

Andrología

Aumento das taxas de translocação da fosfatidilserina nos espermátides e espermatozóides de homens com azoospermia

Increased rates of phosphatidylserine translocation on spermatid and spermatozoa from men with azoospermia

C. Almeida*, M. Sousa*†‡, P. Viana‡, A. Gonçalves‡, J. Silva‡, L. Ferras‡, A. Barros*‡

*Serviço de Genética, Faculdade de Medicina; †Lab Biologia Celular, ICBAS, Universidade do Porto; ‡Centro de Genética da Reprodução A.Barros.

Serviço de Genética, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Portugal

Resumo

a) Objectivos: *Determinação das taxas de apoptose dos espermátides e espermatozóides de homens com azoospermia.* b) Desenho do estudo: *Avaliação quantitativa da translocação da fosfatidilserina com distinção entre células vivas, em apoptose e em necrose.* c) Âmbito onde se desenrolou o estudo: *Universidade do Porto, Portugal.* d) Características da população estudada: *Sob consentimento informado, estudaram-se 19 homens azoospérmicos (5 com anejaculação, 7 com azoospermia obstrutiva, 7 com azoospermia secretora) e, como controlo, 6 homens normozoospérmicos. Todos apresentam cariótipos normais e ausência de microdelecções do cromossoma Y.* e) Principais intervenções realizadas: *Foi realizada uma biopsia testicular de tratamento de modo a recuperar espermátides e espermatozóides testiculares. Nas amostras seminais o estudo da translocação da fosfatidilserina foi efectuado na fracção do sémen e, após centrifugação por gradientes e swim-up, na fracção de swim-up. Após incubação das amostras com anexina V e iodeto de propídio, quantificou-se, ao microscópio de epifluorescência, os diferentes tipos de células.* f) Principais variáveis valorizadas: *Determinou-se a percentagem de espermátides e espermatozóides vivos, em apoptose inicial, apoptose tardia e em necrose nos diferentes grupos. As diferenças entre grupos foram determinadas através do teste (2 a um nível de significância de 5%).* g) Resultados: *O testículo apresenta percentagens superiores de espermátides e espermatozóides em apoptose inicial e em necrose, e o sémen percentagens superiores de espermatozóide vivos e em apoptose tardia. Comparações entre as síndromes testiculares, revelaram proporções superiores de células vivas na azoospermia secretora seguida da obstrutiva, e per-*

Correspondência: Carolina Almeida, BSc
Serviço de Genética
Faculdade de Medicina do Porto
Universidade do Porto
Alameda do Prof. Hernâni Monteiro
4200-319 Porto, Portugal
carola@med.up.pt

Apoios
FCT (60709/04, 60555/04, 59997/04, UMIB).

centagens significativamente superiores de células em apoptose inicial na anejaculação seguida da azoospermia obstructiva. h) Conclusões: A presença de taxas de apoptose superiores no testículo, nomeadamente na anejaculação e na azoospermia obstructiva, sugere um elevado impacto negativo da ausência de ejaculação e da obstrução dos canais excretores, nos espermatídeos e espermatozóides testiculares. Os valores aumentados de apoptose tardia na fracção de sémen sugerem a presença de um mecanismo pós-testicular de activação da cascata apoptótica.

Palavras-chave: Espermatogénese humana. Translocação da fosfatidilserina. Anexina V. Testículo. Sémen.

Summary:

a) Objectives: *Determination of the rates of apoptosis on spermatid and spermatozoa from men with azoospermia.* b) Study design: *Quantitative evaluation of phosphatidylserine translocation with distinction between live, apoptotic and necrotic cells.* c) Study localization: *University of Porto, Portugal.* d) Characteristics of the study population: *Under informed consent, 19 azoospermic men were analysed (5 with anejaculation, 7 with obstructive azoospermia, 7 with secretory azoospermia) and 6 normozoospermic men as controls. All have normal karyotypes and absence of Y chromosome microdeletions.* e) Main interventions: *A testicular biopsy was undertaken in order to recover testicular spermatids and spermatozoa. On semen samples, translocation of phosphatidylserine was studied on the semen fraction and, after gradient centrifugation and swim-up, on the swim-up fraction. After incubation with annexin V and propidium iodide, the different cells types were quantified on an epifluorescence microscope.* f) Main outcomes: *The percentage of live, early apoptotic, late apoptotic and necrotic spermatids and spermatozoa, was evaluated on the different groups. Differences between groups were analysed by (2 test with 5% significance level.* g) Results: *Testis shows higher percentages of early apoptotic and necrotic spermatids and spermatozoa, and semen shows higher percentages of live and late apoptotic spermatozoa. Comparisons between testicular syndromes revealed significant higher proportions of live cells in secretory azoospermia followed by obstructive, and significant higher percentages of early apoptotic cells in anejaculation followed by obstructive azoospermia.* h) Conclusions: *The higher percentages of apoptotic rates on testis, especially on anejaculation and obstructive azoospermia, suggest a strong negative impact of the absence of ejaculation and of excretory duct obstruction on testicular spermatids and spermatozoa. The increased rates of late apoptosis on the semen fraction, suggest a post-testicular event that activates the apoptotic cascade.*

