentam várias funções. Uma das funções prende-se com o facto de impedir a passagem de macromoléculas e de leucócitos do sangue para o epitélio germinativo apical (barreira hemato-testicular); uma outra função é de suporte estrutural e metabólico necessário às células germinativas, bem como o respectivo controlo da nutrição das mesmas durante a espermatogénese, uma vez que estabelecem um íntimo contacto entre elas. Durante a espermatogénese, as células germinativas que sofrem apoptose e os corpos residuais que resultam dos

espermatídeos são fagocitados. O grande número de lisosomas e também de aglomerados de pigmentos lipocrómicos, presentes no citoplasma, traduz esta intensa actividade digestiva (Bloom and Fawcett, 1994; Sharpe, 1994).

O facto do citosqueleto das células de Sertoli estar bastante desenvolvido ao nível dos filamentos de actina, filamentos intermédios e microtúbulos faz com que estas células controlem os movimentos das células da linha germinativa. A própria forma das células de Sertoli e a localização do seu núcleo variam com os movimentos das células germinativas. São ainda as células de Sertoli o factor determinante na libertação dos espermatozóides para o lúmen do túbulo seminífero na espermiação (Rodriguez *et al*, 1997; Sadler, 2001; Holstein *et al*, 2003).

As células da linha germinativa dispõem-se em camadas, que ocupam o espaço entre a lâmina basal e o lúmen do túbulo seminífero. Estas células dividem-se e diferenciam-se até formarem os espermatozóides (Fig.6).

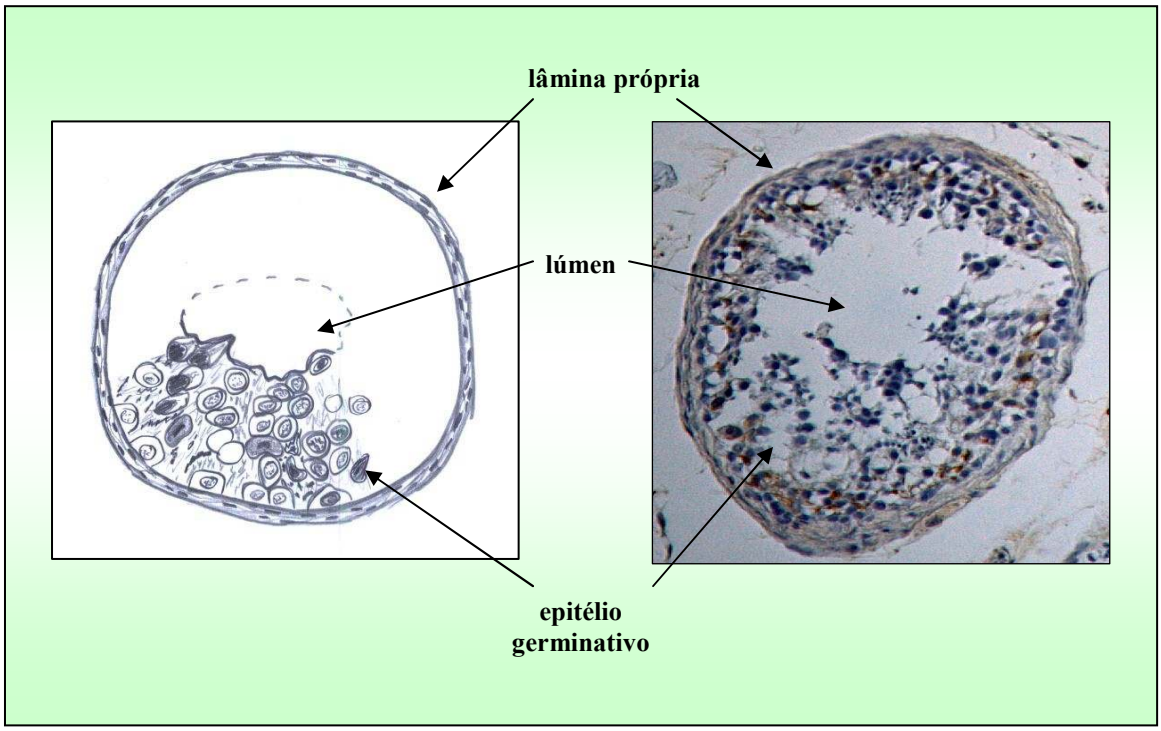


Figura 6: Secção de um túbulo seminífero. Desenho esquemático versus fotografia (x10).

A lâmina de tecido conjuntivo denso, a lâmina própria, que envolve os túbulos seminíferos, é constituída por fibroblastos intercalados por várias camadas de colagénio. A camada mais interna que se une à lâmina basal contem células mioepiteliais ou também designadas por células peritubulares, com capacidade peristáltica (Fig.6) (Johnson *et al*, 1987; Sadler, 2001; Holstein *et al*, 2003).

1.1.2. O PROCESSO DE ESPERMATOGÉNESE

1.1.2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A espermatogénese é um processo dinâmico no qual as espermatogónias (célula indiferenciada situada na lâmina basal dos túbulos seminíferos), através de uma série de eventos, se transformam em espermatozóides maduros. Este processo ocorre continuamente durante toda vida reprodutiva de um indivíduo.

No homem, a diferenciação das células germinativas primordiais tem início na puberdade, enquanto que na mulher, o começo da diferenciação ocorre no útero, durante o terceiro mês do desenvolvimento. No nascimento, as células germinativas do indivíduo do sexo masculino podem ser identificadas nos cordões sexuais do testículo como células grandes rodeadas de células de sustentação. Estas últimas derivam do epitélio superficial da glândula, assim como as células foliculares, tornando-se células de sustentação ou de Sertoli (Rodriguez *et al*, 1997; Sadler, 2001; Holstein *et al*, 2003).

O fenómeno da espermatogénese pode ser dividido em três fases: *espermacitogénese*, fase em que as espermatogónias se dividem produzindo sucessivas gerações de células que posteriormente se irão diferenciar em espermatócitos primários; *fase meiótica*, na qual os espermatócitos sofrem duas divisões sucessivas, reduzindo para metade o seu número de cromossomas, bem como a quantidade de DNA por célula (formam-se os espermatídeos redondos); por último, na *fase da espermiogénese*, os espermatídeos redondos através de um complexo processo de citodiferenciação transformam-se em espermatozóides.

1.1.2.2. ESPERMATOGÉNESE OU FASE PROLIFERATIVA

Pouco antes da puberdade, os cordões sexuais adquirem um lúmen e transformam-se nos túbulos seminíferos. Por volta da mesma época, as células germinativas primordiais dão origem às espermatogónias (Fig.7).

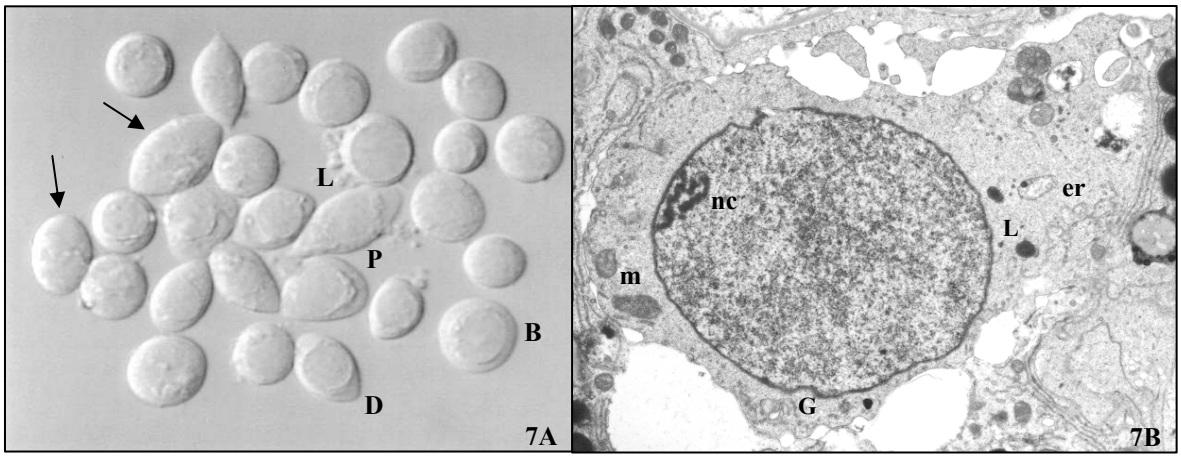


Figura 7: Espermatogónias. (A) Microscopia Hoffman invertida, com ampliação X600. Espermatogónias A alongadas (L, long), claras (P, pale), e densas (D, dark). Espermatogónias B (B). Espermatogónias em telofase (setas). (B) Microscopia electrónica de transmissão, com ampliação X5600. Espermatogónia A alongada (A long). Nucléolo (nc); Mitocôndrias (m); Complexo de Golgi (G); Retículo endoplasmático (ER); Gotículas lipídicas (L) (Cortesia do Prof. Dr. Mário Sousa).

As espermatogónias tipo A dividem-se por mitose para se renovarem a si próprias (espermatogónias A-dark), assim como para originar uma linha celular diferenciada para a espermatogénese (espermatogónias tipo A-pale). Assim, as espermatogónias A-dark podem ser consideradas *stem cells* com funções de reserva regenerativa, permanecendo indiferenciadas e substituindo as células-mãe. As espermatogónias tipo A-pale vão originar, por mitoses sucessivas (fase de proliferação), as espermatogónias B, que se irão diferenciar em espermatócitos primários (Bloom and Fawcett, 1994; Beumer *et al*, 1999; Rooij, 2001).

1.1.2.3. FASE MEIÓTICA

Meiose I

Os espermatócitos são as únicas células que se submetem a duas divisões sucessivas, as chamadas divisões reducionais ou divisões meióticas, que irão dar origem aos espermatídeos (Fig.8). Estas células têm exactamente metade do número de cromossomas nos núcleos, ao contrário das células que compõem o resto do corpo. No homem, as células somáticas contêm 46 cromossomas e os espermatídeos e os espermatozóides contêm 23 cromossomas. A fusão de um espermatozóide haplóide com um ovócito igualmente haploide restaurará um número diplóide de cromossomas nas células do embrião.

Logo após da formação dos espermatócitos primários, estes entram imediatamente na profase I, a primeira divisão meiótica, que é caracterizada por ser muito prolongada. Por este motivo, a maior parte das células do epitélio germinativo encontram-se nesta fase. Neste momento, o espermatócito possui 46 cromossomas (46,XY: 22 pares de cromossomas homólogos autossómicos e dois cromossomas sexuais) e uma quantidade 4N de DNA, isto porque o DNA de cada cromossoma replica-se por forma a que cada cromossoma seja composto por dois cromatídeos.

Na fase de leptóteno, o DNA dos espermatócitos primários replica, e por consequência os filamentos apresentam-se muito finos devido a uma quase completa despiralização, bastante emaranhados e longitudinalmente diferenciados em cromómeros e intercromómeros. De seguida, na fase de zigóteno, os cromossomas homólogos (bivalentes) aproximam-se e formam-se pares bem próximos, emparelhando-se. O emparelhamento começa num ou mais pontos do cromossoma e estende-se, progressivamente, ao longo de todo o comprimento (cromómero a cromómero), este processo é denominado sinapse. Na fase de paquíteno com o processo de espiralização, os cromossomas homólogos tornam-se mais curtos e mais grossos. Na fase de diplóteno os filamentos estão ainda mais espessos e contraídos. Observam-se os dois cromossomas, cada um constituído por dois cromatídeos, unidos pelos pontos de quiasma, formando uma tétrada. Os segmentos correspondentes dos cromossomas emparelhados são

trocados no processo único durante a meiose, denominado por *crossing-over*. De seguida, os cromossomas alinham-se numa placa metafásica, com os centrómeros orientados para os pólos.

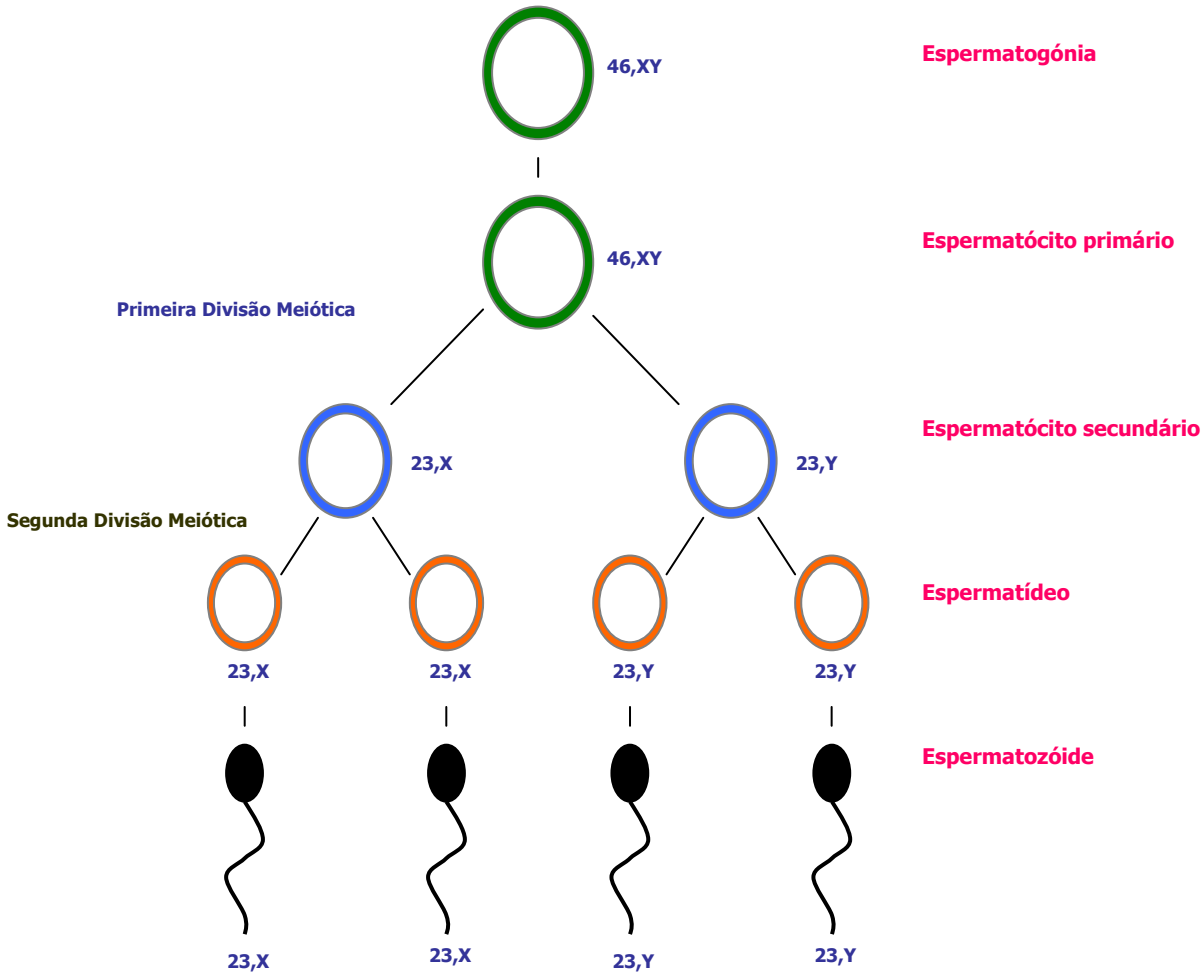


Figura 8: Esquema da espermatogénese. Desenho esquemático.

Na anafase I os cromossomas homólogos separam-se para cada um dos pólos opostos da célula.

No final desta primeira divisão meiótica, formam-se células mais pequenas chamadas espermatócitos secundários. Estas, apesar de possuírem um número haplóide de cromossomas (23,X ou 23,Y), não são ainda células haplóides, uma vez que a redução da quantidade de DNA por célula é ainda parcial (4N a 2N) (Johnson *et al*, 1983; Bloom and Fawcett, 1994; Sadler, 2001).

Meiose II

Os espermatócitos secundários permanecem em interfase apenas por um curto período de tempo. Submetem-se de seguida a uma segunda divisão meiótica que, desta vez, não é acompanhada por replicação de DNA. Durante esta divisão, os cromatídeos separam-se para células opostas originando os espermatídeos redondos. Assim, os espermatócitos secundários através de complexos mecanismos e elaborados processos de divisão celular são convertidos em espermatídeos redondos haplóides, que contêm 23 cromossomas (23,X ou 23,Y) e uma quantidade 1N de DNA. Isto deve-se à segregação dos cromatídeos durante a segunda divisão meiótica, não havendo fase S de replicação de DNA na interfase dos espermatócitos secundários.

O espermatídeo redondo, recentemente formado, apresenta-se como uma célula esferoidal pequena, que se vai submeter a uma metamorfose dramática, que se denomina espermiogénese (Barlow *et al*, 1998; Bloom and Fawcett, 1994; Hermo and Clermont, 1995).

1.1.2.4. Espermatogénese ou Fase de Diferenciação

A série de mudanças que resulta na transformação dos espermatídeos redondos em espermatozóides é conhecida por espermiogénese (Fig.9). No ser humano, o tempo necessário para uma espermatogónia se transformar num espermatozóide maduro é aproximadamente 64 dias (Sadler, 2001; Holstein *et al*, 2003).

O complexo de Golgi começa a produzir as vesículas proacrosómicas, na fase de espermatócito primário, contudo é na fase de espermatídeos redondos que estas vesículas sofrem um grande aumento. É nesta primeira fase de célula haplóide que as vesículas se fundem para originar uma só vesícula, que se liga ao invólucro nuclear (fase Golgi) (Fig.9).

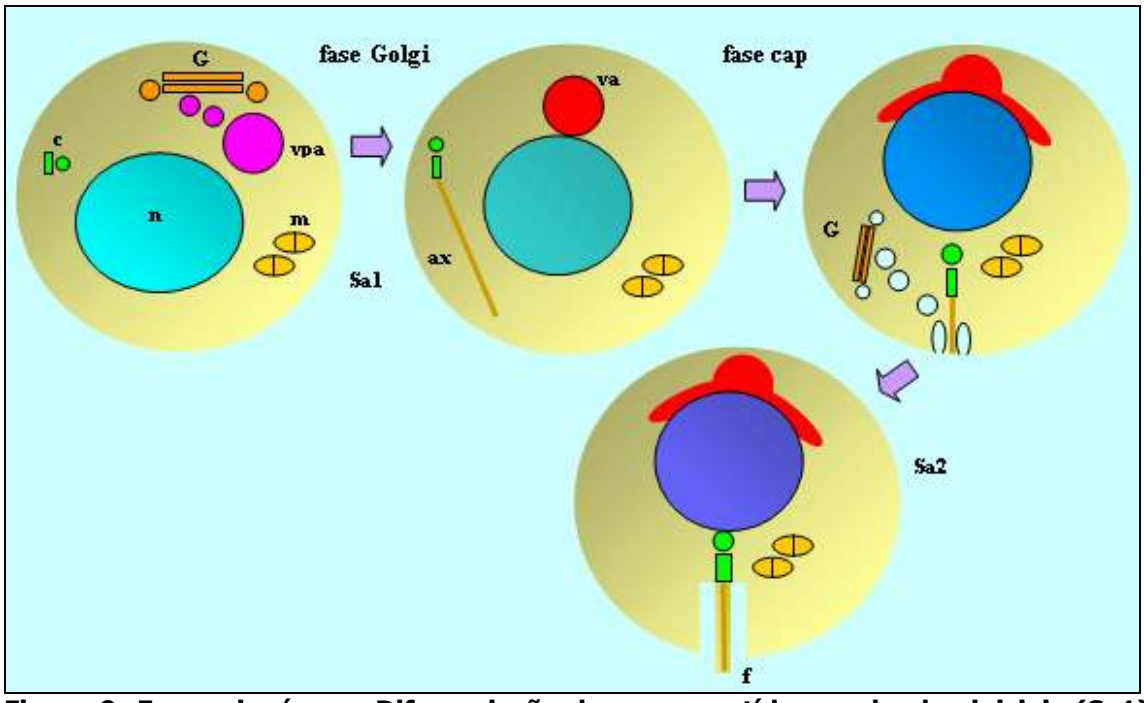


Figura 9: Espermiogénese. Diferenciação dos espermatídeos redondos iniciais (Sa1) a tardios (Sa2). Complexo de Golgi (G); Vesículas proacrosómicas (vpa); Vesícula acrosómica (va); Núcleo (n); Centríolos (c); Axonema (ax); Mitocôndrias (m); Flagelo (f). Desenho esquemático. (Cortesia do Prof. Dr. Mário Sousa)

Nesta fase, o centríolo proximal mantém-se livre enquanto que o centríolo distal inicia a polimerização microtúbulos, dando origem ao axonema intracitoplasmático. Nesta fase, as mitocôndrias migram para o polo basal da célula. De seguida a vesícula acrosómica alonga, cobrindo parcialmente o núcleo (fase cap). Aquando da fase de espermatídeo redondo (Sa2) os centríolos migram para o pólo basal e o centríolo proximal liga-se ao invólucro nuclear. Múltiplas vesículas, com origem no complexo de Golgi, rodeiam o axonema e fundem-se entre si para dar origem a um canal que, ao fundir-se com a membrana citoplasmática, iniciam a formação do flagelo (Fig.9).

Finalmente, segue-se a fase de alongamento dos espermatídeos (Fig.10). O citoplasma alonga-se e o complexo núcleo/acrosoma vai exercer uma protusão no polo apical da célula iniciando a transformação do espermatídeos redondo num espermatídeo em alongamento. Só posteriormente é que o núcleo inicia o seu alongamento, através de uma compressão executada por microtúbulos. Em simultâneo, observa-se a condensação do núcleo.

Durante o alongamento dos espermatídeos, as mitocôndrias enrolam-se em espiral, em torno da parte superior do axonema e dos centríolos, formando a baínha mitocondrial (Fig.10).

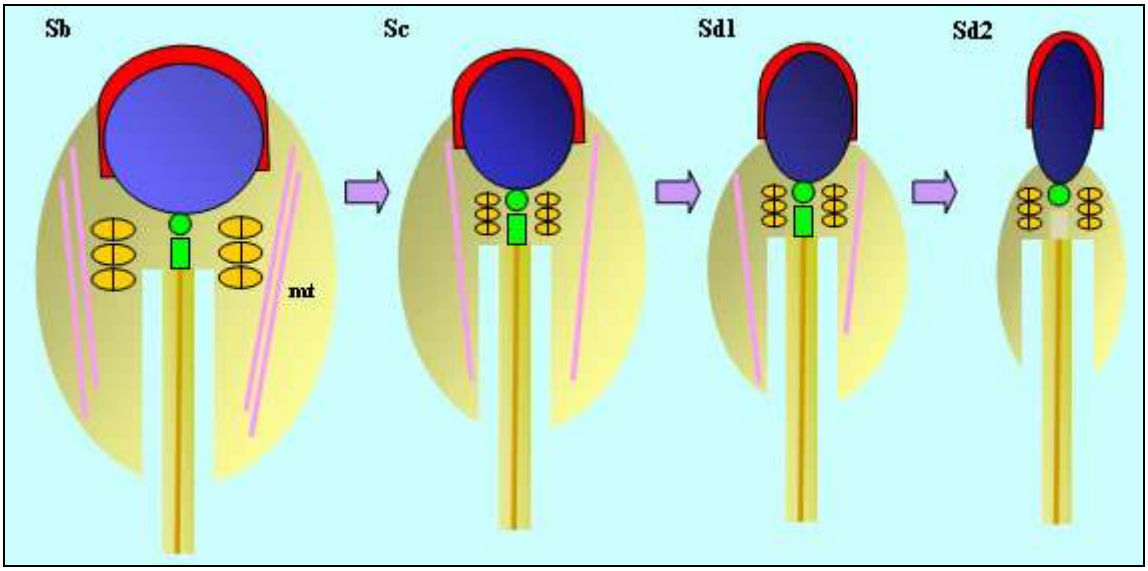


Figura 10: Espermiogénese. Diferenciação dos espermatídeos em alongamento, inicial (Sb) e tardio (Sc). Diferenciação dos espermatídeos alongados, inicial (Sd1) e tardio (Sd2). Manchette (mt). (Cortesia do Prof. Dr. Mário Sousa)

Uma vez formado o espermatozóide, este é libertado das invaginações apicais das células de Sertoli por lise da sua região apical (espermiação). A libertação dos espermatozóides para os canais excretores é auxiliada pelo fluir do líquido seminífero, bem como pela característica crucial dos túbulos seminíferos (células peritubulares) que é a capacidade de contracção. Esta célula continuará a desenvolver-se e a amadurecer, durante seu trânsito através do epidídimo, transformando-se então, no espermatozóide maduro. A complexidade do processo inteiro da espermatogénese explica a sua sensibilidade marcada às substâncias tóxicas ou ao desequilíbrio hormonal. A espermatogénese é possivelmente um dos processos mais complexos de diferenciação celular que ocorre nos tecidos de um indivíduo adulto. Muitos dos seus processos deverão ser estudados e esclarecidos a nível molecular.

O espermatozóide pode ser dividido em duas partes: cabeça e flagelo (Fig.11).
A cabeça é constituída por um núcleo altamente condensado e alongado e a vesícula acrosómica. O conteúdo desta vesícula é rico em enzimas pró-hidrolíticas como por exemplo a hialuronidase e a neuraminidase, e uma protease, a acrosina, que apresenta característica semelhantes à tripsina. Estas enzimas são cruciais na capacidade de penetração do espermatozóide na zona pelúcida do ovócito.

A região equatorial possui na sua membrana citoplasmática os receptores de ligação à membrana citoplasmática do ovócito (oolema), a desintegrina, e ligam-se aos receptores correspondentes do oolema (integrina) (Sousa, 2005).

O flagelo pode ser dividido em três partes: peça intermédia, peça principal e peça terminal, que permitem adquirir a mobilidade necessária para atingir o local de fertilização (Bloom and Fawcett, 1994; Sadler, 2001).

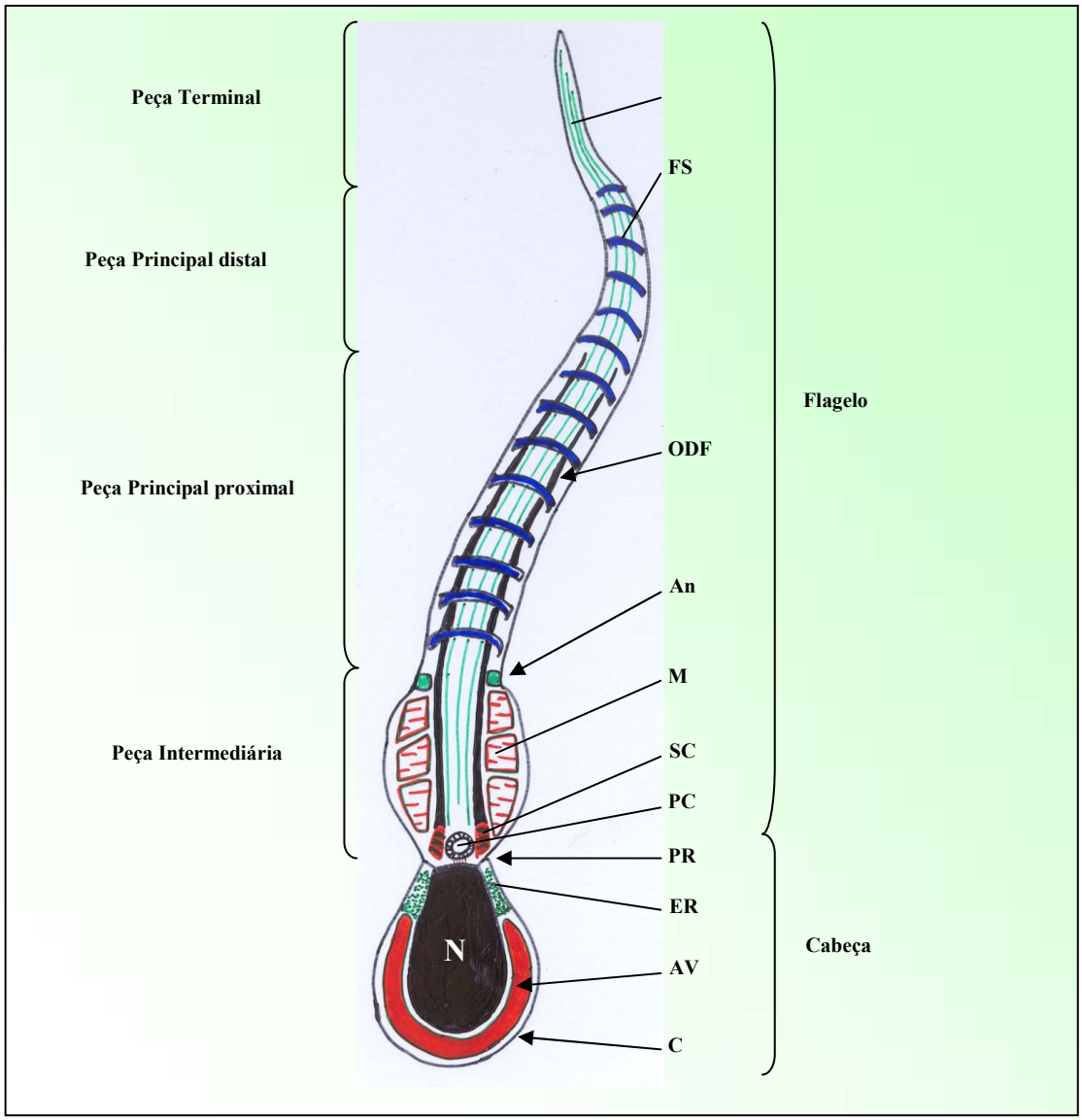


Figura 11: Espermatozóide. Membrana citoplasmática (C); Núcleo (N); Vesícula acrosómica (AV); Região equatorial (ER); Anel posterior (PR); Centríolo proximal (PC); Colunas segmentadas (SC); Mitocôndrias (M); Annulus (An); Fibras densas externas (ODF); Anéis da baínha fibrosa (FS); Axonema (Ax). Desenho esquemático. (Cortesia do Prof. Dr. Mário Sousa)

1.1.3. CÉLULAS ESTAMINAIS E CELULAS PROGENITORAS DA LINHA GERMINATIVA

As células estaminais são definidas pela função que desempenham no organismo. Dividem-se por um processo de mitose assimétrica, em que uma das células filhas mantém as propriedades da célula mãe, enquanto que a outra célula filha se transforma numa célula comprometida com o desenvolvimento.

