

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**

Microscopia de luz e imunofluorescência de alta  
resolução de espermatogônias incluídas  
em resina LR White

**Mestranda:** Amanda Vasconcelos de Albuquerque

**Orientador:** Hélio Chiarini-Garcia

Belo Horizonte  
2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**AMANDA VASCONCELOS DE ALBUQUERQUE**

Microscopia de luz e imunohistoquímica de alta resolução  
de espermatogônias incluídas em resina LR White

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado  
em Biologia Celular da Universidade Federal  
de Minas Gerais, como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular  
Orientador: Hélio Chiarini-Garcia

Belo Horizonte  
2009

Dedico mais essa vitória aos meus pais, João Albuquerque e Niedja Vasconcelos, por acreditarem nos meus sonhos, às vezes mais do que eu mesma.  
E aos meus irmãos, Marcela, Bruno e Gabriel os quais me ensinam diariamente a ser uma pessoa melhor.

**AGRADECIMENTOS:**

- Aos meus pais (João e Niedja) pelo apoio, incentivo e por acreditarem nos meus sonhos;
- Aos meus irmãos (Marcela, Bruno e Gabriel) por me escutarem e me verem chorando pela *webcam* pela milionésima vez e mesmo assim terem tanta paciência comigo;
- Ao meu namorado Bruno que me apoiou desde o início e me deu forças para continuar, embora a distância fosse a nossa maior inimiga;
- À professora Elizabeth Neves que continua sendo minha orientadora querida e que foi uma das grandes responsáveis pela minha vinda para Belo Horizonte;
- Ao professor Hélio que me recebeu de braços abertos, pela excelente orientação e convivência;
- Às professoras Fernanda e Gleydes pela amizade e carinho durante o desenrolar desse projeto;
- Ao quarteto fantástico (Eloína, Juliana e Luciana) que mesmo faltando uma componente, continuaram ouvindo minhas lamentações e felicitações com o mesmo entusiasmo como quando eu estava por perto;
- A todos os meus amigos de Recife (Antenor, Bruno Bastos, Ferrugem, Jorge, Júnior, Levi, Márcia Pimentel, Márcia Regina, Nilson, Olavinho, Serginho, Tio Rico, dentre outros) pelo carinho que fui recebida em todas as férias, saibam que mesmo distante eu penso em cada um de vocês;
- Às maravilhosas novas amigadas de Belo Horizonte (Chicote, Seu João, Luciana Preta, Luciana Loira, Celso, Paolo, Dudu, Flávio, Rebeca, Juliana, Kíssia) por terem se tornado minha família enquanto a minha estava distante;
- Aos companheiros de laboratório (Dani, Micha, Felipe, Renata, Francisco/Geraldo, Débora, Ana Alvarenga, Gisele, Carol, Paula, Letícia e tantos outros) pela troca de conhecimentos e risadas;
- Aos amigos Silvia, Ari, o pequeno Pedro e Maria José por terem me acolhido em sua casa como se eu fosse da família;
- À Maria Luiza, técnica do laboratório, que tanto contribuiu para a realização desse trabalho;
- À secretária da pós-graduação Sibebe, pelo carinho e extrema competência;
- Ao Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB/UFMG;
- Aos meus amigos da disciplina Biologia Celular e Biologia da Reprodução por todos os conhecimentos trocados;
- Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular;
- Aos demais funcionários do Departamento de Morfologia.

### **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

- Gostaria de fazer um agradecimento especial à aluna de doutorado Ana Luiza Alvarenga Drumond pela dedicação e afinco no desenrolar do presente projeto. A participação da mesma foi essencial para a realização deste trabalho.

Essa dissertação foi desenvolvida em parte no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (Liber) do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do Prof. Hélio Chiarini-Garcia e em parte no Departamento de Radiação Oncológica do Instituto do Câncer M.D. Anderson da Universidade do Texas, sob coordenação do professor Marvin L. Meistrich e com o auxílio das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- National Institute of Health (NIH-USA)

“O estudo em geral, a busca da verdade e da beleza são domínios em que nos é consentido ficar crianças toda a vida.”

(Albert Einstein)



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Diferentes tipos espermatogoniais da fase proliferativa ou espermatogonial de camundongos.....	07
<b>Figura 2</b>	Morfologia de túbulos seminíferos submetidos à diferentes fixadores e meios de inclusão..	21
<b>Figura 3</b>	Identificação dos diversos tipos espermatogoniais submetidos à diferentes fixadores e meios de inclusão.....	22
<b>Figura 4</b>	Comparação entre diferentes fluorocromos para marcação de BrdU, em secções fixadas com 4% de paraformaldeído e incluídas em parafina.....	23
<b>Figura 5</b>	Comparação entre diferentes fluorocromos para marcação de BrdU, em secções fixadas com 4% de paraformaldeído e incluídas em resina LR White.....	24
<b>Figura 6</b>	Comparação entre diferentes fluorocromos para marcação de BrdU, em secções fixadas com 4% de paraformaldeído + 1,5% de glutaraldeído e incluídas em parafina.....	25
<b>Figura 7</b>	Comparação entre diferentes fluorocromos para marcação de BrdU, em secções fixadas com 4% de paraformaldeído + 1,5% de glutaraldeído e incluídas em resina LR White.....	26
<b>Figura 8</b>	Comparação da imunofluorescência de espermatogônias, em secções fixadas com 4% paraformaldeído e incluídas em parafina ou em resina LR White.....	27
<b>Figura 9</b>	Comparação da imunofluorescência de espermatogônias, em secções fixadas com 4% paraformaldeído + 1,5% de glutaraldeído e incluídas em parafina ou em resina LR White...	28
<b>Figura 10</b>	Identificação morfológica das espermatogônias marcadas pelo BrdU de secções fixadas com 4% paraformaldeído e incluídas em parafina.....	29
<b>Figura 11</b>	Identificação morfológica das espermatogônias marcadas pelo BrdU de secções fixadas com 4% paraformaldeído e incluídas em resina LR White.....	30
<b>Figura 12</b>	Identificação morfológica das espermatogônias marcadas pelo BrdU de secções fixadas com 4% paraformaldeído + 1,5% de glutaraldeído e incluídas em parafina.....	31
<b>Figura 13</b>	Identificação morfológica das espermatogônias marcadas pelo BrdU (FITC) de secções fixadas com 4% paraformaldeído + 1,5% de glutaraldeído e incluídas em resina LR White...	32
<b>Figura 14</b>	Identificação morfológica das espermatogônias marcadas pelo BrdU (Alexa Fluor 594) de secções fixadas com 4% paraformaldeído + 1,5% de glutaraldeído e incluídas em resina LR White.....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS

1.  $A_{ind}$  – espermatogônia do tipo A indiferenciada;
2.  $A_{is}$  – espermatogônia do tipo A isolada;
3.  $A_{pr}$  – espermatogônia do tipo A pareada;
4.  $A_{al}$  – espermatogônia do tipo A alinhada;
5.  $A_1$  – espermatogônia diferenciada do tipo  $A_1$ ;
6.  $A_2$  – espermatogônia diferenciada do tipo  $A_2$ ;
7.  $A_3$  – espermatogônia diferenciada do tipo  $A_3$ ;
8.  $A_4$  – espermatogônia diferenciada do tipo  $A_4$ ;
9.  $I_n$  – espermatogônia diferenciada do tipo intermediária;
10.  $B$  – espermatogônia diferenciada do tipo  $B$ .
11. MLAR – Microscopia de Luz de Alta Resolução

## SUMÁRIO

1. RESUMO.....	1
2. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	2
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Métodos de preparação histológica para estudos imunohistoquímicos.....	4
3.2. Resina acrílica LR White em estudos imunohistoquímicos.....	5
3.3. Espermatogônias utilizadas como modelo experimental.....	6
3.4. Marcação espermatogonial com a bromodeoxiuridina.....	8
3.4. Proteínas e genes expressos pelas espermatogônias.....	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
4.1. Animais.....	10
4.2. Grupos experimentais.....	10
4.3. Coleta e fixação dos testículos.....	10
4.4. Inclusão e microtomia em parafina e resina LR White.....	11
4.5. Métodos imunohistoquímicos para marcação de BrdU.....	12
4.6. Métodos de avaliação morfológica.....	13
5. RESULTADOS.....	14
5.1. Identificação morfológica de espermatogônias sob microscopia de luz.....	14
5.1.1. Testículos e espermatogônias fixados em 4% paraformaldeído.....	14
5.1.2. Testículos e espermatogônias fixados em 4% paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído..	15
5.2. Imunofluorescência de espermatogônias fixadas em 4% paraformaldeído.....	15
5.2.1. Incluídas em parafina.....	16
5.2.2. Incluídas em LR White.....	16
5.3. Imunofluorescência de espermatogônias fixadas em 4% paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído.	16
5.3.1. Incluídas em parafina.....	16
5.3.2. Incluídas em LR White.....	17
5.4. Comparação da imunofluorescência de espermatogônias em diferentes meios de inclusão..	17
5.4.1. Fixadas em 4% paraformaldeído.....	17
5.4.2. Fixadas em 4% paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído.....	18
5.5. Identificação morfológica das espermatogônias sob microscopia de luz após imunofluorescência.....	18
5.5.1. Espermatogônias fixadas em 4% paraformaldeído.....	19
5.5.2. Espermatogônias fixadas em 4% paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído.....	19
6. FIGURAS.....	20
7. DISCUSSÃO .....	34
8. CONCLUSÃO .....	40
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

## 1. RESUMO

Estudos imunohistoquímicos têm sido desenvolvidos rotineiramente utilizando a parafina como meio de inclusão. Entretanto a preservação da estrutura dos tecidos e principalmente os detalhes celulares ficam comprometidos. Estudos recentes demonstram que através da microscopia de luz de alta resolução é possível reconhecer morfológicamente os diferentes tipos espermatogoniais em roedores. Esse reconhecimento foi possível devido ao uso do glutaraldeído como fixador associado à resina epóxi araldite como meio de inclusão. Embora esse método forneça alta qualidade morfológica das imagens, impossibilita estudos imunohistoquímicos uma vez que o glutaraldeído em altas concentrações, associado à resina araldite, bloqueiam sítios antigênicos das células. Desta forma, seria conveniente padronizar um método de estudo que permitisse reconhecer as células morfológicamente e concomitantemente possibilitasse avaliações imunohistoquímicas das mesmas células identificadas anteriormente através da microscopia de luz. Na busca deste método, o presente projeto utilizou como modelo o testículo de camundongos tratados com o marcador de proliferação celular BrdU para visualizar as células que se dividiram através da técnica de imunofluorescência. Os testículos destes animais foram fixados com paraformaldeído ou com mistura de paraformaldeído associado ao glutaraldeído em baixa concentração (1,5%). Em seguida, pequenos fragmentos foram incluídos em resina hidrofílica LR White e, para efeito de comparação, incluídos também em parafina pelo método convencional. Foi observado que o paraformaldeído não preservou adequadamente a morfologia espermatogonial, independente do meio de inclusão utilizado, apesar de ter apresentado uma marcação imunofluorescente intensa. A adição de baixa concentração de glutaraldeído permitiu a identificação morfológica de todos os diferentes tipos espermatogoniais de camundongos, a saber, espermatogônias indiferenciadas ( $A_{ind}$ ) e diferenciadas ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ , In e B) quando incluídas em LR White e permitiu, ao mesmo tempo, a marcação imunofluorescente apesar de fluoescerem numa menor intensidade. Conclui-se que o glutaraldeído, mesmo em pequenas concentrações e, associado a uma resina adequada, pode produzir resultados de alta resolução para avaliações concomitantes entre morfologia e imunomarkação.

**Palavras-chave:** imunohistoquímica, espermatogônia, BrdU, alta resolução

## 2. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Estudos imunohistoquímicos têm sido desenvolvidos rotineiramente utilizando a parafina como meio de inclusão em diversos tipos de tecidos (Shi et al., 2002; Blanco & Robinson, 2004; Galambos et al., 2008) inclusive em tecido testicular (Dü & Loy, 1988; Iwamura et al., 1994; Moisan et al., 2008). As técnicas imunohistoquímicas são empregadas principalmente para se entender os processos moleculares que ocorrem *in vivo*. Entretanto, embora a parafina permita a realização dessas técnicas, a qualidade morfológica dos tecidos e principalmente os detalhes celulares ficam comprometidos.

Trabalhos recentes demonstram que através da microscopia de luz de alta resolução (MLAR) é possível reconhecer morfológicamente os diferentes tipos espermatogoniais em roedores adultos (Chiarini-Garcia & Russel, 2001; Chiarini-Garcia et al., 2003), sendo inclusive possível distingui-los entre os tipos A indiferenciada ( $A_s$ ,  $A_{pr}$ ,  $A_{al}$ ), tipo A diferenciada ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ ), Intermediária e espermatogônia tipo B. Esse reconhecimento foi possível devido ao uso do glutaraldeído como fixador associado à resina epóxi Araldite como meio de inclusão. Embora esse método forneça alta qualidade morfológica das imagens, impossibilita estudos imunohistoquímicos uma vez que o glutaraldeído em altas concentrações associado à resina Araldite pode agir como aprisionadores para algumas proteínas e ácidos nucléicos bloqueando os epítomos das células (Causton, 1984).

Na tentativa de resolver esta questão entre parafina versus resina epóxi, morfologia versus imunohistoquímica, tem sido cada vez mais freqüente a utilização da resina hidrofílica LR White em técnicas de imunomarcção (Souto-Padron, 2007). Essa resina pode ser polimerizadas na ausência de altas temperaturas, permitindo a preservação da antigenicidade tecidual (Osamura et al, 1997).

É grande a aplicabilidade da resina LR White podendo ser utilizada para os mais diversos tecidos (Osamura et al., 2000). Entretanto, até o momento, não se sabe se esta resina pode preservar, tal como a araldite, a morfologia espermatogonial para avaliações sob microscopia de luz de alta resolução e também se ela permite o desenvolvimento de métodos imunohistoquímicos concomitantemente.

## **Objetivo Geral**

Padronizar a técnica de imunofluorescência de alta resolução utilizando a resina LR White para estudo de espermatogônias de camundongos.

## **Objetivos Específicos**

- Verificar comparativamente, o efeito de diferentes aldeídos como fixadores em concentrações variadas sobre a morfologia testicular e espermatogonial, em fragmentos incluídos em parafina e em resina LR White;
- Determinar qual mistura de fixadores possibilite diferenciar morfologicamente os diferentes tipos de espermatogônias de camundongos, através da técnica de microscopia de luz de alta resolução;
- Verificar através de reações imunohistoquímicas se as espermatogônias podem apresentar fluorescência para a bromodeoxiuridina (BrdU), que foi incorporada ao núcleo espermatogonial após injeção da mesma vinte e quatro horas antes do animal ser sacrificado;
- Determinar se as células que foram BrdU imunofluorescentes podem também serem morfologicamente identificadas depois que as mesmas lâminas forem lavadas e coradas com azul de toluidina-borato de sódio.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. Métodos de preparação histológica para estudos imunohistoquímicos

Existe uma grande variedade de métodos imunohistoquímicos para detecção de antígenos em amostras biológicas. O princípio básico da imunohistoquímica é a detecção de uma molécula alvo com a utilização de um anticorpo. Esse anticorpo pode ser marcado por compostos que fornecem cor ou emitem luz visível (uma vez excitados por uma luz com comprimento de onda específico) à microscopia de luz, ou apresetam eletrondensidade à microscopia eletrônica de transmissão ou ainda a formação de elétrons secundários e/ou retro-espalhados em microscopia eletrônica de varredura (Souto-Padron, 2007).