Key words: Human Spermatogenesis. Phosphatidylserine translocation. Annexin V. Testis. Semen.

INTRODUÇÃO

A espermatogénese compreende uma série de eventos, desde a proliferação e diferenciação das espermatogónias, a divisão meiótica dos espermatócitos e a diferenciação e maturação dos espermatozóides (1). Durante este processo, mais de metade das células morre por apoptose antes de se diferenciarem em espermatozóides (2-5)

A apoptose ou morte celular programada é um mecanismo essencial na manutenção de uma homeostasia celular. O seu papel na espermatogénese tem sido largamente estudado (6) tendo sido já descrito, em animais, a presença de um mecanismo apoptótico activo em cada estadio da espermatogénese (7). Sabe-se

que é responsável pelo ajuste do número de células germinais à capacidade de suporte das células de Sertoli, assim como pela eliminação de células anormais ou danificadas (8).

São várias as alterações que ocorrem numa célula apoptótica, desde a redução do volume celular, a formação de corpos apoptóticos, a fragmentação do invólucro nuclear e a condensação e marginalização periférica da cromatina seguida de digestão internucleosómica do DNA (9). No entanto, uma das alterações morfológicas mais importantes e precoces na apoptose é a translocação do fosfolípido fosfatidilserina do folheto interno para o folheto externo da membrana citoplasmática (10-12). Esta alteração precoce ocorre após a activação das caspases (13), principal família de proteínas envolvida no processo

apoptótico, e é responsável pelo reconhecimento e fagocitose das células apoptóticas pelos macrófagos de modo a evitar um processo inflamatório (12, 14). Na espermatogénese, o reconhecimento e fagocitose das células germinais apoptóticas pelas células de Sertoli é efectuado de uma maneira dependente da fosfatidilserina, sendo este processo de fagocitose essencial para uma eficiente produção de espermatozóides (15).

Foram recentemente descritas, pelo nosso grupo de trabalho, as percentagens de apoptose no sêmen e na fracção de tratamento swim-up (16). Através do estudo da actividade da caspase-3, demonstramos a presença de caspase-3 activa unicamente na peça intermédia e em percentagens superiores em situações de astenozoospermia e de teratozoospermia. Estes resultados sugerem, então, que a maquinaria apoptótica se encontra activa no sêmen de modo a eliminar as células anormais devido a defeitos mitocondriais e do citoesqueleto não correspondendo, portanto, nem ao sequestro da enzima nos corpos residuais (17, 18) nem a um mecanismo de apoptose abortiva (19, 20). Permanece, no entanto, por descrever, as percentagens de apoptose nos espermátides alongados e espermatozóides nas situações de azoospermia.

Este estudo teve como objectivo determinar as percentagens de apoptose nas diferentes patologias testiculares (anejaculação, azoospermia obstructiva e azoospermia secretora). Para tal, recorreu-se ao estudo da translocação da fosfatidilserina, alteração que determina a eliminação das células apoptóticas por fagocitose. A expressão deste marcador apoptótico foi, adicionalmente, determinada a nível seminal.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos Pacientes

Foram estudados, sob consentimento informado, 19 homens azoospermicos em tratamento por infertilidade: 5 com anejaculação, 7 com azoospermia obstructiva - 4 CBAVD, 3 obstrução secundária, e 7 com azoospermia secretora - hipoespermatogénese (idade média 32.37 ± 3.06 ; range 28-40). Todos apresentam cariótipos normais (21-22) e ausência de microdelecções no cromossoma Y (23-24). De modo a recuperar espermátides ou espermatozóides para os tratamentos clínicos, foram submetidos a uma biopsia testicular de tratamento (25).

