

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

**EFEITOS DO HIPO E HIPERTIREOIDISMO NEONATAIS
SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO TESTÍCULO E DOS
DIFERENTES TIPOS DE ESPERMATOGÔNIAS, DO
NASCIMENTO À FASE ADULTA, EM CAMUNDONGOS
C57BL/6J.**

Sarah Alves Auharek

Belo Horizonte

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

SARAH ALVES AUHAREK

**EFEITOS DO HIPO E HIPERTIREOIDISMO NEONATAIS
SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO TESTÍCULO E DOS
DIFERENTES TIPOS DE ESPERMATOGÔNIAS, DO
NASCIMENTO À FASE ADULTA, EM CAMUNDONGOS
C57BL/6J.**

Dissertação apresentada ao Curso 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: Dr. Luiz Renato de França

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas – UFMG
2007

“Efeitos do hipo e hipertireoidismo neonatais sobre o desenvolvimento do testículo e dos diferentes tipos de espermatogônias, do nascimento á fase adulta, em camundongos C57BL/6J”

Dissertação defendida em 27/09/2007

Resultado:

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Cleida Aparecida de Oliveira

Prof. Dr. José Carlos Nogueira

Prof. Dr. Luiz Renato de França (orientador)

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do Prof. Dr. Luiz Renato de França e com o auxílio das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG)

A meus pais, que fizeram dos
meus sonhos também seus sonhos e a
minha irmã Zena, pelo constante
incentivo! Obrigada por tudo!

“ Ò profundidade das riquezas, tanto da sabedoria como da ciência de Deus! Quão insondáveis são os seus juízos, e quão inescrutáveis os seus caminhos! Quem compreendeu a mente do Senhor? Ou quem foi o seu conselheiro? Ou quem lhe deu primeiro a ele, para que lhe seja recompensado? Porque dele e por ele e para ele são todas as coisas. Glória, pois a Ele eternamente.”

Carta de Paulo aos Romanos, Capítulo 11, versos 33 a 36.

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1-** Estádios (I-XII) do ciclo do epitélio seminífero de camundongos.....49
- Figura 2-** Diagrama demonstrando as associações celulares durante o ciclo do ciclo do epitélio seminífero de camundongos..... 50
- Figura 3-** Evolução dos pesos corporal, testicular e índice gonadossomático nos animais controles e tratados com PTU e T3, sacrificados em diferentes idades.....51
- Figura 4 -** Evolução do diâmetro tubular dos camundongos controles e tratados com PTU e T3 e sacrificados em diferentes idades52
- Figura 5-** Morfologia dos gonócitos e dos diferentes tipos de espermatogônias de camundongos C57BL/6J53
- Figura 6 -** Secções transversais de cordões/túbulos seminíferos de camundongos controles e tratados com PTU e T3 e sacrificados entre 1 e 10 dias de idade.....55
- Figura 7 -** Secções transversais de cordões/túbulos seminíferos de camundongos controle, tratados com PTU, T3 e sacrificados entre 15 e 28 dias de idade.....57
- Figura 8 -** Secções transversais de túbulos seminíferos de camundongos controles, tratados com PTU, T3 e sacrificados entre 37 e 100 dias de idade.....59
- Figura 9 -** Evolução do processo de formação do lume em camundongos sacrificados nas idades de 5 a 37 dias.....60
- Figura 10 –** Síntese da evolução do processo de formação do lume em camundongos C57BL/6J sacrificados entre 5 e 37 dias de idade.....61
- Figura 11 –** Evolução do volume nuclear das células de Sertoli em camundongos controles e tratados com PTU e T3 e sacrificados em diferentes idades.....62

Figura 12 – Evolução do número de células de Sertoli em camundongos controles e tratados com PTU e T3 e sacrificados em diferentes idades.....	63
Figura 13 – Evolução do volume das células germinativas de camundongos controles e tratados com PTU e T3 e sacrificados entre 5 e 20 dias de idade.....	64
Figura 14 – Evolução do volume das células germinativas de camundongos controles e tratados com PTU e T3 e sacrificados entre 28 e 100 dias de idade.....	66
Figura 15 – Evolução do número de células germinativas de camundongos controles e tratados com PTU e T3 e sacrificados entre 05 e 20 dias de idade.....	68
Figura 16 – Evolução do número de células germinativas de camundongos controles e tratados com PTU e T3 e sacrificados entre 28 e 100 dias de idade.....	70
Figura 17 – Evolução do número total de espermatogônias A de camundongos controles e tratados com PTU e T3 e sacrificados entre 05 e 100 dias de idade.....	71

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Morfometria das células germinativas de camundongos com 1 e 05 dias de idade.....	72
Tabela 2 - Morfometria das células germinativas de camundongos com 10 dias de idade	73
Tabela 3 - Morfometria das células germinativas de camundongos com 15 dias de idade.....	74
Tabela 4 - Morfometria das células germinativas de camundongos com 20 dias de idade.....	75
Tabela 5 - Morfometria das células germinativas de camundongos com 28 dias de idade.....	76
Tabela 6 - Morfometria das células germinativas de camundongos com 37 dias de idade.....	77
Tabela 7 - Morfometria das células germinativas de camundongos com 70 dias de idade.....	78
Tabela 8 - Morfometria das células germinativas de camundongos com 100 dias de idade.....	79
Tabela 9 - Eficiência da célula de Sertoli, índice meiótico e produção espermática diária (PED) por testículo e por grama de parênquima testicular em camundongos controles, tratados com PTU e com T3, e sacrificados aos 100 dias de idade.....	80
Tabela 10 - Volume (µl) e percentual dos componentes vasculares em camundongos com 10 dias de idade	80

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, meu fiel e bom amigo, que me guiou em todos os passos desta jornada e me permitiu conviver com pessoas tão especiais durante o desenvolvimento desta dissertação;

Ao professor, **Dr. Luiz Renato de França**, por ter me acolhido em seu laboratório, pela competente orientação e ensinamentos os quais levarei por toda a vida;

A meus pais **Fares Auharek** (*in memoriam*) e **Ruth Alves da Silva Auharek** pelos sábios conselhos;

À professora **Dr^a Maria de Fátima Leite**, exemplo de pesquisadora e pessoa, grande incentivadora, por ter despertado em mim o gosto pela ciência e ser meu modelo profissional;

Ao professor **Dr. Hélio Chiarini-Garcia**, por pacientemente ter me ensinado a reconhecer os tipos de espermatogônias;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular: **Leonardo Bordoni, Jaqueline, Gleide, Dirceu, Érika (e Marcos Cabral), Robson, Samyra, Edson, Marcelo, Rafael Nóbrega, Guilherme, Amanda, Carolina, Fernando, Stella, Juliana Raso, Juliana Rocha e Luís Henrique**;

Ao **Adriano Moreira** e **Mara Livia**, técnicos e amigos do Laboratório de Biologia Celular, obrigada pela paciência e auxílio durante toda a elaboração deste projeto;

Ao **Dr. Sérgio Ricardo Batlouni**, por ter me ensinado a fazer os cálculos do hormônio T3 e toda a documentação fotográfica;

À chefe do departamento de Morfologia, professora **Dr^a Gleydes Gambogi Parreira**, pela amizade;

Ao corpo administrativo e aos professores do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, em especial a professora **Dr^a Annamaria Ravaro Vago**;

À **secretária do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, Iraídes**, pelo auxílio e amizade;

Aos **bioteristas do CEBIO, Elmo e Gilmar**, pela presteza e solicitude e por terem me ensinado a trabalhar com os animais;

A **todos os amigos do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular**, pelos divertidos e agradáveis momentos de descontração;

Às fundações que financiaram o desenvolvimento deste projeto, CAPES, CNPq, FAPEMIG;

Muito obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1.1 - Estrutura e diferenciação testicular.....	2
1.2 - Desenvolvimento pós-natal do testículo em roedores.....	2
1.3 - Espermatogênese	3
1.4 - Tipos de espermatogônias e cinética.....	4
1.5 - Nicho e interação célula de Sertoli/ Espermatogônias.....	8
1.6 - Transplante de espermatogônias.....	12
1.7 - Efeitos dos hormônios tireoidianos no testículo.....	13
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 - Animais e tratamento	21
3.1.1 - Experimento I- Hipotireoidismo.....	21
3.1.2 - Experimento II-Hipertireoidismo.....	21
3.2 - Coleta e processamento dos testículos.....	22
3.3 - Caracterização morfológica dos diferentes tipos de espermatogônias e célula de Sertoli.....	22
3.4 - Análises morfométricas.....	23
3.4.1 - Percentual de túbulos seminíferos com lume e com apoptose.....	23
3.4.2 - Proporções volumétricas (%) e volumes dos componentes do testículo.....	24
3.4.3 - Diâmetro tubular.....	25
3.4.4 - Cálculo do volume nuclear das células germinativas e células de Sertoli.....	25
3.4.5- Número de células de Sertoli por testículo.....	25
3.4.6 - Volume individual das células germinativas.....	26
3.4.7- Número de células germinativas por testículo.....	26
3.4.8 - Contagem do número de células germinativas e de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero.....	26
3.4.9- Razões entre números celulares.....	27
3.4.10 - Cálculo da produção espermática diária por testículo e por grama de testículo	28
3.5 - Análises estatísticas.....	28
4. RESULTADOS.....	30
4.1 - Pesos corporal, testicular e índice gonaossomático.....	30
4.2 - Análise histomorfométrica do testículo.....	30
4.2.1 - Diâmetro tubular, formação do lume e presença de apoptoses.....	30
4.2.2 - Morfometria das células de Sertoli.....	31
4.2.3 - Morfologia dos gonócitos e espermatogônias e tipo celular mais avançado nas diferentes idades avaliadas.....	32

1- INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 – Estrutura e diferenciação testicular

O testículo dos mamíferos eutérios é um órgão com forma arredondada ou ovóide, com funções exócrina e endócrina, geralmente localizado no escroto na maioria das espécies e envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, a túnica albugínea. Morfofuncionalmente, o testículo pode ser dividido em dois compartimentos principais: o compartimento intertubular ou intersticial, e o compartimento dos túbulos seminíferos. No compartimento intertubular estão localizadas as células de Leydig, vasos sanguíneos e capilares não fenestrados, vasos ou espaço linfático, nervos, células e fibras do tecido conjuntivo, e uma população variável de outras células como fibroblastos, macrófagos e mastócitos (Russell et al., 1990). Apesar de existir grande variação entre as diferentes espécies de mamíferos quanto à proporção volumétrica (%) dos diversos componentes do compartimento intertubular (Fawcett et al., 1973; França et al., 2005), de maneira geral, a célula de Leydig é o tipo celular mais abundante. A célula de Leydig é a maior fonte de andrógenos, notavelmente testosterona, e uma fonte variada de outros esteróides. A célula de Leydig possui abundante retículo endoplasmático liso e mitocôndrias com cristas tubulares, ambas organelas contêm enzimas associadas com a síntese de esteróides (Russell et al., 1990).