As células estaminais não dão origem directamente a células diferenciadas. Fazem-no indirectamente, através de células progenitoras, que são populações de células intermédias que fazem a ligação entre as células estaminais e as células diferenciadas. As células progenitoras não são capazes de originar novas células estaminais, ao contrário das estaminais que possuem baixa actividade mitótica para produzir um número reduzido de células progenitoras. As células progenitoras apresentam uma actividade mitótica elevada para expandir a sua população e produzir células diferenciadas finais, necessárias à homeostasia dos tecidos.

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

No homem, existem as espermatogónias tipo A-dark e as espermatogónias A-pale. Embora sejam ambas referidas como células estaminais adultas, a sua função biológica é diferente. Enquanto que as espermatogónias A-dark apresentam características que as definem como estaminais, as espermatogónias A-pale possuem características de células progenitoras.

As espermatogónias A-dark apresentam elevada actividade proliferativa durante o desenvolvimento até à puberdade, o que é essencial para a expansão da reserva dos dois tipos de espermatogónias. Pelo contrário, a sua taxa de proliferação na fase adulta é limitada, o que as defende contra agentes tóxicos.

As espermatogónias A-dark representam a reserva regenerativa, enquanto que as espermatogónias A-pale constituem a reserva funcional.

As espermatogónias A-pale, como células progenitoras, mantêm a proliferação cíclica da população diferenciada de espermatogónias permitindo a produção diária de milhões de espermatozóides nos adultos (Ehmcke *et al*, 2006).

1.1.4. ESPERMOGRAMA

O factor masculino está envolvido numa percentagem elevada dos casos de infertilidade conjugal. Para fazer a avaliação da infertilidade masculina, é essencial avaliar no sémen do ejaculado o volume, o pH, a viscosidade, o tempo de liquefacção, a concentração, mobilidade, morfologia e resistência dos espermatozóides, as infecções e a presença de auto-anticorpos. A filosofia fundamental desta abordagem é que a fertilidade masculina pode ser definida em termos de um número mínimo de espermatozóides morfologicamente normais, com movimento progressivo rápido, que deve ser excedido para que um determinado indivíduo seja considerado fértil. É necessário enfatizar que a análise seminal não é um teste de fertilidade, mas é considerada uma pedra básica da avaliação do factor masculino em reprodução assistida, pois é capaz de prover informações da produção testicular, de algumas propriedades funcionais dos espermatozóides e da função secretora das glândulas acessórias.

1.1.5. AZOOSPERMIA

O volume do ejaculado é principalmente composto por líquido seminal proveniente das vesículas seminais e da próstata. Apenas 5% do volume total corresponde aos espermatozóides. Quando o sémen não possui espermatozóides, a situação denomina-se azoospermia. Existem dois tipos de azoospermia: a obstrutiva (os túbulos que ligam os testículos à uretra não estão permeáveis ou encontram-se

ausentes congenitamente) e a secretora (os espermatozóides não são produzidos nos testículos) (Rijinders *et al*, 1996).

1.1.5.1. AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA

A azoospermia obstrutiva pode ser causada por obstrução dos canais genitais excretores, por vasectomia ou por agenesia congénita dos canais deferentes (CBAVD). As causas mais frequentes são as secundárias provocadas por infecções genitais (tuberculose, doenças de transmissão sexual: sífilis, gonorreia, clamidea, micoplasma, micoses, HPV, Herpes genital) e complicações cirúrgicas, tais como cirurgia escrotal (varicocelo, remoção de quistos do epidídimo, entre outros) e cirurgia de correcção de hérnia inguinal.

Apesar de não existirem espermatozóides no sémen, o homem com azoospermia obstrutiva produz espermatozóides.

Menos frequentemente, existe um distúrbio pelo qual, embora todos os canais sejam permeáveis, o homem ejacula para dentro da bexiga ao invés de ejacular na uretra: é a ejaculação retrógrada (Rijinders *et al*, 1996).

1.1.5.2. AZOOSPERMIA SECRETORA

A azoospermia secretora é causada por anomalias na produção dos espermatozóides Nesta situação, o testículo pode produzir espermatozóides em número muito reduzido ou até mesmo não produzir qualquer espermatozóide. De um modo geral, são mais graves que as obstrutivas, podendo ser devida à criptorquidia, distúrbios endócrinos, mutações genéticas do cromossoma Y, anomalias do cariótipo, infecções testiculares, exposição a tóxicos e Quimioterapia/Radioterapia (Meistrisch, 1993; Rijinders *et al*, 1996; Sousa, 2002).

1.2. VIAS DA APOPTOSE

1.2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O termo "morte celular programada" (PCD, *programmed cell death*) foi usado originalmente para descrever uma série coordenada de eventos que conduzem à morte da célula durante o seu desenvolvimento (Lockshin and Williams, 1964; Gonçalves, 1998; Hikim *et al*, 1999).

Os primeiros estudos da apoptose foram realizados através das pesquisas de Kerr, em 1971, que induziu a atrofia no fígado de ratos pela ligação das veias portas, levando à morte dos hepatócitos, caracterizada por alterações morfológicas muito particulares, tais como a diminuição do volume celular, alteração da assimetria da membrana plasmática, condensação da cromatina e, eventualmente, uma fragmentação em vesículas contendo organelos intactos. Esse fenómeno foi inicialmente chamado de necrose; porém Kerr, em 1972, alterou o nome para apoptose, palavra grega para designar a perda das folhas pelas árvores (Kerr, 1972; Hikim *et al*, 1999).

A apoptose é essencial para a remoção de células danificadas e potencialmente perigosas para os organismos, de forma a assegurar a homeostase estrutural e funcional dos tecidos. (Duke *et al*,, 1994)

A apoptose surge em resposta a estímulos específicos de lesão celular, externos (privação de factores de sobrevivência, exposição a radiações e agentes químicos) e internos (lesão do DNA e organelos) (Henriksén *et al*, 1996).

O principal papel da apoptose tem vindo a ser reconhecida na patogénese de diversas doenças humanas, nomeadamente cancro, síndrome de imunodeficiência adquirida, aterosclerose e cardiomiopatias neurodegenerativas (Hikim *et al*, 1998).

O processo apoptótico progride em quatro fases distintas: iniciação, mediação (a célula, tendo recebido o estímulo apoptótico, compromete-se irreversivelmente

com a apoptose), execução (durante a qual ocorrem a maioria das modificações estruturais e bioquímicas) e de remoção (restos celulares são removidos por fagocitose) (Jacobson *et al*, 1997; Evan *et al*, 1998).

1.2.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.

A apoptose está associada a alterações morfológicas e bioquímicas bem definidas, as quais se distinguem a nível citoplasmático e a nível nuclear. Ao nível do citoplasma há redução do volume da célula, e consequente diminuição do contacto com as células vizinhas, balonização localizada da membrana celular, vacuolização do citoplasma, e formação de corpos apoptóticos. Estes corpos apoptóticos são fagocitados por macrófagos e removidos do tecido sem causar uma resposta inflamatória. Ao nível do núcleo observa-se uma indentação e fragmentação do invólucro nuclear e uma marginalização periférica da cromatina seguida de digestão internucleossómica do DNA.

Estas mudanças morfológicas são uma consequência de eventos moleculares e bioquímicos característicos, que ocorrem em células apoptóticas. O mais notável é a activação das enzimas proteolíticas que medeiam a clivagem do DNA em fragmentos oligonucleossómicos (Billig *et al*, 1996, Saraste and Pulkki, 2000).

Durante o processo de apoptose, um dos eventos primordiais é o distúrbio da assimetria da membrana celular. Durante as primeiras fases de apoptose dá-se a exteriorização de fosfatidilserina (PS), ou seja, há uma translocação do interior para o exterior da superfície da membrana plasmática ficando exposta ao ambiente celular externo. Esta exposição da PS promove uma oportunidade para eliminar a célula. Este processo ocorre ao mesmo tempo que ocorre a condensação da cromatina, o que provoca o aumento da permeabilidade da membrana. No epitélio germinal masculino este é o sinal esperado pela célula de Sertoli para a fagocitose da célula alvo (Fig.12). Falhas na fagocitose das células

apoptóticas resultariam num alto número de células anormais no ejaculado e, como consequência, baixa fertilidade (Martin *et al*, 2005).

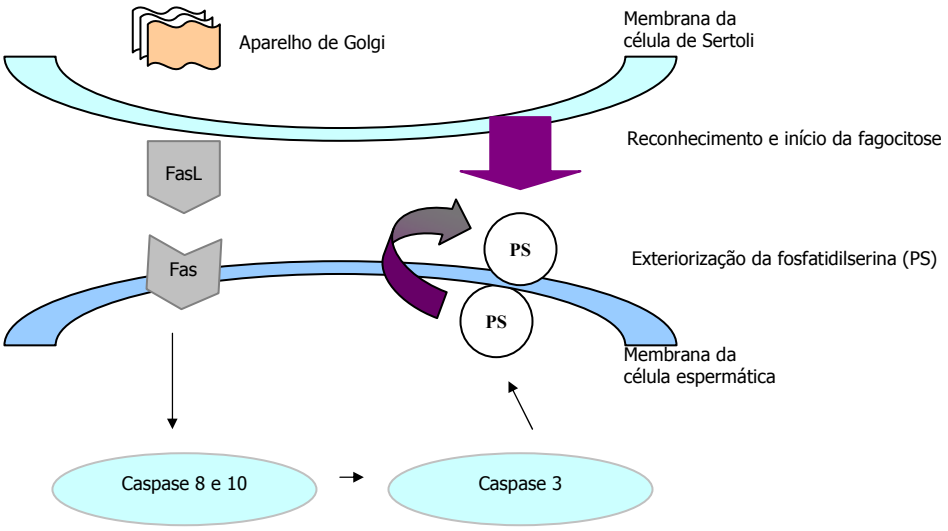


Figura 12: Mecanismo proposto para controlo do número de células produzidas na espermatogénese e para a eliminação de células danificadas.

Em contraste à morte celular por apoptose, a necrose é um processo passivo que não requer gastos de energia pela célula e ocorre em resposta a uma enorme variedade de agentes nocivos. A necrose afecta geralmente um grupo de células contíguas, e é caracterizado pelo aumento de volume da célula e seus organelos, resultando na lise da membrana celular (Fig.13) (Kroemer *et al*, 1998; Leist and Jaattela, 2001).

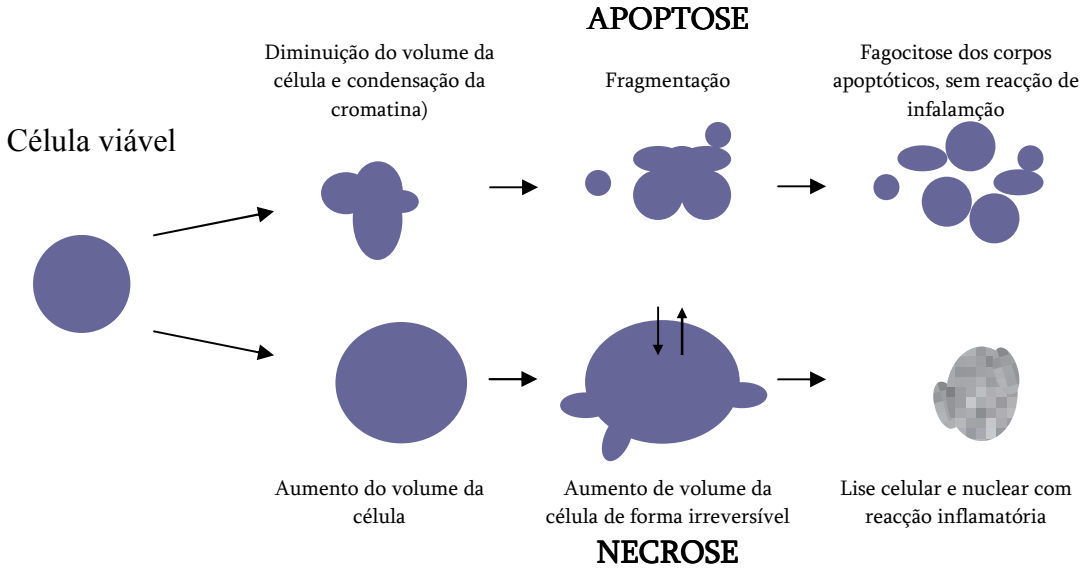


Figura 13: Comparação dos processos de apoptose e de necrose.

1.2.3. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

As células apoptóticas geralmente exibem uma diversidade de modificações bioquímicas originando patologias estruturais. Algumas destas características também podem ser observadas em células necróticas, contudo outras alterações são mais específicas, como fragmentação do DNA e clivagem de proteínas (Kroemer *et al*, 1995).

No primeiro caso, as células apoptóticas exibem quebras típicas do DNA em grandes fragmentos de 50 a 300 quilobases. Por consequência há clivagem internucleossómica do DNA em oligonucleossomas em múltiplos de 180 a 200 pares de bases por endonucleases dependentes de Ca^{2+} e Mg^{2+}. Os fragmentos são visualizados por electroforese em gel de agarose, cujos produtos oligonucleossómicos de degradação do DNA (oligonucleossomas) formam um padrão em escada. Pelo contrário, a digestão irregular do DNA característica da necrose dá origem a um padrão contínuo (em esfregaço).

Na clivagem de proteínas a hidrólise de proteínas envolvendo a activação de vários membros da família das cisteínas-proteases - caspases, é uma das características específicas da apoptose. A clivagem por caspases das proteínas do citoesqueleto e da estrutura nuclear produz as alterações estruturais nucleares e citoplasmáticas observadas nas células apoptóticas (Cohen, 1997; Nicholson, 1999; Marchetti *et al*, 2004)

1.2.4. SINAIS DE MORTE QUE ACTIVAM AS VIAS DE SINALIZAÇÃO

A apoptose pode ser activada por uma variedade de sinais que desencadeiam morte celular, desde a ausência do factor de crescimento ou respectiva hormona a uma interacção ligante-receptor positiva a agentes lesivos específicos. Além disso, há um processo altamente coordenado entre o crescimento celular e a apoptose. A apoptose é importante pois contribui para o controlo do número de células e assegura que as que sobrevivem são apenas as estritamente necessárias. A

apoptose assim contribui para a regulação da densidade normal das populações celulares (Tapanainen *et al*, 1993; Barinaga, 1996; Hikim *et al*, 1999; Oosterhuis *et al*, 2000).

1.2.5. PRINCIPAL FAMÍLIA DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA APOPTOSE

Para compreender melhor o processo de morte celular foram feitos diversos estudos no nemátode *Caenorhabditis elegans*. O seu genoma foi completamente sequenciado, o seu mapa celular foi estabelecido e encontradas as mutações genéticas. O hermafrodita *C. elegans* tem 1090 células somáticas, das quais 131 são eliminadas por apoptose. 959 células vivem e desenvolvem-se em tecidos definidos. Das 131 eliminadas por apoptose, 116 são células do sistema nervoso e o restante são da ectoderme (Zou *et al*, 1997; Lawen, 2003).

A principal causa da apoptose em *C. elegans* é a activação da cisteína-protease, ced-3, a qual é mediada pela oligomerização com a proteína ced-4.

A actividade do complexo ced-3/ced-4 é regulada pelo inibidor apoptótico ced-9 e pelo indutor apoptótico egl-1 (Fig.14).

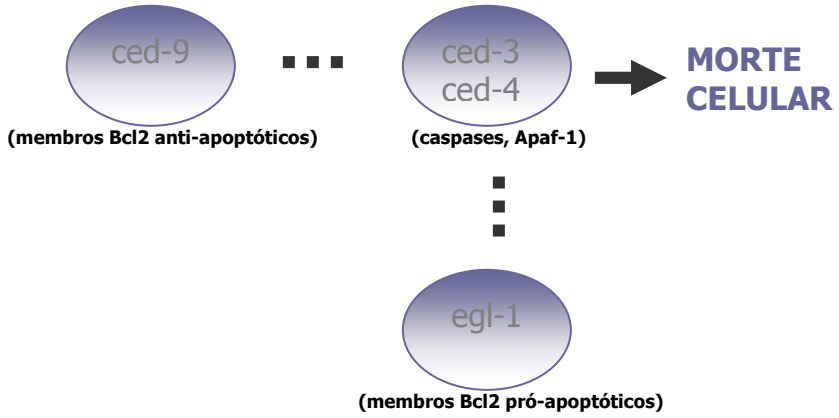


Figura 14 – Apoptose no *Caenorhabditis elegans.*

As caspases e os seus homólogos foram detectados em espécies que variam desde o nemátode (*C. elegans*) até ao díptero (*D. melanogaster*), verificando-se que o cerne da maquinaria da morte celular está conservado durante a evolução (Riedl and Shi, 2004).

A primeira caspase descoberta foi a caspase-1 ou ICE (Interleukin-1β converting enzyme), homóloga nos mamíferos da proteína ced-3. A ced-3 é um membro da família das cisteína-protease e encontra-se envolvido na execução apoptótica em *C. elegans* (Thornberry and Lazebnik, 1998). A ced-4 corresponde ao homólogo mamífero (apoptotic protease activating factor 1), Apaf-1. Este é a unidade do apoptosoma, o qual faz parte de uma complexa activação de sinalização da caspase. Os dois genes ced-3 e ced-4 são fundamentais para a morte celular no *C. elegans*, enquanto que os genes Egl-1 e ced-9 são membros da família Bcl-2 das proteínas pro- e anti-apoptóticas, respectivamente, as quais têm um papel importante na mediação e na regulação das vias de sinalização.

Foi a partir dos estudos efectuados no nemátode *C. elegans* que se identificou, nos mamíferos a família das caspases (cysteine-dependent aspartate-specific protease), proteases ricas em cisteína, responsáveis pelo processo apoptótico. Estas enzimas são bastante específicas, essencialmente por apresentarem uma característica muito rara que consiste na especificidade de provocar clivagem a seguir ao ácido aspártico (aspartato) (Fig.15). Todas as caspases contêm um local activo: pentapeptídeo: Gln-Ala-Cys-$\mathcal{X}$-Gly (QAC$\mathcal{X}$G, onde o $\mathcal{X}$ é R (Arg), Q (Gln) ou G (Gly)), altamente conservado (Cohen, 1997).

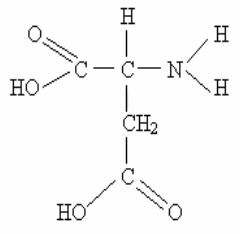


Figura 15: Ácido aspártico (aspartato).

Na Drosophila, foram identificadas 7 caspases, enquanto que nos mamíferos a família as caspases incluem 14 membros diferentes (Richardson and Kumar, 2002; Riedl and Shi, 2004).

De acordo a nomenclatura, as caspases são referidas tendo em consideração a ordem da sua publicação: caspase-1 é ICE, a primeira caspase de mamífero, descrita como um homólogo de ced-3.

Análises filogenéticas das caspases revelam que existem 3 sub-famílias: a sub-família ICE, onde estão incluídas as caspases-1, -4 e -5, a sub-família CED-3/CPP32 (32 kDa cisteína protease) que abrange as caspases-3, -6, -7, -8, -9 e -10, e a sub-família ICH-1 (onde ICH é ICE e ced-3 homólogo)/Nedd2 (Tabela 1) (Nicholson, 1999).

Tabela 1: Membros das famílias das caspases (Cohen, 1997; Nagata *et al*, 1997; Nicholson, 1999; Said *et al*, 2004).

Caspase	Outros nomes	Função	Subunidades activas (kDa)	Prodomínios e elementos adaptadores	Adaptador de activação	Substrato
Caspase-1	ICE	Maturação de múltiplas citoquinas pró-inflamatorias	20/10	Long: CARD	CARDIAK	pro-IL1β, procaspase 3 e 4
Caspase-2	Nedd2-mouse, ICH-1	Iniciadora	20/12	Long: CARD	RAIDD	PARP
Caspase-3	CPP32, Yama, Apopain	Efectora	17/12	Short: sem DED ou CARD	NA	PARP, DNA-PK, SER/BP, rho-GDI
Caspase-4	ICE rel II, TX, ICH-2	Maturação de múltiplas citoquinas pró-inflamatorias	20/10	Long: CARD	D	--
Caspase-5	ICE rel III, TY	Maturação de múltiplas citoquinas pró-inflamatorias	20/10	Long: CARD	D	--
Caspase-6	Mch2	Efectora	18/11	Short: sem DED ou CARD	NA	lamin A
Caspase-7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	Efectora	20/12	Short: sem DED ou CARD	NA	PRAP, procaspase 6
Caspase-8	MACHα1, FLICE, Mch5	Iniciadora	18/11	Long: DED	FADD	--
Caspase-9	ICE-LAP6, Mch6	Iniciadora	17/10	Long: CARD	APAF-1	PRAP
Caspase-10	Mch4, FLICE2	Iniciadora	17/12	Long: DED	FADD	--
Caspase-11	ICH3	Maturação de múltiplas citoquinas pró-inflamatorias	20/10	Long: CARD	D	--
Caspase-12		Maturação de múltiplas citoquinas pró-inflamatorias	20/10	Long: CARD	D	--
Caspase-13	ERICE	Maturação de múltiplas citoquinas pró-inflamatorias	20/10	Long: CARD	D	--
Caspase-14	MICE	Maturação de múltiplas citoquinas pró-inflamatorias	20/10	Long: CARD	NA	--

Na célula, as caspases partilham similaridades na sequência de aminoácidos, estrutura e especificidade do substrato. As caspases são sintetizadas como zimógenios inactivos denominados por procaspases, as quais possuem um

segmento NH2-terminal (N-terminal), também designado de prodomínio e por duas cadeias, uma subunidade longa (~20kD) e uma subunidade curta (~10kD) que contêm as sequências que participam no domínio catalítico (Masumoto *et al*, 2001; Paasch *et al*, 2004; Said *et al*, 2004).

Duas características da estrutura proenzimática são centrais no mecanismo de activação destas proenzimas (*caspases inactivadas - procaspases*). Primeira, o domínio N-terminal, altamente variável na sequência e no comprimento, está envolvido na regulação da activação. Segunda, todos os domínios derivam da proenzima por clivagem em locais específicos de acção das caspases, podendo estas enzimas ser activadas tanto autocataliticamente como numa cascata de enzimas com similar especificidade (Thornberry and Lazebnik, 1998; Wolf and Green, 1999).

O processo de activação das caspases – a proteólise em resíduos de aspartato (Asp-X) - origina heterodímeros por interacção da subunidade grande e pequena, cada uma contribuindo com resíduos decisivos para a actividade catalítica. Em algumas caspases, a maturação final origina tetrâmeros com dois domínios catalíticos (Fig.16) (Wolf and Green, 1999).

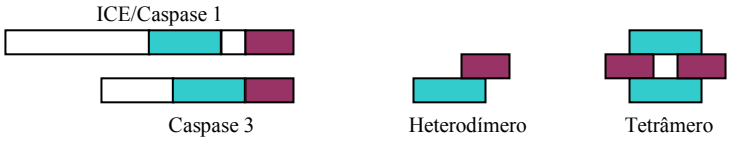


Figura 16: Representação da estrutura e activação das caspases.

Para uma catálise eficiente é necessário o reconhecimento de, pelo menos, quatro aminoácidos com prodomínios no local de clivagem.

A diversidade das funções biológicas das caspases deve-se à especificidade do reconhecimento dos tetrapeptídeos. A sua especificidade é ainda mais estrita: nem

todas as proteínas que contêm uma sequência tetrapeptídea ideal são clivadas, o que implica que elementos estruturais terciários podem influenciar o reconhecimento do substrato. A clivagem de proteínas pelas caspases não é só específica mas também altamente eficiente. A especificidade estrita das caspases serve de pilar à constatação da não ocorrência de digestão proteica indiscriminada durante a apoptose. Ao invés, um conjunto selectivo de proteínas é clivado num único local, resultando numa perda ou mudança de função (Said *et al*, 2004).

As moléculas adaptadoras ligam sensores apoptóticos, tais como, os receptores de morte (death receptors - DR), às procaspases. Os adaptadores contêm geralmente um domínio que liga o adaptador ao sensor e outro que liga ao prodomínio das procaspases. Estes domínios incluem domínios de morte (DD's), domínios de efectuação de morte celular (DED's) e domínios de recrutamento de caspase (CARD) (Wolf and Green, 1999).

O DED é encontrado nas caspases-8 e -10 e parece estar envolvido nas interacções com sinalizadores de proteínas adaptadoras tais como MORT1/FADD e TRADD. O CARD é encontrado nas caspases-1, -2, -4, -5 e -9 e parece ser importante em promover interacções de umas com as outras (ligação CARD: caspase-caspase) mas também com um leque de outras proteínas com funções reguladoras e adaptativas (Earnshaw *et al*, 1999).

Em termos funcionais, as caspases podem ser subdivididas em três grupos: efectoras, indutoras e promotoras da maturação de múltiplas citoquinas pró-inflamatórias (Tabela 1) (Nicholson and Thornberry, 1997; Said *et al*, 2004).

Activação das caspases iniciadoras: as caspases iniciadoras clivam e activam as caspases efectoras (Lawen, 2003). As caspases iniciadoras traduzem sinais extrínsecos recebidos por receptores membranares com domínio DED (caspases-2, -8 e -10), ou sinais endógenos provenientes da mitocôndria (caspase-9). A activação da procaspase-8 requer a associação com o cofactor FADD (Fas-

associated protein with death domain) através do DED, enquanto que a activação da procaspase-9 envolve um complexo com o cofactor Apaf-1 através do CARD. A activação da caspase-9 também requer a presença do citocromo c[1] e desoxiadenosina trifosfato. As caspase-8, caspase-10 e caspase-9 são caspases iniciadoras e encontram-se no topo da sinalização da cascata das caspases (Chen and Wang, 2002; Lawen, 2003).

Activação das caspases efectoras: as caspases efectoras são activadas pelas caspases iniciadoras e efectuam a proteólise celular (caspases -3, -6 e -7). Este grupo de caspases degrada o compartimento nuclear: laminas (proteínas nucleares) que resulta na fragmentação do invólucro nuclear; poli-(adenosina-difosfato)-ribose polimerase (PARP), enzima de reparação do DNA; e a DNase activada que promove a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA.

As caspases efectoras também actuam na degradação de proteínas do citoesqueleto: as proteínas anti-apoptóticas (Bcl2 e Bcl-x_L); as proteínas de sinalização celular, de reparação e de síntese de macromoléculas; a gelsolina; o FAK (*focal adhesion kinase*) e o PAK2 (p21-actived kinase2) (Thornberry and Lazebnik, 1998; Riedl and Shi, 2004).

1.2.6. VIAS DE SIANIZAÇÃO INTRÍNSECA E VIA EXTRÍNSECA

Através dos seus prodomínios, as caspases iniciadoras são recrutadas pelos complexos sinalizadores indutores de morte celular, tanto em resposta à ligação dos receptores da morte da superfície celular (via extrínseca da apoptose) como em resposta aos sinais que têm origem dentro da célula (via intrínseca da apoptose).

[1] Proteína periférica associada à superfície externa da Membrana Mitocondrial Interna.

Via intrínseca.

A via intrínseca é mediada pela mitocôndria em resposta a estímulos apoptóticos sendo que, diversas proteínas são então libertadas para o espaço intermembranar da mitocôndria.

Esta via envolve membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, mais precisamente, elementos da sub-família BH3-only (por exemplo, a Bid, a Bim, a Noxa). Em resposta a um estímulo, comprometem um outro conjunto de membros pró-apoptóticos, a família da Bax, (Bax e Bak), que normalmente se encontram fracamente associados à membrana externa da mitocôndria, prevalecendo maioritariamente no citosol. A interacção entre proteínas das famílias BH3-only e Bax leva à oligomerização dos elementos do último grupo, seguida de inserção na membrana externa da mitocôndria. Estas moléculas passam, então, a constituir canais de saída de proteínas intermembranares desde a mitocôndria até ao citoplasma, incluindo o citocromo c. O citocromo c, uma vez libertado, interactua com uma proteína citoplasmática designada de Apaf-1, a qual recruta e activa a procaspase-9, constituindo um complexo proteico denominado de apoptosoma. Este é uma complexa estrutura com uma simetria de 7 unidades, que provoca a activação da procaspase-9. O apoptossoma, por sua vez, leva a activação da caspase-9, esta na sua função de (caspase iniciadora), irá requerer e activar as caspases-3, -6 e -7 (caspases efectoras), as quais degradarão proteínas importantes para a viabilidade celular.