O grupo controlo consistiu em 6 homens (idade média 31.50 ± 1.05 ; range 30-33) com parâmetros seminais normais (concentração $\geq 20 \times 10^6/\text{ml}$; morfologia normal $\geq 15\%$; mobilidade progressiva rápida $\geq 25\%$), cariótipos normais e ausência de microde-

lecções no cromossoma Y. A determinação dos parâmetros seminais foi efectuada segundo as indicações da Organização Mundial de Saúde (26) e os critérios estritos de Kruger para a morfologia normal dos espermatozóides.

Preparação do tecido testicular

Após biopsia testicular de tratamento, o tecido foi colocado em Sperm Preparation Medium (SPM, tampão Hepes; Medicult) procedendo-se à sua dissociação mecânica, com o auxílio de bisturis cirúrgicos, de modo a libertar os espermátides e espermatozóides testiculares (27). O fluido resultante foi diluído em SPM e lavado duas vezes por centrifugação a 1200 rpm durante 5min. Foi removida uma média de $65\mu\text{l}$ (range: 20-155 μl) de suspensão celular para estudo, no próprio dia da biopsia, da translocação da fosfatidilserina.

Preparação das amostras seminais

Cada paciente contribuiu apenas com uma amostra. Após liquefacção (37°C, 30min) e determinação dos parâmetros do espermograma, cada amostra foi dividida em duas fracções. Uma pequena fracção foi lavada com SPM (1500 rpm, 20min, temperatura ambiente) de modo a remover o líquido seminal. Removeu-se uma média de $251\mu\text{l}$ (range: 180-265 μl) para determinação da fosfatidilserina translocada na fracção de sêmen. O restante foi sujeito à técnica de centrifugação por gradientes e swim-up. A amostra foi centrifugada (1500 rpm, 20min, temperatura ambiente) em gradientes Ixaprep (Medicult, Copenhagen, Dinamarca) de modo a remover o líquido seminal e as células imaturas. O centrifugado foi lavado duas vezes em SPM (1500 rpm, 10min, temperatura ambiente), recoberto com 50-100 μl SPM e incubado (1h, 37°C, 5% CO₂ em ar humedecido) para recolher na fase aquosa superior os espermatozóides móveis (swim-up). Foi removido uma média de $191\mu\text{l}$ (range: 55-265 μl) de modo a determinar a translocação da fosfatidilserina na fracção de swim-up. Todo o procedimento foi efectuado no próprio dia da colheita.

Detecção da translocação da fosfatidilserina

O estudo da translocação da fosfatidilserina do folheto interno para o folheto externo da membrana citoplasmática foi efectuado através do uso da proteína anexina V (An) que, na presença de cálcio, apresenta elevada afinidade para a fosfatidilserina (28). Quando conjugada com um fluorocromo, permite a

detecção da translocação da fosfatidilserina para o folheto externo da membrana citoplasmática, característica de uma célula num estado inicial de apoptose. Foi utilizado o Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Calbiochem, San Diego, USA) onde, a anexina V conjugada com o FITC (An-FITC), serve de marcador fluorescente para as células apoptóticas (emissão de cor verde). As células foram adicionalmente incubadas com o iodeto de propídio (IP), que é um corante vital para o qual a membrana citoplasmática não é permeável. Deste modo, apenas nas fases de perda de permeabilidade membranar (apoptose tardia e necrose), o IP é incorporado pela célula ocorrendo a emissão de fluorescência vermelha.

Quando necessário, foi adicionado ao volume inicial da amostra PBS (Phosphate Buffered Saline Solution, Sigma, St. Louis, USA) de modo a perfazer um volume final de 250µl. A amostra foi incubada (15min, temperatura ambiente) com 10µl de Media Binding Reagent (meio que favorece a ligação entre a anexina V e a fosfatidilserina) e AnV-FITC numa concentração final de 0.96µg/ml. Após centrifugação da amostra (900 rpm, 10 min, temperatura ambiente), resuspendeu-se o pellet lentamente em 100µl de tampão previamente mantido no gelo. Finalmente adicionou-se o IP numa concentração final de 0.075µg/ml.