O compartimento dos túbulos seminíferos constitui a maior parte do testículo, ocupando, na grande maioria das espécies de mamíferos, de 70 a 90% do parênquima testicular (França & Russell, 1998; França et al., 2005). Os túbulos seminíferos são formados pela túnica própria, epitélio seminífero e lume tubular. A túnica própria reveste o túbulo seminífero externamente, sendo composta de células peritubulares mióides e matriz extracelular. As células mióides são contráteis e auxiliam na movimentação do fluido e propulsão do esperma através dos túbulos seminíferos (Russell et al., 1990). O epitélio seminífero é formado basicamente por dois tipos celulares de origem embriológica distinta: as células germinativas procedentes do epiblasto adjacente ao mesoderma extra-embriônico e as células de Sertoli presumivelmente originadas do epitélio celomático (Karl & Capel, 1998; Capel, 2000).

A célula de Sertoli é o primeiro elemento somático a se diferenciar no testículo e suas precursoras expressam o gene determinante sexual *Sry* no braço curto de cromossomo Y (Karl & Capel, 1998; Capel, 2000). O gene *Sry* inicia em machos uma via de ativação de genes específicos deste tecido e/ou repressão de genes que estão especificamente envolvidos no

desenvolvimento ovariano. Linhagens transgênicas de camundongos XX que expressam *Sry* apresentam formação dos cordões testiculares. Contudo, esse evento primário da determinação sexual não ocorre em fêmeas, ou em camundongos, que não possuem o gene *Sry*. Na ausência da expressão de *Sry*, o desenvolvimento da gônada procede ao longo da via ovariana (Martineau et al., 1997; Tilmann & Capel, 2002; Ross & Capel, 2005). Dessa forma, as células de Sertoli possuem um papel central na diferenciação e desenvolvimento testicular que ocorre cerca de 11,5 dias pós-coito (dpc) em camundongos (Capel, 2000). As células de Sertoli proliferam mais ativamente antes do nascimento. Contudo, após o nascimento, em roedores, a proliferação das células de Sertoli se estende por duas (camundongos) a três (ratos) semanas (Steinberger & Steinberger, 1971; Orth, 1982; Vergouwen, 1991; Joyce et al., 1993). A população adulta de células de Sertoli é relativamente estável durante toda a vida do animal (Russell et al., 1990). Vale ressaltar que a célula de Sertoli possui importantes funções, podendo ser citadas dentre elas a manutenção da integridade do epitélio seminífero; secreção de fluido para formar o lúmen tubular; participação no processo de espermiacão e, através de junções de oclusão, divide o epitélio seminífero em compartimentos basal, adluminal, e compartimento intermediário que é transitório (Russell et al., 1990). Como a célula de Sertoli regula o microambiente do compartimento adluminal, formando a barreira hematotesticular, é geralmente assumido que os nutrientes recebidos pelas células germinativas desses compartimentos são fornecidas pela célula de Sertoli, que também medeia a ação dos hormônios (FSH-hormônio estimulante do folículo e andrógenos) no processo espermatogênese (Russell et al., 1990; Sharpe, 1994; França & Chiarini-Garcia, 2005).

1.2 - Desenvolvimento pós-natal do testículo em roedores

À semelhança do observado na maioria das espécies de mamíferos, o desenvolvimento pós-natal do testículo de ratos pode ser dividido em duas fases distintas e inversamente correlacionadas (Orth, 1993; França et al., 2000). Na primeira, com duração aproximada de duas semanas após o nascimento, extensiva proliferação de espermatogônias e de células de Sertoli pode ser observada, promovendo como consequência enorme crescimento em comprimento dos cordões testiculares. Por outro lado, na segunda fase, que ocorre de quinze dias a várias semanas após o nascimento, acentuado aumento no número de células germinativas e na população de células de Leydig do tipo adulto é observado (Orth, 1993; França et al., 2000; Mendis-Handagama & Ariyaratne, 2001). Evidente crescimento no

tamanho do testículo e no diâmetro tubular, além de secreção de fluido através das células de Sertoli, também são notados. Conforme será comentado em detalhes em outros itens da introdução, estas duas fases são reguladas por diferentes hormônios e fatores de crescimento específicos (Orth, 1993; França et al., 1995; Singh & Handelsman, 1996; Maran et al., 1999; Mendis-Handagama & Ariyaratne, 2001; Allan et al., 2004). Por exemplo, o FSH e os hormônios tireoidianos são considerados os principais reguladores da proliferação (FSH) e diferenciação/maturação (T3- triiodotironina) das células de Sertoli (Orth, 1993; Sharpe et al., 2003; Cooke et al., 2005). O crescimento testicular acompanha o aumento nos níveis de FSH durante o seu desenvolvimento (Ojeda & Ramirez, 1972; Döhler & Wuttke, 1974). Em mamíferos as células de Sertoli possuem dois picos de proliferação: durante o período fetal/neonatal precoce e no período pré-puberal (França et al, 2000; Sharpe et al., 2003). Estes dois picos de proliferação são particularmente destacados em espécies nas quais o período neonatal é temporalmente distante do período da puberdade, como nos humanos e em suínos (França et al, 2000; Sharpe et al., 2003). Entretanto, nos roedores, como ratos e camundongos, a distância temporal entre o período neonatal e o puberal é curta (cerca de 4-6 semanas), e eventuais diferentes períodos de proliferação de células de Sertoli não seriam facilmente observados. Em condições naturais, a proliferação das células de Sertoli no testículo de mamíferos adultos não é observada (França & Russell, 1998; Schulz et al., 2005).

Quanto às células de Leydig, diversos hormônios e fatores de crescimento, tais como hormônios tireoidianos, LH (hormônio luteinizante), esteróides, AMH (hormônio anti-Mülleriano), PDGF-A (fator de crescimento derivado de plaqueta), TGF- α/β (fator de crescimento e transformação), IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina) e citocinas secretadas pelos macrófagos, são responsáveis pela regulação da proliferação e diferenciação das células de Leydig (Mendis-Handagama & Ariyaratne, 2001; De Gendt et al., 2005). Os esteróides produzidos por estas células (ex: T- testosterona; DHT- diidrotestosterona) são muito importantes para o desenvolvimento e função do sistema genital (Robaire et al., 2006; Risbridger & Taylor, 2006).

1.3 - Espermatogênese

A espermatogênese é um processo complexo e bem organizado que ocorre nos túbulos seminíferos e dura cerca de 30 a 75 dias na maioria dos mamíferos (França & Russell, 1998; França et al., 2005). Baseado em características morfológicas e funcionais, o processo espermatogênico pode ser dividido em três fases: (a) fase proliferativa ou espermatogonial,

caracterizada por várias e sucessivas divisões mitóticas dos diferentes tipos de espermatogônias, (b) fase meiótica ou espermatocitogênica, na qual ocorre a duplicação do DNA, a recombinação gênica e duas divisões que resultam na formação de uma célula haplóide denominada espermátide e (c) fase de diferenciação ou espermiogênica, onde as espermátides arredondadas passam por drásticas alterações morfológicas e funcionais tais como a formação do acrossoma, do flagelo e a condensação nuclear, resultando numa célula altamente especializada, o espermatozóide, que é morfológicamente apto para alcançar e fertilizar o ovócito (Russell et al., 1990).

As células germinativas organizam-se nos túbulos seminíferos em distintas associações celulares denominadas estádios, os quais se sucedem com o tempo de maneira ordenada, formando o ciclo do epitélio seminífero (CES) (Russell et al., 1990). Cada tipo celular de uma associação celular específica é funcionalmente integrado com outras células desta mesma associação que também estão no mesmo processo de desenvolvimento. Os estádios do ciclo do epitélio seminífero podem ser classificados pelo método da morfologia tubular (Berndtson, 1977; França & Russell, 1998; França et al., 2005) e pelo método do sistema acrossômico (Leblond & Clermont, 1952; Russel et al., 1990; França et al., 2005). O primeiro tem como ponto de referência a forma e a localização dos núcleos das espermátides e a presença de figuras em divisão meiótica (Roosen- Runge & Giesel Jr., 1950; Courot et al., 1970; Ortavant et al., 1977). Nesta classificação, oito estádios do ciclo são obtidos para todas as espécies. Entretanto, pelo sistema acrossômico o número de estádios classificados é variado para cada espécie, e a identificação dos mesmos se baseia no desenvolvimento do acrossoma e nas características morfológicas dos núcleos das espermátides (Leblond & Clermont, 1952; Russell et al., 1990; França et al., 2005). Por este sistema, XII estádios do CES são observados em camundongos, conforme ilustrado na Figura 1.