A técnica de imunohistoquímica utilizando-se anticorpo marcado com um fluoróforo foi registrada inicialmente nos trabalhos de Coons e Kaplan em 1950. Atualmente essa técnica é amplamente utilizada seja para localizar diferentes receptores na membrana celular, para localizar proteínas citoplasmáticas e no interior de organelas na célula.

A fixação do material biológico, etapa que antecede a imunohistoquímica, merece alguns cuidados para que haja adequada preservação da antigenicidade tecidual. De um modo geral o formaldeído nascente (recém preparado a partir do paraformaldeído) em tampão fosfato ou cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 é o fixador de escolha.

Existem dois grandes grupos de técnicas imunohistoquímicas: técnica pré-inclusão e a técnica de pós-inclusão (Souza, 2007). Nos métodos de pré-inclusão a reação imunohistoquímica precede as etapas de inclusão de microtomia. É o método normalmente indicado para estudos à microscopia eletrônica. Já nos métodos imunohistoquímicos pós-inclusão, como indica o termo, a reação imunohistoquímica é aplicada diretamente aos cortes histológicos. É o método mais comumente utilizado e emprega a parafina como meio de inclusão, por não bloquear os sítios antigênicos, favorecendo assim a reação com os anticorpos. No entanto, este método, tem como desvantagem a baixa qualidade morfológica, não preservando bem detalhes citológicos sob a microscopia de luz (Souza, 2007).

### 3.2. Resina acrílica LR White para estudos imunohistoquímicos

Em estudos à microscopia eletrônica de transmissão, as resinas do tipo epóxi (araldite ou epon) são certamente as mais utilizadas. Isso porque elas fornecem uma excelente preservação morfológica dos tecidos, permitindo a obtenção de cortes ultrafinos e possibilitam a visualização de detalhes celulares em secções ultrafinas que não são possíveis de serem observados utilizando-se a parafina (Causton, 1984). No entanto as resinas do tipo epóxi não são as mais indicadas para técnicas imunohistoquímicas pós-inclusão visto que podem produzir uma grande quantidade de ligações cruzadas intermoleculares agindo inclusive como aprisionadores para algumas proteínas e ácidos nucléicos. Além disso, essas resinas possuem baixa absorção de água devido à sua natureza hidrofóbica, são resistentes à luz e a altas concentrações de oxigênio (Causton, 1984).

Na tentativa de resolver esta questão entre parafina e resina epóxi, tem sido cada vez mais freqüente a utilização de dois grupos de resinas acrílicas em técnicas de imunomarcção: as acrílico-aromáticas (LR White e LR Gold) e as acrílico-alifáticas (Lowicryl e Unicryl) (Souto-Padron, 2007). Tanto a resina LR White quanto a Lowicryl podem se infiltrar no tecido na ausência de altas temperaturas, permitindo a preservação da antigenicidade tecidual (Osamura et al, 1997). Fazendo-se uma comparação entre a preservação morfológica de tecidos incluídos na resina LR White daqueles incluídos rotineiramente em resina epóxi, Sakai e colaboradores (2005) afirmaram não haver diferenças na ultraestrutura do tecido entre ambos os meios de inclusão.

A resina acrílica LR White utilizada no presente trabalho possibilita a manutenção de um ambiente polar durante a troca de solventes e resina, evitando a destruição de ligações inter e intramoleculares, garantindo o caráter antigênico da amostra. Além disso, o uso de baixa temperatura durante a desidratação e inclusão, assim como a polimerização com luz UV também garantem uma melhor preservação das características antigênicas das amostras (Souto-Padron, 2007).

A aplicabilidade da resina LR White na imunohistoquímica para estudos ultraestruturais é extensa considerando a grande variedade de tecidos que podem ser incluídos na mesma (Osamura et al., 2000). Segundo Bowes e colaboradores (2006) essa resina pode ser utilizada para a inclusão de diferentes tecidos tais como rins, fígado, coração, glândula adrenal e adeno hipófise, com o objetivo de localizar a proteína



fumarase. Em técnicas de microscopia eletrônica de transmissão a resina LR White é utilizada para localizar substâncias de diferentes tamanhos moleculares em várias organelas celulares tais como retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi, grânulos secretórios e vesículas secretórias utilizando-se tecido da adenohipófise (Itoh et al. 1996; Osamura et al. 1997). Segundo Osamura e colaboradores (2000) a resina LR White pode ser ainda utilizada para estudar a biologia de células secretoras de hormônios peptídeos mesmo em secções ultrafinas. A resina LR White também pode ser utilizada em técnicas imunohistoquímicas ultraestruturais pós-inclusão de culturas de células retinóicas (Winkler et al., 2002) inclusão de *pellets* de macrófagos (Ghrebi et al., 2007) e de tecidos mineralizados (Aparicio et al., 2002).

Utilizando-se testículo de rato, a resina LR White foi aplicada como meio de inclusão para imunomarcagem de actina no espaço sub-acrossomal das espermátides (Kann & Fouquet, 1989). Essa resina já foi inclusive utilizada em análises morfométricas no estudo da distribuição do DNA de espermátócitos humanos através da imunomarcagem com partículas de ouro, além de ter sido também aplicada na detecção de genes ribossomais humanos (Weipoltshammer, 2000).

Como mencionado acima, são muitas as aplicabilidade da resina LR White para estudos à microscopia eletrônica de transmissão. Entretanto, em algumas situações esta resina hidrofílica pode ser empregada em avaliação sob a microscopia de luz. Consultando a literatura verificou-se que sob determinadas condições de fixação a resina LR White foi utilizada com sucesso para localização de moléculas da junção neuro-muscular (Lanuza et al., 2007), localização de miosina em fibras musculares (Thompson et al., 2000) e localização da proteína TGF $\beta$  e de RNAm em pele humana (Slater & Mason, 1994). No entanto, não foi encontrado nenhum estudo que procurasse correlacionar reações imunohistoquímicas de tecidos incluídos em LR White com a identificação morfológica do mesmo tipo celular imunofluorescente marcado.

### **3.3. Espermatogônia utilizada como modelo experimental**

O processo espermatogênico, ou espermatogênese é constituído de diferentes etapas que ocorrem de forma coordenada no epitélio seminífero, culminando com a formação dos espermatozóides. Entre estes processos os mais evidentes são (1) o

aumento do número de células germinativas através de uma série de mitoses espermatogoniais, (2) a divisão meiótica, com formação das células haplóides e (3) a drástica diferenciação destas células haplóides, as espermatídes, formando espermatozóides morfo-funcionalmente aptos para a fertilização. Este processo tem início com a divisão das células-tronco, denominadas de espermatogônias-tronco. Nos animais sexualmente maduros, as espermatogônias podem ser classificadas em dois grupos: espermatogônias indiferenciadas (imaturas) e diferenciadas (maduras) (de Rooij, 1998; de Rooij & Grootegoed, 1998; de Rooij & Russell, 2000). No primeiro grupo encontram-se as espermatogônias A isoladas (Ais) também denominadas de espermatogônias-tronco, as espermatogônias A pareadas (Apr) e as espermatogônias A alinhadas (Aal). No segundo grupo são descritas as espermatogônias do tipo A diferenciadas (A1, A2, A3 e A4), intermediárias (In) e espermatogônias do tipo B. O esquema a seguir (Figura 1) ilustra a provável constituição de diferentes clones no camundongo desde a espermatogônia A isolada (Ais) até a última geração de espermatogônia, do tipo B (de Rooij & Russell, 2000; de Rooij, 2001). O número de gerações de espermatogônias diferenciadas varia nas diversas espécies de mamíferos (Russell et al., 1990; de Rooij & Grootegoed, 1998).



Ais ► Apr ► Aal (Aal-4, ► Aal-8 ► Aal-16) ⇒ A1 ► A2 ► A3 ► A4 ► In ► B

**Figura 1.** Divisões mitóticas (cabeças-de-seta preta) de cada um dos diferentes tipos de espermatogônias da fase proliferativa ou espermatogonial de camundongos. As espermatogônias Ais são as células-tronco do processo espermatogênico e, desta forma, têm a capacidade de se auto-renovarem (seta curva), Apr: espermatogônia pareada, Aal: espermatogônia alinhada, entre as Aal e A1 (seta clara) não ocorre divisão e sim diferenciação celular. A1: espermatogônia do tipo A1, A2: espermatogônia do tipo A2, A3: espermatogônia do tipo A3 e A4: espermatogônia do tipo A4.

A caracterização morfológica das espermatogônias A até meados de 2000 era bastante precária (Clermont & Bustos-Obregon, 1968; Oakberg, 1971; Huckins, 1978), devido à baixa resolução das fotomicrografias e à inadequada preservação dos tecidos. Estes fatores dificultavam a diferenciação com precisão de detalhes morfológicos das espermatogônias, principalmente daquelas do tipo A1-A4, mostrando que as mesmas possuíam particularidades. No entanto, estudos recentes em camundongos (Chiarini-Garcia & Russell, 2001), ratos (Chiarini-Garcia et al., 2003), hamsters (Nascimento et al., 2009), jumentos (Chiarini-Garcia et al., 2009) e sagüis (Alves-Freitas et al., em preparação) demonstraram ser possível caracterizar morfológicamente e com segurança,

os vários tipos de espermatogônias A, através de técnica conhecida como microscopia de luz de alta resolução (Chiarini-Garcia & Meistrich, 2008). Esta técnica baseia-se na alta qualidade de fixação com glutaraldeído e inclusão em resina araldite dos testículos, aliados à pequena espessura (1  $\mu\text{m}$ ) das secções histológicas. A possibilidade de se diferenciar morfológicamente estes tipos celulares entre si permitiu o estudo do posicionamento destas células no perímetro dos túbulos seminíferos. Estudos neste sentido demonstraram, pela primeira vez, que as espermatogônias indiferenciadas estão posicionadas em locais específicos nos túbulos seminíferos próximos ao interstício e consequentemente aos vasos sanguíneos, denominados de nichos espermatogoniais. Estes nichos foram identificados em camundongos (Chiarini-Garcia et al., 2001), ratos (Chiarini-Garcia et al., 2003), hamsters (Nascimento et al., 2009) e jumentos (Chiarini-Garcia et al., 2009).

Embora a morfologia permita reconhecer as espermatogônias e estabelecer sua cinética e nichos, essa análise está sujeita a erros decorrentes da relativa semelhança morfológica de um mesmo tipo espermatogonial, motivo pelo qual o indivíduo que faz a análise deve utilizar vários critérios morfológicos. No entanto, quando os tecidos são fixados em glutaraldeído e incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato, apesar dos tecidos apresentarem boa qualidade citológica, quando comparados com tecidos incluídos em parafina, não foi possível distinguir com certeza os diferentes tipos espermatogoniais, mesmo por um indivíduo que utilize os diversos critérios morfológicos (Chiarini-Garcia et al., 2009).

#### **3.4. Marcação espermatogonial com a bromodeoxiuridina**

O bromodeoxiuridina (BrdU), um análogo da timidina tritiada [ $\text{H}_3$ ], tem sido largamente utilizada como marcador de proliferação celular. O BrdU é incorporado especificamente à molécula de DNA de células durante a fase S (síntese) do ciclo celular (Rehen, 2007). Após a incorporação do BrdU, a detecção dessas células é baseada no uso de anticorpos contra o BrdU (Gratzner et al. 1975). Após o estudo de Gratzner, vários outros anticorpos monoclonais anti-BrdU para identificação de células que incorporaram o BrdU tem sido notificados e há uma concordância geral que os resultados obtidos com o uso deste reagente correspondem de forma semelhante àqueles dados obtidos através de radioautografia com timidina tritiada (Magaud et al., 1989).

No caso das células espermatogoniais, pouco se conhece a respeito do controle molecular envolvendo a sua auto-renovação e diferenciação, entretanto, utilizando a técnica de marcação com BrdU, dentre outras, Wu e colaboradores (2008) afirmaram que a caderina PB tipo curto promove a auto-renovação das células tronco espermatogoniais. Foram observadas culturas de células marcadas com BrdU mostrando um aumento da proliferação de células tronco espermatogoniais quando as colônias estavam infectadas com vetor retroviral para caderina PB, se comparadas às culturas controles. A marcação imunohistoquímica para BrdU também tem sido utilizada para determinar quais tipos de espermatogônias proliferam em quais estádios da espermatogênese, assim como para determinar o tamanho dos clones de proliferação espermatogoniais em testículos de primatas (Ehmcke & Schlatt, 2008). A marcação com BrdU foi também essencial nesse mesmo trabalho na caracterização dos clones espermatogoniais ao indicar que o tempo das células na fase S do ciclo celular estava sincronizado.

Como se pode observar o BrdU tem sido largamente utilizado em trabalhos imunohistoquímicos para marcação de diversos tipos celulares, inclusive de espermatogônias, seja para compreender o mecanismo molecular envolvido, seja para acompanhar seu ciclo de auto-renovação e diferenciação.

### **3.5. Proteínas e genes expressos pelas espermatogônias**

Recentemente têm sido descritos vários marcadores moleculares para as células da linhagem espermatogonial. Dos marcadores descritos até o presente momento, alguns são específicos das espermatogônias do tipo A indiferenciadas (GDNF, Plzf, Ngn-3, Sox-3) enquanto outros marcam especificamente espermatogônias do tipo A diferenciadas, Intermediária e tipo B (c-kit, Sohlh-1 dentre outros).

O Plzf (Zfp145) é um fator de transcrição testicular específico de espermatogônias Ais, Apr e Aal e possui um importante papel no controle da auto-renovação e manutenção do *pool* dessas células (Costoya et al., 2004). Segundo Buaas e colaboradores (2004) as células onde o Plzf é expresso são mantidas em estado indiferenciado e a perda da função do Plzf faz com que as células se diferenciem à custa da auto-renovação. Análises histológicas de secções testiculares de camundongos Zfp145<sup>-/-</sup> apresentaram degeneração dos túbulos com depleção das espermatogônias (Costoya et al., 2004).

Logo o Plzf estaria envolvido no equilíbrio entre auto-renovação e diferenciação das células espermatogoniais indiferenciadas.

Ao contrário do Plzf, o Sohlh 1 é fortemente expresso em espermatogônias A1, A2, A3, A4, Intermediária e tipo B, ou seja, espermatogônias diferenciadas (Ballow et al., 2006). Estudos com camundongos *knockouts* para o Sohlh 1 indicaram que as espermatogônias tronco (indiferenciadas) são capazes de proliferar em testículos adultos, mas são incapazes de diferenciar em espermatócitos. Desta forma, o Sohlh 1 está diretamente envolvido no processo de diferenciação espermatogonial e a sua ausência promove a esterilidade (Ballow et al., 2006).