A observação dos resultados foi efectuada num microscópio de epifluorescência (Eclipse E-400; Nikon, Tóquio, Japão) com câmara CCD (Sony, Tóqui, Japão) e software apropriado para análise de imagem (Cytovision Ultra, Applied Imaging International, Sunderland, UK), tendo sido contabilizados cerca de 100 espermatídeos/espermatozóides por amostra testicular e 100 espermatozóides por amostra seminal.

A utilização simultânea da anexina V e do iodeto de propídio, permitiu distinguir quatro tipos de células: células vivas (An- IP-), células em apoptose inicial (An+ IP-), células em apoptose tardia (An+ IP+) e células necróticas (An- IP+) (Figura 1).

Análise estatística

Os resultados foram analisados ao nível celular onde o indivíduo de estudo é cada espermatozóide contabilizado. A determinação, entre grupos, da significância das diferenças entre a presença de células vivas, necróticas e apoptóticas, foi efectuada através do teste (2 a um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Testículo

Foi contabilizado um total de 1908 espermatídeos/espermatozóides, 512 na anejaculação, 724 na azoospermia obstrutiva (Azo) e 672 na azoospermia secretora (Azs) (tabela 1).

O estudo comparativo entre as três patologias testiculares, revelou a presença de percentagens significativamente superiores de células vivas na Azs ($P < 0.012$) seguida da Azo ($P < 0.0001$), relativamente à anejaculação, e de células em apoptose inicial na anejaculação ($P < 0.0001$), relativamente às Azo e Azs (figura 2). O estudo comparativo entre a azoospermia secretora e a azoospermia obstrutiva revelou valores significativamente superiores de células vivas na Azs ($P = 0.012$) e de células em apoptose inicial na Azo

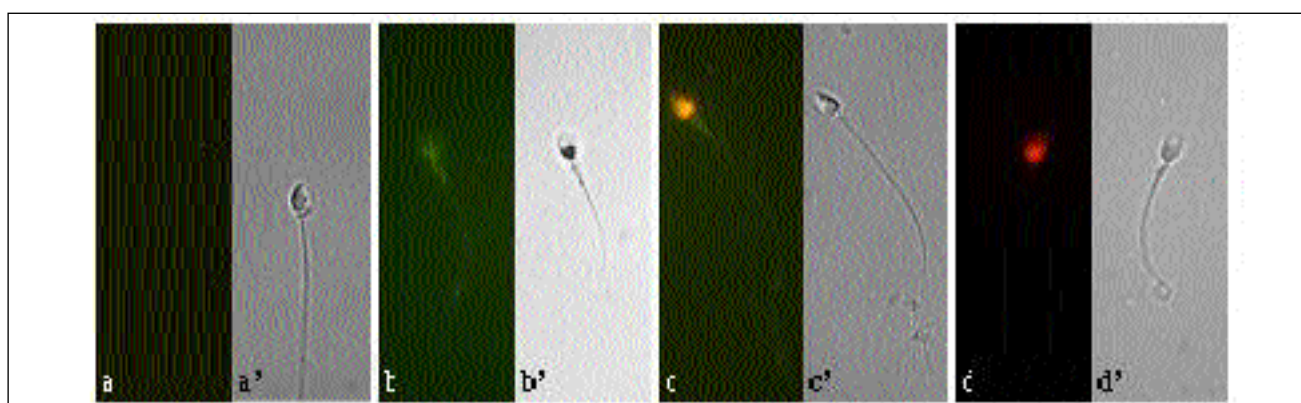


Figura 1

Imagens de fluorescência (a-d) e contraste de fase (a'-d') de espermatídeos e espermatozóides vivos (a, a'), em apoptose inicial (b, b'), apoptose tardia (c, c') e em necrose (d, d').

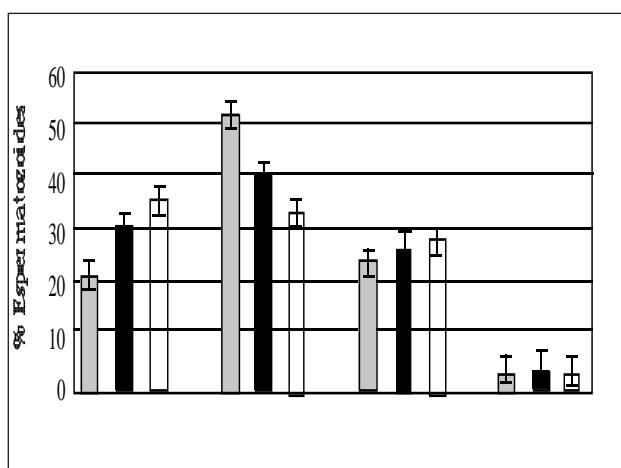
Tabela 1

Espermatídeos e espermatozóides vivos, em apoptose e em necrose nos grupos de patologia testicular.