Por outro lado, a função das caspases efectoras também pode ser modulada por um outro tipo de proteínas, as IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*), que se podem ligar à caspase-9 e inibir a sua actividade de protease, bloqueando a este nível o processo apoptótico. Contudo, também a actividade destas proteínas pode ser regulada por uma outra proteína de nome duplo Smac/DIABLO, a qual, juntamente com o citocromo c, é libertada do espaço intermembranar da mitocôndria durante a apoptose. A Smac/DIABLO associa-se às IAPs e inibe a sua acção, permitindo a activação da caspase-9 a partir do complexo Apaf-1 e,

consequentemente, favorecendo a apoptose (Hikim *et al*, 2003; Riedl and Shi, 2004).

Via extrínseca.

Na via extrínseca da apoptose, por exemplo, a procaspase-8 é recrutada pelo seu DED para o complexo de sinalização indutor de morte celular (DISC), um complexo receptor de membrana que é formado depois da ligação a um membro da família TNFR (*tumor necrosis factor receptor*). Quando ligadas ao DISC, diversas moléculas procaspase-8 estão próximas umas das outras e por consequência estão preparadas para se activar por autoproteolise.

A sinalização extrínseca da apoptose é mediada pela activação dos chamados receptores de morte (*death receptor*, por exemplo, Fas), os quais são receptores de superfície da célula que transmitem sinais apoptóticos após a ligação com ligandos específicos (*death ligand*, por exemplo, FasL). Os receptores de morte pertencem à superfamília TNFR, incluindo TNFR-1, Fas/CD95, e os receptores TRAIL DR-4 e DR-5. Todos os membros da família TNFR são constituídos por subdomínios extracelulares ricos em cisteínas que permitem que reconheçam seus ligandos com especificidade, resultando na trimerização e activação do respectivo receptor de morte (Scaffidi *et al*, 1998). A subsequente sinalização é mediada na porção citoplasmática do receptor de morte o qual contem uma sequência terminal DD. As moléculas adaptadoras tais como FADD ou TRADD possuem os seus próprios DDs, os quais são recrutados pelos DDs do receptor de morte activado, dando forma desse modo ao DISC. Além do seu DD, o adaptador FADD contém também o DED que com a interacção homotípica DED-DED traz a procaspase-8 para o DISC. A concentração local de diversas moléculas procaspase-8 no DISC conduz à sua activação autocatalítica e libertação da caspase-8 activa. A caspase-8 activa processa a jusante as caspases efectoras as quais clivam específicos substratos resultando na morte celular. As células que

possuem a capacidade de induzir directamente as vias de apoptose caspase-dependente são classificadas com células tipo I (Said *et al*, 2004).

Nas células do tipo II, o sinal não é por si só suficiente para desencadear a cascata de caspases de modo a provocar a morte celular. Neste caso, o sinal necessita ser amplificado através das vias apoptóticas dependentes da mitocôndria. A ligação entre a caspase que sinaliza a cascata e as mitocôndrias provem do Bid, membro da família da proteína Bcl-2. O Bid é clivado pela caspase-8 e é truncado (tBid), este é translocado para a mitocôndria onde actua em sintonia com os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, Bax e Bak. Estes induzem a libertação no citosol do citocromo c bem como outros factores pró-apoptóticos mitocondriais. O citocromo c no citosol liga-se a Apaf-1 que por sua vez através de uma mudança do dATP-dependente, oligomeriza para formar-se o apoptosoma. Por sua vez, a caspase-9 activada desencadeia a cascata de caspases que envolve caspases efectoras a jusante tais como caspase-3, caspase-6, e caspase-7 finalmente por fim resulta a morte celular (Hikim *et al*, 2003; Riedl and Shi, 2004; Said *et al*, 2004).

1.2.7. AS MITOCONDRIAS COMO REGULADORES CENTRAIS DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRÍNSECOS DA APOPTOSE

Para além de amplificar e mediar as vias apoptóticas de sinalização extrínseca, as mitocôndrias também têm um papel central na integração e na propagação dos sinais da morte que se originam dentro da célula tal como danificação do DNA, stress oxidativo e drogas quimioterápicas. As condições da indução apoptótica envolvem a desregulação do potencial transmembranar interno da mitocôndria ($\Delta\Psi$) bem como a transição de permeabilidade (PT) e simultaneamente, o aumento do volume da mitocôndria por osmose como resultado do influxo da água na matriz com eventual ruptura da membrana mitocondrial externa, resultando na libertação de proteínas pró-apoptóticas do espaço mitocondrial intermembranar para o citoplasma (Erkkila *et al*, 2001). A libertação de proteínas

e de outros factores provocam a formação do apoptosoma e consequentemente a activação das caspases. Mas existem outros factores, tais como, o apoptose-inducing factor (AIF), a endonuclease (endoG), Smac/Diablo, e Htr/Omi. A PT é seguida sempre pelo ΔΨ, mas o ΔΨ não é causado sempre pelo PT, e a libertação do citocromo c é observada mesmo na ausência de ΔΨ. Além da libertação de factores mitocondriais, a dissipação do ΔΨ e do PT também causam uma perda da homeostase bioquímica celular em que a síntese do ATP é parada, as moléculas redox tais como NADH, NADPH, e a glutationa são oxidadas, aumentando assim a formação de radicais livres de oxigénio (ROS). Níveis elevados de ROS causam a oxidação dos lípidos, proteínas, e ácidos nucleicos, realçando desse modo o rompimento de ΔΨ como parte de um feedback positivo (Green *et al*, 1998; Bernardi *et al*, 1999).

1.2.8. SINAIS INDUTORES DA APOPTOSE

Os sinais indutores da apoptose podem ser de dois tipos, endógenos ou exógenos. No caso dos endógenos, há uma alteração da proporção das proteínas da família Bcl2 que, por consequência, aumenta a permeabilidade da membrana mitocondrial. Dá-se a libertação de proteínas que, por sua vez, induzem a activação da procaspase-9. Este processo deve-se a factores como a exposição em situações de stress, hipoxia, lesões do DNA, drogas, entre outros.

No que diz respeito aos sinais indutores da apoptose exógenos, há um ligando específico indutor de morte celular, que é libertado com o intuito de iniciar o processo apoptótico, dirigido a uma célula-alvo. Neste processo o ligando FasL liga-se a um receptor transmembranar específico, FasR, promovendo a oligomerização dos receptores o que activa as caspases iniciadoras 2, 8 ou 10.

1.2.9. VIA DO FasL-FasR

A família TNFR é um grupo de proteínas transmembranares do tipo I, que contêm repetições de cisteína característicos nos domínios extracelulares. Alguns dos membros da família TNFR que partilham o domínio de morte (DD) na região intracelular são denominados por receptores de morte (DR). Estes incluem Fas/APO-1/CD95, TNFR I, DR3, TRAIL R1/DR4, TRAIL R2/DR5, e DR6 (Runic *et al*, 1998; Chen *et al*, 2002).

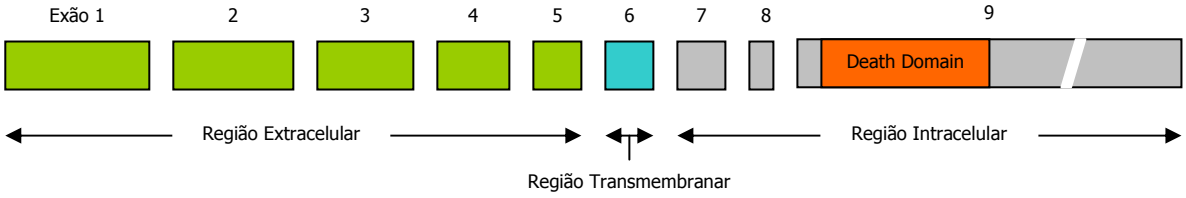


Figura 17: Esquema do gene Fas.

O gene Fas possui nove exões e oito intrões (Fig.17). O exão 1 representa a região 5' não traduzida e o DNA que codifica os 10 primeiros aminoácidos da sequência sinalizadora. A região extracelular da molécula consiste em três domínios ricos em cisteína e é codificada pelos exões 2, 3, 4 e 5. O exão 6 codifica a região transmembranar. Os exões 7 e 8 codificam a porção citoplasmática próxima à membrana, composta por 36 aminoácidos. Os demais aminoácidos que compõem a região citoplasmática (incluindo o domínio de morte) são codificados pelo exão 9, que inclui ainda a região 3' não traduzida (Berhmann, *et al*, 1994).

O Fas é capaz de iniciar a apoptose quando acoplado ao seu ligando, FasL (CD95L), sendo este uma proteína transmembranar do tipo II. A interacção do FasL-Fas provoca a morte das células que expressam o Fas, um processo que está bem estudado nas células linfóides (Lee *et al*, 1997). De particular interesse é o facto de o FasL ser expresso em células com resposta imune privilegiada, tais como o testículo, o olho, a placenta e o cérebro (McClure *et al*, 1999; Eid *et al*, 2002).

A ligação do FasL ao FasR resulta na agregação dos domínios DD dos FasR, sendo recrutado a molécula adaptadora FADD que se liga com seu próprio DD na porção C-terminal, através de interacções homotípicas. São então recrutadas duas proteínas-chave de sinalização, formando o DISC (French *et al*, 1996; Ashkenazi and Dixit, 1998). Entretanto, o FADD recruta a procaspase-8 através de uma outra interacção homotípica de seus domínios efectores de morte (DEDs) (Nagata *et al*, 1997). Dá-se, subsequentemente, a oligomerização que promove a auto-activação da procaspase-8. O FADD, provavelmente activa a procaspase-10 através de um mecanismo similar. A proteína FLIP (FADD-like ICE inhibitory protein) inibe a interacção Fas-FADD-procaspase-8, e por consequência também inibe a apoptose (Wolf and Green, 1999; Esteban *et al*, 2003).

Nos testículos, o sistema Fas está associado à natureza imunitária privilegiada deste órgão. As células de Sertoli que expressam FasL eliminam células T activadas pelo Fas, protegendo assim as células germinativas e impedindo reacções da rejeição no ambiente testicular (Lee *et al*, 1997; Schmelz *et al*, 2002).

1.2.10. VIA DO p53

A proteína codificada pelo cromossoma 17 é denominada por p53 em consequência do seu peso molecular ser de 53 kDa. A sua principal função está relacionada com a preservação da integridade do código genético em cada célula, ou seja, a manutenção da mesma sequência de nucleotídeos ao longo de toda a molécula de DNA igualmente presente em todas as células (Erster *et al*, 2004).

A p53 é uma proteína nuclear que está intimamente envolvida no controle do ciclo celular, reparação e síntese de DNA, diferenciação celular e programação de morte celular. Esta proteína p53 faz uma verificação quanto à eventual ocorrência de uma mutação na sequência do DNA em consequência de um erro de replicação, por isso tem um importante papel na paragem do ciclo celular e na indução da apoptose. Em resposta ao stress celular exercido por hipoxia, à

presença de uma actividade oncogénica ou danos no DNA, os níveis de p53 na célula aumentam.

Pelo facto desta proteína exercer a função de detecção de alterações no DNA e consequente correcção ou morte celular, a proteína p53 é considerada como uma "guardiã do genoma" (Beumer et al, 1998; Müllauer *et al*, 2001).

Em 50 a 60% de todos os tumores, incluindo o cancro testicular, são detectadas mutações do p53. Transformações oncogénicas são suprimidas pela via p53, por apoptose. O p53 é encontrado em altas concentrações nos testículos e tem um importante papel na apoptose nas células germinativas, induzida pela temperatura (Gao *et al*, 2001; Said *et al*, 2004).

O p53 desencadeia a apoptose em resposta aos estímulos de morte, através da activação de genes de transcrição de mecanismos independentes.

Entre os mediadores da via apoptótica induzidos pela p53, estão o Bax, o qual acelera a apoptose através da activação de caspases que alteram a estrutura da mitocôndria (May and May, 1999) e a Fas/APO-1, da família TNFR, que promove transdução de sinal ao ligar-se à proteína DR5, resultando na indução da cascata de caspases que levam à apoptose. Uma outra via para apoptose é mediada pela IGFbp-3, antagonista do IGF-1, que bloqueia a sinalização do factor de crescimento mitogénico (Rotter *et al*, 1993; Sidransky, 1996; Rajah *et al*, 1997; Abe *et al*, 2001).

1.2.11. FAMÍLIA DO Bcl2

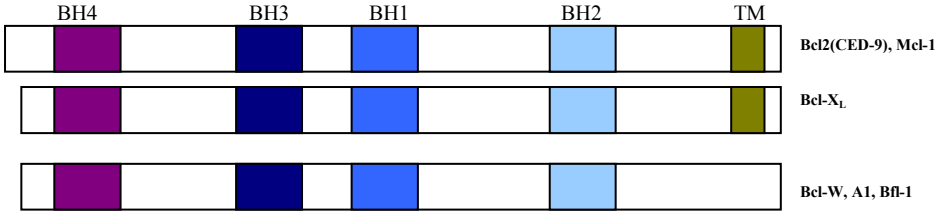
A família Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*) participa na regulação da apoptose por um vasto leque de situações. O Bcl2 codifica uma proteína capaz de bloquear a apoptose induzida por numerosos estímulos. A proteína codificada pelo Bax, em algumas circunstâncias, potencia ou acelera os processos apoptóticos.

A família Bcl2 engloba membros anti-apoptóticos, também denominados por bloqueadores (Bcl2 e Bcl-x_L) e membros pró-apoptóticos ou promotores de apoptose (Bax, Bcl- x_S, Bad, Bak). É a expressão relativa destes dois tipos de genes, que vai determinar o destino das células: vida ou morte.

Estas proteínas localizam-se na superfície da membrana de diferentes organelos, tais como, mitocôndria, retículo endoplasmático, núcleo, entre outros, formando homodímeros (Bcl2/Bcl2 ou Bax/Bax) ou complexos heterodiméricos (Bcl2/Bax).

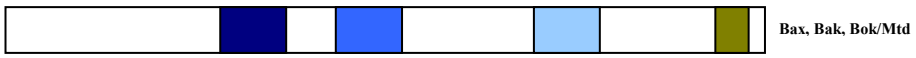
Membros anti-apoptóticos

Família Bcl2



Membros pró-apoptóticos

Família Bax



Família BH3 only

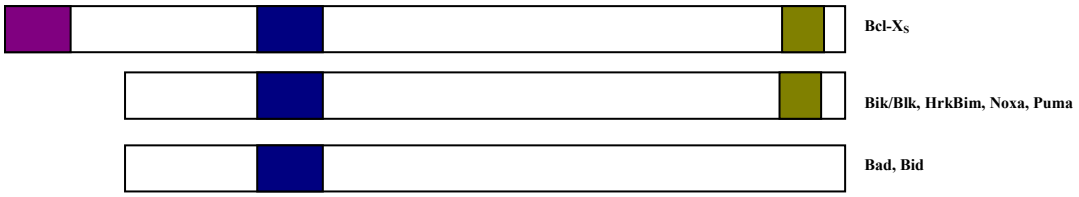


Figura 18: Membros da família Bcl2 (Borner, 2003; Cory and Adams, 2002; Kelekar and Thompson, 1998).

Os elementos da família Bcl2 são estruturalmente semelhantes, pelo que apresentam um elevado grau de homologia em algumas regiões estruturais (Bcl2

homology regions) - BH1 a BH4, estes interactuam entre si e com outras proteínas. A região transmembranar (TM) determina a localização subcelular da proteína (Fig.17). As proteínas que contêm a região transmembranar, do tipo Bcl2, Bcl-x_L e Bax, localizam-se nas membranas intracitoplasmáticas (membrana nuclear, retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias). Quanto às proteínas que não possuem a região transmembranar, por exemplo, Bad e Bid, existem no citosol. Uma vez que, membros da mesma família se localizam em regiões diferentes pode-se concluir que possuem funções e mecanismos diferentes na apoptose, sendo eles bloqueadores ou promotores da apoptose. Por exemplo, tanto o Bcl2 (bloqueador) como o Bax (promotor) têm a região transmembranar (Knudson *et al*, 1995; Cory and Adams, 2002).

Analisando e comparando a estrutura do Bcl-x_L e do Bcl-x_S, pode-se concluir que estes diferem em relação à presença/ausência das regiões BH1 e BH2, pelo que se pode concluir que há interacções proteicas diferentes para os dois tipos de proteínas. Estas diferenças podem ser fulcrais no que diz respeito às suas funções e à regulação da apoptose, tal como se pode ver pelo exemplo acima referido, em que o Bcl-x_L e o Bcl- x_S são respectivamente anti-apoptótico (bloqueador) e pró-apoptótico (promotor) (Krajewski *et al*, 1996).

Os membros anti-apoptóticos.

O Bcl2 e seus homólogos mais próximos, Bcl-x_L e o Bcl-w inibem potencialmente a apoptose, em resposta a várias lesões citotoxicas. O seu domínio hidrofóbico no terminal carboxilo leva à ligação deste ao citoplasma face às três membranas intracelulares: a membrana mitocondrial externa, o retículo endoplasmático (ER) e o invólucro nuclear. Bcl2 é uma proteína integral da membrana, mesmo nas células saudáveis, enquanto que Bcl-w e o Bcl-x_L apenas se associam à membrana após sinais citotóxicos (Sano *et al*, 2000; Cory and Adams, 2002).

A estrutura tridimensional destas proteínas, Bcl-x_L, Bcl2 e Bcl-w, compreende duas α-hélices hidrofóbicas centrais, α5 e α6, rodeadas por cinco α-hélices anfipáticas,

α1, α2, α3 α4 e α7, de tal forma organizadas que as regiões BH1, BH2 e BH3 formam um sulco hidrofóbico (Kelekar and Thompson, 1998). Notavelmente, este sulco pode ligar a α-hélice BH3 a um BH3-only de interacção relativa. No Bcl-w o sulco pode ser ocupado pela sua cauda do terminal carboxilo, tal como o Bax, pelo que o BH3 ligando pode necessitar deslocar a cauda. Quanto ao A1 e ao Mcl1, parecem ter uma actividade mais fraca de sobrevivência e é mais divergente na sequência – o que poderá ser um indicativo de funções adicionais. As células nucleadas requerem a protecção de pelo menos um Bcl2 homologo, cuja abundância destes guardiães regula a homeostase do tecido. A inactivação dos genes homólogos ao Bcl2 leva ao aumento da apoptose (Fig.18) (Cory and Adams, 2002).

Os membros pró-apoptóticos.

O grupo pró-apoptotico da família Bcl-2 pode ser dividida em dois subgrupos: a subfamília Bax, no qual são exemplo Bax, Bak, e Bok, em que todos possuem os domínios BH1, BH2, e BH3, e o grupo BH3-only (Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, Puma, Blk, BNIP3, e Spike) tem somente a região BH3, um domínio de interacção necessário e suficiente para sua acção apoptótica (Fig.18) (Cory and Adams, 2002).

O grupo BH3-only - as proteínas de BH3-only parecem ser sentinelas que são responsáveis pelo desencadear da apoptose em resposta a estímulos do desenvolvimento normal da célula e a danos intracelulares. Com a excepção do Bid, são proteínas que actuam ligando-se e neutralizando os membros da família anti-apoptóticos. Uma pequena alteração no grupo alostérico que é induzida nas a proteínas anti-apoptóticas, pelo acoplamento da proteína BH3, afecta sua associação com outras proteínas (Cory and Adams, 2002).

O Bax/Bak são proteínas essenciais para a permeabilização da membrana mitocondrial externa. Na sua ausência, as proteínas de BH3-only não podem induzir a apoptose (Krajewska *et al*, 1996; Valentijn *et al*, 2004).

As proteínas individuais de BH3-only traduzem sinais específicos de morte, desde que sejam activadas por sinais apoptóticos, tais como, stress da célula, danos do DNA (Noxa e Puma são genes que são induzidos pelo p53), privação do factor de crescimento, ou anoikis[2] (Borner *et al*, 2003; Valentjin *et al*, 2004). Um outro exemplo, o Bid citoplasmático é processado pela caspase-8 na sua forma tBid (truncada), o qual após miristoilação é translocada para a mitocôndria, onde provoca a libertação do citocromo c promovendo a oligomerização de Bax ou Bak (Cory and Adams, 2002; Scorrano *et al*, 2002). Outros, como o Bad, interagem com as proteínas anti-apoptóticas (Bcl2 e Bcl-x_L) e antagoniza a sua função.

O grupo das proteínas BH3-only é o que apresenta uma maior diversidade na família Bcl2. Esta diversidade reflecte-se na sua regulação, e é aqui que se devem procurar as ligações com as vias de sinalização-tradução.

Em geral, as proteínas de BH3-only interferem com o equilíbrio da homo- ou da hetero-oligomerização, entre os membros pró-apoptóticos Bax/Bak e os membros anti-apoptóticos Bcl2/Bcl-x_L (Fig.19). O Bid e o Bim possuem os domínios BH3, que podem desencadear directamente a oligomerização da Bax/Bak, promovendo a libertação do citocromo c e por consequência provocando apoptose (Cory and Adams, 2002). Por sua vez, o Bad e o Bik embora também possuam domínios BH3, não actuam directamente sobre o Bax/Bak; em vez disso, ligam-se aos membros anti-apoptóticos, Bcl-2/Bcl-x_L. Deste modo sensibilizam os domínios BID-Like que induzem a activação dos multidomínios ticos Bax/Bak, libertação do citocromo c e apoptose (Slee *et al*, 1999; Letai *et al*, 2002; Scorrano and Korsmeyer, 2003).

[2] Forma de apoptose que é induzida pela perda de adesão das células ou por adesão inapropriada. A adesão na matrix extracelular é importante para determinar se a célula está na localização correcta e suprimir células deslcadas por apoptose.

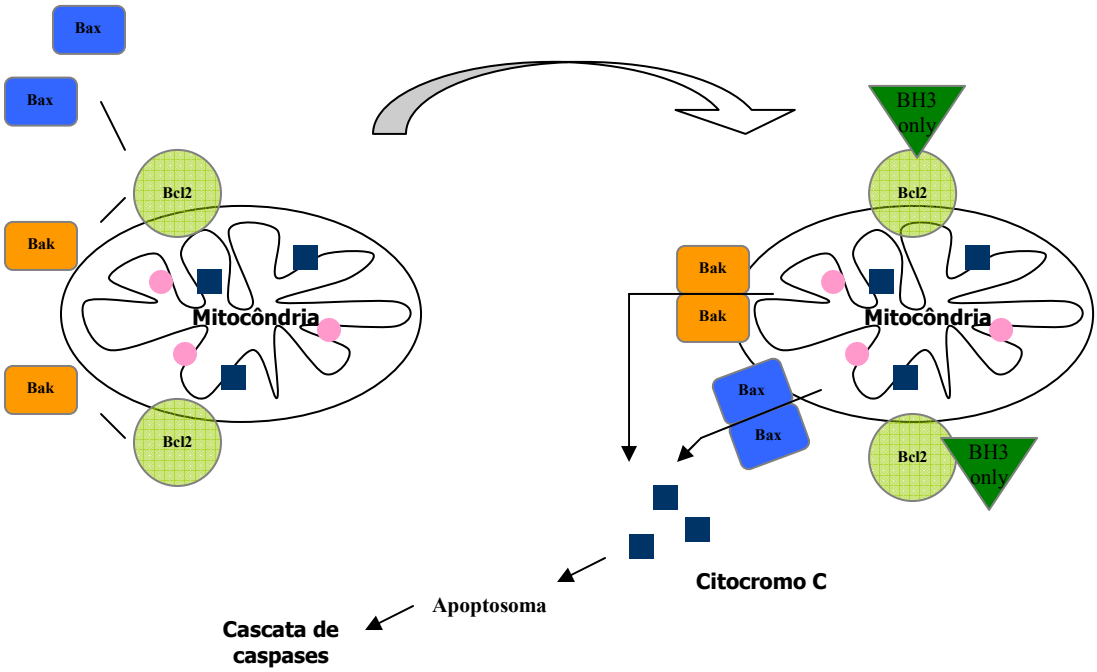


Figura 19: Regulação da apoptose pela família Bcl2.

<u>A família Bax</u> - Bax e Bak são extensamente distribuídos pelo organismo, no entanto a proteína Bok, está mais presente nos tecidos reprodutivos. A inactivação da Bax afecta ligeiramente a apoptose, a destruição da Bak não tem nenhum efeito discernível. Contudo, a inactivação de ambos os genes inviabiliza a apoptose em vários tecidos. Assim, a presença da Bax ou da Bak parece ser essencial para a apoptose na maioria das células. Bax e Bak funcionam principalmente na mitocôndria, contudo também apresentam importantes papéis noutras regiões, como no retículo endoplasmático. A Bax é um monómero citosólico presente em células saudáveis. Contudo, altera a sua conformação durante a apoptose, integrando-se na membrana mitocondrial externa, oligomerizando-se. Existe uma elevada semelhança entre a estrutura tridimensional da Bax com os elementos anti-apoptóticos. Curiosamente, a hélice do terminal carboxilo hidrofóbico de Bax tapa o sulco hidrofóbico formado pelos BH1, BH2 e BH3. Uma vez que o terminal carboxilo é essencial para marcar a mitocôndria, provavelmente a cauda ficará de fora logo depois da células receberem sinais de stress (Cory and Adams, 2002).

A Bak é uma proteína oligomérica que, mesmo em células saudáveis, está presente na membrana mitocondrial, mas também altera a sua conformação durante a apoptose podendo formar grandes agregados (Valentijn *et al*, 2004).

Os oligómeros de Bax e de Bak provocam e/ou contribuem para a permeabilização da membrana mitocondrial externa, permitindo o efluxo de proteínas apoptóticas. Todavia, o mecanismo é controverso. Um dos modelos, que é baseado na semelhança estrutural de membros da família Bcl2, no qual a Bax e a Bak formam canais. Consistente com esta hipótese é o facto de que os oligómeros da Bax formam poros nos liposomas, os quais permitem a passagem do citocromo c (Fig.19). Em alternativa, Bax pode interagir com os componentes já existentes poros de permeabilidade da célula (por exemplo, o voltage-dependent anion channel - VDAC), para criar um canal maior (Cory and Adams, 2002).

A expressão dos genes da família Bcl2 tem como consequência a indução à apoptose. A regulação é efectuada pelo predomínio dos membros da família Bcl2, em formas homodiméricas ou heterodiméricas. O estado de permissividade ou resistência à apoptose resulta de um balanço entre os elementos pró-apoptóticos e os anti-apoptóticos (Fig.20). Pode-se então concluir que se numa reacção houver predomínio de elementos anti-apoptóticos (em homodímeros ou heterodímeros) há resistência à apoptose. Em contrapartida, o predomínio de elementos pró-apoptóticos como o Bax (na forma homodimérica) ou o Bad (na forma heterodimérica) é permissiva à apoptose. As proporções dos membros da família Bcl2 podem ser influenciados por sinais exógenos específicos para a indução da morte celular, bem como por sinais de lesão endógena (Sambade, 1999).

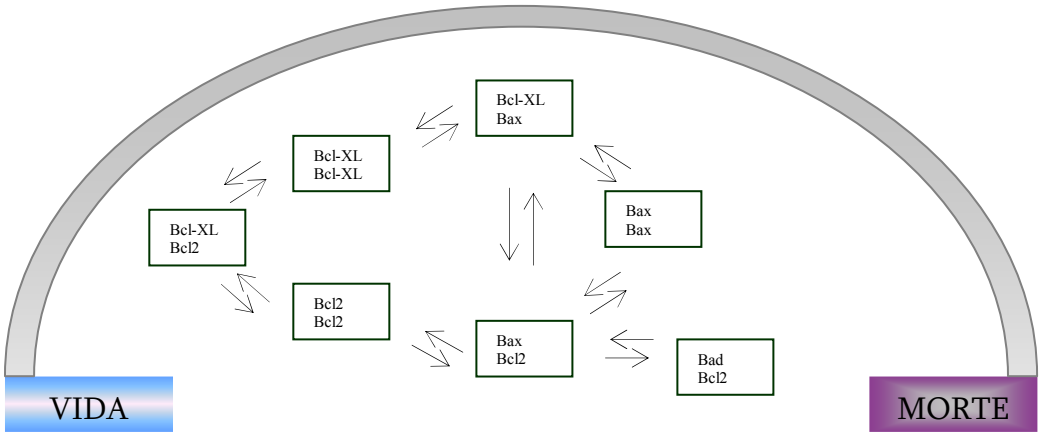


Figura 20: Modelo funcional da família Bcl2.

A função central dos membros da família Bcl-2 devem guardar a integridade mitocondrial e controlar a libertação de proteínas mitocondrial no citoplasma (Cory and Adams, 2002).

Em suma, no modelo actual da forma como os membros da família Bcl2 regulam a apoptose, pode ser descrito da seguinte forma:

1. Stress apoptótico específico desencadeia a activação das proteínas BH3-only;
2. As proteínas BH3-only interactuam com os membros anti-apoptóticos na membrana mitocondrial externa (e também no núcleo e no retículo endoplasmático);
3. Libertação de factores pró-apoptóticos.
4. Bax submete-se a uma mudança de conformação (ajudada pelas proteínas de BH3-only)
5. Inserção na membrana mitocondrial externa onde provocam a transição de permeabilidade (PT) e a libertação de factores apoptóticos. (Borner *et al*, 2003)

Curiosamente, alguns vírus, tais como Epstein–Barr, Peste suína Africana, herpes e o vírus da hepatite têm nos seus genomas genes homólogos para os factores de sobrevivência Bcl-2-like (E1B-19K, BHRF, LMW5-HL and v-Bcl-2-KSHV, respectivamente) mas não para os factores de morte Bax-like ou BH3-only (Cory and Adams, 2002). Assim, eles usam os seus próprios factores de sobrevivência para manter o hospedeiro viável para a formação de descendentes, mas não requerem ao Bax-like ou BH3-only para matar as células após a multiplicação.