A duração total do processo espermatogênico, de espermatogônia do tipo A (ver abaixo) até a espermição e que engloba cerca de 4,5 ciclos espermatogênicos, é de cerca de 30 a 80 dias (Russell et al., 1990; França & Russell, 1998; França et al., 2005). A duração do ciclo do epitélio seminífero, que é uma constante biológica espécie-específica (Clermont, 1972), está sob controle do genótipo da célula germinativa (França et al., 1998).

1.4 – Tipos de espermatogônias e cinética

As células germinativas primordiais (CGP) se originam do epiblasto adjacente ao mesoderma extra-embrionário, cerca de 7,25 dpc (Bendel-Stenzel et al., 1998; Ross & Capel,

2005) e migram da base do alantóide ao longo do intestino posterior para as cristas genitais, proliferando ativamente nesta fase. Quando alcançam a crista genital, cerca de 10,0 a 11,0 dpc, (Ross & Capel, 2005), são envolvidas pelas células de Sertoli formando assim os cordões seminíferos que também tem a participação das células pericordonais mióides. A formação dos cordões seminíferos, que ocorre pela via de sinalização envolvendo a fosfatidilinositol-3 quinase, é considerada o primeiro indicador morfológico da diferenciação sexual (França & Chiarini-Garcia, 2005).

Nos roedores, após curto período de proliferação, os gonócitos vão permanecer quiescentes no ciclo celular até o período perinatal quando novamente tornam a se dividir por mitoses, iniciando assim o processo espermatogênico. Nesse período, os gonócitos começam a migrar para a base do epitélio emitindo prolongamentos citoplasmáticos em direção à membrana basal (McGuinness & Orth, 1992). A alocação dos gonócitos em direção a membrana basal é necessária para sobrevivência dessas células, pois àquelas que eventualmente permanecem no centro dos cordões testiculares sofrem apoptose (Hasthorpe et al., 1999). Orwig et al (2002), identificaram duas subpopulações de gonócitos em suspensões celulares do testículo de ratos neonatos; os gonócitos com pseudópodos ou gonócitos com prolongamentos celulares e os gonócitos arredondados. Essas duas populações potencialmente se desenvolvem de maneira distinta: as células com pseudópodos tornam-se as células tronco e as arredondadas sofrem apoptose (Orwig et al., 2002).

Estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que gonócitos e células de Sertoli se comunicam via *gap junction*. Assim, a interação mediada por contato entre essas células tem um papel importante na divisão pós-natal dos gonócitos, provavelmente em conjunto com fatores secretados pela própria célula de Sertoli. A proliferação e a disposição dos gonócitos pós-natais são eventos independentes que ocorrem na ausência de fatores extratesticulares (McGuinness & Orth, 1992). Os gonócitos em contato com a membrana basal se dividirão mitoticamente formando as espermatogônias tronco do testículo (De Rooij & Grootegoed, 1998; De Rooij & Russell, 2000). Segundo Van Haaster & De Rooij (1993), no começo da espermatogênese, os gonócitos ou originam a espermatogônia-tronco ou originam diretamente espermatogônia mais diferenciada (A₂). Pelo fato de nesta fase o testículo ainda se encontrar na cavidade abdominal, a aceleração do processo espermático devido à maior temperatura também deve ser considerada (Van Haaster & De Rooij, 1993).

Em roedores, as espermatogônias tradicionalmente têm sido subdivididas em espermatogônias do tipo A, que apresentam pouca heterocromatina lineando a borda nuclear

(carioteca) e espermatogônias do tipo B, que apresentam abundante heterocromatina, ocorrendo ainda um tipo de espermatogônia intermediária (In) (De Rooij & Grootegoed, 1998; De Rooij & Russell, 2000). Em camundongos, as espermatogônias do tipo A isoladas (A_{is}) são consideradas as células tronco da linhagem espermatogênica. Na divisão desta espermatogônia pode ocorrer a formação de duas novas células tronco ou, a citocinese não é completa, originando assim as espermatogônias A pareadas (A_{pr}), que permanecem conectadas por pontes citoplasmáticas. Normalmente, é considerado que a metade da população de células tronco divide para formar (A_{pr}), enquanto a outra metade, através de divisões de auto-renovação, mantém o número de células tronco. No entanto, vale ressaltar que os mecanismos envolvidos na determinação do tipo de divisão a ser seguido pelas espermatogônias tronco não estão ainda caracterizados. Já a espermatogônia A_{pr} divide formando cadeias de 4, 8, 16 ou 32 células, que são conhecidas como espermatogônias alinhadas (A_{al}), ainda conectadas por pontes citoplasmáticas (De Rooij & Grootegoed, 1998; De Rooij & Russell, 2000). Estudos em cultura celular identificaram a neuregulina-1, membro da superfamília EGF (fator de crescimento epidermal), como fator necessário para a formação das espermatogônias alinhadas (Hamra et al., 2007).

A espermatogônia A_{al} se diferencia em espermatogônia A_1 , que é o primeiro tipo espermatogonial do grupo das espermatogônias diferenciadas. A espermatogônia A_1 , através de uma série de seis divisões mitóticas origina as espermatogônias A_2 , A_3 , A_4 , espermatogônia In e, finalmente, a espermatogônia B que por sua vez forma os espermátócitos primários, conforme esquema abaixo: A_{is} (isolada) \rightarrow A_{pr} (pareada) \rightarrow A_{al} (alinhadas com várias gerações) \rightarrow $A_1 \rightarrow A_2 \rightarrow A_3 \rightarrow A_4 \rightarrow$ In \rightarrow B \rightarrow espermátócitos primários. Dessa forma as espermatogônias podem ser classificadas em duas categorias básicas: espermatogônias indiferenciadas ou imaturas (A_{is} , A_{pr} , A_{al}) e espermatogônias diferenciadas ou maduras (A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , In, B), (De Rooij & Grootegoed, 1998; De Rooij & Russel, 2000; De Rooij & Van Pelt, 2003). Ao contrário das espermatogônias consideradas indiferenciadas, funcionalmente as espermatogônias diferenciadas estão presentes somente em determinados estádios do CES e estão temporalmente comprometidas com a formação de espermatozoides ou sofrerão apoptoses (De Rooij & van Dissel-Emiliani, 1997). A cinética das espermatogônias indiferenciadas, bem como das diferenciadas e a composição celular dos diferentes estádios do CES estão ilustradas na Figura 2.

Shosei et al. (2006) caracterizaram a primeira onda espermatogênica e demonstraram que a mesma, em camundongos, ocorre de forma autônoma. Desta forma, na primeira semana

pós-natal, os gonócitos paralelamente originam as espermatogônias indiferenciadas (A_{ind}) e espermatogônias diferenciadas (A_{dif}). Esse processo relaciona-se com um pré-modelo do CES, que inicia antes do nascimento. As espermatogônias diferenciadas são geradas especificamente em segmentos do túbulo seminífero com altos níveis de expressão de mRNA de galectina 1 da célula de Sertoli. Essas espermatogônias diferenciadas não passam pelo *status* de espermatogônias indiferenciadas e surgem na primeira onda espermatogênica, resultando na formação de espermatozóides férteis. De maneira oposta, as espermatogônias indiferenciadas são geradas preferencialmente em segmentos com níveis médios de galectina. Elas subsequentemente agem como uma população de células tronco auto-renováveis, originando também células diferenciadas. A transformação de espermatogônias indiferenciadas em espermatogônias diferenciadas está relacionada com o CES, e as espermatogônias diferenciadas são estabelecidas em estádios com alta expressão de galectina (estádios IX-X) (Shosei et al. 2006).

Chiarini-Garcia & Russell (2001 e 2002) demonstraram ser possível caracterizar morfológicamente, através das microscopias de luz e eletrônica de transmissão, os vários tipos de espermatogônias de camundongos. Vale ressaltar que a diferenciação da espermatogônia A_{al} para a espermatogônia A_1 é um ponto importante da espermatogênese, que parece ser altamente regulado. Assim, diferentes condições como deficiência em vitamina A, intoxicações da célula de Sertoli, radiação e mesmo aumento da temperatura testicular podem bloquear essa diferenciação (De Rooij & Grootegoed, 1998).

Nakagawa et al. (2007) demonstraram que no processo espermatogênico de camundongos, as espermatogônias indiferenciadas estão funcionalmente divididas em múltiplos compartimentos: as células tronco reais e as células tronco potenciais. Ao que parece, o sistema de célula tronco não é exclusivamente dependente da auto-renovação intrínseca da espermatogônia isolada (A_{is} que seria considerada a célula tronco real), mas envolve extensa população com potencial de auto-renovação, chamada de células tronco potenciais. Havendo perda da célula tronco real, as células tronco potenciais assumem o papel de regular a homeostase testicular, desta forma há gênese de novas células tronco reais e a integridade da espermatogênese é assegurada (Nakagawa et al. 2007).