	Anejaculação			Azo			Azs			Total		
	(n)	(%) ^a	P*	(n)	(%) ^a	P*	(n)	(%) ^a	P*	(n)	(%) ^a	P*
AnV-IP-	107	20.9 ± 21.8	<0.0001	215	29.7 ± 9.9	<0.0001	24	236 ± 23.6	<0.0001	564	29.6 ± 18.8	<0.0001
AnV+IP-	268	52.3 ± 22.6	<0.0001	298	41.2 ± 10.5	<0.0001	228	33.9 ± 16.8	<0.0001	794	41.6 ± 17.1	<0.0001
AnV-IP+	121	23.6 ± 12.2	<0.0001	190	26.2 ± 6.9	<0.0001	187	27.8 ± 13.2	0.006	498	26.1 ± 10.5	<0.0001
AnV+IP+	16	3.1 ± 3.8	0.041	21	2.9 ± 4.3	NS	15	2.2 ± 2.0	NS	52	2.7 ± 3.3	0.040

aMédia±DP
*Versus Sémén

(P = 0.006). Não se observaram diferenças significativas, entre os grupos, para a presença de células em apoptose tardia e em necrose (figura 2).

**Figura 2**

Diferenças para a presença de espermatídeos e espermatozóides vivos (AnV- IP-), em apoptose inicial (AnV- IP-), tardia (AnV+ IP+) e em necrose (AnV- IP+) entre os grupos de patologia testicular. *P<0.0001 (vs anejaculação); # P<0.012 (Azo vs Azs)

Sémén

O grupo controlo consistiu em 6 pacientes com parâmetros seminais normais, tendo sido realizada a técnica de centrifugação por gradientes e swim-up para cada amostra seminal.

Foi contabilizado um total de 674 espermatozóides na fracção de sémén e de 644 espermatozóides na fracção de swim-up (tabela 2). O estudo comparativo entre as duas fracções revelou um aumento significativo (P < 0.0001) da percentagem de células vivas após a realização da técnica de centrifugação por gradientes e swim-up, assim como uma redução signifi-

cativa da percentagem de células em apoptose inicial (P<0.0001) e em necrose (P=0.021) (tabela 1). Não se verificaram diferenças para a percentagem de células em apoptose tardia.

Testículo vs Sémén

Tabela 2

Espermatozóides vivos, em apoptose e em necrose nas fracções de sémén e de swim-up

	Fracção Sémén		Fracção Swim-Up		P*
	(n)	(%) ^a	(n)	(%) ^a	
AnV-IP-	314	46.6 ± 9.9	393	61 ± 12.4	<0.0001
AnV+IP-	116	17.2 ± 7.4	34	5.3 ± 2.3	<0.0001
AnV-IP+	235	34.9 ± 13.1	216	33.5 ± 10.9	NS
AnV+IP+	9	1.3 ± 1.8	1	0.2 ± 0.4	0.021

aMédia±DP
*Sémén vs Swim-Up

Os resultados obtidos ao nível testicular para a presença de células vivas, em apoptose inicial, tardia e em necrose, foram comparados com os resultados obtidos na fracção de sémén e swim-up. Este estudo revelou a presença de percentagens significativamente superiores de espermatozóides vivos (P<0.0001) no sémén e de espermatozóides em apoptose (P<0.0001) e em necrose (P=0.040) no testículo (tabela 1). No entanto, verifica-se que o aumento de células em apoptose no testículo, se deve apenas à presença de espermatozóides em apoptose inicial, apresentando o sémén percentagens significativamente superiores de espermatozóides em apoptose tardia (P<0.0001) (Figura 3). Os mesmos resultados se observaram quando comparando com a fracção de swim-up. Ao comparar especificamente cada patologia testicular com a fracção de sémén, observaram-se resultados semelhantes, excepto a ausência de diferenças significativas para a presença de células necróticas na Azo (P=0.063) e na Azs (P=0.225) relativamente ao sémén (tabela 1).