1.2.12. REGULAÇÃO DA APOPTOSE POR IAPs

O factor de transição NF-κB para além de ser um regulador central da resposta imune é descrito geralmente como um factor anti-apoptótico de transcrição, embora sob determinadas circunstâncias o NF-κB também pode contribuir positivamente para a indução da apoptose (Lin and Karin, 2003; Said *et al*, 2004; Dufner *et al*, 2005). Para além de induzir a expressão de membros anti-apoptóticos da família das Bcl-2, o NF-κB é também responsável pela activação de outros genes anti-apoptóticos como as IAP's (inhibitors of apoptotics proteins), caspase-8-c-FLIP (FLICE inhibitory protein), A1 (também conhecido por Bf11), TNFR-associated factor 1 (TRAF1) e TRAF2. Como o TRAF1 e o TRAF2 são proteínas adaptadoras requeridas para optimizar a actividade do NF-κB e c-Jun Kinase (Jnk), a sua actividade anti-apoptótica é provavelmente devida à sua habilidade para a aumentar a activação do NF-κB. As outras proteínas anti-apoptóticas podem trabalhar de uma forma coordenada para bloquear a apoptose de variadas formas ao longo da sinalização da cascata apoptótica (Karin and Lin, 2002).

A família dos IAPs é então constituída por proteínas anti-apoptóticas. Muitos dos seus membros, incluindo X-linked (XIAP), c-IAP1, e c-IAP2, revelaram-se potentes inibidores directos de um subgrupo de proteases, caspase 3, 7 e 9. A estrutura do XIAP é caracterizada por três repetições tandem de 70 motivos de aminoácidos (domino BIR), que são essenciais às propriedades anti-apoptóticas (Suzuki *et al*,

2001). A análise à estrutura e função do XIAP revela que a região do XIAP que contém o domínio BIR2 é necessário e suficiente para inibir as caspases 3 e 7, enquanto que o domínio BIR3 é responsável pela inibição da caspase 9 (Huang *et al*, 2000). Os aminoácidos dentro da região de ligação entre os domínios BIR1 e BIR2, revelaram-se essenciais para a inibição da caspase 3. Para além disso, estes resíduos podem ligar-se ao local activo, enquanto que o domínio BIR pode interagir com um local adjacente na caspase 3. No entanto, a inibição da caspase 3 e da 7 pelo XIAP é diferente. A inibição da caspase 3 é competitiva enquanto que a da caspase 7 envolve a inibição tanto competitiva como não-competitiva. A região de ligação entre os domínios BIR1 e BIR2 do XIAP é responsável pela inibição das duas caspases 3 e 7. Contudo, o próprio domínio BIR2 interactua com a região NH2-terminal da caspase 7, uma interacção que contribui para uma inibição não-competitiva pelo XIAP.

Para além dos domínios BIR presentes no c-IAP1, c-IAP2, e XIAP existe também um domínio altamente conservado, o domínio RING. Através deste domínio, o IAPs pode catalizar a sua própria ubiquitização, podendo conduzir outras proteínas, tais como caspase 3 e 7 para ubiquitização e degradação (Huang *et al*, 2000; Suzuki *et al*, 2001). A inibição directa da actividade das caspases pelas IAPs é um importante meio de regulação visto que quando activadas, as cascatas de sinalização de enzimas proteolíticas, tais como as caspases, são irreversíveis. Deste modo, é necessário uma regulação precisa de modo a prevenir uma destruição inapropriada das células.

1.2.13. PRINCIPAIS MÉTODOS DE ESTUDO DA OCORRENCIA DA APOTOSE

Os principais métodos de estudo da ocorrência de apoptose são:

1) Morfologia celular;

2) "DNA laddering", formação de bandas de DNA de múltiplos tamanhos em gel de agarose, decorrente da clivagem internucleossómica do DNA;

3) Identificação de fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática com Anexina V;
4) TUNEL (*TdTmediated deoxyuridine triphosphate nick endlabeling*) que é marcação para identificação de fragmentação de cromatina.
5) Imunohistoquímica.

1.2.14. APOPTOSE/DOENÇAS

A morte celular programada faz parte de diversos processos vitais, como o desenvolvimento embrionário, o controle de tumores e a regulação de populações de células do sistema imunitário. Alterações nos genes responsáveis pela autodestruição podem ser desastrosas. Por ser indispensável à vida, a morte da célula deve seguir um plano meticuloso. Qualquer distúrbio de sua regulação (tanto o excesso quanto a insuficiência) pode provocar uma variedade de doenças (Ishizaki *et al*, 1995; Reijo *et al*, 1996).

A apoptose excessiva pode causar doenças neurodegenerativas (Alzheimer e Parkinson), lesões secundárias após isquemia, retinite pigmentosa e osteoporose. Certas infecções também podem levar à apoptose excessiva: na doença de Alzheimer, os neurónios parecem cometer suicídio precocemente, o que resulta na demência progressiva e irreversível, por perda da cognição e da memória (Rudin *et al*, 1997).

Infecções por bactérias e protozoários também podem provocar a apoptose. Bactérias como *Shigella flexneri* e espécies de *Salmonella*, que causam disenterias, invadem as células e libertam as proteínas IpaB (*S. flexneri*) e SipB (*Salmonella*), que activam a caspase 1 e levam à autodestruição. O protozoário *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, induz apoptose em algumas das células que infecta (não em todas), embora não se conheça o processo em detalhes.

Já a ausência de apoptose, em que a célula se "esquece" de morrer, pode levar a doenças auto-imunes (em que o sistema imune ataca o próprio organismo), infecções virais prolongadas ou tumores. As doenças auto-imunes podem ser geradas por falhas no programa de morte de células T que reagem com substâncias do próprio organismo, ou mesmo após uma reacção de defesa a certos componentes externos muito semelhantes aos internos.

Infecções virais também se podem prolongar pela ausência de apoptose. As células invadidas pelo vírus com frequência param ou reduzem a síntese das próprias proteínas para fabricar as dos invasores. Em geral, isso bastaria para levar à apoptose de muitas células, mas alguns vírus inibem o processo.

Na SIDA, a indução de apoptose em células sadias contribui para a deficiência do sistema imunitário que caracteriza a doença. O vírus da SIDA (HIV) infecta basicamente os linfócitos T *helper*, usando como porta de entrada a proteína de superfície CD4. A "chave" compatível com a CD4 é a proteína virusal gp120. Pessoas com SIDA perdem grande parte desses linfócitos, mas a maioria dos que morrem não parece estar infectada, e foi provado que muitos morrem por apoptose. Estudos recentes sugerem que a gp120 também presente no sangue dos portadores do HIV, activaria o suicídio de células não-infectadas ao ligar-se ao CD4. Interacções entre as proteínas Fas e FasL, cuja produção aumenta durante a infecção, fariam o mesmo. Os linfócitos T citotóxicos, mesmo não tendo a CD4, também são levados ao suicídio, pois dependem de factores de crescimento derivados dos auxiliares para evitar o processo.

Esta é uma pequena amostra de como uma falha mínima no programa de morte que toda a célula carrega pode levar a uma doença e, às vezes, à morte do indivíduo. Mas é suficiente para justificar todo o esforço realizado para que cada participante, cada etapa e cada arma do misterioso suicídio celular sejam revelados. Qualquer descoberta é importante para a criação de novas terapias e

métodos de prevenção, que poderão evitar ou tratar com sucesso inúmeras doenças hoje incuráveis (Cohen, 1997; Mullauer *et al*, 2001).

1.3. APOPTOSE NA ESPERMATÓGENESE HUMANA

Ao contrário do que se verifica nos roedores, o período pós-natal e antes da puberdade, nos humanos, é caracterizado por níveis muito baixos de apoptose no epitélio seminal masculino (Erkkila *et al*, 1997)

Devido à presença de FSH, apenas na puberdade se verifica a activação dos mecanismos apoptóticos. Ao que parece a apoptose tem aqui um papel fundamental e poderá resultar numa perda de até 75% do número potencial de espermatozóides maduros (Bartke, 1995; Billig *et al*, 1995; Holdcraft and Braun, 2004).

Nos humanos, a apoptose envolve as quatro classes da linha germinativa, isto é, espermatogónias, espermatócitos, e espermatídeos e espermatozóides (Hikim *et al*, 1999). A incidência de apoptose espontânea nas células germinativas varia com a etnia. Por exemplo, a incidência de apoptose nas espermatogónias, espermatócitos e espermatídeos é superior em homens chineses em comparação como os caucasianos, embora nos espermatócitos esta diferença não seja tão significativa. É de salientar, que tanto nos testículos como noutros tecidos a apoptose que ocorre espontaneamente foi durante muito tempo menosprezada, uma vez que as células apoptóticas desaparecem rapidamente devido ao eficiente papel promovido por fagocitose, pelas células de Sertoli (Hikim et al, 1999). As células de Sertoli desempenham papéis importantes na espermatogénese. Com efeito, além da sua intervenção na formação da barreira hemato-testicular, fornecem o suporte estrutural e metabólico necessário às células germinativas e controlam a nutrição das mesmas durante a espermatogénese, dado o seu íntimo contacto que com elas estabelecem. Desde que as células de Sertoli foram reconhecidas como células sem capacidade para renovação e capazes de suportar um determinado número de células germinativas, verificou-se que o número destas é limitado. Por consequência, a morte das células germinativas, pelo menos durante o desenvolvimento, ocorre muito provavelmente a fim de limitar o número

das células germinativas por forma a que as células de Sertoli tenham capacidade de ter o seu papel de suporte (Dirami *et al*, 1995; Rodriguez *et al*, 1997).

Segundo Pentikainen, as células germinativas podem ser inibidas por bloqueamento da interacção entre Fas-FasL, presente nas células germinativas. Pelo que o sistema de Fas-FasL tem um importante papel na regulação da apoptose nas células de germinativas no testículo humano. O FasL expresso pelas células de Sertoli liga-se ao Fas das células germinativas, provocado a sua morte (Pentikainen *et al*, 1999).

Em testículos de roedor, a apoptose induzida pelo FasL foi sugerida como um dos mecanismos que limita o número de células germinativas durante a espermatogénese normal ou depois de lesões testiculares, tais como a exposição à radiação ou à administração de substâncias, tais como o MEHP (mono-(2-ethylhexyl)phthalate) e 2,5-HD (2,5 hexanedione) (Blanchard *et al*, 1996; Lee *et al*, 1997; Blanco-Rodrígez *et al*, 1999). Estudos recentes mostraram que no testículo humano a apoptose é um notável evento durante a espermatogénese, em que a interacção do Fas-FasL está intimamente envolvida neste evento (Kim *et al*, 2006).

Apesar de se saber que o Fas, o FasL, e a caspase-3 estão envolvidos na patogénese de múltiplas patologias andrológicas, como o parâmetro anormal do esperma, torção testicular, varicocelo, e os tumores de células germinativas, pouco se sabe sobre os seus papéis nos testículos humanos com apoptose anómala (Kim *et al*, 2001; Kim *et al*, 2006).

Segundo Kim, nos casos de Síndrome de células de Sertoli (SCO), a imuno-marcação da caspase-3 activa ocorre essencialmente no citoplasma de células de Sertoli, pelo que sugere fortemente a possibilidade destas se submeterem à apoptose. Contudo, serão necessários mais estudos para avaliar o relacionamento entre a apoptose das células de Sertoli e a depleção das células germinativas em

SCO. Embora a expressão de Fas e FasL em células de Leydig tenha sido observada em todos os testículos de espécimes diferentes, não foi detectada apoptose nessas mesmas células observadas em tecido testicular normal.

Considerando que a expressão de FasL nas células de Sertoli desencadeia a eliminação por apoptose das células germinativas que expressam Fas, Kim sugere que a alta expressão de FasL em células de Sertoli e a elevada activação da caspase-3 pode estar associada com a alteração da maturação das células germinativas na maturation arrest (MA) e com a depleção das células germinativas em SCO. (Kim *et al*, 2006)

A apoptose pode também servir para eliminar células germinativas com DNA alterado (Rodriguez *et al*, 1997). Durante o período em que os espermatócitos se encontram na fase de meiose, a apoptose ocorre para controlar a qualidade do equilíbrio do sistema ou como checkpoint durante o processo de sinapse cromossómica. Este sistema de controlo é pensado para reconhecer o desemparelhamento da cadeia dupla do DNA, nos cromossomas onde não ocorreu a sinapse durante a metafase, por este motivo a apoptose é induzida nas células afectadas. Embora o DNA alterado seja indutor de apoptose, este poderá não ser o único. O controlo da indução da apoptose nas células germinativas durante a meiose, parece ser regulado também pelo p53. Este é o maior regulador de apoptose em resposta ao DNA danificado nas células e é altamente manifestado nos espermatócitos em paquíteno (Blanco-Rodrígez *et al*, 1998; Beumer *et al*, 1998).

A apoptose nas células germinativas está associada a patologias, tais como a infertilidade, o criptorquidismo, e torções do testículo (Dunkel *et al*, 1997).

A acção competitiva dos membros pro- e anti-apoptóticos da família Bcl-2 regula a activação das caspases que por consequência interferem na célula (Yan *et al*, 2000). Assim, níveis elevados dos membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, Bax

e Bak, em relação aos membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, estão associados à apoptose das células germinativas durante o seu desenvolvimento e conduzindo a um desequilíbrio na fertilidade. Para além disso, o membro anti-apoptótico da família Bcl-2, o Bcl-w, aparece como um importante factor de sobrevivência para células de Sertoli, espermatogónias, e espermatócitos (Yan *et al* l, 2000). O seu défice leva a uma alteração da espermatogénese, em que as células de Sertoli as de células germinativas são afectadas (Print *et al*, 1998).

Entre as caspases identificadas nos seres humanos, a caspase-3 é provavelmente a que se encontra mais correlacionada com a apoptose (Krajewska *et al*, 1997).

A apoptose envolve a estimulação de uma complexa sinalização em cascata, que em última analise conduz à activação das caspases, em que a caspase 3 activa uma deoxiribonuclease, que é responsável pela clivagem característica observada nos núcleos das células apoptóticas (Tesarik *et al*, 1998; Kim *et al*, 2001; Abend *et al*, 2004).

A caspase-3 reside inicialmente no citosol, implicando que seja transportada para o núcleo durante o apoptose de forma a aceder aos substratos nucleares. Através de estudos imunohistoquímicos a caspase-3 aparece distribuída uniformemente por todo o citosol da maioria de células que produzem esta protease. Entre alguns exemplos, a caspase-3 aparece marcada imunologicamente nos núcleos das células das células germinativas, células da mucosa gástrica, células do tecido epitelial do cólon, células do tecido epitelial da traqueia, os pneumócitos tipo-II, e tecido epitelial da próstata (Krajewska *et al*, 1997).

2. OBJECTIVO

A apoptose nas células germinativas é essencial no desenvolvimento da espermatogénese e a sua desregulação poderá levar à infertilidade masculina. Assim, a compreensão das causas e do próprio mecanismo será de elevada importância na prevenção de problemas que daí poderão advir.

Ao longo dos anos, foram feitos alguns avanços neste tema, contudo os estudos foram essencialmente feitos em animais.

Tendo em consideração as especificidades da nossa espécie, este estudo foi efectuado em epitélio germinal masculino.

As caspases são proteases que desempenham um papel central na apoptose. A caspase mais a montante neste processo é a caspase 8, esta é seguida da activação da caspase 3. A caspase 3 é considerada a maior caspase executora neste processo.

Uma vez que a caspase 3 tem uma elevada importância no mecanismo apoptótico, foi dedicada esta analise em primeiro lugar a esta protease, sendo de grande importância continuar no futuro o estudo das restantes caspases.

No presente estudo, foi analisada na linha germinativa a presença da actividade da caspase-3 activada no epitélio germinal masculino.

Os objectivos deste trabalho são:

- Quantificar o número de células com caspase 3 activa no epitélio germinal masculino após ter sujeito o tecido à respectiva marcação;
- Fazer uma análise estimativa da quantidade de células com caspase 3 activa no túbulo seminífero e extrapolar para o testículo;

- Inferir quanto à influência da caspase 3 activa na linha germinativa do epitélio germinal masculino.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. POPULAÇÃO

A amostra incluiu 6 pacientes, dos quais 4 com Azoospermia Obstrutiva (1 CBAVD, 1 Vasectomia, 2 Obstrução Inflamatória dos Epidídimos), 1 com Ejaculação Retrógrada e 1 submetido a Orquidectomia por motivo de alteração do sexo.

3.2. RECOLHA E PROCESSAMENTO DAS BIÓPSIAS TESTICULARES

As amostras foram colhidas e processadas para diagnóstico Anatomopatológico da situação de Azoospermia. As biópsias foram fixadas, imediatamente após a colheita, em 4% Paraformaldeído (Paraformaldeido puríss. DAC, Merck, Darmstadt, Germany) em tampão PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA), pH 7.2, durante 6 a 12 horas, à temperatura ambiente (RT). Seguidamente foram colocadas a 4ºC, overnight. Após lavagem (2x30 min) em PBS, seguiu-se a desidratação recorrendo a uma série ascendente de álcoois (Etanol absoluto p.a, Merk): 70º, 90º, 100º(I), 100º(II), 100º(III), 100º(IV), em banhos de 30 minutos cada. Posteriormente, foram imersas numa mistura de Etanol e Xilol (1:1), 30 minutos e finalmente em Xilol (Merck) (2x1 hora).

A impregnação foi realizada numa solução de Xilol e Parafina (1:1) durante 1 hora e por fim em Parafina (Parafina vertível, ponto de solidificação aprox. 56-58ºC, Ph Eur,BP, Merck) (2x1 hora).

A inclusão foi feita em Parafina em moldes de inclusão (Peel-A-Way, Valley Road Warrington - PA, USA). Este procedimento foi executado junto a uma fonte de calor, para que a parafina não solidificasse. A Parafina foi colocada no molde e incluiu-se a amostra deixando-a cair aleatoriamente. De seguida colocou-se o respectivo número de registo e deixou-se solidificar à temperatura ambiente (Anexo 1).

3.3. TRATAMENTO DAS LÂMINAS COM VECTABOND

As lâminas pré-lavadas (SuperFrost, Menzel, Braunschweig, Germany) foram imersas em Acetona (Acetona p.a, Merck) durante 5 minutos e, depois de escorridas, colocaram-se na solução Vectabond Reagent (Vector Laboratories, Burlingame, USA) durante 5 minutos (7ml Vectabond Reagent + 350ml Acetona, para 500 lâminas). Deixou-se escorrer e eliminou-se o excesso de reagente imergindo em água destilada durante 30 segundos. Colocaram-se num suporte metálico para lâminas e após secagem na estufa a 37ºC, durante 24 horas, guardaram-se em caixas opacas até à sua utilização (Anexo 2).

3.4. CORTES HISTOLÓGICOS

Realizaram-se 10 cortes histológicos seriados de cada bloco (um bloco por paciente), com espessura de 3 µm, num micrótomo manual de Minot (American Optical, USA), utilizando uma lâmina de aço (S35,FEATHER, Koln, Germany). Com a ajuda de um pincel, os cortes foram colocados numa tina com água fria e recolhidos nas lâminas previamente tratadas com Vectabond Reagent (Vector Laboratories). De seguida, as lâminas foram imersas num banho-maria (água aproximadamente a 50ºC), de modo a distender a secção. Recolheram-se cuidadosamente os cortes nas lâminas e colocaram-se num suporte de secagem. Deixaram-se na estufa a 37ºC durante a noite (Anexo 2).

3.5. COLORAÇÃO HEMALÚMEN-EOSINA

O primeiro corte de cada bloco foi corado com Hemalúmen – Eosina, para confirmar que as células se encontravam intactas, conferir que o processamento das amostras não danificou os túbulos seminíferos e verificar a constituição dos mesmos. Para se proceder à coloração das lâminas, estas foram previamente desparafinadas num banho de Xilol durante 10 minutos, rehidratadas com uma série de álcoois (Etanol absoluto, 90º, 70º,50º - 3 minutos cada) e, finalmente, foram mergulhadas em água destilada durante 5 minutos. Para a coloração dos

núcleos, as lâminas foram imersas em Hemalúmen (Hemalúmen Mayer para microscopia, Merck), durante cerca de 10 minutos. De seguida foram lavadas em água corrente durante 10 minutos, por forma a retirar o excesso de hemalúmen. Seguiu-se a imersão em Eosina (solução aquosa a 0,5%), para a coloração citoplasmática, durante 3 minutos e procedeu-se à lavagem rápida em água destilada. Depois deste passo, seguiu-se a desidratação, onde foi utilizada uma série ascendente de álcoois: Etanol 50º,70º, 90º, 95º, 100º(I), 100º(II) e Xilol, em banhos de 3 minutos cada. Seguiu-se a montagem em Entellan (Novo Entellan meio de montagem rápido para microscopia, Merck).

Um segundo corte foi corado apenas com Hematoxilina (Vector Laboratories) (Anexo 2).

3.6. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Após desparafinação (Xilol - 3x3min) e rehidratação na série descendente de álcoois (Etanol absoluto - 2x3 minutos, Etanol 95º – 3 minutos, Etanol 70º – 3 minutos, Etanol 50º – 3 minutos) e água destilada (3 minutos), bloquearam-se as peroxidases endógenas com peróxido de hidrogénio (Hydrogen Peroxide 30%, Merck) a 3% em água destilada, durante 10 minutos. De seguida, lavou-se em água destilada (2x5min) e posteriormente em tampão de lavagem (0.1%Tw20/PBS) (Large Volume Tween 20, Lab Vision Corporation Fremont, Califórnia, USA) durante 5 minutos. Seguiu-se uma incubação durante 1 hora em soro normal de cavalo (Vectastain Elite ABC Kit Universal, Vector Laboratories), numa diluição 5% em tampão de lavagem, para bloquear os locais reactivos inespecíficos. As preparações foram então incubadas overnight, com anticorpo primário para a caspase-3 activa (Caspase-3, R&D Systems, Minneapolis, USA), a 4°C, em câmara escura húmida. Após a incubação os cortes foram lavados em tampão de lavagem (0.1%Tw20/PBS) durante 3x5 minutos. De seguida, as lâminas foram incubadas com um anticorpo secundário biotinilado (Vectastain Elite ABC Kit Universal, Vector Laboratories) durante 30 minutos à temperatura

ambiente. Seguiu-se nova lavagem em tampão de lavagem (0.1%Tw20/PBS) durante 3x5 minutos, após a qual as lâminas foram incubadas com o complexo ABC Elite ABC Kit Universal, Vector Laboratories) durante 30 minutos. O complexo avidina-biotina (ABC) é um método indirecto de visualização do anticorpo primário, tendo a capacidade de localizar antigénios em baixas quantidades. Foi feita nova lavagem com tampão de lavagem (0.1%Tw20/PBS) durante 3x5 minutos. Para demonstrar a imunomarcação, utilizou-se o tetrahidrocloridro de 3,3-diaminobenzina (DAB, Sigma) como cromogénio. De seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada durante 4 minutos. A coloração nuclear foi efectuada por coloração com Hematoxilina de Mayer (Vector Hematoxylin, Vector Laboratories). Todas as incubações decorreram à temperatura ambiente com excepção da incubação com o anticorpo primário. Finalmente, desidrataram-se as lâminas numa série ascendente de álcoois (Etanol 70º - 2 minutos, Etanol 96º - 2x2 minutos, Etanol 100º - 2x2 minutos, Etanol 100º e Xilol (50:50) - 2 minutos e Xilol - 2x2 minutos) e montou-se em Entellan (Novo Entellan meio de montagem rápido para microscopia, Merck) à temperatura ambiente (Anexo 2).

3.7. ANÁLISE ESTEREOLÓGICA

Os cortes foram observados em microscopia de luz (Leitz DMR – Leica, Ref: 515343, Germany), com captação de imagem por uma câmara digital (Leica, Modelo: DFC480 – R2, Serial Number: 87272305.0, Germany), controlada por software apropriado (Leica Image Manager 50 (IM50), Switzerland), instalado num "desktop" (Processador Intel Pentium 4, com sistema operativo Microsoft Windows XP Professional).

Foi aplicada uma abordagem estereológica em tempo real sobre as imagens captadas e mostradas num monitor TFT de 17' (Marca LG, operado com uma resolução de 1280 por 1024). A mesma visou estimar as densidades volumétricas (V_V) dos seguintes tipos celulares: células de Sertoli; espermatogónias; espermatócitos primários; espermatócitos secundários; e espermatídeos redondos

nos túbulos seminíferos e nos volumes totais testiculares. O parâmetro V_V corresponde à % do volume total de um qualquer espaço de referência definido pelo operador (por exemplo, o túbulo seminífero), ocupado por uma qualquer estrutura incorporada nesse espaço (por exemplo, células de Sertoli). Assumindo uma retracção homogénea, e considerando a natureza comparativa do estudo, cada V_V foi estimado de uma forma não-enviesada, aplicando uma técnica clássica de contagem manual de pontos (Howard and Reed, 1998), usando-se para tal uma grelha multi-sistema (Anexo 3) colocada sobre a imagem e inserindo o resultado das contagens na seguinte fórmula geral:

$$V_V \text{ (estrutura, referência)} = (\sum P\text{(estrutura)} \times 100) \div (R \cdot \sum P\text{(referência)}),$$

na qual "$\sum$P(estrutura)" é o número total de pontos sobre um componente de interesse, contado tendo em conta todos os campos amostrados num individuo, "$\sum$P(referência)" corresponde ao total de pontos no espaço de referência e "R" corresponde à razão entre pontos, considerando o sistema de pontos usados ora para as estruturas (células alvo) ora para o espaço de referência. Conforme o parâmetro, o espaço de referência foi o túbulo seminífero ou o testículo.

Para a estimativa V_V (célula, túbulo seminífero), o estudo foi feito em objectiva de imersão, de 100X, amostrando-se sistematicamente todos os campos possíveis, por controlo manual dos movimentos da platina, da "esquerda para a direita" e "de cima para baixo", tendo em conta a imagem observada / projectada.

De modo a estimar o volume total de cada tipo celular (V (célula)) no testículo, foi feito um estudo em "multi-cascata", baseado nas seguintes computações:

$$V_V \text{ (célula, biópsia)} = V_V \text{ (célula, túbulo seminífero)} \times V_V \text{ (túbulo seminífero, biópsia)}$$

e

$$V \text{ (célula)} = V_V \text{ (célula, biópsia)} \times V\text{(biópsia)},$$

sendo que o volume total de cada biópsia foi estimado por deslocamento de fluído, antes de se proceder ao seu processamento para microscopia (Anexo 4).

O V_V (túbulo seminífero, biópsia) foi estimado por uma contagem de pontos feita directamente ao microscópio, sem captação de imagem digital, usando objectiva de baixa ampliação (10 x) e inserindo-se, numa das oculares, uma grelha de pontos multi-sistema de vidro (Integrationsplatte II, 100/25, Carl Zeiss) (Howard and Reed, 1998) (Anexo 5).

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o programa estatístico SPSS, para Windows (v. 14.0). Após análise descritiva dos resultados, foram criados dois grupos de estudo. O grupo Controlo, onde se incluíram o paciente com ejaculação retrógrada e o paciente que se submeteu a orquidectomia por motivo de alteração de sexo e o grupo com Azoospermia Obstrutiva, integrando os pacientes com azoospermia obstrutiva secundária e CBAVD.

Após contabilização ao microscópio, a significância das diferenças encontradas, entre grupos, para a presença de células com caspase-3 activa, foi calculada através do teste t-Student (teste paramétrico), com um intervalo de confiança de 95%, visto que pretendemos fazer uma comparação entre dois grupos de uma amostra biológica, pelo que regra geral é uma distribuição Normal.

Numa outra perspectiva, foi tido em consideração que a amostragem tem um número baixo de indivíduos e que foi feita uma comparação de dois grupos independentes. Utilizou-se paralelamente à análise acima citada, uma análise não-paramétrica, recorrendo ao teste de Mann-Whitney U. É de salientar, que quando ambos os testes deram resultados significativos, aceitou-se que há uma diferença significativa. Quando apenas o teste t-Student foi significativo, então considerou-

se a diferença encontrada como marginalmente significativa. Aceitou-se a hipótese nula, em definitivo, quando ambos os testes foram não-significativos.

4. RESULTADOS

No presente trabalho, foi estudada a presença de caspase-3 activa na linha germinativa do epitélio masculino. Para isso foi efectuado um estudo exaustivo recorrendo a análise estatística envolvendo seis pacientes (Tabela 2).

Tabela 2: Discriminação dos pacientes versus patologia que lhe está associada.

Paciente	Patologia
A	Agenesia Bilateral dos Canais Deferentes (CBAVD)
B	Azoospermia obstrutiva secundária por Vasectomia
C	Azoospermia obstrutiva secundária por obstrução inflamatória dos epidídimos
D	Ejaculação Retrógrada
E	Azoospermia obstrutiva secundária por obstrução inflamatória dos epidídimos
F	Orquidectomia por motivo de alteração de sexo

4.1. HOMOGENEIDADE DAS AMOSTRAS

Analisou-se o coeficiente de variação (CV) de três grupos inicialmente organizados - Grupo 1/2: 1. Azoospermia obstrutiva (CBAVD, Azoospermia obstrutiva secundária) / 2. Controlo (Ejaculação Retrógrada, Orquidectomia); Grupo 3/4: 3. Azoospermia obstrutiva (CBAVD, Azoospermia obstrutiva) e Ejaculação Retrógrada / 4. Orquidectomia e Grupo 5/6: 5. Azoospermia obstrutiva secundária / 6. Azoospermia obstrutiva primária (CBAVD), Ejaculação Retrógrada e Orquidectomia, que nos permitiu inferir quanto à homogeneização da amostra (Anexo 6). Os grupos 1/2 e 5/6 foram os que apresentaram coeficientes de variação mais baixos e mais próximos de 0,25 (homogeneidade ideal). No entanto, optamos pelo grupo 1/2 por corresponder idealmente ao grupo obstrutivo e o grupo controlo (Tabela 3) (Anexo 7).