A identificação imunohistoquímica de espermatogônias vem permitindo um maior entendimento da evolução espermatogonial e mecanismos moleculares que ocorrem *in vivo*. Embora o método paraformaldeído/parafina permita a identificação de algumas espermatogônias através de seus marcadores, esse método não permite a identificação morfológica das mesmas. Caso tal identificação fosse possível, comprovaríamos dentre os diversos tipos espermatogoniais, qual deles estariam sendo marcados pelo anticorpo. Desta forma, a padronização de um método que permitisse a identificação imunohistoquímica e ao mesmo tempo a identificação através da microscopia de luz de alta resolução permitiria o estudo acurado dos diferentes tipos espermatogoniais em relação aos vários marcadores conhecidos na atualidade.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Animais

Foram utilizados 4 camundongos machos adultos da linhagem C57BL6, todos com idade entre 115 e 160 dias. Estes animais foram obtidos junto ao Centro de Estudos do Câncer M.D. Anderson, da Universidade o Texas, em Houston, EUA, onde foram mantidos sob fotoperíodo de 12 horas claro por 12 horas escuro e recebendo comida e água à vontade. Os procedimentos desenvolvidos neste projeto foram aprovados pela Associação Americana para Cuidado com Animais de Laboratório, de acordo com regulamentação da USDA e DHHS da NIH.

### 4.2. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, de acordo com as diferentes concentrações de fixadores.

(1) 4% paraformaldeído em tampão cacodilato 0.05M pH 7.2 (n=2)

(2) 4% paraformaldeído + 1.5% glutaraldeído em tampão cacodilato 0.05M pH 7.2 (n=2)

Os fixadores foram preparados no máximo 24 horas antes de serem utilizados, e armazenados em geladeira até o momento da fixação por perfusão intravascular. Utilizou-se formaldeído nascente, preparado a partir do paraformaldeído (Merck -1.04005) e o glutaraldeído grau II ou biológico (50%) da EMS (Cat # 16520).

### 4.3. Coleta e Fixação dos Testículos

Os camundongos receberam cada um uma injeção intraperitoneal de bromodeoxiuridina (BrdU – Sigma, Cat # B5002) na proporção de 60mg/Kg de peso

corporal. Vinte e quatro horas após a injeção de BrdU os animais foram anestesiados com Tiopental (Thiopentax - Cristália) na proporção de 30 mg/kg de peso corporal, via intraperitoneal, e os testículos fixados por perfusão intravascular. Aproximadamente 15 minutos antes do procedimento de perfusão intravascular, injetou-se, por via intraperitoneal, heparina (Liquemine - Roche) na dosagem de 125 UI/kg de peso corporal para evitar coagulação intravascular durante o processo de perfusão. Após este período, procedeu-se a abertura da cavidade torácica com o objetivo de expor o coração. Um cateter (20G - 1,1mm) foi introduzido no ventrículo esquerdo e o leito vascular lavado com solução salina 0,9%, a uma pressão de aproximadamente 80 mmHg. Após a retirada do sangue com a solução salina, procedimento que durou de 5 a 10 minutos, o procedimento de fixação iniciou-se através da perfusão com os diferentes tipos de fixadores, como mencionado anteriormente, por um período de aproximadamente 25 minutos. Em seguida, os testículos foram orquiectomizados, pesados e recortados em pequenos fragmentos de 1 a 2 mm de espessura. Estes fragmentos foram re-fixados por imersão no mesmo tipo de fixador por cerca de 12 horas, a 4°C. Este procedimento baseou-se em método já descrito por Sprando (1990) e Chiarini-Garcia & Meistrich (2008).

#### **4.4. Inclusão e microtomia em parafina e resina LR White**

Os fragmentos dos testículos direitos de cada animal foram incluídos em parafina (Merck, Cat # 1.11609) através de método convencional. Dos blocos foram obtidos cortes histológicos de 5µm de espessura, coletados em lâminas histológicas cobertas com silano (Sigma, A3648), para evitar o descolamento do corte durante o processamento imunohistoquímico. Este material serviu como controle para as reações imunohistoquímicas, visto que conhecidamente dariam reação positiva.

Os fragmentos dos testículos esquerdos foram incluídos na resina hidrofílica LR White (Polysciences, Cat # 17411), para isso os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool 50, 70, 90% (20 minutos cada) e 100%, duas vezes de 20 minutos. Após o último álcool absoluto, os fragmentos foram lentamente infiltrados em uma mistura de etanol 100% e LR White na proporção 1:1 durante 12 horas, posteriormente infiltrados na mesma mistura na proporção 1:3 por mais 12 horas e, finalmente em resina LR White pura, por mais 12 horas. Durante toda a infiltração, os

tecidos foram submetidos a um processo de homogeneização lenta, em equipamento especial para este fim e à temperatura ambiente. A solução de inclusão, foi constituída de uma mistura de resina LR White mais o catalisador (Polysciences, Cat # 17413) numa proporção de 10 $\mu$ L para cada 10mL de resina. Os fragmentos de testículo foram incluídos em cápsulas BEEM (Ted Pella, Inc. Cat # 130-2) completamente preenchidas pela resina e tampadas evitando ao máximo o contato com o oxigênio. As cápsulas foram então levadas para estufa a 60°C, onde permaneceram por aproximadamente 12 horas, para polimerização. Dos blocos foram obtidos cortes semifinos de 1 $\mu$ m de espessura utilizando micrótomo Reichert Jung modelo 1140/Auto Cut e navalhas de vidro. Estes cortes histológicos foram colocados em lâminas de vidro silanizadas para evitar que descolassem durante as reações imunohistoquímicas e coloração histológica com azul de toluidina-borato de sódio.

#### **4.5. Métodos imunohistoquímicos para marcação do BrdU**

Parte dos métodos imunohistoquímicos foram realizados no Departamento de Radiação Oncológica do Instituto do Câncer M.D. Anderson da Universidade do Texas e parte no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (Laber).

Para a identificação de células em proliferação, foram realizados ensaios de imunohistoquímica com o marcador de proliferação celular BrdU. Para isso, as secções cujos fragmentos foram incluídos em parafina foram desparafinizadas através de lavagens sucessivas em xilol, seguido de re-hidratação em álcool (100%, 90% e 70% e água). Os cortes histológicos incluídos em LR White não tiveram a resina retirada dos tecidos e foram processadas diretamente para a hidratação. A partir desse momento, todas as etapas a seguir foram as mesmas para as secções incluídas em parafina e em LR White. Os cortes foram hidratados em água destilada e submetidas à solução de protease a 0.1%, por uma hora, à temperatura ambiente. Após lavagens sucessivas em PBS (tampão fosfato salina), os cortes foram submetidos à desnaturação, para recuperação antigênica, em solução de 2N HCl, por 50 minutos, à temperatura ambiente, em seguida a reação foi neutralizada por imersão das lâminas em 0,1M borato de sódio, por 2 minutos. Os cortes foram permeabilizados em PBS/Triton X-100 (0,2% PBS-T) e incubados em soro normal eqüino para bloquear ligações inespecíficas, por 30 minutos, à 37°C, antes de serem



incubados com anticorpo primário anti-BrdU (IU-4, diluição 1:100), por uma hora, também à 37°C. O anticorpo primário foi diluído em PBS-T, com soro normal eqüino a 10% (Sigma Cat # HO146), e não foi adicionado às secções escolhidas como controle negativo. Depois de lavados em PBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo secundário, cabra-anti-camundongo IgC , conjugados com FITC (diluição 1:100) ou Alexa Fluor-594 (diluição 1:300), ambos por uma hora a 37°C. O anticorpo secundário foi diluído em PBS-T, com 10% de soro normal caprino (Sigma Cat # G9023). As lâminas foram novamente lavadas em PBS-T e montadas com meio de montagem para imunofluorescência contendo iodeto de propídio (para as lâminas marcadas com FITC) e DAPI (para as lâminas marcadas com Alexa Fluor-594).

A análise do material foi realizada em microscópio de epifluorescência, no qual foram obtidas fotomicrografias. Inicialmente as lâminas foram fotografadas com DAPI e o iodeto de propídeo que fluorescem os núcleos das células de uma forma indiscriminada quando se utiliza filtros de comprimento de onda de a 350nm e 536nm, respectivamente. Em seguida, os filtros foram mudados para aqueles que excitam os fluorocromos FITC (490nm) e Alexa Fluor-594 (594nm) que seriam específicos para os anticorpos anti-BrdU utilizados pra marcar as espermatogônias que dividiram no período de 24 horas após injeção do BrdU. Posteriormente as imagens das células marcadas com BrdU (FITC ou Alexa Fluor-594), foram sobrepostas com aquelas imagens dos núcleos marcados com DAPI ou iodeto de propídeo para visualização das células de interesse, ou seja as espermatogônias marcadas para o BrdU. Além disso, foi feito um mapeamento da lâmina em contraste de fase, ou seja, permitir a identificação dos túbulos seminíferos que outrora estavam fluorescentes, depois de retirada a fluorescência através de lavagem com água destilada e de serem corados com azul de toluidina-borato de sódio.

#### **4.6. Métodos de avaliação morfológica**

Após análise sob microscopia de fluorescência e captura de imagens digitais das espermatogônias marcadas para o BrdU, estas lâminas foram desmontadas, ou seja, a lamínula foi retirada e as lâminas foram lavadas com água, secas em chapa quente (~60°C) e posteriormente coradas com azul de toluidina-borato de sódio a 1% e, finalmente, montadas com Entellan (Merck).

Além da identificação dos diferentes tipos espermatogoniais após a imunohistoquímica, também foram realizados estudos de lâminas que não passaram pela imunofluorescência, para se observar se o processamento imunohistoquímico iria interferir de alguma forma na identificação das espermatogônias.

Os diferentes tipos espermatogoniais indiferenciados e diferenciados foram caracterizados baseando-se em estudo prévio desenvolvido por Chiarini-Garcia & Russell (2001) sob microscopia de luz de alta resolução. Imagens digitais no mesmo campo e aumento daquelas obtidas nas avaliações imunofluorescentes foram obtidas utilizando a câmera fotográfica digital Q-Color 3 da Olympus acoplada ao fotomicroscópio Olympus BX-41. As imagens digitais foram posteriormente ajustadas quanto à resolução (600 dpi), foco, contraste e escala de cinza (curva sigmóide) utilizando o programa Adobe Photoshop. Estas imagens foram comparadas com aquelas obtidas nos estudos de imunofluorescência com o objetivo de verificar se aquelas mesmas células marcadas anteriormente para o BrdU podiam ser identificadas morfológicamente em camundongos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Identificação morfológica das espermatogônias em diferentes fixadores e meios de inclusão sob microscopia de luz

O método para identificação dos diferentes tipos espermatogoniais indiferenciados e diferenciados foi baseado em estudo prévio desenvolvido por Chiarini-Garcia & Russell (2001).

#### 5.1.1. Testículo e espermatogônias fixados em 4% paraformaldeído

- **Incluídos em parafina**

Após fixação por perfusão intravascular com paraformaldeído, inclusão em parafina e obtenção de cortes histológicos de 5 $\mu$ m de espessura, os túbulos seminíferos apresentaram-se dispersos com grandes espaços vazios entre eles (Fig. 2A-B). O tecido intersticial pôde ser observado livre entre os túbulos seminíferos formando estruturas livres. No epitélio seminífero podem ser observadas as células de Sertoli e as células germinativas (Fig. 2B), mas sem distinção morfológica precisa entre diferentes tipos celulares.

O processamento paraformaldeído/parafina não preservou adequadamente os detalhes citológicos dos diferentes tipos espermatogoniais de camundongos. Foi possível agrupar, com dificuldade, as espermatogônias em apenas três tipos, aquelas do tipo A, In e B. A associação entre este processamento e a espessura do corte histológico, de 5 micrômetros, não permitiram discriminar morfológicamente os diferentes subtipos de espermatogônia do tipo A indiferenciadas e diferenciadas – A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> e A<sub>4</sub> (Fig. 3).

- **Incluídos em LR White**

Os testículos fixados em paraformaldeído, incluídos em LR White e cortados com 1 $\mu$ m de espessura, apresentaram, à semelhança do observado naqueles incluídos em parafina, grandes espaços vazios artefactuais entre os túbulos seminíferos (Fig. 2C-D).

No epitélio seminífero, as células germinativas foram observadas espalhadas, com bastante espaço entre elas (Fig. 2D), espaços maiores que aqueles vistos nos cortes de parafina.

A fixação em paraformaldeído associado à inclusão em LR White também não permitiu a distinção dos diferentes tipos de espermatogônias do tipo A, tal como observado na inclusão em parafina. Foi possível identificar as espermatogônias apenas como do tipo A (como um único grupo, sem distinção entre os diferentes subtipos) e espermatogônias In e B (Fig. 3).

### **5.1.2. Testículo e espermatogônias fixadas em 4% paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído**

- **Incluídas em parafina**

Os testículos fixados em paraformaldeído + 1,5% de glutaraldeído, incluídos em parafina e cortados com 5 $\mu$ m de espessura, apresentaram a morfologia tubular e o espaço intersticial bem preservado (Fig. 2E-F). Os túbulos seminíferos estão justapostos uns aos outros sem espaço artefactual entre eles.

Adicionando-se 1,5% de glutaraldeído ao paraformaldeído 4%, observou-se que não houve melhora na qualidade morfológica das espermatogônias. Mais uma vez, foi possível apenas identificar as espermatogônias como do tipo A, In e B (Fig. 3).

- **Incluídas em LR White**

Ao adicionar 1,5% de glutaraldeído à solução de paraformaldeído, e após inclusão em LR White e obtenção de cortes de 1 $\mu$ m de espessura, constatou-se que a morfologia tubular e o espaço intersticial estavam muito bem preservados (Fig. 2G-H), isto é, os túbulos seminíferos apresentavam-se justapostos e as células de Sertoli e germinativas encontravam-se coesas e de forma compacta.

A fixação em paraformaldeído acrescido de 1,5% de glutaraldeído, associado à inclusão em LR White, permitiu a identificação morfológica de todos os tipos espermatogoniais de camundongos ( $A_{ind}$ ,  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ , In, B) (Fig. 3).

## **5.2. Imunofluorescência de espermatogônias marcadas com diferentes fluorocromos para BrdU, fixadas em 4% paraformaldeído**

Após o procedimento imunohistoquímico, o material foi analisado sob microscopia de fluorescência, no qual foram capturadas imagens digitais das espermatogônias marcadas para o BrdU. Para comparação da intensidade e especificidade da fluorescência, foram utilizados dois tipos de fluorocromos: a combinação iodeto de propídeo + FITC e a combinação DAPI + Alexa Fluor 594.

### **5.2.1. Incluídas em parafina**

A marcação com iodeto de propídeo assim como o DAPI foram utilizadas para a visualização dos núcleos celulares (Fig. 4A e 4D respectivamente). De acordo com o resultado observado, a visualização dos núcleos foi ligeiramente melhor utilizando-se o DAPI do que o iodeto de propídeo.