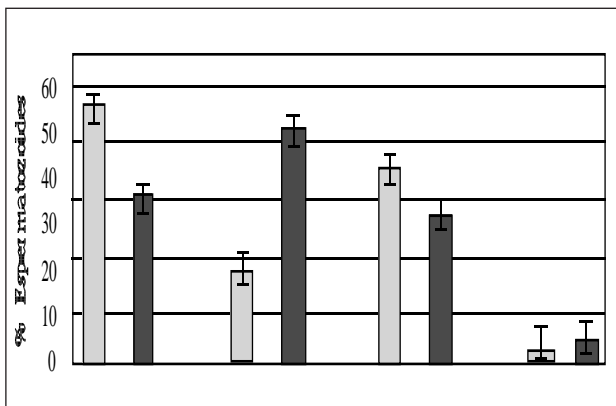


Figura 3

Diferenças para a presença de espermatozóides vivos (AnV-IP-), em apoptose inicial (AnV-IP-), tardia (AnV+IP+) e em necrose (AnV-IP+) entre a fracção de sémem e o testículo.

* $P < 0.0001$, # $P = 0.040$

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A apoptose é um mecanismo essencial no decorrer da espermatogénese. A exposição da fosfatidilserina no folheto externo da membrana citoplasmática é um marcador essencial no reconhecimento e eliminação de células germinais anormais pelas células de Sertoli de modo a permitir o desenvolvimento e a produção normal de espermatozóides.

Pensa-se que um dos factores envolvidos na alteração do funcionamento normal da espermatogénese, com consequente aparecimento de diferentes patologias (alteração dos parâmetros seminais e azoospermia), é a desregulação do mecanismo apoptótico (29). Estudos anteriores demonstraram a presença de percentagens aumentadas de apoptose em diferentes patologias testiculares, através da observação de percentagens elevadas de fragmentação do DNA (30 - 33) HT4, HT28, HT21, HT42) e do aumento da expressão das proteínas Fas/FasL (33, 34) (HT42, HT17).

A presença de fosfatidilserina translocada foi observada em todos os estádios da espermatogénese de indivíduos azoospermicos (35, 36), HT5/34 tendo-se verificado que a sua exposição raramente ocorre nos estádios de ST1, Sa, Sb e Sc (3.9%, range: 0-16%) comparativamente com o observado na fase de espermátido alongado (49.3%, range: 20-54%) (35). No entanto, nem sempre houve uma clara definição do grupo de estudo, sendo avaliado um reduzido número de células.

Deste modo, e através do uso de uma proteína de elevada afinidade para a fosfatidilserina, a anexina V,

descrevemos, pela primeira vez, as percentagens de espermátidos alongados e espermatozóides com fosfatidilserina translocada, em pacientes azoospermicos, assim como em pacientes com parâmetros seminais normais.

No presente trabalho, demonstramos a presença de percentagens significativamente superiores de espermatozóides vivos no sémem (46.6% vs 29.6%) e de espermátidos e espermatozóides em apoptose inicial (41.6% vs 17.2%) e em necrose (2.7% vs 1.3%) no testículo, facto que sugere o envolvimento da apoptose nas diferentes patologias testiculares. No entanto, verificaram-se percentagens significativamente superiores de espermatozóides em apoptose tardia no sémem (34.9%) relativamente ao testículo (26.1%). Deste modo, e tal como Greco et al sugeriu através da demonstração de percentagens de fragmentação do DNA superiores no sémem (23.6%) relativamente ao testículo (4.8%) (37), confirma-se a presença de um factor pós-testicular de indução da activação da cascata apoptótica, que resulta na presença de espermatozóides numa fase avançada de degradação no ejaculado. Foi sugerido, recentemente, um eficiente tratamento de infertilidade com a administração oral de vitamina C e E (38) ou com diclofenac (39), nos casos de elevados níveis de apoptose no sémem.

A comparação entre os diferentes grupos de patologia testicular demonstrou a presença de percentagens significativamente superiores de espermátidos e espermatozóides vivos (36%) nos casos de patologia testicular severa (azoospermia secretora) em comparação com os casos de espermatogénese conservada (29.7%, azoospermia obstrutiva e 20.9%, anejaculação). Por outro lado, a azoospermia obstrutiva e a anejaculação, apresentam níveis superiores de apoptose inicial (41.2% e 52.3%, respectivamente, vs 33.9%). Adicionalmente, não foram encontradas diferenças para a presença de células em apoptose tardia e em necrose. Estes resultados sugerem que, embora o mecanismo apoptótico se encontre activo no sentido de eliminar as células numa fase avançada de degradação, a acumulação de espermátidos e espermatozóides por obstrução tubular (azoospermia obstrutiva) ou por incapacidade de ejaculação (anejaculação), tem um elevado impacto negativo sobre essas mesmas células conduzindo, então, à activação da cascata apoptótica.