Dentro do grupo obstrutivo, foram incluídos os pacientes A, B, C e E, ou seja, o paciente com Agenesia Bilateral dos Canais Deferentes e os com Azoospermia obstrutiva secundária. No grupo controlo, incluíram-se os pacientes D e F, ou seja, o paciente com Ejaculação Retrógrada e o que foi submetido a uma Orquidectomia por motivo de alteração de sexo (Anexo 8).

Tabela 3: Valores do coeficiente de variação para os três grupos.

		Grupos						
		Todos	1	2	3	4	5	6
Coeficiente de Variação	V_V (SC+,Túbulo)	0,34	0,19	0,25	0,25	0,00	0,22	0,38
	V_V (SC-,Túbulo)	0,59	0,71	0,56	0,67	0,00	0,73	0,54
	V_V (SG+,Túbulo)	1,15	1,06	1,04	1,01	0,00	0,59	1,20
	V_V (SG-,Túbulo)	0,68	0,67	0,44	0,63	0,00	0,42	0,79
	V_V (ST1+,Túbulo)	0,55	0,54	0,78	0,50	0,00	0,43	0,53
	V_V (ST1-,Túbulo)	0,23	0,29	0,03	0,26	0,00	0,36	0,03
	V_V (ST2+,Túbulo)	0,88	0,93	0,98	0,77	0,00	1,09	0,78
	V_V (ST2-,Túbulo)	0,81	0,89	0,86	0,73	0,00	1,04	0,60
	V_V (Sa+,Túbulo)	0,48	0,40	0,80	0,48	0,00	0,48	0,59
	V_V (Sa-,Túbulo)	0,90	0,73	1,05	0,74	0,00	0,58	1,22

1. Azoospermia obstrutiva (CBAVD, Azoospermia obstrutiva) / 2. Controlos (Ejaculação Retrógrada, Orquidectomia)
3. Azoospermia obstrutiva (CBAVD, Azoospermia obstrutiva) e Ejaculação Retrógrada / 4. Orquidectomia
5. Azoospermia obstrutiva secundária / 6. Azoospermia obstrutiva primária (CBAVD), Ejaculação Retrógrada e Orquidectomia

4.2. ESTEREOLOGIA

Na análise estereológica foi feita a estimativa V_V (célula, túbulo seminífero) em objectiva 100X, onde o V_V corresponde à percentagem (%) de volume total do espaço ocupado pela célula no túbulo seminífero.

Começou-se por estimar o volume total de cada tipo celular (V (célula)) no testículo. Para isso foi feito um estudo em "multi-cascata", baseado nas seguintes computações:

$$V_V \text{ (célula, biópsia)} = V_V \text{ (célula, túbulo seminífero)} \times V_V \text{ (túbulo seminífero, biópsia)}$$

e

$$V \text{ (célula)} = V_V \text{ (célula, biópsia)} \times V \text{ (biópsia)}.$$

Para estimar a densidade volumétrica dos diferentes tipos celulares (células de Sertoli, espermatogónias, espermatócitos primários, espermatócitos secundários e espermatídeos redondos) (Fig.21 a 26) nos túbulos seminíferos e no volume total testicular foi efectuada a respectiva contagem dos pontos em tempo real

utilizando a grelha multi-sistema (Fig.27) que foi colocada sobre a imagem do monitor (Anexo 11).

Figura 21: Imunohistoquímica para a caspase 3 activa no paciente com Agenesia Bilateral dos Canais Deferentes (CBAVD). Pormenor de uma espermatogónia marcada (1) e não marcada (2) (Objectiva 100X).

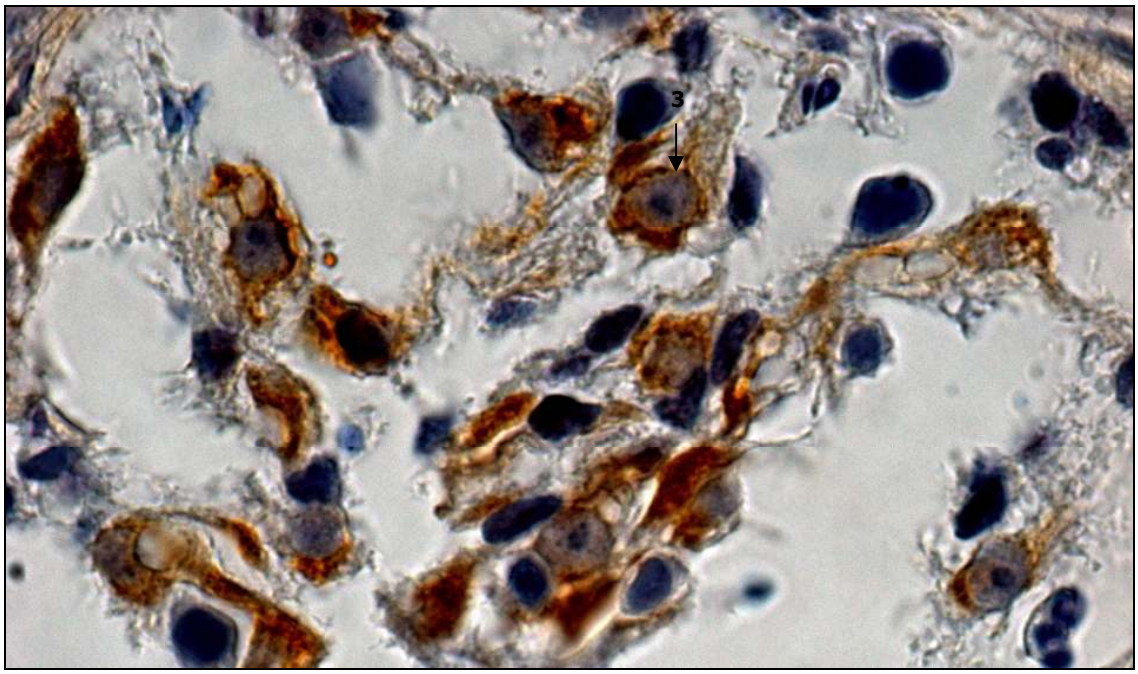


Figura 22: Imunohistoquímica para a caspase 3 activa no paciente submetido a orquidectomia por motivo de alteração de sexo. Pormenor de células descamadas intensamente marcadas (3) (Objectiva 100X).

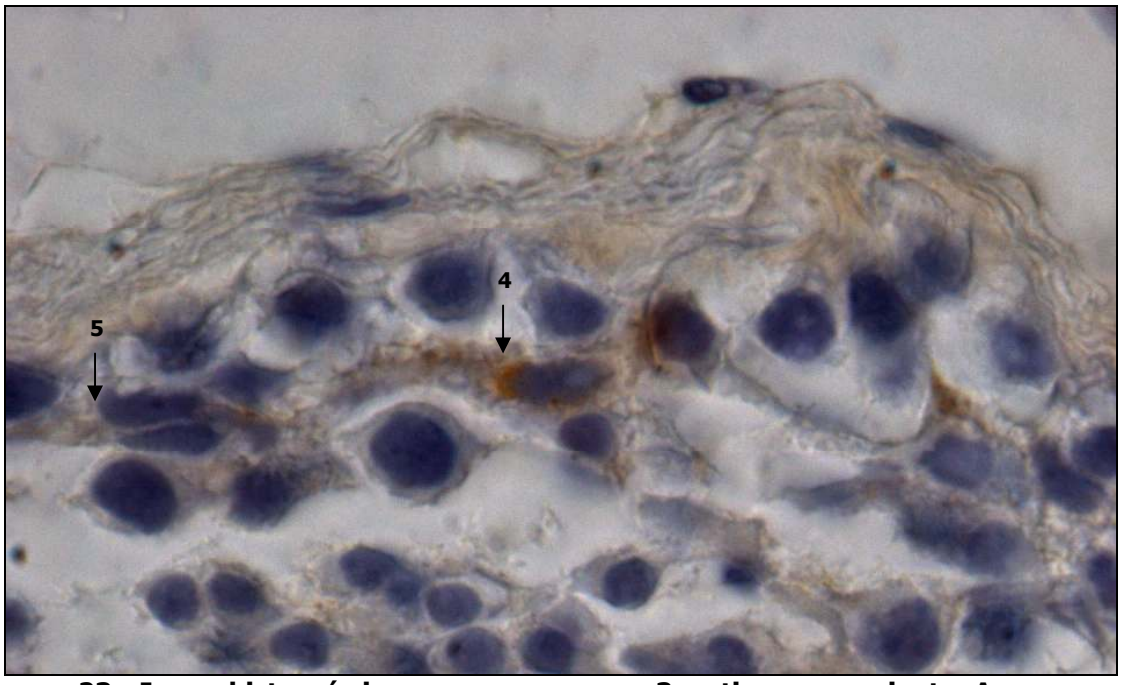


Figura 23: Imunohistoquímica para a caspase 3 activa no paciente Azoospermia obstrutiva secundária por Vasectomia. Pormenor de uma célula de Sertoli marcada (4) e de uma célula de Sertoli não marcada (5) (Objectiva 100X).

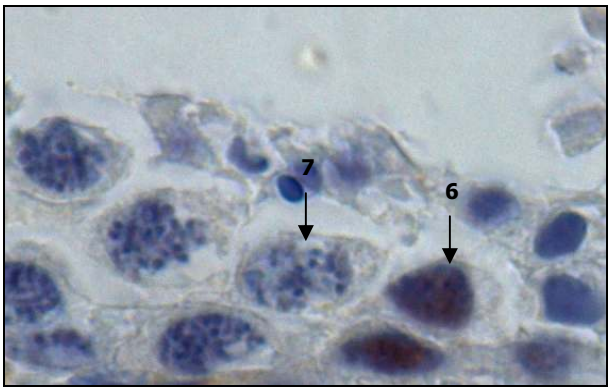


Figura 24: Imunohistoquímica para a caspase 3 activa no paciente com Agenesia Bilateral dos Canais Deferentes (CBAVD). Pormenor de um espermatócito primário marcado (6) e de um espermatócito primário não marcado (7) (Objectiva 100X).

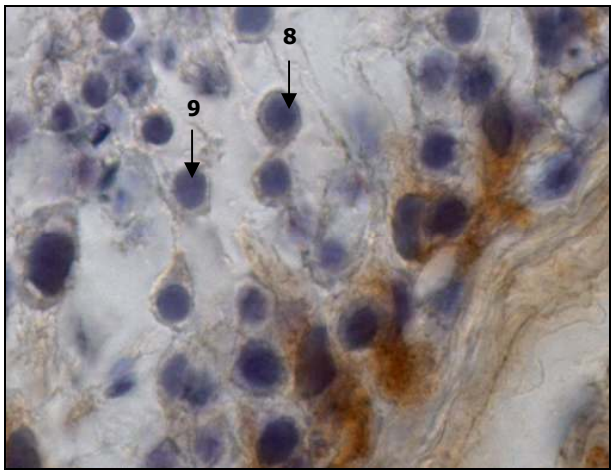


Figura 25: Imunohistoquímica para a caspase 3 activa no paciente Azoospermia obstrutiva secundária por Vasectomia. Pormenor de um espermatócito secundário marcado (8) e de um espermatócito secundário não marcado (9) (Objectiva 100X).

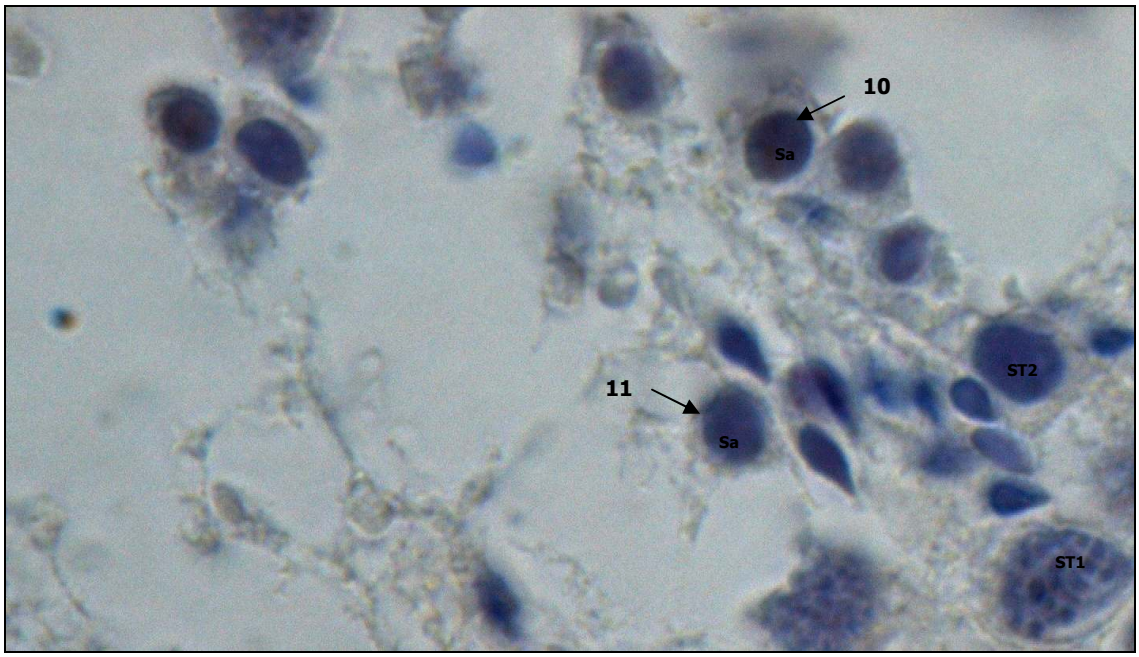


Figura 26: Imunohistoquímica para a caspase 3 activa no paciente com Agenesia Bilateral dos Canais Deferentes (CBAVD). Pormenor de um espermatídeo redondo marcado (10) e de um não marcado (11). Espermatócitos primário (ST1), espermatócitos secundário (ST2), espermatócito redondo (Sa) (Objectiva 100X).

O resultado das contagens foi submetido à seguinte fórmula geral:

$$V_V \text{ (estrutura, referência)} = (\sum P(\text{estrutura}) \times 100) \div (R \cdot \sum P(\text{referência})),$$

em que "$\sum$P(estrutura)" é o número total de pontos sobre um componente de interesse, contado tendo em conta todos os campos amostrados num indivíduo, "$\sum$P(referência)" corresponde ao total de pontos no espaço de referência e "R" corresponde à razão entre pontos, considerando o sistema de pontos usados ora para as estruturas (células alvo) ora para o espaço de referência.

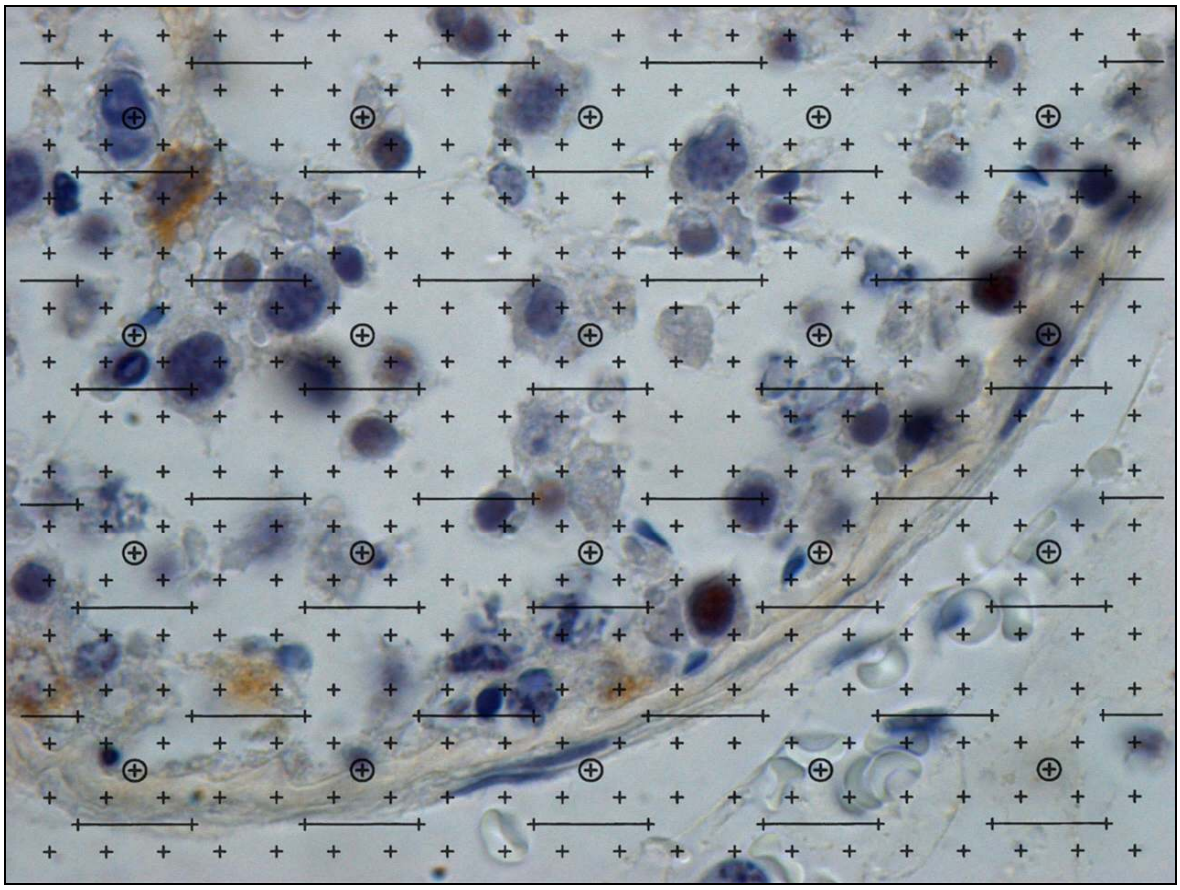


Figura 27: Imunohistoquímica para a caspase 3 activa no paciente com Agenesia Bilateral dos Canais Deferentes (CBAVD). Grelha multi-sistema usada para a contagem (Objectiva 100X), colocada sobre a imagem do monitor.

A avaliação da densidade volumétrica (túbulo seminífero, biópsia) foi efectuada a partir da estimativa por contagem de pontos. Esta contagem foi efectuada em tempo real, directamente ao microscópio, em que uma das oculares possui uma grelha de pontos multi-sistema de vidro (Integrationsplatte II, 100/25, Carl Zeiss) (Fig.28).

Figura 28: Imunohistoquímica para a caspase 3 activa no paciente submetido a orquidectomia. Integrationsplatte II, 100/25-lattice, grelha utilizada para contagem de pontos, inserida na ocular esquerda (Objectiva 10X) do microscópio.

4.3. ESTATÍSTICA

Na análise estatística, foi tido em consideração o túbulo seminífero e, depois, fez-se a extrapolação para o volume testicular, estabelecendo uma comparação entre o grupo obstrutivo e o grupo controlo.

Em termos de densidade volumétrica (V_V) de todas as células de todos os pacientes de cada grupo, o estudo comparativo da presença de caspase-3 activa entre o grupo obstrutivo e o controlo revelou que não existem diferenças significativas quer no túbulo seminífero (P=0,175, t-Student; P=0,267, Mann-Whitney U) quer no testículo (P=0,405, t-Student; P=0,533, Mann-Whitney U) (Tabela 4).

Tabela 4: Comparação entre a presença de caspase-3 activa nos grupos obstrutivo e controlo, no túbulo e no testículo.

	N[a)]	**Túbulo**			**Testículo**		
		% Média ± DP [b)]	*P* [c)]	*P* [d)]	**% Média ± DP** [b)]	*P* [c)]	*P* [d)]
Obstrutivo	4	9,66 ± 1,78	0,175	0,267	0,0027 ± 0,00078	0,405	0,533
Controlo	2	6,64 ± 2,91			0,0021 ± 0,00053		

a) Pacientes.
b) Percentagem de volume relativo ocupado por células com caspase-3 activa.
c) Teste t-Student.
d) Teste Mann-Whitney U.

Após esta comparação geral, da presença de caspase-3 activa entre os dois grupos de estudo, efectuou-se uma análise mais pormenorizada a nível celular.

Foi em primeiro lugar analisado ao nível do túbulo (Anexo 9) e, posteriormente, ao nível do testículo (Anexo 10).

4.3.1. TÚBULO

Ao nível do túbulo foi feita uma análise detalhada, por forma a verificar se existe algum estadio onde a caspase-3 activa está mais expressa (Tabela 5).

Tabela 5: Comparação entre a presença de caspase-3 activa nos diferentes grupos de células, entre os grupos obstrutivo e controlo, no túbulo.

Grupo de Células	Obstrutivo			Controlo			Túbulo	
	N [a)]	Caspase-3 activa		N [a)]	Caspase-3 activa			
		N [a)]	% Vv Média ± DP [b)]		N [a)]	% Vv Média ± DP [b)]	*P* [c)]	*P* [d)]
I								
SC	2186	1738	6.03 ± 1.13	779	492	3.24±0.80	**0.038**	0.133
GC	5915	1877	3.36 ± 2.33	2934	788	3.41 ± 2.12	0.915	0.800
II								
SC	2186	1738	6.03 ± 1.13	779	492	3.24±0.80	**0.038**	0.133
DGC	4663	1380	3.20 ± 2.26	1745	492	2.96 ± 2.47	0.533	0.800
HGC	1252	497	0.44 ± 0.17	1189	296	0.45 ± 0.37	0.964	1
III								
SC	2186	1738	6.03 ± 1.13	779	492	3.24±0.80	**0.038**	0.133
SG	2365	537	0.42±0.44	589	83	0.15±0.15	0.462	0.533
ST1	1569	562	1.87±1.00	859	310	2.13±1.65	0.816	0.800
ST2	729	281	0.91±0.85	297	99	0.69±0.68	0.770	0.800
Sa	1252	497	0.44±0.18	1189	296	0.45±0.37	0.964	1

a) Número de pontos por célula.
b) Percentagem de volume relativo ocupado por célula com caspase-3 activa.
c) Teste t-Student (Obstrutivos vs Controlo).
d) Teste Mann-Whitney (Obstrutivos vs Controlo).

SC- Células de Sertoli; GC- Células germinativas; DGC- Células germinais diplóides; HGC- Células germinais haplóides; SG- Espermatogónias; ST1- Espermatócitos primários; ST2- Espermatócitos secundários; Sa- Espermatídeos redondos.

Em todos os grupos celulares verificou-se que apenas as células de Sertoli apresentam um volume relativo com caspase-3 activa significativamente diferente, sendo superior no grupo obstrutivo (Tabela 5). Contudo, esta diferença é

marginalmente significativa dado que não se verifica nos dois testes aplicados (teste t-Student e teste Mann-Whitney U).

Para esclarecer se existem diferenças entre os diferentes grupos de células dentro de cada grupo obstrutivo e controlo (Tabela 6 e 7, respectivamente), foram aplicados igualmente os testes t-Student e Mann-Whitney U.

4.3.1.1. GRUPO OBSTRUTIVO

Tabela 6.I: Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as células de Sertoli e as células germinativas, no grupo Obstrutivos, no túbulo.

	Teste t-Student		Teste Mann-Whitney U	
	SC	**GC**	**SC**	**GC**
SC		0.114		0.114
GC				

SC- Células de Sertoli; GC- Células Germinativas.

Tabela 6.II: Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as células de Sertoli, as células diplóides e as células haplóides, no grupo Obstrutivos, no túbulo.

	Teste t-Student			Teste Mann-Whitney U		
	SC	**DGC**	**HGC**	**SC**	**DGC**	**HGC**
SC		0.066	**<0.0001**		0.114	**0.029**
DGC			0.051			**0.029**
HGC						

SC- Células de Sertoli; DGC- Células Germinativas Diplóides; DGC- Células Germinativas Haplóides.

Tabela 6.III: Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as diferentes células da linha germinativa, no grupo Obstrutivos, no túbulo.

	Teste t-Student					Teste Mann-Whitney U				
	SC	**SG**	**ST1**	**ST2**	**Sa**	**SC**	**SG**	**ST1**	**ST2**	**Sa**
SC		**<0,0001**	**0,001**	**<0,0001**	**<0,0001**		**0,029**	**0,029**	**0,029**	**0,029**
SG			**0,038**	0,344	0,927			0,057	0,343	0,486
ST1				0,195	**0,031**				0,343	**0,029**
ST2					0,321					1,000
Sa										

SC- Células de Sertoli; SG- Espermatogónias; ST1- Espermatócitos primários; ST2- Espermatócitos secundários; Sa- Espermatídeos redondos.

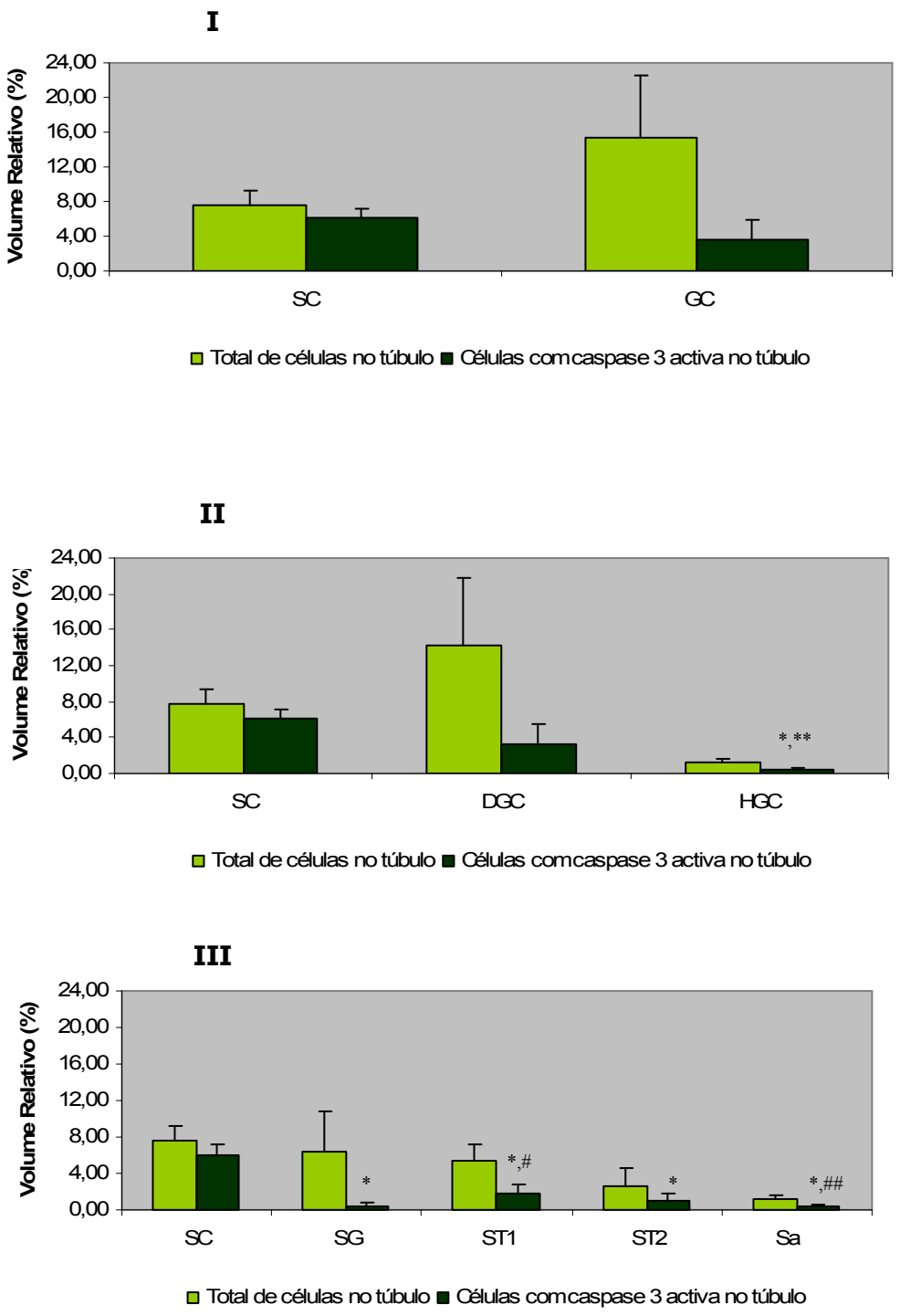


Gráfico 1: Volume relativo (%) ocupado nos túbulos seminíferos pelos diferentes tipos celulares estudados, imunohistoquimicamente marcados contra caspase-3 activa, no grupo obstrutivo. (*) Diferenças significativas vs SC; (**) Diferenças significativas vs DGC; (#) Diferenças significativas vs SG; (##) Diferenças significativas vs ST1; SC - Células de Sertoli; GC – Células germinativas; DGC - Células germinais diplóides; HGC - Células germinais haplóides; SG – Espermatogónias; ST1 - Espermatócitos primários; ST2 - Espermatócitos secundários; Sa – Espermatídeos redondos.