As secções fixadas com 4% paraformaldeído e incluídas em parafina mostraram túbulos seminíferos com marcação para o BrdU tanto utilizando o fluorocromo FITC quanto o Alexa Fluor 594 (Fig. 4B e 4E respectivamente). Quando as marcações para núcleo foram sobrepostas às marcações para o BrdU, constatou-se que os núcleos marcados para o BrdU coincidiam com aqueles localizados na base do epitélio seminífero onde sabidamente estão presentes as espermatogônias (Fig. 4C e 4F).

### **5.2.2. Incluídas em LR White**

Assim como realizado nas secções de parafina, foram testados os mesmos dois tipos de fluorocromos para o BrdU incorporado às espermatogônias fixadas em 4% paraformaldeído: as combinações iodeto de propídeo + FITC e DAPI + Alexa Fluor 594.

A intensidade de fluorescência para a marcação nuclear com iodeto de propídeo e DAPI mostrou-se semelhante (Fig. 5A e 5D respectivamente), apesar de terem sido menos intensas que quando incluídas em parafina (ver adiante).

As secções fixadas com 4% paraformaldeído e incluídas em LR White também demonstraram fluorescência para o BrdU tanto utilizando o fluorocromo FITC quanto o

Alexa Fluor 594 (Fig. 5B e 5E, respectivamente) com leve *background* em ambas as figuras quando analisadas ao microscópio de fluorescência. Utilizando esse método, também foi constatado que as marcações das espermatogônias para o BrdU coincidem com as posições das espermatogônias no epitélio seminífero (Fig. 5C e 5F).

### **5.3. Imunofluorescência de espermatogônias marcadas com diferentes fluorocromos para BrdU, fixadas em 4% paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído**

#### **5.3.1. Incluídas em parafina**

Utilizando-se como fixador 4% paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído, também foram testados os mesmos dois tipos de fluorocromos: iodeto de propídeo + FITC ou a combinação DAPI + Alexa Fluor 594.

A intensidade de fluorescência para a marcação nuclear mostrou-se ligeiramente melhor com DAPI (Fig. 6D) do que com o iodeto de propídeo (Fig. 6A) nas secções incluídas em parafina.

As secções fixadas com 4% paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído e incluídas em parafina apresentaram fluorescência para o BrdU utilizando os dois tipos de fluorocromos: FITC e Alexa Fluor 594. Entretanto a intensidade de fluorescência mostrou-se mais acentuada com o fluorocromo Alexa Fluor 594 do que com o FITC (Fig. 6E e 6B, respectivamente). Quando as marcações para núcleos são sobrepostas às marcações para o BrdU, a visualização das espermatogônias marcadas pelo BrdU torna-se mais nítida utilizando-se a combinação DAPI + Alexa Fluor (Fig. 6F) do que a combinação iodeto de propídeo + FITC (Fig. 6C).

#### **5.3.2. Incluídas em LR White**

A marcação nuclear com DAPI (Fig. 7D) mostrou uma intensidade de fluorescência ligeiramente maior do que a marcação com iodeto de propídeo (Fig. 7A), mais uma vez

com leve *background* em ambas as figuras quando observadas ao microscópio de fluorescência.

Assim como nas secções incluídas em parafina, as secções fixadas com 4% paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído e incluídas em LR White também apresentaram melhor fluorescência para o BrdU utilizando-se o fluorocromo Alexa Fluor 594 (Fig. 7E) do que o FITC (Fig. 7B). Assim como em parafina, as sobreposições dos núcleos das espermatogônias tornam-se mais nítidas utilizando-se a combinação DAPI + Alexa Fluor 594 (Fig. 7F) do que a combinação iodeto de propídeo + FITC (Fig. 7C).

#### **5.4. Comparação da imunofluorescência de espermatogônias marcadas com o mesmo fluorocromo em diferentes meios de inclusão**

De acordo com os resultados anteriores, a visualização das espermatogônias marcadas com a combinação DAPI + Alexa Fluor 594 foi melhor do que a combinação iodeto de propídeo + FITC. Por esta razão as comparações a seguir foram feitas apenas com o fluorocromo DAPI + Alexa Fluor 594 que ofereceu melhor resultado.

##### **5.4.1. Fixadas em 4% paraformaldeído**

A visualização dos núcleos marcados com o DAPI foi melhor nas secções incluídas em parafina do que nas incluídas com LR White (Fig. 8A e 8D, respectivamente).

A intensidade de fluorescência na marcação para o BrdU com o Alexa Fluor 594 também foi mais intensa nas secções incluídas em parafina (Fig. 8B) do que naquelas em LR White (Fig. 8E).

Como era de se esperar, quando as imagens são sobrepostas, as secções fixadas com 4% paraformaldeído apresentaram maior intensidade de fluorescência nas espermatogônias marcadas pelo BrdU quando incluídas em parafina (Fig. 8C) do que nas secções fixadas com 4% paraformaldeído e incluídas em LR White (Fig. 8F).

#### **5.4.2. Fixadas em 4% paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído**

Semelhante ao resultado anterior, a visualização dos núcleos marcados com DAPI foi melhor nas secções incluídas em parafina (Fig. 9A) do que em LR White (Fig. 9D).

A marcação para o BrdU com o Alexa Fluor 594 também foi mais intensa nas secções incluídas em parafina do que naquelas incluídas em LR White (Fig. 9B e 9E, respectivamente).

Quando as imagens são sobrepostas, as secções fixadas com 4% paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído apresentam espermatogônias marcadas para o BrdU com intensidade de fluorescência maior nas secções incluídas em parafina (Fig. 9C) do que naquelas incluídas em LR White (Fig. 9F). Embora tenha uma intensidade de fluorescência menor, a visualização das espermatogônias foi mais pontual nas secções incluídas em LR White isto é, a fluorescência foi vista na forma de vários pontos individuais sobre o núcleo das espermatogônias

#### **5.5. Identificação morfológica das espermatogônias, sob microscopia de luz, após processamento imunohistoquímico para o BrdU**

Após análise sob microscopia de fluorescência e captura de imagens digitais das espermatogônias marcadas para o BrdU, estas lâminas foram desmontadas, lavadas e coradas com azul de toluidina-borato de sódio para análise sob microscopia de luz convencional (ver materiais e métodos). O método para identificação morfológica dos diferentes tipos espermatogoniais indiferenciados e diferenciados foi mais uma vez baseado em estudo prévio desenvolvido por Chiarini-Garcia & Russell (2001).

##### **5.5.1. Espermatogônias fixadas em 4% paraformaldeído**

- **Incluídas em parafina**

Quando as lâminas utilizadas na imunofluorescência foram desmontadas e coradas, a identificação morfológica sob microscopia de luz das espermatogônias marcadas para o BrdU dessas mesmas espermatogônias torna-se difícil devido à baixa



qualidade na preservação tecidual (Fig. 10), não sendo possível a identificação morfológica das espermatogônias marcadas.

- **Incluídas em LR White**

Em relação às lâminas incluídas em LR White, após a imunofluorescência e remontagem das lâminas, a identificação de algumas espermatogônias marcadas pelo BrdU torna-se possível devido à melhor preservação tecidual. Foi possível a identificação de espermatogônias do tipo A, In e B (Fig. 11).

### 5.5.2. Espermatogônias fixadas em 4% paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído

- **Incluídas em parafina**

Após a imunofluorescência e remontagem das lâminas, a morfologia dos túbulos seminíferos e das espermatogônias sob microscopia de luz não ficou bem preservada, dificultando a identificação dos componentes teciduais (Fig. 12). Semelhante ao resultado das espermatogônias fixadas em 4% paraformaldeído e incluídas em parafina, também não foi possível distinguir através da morfologia nenhum dos tipos espermatogoniais marcados para o BrdU.

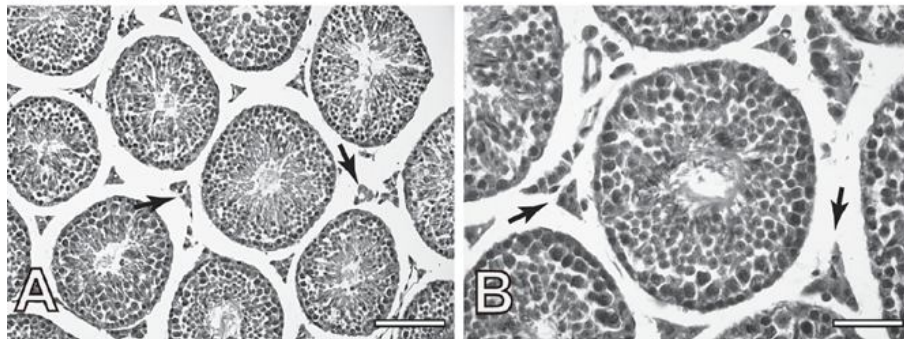
- **Incluídas em LR White**

Após a adição de 1,5% glutaraldeído, a fixação foi nitidamente melhor quando as espermatogônias foram incluídas em LR White. Mesmo após o processamento imunohistoquímico e a remontagem das lâminas, foi possível identificar todos os tipos espermatogoniais, independente do fluorocromo ser FITC (Fig. 13) ou Alexa Fluor 594 (Fig. 14), tal como são descritos pelo método de microscopia de luz de alta resolução (Chiarini-Garcia & Russell 2001). Através dessa técnica foi possível inclusive a identificação de pré-leptótenos marcados pelo BrdU, ou seja, as espermatogônias tipo B incorporaram o BrdU antes das mesmas se dividirem em pré-leptótenos. Desta forma, em LR White foi possível a identificação de espermatogônias do tipo A indiferenciada ( $A_{ind}$ ), do tipo A diferenciada ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  e  $A_4$ ), espermatogônias intermediárias (In) e espermatogônia do tipo B (B).

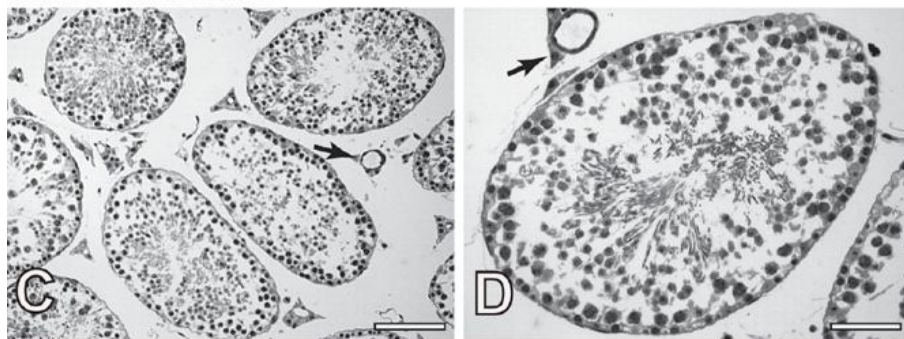
## 6. FIGURAS

### 4% Paraformaldeído

Inclusão em Parafina

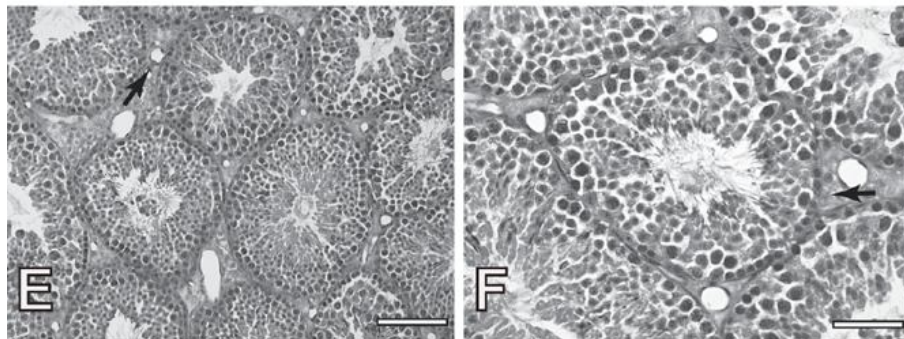


Inclusão em LR White

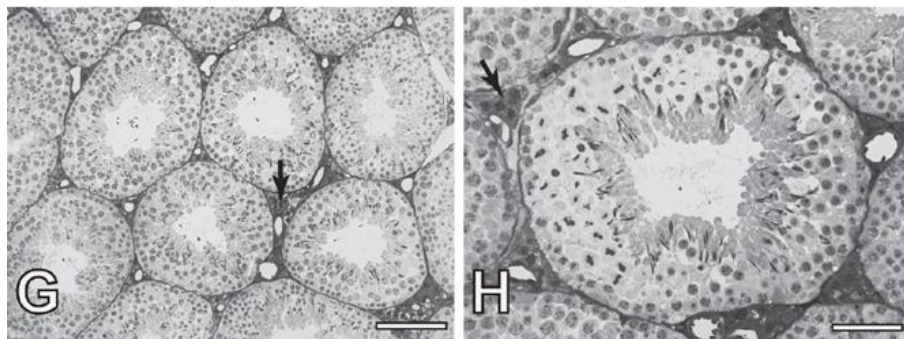


### 4% Paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído

Inclusão em Parafina



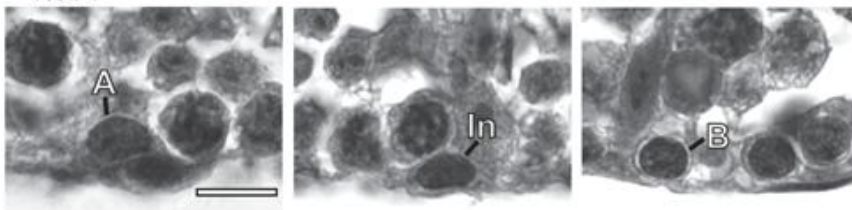
Inclusão em LR White



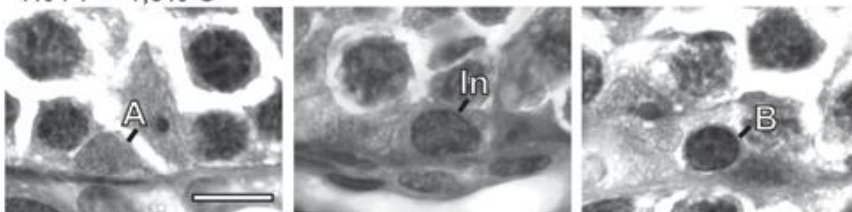
**Figura 2-** Secções transversais de túbulos seminíferos submetidos à diferentes fixadores e meios de inclusão. Setas = tecido intersticial. Barras: A,C,E,G, 90µm e B,D,F,H, 45µm. Coloração: azul de toluidina-borato de sódio.