Tal como demonstrado anteriormente (40), a técnica de centrifugação por gradientes e swim-up mostrou-se eficiente na redução da percentagem de espermatozóides em apoptose e em necrose e, conseqüentemente, no enriquecimento das amostras relativamente à percentagem de espermatozóides vi-

vos. Estes resultados vêm confirmar, novamente, o reduzido risco de selecção de espermatozóides apoptóticos durante os tratamentos clínicos (16).

Em conclusão, demonstramos a presença de percentagens superiores de espermátides alongados e espermatozóides em apoptose inicial e em necrose no testículo. No entanto, e nos casos de espermatogénese conservada, a apoptose parece surgir como consequência e não causa da patologia. No sémen, embora se verifique a presença de percentagens superiores de espermatozóides vivos, as elevadas percentagens de espermatozóides numa fase tardia da apoptose, mesmo na fracção do swim-up, demonstram a importância de aferir o melhor método de selecção de espermatozóides durante os tratamentos clínicos (40) e/ou de optimização da qualidade e funcionamento dos mesmos (41).

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi parcialmente financiado pela FCT (60709/04, 60555/04, 59997/04, UMIB).

BIBLIOGRAFÍA

1. **Johnson L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Scrutchfield WL.:** Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 471-480.
2. **Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P.:** An early and massive wave of germinal cell apoptosis required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 1997;16: 2262-2270.
3. **Braun RE.:** Every sperm is sacred - or is it? *Nat Genet* 1998; 18: 202-204.
4. **Print CG, Loveland KL.:** Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *BioEssays* 2000; 22: 423-430.
5. **Kierszenbaum AL.:** Apoptosis during spermatogenesis: the thrill of being alive. *Mol Reprod Dev* 2001; 58: 1-3.
6. **Blanco-Rodriguez J.:** A matter of death and life: the significance of germ cell death during spermatogenesis. *Int J Androl* 1998; 21: 236-248.
7. **Blanco-Rodriguez J, Martínez-García C.:** Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif* 1996; 29: 13-31.
8. **Pentikainen V, Erkkila K, Dunkel L.:** Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am J Physiol* 1999; 276: E310-E316.
9. **Ziegler U, Groscurth P.:** Morphological Features of Cell Death. *News Physiol Sci* 2004; 19: 124-128.
10. **Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C.:** A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184: 39-51.
11. **Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR.:** Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995; 182: 545-1556.
12. **Van den Eijnde SM, Boshart L, Reutelingsperger CPM, De Zeeuw CI, Vermeij-Keers C.:** Phosphatidylserine plasma membrane asymmetry in vivo: a pan-cellular phenomenon which alters during apoptosis. *Cell Death Differ* 1997; 4: 311-316.
13. **Naito M, Nagashima K, Mashima T, Tsuruo T.:** Phosphatidylserine externalization is a downstream event of Interleukin-1 β -Converting Enzyme family protease activation during apoptosis. *Blood* 1997; 89: 2060-2066.
14. **Shiratsuchi A, Umeda M, Ohba Y, Nakanishi Y.:** Recognition of phosphatidylserine on the surface of apoptotic spermatogenic cells and subsequent phagocytosis by Sertoli cells of the rat. *J Biol Chem* 1997; 272, 2354-2358.
15. **Nakanishi Y, Shiratsuchi A.:** Phagocytic Removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanisms and consequences. *Biol Pharm Bull* 2004; 27, 13-16.
16. **Almeida C, Cardoso MF, Sousa M, Viana P, Gonçalves A, Silva J, Barros A.:** Quantitative study of caspase-3 activity in semen and after swim-up preparation in relation to sperm quality. *Hum Reprod* 2005; 20: 1307-1313.
17. **Blanco-Rodriguez J, Martinez-Garcia C.:** Apoptosis is physiologically restricted to a specialized cytoplasmic compartment in rat spermatids. *Biol Reprod* 1999; 61: 1541-1547.
18. **Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D.:** Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002; 66: 1061-1067.
19. **Sakkas D, Mariethoz E, St John JC.:** Abnormal semen parameters in human are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 1999; 251: 350-355.
20. **Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A, Ong CN.:** Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod* 2002; 17: 1266-1273.