Devido a sua alta importância, o grupo das espermatogônias indiferenciadas têm sido bastante investigado (Hofmann & Dym, 2005). No entanto, até o presente momento, não existem ainda marcadores específicos para as espermatogônias tronco, apesar das mesmas expressarem marcadores de superfície como as integrinas α_6 e β_1 , bem como o sistema

GFR α -1/ receptor Ret, que é ativado através da ligação com o fator neurotrófico de células da glia (GDNF) (Shinohara et al., 1999; Meng et al., 2000). Quando diferenciam, as espermatogônias perdem a expressão de GFR α -1 e adquirem o receptor de superfície c-Kit. Outras proteínas como Oct-4 e Dazl são também expressos pelas espermatogônias tronco (Hofmann & Dym, 2005). Em camundongos, análises histológicas demonstraram que as células CDH1 (molécula de adesão célula-célula) positivas, previamente conhecido como caderina-E, apresentam características de espermatogônias indiferenciadas. Tokuda et al (2007) demonstraram através de imunohistoquímica que essas células formam cadeias de 1, 2, 4 até 8 células e experimentos com transplante demonstraram que as células CDH1 positivas também apresentam capacidade de colonizar o testículo. A neurogenina 3 (*Ngn3*), um fator de transcrição da família *helix-loop-helix* (bHLH), tem papel central na regulação dos processos de diferenciação e foi ainda demonstrado que as espermatogônias indiferenciadas expressam esse gene (Yoshida et al., 2004). Raverot et al. (2005), localizaram a expressão de *Sox3*, membro da família *high mobility group* (HMG), nas espermatogônias indiferenciadas e identificaram que este gene é necessário no início da espermatogênese através de via que envolve *Ngn3*. O *Sox3* é um dos poucos fatores identificados necessário nos estágios iniciais da maturação das células germinativas (Raverot et al. 2005). O *Plzf* (gen da leucemia promielocítica) é um repressor transcripcional que regula o estado epigenético das células indiferenciadas, dessa forma este fator apresenta papel essencial na manutenção das espermatogônias e sua inativação resulta em perda de célula germinativa dependente da idade, promovendo assim progressiva degeneração testicular devido à redução contínua da capacidade de auto-renovação no compartimento da célula tronco espermatogonial (Buaas, et al., 2004; Costoya, et al., 2004).

1.5 - Nicho e interação célula de Sertoli/ Espermatogônia

Schofield (1978) propôs o conceito de nicho para descrever o meio ambiente fisiologicamente delimitado que suporta a célula-tronco. O nicho constitui um microambiente favorável que protege a célula tronco do estímulo de diferenciação, apoptose e outros estímulos que alteram o estoque dessas células. Este microambiente também regula a proliferação das células tronco, cuja exacerbada proliferação pode eventualmente resultar em câncer. Dessa forma, o nicho mantém o balanço entre quiescência e ativação das células tronco (Moore & Lemischka, 2006). Segundo Li & Xie (2005), o nicho da célula tronco

possui várias características tais como: ser composto por grupo de células com localização tecidual específica; funcionar como ancorador físico para a célula tronco; gerar fatores extrínsecos que controlam o número e destino dessas células tronco; além de exibir estrutura assimétrica. Determinados aspectos do nicho das células tronco são conservados entre os diferentes tecidos, sob estímulo adequado as células-tronco se multiplicam e as células filhas perdem o contato físico com o nicho, assim estas células não seriam mais controladas por este microambiente e se diferenciam para formar as células maduras típicas de determinado órgão (Watt & Hogan, 2000). Nichos já foram descritos em vários tecidos auto-renováveis, como por exemplo, a epiderme (Miller et al., 1997), o epitélio intestinal (Bjerkness & Cheng, 1999), e o tecido hemocitopoético (Spangrude et al., 1988). No testículo, foi demonstrado que as espermatogônias mais primitivas (A_{is} a A_{al}) não estão distribuídas aleatoriamente nos túbulos seminíferos na maioria dos estádios do CES, mas sim posicionadas em regiões específicas, denominadas de nichos espermatogoniais (Chiarini-Garcia et al., 2001; Chiarini-Garcia et al., 2003; Nascimento, 2004).

Tem sido postulado que a célula de Sertoli, juntamente com a membrana basal, a célula peritubular mióide, além de sinais externos ainda não determinados e oriundos do túbulo seminífero, formariam em conjunto o microambiente denominado de nicho espermatogonial (Ogawa et al., 2005). Este nicho controlaria a auto-renovação e diferenciação das espermatogônias-tronco. Pelo fato de as espermatogônias tronco serem células isoladas, as mesmas não possuem comunicação direta com outras células. Portanto, todos os sinais que estas células recebem parecem vir diretamente da célula de Sertoli e/ou de moléculas difusas produzidas por outras células (Ogawa et al., 2005).

A complexa organização do epitélio seminífero comprova o fato de que a polaridade da célula de Sertoli *in vivo* pode ser crucial para a regulação das células germinativas. A porção basal da célula de Sertoli é altamente especializada e secreta fatores que agem paracrinamente sobre as espermatogônias adjacentes, e a porção apical da célula de Sertoli secreta outras substâncias que têm acesso direto aos espermatócitos e/ou espermátides (Dym & Fawcett, 1970; Dym & Feng, 2005). Estudos que utilizaram co-cultura de célula de Sertoli/células germinativas mostraram que, nestas condições, não há uma ampla diferenciação das células germinativas. Possivelmente, isto se deve ao fato de as células de Sertoli perderem a polaridade. Quando em cultura com componentes da membrana basal, a célula de Sertoli resgata em parte sua polaridade e suporta algumas células germinativas, no entanto isto não é suficiente para permitir a diferenciação destas células (Hadley et al., 1985).

Dentre as várias substâncias secretadas pelas células de Sertoli há uma classe de proteínas reguladoras, que embora sejam produzidas em pequena quantidade, possuem importante papel bioquímico. Estas glicoproteínas funcionam como fatores de crescimento ou fatores parácrinos e incluem o hormônio anti-Mülleriano, a inibina e o ligante c-kit. As células de Sertoli podem secretar ainda peptídeos bioativos como, por exemplo, a prodinorfina e nutrientes ou metabólitos intermediários. Evidências experimentais sugerem que o lactato e o piruvato secretado pelas células de Sertoli são as principais fontes de energia para as células germinativas (França & Chiarini-Garcia, 2005)

As células de Sertoli e as células germinativas interagem também através do sistema c-kit ligante e receptor (Yoshinaga et al., 1991; Ohta et al., 2000; revisões em de Rooij & Grootegoed, 1998; de Rooij, 2001). C-kit é um proto-oncogen encoberto pelo receptor tirosina-quinase (Sette et al., 2000). Durante a fase inicial de desenvolvimento fetal, o ligante é expresso pelas células germinativas primordiais, sendo importante para o sucesso de migração das mesmas para as gônadas, enquanto o receptor é expresso pelos gonócitos. No entanto, após a formação do testículo o ligante c-kit é expresso pelas células de Sertoli e o receptor c-kit é expresso principalmente pelas espermatogônias do tipo A em fase de diferenciação. Desta forma, via célula de Sertoli, o c-kit é bastante importante para a proliferação destas espermatogônias (França & Chiarini-Garcia 2005). É importante ressaltar que o receptor c-kit é expresso nas células germinativas desde espermatogônias diferenciadas a paquíteno, contudo, apesar de ser controverso (Hofmann & Dym, 2005), aparentemente as espermatogônias indiferenciadas não apresentam este receptor, sendo assim identificadas como células c-kit negativas (Ohta et al., 2000).

Além do sistema c-kit, o fator neurotrófico derivado de célula da glia (GDNF), membro da família TGF- β (fator de crescimento e transformação) que promove a sobrevivência e diferenciação de alguns tipos de neurônios, é também importante para a proliferação das células germinativas (Meng et al., 2000). Este fator também é expresso pelas células de Sertoli, enquanto as espermatogônias-tronco expressam o receptor Ret tirosina-quinase e a família de receptor $\alpha 1$ de GDNF (GFRA1). Quando ocupado por GDNF, GFRA1 dimeriza e forma um complexo com GDNF e Ret e, dessa forma, o Ret ativado medeia a resposta intracelular (Dym & Feng, 2005). Segundo He et al. (2007), GFRA1 é um componente importante do complexo GFRA1/RET e a inativação parcial do receptor Ret pelo silenciamento de GFRA1 pode seqüencialmente bloquear a sinalização intracelular e induzir a diferenciação das espermatogônias tronco (He et al.2007). A superexpressão do GDNF pelas

células de Sertoli promove acúmulo de espermatogônias-tronco nos túbulos seminíferos e seminoma (tumor sem metástase) no testículo. Pela sua importância na proliferação das espermatogônias-tronco, a manipulação experimental do GDNF e de seus receptores é uma abordagem promissora para ajudar pacientes humanos que apresentam hipo-espermatogênese (França & Chiarini-Garcia, 2005).

Chen et al. (2005) demonstraram que ERM (molécula relacionada a fatores de transcrição da família Ets), é expresso exclusivamente nas células de Sertoli e é necessária para o controle transcripcional do nicho da espermatogônia-tronco. Camundongos com alteração em ERM tem perda na auto-renovação das espermatogônias-tronco com bloqueio na diferenciação espermatogênica normal, além de apresentar uma depleção progressiva de células germinativas. Hess et al. (2006) demonstraram que GDNF mantém as espermatogônias tronco no período perinatal, contudo, ERM seria o fator essencial para a auto renovação das células tronco do testículo de animais púberes e adultos. Dessa forma, este estudo sugere que o nicho espermatogonial pode mudar com a idade.

A BMP4 (proteína morfogênica do osso), é produzida pela célula de Sertoli e os receptores ALK3 (receptores serina-treonina-quinase) e R-Smad 5 são especificamente expressos nas células germinativas primordiais e nas espermatogônias do tipo A. BMP4 é expressa no testículo pós-natal e está envolvida com a diferenciação das espermatogônias (Pellegrini et al, 2003). As proteínas morfogênicas do osso, BMPs, pertencem a um grupo de proteínas da família de TGF β (fator de crescimento e transformação) que inclui BMP2, BMP4, BMP7 e o fator de crescimento e diferenciação 5 (GDF5) (Massague & Chen, 2000). A interação de BMP4 e seu receptor ALK3 regula uma via de transdução de sinal que induz a expressão de c-kit seguido da diferenciação da espermatogônia-tronco (Pellegrini et al, 2003).