### Inclusão em Parafina

4% PF

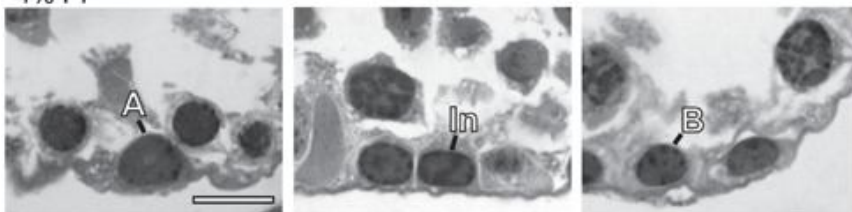


4% PF + 1,5% G

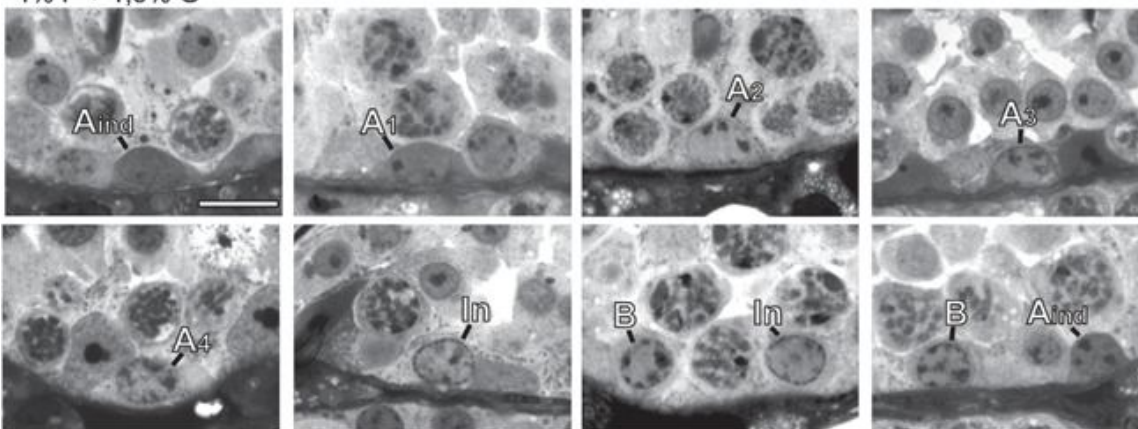


### Inclusão em resina LR White

4% PF

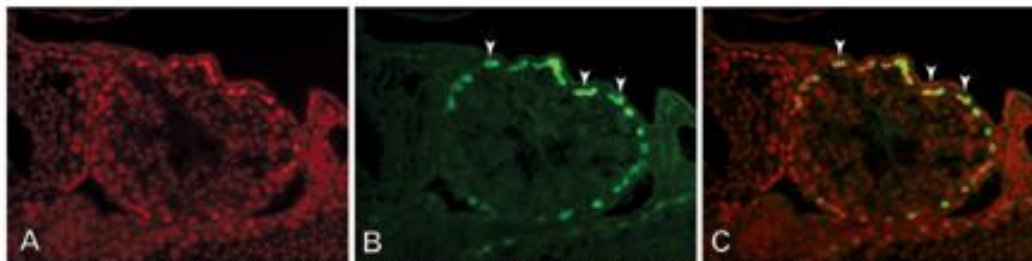


4% P + 1,5% G

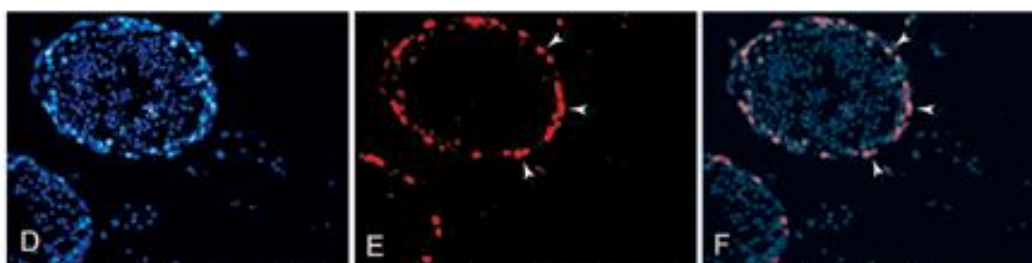


**Figura 3** - Identificação dos diversos tipos espermatogoniais submetidos à diferentes fixadores e meios de inclusão. Aind, espermatogônia A indiferenciada; A, espermatogônia A; A1, espermatogônia A1; A2, espermatogônia A2; A3, espermatogônia A3; A4, espermatogônia A4; In, espermatogônia intermediária; B, espermatogônia do tipo B; P, paraformaldeído; G, glutaraldeído. Barra = 10µm. Coloração: azul de toluidina-borato de sódio.

Comparação entre diferentes fluorocromos preparados para marcação de BrdU, em cortes histológicos de túbulos seminíferos fixados com 4% de paraformaldeído e incluídos em parafina.

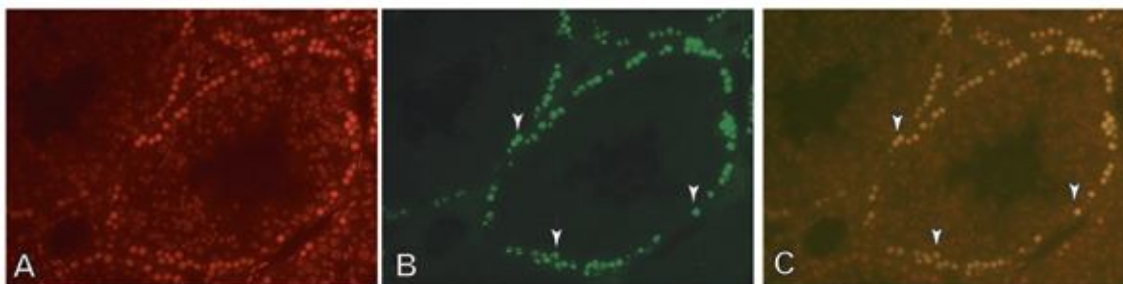


**Figuras 4A-C.** Imunofluorescência para localização de BrdU em espermatogônias de camundongos (cabeças de seta). Os túbulos seminíferos foram fixados com 4% de paraformaldeído, incluídos em parafina e cortados com 5µm de espessura. A, iodeto de propídeo; B, FITC; C, combinação iodeto de propídeo + FITC.

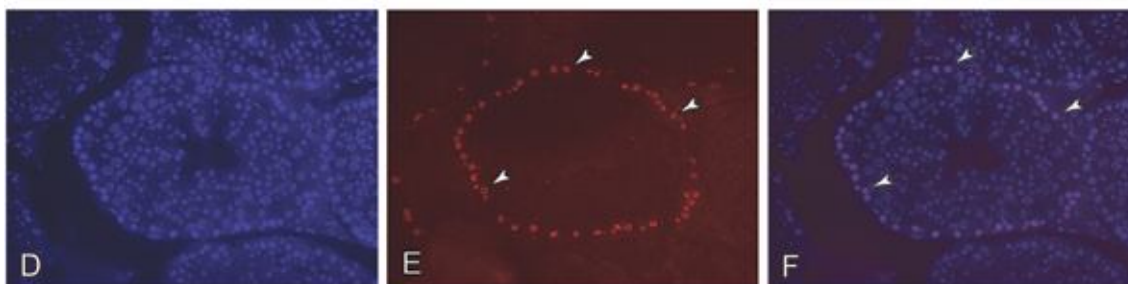


**Figuras 4D-F.** Imunofluorescência para localização de BrdU em espermatogônias de camundongos (cabeças de seta). Os túbulos seminíferos foram fixados com 4% de paraformaldeído, incluídos em parafina e cortados com 5µm de espessura. A, DAPI; B, Alexa Fluor 594; C, combinação DAPI + Alexa Fluor 594.

Comparação entre diferentes fluorocromos preparados para marcação de BrdU, em cortes histológicos de túbulos seminíferos fixados com 4% de paraformaldeído e incluídos em resina LR White

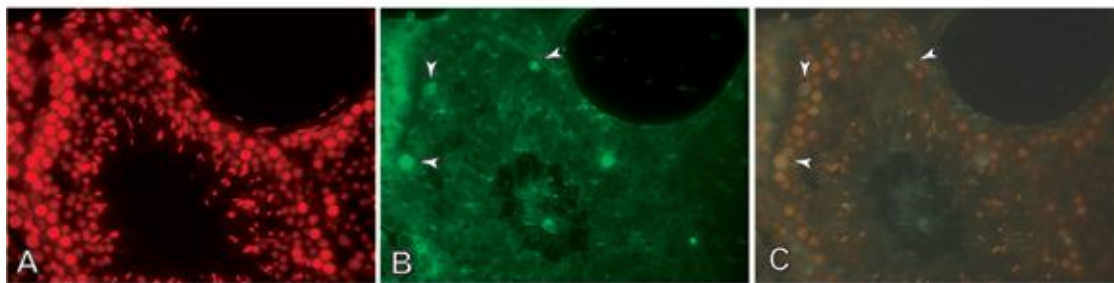


**Figuras 5A-C.** Imunofluorescência para localização de BrdU em espermatogônias de camundongos (cabeças de seta). Os túbulos seminíferos foram fixados com 4% de paraformaldeído, incluídos em resina LR White e cortados com 1µm de espessura. A, iodeto de propídeo; B, FITC; C, combinação iodeto de propídeo + FITC.

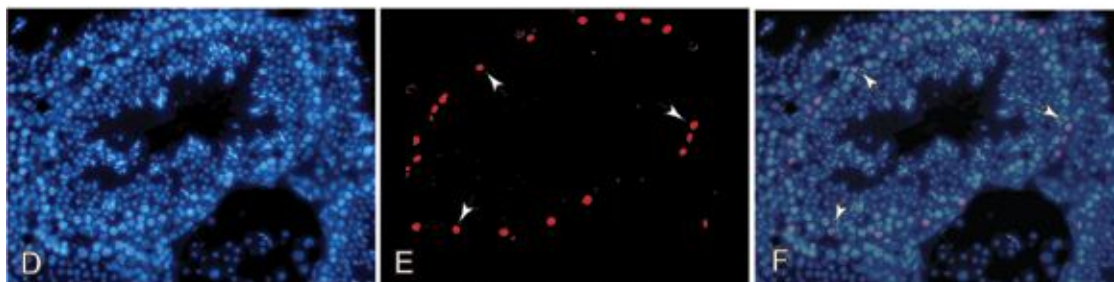


**Figuras 5D-F.** Imunofluorescência para localização de BrdU em espermatogônias de camundongos (cabeças de seta). Os túbulos seminíferos foram fixado com 4% de paraformaldeído, incluídos em resina LR White e cortados com 1µm de espessura. A, DAPI; B, Alexa Fluor 594; C, combinação DAPI + Alexa Fluor 594.

Comparação entre diferentes fluorocromos preparados para marcação de BrdU, em cortes histológicos de túbulos seminíferos fixados com 4% de paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído e incluídos em parafina

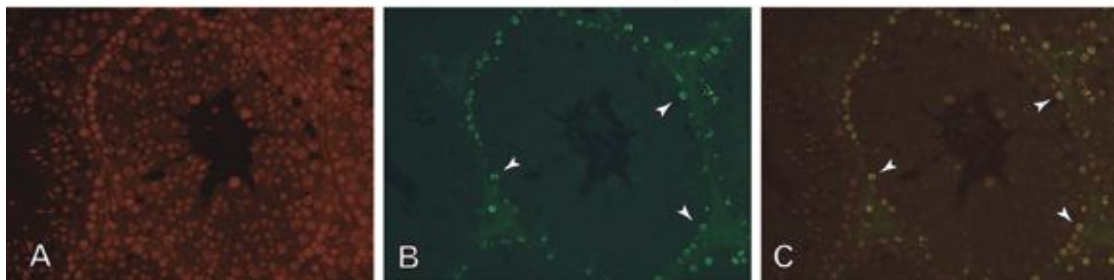


**Figuras 6A-C.** Imunofluorescência para localização de BrdU em espermatogônias de camundongos (cabeças de seta). Os túbulos seminíferos foram fixados com 4% de paraformaldeído + 1,5% de glutaraldeído, incluídos em parafina e cortados com 5µm de espessura. A, iodeto de propídeo; B, FITC; C, combinação iodeto de propídeo + FITC.

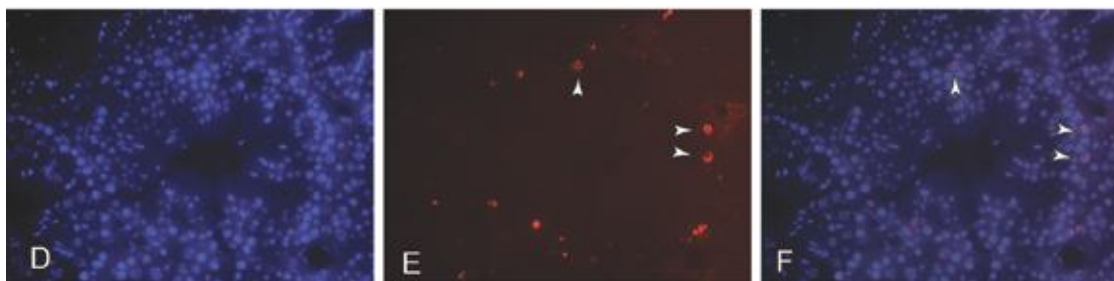


**Figuras 6D-F.** Imunofluorescência para localização de BrdU em espermatogônias de camundongos (cabeças de seta). Os túbulos seminíferos foram fixados com 4% de paraformaldeído + 1,5% de glutaraldeído, incluídos em parafina e cortados com 5µm de espessura. A, DAPI; B, Alexa Fluor 594; C, combinação DAPI + Alexa Fluor 594.

Comparação entre diferentes fluorocromos preparados para marcação de BrdU, em cortes histológicos de túbulos seminíferos fixados com 4% de paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído e incluídos em resina LR White

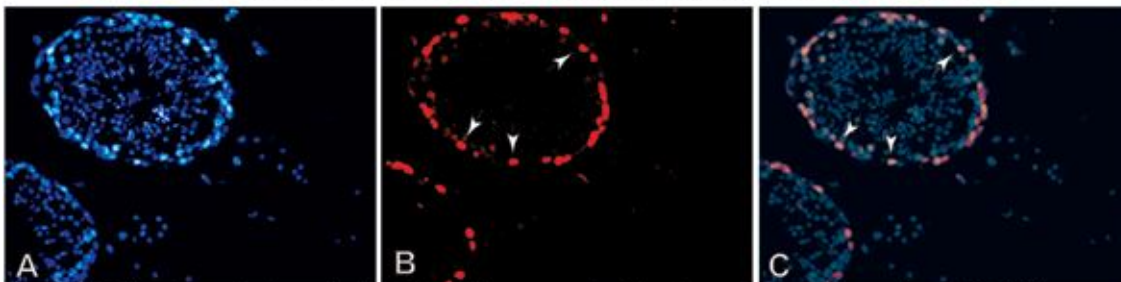


**Figuras 7A-C.** Imunofluorescência para localização de BrdU em espermatogônias de camundongos (cabeças de seta). Os túbulos seminíferos foram fixados com 4% de paraformaldeído + 1,5% de glutaraldeído, incluídos em resina LR White e cortados com 1µm de espessura. A, iodeto de propídeo; B, FITC; C, combinação iodeto de propídeo + FITC.