Analisando o grupo obstrutivo, verificou-se que da comparação entre os dois testes aplicados, as células de Sertoli não apresentam diferenças significativas quando comparadas com o grupo das células germinativas (Graf.1.I e Tabela 6.I). Contudo, quando as comparamos com os grupos de células diplóides e haplóides, verificamos que apresentam um volume relativo com caspase-3 activa significativamente superior em relação às células haplóides (P= <0,0001, t-Student; P= 0,029, Mann-Whitney U) (Graf.1.II). Por sua vez, o grupo das células diplóides apresentam um volume relativo com caspase-3 activa significativamente superior mas marginal em relação às células haplóides (P= 0,051, t-Student; P= 0,029, Mann-Whitney U).

Numa terceira análise, foram comparadas as células de Sertoli com as todas as células da linha germinativa discriminadamente (Graf.1.III) e observou-se que apresentam diferenças significativas em relação a todas as outras células (Tabela 6.III).

Analisando em mais pormenor o Gráfico 1.III, verificou-se que as espermatogónias apenas apresentam diferenças significativas, mas marginais, em relação aos espermatócitos primários (P=0,038, t-Student; P= 0,057, Mann-Whitney U). Por sua vez, estes apresentam um volume relativo com caspase-3 activa significativamente superior em relação aos espermatídeos redondos (P=0,031, t-Student; P= 0,029, Mann-Whitney U).

4.3.1.2. GRUPO CONTROLO

Tabela 7.I: Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as células de Sertoli e as células germinativas, no grupo Controlo, no túbulo.

	Teste t-Student		Teste Mann-Whitney U	
	SC	**GC**	**SC**	**GC**
SC		0.923		1
GC				

SC- Células de Sertoli; GC- Células Germinativas.

Tabela 7.II: Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as células de Sertoli, as células diplóides e as células haplóides, no grupo Controlo, no túbulo.

	Teste t-Student			Teste Mann-Whitney U		
	SC	**DGC**	**HGC**	**SC**	**DGC**	**HGC**
SC		0.895	**0.046**		1	0.333
DGC			0.292			0.333
HGC						

SC- Células de Sertoli; DGC- Células Germinativas Diplóides; DGC- Células Germinativas Haplóides.

Tabela 7.III: Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as diferentes células da linha germinativa, no grupo Controlo, no túbulo.

	Teste t-Student					Teste Mann-Whitney U				
	SC	**SG**	**ST1**	**ST2**	**Sa**	**SC**	**SG**	**ST1**	**ST2**	**Sa**
SC		**0,033**	0,482	**0,075**	0,046		0,333	0,667	0,333	0,333
SG			0,233	0,383	0,390			0,333	0,667	0,667
ST1				0,373	0,296				0,667	0,333
ST2					0,703					0,667
Sa										

SC- Células de Sertoli; SG- Espermatogónias; ST1- Espermatócitos primários; ST2- Espermatócitos secundários; Sa- Espermatídeos redondos.

Quanto ao grupo controlo, após a comparação entre os dois testes, verificou-se que as células de Sertoli, tal como no grupo obstrutivo, também não apresentam diferenças significativas em relação às células germinativas (Graf.2.I). Contudo, quando comparadas com os grupos de células diplóides e haplóides, verificamos que passam igualmente a apresentar um volume relativo com caspase-3 activa significativamente superior, mas marginal, em relação às células haplóides (P= 0,046, t-Student; P=0,333, Mann-Whitney U) (Graf.2.II).

Fazendo um estudo mais pormenorizado, apenas se observaram diferenças significativas, mas marginais, entre as células de Sertoli e as espermatogónias

(P=0,033, t-Student) e os espermatócitos secundários (P=0,075, t-Student) (Graf.2.III).

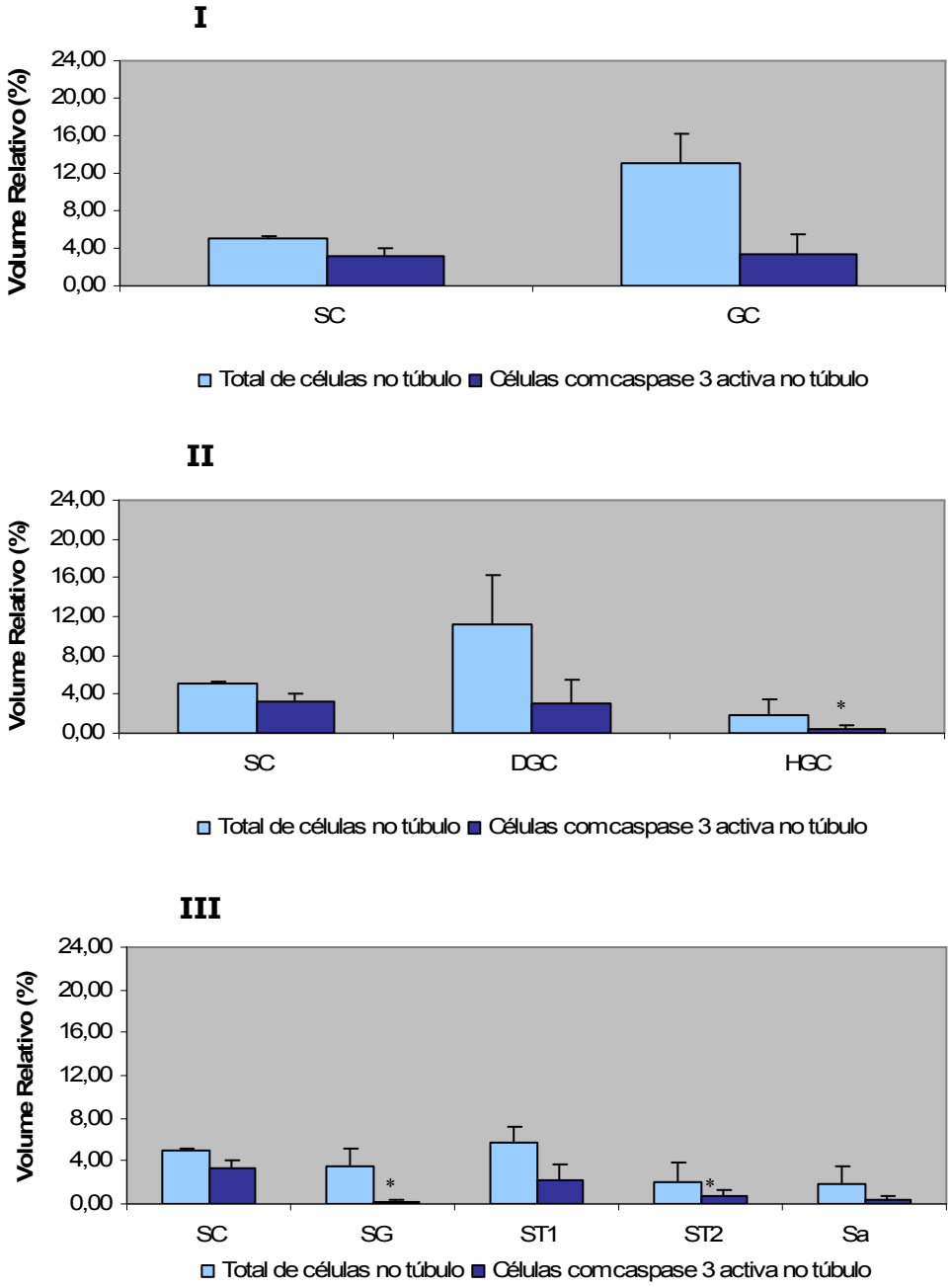


Gráfico 2: Volume relativo (%) ocupado nos tubos seminíferos pelos diferentes tipos celulares estudados, imunohistoquimicamente marcados contra caspase-3 activa, no grupo controlo. (*) Diferenças significativas vs SC; (#) Diferenças significativas vs SG; (##) Diferenças significativas vs ST1; SC - Células de Sertoli; GC – Células germinativas; DGC - Células germinais diplóides; HGC - Células germinais haplóides; SG – Espermatogónias; ST1 - Espermatócitos primários; ST2 - Espermatócitos secundários; Sa – Espermatídeos redondos.

4.3.2. TESTÍCULO

Foi igualmente feita uma análise detalhada ao nível do testículo, tentando verificar se existe algum estadio onde a caspase-3 activa está mais expressa (Tabela 8).

Tabela 8: Comparação entre a presença de caspase-3 activa nos diferentes grupos de células, entre os grupos obstrutivo e controlo, no testículo.

Grupo de Células	Obstrutivo			Controlo			Testículo	
	N [a)]	Caspase-3 activa		N [a)]	Caspase-3 activa			
		N [a)]	%Vv Média ± DP [b)]		N [a)]	% VvMédia ± DP [b)]	*P* [c)]	*P* [d)]
I								
SC	2186	1738	0,00175 ± 0,00071	779	492	0,00106 ± 0,00005	0,261	0,533
GC	5915	1877	0.0009 ± 0.0006	2934	788	0.0011 ± 0.0005	0.847	0.800
II								
SC	2186	1738	0,00175 ± 0,00071	779	492	0,00106 ± 0,00005	0,261	0,533
DGC	4663	1380	0.0008 ± 0.0006	1745	492	0.0009 ± 0.0006	0.907	1
HGC	1252	497	0.0001 ± 0.00001	1189	296	0.0002 ± 0.0001	0.464	1
III								
SC	2186	1738	0,00175 ± 0,00071	779	492	0,00106 ± 0,00005	0,261	0,533
SG	2365	537	0,00011 ±0,00012	589	83	0,000043 ± 0,000041	0,508	0,800
ST1	1569	562	0,00050 ± 0,00026	859	310	0,00065 ± 0,00041	0,593	0,800
ST2	729	281	0,00023 ± 0,00022	297	99	0,00021 ± 0,00018	0,913	1
Sa	1252	497	0,00011 ± 0,00001	1189	296	0,00016 ± 0,00015	0,502	1

a) Número de pontos por célula.

b) Percentagem de volume relativo ocupado por célula com caspase-3 activa.

c) Teste t-Student (Obstrutivos vs Controlo).

d) Teste Mann-Whitney (Obstrutivos vs Controlo).

SC- Células de Sertoli; GC- Células germinativas; DGC- Células germinais diplóides; HGC- Células germinais haplóides; SG- Espermatogónias; ST1- Espermatócitos primários; ST2- Espermatócitos secundários; Sa- Espermatídeos redondos.

Como se pode verificar pela análise da tabela 8 há uma total ausência de diferenças significativas em todos os grupos.

Tal como foi efectuado para o túbulo, também se foi verificar se existem diferenças entre os diferentes grupos de células no grupo obstrutivo e no grupo controlo (Tabela 9 e 10) respectivamente. Para isso tornou-se a aplicar os testes t-Student e Mann-Whitney U.

4.3.2.1. GRUPO OBSTRUTIVO

Tabela 9.I: Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as células de Sertoli e as células germinativas, no grupo Obstrutivos, no testículo.

	Teste t-Student		Teste Mann-Whitney U	
	SC	**GC**	**SC**	**GC**
SC		0.138		0.114
GC				

SC- Células de Sertoli; GC- Células Germinativas.

Tabela 9.II: Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as células de Sertoli, as células diplóides e as células haplóides, no grupo Obstrutivos, no testículo.

	Teste t-Student			Teste Mann-Whitney U		
	SC	**DGC**	**HGC**	**SC**	**DGC**	**HGC**
SC		0.102	**0.004**		0.114	**0.029**
DGC			0.050			**0.029**
HGC						

SC- Células de Sertoli; DGC- Células Germinativas Diplóides; DGC- Células Germinativas Haplóides.

Tabela 9.III: Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as diferentes células da linha germinativa, no grupo Obstrutivos, no testículo.

	Teste t-Student					Teste Mann-Whitney U				
	SC	**SG**	**ST1**	**ST2**	**Sa**	**SC**	**SG**	**ST1**	**ST2**	**Sa**
SC		**0,004**	**0,016**	**0,006**	**0,004**		0,29	0,57	0,29	0,29
SG			**0,036**	0,391	0,972			0,57	0,343	0,343
ST1				0,164	**0,026**				0,200	0,29
ST2					0,339					1
Sa										

SC- Células de Sertoli; SG- Espermatogónias; ST1- Espermatócitos primários; ST2- Espermatócitos secundários; Sa- Espermatídeos redondos.

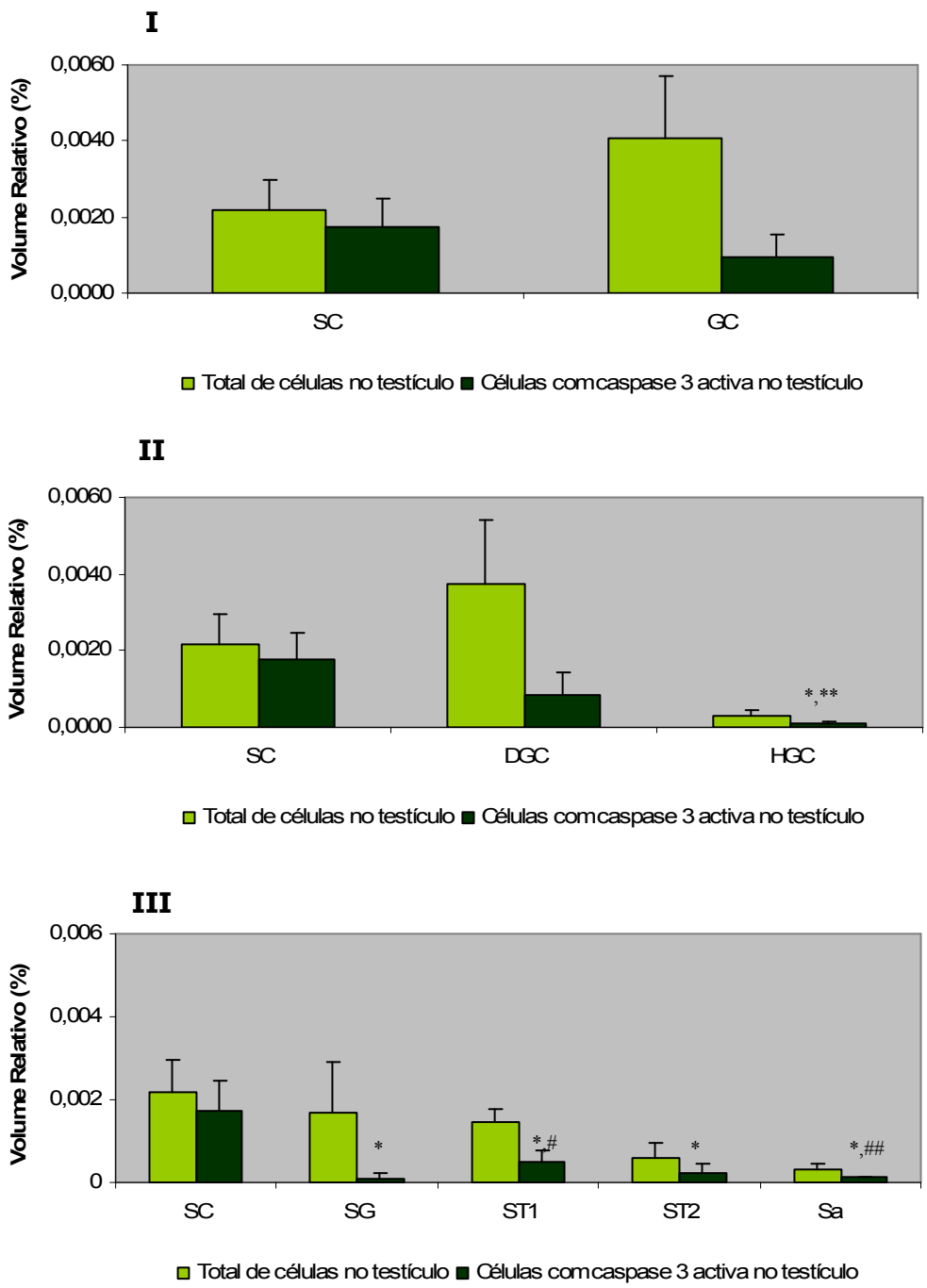


Gráfico 3: Volume relativo (%) ocupado no testículo pelos diferentes tipos celulares estudados, imunohistoquimicamente marcados contra caspase-3 activa, no grupo obstrutivo. (*) Diferenças significativas vs SC; (**) Diferenças significativas vs DGC; (#) Diferenças significativas vs SG; (##) Diferenças significativas vs ST1; SC - Células de Sertoli; GC – Células germinativas; DGC - Células germinais diplóides; HGC - Células germinais haplóides; SG – Espermatogónias; ST1 - Espermatócitos primários; ST2 - Espermatócitos secundários; Sa – Espermatídeos redondos.

Analisando o grupo obstrutivo, verificou-se que da comparação entre os dois testes aplicados, as células de Sertoli não apresentam diferenças significativas

quando comparadas com o grupo das células germinativas (Graf.3.I e Tabela 9.I). Contudo, quando as comparamos com os grupos de células diplóides e haplóides, verificamos que apresentam um volume relativo com caspase-3 activa significativamente superior em relação às células haplóides (P= <0,004, t-Student; P= 0,029, Mann-Whitney U) (Graf.3.II e Tabela 9.II). Por sua vez, o grupo das células diplóides apresentam um volume relativo com caspase-3 activa significativamente superior mas marginal em relação às células haplóides (P= 0,050, t-Student; P= 0,029, Mann-Whitney U).

No testículo, em particular no grupo obstrutivo, verificou-se que embora haja diferenças significativas, estas são marginais dado que apenas se verificam no teste t-Student. Sendo assim, as células de Sertoli apresentam um volume relativo com caspase-3 activa significativamente superior em relação a todas as outras células da linha germinativa (P<0,016). Os espermatócitos primários apresentam valores significativamente superiores às espermatogónias (P=0,036) e aos espermatídeos redondos (P=0,026) (Graf.3.III e Tabela 9.III).

4.3.2.2. GRUPO CONTROLO

Tabela 10.I: Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as células de Sertoli e as células germinativas, no grupo Controlo, no testículo.

	Teste t-Student		Teste Mann-Whitney U	
	SC	**GC**	**SC**	**GC**
SC		1		1
GC				

SC- Células de Sertoli; GC- Células Germinativas.

Tabela 10.II: Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as células de Sertoli, as células diplóides e as células haplóides, no grupo Controlo, no testículo.

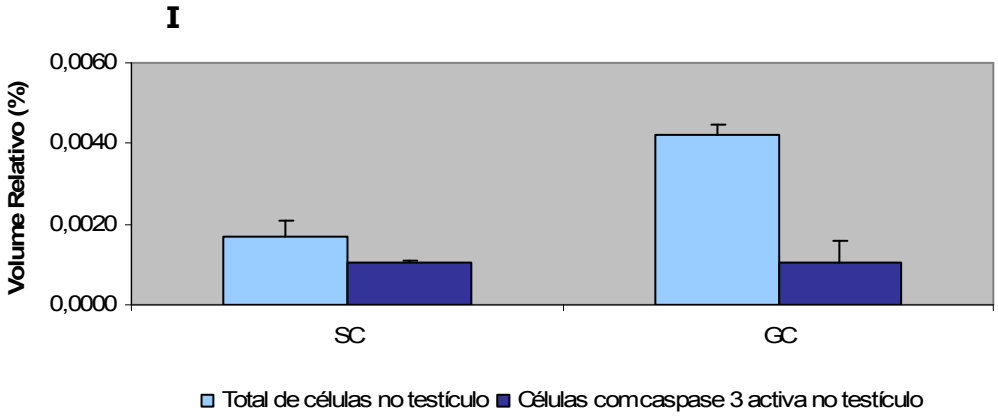
	Teste t-Student			Teste Mann-Whitney U		
	SC	**DGC**	**HGC**	**SC**	**DGC**	**HGC**
SC		0.769	**0.015**		1	0.333
DGC			0.247			0.333
HGC						

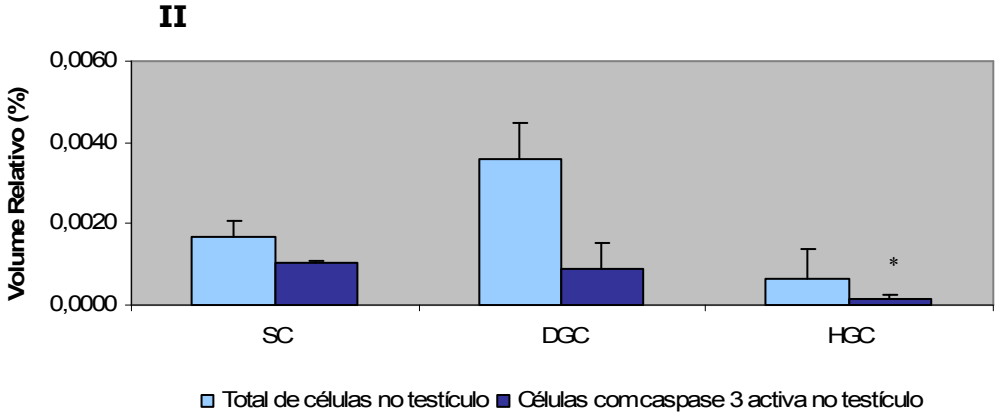
SC- Células de Sertoli; DGC- Células Germinativas Diplóides; DGC- Células Germinativas Haplóides.

Tabela 10.III: Comparação entre a presença de caspase-3 activa entre as diferentes células da linha germinativa, no grupo Controlo, no testículo.

	Teste t-Student					Teste Mann-Whitney U				
	SC	**SG**	**ST1**	**ST2**	**Sa**	**SC**	**SG**	**ST1**	**ST2**	**Sa**
SC		**0,002**	0,300	**0,023**	**0,015**		0,333	0,333	0,333	0,333
SG			0,170	0,336	0,394			0,333	0,333	0,667
ST1				0,293	0,252				0,333	0,333
ST2					0,811					0,667
Sa										

SC- Células de Sertoli; SG- Espermatogónias; ST1- Espermatócitos primários; ST2- Espermatócitos secundários; Sa- Espermatídeos redondos.





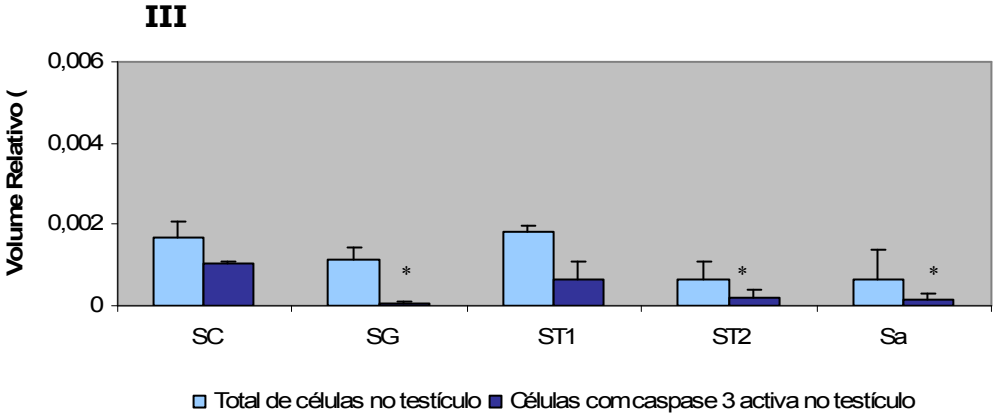


Gráfico 4: Volume relativo (%) ocupado no testículo pelos diferentes tipos celulares estudados, imunohistoquimicamente marcados contra caspase-3, no grupo controlo. (*) Diferenças significativas vs SC; (#) Diferenças significativas vs SG; (##) Diferenças significativas vs ST1; SC - Células de Sertoli; GC – Células germinativas; DGC - Células germinais diplóides; HGC - Células germinais haplóides; SG – Espermatogónias; ST1 - Espermatócitos primários; ST2 - Espermatócitos secundários; Sa – Espermatídeos redondos.

Quanto ao grupo controlo, após a comparação entre os dois testes, verificou-se que as células de Sertoli, tal como no grupo obstrutivo, também não apresentam diferenças significativas em relação às células germinativas (Graf.4.I e Tabela 10.I). Contudo, quando comparadas com os grupos de células diplóides e haplóides, verificamos que passam igualmente a apresentar um volume relativo com caspase-3 activa significativamente superior, mas marginal, em relação às células haplóides (P= 0,015, t-Student; P=0,333, Mann-Whitney U) (Graf.4.II e Tabela 10.II).

No grupo controlo, verifica-se que as células de Sertoli apresentam um volume relativo com caspase-3 activa significativamente superior às espermatogónias, espermatócitos secundários e espermatídeos redondos. Contudo, estas diferenças são apenas marginais dado que só se verificaram no teste t-Student.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A apoptose tem sido alvo de variadíssimos estudos uma vez que tem um papel fundamental na regulação da espermatogénese.

Fujisawa, analisou a regulação da apoptose em pacientes com varicocelo. Foram utilizadas biópsias testiculares provenientes de pacientes com oligozoospermia e voluntários férteis, os quais serviram como controlos. Através da técnica in-situ end labeling foi possível estabelecer um Índice Apoptótico (AI = número de células marcadas / número total de espermatócitos e espermatogónias em 20 túbulos seminíferos) e foi expresso em percentagem (%). Também o número de células marcadas por células de Sertoli foi calculado. Após a aplicação da técnica in situ end-labeling nos homens com espermatogénese conservada, observou-se que a apoptose espontânea ocorre principalmente nas células germinativas próximas da membrana basal, ou seja, ao nível dos espermatócitos e das espermatogónias. Ao microscópio electrónico foi possível observar que nos pacientes com varicocelo a apoptose atinge essencialmente os espermatócitos, em contrapartida, não foi observada apoptose nas espermatogónias. Verificou-se que o AI para os pacientes com varicocelo à direita (3,90 ± 2,28%) e à esquerda (3,78 ± 2,87%) era significativamente mais baixo ($P<0,05$) nos pacientes com varicocelo do que nos controlos (9,6 ± 0,93%). O número de células apoptóticas por células de Sertoli foi também significativamente mais baixo nos pacientes com varicocelo tanto direito como esquerdo (0,33 ± 0,21%, 0,33 ± 0,23%, respectivamente) quando comparado com os valores dos pacientes controlo (1,44 ± 0,15%).

Em conclusão, existe muito menos apoptose nos testículos de homens inférteis com varicocelo quando comparado com controlos (Fujisawa, 1999).

Num estudo executado por Tesarik, foi verificada a frequência de células germinativas em apoptose em dois grupos de pacientes azoospérmicos: pacientes

com falência completa de espermiogénese e pacientes com falência incompleta de espermiogénese. Através da técnica TUNEL, observou-se uma percentagem significativamente maior de fragmentação no DNA nos pacientes com falência completa de espermiogénese, tanto nos espermatócitos primários como nos espermatídeos redondos. Após a aplicação da técnica Annexin V, verificou-se que a exteriorização da fosfatidilserina ocorre ocasionalmente nos espermatócitos primários e nos espermatídeos redondos, tanto pacientes com falência completa de espermiogénese e pacientes com falência incompleta de espermiogénese. Em contraste, observou-se uma percentagem mais elevada da exteriorização da fosfatidilserina em células que se encontram em estádios mais avançados (Sb-Sc). Tendo em consideração que a exteriorização da fosfatidilserina está envolvida no reconhecimento das células apoptóticas por células que executam a fagocitose, então os espermatócitos e os espermatídeos redondos em apoptose podem não ser removidos facilmente pela fagocitose. Isto pode explicar a existência frequente de espermatócitos primários e espermatídeos redondos no ejaculado de pacientes com azoospermia não obstrutiva (Tesarik *et al*, 1998).

Segundo um estudo feito por Martincic, foi determinada a presença e a frequência de apoptose nas células germinativas em biópsias testiculares humanas em pacientes com azoospermia obstrutiva, com espermatogénese conservada, azoospermia secretora, com paragem de maturação (MA) e hipospermatogénese (HP), e pacientes com Síndrome de células de Sertoli (SCO), através da técnica TUNEL. Foi analisado o Índice Apoptótico (AI = número de células apoptóticas / 1000 células germinativas e de Sertoli). Este índice é apresentado com a seguinte referência: média ± desvio-padrão. Verificou-se que o AI nos pacientes com azoospermia obstrutiva e espermatogénese conservada (0,9 ± 0,24) é inferior ao AI dos pacientes com de azoospermia secretora (MA e HP) (1,69 ± 2,75). No caso dos pacientes com Síndrome de células de Sertoli não se verificou qualquer marcação positiva nas células do tecido testicular (Martincic *et al*, 2001).

Num estudo realizado por Lin, foi determinada através da técnica in situ end-labeling a frequência da apoptose em biópsias testiculares com espermatogénese anómala. As biópsias incluíram pacientes com azoospermia obstrutiva e pacientes com oligozoospermia severa. Após análise histológica as biópsias foram classificadas em Síndrome de células de Sertoli (SCO), paragem em espermatócito, paragem em espermatídeo, hipospermatogénese e espermatogénese conservada. Foram estudados os seguintes índices apoptóticos: corpos apoptóticos / total de células e corpos apoptóticos / células de Sertoli. Observou-se que nos pacientes com paragem em espermatócito, paragem em espermatídeo e hipospermatogénese os índices apoptóticos são significativamente mais elevados, em comparação com os pacientes com SCO e espermatogénese conservada. Estatisticamente, não existem diferenças significativas entre os índices apoptóticos obtidos entre os pacientes com paragem em espermatócito, paragem em espermatídeo e hipospermatogénese (Lin et al, 1997).