Estudos primários com *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila* demonstraram que os receptores transmembrana da família Notch têm importantes funções na sinalização celular durante o desenvolvimento (Berry et al., 1997). Genes do sistema Notch têm sua expressão confirmada no testículo de roedores. Os três receptores Notch, Notch,1-3, são encontrados em espermatogônias. A célula de Sertoli expressa somente o receptor Notch 2. Os ligantes Notch, Delta 1 e Jagged 1 são localizados nas espermatogônias e células de Sertoli, respectivamente (Dirami et al., 2001). A presença de receptores Notch e dos ligantes Notch nas espermatogônias e nas células de Sertoli indicam que essas células são capazes de interagirem, e que a sinalização via Notch é necessária na espermatogênese (Hayashi et al., 2001).

1.6 - Transplante de espermatogônias

O transplante de espermatogônias é uma abordagem experimental que consiste na remoção de células-tronco do testículo de um animal doador e a transferência das mesmas para o testículo de um receptor, aonde estas células irão se desenvolver e formar espermatozoides maduros com características genéticas do doador. A técnica de transplante de espermatogônias foi inicialmente utilizada em camundongos por Brinster e colaboradores (Brinster & Avarbock, 1994; Brinster & Zimmermann, 1994) e tem proporcionado enormes possibilidades para o estudo tanto da biologia da célula tronco quanto do processo espermatogênico em si e das interações entre células de Sertoli e as células germinativas, além de pesquisas em potencial na preservação de espécies e medicina reprodutiva (Dym, 1994; Parreira et al., 1998 e 1999; Hausler & Russell, 1999; França & Russell, 2000; Izadyar et al., 2000; Griswold et al., 2001; McLean et al., 2001; Meachem et al., 2001; Brinster, 2002; Dobrinski, 2005a,b; Khaira et al., 2005; McLean, 2005). Recentemente, o Laboratório de Biologia Celular do ICB/UFMG tem realizado com sucesso o transplante de espermatogônias singênico (entre a mesma espécie) e xenogênico (entre espécies diferentes), utilizando-se a tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) como receptor (Lacerda et al., 2006).

Portanto, o futuro do transplante de células germinativas é bastante promissor. A possibilidade de melhoramento do potencial reprodutivo de animais de produção, através da manutenção por tempo indeterminado do estoque genético de machos com alto valor zootécnico, é bastante viável. Da mesma forma, a reprodução e a preservação do plasma germinal de espécies ameaçadas de extinção poderão ser feitas através do transplante de espermatogônias-tronco para espécies filogeneticamente próximas. Alternativamente, estas células podem ser congeladas até que um receptor adequado para manter a linhagem germinativa seja encontrado. Nagano et al. (2001) mostraram ser possível produzir camundongos transgênicos através da transdução retroviral de células tronco germinativas. Esta rota de engenharia genética, juntamente com a recombinação homóloga das células germinativas (Guillaudoux et al., 2000; Celebi et al., 2002), além de ser mais simples e barata do que a modificação de células tronco embrionárias, facilita bastante a produção de animais transgênicos, conforme demonstrado em experimentos realizados recentemente por Kanatsu-Shinohara et al. (2005). Além de depender de um receptor adequado, o sucesso do transplante de espermatogônias também varia com a escolha de um doador apropriado. Como o sucesso depende diretamente da transferência das espermatogônias-tronco – A_{is} – para o receptor, quanto maior for o número destas células maior a probabilidade do sucesso do transplante.

Neste sentido, ultimamente têm sido utilizados como doadores animais cujo epitélio seminífero não possui ainda células germinativas em fases mais avançadas (espermátócitos e espermátides) e que possuem conseqüentemente maior número relativo de espermatogônias. Como exemplo, tem sido utilizados animais criptorquídicos adultos e animais pré-púberes (Shinohara et al., 2000), bem como camundongos adultos deficientes em vitamina A ou aqueles cujos testículos sofreram hipertermia (McLean et al., 2002). Portanto, em condições normais, para se obter quantidade adequada de espermatogônias tronco, grande número de animais jovens devem ser sacrificados (Ogawa et al, 1997). Desta forma, seria bastante vantajoso encontrar uma abordagem experimental na qual o número de espermatogônias indiferenciadas nos animais doadores jovens fosse mais elevado.

1.7 - Efeitos dos hormônios tireoidianos no testículo

Os hormônios tireoidianos são sintetizados e secretados pelas células epiteliais foliculares da tireóide. Os dois hormônios tireoidianos ativos são a triiodotironina (T3) e a tetraiodotironina ou tiroxina (T4). Os mesmos têm efeito em praticamente todos os sistemas do corpo, incluindo os envolvidos no crescimento e no desenvolvimento normais. As estruturas do T3 e T4 diferem somente por um único átomo de iodo. Embora o T3 seja mais ativo que o T4, quase toda a liberação hormonal da tireóide é de T4. Dessa forma, via enzima 5'-iodase, nos tecidos-alvos, há a conversão de T4 em T3. Os tecidos-alvo também convertem uma parte do T4 em T3 reverso (rT3), que é inativo. Essencialmente, o T4 serve como precursor para o T3, e as quantidades relativas de T4 convertidas em T3 e rT3 determinam a quantidade de hormônio ativo que é produzido no tecido-alvo (Costanzo, 2004).

As ações biológicas de T3 e T4 são mediadas através dos receptores dos hormônios tireoidianos (TRs), que pertencem a superfamília do receptor nuclear do ácido retinóico/esteróides. TRs são fatores de transcrição dependentes de ligante, codificado por dois diferentes genes, TR α e TR β , localizados em humanos nos cromossomos 17 e 3, respectivamente. As isoformas de TR que ligam T3, são derivadas dos genes TR α e TR β . Cada isoforma TR tem uma via de expressão tecido-específica. TRs regulam a transcrição por ligarem os hormônios tireoidianos a elementos responsivos (TREs) como heterodímeros ou homodímeros em regiões promotoras de genes alvo de T3. A atividade transcripcional de TR depende não somente do tipo de TRE mas também de proteínas co-repressoras e co-ativadoras (Suzuki & Cheg, 2003). Ambos os genes TR α e TR β podem sofrer *splicing* alternativo e nove isoformas peptídicas podem ser isoladas. Três peptídios funcionais têm

sido identificados: $\alpha 1$ (THA1) de TR α , $\beta 1$ (THB1) e $\beta 2$ (THB2) de TR β . As seis isoformas restantes não possuem a porção de ligação ao DNA e/ou domínio de ligação ao ligante, e suas funções não são claras (Holsberger et al., 2005a). Em ratos, as principais isoformas funcionais de TR são TR $\alpha 1$ e TR $\beta 1$ (Cooke, 1996). O mRNA de TR $\alpha 1$ é abundante no testículo em desenvolvimento. Além disso, o mRNA de TR $\alpha 2$ e TR $\alpha 3$ também são expressos nas células de Sertoli, contudo, ambas isoformas não medeiam a sinalização de T3 uma vez que não são responsivas a esse hormônio (Holsberger et al., 2005a). Entretanto, segundo Macchia et al. (2001), o TR $\alpha 2$ liga o hormônio tireoidiano a elementos responsivos na ausência de um ligante e, como resultado, o mesmo pode ser antagonista constitutivo na sinalização de T3 capaz de silenciar parcialmente a expressão gênica mediada por T3 (Macchia et al., 2001). Além disso, todas as ações de T3 mediadas através de TR β no testículo são mediadas através de TR $\beta 1$ (Holsberger et al., 2005a).

De acordo com Cooke (1996) e Buzzard et al. (2000), o TR $\alpha 1$ é expresso no núcleo das células de Sertoli em proliferação, diminuindo sua expressão de forma coincidente com a fase em que estas células cessam sua atividade mitótica. Experimentos feitos com camundongos *knockout* para as isoformas α e β do TR (TR α K0 e TR β K0, respectivamente) mostraram que T3 é incapaz de induzir a abertura do lume dos túbulos seminíferos no camundongo TR α K0, mas não no camundongo TR β K0, sugerindo que a sinalização através de TR $\alpha 1$ é a via principal pela qual T3 promove a maturação normal da célula de Sertoli (Holsberger et al., 2005a). Buzzard et al. (2000) mostraram a presença dos receptores TR $\alpha 1$ nas células de Leydig, bem como a ocorrência dos mesmos em espermatogônias intermediárias e espermátócitos em paquíteno. Estes resultados sugerem que os hormônios tireoidianos são importantes para a função testicular nos animais adultos, funcionando, provavelmente, como moderador para a sobrevivência das células germinativas (Buzzard et al., 2000).

O PTU (6-propil-2-tiouracil) é uma droga bociogênica que inibe a captação de iodo e a síntese de tiroxina (T4) na glândula tireóide e também inibe a deiodinação periférica do hormônio T4 em T3 (Cooke & Meisami, 1991). Estudos demonstraram que o hipotireoidismo neonatal transitório, causado pelo PTU, é capaz de aumentar significativamente o número de células de Sertoli, o peso dos testículos e a produção espermática em ratos, camundongos, hamsters, galos domésticos e tilápias (Cooke, 1991; Cooke & Meisami, 1991; Cooke et al., 1992; Cooke et al., 1993; Hess et al., 1993; Joyce et al., 1993; Cooke et al., 1994; Kirby et al., 1996; Matta et al., 2002; Jansen 2007). Estudos mais detalhados nos animais tratados com

PTU mostraram que a redução na concentração dos hormônios tireoidianos torna mais lenta a transição da fase proliferativa para a fase madura e não mitogênica da célula de Sertoli, resultando em prolongamento da fase mitogênica e aumento da população adulta de células de Sertoli (Van Haaster et al., 1992; Joyce et al., 1993; França et al., 1995; Cooke, 1996).