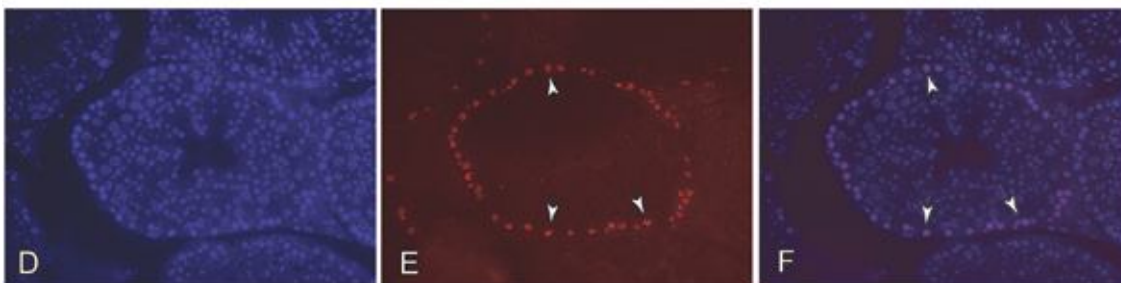


**Figuras 7D-F.** Imunofluorescência para localização de BrdU em espermatogônias de camundongos (cabeças de seta). Os túbulos seminíferos foram fixados com 4% de paraformaldeído + 1,5% de glutaraldeído, incluídos em resina LR White e cortados com 1µm de espessura. A, DAPI; B, Alexa Fluor 594; C, combinação DAPI + Alexa Fluor 594.

Comparação da imunofluorescência de espermatogônias marcadas para BrdU, em cortes histológicos de túbulos seminíferos com 4% de paraformaldeído e incluídos em parafina ou em resina LR White

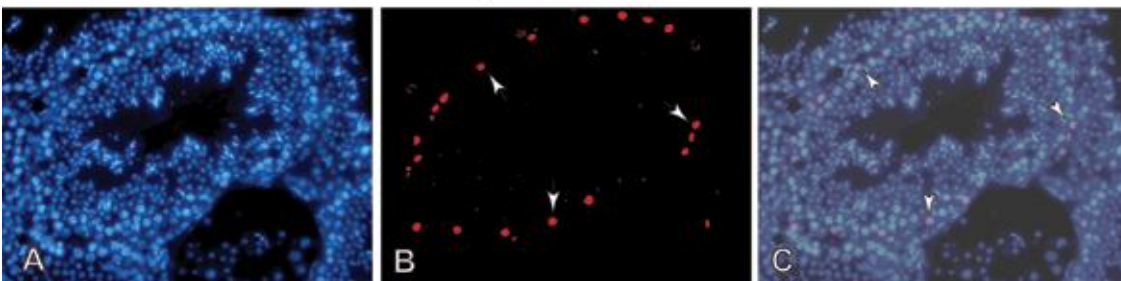


**Figuras 8A-C.** Imunofluorescência para localização de BrdU em espermatogônias de camundongos (cabeças de seta). Os túbulos seminíferos foram fixados com 4% de paraformaldeído, incluídos em parafina e cortados com 5µm de espessura. A, DAPI; B, Alexa Fluor 594; C, combinação DAPI + Alexa Fluor 594.

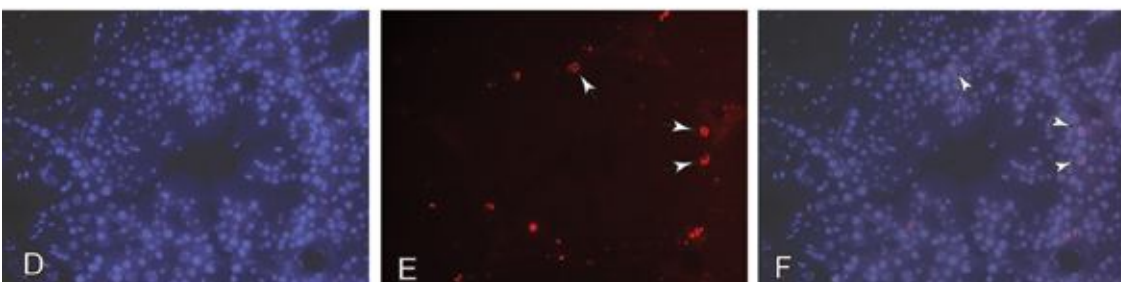


**Figuras 8D-F.** Imunofluorescência para localização de BrdU em espermatogônias de camundongos (cabeças de seta). Os túbulos seminíferos foram fixados com 4% de paraformaldeído, incluídos em resina LR White e cortados com 1µm de espessura. A, DAPI; B, Alexa Fluor 594; C, combinação DAPI + Alexa Fluor 594.

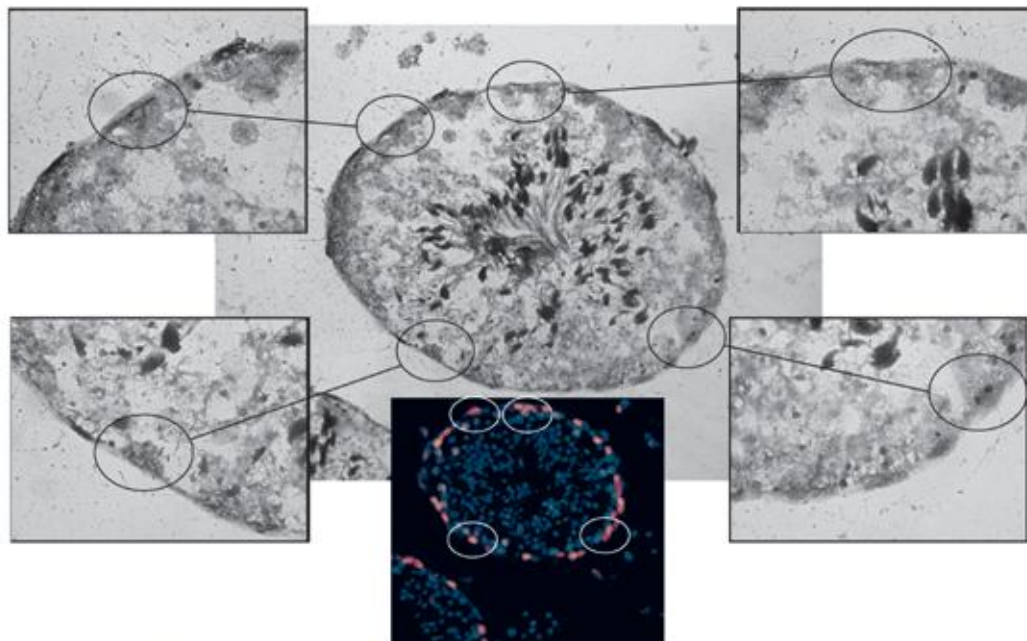
Comparação da imunofluorescência de espermatogônias marcadas para BrdU, em cortes histológicos de túbulos seminíferos fixados com 4% de paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído e incluídos em parafina ou em resina LR White



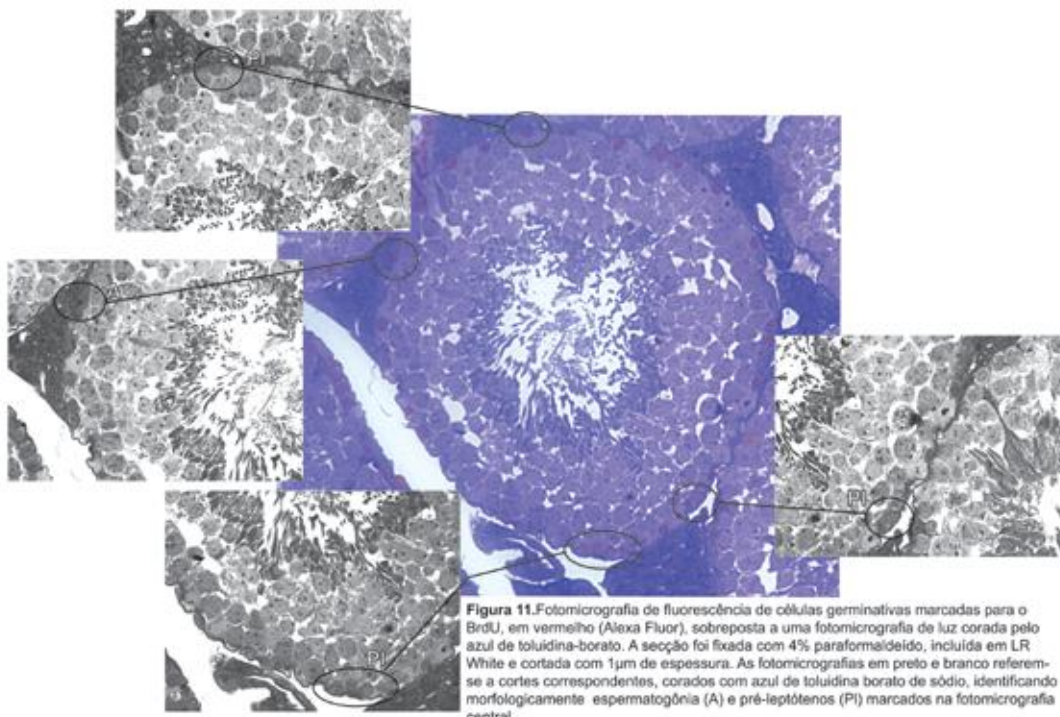
**Figuras 9A-C.** Imunofluorescência para localização de BrdU em espermatogônias de camundongos (cabeças de seta). Os túbulos seminíferos foram fixados com 4% de paraformaldeído + 1,5% de glutaraldeído, incluídos em parafina e cortados com 5µm de espessura. A, DAPI; B, Alexa Fluor 594; C, combinação DAPI + Alexa Fluor 594.



**Figuras 9D-F.** Imunofluorescência para localização de BrdU em espermatogônias de camundongos (cabeças de seta). Os túbulos seminíferos foram fixados com 4% de paraformaldeído + 1,5% de glutaraldeído, incluídos em resina LR White e cortados com 1µm de espessura. A, DAPI; B, Alexa Fluor 594; C, combinação DAPI + Alexa Fluor 594.

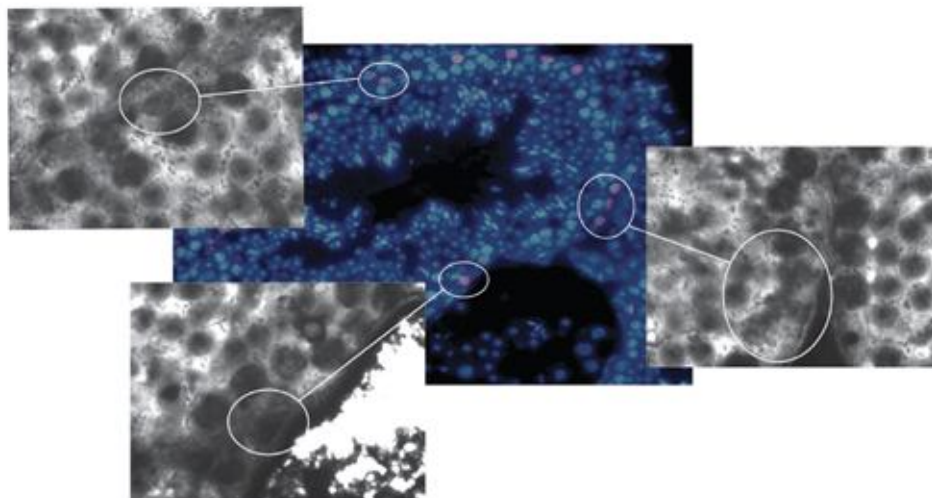


**Figura 10.** Fotomicrografia de imunofluorescência (colorida) mostrando espermatogônias marcadas para o BrdU (rosa), e o mesmo corte em azul de toluidina-borato (imagem central preto e branco) indicando as mesmas células circundadas na imagem de fluorescência. A seção foi fixada com 4% paraformaldeído incluída em parafina e cortada com 5µm de espessura. As quatro fotomicrografias laterais mostram detalhes da imagem central destacando as mesmas espermatogônias marcadas pelo BrdU.

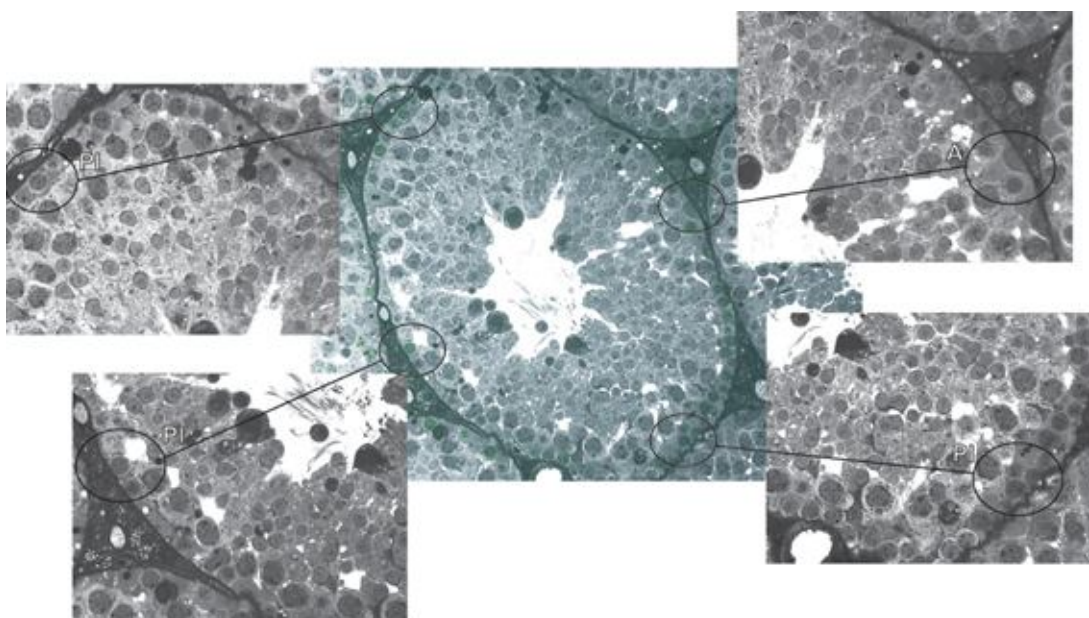


**Figura 11.** Fotomicrografia de fluorescência de células germinativas marcadas para o BrdU, em vermelho (Alexa Fluor), sobreposta a uma fotomicrografia de luz corada pelo azul de toluidina-borato. A seção foi fixada com 4% paraformaldeído, incluída em LR White e cortada com 1µm de espessura. As fotomicrografias em preto e branco referem-se a cortes correspondentes, corados com azul de toluidina borato de sódio, identificando morfologicamente espermatogônia (A) e pré-leptóteno (PI) marcados na fotomicrografia central.