21. **Alves C, Carvalho F, Crenades N, Sousa M, Barros A.:** Unique (Y;13) translocation in a male with oligozoospermia: cytogenetic and molecular studies. *Eur J Hum Genet* 2002; 10: 467-74.
22. **Pinho MJ, Neves R, Costa P, Ferrás C, Sousa M, Alves C, Almeida C, Fernandes S, Silva J, Ferrás L, Barros A.:** Unique t(Y;1)(q12;q12) reciprocal translocation with loss of the heterochromatic region of chromosome 1 in a male with azoospermia due to meiotic arrest: a case report. *Hum Reprod* 2005; 20: 689-696.
23. **Fernandes S, Huellen K, Gonçalves J, Dukal H, Zeisler J, Rajpert De Meyts E, Skakkebaek NE, Habermann B, Krause W, Sousa M, Barros A, Vogt PH.:** High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 286-298.
24. **Ferrás C, Fernandes S, Marques CJ, Carvalho F, Alves C, Silva J, Sousa M, Barros A.:** AZF and DAZ gene copy-specific deletion analysis in maturation arrest and Sertoli cell-only syndrome. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 755-761.
25. **Sousa M, Cremades N, Silva J, Oliveira C, Ferraz L, Teixeira da Silva J, Viana P, Barros A.:** Predictive value of testicular histology in secretory azoospermic subgroups and clinical outcome after microinjection of fresh and frozen-thawed sperm and spermatids. *Hum Reprod* 2002; 17: 1800-1810.
26. **World Health Organization** (1999) Laboratorial manual for the examination of human semen and sperm cervical-mucus interaction. Cambridge University Press, UK.
27. **Sousa M, Cremades N, Alves C, Silva J, Barros A.:** Developmental potential of human spermatogenic cells co-cultured with Sertoli cells. *Hum Reprod* 2002; 17: 161-172.
28. **Van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutenlingsperger CPM.:** Annexin V-Affinity Assay: A review on an apoptosis detection system based on Phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998; 31: 1-9.
29. **Kim ED, Barqawi AZ, Seo JT, Meacham RB.:** Apoptosis: its importance in spermatogenic dysfunction. *Urol Clin N Am* 2002; 29: 755-765.
30. **Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Lipshultz LI, Kim ED.:** In situ end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril* 1997; 68: 1065-1069.
31. **Ramos L, Kleingeld P, Meuleman E, Kooy R, Kremer J, Braat D, Wetzels A.:** Assessment of DNA Fragmentation of spermatozoa that were surgically retrieved from men with azoospermia. *Fertil Steril* 2002; 77: 233-237.
32. **Takagi S, Itoh N, Kimura M, Sasao T, Tsukamoto T.:** Spermatogonial proliferation and apoptosis in hyperpermatogenesis associated with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2001; 76: 901-907.
33. **Eguchi J, Koji T, Nomata K, Yoshii A, Shin M, Kanetake H.:** Fas-Fas ligand system as a possible mediator of spermatogenic cell apoptosis in human maturation-arrested testes. *Hum Cell* 2002; 15: 61-68.
34. **Francavilla S, D'Abrizio P, Rucci N, Silvano G, Properzi G, Straface E, Cordeschi G, Necozone S, Gnassi L, Arizzi M, Ulisse S.:** Fas and Fas Ligand expression in fetal and adult human testis with normal and deranged spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2692-2700.
35. **Tesarik J, Greco E, Cohen-Bacrie P, Mendoza C.:** Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 757-762.
36. **Tesarik J, Ubaldi F, Rienzi L, Martinez F, Iacobelli M, Mendoza C, Greco E.:** Caspase-dependent and -independent DNA fragmentation in Sertoli and germ cells from men with primary testicular failure: relationship with histological diagnosis. *Hum Reprod* 2004; 2: 254-261.
37. **Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C.:** Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 2005; 20: 226-230.
38. **Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Tesarik J.:** Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* 2005; 26: 349-353.
39. **Alvarez JG.:** Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 2005; 20: 2031-2032; author reply 2032-3.
40. **Lachaud C, Tesarik J, Canadas ML, Mendoza C.:** Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 2004; 19: 607-610.
41. **Alvarez JG.:** Nurture vs Nature: How can we optimize sperm quality?. *J Androl* 2003; 24: 640-648.