No entanto, resultados paradoxais foram encontrados em suínos tratados com PTU nos primeiros meses após o nascimento (Silva Jr., 2000; Cooke et al., 2005). Nesta espécie, o hipotireoidismo induzido pelo PTU reduziu significativamente o número de células de Sertoli em animais adultos. Por outro lado, dependendo da dosagem utilizada, a administração neonatal de T3 aumentou ou reduziu o número destas células. Segundo Silva Jr. (2000) e Cooke et al. (2005), estes resultados sugerem que diferenças nos mecanismos de regulação da proliferação das células de Sertoli, através dos hormônios tireoidianos, podem ocorrer entre as diversas espécies de mamíferos. Desta forma, particularidades relacionadas com a influência temporal de outros tipos celulares presentes no testículo tais como as células de Leydig, não podem ser descartadas.

Nos experimentos que utilizaram ratos como modelo experimental, os animais receberam PTU através do leite materno na fase de aleitamento. Com esta finalidade, o PTU foi colocado na água de beber das ratas em concentrações que variaram de 0,006 a 0,1% (Cooke & Meisami, 1991; Cooke et al., 1993). Durante o período de tratamento observou-se diminuição marcante no peso corporal dos animais tratados, cerca de 50% em ratos e 57% em camundongos, conseqüente à redução na concentração plasmática de hormônios tireoidianos, permanecendo nos animais adultos uma diferença de 15 a 25% do peso corporal em relação aos animais controle. Entretanto, nos ratos adultos que foram tratados com PTU nas primeiras semanas de vida pós-natal, o peso testicular e a produção espermática diária aumentaram em 83% e 140%, respectivamente (Kirby et al., 1992; Hess et al., 1993; Cooke et al., 1994; Joyce et al., 1993). Segundo Cooke et al. (1991), em ratos o hipotireoidismo neonatal não promove alterações na espermatogênese ou na qualidade do espermatozóide produzido, observando-se somente elevação da produção espermática.

O prolongamento da fase mitótica, e conseqüentemente do período imaturo das células de Sertoli, devido ao tratamento com PTU, resulta em retardo na abertura do lume dos túbulos seminíferos e inabilidade destas células em sustentar estágios avançados do desenvolvimento das células espermatozóides. Isto acarreta degenerações das células germinativas e diminuição do tamanho dos testículos neste período (França et al., 1995). O marcante contraste entre os efeitos negativos do tratamento com PTU na fase inicial do desenvolvimento testicular e os eventuais efeitos positivos no testículo adulto indica que o

período que se segue ao término do tratamento deve ser de acentuadas modificações. Desta forma, déficits no desenvolvimento testicular tais como atraso na formação do lume tubular, aumento da degeneração das células germinativas e diminuição do diâmetro tubular, induzidos pelo tratamento com o PTU são reversíveis; e, após o término do tratamento, o testículo apresenta significativas alterações que vão acompanhar o aumento de tamanho do testículo adulto e a produção espermática, quando o animal retoma o estado eutireóidico (Cooke et al., 1994).

Neste contexto, pelo fato da célula de Sertoli ter a capacidade de suporte relativamente fixa para células espermatogênicas, de maneira espécie-específica, o aumento da população de células de Sertoli propicia a maior disponibilidade de nichos, resultando em aumento na proliferação das células germinativas, bem como de outros tipos celulares do testículo (Hess et al., 1993; França et al., 1995). Assim, fica evidente que os hormônios tireoidianos são responsáveis pela maturação das células de Sertoli, exercendo papel muito importante para a função testicular durante o período de desenvolvimento pós-natal dos testículos (Van Haaster et al., 1992; Cooke et al., 1994; França et al., 1995; Cooke, 1996). Contudo, é importante ressaltar que os níveis de FSH e LH ficam reduzidos durante o período de tratamento e após o término do mesmo. No entanto, apesar dos níveis de andrógenos estarem baixos durante o tratamento, nos animais adultos os mesmos apresentaram-se normais. Segundo Kirby et al. (1992), paradoxalmente a maior proliferação das células de Sertoli nos animais tratados com PTU ocorre na presença de concentrações baixas de FSH. O tratamento com PTU diminui ainda os níveis séricos de GH (hormônio do crescimento) e PRL (prolactina) e induz aumento de 14 vezes nos níveis de TSH (hormônio estimulante da tireóide) circulante (Kirby et al. 1992). Estudos *in vitro*, mostraram que os hormônios tireoideanos inibem diretamente as mitoses das células de Sertoli estimulada por FSH, estimulando a produção de mRNA de proteínas secretórias características de células de Sertoli mais diferenciadas (Cooke et al., 1994). Apesar dos estudos serem ainda incipientes, merece ser ressaltado que os hormônios tireoidianos também alteram funcionalmente os componentes da membrana basal e as células peritubulares mióides (Arambepola et al., 1998; Loveland et al., 1998; Ulisse et al., 1998). Segundo Miranda (2002), o FSH é capaz de aumentar aditivamente o número de células de Sertoli em ratos Wistar tratados durante o período neonatal com PTU. No entanto, provavelmente em decorrência da maior produção de fluido tubular pelas células de Sertoli, e o desenvolvimento não proporcional da porção inicial dos ductos excurrentes (dúctulos eferentes e segmento inicial do epidídimo), que limita a reabsorção adequada deste fluido, o processo espermatogênico é comprometido nestes animais. Desta forma, o aumento acentuado

do número de células de Sertoli em animais tratados com PTU + FSH compromete a função espermatogênica em decorrência de fatores extratesticulares (Miranda, 2002).

De maneira antagônica aos efeitos do hipotireoidismo, elevadas concentrações de T3 em ratos imaturos levam à redução no número de células de Sertoli, da produção espermática e do peso testicular nos animais adultos, em virtude da diminuição do período mitogênico e aceleração do processo de maturação das células de Sertoli (van Haaster et al., 1993). Altas doses de T3, induzindo o hipertireoidismo, administradas durante a fase inicial do período pós-natal, estimulam a produção de inibina imunorreativa e também de inibina bioativa, através das células de Sertoli, resultando em níveis baixos de FSH e redução do período de proliferação destas células (van Haaster et al., 1993). Estudos em cultura de células de rato mostram que o T3 inibe a atividade mitótica das células de Sertoli, além de estimular diretamente a produção de mRNA de inibina β_B e clusterina, proteínas essas que são excelentes marcadores de diferenciação *in vivo*. Esses resultados indicam que o T3 promove diretamente a diferenciação das células de Sertoli neonatais com concomitante alteração na proliferação e atividade secretória dessas células. Desta forma, ao lado do FSH, o T3 pode ser considerado como importante regulador endócrino da célula de Sertoli (Cooke et al. 1994).

Os mecanismos moleculares pelos quais T3 induz a parada de proliferação e a saída da célula de Sertoli do ciclo celular não são conhecidos. A progressão do ciclo celular é regulada por ciclinas e quinases dependentes de ciclina; estas por sua vez são reguladas por inibidores específicos de quinase dependente de ciclina (CDKIs) como os da família INK4 e Kip/Cip (Holsberger et al., 2003). A supressão de p27 (inibidor de quinase dependente de ciclina) estende a proliferação da célula de Sertoli e, em última análise, aumenta o tamanho do testículo adulto, o número de células de Sertoli e a produção espermática. Entretanto, o hipertireoidismo aumenta bastante a expressão de p27 na célula de Sertoli, em comparação com os observados nos camundongos hipotireoidicos (Holsberger et al., 2003). Estudos recentes mostraram que os hormônios tireoidianos estimulam os inibidores de quinase dependentes de ciclina (CDKIs) p27^{Kip} e p21^{Cip1}. Desta forma, em comparação com o grupo controle, camundongos *Knockout* para as proteínas p21 (p21KO), p27 (p27KO) e para ambas as proteínas (DBKO), mostraram significativo aumento do peso testicular. Esses dados sugeriram que p27 e p21 provavelmente exerciam papel inibitório na regulação do número de células de Sertoli e que a perda de CDKI produz inicialmente aumento primário no número de célula de Sertoli por testículo e aumento secundário na produção espermática diária e peso testicular. De fato, além de terem demonstrado estes efeitos, a perda de ambos CDKIs

resultaram em efeito aditivo na produção espermática diária e peso testicular, indicando que essas CDKI desempenham importante papel no desenvolvimento testicular (Holsberger et al., 2005b).

Embora tenha sido demonstrado que os hormônios tireoidianos regulam a expressão p27^{Kip} e p21^{Cip1}, nem o gene de p27^{Kip} nem o de p21^{Cip1} possuem elementos responsivos aos hormônios tireoidianos, sugerindo que T3 afeta as CDKIs por um mecanismo indireto, possivelmente regulando uma janela do ciclo celular que controla a degradação dessas CDKIs. Dessa forma, por conter um motivo específico que reconhece a fosforilação de p27^{Kip} e de p21^{Cip1} e que induz a ubiquitilação desses genes através do recrutamento do complexo enzimático SCF^{Skp2}, a Skp2 foi considerada como uma importante proteína na regulação da atividade mitótica das células de Sertoli. Estes resultados sugerem fortemente que os hormônios tireoidianos inibem a atividade de Skp2, regulando assim a proliferação das células de Sertoli (Holsberger et al., 2005c). Vale ressaltar que os testículos de camundongos *knockout* para Skp2 apresentam menor número de células de Sertoli, provavelmente devido aos aumentos dos níveis de p27^{Kip} e de p21^{Cip1} (Holsberger et al., 2005c).