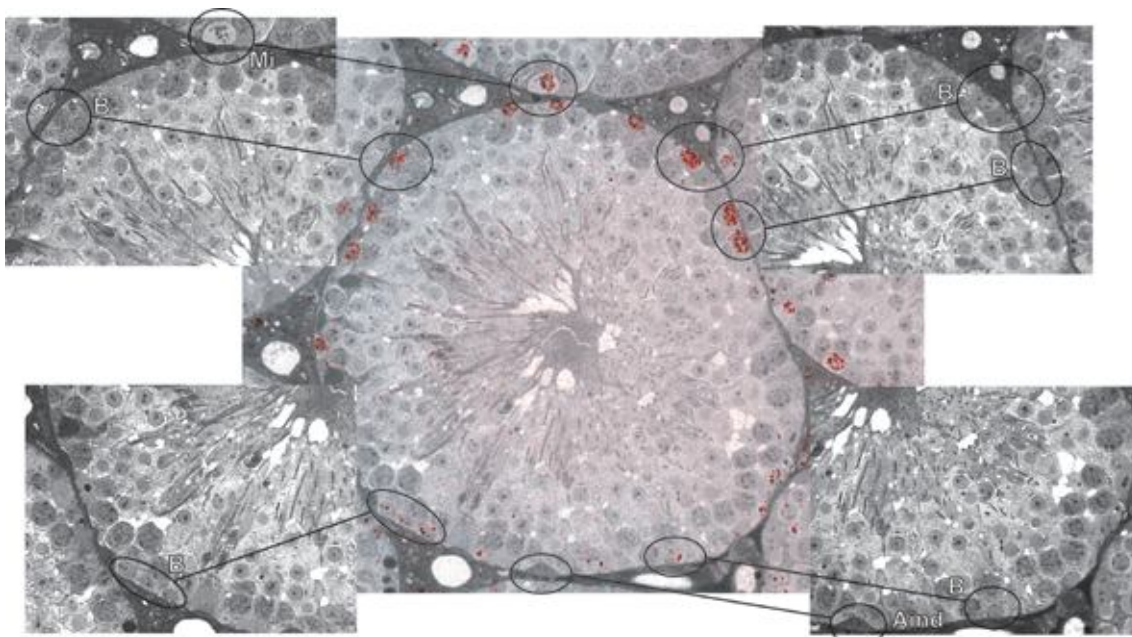




**Figura 12.** Fotomicrografia de imunofluorescência (colorida) mostrando espermatogônias marcadas para o BrdU (púrpura), em secções fixadas com 4% paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído, incluídas em parafina e cortadas com 5µm de espessura. As fotomicrografias em preto e branco referem-se a cortes correspondentes, corados com azul de toluidina borato de sódio, mostrando a morfologia das mesmas células vistas na fluorescência (círculos).



**Figura 13.** Fotomicrografia de fluorescência de células germinativas marcadas para o BrdU em verde (FITC), sobreposta à fotomicrografia de luz preto e branco corada pelo azul de toluidina-borato de sódio. A secção foi fixada com 4% paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído, incluída em LR White e cortada com 1µm de espessura. As fotomicrografias em preto e branco referem-se a cortes correspondentes, corados com azul de toluidina borato de sódio, identificando morfologicamente espermatogônia (A) e pré-leptótenos (PI) marcados na fotomicrografia central.



**Figura 14.** Fotomicrografia de fluorescência de espermatogônias marcadas para o BrdU em vermelho (Alexa Fluor), sobreposta a uma fotomicrografia de luz preto e branco corada pelo azul de toluidina-borato de sódio. A secção foi fixada com 4% paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído, incluída em LR White e cortada com 1  $\mu$ m de espessura. As fotomicrografias laterais em preto e branco referem-se a cortes correspondentes, corados com azul de toluidina borato de sódio, identificando morfologicamente espermatogônia indiferenciada (Aind), espermatogônias do tipo B (B) e mitose espermatogonial (Mi). Observar que a espermatogônia Aind não está marcada pelo Alexa Fluor, indicando que não se dividiu durante as 24 horas em que o BrdU foi injetado.

## 7.DISSCUSSÃO

Técnicas fluorescentes tem sido empregadas na atualidade de forma rotineira no desenvolvimento de estudos nas diferentes áreas das ciências biológicas e médicas. Dentre os métodos mais empregados estão aqueles que utilizam anticorpos marcados com fluorocromos para identificar sítios antigênicos específicos para os mais diversos constituintes celulares. O método de preparação dos tecidos para avaliações imunohistoquímicas mais utilizado na atualidade emprega a formalina como fixador associada à inclusão em parafina. Entretanto, apesar da fluorescência se mostrar adequada, a preservação morfológica das estruturas marcadas pelo fluorocromo fica comprometida, dificultando a identificação de detalhes citológicos. Em determinadas situações experimentais, quando é necessário a identificação morfológica daquela estrutura marcada pelo fluorocromo, este método formalina/parafina não é adequado. Na tentativa de resolver este impasse comparamos, no presente trabalho, os efeitos de diferentes fixadores e meios de inclusão sob marcação imunofluorescente de espermatogônias e ao mesmo tempo verificamos a possibilidade de identificar morfológicamente as mesmas células marcadas anteriormente, agora pela microscopia de luz convencional. Constatamos que a adição de 1,5% glutaraldeído na solução fixadora aliada à inclusão na resina hidrofílica LR White permitiu a identificação das espermatogônias pelo método imunofluorescente e, ao mesmo tempo, permitiu a identificação morfológica das mesmas.

### 5.1. Imunofluorescência

A imunofluorescência para BrdU das espermatogônias fixadas em paraformaldeído e incluídas em parafina foi semelhante àquela descrita na literatura por outros autores (Ehmcke & Schlatt, 2008; Wu et al., 2008). Constata-se uma imunofluorescência intensa e homogênea sobre as espermatogônias fixadas em 4% paraformaldeído, com pouco ou nenhum *background*. No entanto quando o glutaraldeído é adicionado à solução de paraformaldeído, mesmo em pequenas concentrações (1,5% neste caso), houve redução da intensidade de fluorescência sobre as espermatogônias. De fato é sabido que a fixação é de extrema importância para o sucesso de uma detecção imunohistoquímica, pois dependendo do antígeno a ser detectado, o tipo e a concentração do agente fixador

podem inviabilizar sua detecção (Ramos-Vara, 2005). O glutaraldeído é classificado de fixador não coagulante porque faz com que as proteínas assumam o aspecto de um gel transparente, estabilizando estruturalmente as macromoléculas tissulares, estabelecendo ligações cruzadas entre os componentes estruturais, sem distorcê-los (Sesso, 2007; Souto-Padron, 2007). Essas ligações cruzadas garantem uma boa preservação estrutural, podendo, no entanto modificar a estrutura de determinadas moléculas, mascarando seus sítios antigênicos (Souto-Padron, 2007). Desta forma acreditamos que a adição de 1,5% de glutaraldeído, apesar de ter reduzido a intensidade de fluorescência, não foi suficiente para bloquear por completo os sítios antigênicos, permitindo a marcação fluorescente das espermatogônias.

Outro fator que pode estar relacionado com a redução da intensidade de fluorescência pode ser a espessura de corte. Enquanto as espermatogônias incluídas em parafina foram cortadas com espessura de 5 $\mu$ m, aquelas incluídas na resina LR White tinham a espessura de corte 5 vezes menor (1 $\mu$ m). Dessa forma, cortes espessos implicam numa maior quantidade de sítios antigênicos, possibilitando um elevado número de anticorpos conjugados com fluorocromos associados à mesma espermatogônia, resultando numa maior intensidade de fluorescência.

Além disso, a intensidade de fluorescência pode estar relacionada com o meio de inclusão. Enquanto em parafina as secções sofrem desparafinização antes do processamento imunohistoquímico, as secções incluídas em LR White não passam por nenhum método de retirada da resina, o que pode resultar num menor número de sítios antigênicos disponíveis, diminuindo a intensidade da fluorescência.

A imunofluorescência espermatogonial das secções incluídas na resina hidrofílica LR White, como dito anteriormente, ofereceram uma menor intensidade de marcação quando comparado à intensidade em parafina. Entretanto, em LR White as espermatogônias marcadas para o BrdU mostraram uma marcação mais pontual na região nuclear, quando observado em grande aumento sob microscópio de fluorescência. Além disso, a aparência pontual da fluorescência pode estar relacionada a uma menor sobreposição dos fluorocromos, devido à menor espessura de corte na resina.

Outro achado que julgamos importante salientar foi a presença de *background* nos fragmentos de testículos incluídos em resina LR White. Observamos um *background* mais

elevado em LR White do que aquele presente nas secções em parafina quando o fixador foi o paraformaldeído. Quando adicionamos 1,5% de glutaraldeído observamos *background* ainda mais intenso nas secções de LR White. Até o momento, não se sabe ao certo o motivo de tal resultado, entretanto acreditamos que possa estar relacionado com a não retirada da resina, resultando em ligações inespecíficas e/ou uma conhecida auto-fluorescência produzida pelo glutaraldeído (Collins & Goldsmith, 1981; Baschong et al., 2001).

Foram utilizadas duas combinações de fluorocromos (iodeto de propídeo + FITC e DAPI + Alexa Fluor 594) na tentativa de determinar qual delas forneceria uma melhor visualização das espermatogônias marcadas para o BrdU, quando aplicássemos os diferentes métodos de fixação e inclusão propostos no presente trabalho. Os resultados obtidos foram semelhantes àqueles encontrados na literatura (Tokuda et al., 2007). No presente trabalho, a combinação DAPI + Alexa Fluor 594 proporcionou uma fluorescência espermatogonial mais intensa quando comparado com a combinação iodeto de propídeo + FITC. Consultando a literatura, não encontramos referência semelhante sobre este nosso achado.

## **5.2. Microscopia de luz**

Foram realizados dois tipos de estudos morfológicos sob microscopia de luz comparando os efeitos de fixadores e meios de inclusão sobre a morfologia dos testículos e das espermatogônias: (1) um estudo avalia a preservação morfológica dos testículos e das espermatogônias depois de cortados e corados com azul de toluidina-borato, e (2) o outro estudo também procura avaliar morfológicamente os testículos e as espermatogônias corados com azul de toluidina-borato só que após terem sido submetidos ao processamento imunohistoquímico. Este segundo método de avaliação teve como objetivo verificar se o processamento imunofluorescente prejudicaria a morfologia do órgão e das células germinativas.

Os testículos fixados em paraformaldeído foram morfológicamente mal preservados independente do tecido ter sido incluído em parafina ou resina. O tecido intersticial apresentou espaços vazios entre ele e os túbulos seminíferos, semelhante a uma extensa retração dos tecidos, em ambos os meios de inclusão. Inicialmente, este

achado sugere que esta retração deve estar relacionada com a fixação. No entanto, é conhecido que o paraformaldeído é um fixador que provoca pouca retração dos tecidos (Fox et al., 1985), tornando este resultado contraditório. Acreditamos que este artefacto possa estar relacionado com uma ruptura entre os túbulos seminíferos e o tecido intersticial no momento em que o testículo foi recortado em pequenos fragmentos com uma lâmina. Quando se faz fixação com paraformaldeído, por imersão ou perfusão, o tecido não adquire a mesma rigidez do que quando fixado com glutaraldeído. Desta forma, as fracas ligações cruzadas formadas pelo formaldeído não resistem à pressão do corte e se rompem provocando este artefacto. A preservação do epitélio seminífero, quando o testículo foi incluído em LR White, também não apresentou resultado satisfatório, com vazio artefactual entre as células germinativas, ao contrário daquele epitélio seminífero incluído em parafina que se apresentou compacto e repleto de células. Acreditamos que esta diferença não reflete a verdade quanto ao número de células germinativas e que, provavelmente, está relacionada à espessura de corte. Como o corte histológico em LR White foi de apenas 1µm, quando comparado ao de 5µm em parafina, o menor número de células estaria relacionado a uma sobreposição de estruturas 5 vezes menor no material incluído em resina plástica. Mas, de qualquer forma, houve alteração morfológica do epitélio após fixação apenas com paraformaldeído pois após a adição do glutaraldeído na solução fixadora as células de Sertoli e germinativas foram vistas bastante coesas no epitélio seminífero mesmo quando o tecido foi cortado com 1µm de espessura.

Quanto à morfologia espermatogonial o paraformaldeído não forneceu qualidade suficiente para distinguir os diferentes tipos espermatogoniais. De fato, a identificação das espermatogônias tipo A, In e B foi menos duvidosa quando o tecido foi incluído na resina LR White do que naqueles incluídos em parafina, provavelmente porque as secções em resina eram 5 vezes mais finas, proporcionando uma melhor visualização de pequenos detalhes do núcleo espermatogonial. Estudos desenvolvidos em camundongos por Oakeber (1971) e em ratos por Huchins (1978), que utilizaram fixação em Zenker-formol, inclusão em parafina e cortes histológicos de 5µm de espessura, demonstraram também a presença dos diferentes tipos espermatogoniais de roedores ( $A_{ind}$ ,  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ , In e B) tal como descrito por Chiarini-Garcia & Russell (2001) e Chiarini-Garcia et al. (2003), respectivamente, que utilizaram fixação em glutaraldeído, inclusão em resina araldite e cortes semifinos de 1µm de espessura. No entanto, os trabalhos desenvolvidos na década

de 1970 não utilizaram especificamente a morfologia para diferenciar os diferentes tipos espermatogoniais. Huckins (1978) utiliza avaliação das espermatogônias *in toto*, isto é, através de uma técnica onde os túbulos seminíferos são preparados inteiros (sem cortes histológicos) e as espermatogônias são visualizadas por transparência dentro do epitélio. Esta visualização se faz alterando a altura do micrométrico do microscópio (de Rooij & Russell, 2000). Neste caso as células foram identificadas por estarem isoladas ou em associação de pares ou múltiplos deles. Células isoladas seriam as espermatogônias A isoladas ( $A_{is}$ ), aquelas pareadas (com pontes citoplasmáticas entre elas) seriam as espermatogônias A pareadas ( $A_{pr}$ ) e assim por diante (Clermont & Bustos-Obregon, 1968). Já o estudo desenvolvido em camundongos por Oakberg (1971), separou as espermatogônias nos seus diferentes tipos avaliando o ciclo celular das mesmas através do uso de timidina tritiada. Diante do exposto acima, e observando as fotomicrografias dos trabalhos de Oakberg (1971) e Huckins (1978), os nossos achados após inclusão em parafina são semelhantes àqueles encontrados por eles. Isto é, utilizando apenas a morfologia celular, o método paraformaldeído/parafina não permite classificar os diferentes tipos espermatogoniais, apenas as do tipo A, In e B.

Ao se adicionar o glutaraldeído foi observada uma notável melhora na qualidade de preservação dos tecidos incluídos em parafina e na resina LR White. O glutaraldeído é considerado um excelente fixador por ser não coagulante e por estabelecer ligações cruzadas intra e intermoleculares (Fox et al., 1985; Sesso, 2007).

Os testículos que foram fixados com 4% paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído e incluídos em parafina apresentaram uma boa qualidade estrutural, com preservação tanto do interstício quanto do epitélio seminífero. Entretanto, no que se refere à qualidade espermatogonial, quando incluídos em parafina a identificação dos diferentes tipos de espermatogônias continuou restrita às do tipo A, In e B. A alta espessura das secções associada a uma baixa preservação de detalhes celulares impossibilita a identificação dos demais tipos espermatogoniais. A situação parece se agravar quanto se tenta identificar as espermatogônias que passaram pelo processamento imunohistoquímico e foram marcadas para o BrdU. Isto é, após a avaliação imunofluorescente, quando as lâminas foram remontadas, a qualidade morfológica piorou dificultando mais ainda a identificação dos diferentes tipos espermatogoniais.