Pentikainen estudou o papel do sistema Fas-FasL na regulação da apoptose nas células germinativas. Para isso utilizou pacientes idosos (> de 68 anos) submetidos a orquidectomia por tratamento do cancro da próstata os quais não foram sujeitos a qualquer tipo de medicamentação hormonal, nem tratamento com radioterapia/quimioterapia. Por este motivo, os pacientes foram considerados com possuindo espermatogénese normal e conservada. Através da análise ao microscópio electrónico, verificaram que as células mais afectadas pela apoptose foram os espermatócitos e ocasionalmente os espermatídeos, tendo sido observadas as principais características das células em apoptose, tais como a condensação da cromatina e a degeneração de organelos. Após a aplicação da técnica de imunohistoquímica para a proteína Fas foi possível verificar que as células apoptóticas identificadas foram os espermatócitos e os espermatídeos. Foi utilizado um anticorpo antagonista para o FasL para bloquear o sistema Fas-FasL inibindo a apoptose das células germinativas. O efeito inibitório deste anticorpo foi detectado através da técnica in situ end-labeling e verificou-se que quase nenhumas células positivas foram observadas. Para confirmar os resultados

obtidos pela in situ end-labeling, foi também utilizada a caspase universal (Z-VAD.FMK) que inibe a morte celular das células germinativas, sugerindo que o Fas está associado à apoptose das células germinativas e é mediado pela via das caspases.

Em conclusão, o estudo realizado sugere um importante papel do sistema Fas-FasL na regulação da apoptose nas células germinativas do testículo humano (Pentikainen *et al*, 1999).

Francavila analisou a expressão do Fas e do FasL em testículos de fetos e adultos. Para isso, utilizou fetos com 20, 21 e 22 semanas obtidos por interrupção da gravidez por doença materna. Nos adultos, usou tecido testicular de pacientes férteis submetidos a orquidectomia por seminoma testicular e pacientes com azoospermia e oligozoospermia severa. Após análise histológica com hematoxilina-eosina, as biópsias analisadas foram classificadas como Síndrome de células de Sertoli (SCO), paragem de maturação (MA), paragem de maturação tardia (PMA), hipospermatogénese (HP) e espermatogénese conservada. Através do estudo imunohistoquímico, foi possível observar uma elevada marcação do FasL no compartimento basal dos túbulos seminíferos, confinada essencialmente às células de Sertoli. A expressão do FasR foi ocasional e confinada às células germinativas, essencialmente aos espermatócitos primários e muito raramente aos espermatídeos redondos. Foi possível estabelecer um Índice Apoptótico (AI = células Fas-positivas / 100 núcleos de células de Sertoli em 30 biópsias testiculares), e observou-se que nos pacientes com PMA (3,82 ± 0,45%) o AI foi significativamente superior aos pacientes com MA (1,56 ± 1,07%) e com espermatogénese conservada (2,02 ± 0,29%).

Em conclusão, a elevada expressão do Fas nas células germinativas dos pacientes com PMA sugeriu que o sistema Fas-FasL poderá estar envolvido no mecanismo de controlo da produção de gâmetas (Francavilla *et al*, 2000).

Ofordeme estudou através de técnicas de imunohistoquímica a apoptose e a proliferação celular em testículos de crianças com criptorquidia. Para isso, utilizou biópsias testiculares de crianças tratadas à criptorquidia e para os controlos utilizou material de autópsias. Os resultados mostraram uma maior taxa de apoptose nos controlos, o mesmo se constatou para a proliferação celular. Foi feita a quantificação das células apoptóticas através da razão: células apoptóticas/50 túbulos seminíferos expressa por média ± desvio-padrão. Verificou-se que existe significativamente mais apoptose nos testículos intra-abdominais (1,63 ± 1,95) do que nos testículos inguinais (0,71 ± 1,31). Similarmente, há menos apoptose nas crianças com idade superior a 1 ano (0,68 ± 1,40) do que em crianças com idade inferior a 1 ano (1,35 ± 1,56). Nos testículos autopsiados (controlo) verificou-se mais apoptose (10,60 ± 1,34) e mais proliferação celular (8,40 ± 6,43) em relação aos testículos criptorquídicos.

Em conclusão, em testículos criptorquídicos de crianças a partir dos 6 meses de idade nem a apoptose, nem a proliferação são acontecimentos comuns, contudo a apoptose é mais frequente em crianças com testículos intra-abdominais e com idade inferior a 1 ano (Ofordeme *et al*, 2005).

Oldereid, investigou a frequência da apoptose espontânea e a expressão das proteínas da família Bcl-2 durante a espermatogénese humana. As biópsias testiculares utilizadas tiveram origem em dadores de órgãos em morte cerebral, os quais não apresentavam qualquer tipo de abuso de drogas ou álcool. Através da técnica TUNEL foi possível estabelecer um Índice Apoptótico (AI = células apoptóticas / 50 secções tubulares), o qual foi tido em consideração para as espermatogónias, espermatócitos primários e espermatídeos. Este índice foi apresentado com a seguinte referência: média ± desvio-padrão. Observou-se que os espermatócitos primários foram os que apresentaram maior percentagem de apoptose (26,2 ± 25,1) em comparação com as espermatogónias (4,6 ± 6,9), e espermatídeos (17,0 ± 18,3). Ocasionalmente, observaram-se células de Sertoli com positividade no núcleo. No que diz respeito à análise imunohistoquímica das

proteínas da família Bcl-2, verificou-se que o Bax, o Bcl-2, o Bcl-x, o Bak, o mcl-1 e o Bad apresentam marcação positiva nas células germinativas, enquanto que o Bcl-w que não foi detectado.

Em conclusão, os resultados demonstraram que a apoptose no testículo normal, envolve todas as classes de células germinativas. Quanto às proteínas apoptóticas Bax, Bcl-2, Bcl-x, Bak, mcl-1 e Bad estas parecem estar envolvidas na diferenciação e maturação através dos diferentes estádios da espermatogénese humana (Oldereid *et al,* 2001).

Segundo um estudo levado a cabo por Lin, foi estudado o papel das seguintes proteínas: Bcl-2, Bax, p53 e cyclic AMP responsive element modulator (CREM) na espermatogénese humana. Para efectuar esse estudo foram aplicadas as seguintes técnicas: imunohistoquímica, in-situ end-labeling (ISEL) e análise ao microscópio. As biópsias utilizadas tiveram origem em pacientes com azoospermia e oligozoospermia severa. Após análise histológica com hematoxilina-eosina as biópsias foram classificadas como: Síndrome de células de Sertoli (SCO), hipospermatogénese, paragem em espermatócito; paragem em espermatídeo e espermatogénese conservada. Através da técnica ISEL, foi possível estabelecer um Índice Apoptótico (AI = corpos apoptóticos / células de Sertoli), e observou-se que nos pacientes com paragem em espermatócito, paragem em espermatídeo e hipospermatogénese o índice apoptótico foi significativamente mais elevado, em comparação com os pacientes com SCO e espermatogénese conservada. Estatisticamente, não se encontraram diferenças significativas entre os índices apoptóticos obtidos nos pacientes com paragem em espermatócito, paragem em espermatídeo e hipospermatogénese. Através da imunohistoquímica foi possível verificar que a imunoreactividade para o CREM foi observada especificamente nos espermatídeos redondos, pelo que apenas se manifestou nos pacientes com hipospermatogénese, paragem em espermatídeo e espermatogénese conservada. Quanto às outras proteínas, a imunomarcação foi praticamente indetectável.

Este estudo permitiu concluir que possivelmente as proteínas analisadas têm um papel importante na regulação da apoptose na infertilidade masculina. Embora os resultados imunohistoquímicos para a Bcl-2, Bax e p53 não tenha sido conclusivos, a ausência do CREM nos espermatócitos implica um importante papel na apoptose no mecanismo molecular de espermatogénese anormal (Lin W *et al*, 1999).

Segundo Pentikainen, foi efectuado um estudo com o objectivo de caracterizar os efeitos do TNFα nas células germinativas do testículo humano (*in vitro*). Para isso, foram utilizadas biópsias testiculares provenientes de pacientes submetidos a orquidectomia por cancro da próstata, os quais não foram sujeitos a qualquer tipo de medicamentação hormonal, nem a tratamento com radioterapia/quimioterapia. Estes pacientes não tinham criptorquidia, nem doenças endócrinas. Para localizar o receptor do TNFα no testículo humano adulto, foi feito um estudo imunohistoquímico. Contudo, apenas o TNF-I foi encontrado por imunohistoquímica, pelo que foi detectado utilizando dois anticorpos (H-271 e CSA-810). Com o anticorpo H-271, observou-se uma marcação positiva nas células de Sertoli, essencialmente no núcleo ou nas proximidades deste. Utilizando o anticorpo CSA-810, as células de Sertoli também apresentaram marcação positiva, mas no citoplasma. Quando se juntam os dois anticorpos as células de Sertoli continuam a aparecer com marcação positiva, contudo as espermatogónias e os espermatócitos em fase de paquíteno também apresentam marcação, mas mais raramente (Pentikainen *et al*, 2001).

A proteína GATA, pertence à família dos factores de transcrição, participa na regulação e desenvolvimento da função de muitos órgãos e está ligada à sinalização das caspases, regulando a apoptose. Em particular, a proteína GATA-6, está presente no testículo (túbulos seminíferos) desde os fetos até aos adultos. Sabendo que a GATA-6 tem um papel importante na apoptose e no ciclo celular, Ketola explorou as relações entre a expressão da GATA-6, a proliferação celular e a apoptose associada às proteínas Bcl-2 e Bax, durante o desenvolvimento testicular em fetos. As biópsias testiculares utilizadas foram obtidas a partir de

fetos resultantes de abortos espontâneos ou terapêuticos (16ª a 22ª semanas, n=9) e de fetos autopsiados (27ª a 40ª semanas, n=5) devido a asfixia perinatal ou infecção 48h após o nascimento. Foi utilizada a técnica de imunohistoquímica para localizar a GATA-6 e verificou-se que estava presente nas células de Sertoli entre a 16ª e a 40ª semanas. Verificou-se também que a intensidade de marcação destas células foi muito maior da 16ª às 23ª semanas, observando-se uma diminuição desta intensidade com o desenvolvimento fetal. A técnica TUNEL foi utilizada para verificar a apoptose, enquanto que para a proliferação celular foi utilizada a técnica de imunohistoquímica para a Ki-67 no testículo fetal. A partir da 16ª semana só algumas células apoptóticas foram observadas. No que diz respeito à proliferação celular, verificou-se que as células proliferativas também foram escassas (Ketola *et al*, 2003).

Tesarik estudou a relação entre a actividade das caspases e a fragmentação do DNA nas células de Sertoli e nas células germinativas em homens com azoospermia não obstrutiva. Após análise histológica, a azoospermia foi classificada em Síndrome de células de Sertoli (SCO), paragem de maturação (MA), paragem de maturação tardia (PMA) e hipospermatogénese (HP). Para analisar a actividade das caspases utilizaram a técnica in-situ labelling para a caspase activa (FITC-VAD-FMK), tendo concluindo que a maior percentagem de células com apoptose se verifica nas células germinativas que permanecem associadas às células de Sertoli após um vigoroso tratamento mecânico nos pacientes com MA (88 ± 9%) e PMA e (80 ± 8%). Quanto à fragmentação do DNA, a técnica utilizada foi o TUNEL e verificaram que raramente ocorre fragmentação de DNA nos núcleos das células de Sertoli. Nas células germinativas, tanto nas associadas às células de Sertoli, como nas livres, apresentaram fragmentação do DNA essencialmente nos pacientes com MA (89 ± 9%, 85 ± 8%) e PMA (85 ± 7%, 73 ± 7%), respectivamente.

Em conclusão, a activação das caspases e a fragmentação do DNA nas células de Sertoli em homens adultos foi praticamente insignificante (Tesarik *et al*, 2004).

Segundo Krajewska, no sistema reprodutivo masculino a imunomarcação da caspase-3 manifesta-se essencialmente nas espermatogónias, muito pouco nos espermatócitos e nos espermatídeos maduros e raramente nas células de Sertoli (Krajewska *et al*, 1997).

Kim estudou o processo apoptótico mediado pelo Fas e pela caspase-3 activa em pacientes com azoospermia obstrutiva e não obstrutiva. Após análise histológica as biópsias testiculares foram classificadas da seguinte forma: 10 com espermatogénese conservada, 6 com paragem de maturação (MA) e 6 com Síndrome de células de Sertoli (SCO). Todos os indivíduos com azoospermia obstrutiva mas com espermatogénese conservada foram classificados com controlos. Após aplicação da técnica TUNEL verificou-se que tanto nos pacientes com espermatogénese conservada como nos com MA, as células germinativas, nomeadamente espermatócitos (3 ± 1,41%) e espermatídeos redondos (22,06 ± 11,32%), foram as que apresentaram uma maior percentagem de apoptose. Nos casos de espermatogénese conservada, as células germinativas mais afectadas foram os espermatócitos primários, os espermatídeos redondos e ocasionalmente as células de Sertoli. No caso dos pacientes com MA, a apoptose foi observada nos espermatócitos primários. No caso dos pacientes com SCO, dado que apenas existem células de Sertoli, estas apresentaram uma elevada percentagem de apoptose (31,89 ± 18,77). A expressão de mRNA, testada por RT-PCR, em casos com SCO e MA, não apresentaram uma variação significativa em relação aos casos com espermatogénese conservada. Para determinar a localização da caspase 3 activa, aplicaram a imunohistoquímica para a caspase-3 activa, que permitiu verificar que nos pacientes com espermatogénese conservada não se observou quase nenhuma marcação. Por outro lado, nos pacientes com MA, a marcação da caspase 3 activa manifestou-se mais no citoplasma das células de Sertoli e nas germinativas e nos casos com SCO apenas se observou no citoplasma das células de Sertoli.

Em conclusão, a caspase-3 activa parece estar envolvida na apoptose de casos patológicos, tendo sido detectada tanto nas células germinativas como nas células de Sertoli dos pacientes com MA e SCO (Kim *et al*, 2006).

Tanaka estudou homens inférteis com varicocelo e como controlos utilizou biópsias testiculares recolhidas logo após vasectomia. A técnica utilizada para o estudo foi a imunohistoquímica e verificou que a marcação para a caspase-3 foi essencialmente nas espermatogónias e mais raramente nos espermatócitos, sendo uma marcação tanto nuclear como citoplasmática. A quantificação foi efectuada segundo a seguinte razão: total de células marcadas / total de células germinativas. Os resultados foram expressos pela referência: média ± desvio-padrão. Em relação às proteínas estudadas (caspase-1, caspase-3 e Bax) a caspase-3 foi a que apresentou uma maior marcação. Contudo, esta apresentou significativamente menos marcação nas células germinativas nos pacientes varicocelo direito (25,2 ± 7,1) e esquerdo (24,8 ± 5,8) do que no controlo (34,9 ± 6,1). Para a Bax e a caspase-1 o total de células germinativas marcadas foi similar entre os dois grupos. Quando se fez uma análise em relação às espermatogónias foi estudada a seguinte razão: total de espermatogónias marcadas / total de espermatogónias (sendo este índice expresso por média ± desvio-padrão) e concluiu-se que a marcação das caspases-1 e -3 é muito menos frequente nos pacientes com varicocelo direito e esquerdo do que nos controlos (23,9 ± 10,9; 23 ± 14,6 vs 40,3 ± 6,7 e 43 ± 12,2; 45,4 ±10,8 vs 64,2 ± 9,4), verificando-se que a caspase-3 apresenta mais marcação em relação à caspase-1.

Este estudo permitiu concluir que a reduzida expressão da caspase-3 participa na regulação da apoptose, nos testículos de homens inférteis com varicocelo (Tanaka *et al*, 2002).

O activator protein-1 (AP-1) é um regulador da morte celular das células germinativas. Esta proteína é um termo colectivo de c-Jun, JunD e c-Fos. A actividade da AP-1 é induzida por agressões ambientais e estímulos fisiológicos.

Num estudo realizado por Suomalainen, foi avaliado o papel da AP-1 na apoptose das células germinativas do testículo humano. Para isso, utilizou pacientes com idades entre os 59 e os 80 anos, submetidos a orquidectomia por cancro da próstata, os quais não foram sujeitos a qualquer tipo de medicamentação hormonal, nem tratamento com radioterapia/quimioterapia. Por este motivo, os pacientes foram considerados como possuindo espermatogénese conservada. Para localizar as proteínas c-Jun, JunD e c-Fos utilizaram a técnica de imunohistoquímica e observaram que as espermatogónias e os espermatócitos em fase de paquíteno apresentam marcação citoplasmática apenas para o JunD e o c-Fos, não existindo marcação nuclear. Através da análise efectuada pela técnica ISEL (análise à fragmentação do DNA) foi detectada a apoptose nos espermatócitos e ocasionalmente nas espermatogónias. Na observação ao microscópio electrónico, as células apoptóticas mais comuns foram também os espermatócitos. Para análise da caspase-3, induziram a apoptose e verificaram que a actividade da caspase-3 foi aumentando progressivamente desde as 2,5h até ás 10h. Através deste estudo foi possível verificar que com a indução da apoptose nas células germinativas, a activação do factor de transcrição AP-1 ocorre antes da activação de caspases efectoras, tais como o caspase 3. A actividade da AP-1 aumenta nas células de Sertoli, enquanto que a apoptose ocorre em células germinativas, sugerindo que a AP-1 regula os genes das células de Sertoli que participam no controle parácrino da morte das células germinativas (Suomalainen *et al*, 2004).

Berensztein analisou o número relativo de células testiculares em apoptose e em proliferação celular nos túbulos seminíferos e no interstício, em diferentes idades (recém-nascido, dos 1 aos 21 dias; pós-natal, dos 1 aos 6 meses e em crianças, dos 1 aos 6 anos). Iniciou o estudo com uma avaliação do peso testicular dos três grupos e concluiu que duplica no primeiro mês de vida e depois praticamente estabiliza pelo menos até aos 5 anos de idade. De seguida, recorreu às técnicas TUNEL e imunohistoquímica para a caspase-3 activa, para estimar os valores recorrendo às seguintes razões: AI (Índice Apoptótico = % de células apoptóticas

/ número total de células) e PI (Índice de Proliferação = % de células em proliferação / número total de células) em que no número total de células estão incluídas as células germinativas, células intersticiais e células de Sertoli. Nos três tipos de células, o AI no grupo dos recém-nascidos foi significativamente mais baixo do que nos outros grupos. No que diz respeito às células germinativas no grupo dos recém-nascidos foi possível observar um aumento significativo do índice de proliferação celular em relação aos outros grupos de crianças. Nas células de Sertoli e nas intersticiais o PI foi semelhante nos três grupos. Foi analisada a razão entre o PI/AI, para comparar diferenças relativas entre os três grupos e verificou-se que tanto nas células germinativas, nas células de Sertoli como nas intersticiais apenas o grupo dos recém-nascidos apresentou diferenças significativas superiores em relação aos outros dois grupos. No que diz respeito à percentagem de marcação positiva de caspase-3 activa nos três grupos, verificou-se que foi no grupo dos recém-nascidos que se observou uma percentagem significativamente mais baixa do que nos outros grupos. Neste grupo a percentagem de marcação positiva de caspase-3 activa foi de 6,59 ± 3,81% para as células de Sertoli, 10,3 ± 5,42% para as células germinativas e 7,86 ± 3,61% para as células intersticiais. No grupo pós-natal os valores foram respectivamente, 12,64 ± 6,66%, 23,0 ± 12,0%; 11,4 ± 3,69%. Para o grupo das crianças foram 12,62 ± 6,97%; 21,3 ± 11,6%; 13,1 ± 4,85%.

Em conclusão, durante período de recém-nascidos há um vigoroso crescimento testicular que depois estabiliza nos primeiros anos da puberdade. Este aumento é acompanhado por uma diminuição da taxa de apoptose, cujos factores que influenciam ainda não estão estudados. Contudo, é notável que esta alteração ocorre antes do pico de testosterona, depois da activação gonadal pós-natal, no primeiro trimestre de vida. As mudanças que ocorrem durante os primeiros meses de vida podem ser importantes para definir a função testicular nos adultos (Berensztein *et al*, 2002).

Como se pode observar por esta revisão completa da literatura em relação a estudos de apoptose no epitélio germinal masculino humano, não existe um único que tenha utilizado metodologias quantitativas rigorosas e robustas (apenas usaram metodologias semiquantitativas), pelo que se torna difícil retirar qualquer conclusão definitiva. Um outro problema que ressalta dos estudos acima referidos é que pelo facto de terem utilizado uma grande mistura de síndromes (pacientes), as conclusões também se tornam muito difíceis de estabelecer de um modo rigoroso, havendo mesmo, com frequência, conclusões contraditórias.

Pelo contrário, no presente estudo utilizamos técnicas de estereologia que permitem inferir de uma análise bidimensional (secções histológicas) os volumes celulares (análise tridimensional). As técnicas estereológicas foram aplicadas aos túbulos seminíferos dos cortes histológicos e depois foi possível extrapolar os resultados para o volume testicular total por termos determinado o volume testicular dos pacientes no momento das biópsias. A outra originalidade do presente estudo foi de se proceder a uma determinação dos níveis apoptóticos em todos os tipos celulares do epitélio germinal masculino humano, ou seja, nas células de Sertoli (somáticas, de suporte e nutritivas), nas espermatogónias A (células estaminais adultas), nos espermatócitos primários (meiose I), nos espermatócitos secundários (meiose II) e nos espermatídeos redondos (células haplóides). A outra originalidade do presente estudo foi a de se calcular os volumes de cada tipo celular em vez de estabelecer índices apoptóticos. De facto, os índices apoptóticos acima utilizados pelos outros autores possuem um valor muito duvidoso, pois referem-se a percentagens de células positivas num total muito variável de misturas de células diferentes.

Para o presente estudo, decidimos apenas estudar a azoospermia obstrutiva, por ser a principal causa de azoospermia nos humanos. Como controlos, usamos biópsias de pacientes sem obstrução dos canais genitais excretores. Em todos os casos, a espermatogénese encontrava-se conservada no sentido de que havia produção de espermatozóides no testículo de todos os pacientes.

Os resultados foram surpreendentes. Em primeiro lugar, verificamos inequivocamente que as taxas de apoptose estão de facto aumentadas nos pacientes com azoospermia obstrutiva, o que está de acordo com o teoricamente esperado (Almeida *et al*, 2005). Determinamos também pela primeira vez que, nos controlos, a célula mais frequentemente atingida por apoptose é a célula de Sertoli, seguida pelos espermatócitos primários, as espermatogónias, os espermatócitos secundários e os espermatídeos redondos. Esta conclusão está de acordo com os resultados acima descritos por outros autores em relação às células germinais, mas viola o princípio de que as células de Sertoli se encontram poupadas.

Pelo contrário, os nossos resultados demonstram diferenças muito significativas na azoospermia obstrutiva. Assim, tal como para os controlos, na presença de obstrução dos canais genitais excretores extratesticulares, a célula mais frequentemente atingida por apoptose é a célula de Sertoli, seguida pelos espermatócitos primários, as espermatogónias, os espermatócitos secundários e os espermatídeos redondos. No entanto, na azoospermia obstrutiva, as taxas de apoptose são muito maiores nas células germinativas diplóides, que são as responsáveis pela proliferação e diferenciação celulares. Este resultado permite, assim, explicar porque é que na azoospermia obstrutiva os pacientes apresentam na realidade uma forte diminuição da produção de espermatozóides com o decorrer do tempo (Sousa *et al*, 1999, 2002a, 2002b).

Em relação à presença de caspase 3 activa nas células de Sertoli, resultado que contraria o paradigma de que as células de Sertoli se encontram poupadas (ver os resultados acima descritos pelos outros autores), pensamos, no entanto, que os nossos resultados têm uma explicação plausível. Por um lado, como o número de células germinais está dependente do número de células de Sertoli, a morte de células germinais implicará também a necessidade da morte das células de suporte. Por outro lado, os nossos resultados mostram que o estímulo obstrutivo

provoca uma forte descamação celular, sobretudo das células de Sertoli, local onde estas entram em apoptose e acabam forçosamente por degenerar.

6. ABORDAGEM PEDAGÓGICA

O trabalho desenvolvido, a nível científico, permitiu aumentar significativamente o *background* para o ensino da Biologia. Foi possível contactar novamente com o Laboratório, uma relação fundamental para a actualização e aprofundamento do conhecimento e a correlativa promoção da qualidade do ensino. O afastamento inevitável da componente prática após a conclusão da licenciatura fez com que fosse importante voltar ao contacto com o mundo do Laboratório onde tudo está na "crista da onda", permitindo, assim, renovar a destreza e o à vontade perante a ciência.

Fazendo uma análise dos Programas actuais do Ensino Básico e Secundário, foi possível verificar a importância do tema desta dissertação, nos níveis do ensino Básico e Secundário, em particular, nos 12º, 11º e 9º anos de escolaridade.

A disciplina de Biologia constitui para o 12º ano uma das opções da componente de formação específica do Curso Científico - Humanístico de Ciências e Tecnologias, com programa nacional. Visa o aprofundamento dos saberes construídos nas disciplinas estruturantes do curso, de modo a alargar o espectro de conhecimentos e competências dos alunos, perspectivando também as suas opções de prosseguimento de estudos a nível superior (Mendes *et al*, 2004).
O tema central do programa de Biologia do 12º ano é "A BIOLOGIA E OS DESAFIOS DA ACTUALIDADE". O estudo de aspectos biotecnológicos está presente em todas as unidades distanciando-se, porém, da tradicional oposição ciência – básica e ciência – aplicada. Pretende-se enfatizar a influência que, actualmente, a Biologia e a Biotecnologia exercem sobre a vida das pessoas, visando-se, por isso, tanto o conhecimento de exemplos de produtos e serviços, como a reflexão sobre aspectos de natureza social, económica e ética que contextualizaram a sua génese e/ou influenciaram a sua aplicabilidade (Mendes *et al*, 2004).

O trabalho desenvolvido neste estudo pode desempenhar uma importância crucial na leccionação das seguintes unidades:

- Unidade 1 - REPRODUÇÃO E MANIPULAÇÃO DE FERTILIDADE: centra o estudo na reprodução humana e na compreensão de alguns processos biotecnológicos que permitem a sua manipulação, ponderando a sua importância no controlo de natalidade das populações humanas e a resolução de problemas de infertilidade.
- Unidade 2 – PATRIMÓNIO GENÉTICO: confere enfoque ao estudo dos genes, nomeadamente a sua natureza e carácter hereditário, a sua regulação e alteração, com implicações ao nível da qualidade de vida dos indivíduos e da biodiversidade; contempla, ainda, a perspectiva dos genes como património evolutivo das espécies e como campo de intervenção biotecnológica.
- Unidade 3 – IMUNIDADE E CONTROLO DAS DOENÇAS: estuda o sistema imunitário humano, explora algumas das principais reacções de defesa do organismo, bem como o desenvolvimento de algumas soluções biotecnológicas que visam melhorar processos de diagnóstico e terapêutica de doenças.

Os programas de Biologia para o 10º e 11º Anos de Escolaridade estão organizados não só na perspectiva histórica da construção dos saberes, como também na organização e compreensão especializada dos mesmos. Esta opção dos programas teve na sua base vários motivos. Em primeiro lugar, trata-se da primeira vez que os alunos contactam com a Biologia como uma área específica da ciência, tornando-se, assim, fundamental apresentar a Biologia como um todo, quer na identificação do seu objecto de estudo (a VIDA), quer na apresentação articulada de conhecimentos que engloba actualmente. Em segundo lugar, após a abordagem compartimentada dos saberes segue-se, nos níveis de ensino subsequentes, por um aprofundamento dos mesmos. Este facto leva a que, dificilmente, nos programas de estudo actuais, o aluno tenha possibilidade de obter uma visão integrada e reflectida da ciência biológica. Finalmente, o ensino

da Biologia na Educação para a Cidadania assume uma inesquestionável pertinência e acuidade. Assim, no final do Ensino Secundário, deve ter sido transmitido um conjunto de conhecimentos e competências que permitam ao aluno enquanto cidadão interagir consciente e construtivamente com a sociedade e o ambiente e formar um sistema de valores que proporcione um relacionamento recíproco e responsável, não só com os seus concidadãos, mas também com os outros seres vivos. Este objectivo não se compadece com o ensino compartimentado da Biologia, pelo que é necessário que a Biologia seja apresentada de uma forma integrada e articulada (Silva *et al*, 2003).

Fazendo uma integração com o estudo efectuado na dissertação, foi possível estabelecer uma relação nas Unidades 5 - CRESCIMENTO E RENOVAÇÃO CELULAR e 6 – REPRODUÇÃO.

O ensino das Ciências no Ensino Básico é fundamental, correspondendo a uma preparação inicial, que será aprofundada posteriormente no ensino Secundário, apenas para uma minoria. O Ensino Básico para as Ciências tem como objectivo proporcionar aos alunos um despertar da curiosidade perante o mundo natural à sua volta e criar um sentimento de admiração, entusiasmo e interesse pela Ciência. Paralelamente pretende propiciar uma compreensão geral e alargada das concepções das estruturas explicativas da Ciência, bem como dos procedimentos de investigação científica, de modo a sentir confiança na abordagem de questões científicas e tecnológicas. E acima de tudo, questionar o comportamento humano perante o mundo, bem como o impacto da Ciência e da Tecnologia no nosso ambiente e no nosso quotidiano.