Além de seus efeitos sobre a população de células de Sertoli, o tratamento com PTU também influencia o número e a função das células de Leydig (Hardy et al., 1993; Antony et al., 1995; Hardy et al., 1996; Mendis-Handagama et al., 1998; Teerds et al., 1998; Mendis-Handagama & Ariyaratne, 2004). Estudos morfométricos indicaram que o número de células de Leydig em animais tratados com PTU foi 70% maior do que nos animais controle. No entanto, tanto o tamanho destas células quanto o número de receptores para LH e o potencial esteroidogênico das mesmas estavam reduzidos (Hardy et al., 1993), justificando o não aumento nas concentrações plasmáticas de testosterona nos animais tratados. Mendis-Handagama et al. (1998) demonstraram que, no período neonatal, ratos tratados com PTU apresentam prolongamento da fase de proliferação das células mesenquimais, retardando o início da diferenciação em células precursoras de células de Leydig. Assim, um maior número de células mesenquimais se diferencia nestas precursoras após a suspensão do tratamento com PTU. No entanto, em suínos adultos tratados com PTU no período neonatal, o número total de células de Leydig e as concentrações plasmáticas de testosterona não foram alterados, mostrando que o padrão de proliferação e de maturação das células de Leydig em suínos difere substancialmente daquele observado em ratos (Silva Jr., 2000; Cooke et al., 2005).

2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Dentre os trabalhos desenvolvidos até o presente momento, utilizando como modelo experimental o hipotireoidismo neonatal, foram poucos aqueles que estudaram os efeitos desta condição sobre as células germinativas (Hess et al., 1993; Meisami et al., 1994; Maran et al., 1999; Miranda, 2002). Hess et al. (1993) demonstraram que o número de espermátocitos em leptóteno aumentou 93% e o número de espermátides arredondadas elevou cerca de 84%, acompanhado por um nítido aumento do peso testicular e da produção espermática no adulto. Estudo desenvolvido por Simorangkir et al. (1997) é um dos poucos que avalia as células da linhagem espermatogonial sob condições de hipotireoidismo. Estes autores estudaram o desenvolvimento das células germinativas no testículo de ratos imaturos sob esta condição experimental e verificaram que há um prejuízo no desenvolvimento das células germinativas durante os primeiros 30 dias pós-natais. Este trabalho não fez distinção entre os grupos de espermatogônias indiferenciadas e diferenciadas. Um outro estudo, *in vitro*, mostra que o hormônio tireoidiano (T3) regula negativamente a expressão da molécula de adesão de célula neural (NCAM) e afeta a adesão dos gonócitos em cultura gonócito-célula de Sertoli (Laslett et al., 2000). Tal fato é particularmente atrativo, pois demonstra a importância da interação gonócito-célula de Sertoli durante o desenvolvimento dos gonócitos. Estes achados *in vitro* sugerem a possibilidade do T3 influenciar outros aspectos do desenvolvimento gonócito-célula de Sertoli em neonatos, incluindo, mas não limitando, a expressão de fatores adesivos importantes para a interação dessas células. Estudos utilizando hibridização *in situ* e imunohistoquímica mostraram que mRNA para os receptores de hormônios tireoidianos foram expressos especificamente nas células germinativas, principalmente espermatogônias, sugerindo que os mesmos possuem importante papel na regulação dos estádios iniciais do desenvolvimento de células germinativas em camundongos (Mu & Liu, 1998). No entanto, até o presente momento, não existem dados concretos na literatura a respeito dos efeitos do hipo e hipertireoidismo neonatal sobre as células da linhagem espermatogênica, particularmente espermatogônias.

Pelo fato de a célula de Sertoli interagir funcionalmente com as células tronco espermatogonial e provavelmente constituir o nicho destas células, além de fornecer importantes fatores que possivelmente controlam a auto-renovação e/ou diferenciação das mesmas, vários estudos sustentam a hipótese de que a célula de Sertoli regula a manutenção

do *pool* de espermatogônias-tronco (revisão em Li & Xie, 2005). Desta forma, considerando que a célula de Sertoli pode ser o principal elemento controlador do nicho espermatogonial, o presente trabalho pretende investigar os diferentes tipos espermatogoniais sob as condições de hipo e hipertireoidismo no intuito de correlacionar as modificações ocorridas na diferenciação/maturação das células de Sertoli com a cinética espermatogonial, do nascimento à idade adulta. Particularmente, pretendemos nesta investigação estudar o período durante o desenvolvimento pós-natal do testículo de camundongos, no qual ocorrerá maior disponibilidade de nichos de espermatogônias tronco. Eventualmente, estas espermatogônias podem ser utilizadas para aumentar a eficiência do transplante de células germinativas.

Desta forma, com a finalidade de se investigar a biologia dos diferentes tipos de espermatogônias de camundongos C57BL/6J sob as condições de hipo e hipertireoidismo em diferentes idades, do nascimento fase adulta, os seguintes parâmetros serão avaliados:

- biometria e morfometria dos testículos, incluindo-se o percentual ocupado no parênquima testicular pelos núcleos das células de Sertoli e diferentes tipos espermatogoniais;
- morfologia dos gonócitos e dos diferentes tipos espermatogoniais;
- cálculo do volume nuclear, volume citoplasmático, bem como volume celular dos gonócitos e das espermatogônias indiferenciadas e diferenciadas (A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , In, B);
- cinética espermatogonial através do cálculo do número de espermatogônias indiferenciadas (A_{is} , A_{pr} , A_{al}) e diferenciadas (A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , In, B);
- investigação de uma idade durante o desenvolvimento pós-natal do testículo de camundongos, com maior disponibilidade de nicho/espermatogônias tronco, para que se tenha um doador eficiente de espermatogônias tronco, com a finalidade de melhorar a técnica do transplante de espermatogônias;
- investigação do grau de diferenciação das células de Sertoli e a correlação deste aspecto com a formação do lume tubular e diâmetro tubular;
- cálculo do número de células de Sertoli por testículo;
- determinação das relações quantitativas (razões) entre os diferentes tipos celulares constituintes do epitélio seminífero nos camundongos com 100 dias de idade e cálculo da produção espermática diária.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Animais e tratamento

No presente estudo utilizaram-se camundongos machos da linhagem C57BL/6J, procedentes do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Dois diferentes tratamentos foram efetuados e as metodologias relacionadas aos mesmos estão detalhadas a seguir. No entanto, merece ser ressaltado que no total foram utilizados 152 camundongos nas diferentes idades, considerando-se os grupos controle (n = 63), hipotireóideo (n = 57), e hipertireóideo (n = 32).

3.1.1 - Experimento I - Hipotireoidismo

O PTU (6-propil- 2- tiouracil, Laboratório Sigma) foi a droga empregada para induzir o hipotireoidismo neonatal transitório nos camundongos. Esta droga, utilizada na concentração de 0,1% (p/v), foi adicionada na água de beber das mães lactantes durante os primeiros 20 dias, ou seja, do nascimento da ninhada até 20 dias pós-parto. Desta forma, a droga ingerida pela mãe foi transferida para os animais recém-nascidos através do leite materno, promovendo severo hipotireoidismo nesses animais (Kirby et al., 1992). Com a finalidade de melhorar a palatabilidade do PTU, que tem sabor bastante amargo, foi adicionado cerca de 10 gotas de adoçante (Adocyl) por litro de solução, na água de beber das mães lactantes. As mães dos animais do grupo controle receberam somente água. Os animais foram sacrificados nas idades de 5, 10, 15, 20, 28, 37, 70 e 100 dias. Somente os animais controle foram sacrificados com 1 dia de idade. O número amostral (n) variou de 4 a 6 animais por grupo experimental e idade.

3.1.2 - Experimento II - Hipertireoidismo

Os camundongos receberam diariamente injeções intraperitoniais de 100µg T3/Kg de peso corporal do dia 1 ao 15 e também foram sacrificados nas idades de 5, 10, 15, 20, 28, 37 e 100 dias. Devido a alta mortalidade dos animais submetidos ao tratamento com T3 (~75%), e o fato de termos tido grandes dificuldades de completarmos todos os grupos experimentais, os animais sacrificados na idade de 37 dias (n=4) receberam injeções intraperitoniais de 50µg T3/Kg de peso corporal do dia 1 ao 15. No entanto, mesmo com a redução da dose, observou-se considerável índice de mortalidade (~60%). O hormônio T3 (Laboratório Sigma) foi dissolvido em 0,025 N NaOH em salina (Van Haaster et al., 1993). Os camundongos tratados

com T3 foram sacrificados nas idades de 5, 10, 15, 20, 28, 37 e 100 dias. Portanto, neste grupo experimental, não foram sacrificados camundongos com 70 dias de idade. Os animais controle do experimento com o hormônio T3 (Experimento II) foram os mesmos do Experimento I.

3.2. Coleta e processamento dos testículos

Em função do pequeno porte dos camundongos das idades de 1 e 5 dias, os testículos desses animais foram fixados por imersão. Estes camundongos receberam injeção intraperitoneal do anestésico tiopental sódico, na dosagem de 30 mg/kg de peso corporal. Em seguida, os testículos foram retirados e fixados em glutaraldeído a 5% em tampão cacodilato 0,05M, pH 7,3, durante 24 horas. Após esta etapa, os testículos foram pesados, colocados no mesmo tampão e armazenados em geladeira, até o momento da inclusão.

Já os testículo dos camundongos das demais idades investigadas (10, 15, 20, 28, 37, 70 e 100 dias) foram fixados por perfusão intra-ventricular esquerda. Aproximadamente 15 minutos antes da perfusão os animais receberam heparina (125 UI/Kg de peso corporal). O plano anestésico foi obtido por meio de injeção intraperitoneal de tiopental. Posteriormente, um cateter (22G = 1 mm) foi introduzido no ventrículo esquerdo e o leito vascular foi perfundido com solução salina 0,9%, a uma pressão de aproximadamente 80 mmHg. Após a retirada do sangue iniciou-se a perfusão com glutaraldeído a 5% em tampão cacodilato 0,05M, pH 7,3. Após esta etapa que teve duração de aproximadamente 20 a 30 minutos, os testículos foram retirados, pesados e recortados em fragmentos de 1 a 2 mm de espessura. Estes fragmentos foram re-fixados por imersão no mesmo tipo de fixador por mais 12 a 24 horas, a 4° C.