Tal como esperávamos, quando os testículos foram fixados com paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído, incluídos em LR White e cortados com 1µm de espessura, a qualidade morfológica foi nitidamente melhor. Após terem sido submetidas ao processo imunofluorescente, as lâminas histológicas mantiveram sua morfologia intacta, continuando possível identificar as espermatogônias que antes estavam marcadas para o BrdU. A resina LR White forma uma “malha” no tecido e não é retirada, nem durante o processamento para microscopia de fluorescência, nem durante o processamento para microscopia de luz (Bozzola & Russel, 1999). A não retirada da resina possibilita maior preservação tecidual e, por esse motivo, preserva a morfologia das espermatogônias.

Constatamos que a resina por si só não foi suficiente para manter a qualidade morfológica das espermatogônias pois quando se utilizou apenas o paraformaldeído como fixador, já não foi mais possível identificar, com certeza, os diferentes tipos espermatogoniais. Concluimos que como a melhor qualidade fornecida pela resina não foi suficiente para identificar todos os tipos de espermatogônias, decididamente o fixador também possui um importante papel nesse processo.

Inicialmente, pensou-se em utilizar a resina plástica glicol metacrilato para se fazer avaliações morfológicas e imunohistoquímicas neste mesmo material. É sabido que nos tecidos incluídos em metacrilato podem ser feitas reações imunohistoquímicas (Chiarini-Garcia et al., 2009b). Entretanto, quando se tentou identificar morfológicamente os diferentes tipos espermatogoniais pelo método de microscopia de luz de alta resolução (Chiarini-Garcia & Russell, 2001; Chiarini-Garcia et al., 2003; Nascimento et al., 2009; Chiarini-Garcia et al., 2009a) a distinção morfológica entre os diferentes tipos celulares não foi possível (Chiarini-Garcia et al., 2009b; Alves-Freitas D, em preparação.; Drumond AL, 2006; Rezende CA, 2007; informações pessoais).

Estes achados, em conjunto, demonstram que o glutaraldeído, mesmo em pequenas concentrações, e associado a uma resina adequada, pode produzir resultados de alta resolução para avaliações concomitantes entre morfologia e imunomarcção através de técnicas de microscopias de luz e microscopia de imunofluorescência numa mesma secção, respectivamente.



## 8. CONCLUSÕES

As ponderações, em conjunto, dos vários parâmetros estudados, permitiram-nos chegar às seguintes conclusões:

1. A combinação paraformaldeído/parafina não preservou detalhes nucleares e só possibilitou a identificação morfológica das espermatogônias do tipo A indiscriminadamente, Intermediária e espermatogônia tipo B;
2. A combinação paraformaldeído/LR White possibilitou apenas a identificação das espermatogônias tipo A de uma forma generalizada, Intermediária e espermatogônia tipo B;
3. A adição de glutaraldeído à solução fixadora não melhorou a preservação morfológica das células incluídas em parafina, possibilitando a identificação das mesmas espermatogônias tipo A, Intermediária e tipo B;
4. A mistura de 4% paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído associado à inclusão em resina LR White permitiu a identificação morfológica de todos os tipos espermatogoniais de camundongos, a saber, espermatogônias indiferenciadas, espermatogônias diferenciadas (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> e A<sub>4</sub>), intermediárias e tipo B, através da técnica de microscopia de luz de alta resolução.
5. A parafina oferece uma excelente visualização das espermatogônias marcadas para o BrdU tanto utilizando-se o fixador paraformaldeído quanto o fixador paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído, independente do tipo de fluorocromo utilizado; entretanto não permite a identificação morfológica do tipo espermatogonial marcado;
6. A resina hidrofílica LR White também permitiu a visualização das espermatogônias marcadas para o BrdU em ambos os fixadores, embora numa intensidade de fluorescência menor;
7. A identificação imunofluorescente das espermatogônias marcadas pelo BrdU concomitante com a identificação morfológica de todos os tipos espermatogoniais só foi possível quando essas células foram fixadas com paraformaldeído + 1,5% glutaraldeído e incluídas na resina hidrofílica LR White.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves-Freitas D; França LR; Chiarini-Garcia H. Spermatogonial kinetics in the marmoset *Callitrix penicillata*: report of a new generation of type B spermatogonia, em preparação.
- Aparicio S; Doty SB; Camacho NP; Paschalis EP; Spevak L; Mendelsohn R; Boskey AL. Optimal methods for processing mineralized tissues for fourier transform infrared microspectroscopy, *Calcified Tissue International*, v.70, p.422-429, 2002.
- Ballow D; Meistrich ML; Matzuk M; Rajkovic A. *Sohlh 1* is essential for spermatogonial differentiation. *Developmental Biology*, v.294, p.161-197, 2006.
- Baschong W; Suetterlin R; Laeng RH. Control of autofluorescence of archival formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue in confocal laser scanning. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 49 (12), p.1565-1571, 2001.
- Blanco M; Robinson MJ; Muscarinic M3 acetylcholine receptor immunostaining in paraffin-embedded normal and neoplastic prostatic gland tissue. *Annals of Diagnostic Pathology*, v. 8(6), p.333-336, 2004.
- Bowes T; Sing B; Gupta RS. Subcellular localization of fumase in mammalian cells and tissues. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 127, p.335-346, 2006.
- Bozzola JJ; Russell LD. *Electron Microscopy, Second Edition*. Jones and Bartlett Publishers, Inc., Sudbury, MA, 1999.
- Buaas FW; Kirsh AL; Sharma M; McLean DJ; Morris J; Griswold MD; de Rooij DG; Braun RE. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nature Genetics*, v.36, p.647-652, 2004.
- Causton BE. The choice of resins for electron immunocytochemistry. In: Immunolabeling for electron microscopy. *Elsevier Science Publishers*, p.29-36. 1984.
- Chiarini-Garcia H; Russel LD. High resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biology of Reproduction*, v.65, p.1170-1178, 2001.

Chiarini-Garcia H; Hornick JR; Griswold MD; Russell LD. Distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random. *Biology of Reproduction*, v.65, p.1179-1185, 2001.

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

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

Chiarini-Garcia H; Freitas DA; Barbosa IS; Almeida FRLC. Evaluation of seminiferous epithelial cycle, spermatogonial kinetics and niche in donkeys (*Equus asinus*). *Animal Reproduction Science*, 2009a.

Chiarini-Garcia H, Ameida FRL, Parreira GG. Different Embedding Methods - paraffin, glycol methacrylate and araldite, for investigating the seminiferous epithelium. H. Chiarini-Garcia & R. N. Melo. (eds). *Light Microscopy: Basic Techniques for Cell-Biological Research*. Totowa, NJ, USA: Humana Press. From *Methods in Molecular Biology Series*. 2009b.

Clermont Y; Bustos-Obregon E. Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto". *American Journal of Anatomy*, v.122, p.237-248, 1968.

Collins J; Goldsmith TH. Spectral properties of fluorescence induced by glutaraldehyde fixation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 29 (3), p.411-414, 1981.

Coons AH, Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells. II Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescence antibody. *The Journal of Experimental Medicine*, v.91, p.1-13, 1950.

- Costoya, JA; Hobbs RM; Barna M; Cattoretti G; Manova K; Sukhwani M; Orwig KE; Wolgemuth DJ; Pandolfi PP. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nature Genetics*, v.36, p.653-659. 2004.
- de Rooij DG. Stem cells in the testis. *International Journal of Experimental Pathology*, v.79, p.67-80, 1998.
- de Rooij DG; Grootegoed JA. Spermatogonial stem cell. *Current Opinion in Cell Biology*, v.10, p.694-701, 1998.
- de Rooij DG; Russel LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of Andrology*, v.21, p.776-798, 2000.
- de Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction*, v.121, p.347-354, 2001.
- Drumond AL; França LR; Chiarini-Garcia H. High-resolution light microscopy identification of different spermatogonial types, during the testis development in mice. *Animal Reproduction*, v.3, p.189, 2006.
- Dü W; Loy V. Evidence of interepithelial seminomas spread into the rete testis by immunostaining of paraffin sections with antibodies against cytokeratin and vimentin. *Urological Research*, v.16 (5), p.389-393, 1988.
- Ehmcke J; Schlatt S. Identification and characterization of spermatogonial subtypes and their expansion in whole mounts and tissue sections from primate testes. *Methods in molecular Biology*, v.450, p.109-118, 2008.
- Fox CH; Johnson FB; Whiting J; Roller PP. Formaldehyde fixation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v.33 (8), p.845-853, 1985.
- Galambos C; Feingold B; Webber SA. Characterization of c4d immunostaining paraffin-embedded tissue of nonpresensitized pediatric heart transplant patients. *Pediatric and Developmental Pathology*, v.11 (3), p.181-184, 2008.

- Ghrebi SS; Owen GR; Brunette DM. Triton X-100 pretreatment of LR White thin sections improves immunofluorescence specific and intensity. *Microscopy Research and Technique*, v.70 (7), p.555-562, 2007.
- Gratzner HG; Leif RC; Ingram DJ; Castro A. The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluorescent determination of DNA replication in single cells and chromosomes. *Experimental Cell Research*, v.1, p.88-94, 1975.
- Huckins C. Behavior of stem cell spermatogonia in the adult rat irradiated testis. *Biology of Reproduction*, v.19, p.747-760, 1978.
- Itoh Y; Tanaka S; Takekoshi S; Itoh J; Osamura RY. Prohormone convertases (PC1/3 and PC2) in rat and human pancreas and islet cell tumors: subcellular immunohistochemical analysis. *Pathology International*, v.46, p.726-737, 1996.
- Iwamura M; Abrahamsson PA; Benning CM; Cockett AT; di Sant'Agnese PA. Anrogen receptor immunostaining and its tissue distribution in formalin-fixed, paraffin-embedded sections after microwave treatment. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v.42 (6), p.783-788, 1994.
- Kann ML; Fouquet JP. Comparison of LR white resin, Lowicryl K4M and Epon postembedding procedures for immunogold staining of actin in the testis. *Histochemistry*, v.91, p.221-226, 1989.
- Lanuza MA; Besalduch N; Garcia N; Sabaté M; Santafé MM; Tomas J. Plastic-embedded semithin cross-sections as a tool for high resolution immunofluorescence analysis of the neuromuscular junction molecules: Specific cellular location of protease-activated receptor-1. *Journal of Neuroscience Research*, v.85 (4), p.784-756, 2007.
- Magaud JP; Sargent I; Clarke PJ; French M; Rimokh R; Mason DY. Double immunocytochemical labeling of cell and tissue samples with monoclonal anti-bromodeoxyuridine. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v.37, p.1517-1527, 1989.

- Moisan V; Bomgardner D; Tremblay JJ. Expression of the Ladybird-like homeobox 2 transcription factor in the developing mouse testis and epididymis. *BMC Developmental Biology*, v.27, p.8-22, 2008.
- Nascimento HF; Drumond AL; França LR; Chiarini-Garcia H. Spermatogonial morphology, kinetics and niches in golden hamsters exposed to short- and long-photoperiod. *International Journal of Andrology*, 2009.
- Oakberg EF. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anatomical Record*, v.169, p.515-532, 1971.
- Osamura RY; Yasuda O; Kawakami T; Itoh Y; Inada K; Kakudo K. Immunoelectron microscopic demonstration of regulated pathway for calcitonin and constitutive pathway for carcinoembryonic antigen in the same cells of human medullary carcinomas of thyroid glands. *Modern Pathology*, v.10, p.7-11, 1997.
- Osamura RY; Itoh Y; Matsuno A. Applications of plastic embedding to electron microscopic immunocytochemistry and in situ hybridization in observations of production and secretion of peptide hormones. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v.48, p.885-891, 2000.
- Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology* v.42, p.405-426, 2005.
- Rehen SK. Ciclo Celular. In: Carvalho HF e Recco-Pimentel SM. *A Célula*. 2ª. ed. – Barueri, SP: Manole,, p. 235-247, 2007.
- Rezende CA; Meistrich ML; Matzuk MM, Drumond AL; Shetty G; Weng CC; Chiarini-Garcia H. Germ cell loss in *TEX14* mutant mice with disrupted intercellular bridges. In XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, Búzios, Rio de Janeiro, Brasil, 2007.

- Russell LD; Ettlín RA; Sinha Hikim AP; Clegg ED. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Vienna, IL, Cache River Press, p.280, 1990.
- Sakai Y; Hosaka M; Hira Y; Watanabe T. Addition of phosphotungstic acid to ethanol for dehydration improves both the ultrastructure and antigenicity of pituitary tissue embedded in LR White acrylic resin. *Archives of Histology and Cytology* v.68 (5), p.337-347, 2005.
- Sesso A. Fixação de sistemas biológicos. In: Souza, W. *Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas*, 2ª ed- Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, p.1-24, 2007.
- Shi L; Li G; Zhu C. Expression and significance of Fas and FasL protein in squamous cell carcinoma of larynx. *Journal of Clinical Otorhinolaryngology*, v.16 (12), p.661-662, 2002.
- Slater M; Mason RS. Immunogold localization of TGF beta 1 protein and mRNA in human skin using a colloidal gold/digoxigenin system. *Histochemistry*, v. 102 (2), p.153-163, 1994.
- Souto-Padron T. Imunocitoquímica: Técnicas pré e pós-inclusão. In: Souza, W. *Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas*, 2ª ed- Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, p.148-163, 2007.
- Souza W. Introdução à imunocitoquímica. In: Souza, W. *Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas*, 2ª ed- Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, p.145-147, 2007.
- Sprando RL. Perfusion of the rat testis through the heart using heparin. In: Russell et al. *Histological Histopathological Evaluation of the Testis*. Vienna, IL, Cache River Press, p.277-280, 1990.

- Thompson JL; Vijayan K; Riley DA. Immunohistochemical myofiber typing and high-resolution myofibrillar lesion detection in LR White embedded muscle. *Microscopy Research and Technique*, v.49 (6), p.589-595, 2000.
- Tokuda M; Kadokawa Y; Kurahashi H; Marunouchi T. CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. *Biology of Reproduction*, v.76, p.130-140, 2007.
- Weipoltshammer K; Schöfer C; Almeder M; Wachtler F. Signal enhancement at the electron microscopic level using Nanogold and gold-based autometallography. *Histochemistry and cell biology*, v.114, p.489-495, 2000.
- Winkler J; Hagelstein S; Rohde M; Laqua H. Cellular and cytoskeletal dynamics within organ cultures of porcine neuroretina. *Experimental Eye Research*, v.74 (6), p.777-788, 2002.
- Wu J; Zhanga Y; Tianb GG; Zoua K; Leec CM; Yua Q; and Yuana Z. Short-type PB-cadherin promotes self-renewal of spermatogonial stem cells via multiple signaling pathways. *Cellular Signalling*, v.6, p.1052-1060, 2008.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)