No 9º Ano de Escolaridade aborda-se o tema "VIVER MELHOR NA TERRA", o qual visa a compreensão de que a qualidade de vida implica saúde e segurança, numa perspectiva individual e colectiva. O conhecimento na área da biotecnologia é fundamental para a qualidade de vida, sendo esta uma área relevante na

sociedade científica e tecnológica do mundo em que vivemos. Neste tema é fundamental abordar problemáticas do ponto de vista da saúde individual (o corpo humano, seu funcionamento e equilíbrio), do ponto de vista de segurança e saúde globais, em interacção com os outros e o meio. Aqui, a Saúde é entendida como qualidade de vida para a qual contribui um modo correcto de estar no mundo. A identificação de comportamentos de risco pode desencadear a pesquisa, a resolução de problemas, o debate e a comunicação, com vista à intervenção e à proposta de soluções. A análise de posições científicas controversas, o levantamento de problemas na escola, a discussão de temas actuais no mundo podem conduzir à tomada de consciência sobre a importância de cada um não se alhear dos problemas e respectivas soluções, identificando os contributos da Ciência e da Tecnologia na resolução desses problemas (Galvão *et al*, 2001).

Fazendo um enquadramento do programa do 9º Ano de Escolaridade ao trabalho elaborado na tese, foi possível estabelecer uma estreita relação com a unidade – SEXUALIDADE E TRANSMISSÃO DA VIDA.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

À medida que foram sendo efectuadas variadíssimas pesquisas sobre o tema em estudo, foi possível constatar que de todos os trabalhos feitos anteriormente por variados autores, nunca foram aplicadas metodologias suficientemente credíveis para se poder tirar uma conclusão definitiva. Por toda esta falta de rigor, tornou-se essencial iniciar um estudo através do qual seja possível tirar conclusões exactas e cientificamente credíveis.

A população em análise foi constituída por pacientes em que a espermatogénese se encontrava conservada. A patologia seleccionada foi a azoospermia obstrutiva, uma vez que esta é a principal causa de azoospermia nos humanos. Foi então aplicado um exaustivo estudo de modo a determinar os níveis apoptóticos em todos os tipos celulares do epitélio germinal masculino humano, bem como calcular os volumes de cada tipo celular.

As informações contidas neste estudo fornecem informações importantes a respeito da apoptose das células do epitélio germinal masculino numa amostra de pacientes com azoospermia obstrutiva, podendo ser a base para novas pesquisas. Será importante fazer novos estudos com outros membros apoptóticos e outros tipos de pacientes, contudo é fundamental que seja aplicada a mesma metodologia de estudo, permitindo retirar conclusões plausíveis e rigorosas com todo o interesse científico e clínico.

8. BIBLIOGRAFIA

- Abe Y, Matsumoto S, Wei S, Nezu K, Miyoshi A, Kito K, Ueda N, Shigemoto K, Hitsumoto Y, Nikawa J (2001). "Cloning and characterization of a p53-related protein kinase expressed in interleukin-2-actived cytotoxic T-cells, epithelial tumor cell lines, and the testes". The Journal of Biological Chemistry, **276**(47): 44003-44011.

- Abend M, Port M, Schmelz H, Kraft K (2004). "Significance of apoptosis in metastasizing testis tumors". Urol Res., **32**:28-35.

- Almeida C, Cardoso M, Sousa M, Viana P, Gonçalves A, Silva J, Barros A (2005). "Quantitative study of caspase-3 activity in semen and after swim-up preparation in relation to sperm quality". Human Reproduction, **20**(5): 1307-1313.

- Ashkenazi A and Dixit V (1998). "Death Receptors: Signaling and Modulation". Science, **281**:1305-1308.

- Barinaga, M (1996). "Forging a Path to Cell Death". Science, **273**: 735-737.

- Barlow C, Liyanage M, Moens P, Tarsounas M, Nagashima K, Brown K, Rottinghaus S, Jackson S, Tagle D, Ried T (1998). "Atm deficient results in severe meiotic disruption as early as leptonema of profase I". Development, **125**: 4007-4017.

- Bartke A (1995). "Apoptosis of male germ cells, a generalized or a cell type-specific phenomenon?" Endocrinology **136**: 3-4.

- Berensztein E, Sciara M, Rivarola M, Belgorosky A (2002). "Apoptosis and proliferation of human testicular somatic and germ cells during prepuberty:

high rate of testicular growth in newborns mediate by decreased apoptosis". The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, **87**(11): 5113-5118.

- Bernardi, P, Scorrano, L, Colonna, R, Petronilli, V and Di Lisa, F (1999). "Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues." Eur J Biochem**, 264**(3): 687-701.

- Beumer T, Kiyokama H, Roepers-Gajadien H, Bos L, Lock T, Gademan I, Rutgers D, Koff A, Rooij D (1999). "Regulatory Role of p27 in the Mouse and Human Testis". Endocrinology, **140**(4): 1834-1840.

- Beumer T, Roepers-Gajadien H, Gademan I, Buul P, Gil-Gomez G, Rutgers D, Rooij D (1998). "The role of the tumor suppressor p53 in spermatogenesis". Cell Death and Differentiation, **6**: 669-677.

- Billig A, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M and Hsueh A (1995). "Apoptosis in Testis Germ Cells: Developmental Change in Gonadotropin Dependence and Localization to Selective Tubule Stages". Endocrinology, **136**(1): 5-12.

- Billig H, Chun S, Eisenhauer K, Hsueh A (1996). "Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise". Human Reproduction, **2**(2): 103-117.

- Blanchard K, Allard E, Boekelheide K (1996). "Fate of Germ Cells in 2,5-Hexanedione-Induced Testicular Injury". Toxicology and Applied Pharmacology, **137**: 141-148.

- Blanco-Rodrígez J (1998). "A mater of death and life: the significance of germ cell death during spermatogenesis". International Journal of Andrology, **21**(5): 236-246.

- Blanco-Rodríguez J and Martínez-García C (1999). "Apoptosis is Physiologically Restricted to a Specialized Cytoplasmic Compartment in Rats Spermatids". Biology of Reproduction, **61**: 1541-1547.

- Bloom W and Fawcet D (1994). "A textbook of histology." New York: Chapman and Hall: 768-815.

- Borner, C (2003). "The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions." Mol Immunol, **39**(11): 615-47.

- Chen M and Wang J (2002). "Initiator caspases in apoptosis signaling pathways". Apoptosis, **7**(49): 313- 319.

- Cohen, G (1997). "Caspases: the executioners of apoptosis". Biochem. J, **326**: 1-16.

- Cory S and Adams JM (1998). "The Bcl2 protein family: arbiters of cell survival." Science, **281**:1322-1326.

- Cory, S and Adams, JM (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." Nat Rev Cancer, **2**(9): 647-56.

- Dirami G, Ravindranath N, Kleinman H, Dym M (1995). "Evidence that basement membrane prevents apoptosis of Sertoli cells in vitro in the absence of known regulators of Sertoli cell function". Endocrinology, **136**(10): 4439-4447.

- Dufner A, Pownall S, Mak T (2005). "Caspase recruitment domain protein 6 is a microtubule-interacting protein that positively modulates NF-κB activation". PNAS, **103**(4): 988-993.

- Duke RC; Witter RZ; Nash PB; Young JDE, and Ojcius DM (1994). "Cytolysis mediated by ionophores and pore-forming agents: role of intracellular calcium in apoptose". FASEB J, **8**: 237-246.

- Dunkel L, Hirvonen V, Erkkilä (1997). "Clinical aspects of male germ cell apoptosis during testis development and spermatogenesis". Cell Death and Differentiation, **4**: 171-179.

- Dunkel L, Taskinen S, Hovatta O, Tilly J, Wikström S (1997). "Germ Cell Apoptosis After Treatment of Cryptorchidism with Human Chorionic Gonadotropin is Associated with Impaired Reproductive Function in the Adult". J. Clin. Invest., **100**(9): 2341–2346.

- Earnshaw W, Martins L e Kaufmann S (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis". Annu. Rev. Biochem, **68**: 383-424.

- Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S (2006). "Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives". Human Reproduction Update, **12**: 275-282.

- Eid N, Shibata M, Ito Y, Kusakabe K, Hammad H, Otsuki Y (2002). "Involvement of Fas system and active caspases in apoptotic signalling in testicular germ cells of ethanol-treated rats". International Journal of Andrology, **25**:159-167.

- Erkkila K, Henrikse K, Hirvonen V, Rannikko S, Salo J, Parvinen M, and Dunkel L (1997). "Testosterone Regulates Apoptosis in Adult Human Seminiferous Tubules *in Vitro*". Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, **82**(7): 2314-2321.

- Erkkila K, Pentikainen V, Wikström M, Parvinen M, Dunkel L (2001). "Partial Oxygen Pressure and Mitochondrial Permeability Transition Affect Germ Cell Apoptosis in the Human Testis" The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, **84**(11): 4253-4259.

- Erster S, Mihara M, Kim R, Petrenko O, Moll U (2004). "In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation". Molecular and Cellular Biology, **24**(15): 6728-6741.

- Esteban R, Chamond R, Sánchez B, Cuevas C, Vargas J, Hidalgo M, Ruiz M (2003). "Apoptosis en el testículo criptorquídico. Implocation de la molécula Fas en su modulación". Cir Pediatr, **16**(1): 17-19.

- Evan G and Littlewood T (1998). "A matter of life and cell death". Science, **281**(5381): 1317-1322.

- Francavilla S, D'Abrizio P, Rucci N, Silvano G, Properzi G, Straface E, Cordeschi G, Necozione S, Gnessi L, Arizzi M, Ulisse S (2000). "Fas and Fas Ligand Expression in Fetal and Adult Human Testis with Normal or Deranged Spermatogenesis". The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, **85**(8): 2692-2700.

- French L, Hahne M, Viard I, Radlgruber G, Zanone R, Becker K, Muller C and Tschopp J (1996). "Fas and Fas Ligand in Embryos and Adult Mice: Ligand Expression in Several Immune-privileged Tissues and Coexpression in Adult Tissues Characterized by Apoptotic Cell Turnover". The Journal of Cell Biology, **133**(2): 335-343.

- Fujisawa M, Hiramine C, Tanaka H, Okada H, Arakawa S, Kamidono S (1999). "Decrease in apoptosis of germ cells in the testes of infertile men with varicocele". World J Urol, **17**: 296-300.

- Galvão C, Neves A, Freire A, Lopes A, Santos M, Conceição M, Vilela M, Oliveira M, Pereira M (2001). " Ciências Físicas e Naturais – Orientação Curriculares – 3º Ciclo d Ensino Básico". Ministérios da Educação.

- Gonçalves T (1998). "A Levedura como modelo de Apoptose: Alterações bioquímicas e ciclo celular". RFML, **III**(3): 357-363.

- Green D and Reed J (1998). "Mitochondria and Apoptosis". Science, **281**(5381): 1309-1312.

- Henriksén K, Kangasniemi M, Parvinen M, Kaipia A, and Hakovirta H (1996). "In vitro, follicle-stimulating hormone prevents apoptosis and stimulates deoxyribonucleic acid synthesis in the rat seminiferous epithelium in a stage-specific fashion". Endocrinology, **137**: 2141-2149.

- Henriksén K, Kulmala J, Toppari J, Mehrotra K, and Parvinen M (1996). "Stage-specific apoptosis in the rat seminiferous epithelium: quantification of irradiation effects". Journal of Andrology **17**: 394-402.

- Hermo L and Clermont Y (1995). "How are germ cells produced and what factors control their production?" *In*: Robaire, B.; Pryor, J.L. & Trasler, J.M. (eds.) Handbook of andrology. São Francisco: American Society of Andrology.

- Hikim A, Lue Y, Swerdloff R (1997). "Separation of germ cell apoptosis from toxin-induced cell death by necrosis using in situ end-labeling histochemistry after glutaraldehyde fixation". Tissue & Cell, **29**(4): 487-493.

- Hikim A and Swerdloff R (1999). "Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis". Reviews of Reproduction, **4**: 38-47.

- Hikim A, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang X, AND Swerdloff R (1998). "Spontaneous Germ Cell Apoptosis in Humans: Evidence for Ethnic Differences in the Susceptibility of Germ Cells to Programmed Cell Death". Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, **83**(1): 152-156.

- Hikim A, Lue Y, Romero M (2003). "Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis". Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, **85**:175-182.

- Holdcraft R and Braun R (2004). "Hormonal regulation of spermatogenesis". International Journal of Andrology, **27**:335–342.

- Holstein A, Schulze W, Davidoff M (2003). "Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment". Reproductive Biology and Endocrinology, **1**(107): 1-16.

- Howard CV and Reed MG (1998). "Unbiased Stereology. Three-dimensional. Measurements in Microscopy". Oxford, Bios Scientific Publishers.

- Huang H, Joazeiro C, Bonfoco E, Kamada S, Leverson J, Hunter T (2000). "The Inhibitor of Apoptosis, cIAP2, Functions as Ubiquitin-Proteins Ligase and Promotes in vitro Monoubiquitination of Caspase-3 and -7". The Journal Biological Chemistry, **275**(35): 26661-26664.

- Ishizaki, Y, Cheng, L, Mudge, AW and Raff, MC (1995). "Programmed cell death by default in embryonic cells, fibroblasts, and cancer cells." Molecular Biology of the Cell, **6**(11): 1443-58.

- Jacobson M, Weil M, Raff M (1997). "Programmed Cell Death in Animal Development". Cell, **88**:347-357.

- Johnson L, Nguyen H, Petty C, Neaves W (1987). "Quantification of Human Spermatogenesis: Germ Cell Degeneration during Spermatocytogenesis and Meiosis in Testes from Younger and Older Adult Men". Biology of Reproduction, **37**: 739-747.

- Johnson L, Petty C, Neaves W (1983). "Further Quantification of Human Spermatogenesis: Germ Cell Loss During Postprophase of Meiosis and its Relationship to Daily Sperm Production". Biology of Reproduction **29**: 207-215.

- Karin M and Lin A (2002). "NF-κB at the crossroads of life and death". Nature Immunology, **3**(3): 221-227.

- Kelekar A and Thompson C (1998). "Bcl-2 family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis". Cell Biology, **8**: 324- 330.

- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972). "Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics." Br. J. Cancer, **26**: 239-257.

- Ketola I, Toppari J, Vaskivuo T, Herva R, Tapanainen J, Heikinheimo (2003). "Transcription Factor GATA-6, Cell Proliferation, Apoptosis, and Apoptosis-Related Proteins Bcl-2 and Bax in Human Fetal Testis". The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, **88**(4): 1858–1865.

- Kim E, Lin W, Abrams J, Lipshultz L (1997). "Image analysis assessment of the abnormal testis biopsy in male infertility". Journal of Urology, **158:** 82-84.

- Kim J, Ghosh S, Weil A, Zirkin B (2001). "Caspase-3 and Caspase-Actived Deoxyribonuclease are Associated with Testicular Germ Cell Apoptosis Resulting from Reduced Intratesticular Testosterone". Endocrinology, **142**(9): 3809-3816.

- Kim S, Yoon Y, Park Y, Seo J, and Kim J (2006). "Involvement of the Fas–Fas ligand system and activecaspase-3 in abnormal apoptosis in human testes with maturation arrest and Sertoli cell– only syndrome". Fertility and Sterility, **87**(3): 547-553

- Knudson C, Tung K, Tourtellotte W, Brown G, Korsmeyer S (1995). "Bax-Deficiente Mice Lymphoid Hyperpalsia and Male Germ Cell Death". Science, **270**: 96-98.

- Krajewska M, Wang H, Krajewski S, Zapata J, Shabaik A, Gascoyne R, Reed J (1997). "Immunohistochemical Analysis of in vivo Patterns of Expression of CPP32 (Caspase-3), a Cell Death Protease". Cancer Research, **57**: 1605-1613.

- Krajewski S, Krajewski M, Reed J (1996). "Immunohistochemical Analysis of *in vivo* Patterns of *Bak* Expression, a Proapoptotic Member of the Bcl-a Protein Family." Cancer Research**, 56**: 2849-2855.

- Kroemer G, Dallaporta, B and Resche-Rigon M (1998). "The mitochondrial death/life regulator in apoptose and necrosis". Ann. Rev. Physiol, **60**:619-642.

- Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiére JL, and Mignotte B (1995). "The biochemistry of programmed cell death". FASEB J., **9**: 1277-1287.

- Lawen A (2003). "Apoptosis—an introduction". BioEssays, **25**:888–896.

- Lee J, Richburg J, Younkin S, and Boekelheide K (1997). "The Fas System Is a Key Regulator of Germ Cell Apoptosis in the Testis". Endocrinology, **138**(5): 2081-2088.

- Leist M and Jaattela M (2001). "Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms". Nature Reviews Molecular Cell Biology, **2**(8): 589-98.

- Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S and Korsmeyer SJ (2002). "Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics". Cancer Cell, **2**(3): 183-92.

- Lin A and Karin M (2003). " NF-κB in cancer: a marked target". Seminars in Cancer Biology, **13**: 107-114.

- Lin W, Lamb D, Lipshultz, Kim E (1999). "The Role of Autosomal Cell Apoptosis Regulator Genes in Human Spermatogenesis". International urology and Nephrology, **31**(2): 237-246.

- Lin W, Lamb D, Wheeler T, Abrams J, Lipshultz L, Kim E (1997). "Apoptotic frequency is increased in spermatogenic maturation arrest and hypospermatogenics states". Journal of Urology, **168:** 1791-1793.

- Lin W, Lamb D, Wheeler T, Lipshultz L, Kim E (1997). "In situ end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis". Fertility and Sterility, **68**(6): 1065-1069.

- Lockshin R and Williams C (1964). "Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths". Journal of Insect Physiology**, 10** (4): 643-649.

- Marchetti C, Gallego M, Defossez A, Formstecher P and Marchetti P (2004). "Staining of human sperm with fluorochrome-labeled inhibitor of caspases to detect actived caspases: correlation with apoptosis and sperm parameters". Human Reproduction, **19**(5): 1127-1134.

- Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R (2005). "Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction". Human Reproduction, **20**(12): 3459-3468.

- Martincic D, Klun I, Zorn B, Vrtovec H (2001). "Germ cell apoptosis in the human testis". Eur J Physiol, **442**(1): R159-R160.

- Masumoto J, Taniguchi S, Nakayama J, Shiohara M, Hidaka E, Katsuyama T, Murase S, Sagara J (2001). "Expression of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, a pyrin N-terminal homology domain-containing protein, in normal human tissues". The Journal of Histochemistry & Cytochemistry, **49**(10): 1269-1275.

- May P and May E (1999). "Twenty years of p53 research: structural and functions aspects of the protein". Oncogene, **18**: 7621-7636.

- McClure R, Heppelmann C, and Paya C (1999). "Constitutive Fas Ligand Gene Transcription in Sertoli Cells Is Regulated By Sp1". The Journal of Biological Chemistry, **274**(12): 7756-7762.

- Meistrisch M (1993). "Effects of Chemotherapy and Radiotherapy on Spermatogenesis". Eur Urol, **23**: 136-142.

- Mendes A, Rebelo D, Pinheiro E (2004). "Biologia 12º Ano - Curso Científico-Humanístico de Ciências e Tecnologias". Ministério da Educação, Direcção-Geral de Inovação e de Desenvolvimento Curricular.

- Mullauer L, Gruber P, Sebinger D, Buch J, Wohlfart S, Chott A (2001) "Mutations in apoptosis genes: a pathogenic factor for human disease". Mut Res, **488**: 211-31.

- Nagata S (1997). "Apoptosis by Death Factor". Cell, **88**:355-365.

- Nicholson D (1999). "Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death". Cell Death and Differentiation, **6**: 1028-1042.

- Nicholson DW and Thornberry NA (1997). "Caspases: killer proteases". TIBS, **22**: 299-306.

- Ofordeme K, Aslan A, Nazir T, Hayner-Buchan A and Kogan B (2005). "Apoptosis and proliferation in human undescended testes". BJU International, **96:** 634–638.

- Oldereid N, Angelis P, Wiger R, Clausen O (2001). "Expression of Bcl-2 family proteins and spontaneous apoptosis in normal human testis". Molecular Human Reproduction, **7**(5): 403-408.

- Oosterhuis G, Mulder A, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk C, Shoemaker J and Vermes I (2000). "Measuring apoptosis in human spermatozoa: biological assay for semen quality?". Fertility and Sterility, **74**(2): 245-250.

- Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, Glandera H (2004). "Activation pattern of caspases in human spermatozoa". Fertility and Sterility, **81**(1): 802-809.

- Pentikainen V, Erkkila K, Dunkel L (1999). "Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro". Am J Physiol, **276**: E310-E316.

- Pentikainen V, Erkkila K, Suomalainen L, Otala M, Pentikainen M, Parvinen M, Dunkel L (2001). "TNFα Down-Regulates the Fas Ligand and Inhibits Germ Cell Apoptosis in the Human Testis" The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, **86**(9): 4480-4488.

- Print C and Loveland K (2000). "Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis". BioEssays, **22**: 423-430.

- Print CG, Loveland KL, Gibson L, Meehan T, Stylianou A, Wreford N, de Kretser D, Metcalf D, Kontgen F, Adams JM, Cory S (1998). "Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant". Proc Natl Acad Sci USA, **95**: 12424-12431.

- Rajah R, Valentinis B, Cohen P (1997). "Insulin-like Growth Factor (IGF)-binding Protein-3 Induces Apoptosis and Mediates the Effects of Transforming Growth Factor-b1 on Programmed Cell Death through a p53- and IGF-independent Mechanism". The Journal of Biological Chemistry, **272**(18): 12181–12188.

- Reijo R, Alagappan R, Patrizio P, Page D (1996) "Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome". Lancet, **347**: 1290-1293.

- Richardson H and Kumar S (2002). "Death to flies: Drosophila as a model system to study programmed cell death." J Immunol Methods, **265**(1-2): 21-38.

- Riedl S and Shi Y (2004). "Molecular Mechanisms of Caspase Regulation During Apoptosis". Nature Reviews/Molecular Cell Biology, **5**: 897-907.

- Rijinders P, Verveld M, Piederiet M, Bras M, Lens J, Zeilmaker (1996). "ivf lab-Laboratory aspects of in-vitro fertilization". N.V. Organon.

- Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, and Vassalli P (1997). "An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis". EMBO J, **16**: 2262-2270.

- Rooij D (2001). "Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells". Reproduction, **121**: 347-354.

- Rotter V, Schwartz D, Almon E, Goldfinger N, Kapon A (1993). "Mice with reduced levels of p53 protein exhibit the testicular giant-cell degenerative syndrome". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**: 9075-9079.

- Rudin CM and Thompson CB (1997). "Apoptose and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death". Ann. Rev. Med., **48**: 267-281.

- Runic R, Lockwood C, Chapelle L, Dipasquale B, Demopoulos R, Kumar A, Guller S (1998). "Apoptosis and Fas Expression in Huma Fetal Membranes". Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, **83**(2): 660-666.

- Russell L, Ettlin R, Hikim A, Clegg E (1990). "Histological and Histopathological Evaluation of the Testis". Cache River Press, Clearwater, FL, 1–275.

- Sadler T. "Langman's Medical Embryology", 8ª Edição, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

- Said T, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A (2004). "Role of caspases in male infertility". Human Reproduction Update, **10**(1): 39-51.

- Sambade C. "A Morte Celular por Apoptose". In Biologia Celular. Edited by LIDEL-Edições Técnicas, Lisboa (Ed.), 1999, 461-479.

- Sano M, Umezawa A, Suzuki A, Shimoda K, Fukuma M, Hata J (2000). "Involvement of EAT/mcl-1, an Anti-apoptotic bcl-2-Related Gene, in Murine Embryogenesis and Human Development". Experimental Cell Research, **259**: 127-139.

- Saraste A and Pulkki K (2000). "Morphologic and biochemical hallmarks of apoptose". Cardiovasc Res, **45**(3): 528-37.

- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH and Peter ME (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." Embo J **17**(6): 1675-87.

- Schmelz H, Abend M, Kraft K, Hauck E, Weidner W, Beuningen D, Sparwasser C (2002). "Fas/Fas Ligand System and Apoptosis Induction in Testicular Carcinoma". Cancer, **95**(1): 73-81.

- Scorrano L and Korsmeyer SJ (2003). "Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members". Biochem Biophys Res Commun, **304**(3): 437-44.

- Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA and Korsmeyer SJ (2002). "A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis". Dev Cell, **2**(1): 55-67.

- Sharpe R (1994). "Regulation of spermatogenesis" in: E. Knobil, J.D. Neil (Eds.), The Physiology of Reproduction, Raven Press, New York, 1363–1434.

- Sidransky D (1996). "Clinical implications of the p53 gene". Ann. Rev. Med., **47**: 285-301.

- Silva C, Amador F, Baptista J, Valente R, Mendes A, Rebelo D, Pinheiro E, (2003). "Programa de Biologia e Geologia 10º ou 11º anos - Curso Científico-Humanístico de Ciências e Tecnologias". Ministério da Educação, Departamento do Ensino Secundário.

- Slee E, Harte M, Kluck R, Wolf B, Casiano C, Newmeyer D, Wang H, Reed J, Nicholson D, Alnemri E, Green D, Martin S (1999). "Ordering the Cytochrome c–initiated Caspase Cascade: Hierarchical Activation of Caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a Caspase-9–dependent Manner". The Journal of Cell Biology, **144**(2): 281–292.

- Sousa M, Barros A, Takahashi K, Oliveira C, Silva J, Tesarik J (1999). "Clinical efficacy of spermatid conception. Analysis using a new spermatid classification scheme". Human Reproduction, **14**:1279-1286.

- Sousa M, Cremades C, Alves C, Silva J, Barros A (2002). "Developmental potencial of human spermatogenic cells cocultured with Sertoli Cells". Human Reproduction, **17**: 161-172.

- Sousa M, Cremades C, Alves C, Silva J, Barros A (2002b). "Developmental potential of human spermatogenic cells cocultured with Sertoli cells". Human Reproduction, **17**:161-172.

- Sousa M, Cremades N, Silva J, Oliveira C, Teixeira da Silva J, Viana P, Ferras L, 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". Human Reproduction, **17**: 1800-1810.

- Sousa M, Cremades N, Silva J, Oliveira C, Teixeira da Silva J, Viana P, Ferrás L, Barros A (2002a). "Predictive value of testicular histology in secretory azoospermic subgroups and clinical outcome after microinjection of fresh and frozen-thawed sperm and spermatids". Human Reproduction, **17**:1800-1810.

- Sousa M; Azevedo C (2005). "Fertilização animal". In: Biologia Celular e Molecular. Azevedo C (ed). Porto: Edições Técnicas Lidel, 445-460.

- Suomalainen L, Dunkel L, Ketola I, Eriksson M, Erllilä K, Oksjki R, Taari K, Heikinheimo M, Pentikainen V (2004). "Activator protein-1 in human male germ cell apoptosis". Molecular Human Reproduction, **10**(10): 743-753.

- Suzuki Y, Nakabayashi Y, Nakata K, Reed J, Takahashi R (2001). "X.linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) Inhibits Caspase-3 and Caspase-7 in Distinct Modes". The Journal of Biological Chemistry, **276**(29): 27058-27063.

- Tanaka H, Fujisawa M, Tanaka H, Okada H, Kamidono S (2002). "Apoptosis-related protein in the testes of infertile men with varicocele". BJU International, **89**: 905-909.

- Tapanainen J, Tilly J, Vihko K and Hsueh A (1993). "Hormonal Control of Apoptotic Cell Death in the Testis: Gonadotropins and Androgens as Testicular Cell Survival Factors". Molecular Endocrinology, **7**(5): 643-650.

- Tesarik J, Greco E, Cohen-Bacrie P, Mendoza C (1998). "Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure". Mol Hum Reprod, **4**: 757-762.

- Tesarik J, Guido M, Mendoza C, Greco E (1998). "Human Spermatogenesis *in Vitro*: Respective Effects of Follicle-Stimulating Hormone and Testosterone on Meiosis, Spermiogenesis, and Sertoli Cell Apoptosis". Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, **83**(12): 4467-4473.

- Tesarik J, Ubaldi F, Rienzi L, Martinez F, Iacobelli M, Carmen Mendoza C and Greco E (2004)." Caspase-dependent and -independent DNA fragmentation in Sertoli and germ cells from men with primary testicular failure: relationship with histological diagnosis". Human Reproduction, **19**(2): 254-261.

- Tesarik J, Ubaldi F, Rienzi L, Martinez F, Iacobelli M, Mendoza C, Greco E (2004). "Caspase-dependent and -independent DNA fragmentation in Sertoli and germ cells from men with primary testicular failure: relationship with histological diagnosis". Human Reproduction, **19**(2): 254-261.

- Thornberry N and Lazebnik Y (1998). "Caspases: enemies within". Science, **281**: 1312-1316.

- Valentjin AJ, Zouq N and Gilmore AP (2004). "Anoikis." Biochemical Society Transactions, **32** (3):421-425.

- Wolf B and Green D (1999). "Suicidal Tendencies: Apoptotic Cell Death by Caspase Family Proteinases". The Journal of Biological Chemistry, **274**(29): 20049-20052.

- Yan W, Samson M, Jegou B, and Toppari J (2000). "Bcl-w forms complexes with Bax and Bak, and elevated ratios of Bax/Bcl-w and Bak/Bcl-w correspond to spermatogonial and spermatocyte apoptosis in the testis". Mol Endocrinol, **14**: 682-699.

- Zou H, Henzel W, Liu X, Lutschg A and Wang X (1997). "Apaf-1, a Human Protein Homologous to *C. elegans* CED-4, Participates in Cytochrome c–Dependent Activation of Caspase-3". Cell, **90**: 405-413.

9. ANEXOS