Após a fixação primária e lavagens em tampão cacodilato por 60 minutos, os fragmentos dos testículos dos animais de todas as idades (1 a 100 dias) foram pós-fixados em ósmio reduzido (tetróxido de ósmio a 1%, ferrocianeto de potássio a 1,5% em tampão cacodilato 0,05M em pH 7,3) a 4°C por 90 minutos. Após desidratação em álcool e acetona, estes fragmentos foram incluídos em resina Araldite (EMS). Cortes semi-finos de aproximadamente 1µm de espessura foram obtidos no micrótomo rotativo Leica RM 2165. Os cortes histológicos foram corados com azul de toluidina- borato de sódio a 1%, montadas com entellan (Laboratório Merck), e analisadas em microscópio Olympus.

Para cada animal investigado, o índice gonadossomático, IGS, (relação percentual entre a massa testicular e o peso corporal) foi estimado.

3.3 - Caracterização morfológica dos diferentes tipos de espermatogônia e célula de Sertoli

Esta caracterização foi feita a partir de cortes transversais de túbulos seminíferos, em todas as associações celulares ou estádios do CES nos animais pós-púberes, onde todas estas associações estão claramente definidas, e também nos camundongos imaturos (de 5 a 28 dias de idade). Desta forma, as espermatogônias indiferenciadas (A_{is} , A_{pr} e A_{al}) e diferenciadas (A_{1-4}) foram morfológicamente caracterizadas, com o objetivo de comparar a morfologia e evolução das mesmas nos diferentes grupos experimentais e também com aquelas de animais imaturos. O principal critério utilizado para verificar a estrutura das mesmas, sob a microscopia de luz, foi a morfologia nuclear que se baseou em: (1) na forma e posição do núcleo; (2) na presença e na disposição da heterocromatina; (3) na granulosidade da eucromatina; e (4) no grau de compactação do nucléolo (Chiarini-Garcia & Russell, 2001).

Também neste contexto, com a finalidade de se avaliar o grau de diferenciação das células de Sertoli, foi avaliada a morfologia destas células nos animais controle e naqueles submetidos aos tratamentos com PTU e T3, nas diferentes idades investigadas.

Com o intuito de se investigar a evolução do processo espermatogênico nos diferentes grupos experimentais, nos animais com 5, 10, 15, 20 e 28 dias de idade, que ainda não apresentam espermatogênese completa, também foi avaliado o tipo de célula germinativa mais avançada no processo espermatogênico. Este tipo de avaliação não foi feita nos animais recém-nascidos pelo fato dos mesmos apresentarem somente gonócitos nos cordões seminíferos (De Rooij & Van Disel-Emiliani, 1997).

3.4- Análises morfométricas

Todas as análises morfométricas que serão detalhadas nos próximos itens seguiram o mesmo padrão e metodologias previamente descritas por Neves et al., 2002; França & Godinho, 2003; Leal et al., 2004; Leal & França, 2006; Almeida et al., 2006. Entre 4 e 6 animais foram avaliados para cada idade, nos três diferentes grupos experimentais investigados.

3.4.1 - Percentual de túbulos seminíferos com lume e com apoptose

Com o objetivo de investigar a formação do lume tubular nos camundongos nas idades de 5 a 37 dias, e nos diferentes tratamentos, 100 secções transversais de túbulos/cordões seminíferos foram avaliados por animal. Desta forma, a seguinte classificação foi estabelecida:

túbulos sem lume/sem vacuolação (SV), túbulos com vacúolos (V), túbulos com lume pequeno (LP) e túbulos com lume grande (LG). Esses resultados foram expressos em porcentagem.

Pelo fato da idade de 15 dias ser um momento crítico para o desenvolvimento testicular de camundongos, no qual as células de Sertoli estão em fase de diferenciação/maturação (Vergouwen et al., 1991), o percentual de túbulos seminíferos com células germinativas em apoptose foi também avaliado nesta idade. Com esta finalidade, 100 secções transversais de túbulos/cordões seminíferos foram quantificadas por animal.

3.4.2 - Proporções volumétricas (%) e volumes dos componentes do testículo

As proporções volumétricas foram estimadas utilizando-se ocular com retículo com 441 intersecções (pontos) por campo, em aumento de 1000x. Em virtude do tamanho da área dos cortes histológicos, o número de campos estudados variou com as idades. Assim, para os animais das idades de 1, 5, 10 e 15 dias foram analisados 30 campos, perfazendo um total de 13230 pontos. Já para os animais com 20 dias de idade e entre 28 a 100 dias, foram analisados 40 (17640 pontos) e 80 campos (35280 pontos), respectivamente. Todos estes campos foram escolhidos ao acaso. Dos componentes testiculares foram avaliados gonócitos, os diferentes tipos espermatogoniais, espermátócito em pré-leptóteno e células de Sertoli. Pelo fato de ter sido considerada uma idade crítica (ver resultados e discussão), os vasos (diagnosticados como capilar, artéria, veia e vaso linfático) foram avaliados nos camundongos com 10 dias de idade.

Para cálculos subseqüentes e quando pertinente, o volume de cada componente testicular avaliado, expresso em μL , foi estimado a partir do conhecimento do volume líquido do testículo. O valor deste último foi obtido subtraindo-se do peso bruto do testículo o peso da túnica albugínea: média de 3,5% por animal/idade investigada (dados do Laboratório de Biologia Celular, ICB/UFMG). Como a densidade do testículo é muito próxima de 1 (1,03 a 1,04; França, 1991), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume. O volume de cada um destes componentes foi calculado conforme fórmula abaixo:

$$V = \frac{V_T \cdot X}{100}$$

onde: V = volume de um determinado componente no testículo (μL)

V_T = volume total do parênquima testicular (μL)

X = porcentagem ocupada por um determinado componente no testículo (%)

3.4.3 – Diâmetro tubular

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 10 a 20 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentaram contorno o mais circular possível, utilizando-se ocular micrométrica de 10x, com aumento final de 400x.

3.4.4 - Cálculo do volume nuclear das células germinativas e células de Sertoli

O volume nuclear dos gonócitos, espermatogônias, espermatócito em pré-leptóteno e das células de Sertoli foi mensurado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$Vn = \frac{4}{3} \pi R^3$$

onde: Vn = volume nuclear (μm^3)

π = 3,1416

R = raio nuclear (diâmetro nuclear / 2)

O diâmetro nuclear médio representa ao valor médio dos diâmetros de 30 a 40 núcleos para cada tipo celular avaliado por animal, nas diferentes idades investigadas. Como o núcleo das espermatogônias possui forma normalmente ovóide, as mesmas tiveram o diâmetro maior e menor mensurados e o valor médio calculado. Da mesma forma, as células de Sertoli também tiveram seus diâmetros maior e menor medidos. Neste tipo de avaliação, somente as células de Sertoli com nucléolo evidente foram consideradas. Estes diâmetros foram medidos com o auxílio de ocular micrométrica de 10x da Olympus, acoplada a objetiva de 100x, resultando em aumento final de 1000x.

3.4.5 - Número de células de Sertoli por testículo

De posse do volume nuclear (μm^3) das células de Sertoli, da proporção volumétrica (%) das mesmas no testículo, e do volume total (μL) ocupado por estas células no testículo, foi estimado o número de células de Sertoli por testículo, conforme fórmula abaixo:

$$NC_s = \frac{V}{Vn}$$

onde: NC_s = número de células de Sertoli no testículo ($\times 10^6$)

V = volume total de células de Sertoli no parênquima testicular (μL)

Vn = volume nuclear da célula de Sertoli (μm^3)

3.4.6 – Volume individual das células germinativas

O cálculo do volume individual dos gonócitos, dos diferentes tipos espermatogoniais e dos espermatócitos em pré-leptóteno foi investigado empregando-se retículo com 441 intersecções (pontos), em um total de 20 células por tipo celular, em aumento de 1000x. Pontos sobre o citoplasma e o núcleo destes tipos celulares foram contados por animal, com a finalidade de se determinar a proporção (%) entre núcleo e citoplasma. De posse do volume nuclear estimado previamente, foi possível calcular o volume citoplasmático e, conseqüentemente, o volume individual (volume celular), dos tipos celulares avaliados. Estes valores foram expressos em micrômetros cúbicos. Conforme os cálculos:

$$\text{Volume citoplasmático} = \frac{\% \text{ citoplasma} \times \text{volume nuclear}}{\% \text{ núcleo}}$$

$$\text{Volume celular} = \text{volume nuclear} + \text{volume citoplasmático}$$

3.4.7 - Número de células germinativas por testículo

De posse do volume individual (μm^3) das células germinativas avaliadas (gonócitos, espermatogônias e espermatócitos primários em pré-leptóteno), da proporção volumétrica (%) das mesmas no testículo, e do volume total (μL) ocupado por estas células no testículo, foi calculado o número destas células por testículo, conforme fórmula abaixo:

$$NC = \frac{V}{V_n}$$

onde: NC = número de célula no testículo ($\times 10^6$)

V = volume celular no parênquima testicular (μL)

Vc = volume celular individual (μm^3)

É importante ressaltar que a partir da idade de 10 dias, o número absoluto de cada tipo espermatogonial foi corrigido pela frequência do estágio em que a mesma ocorre.

3.4.8 - Contagem do número de células germinativas e de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero

Esta análise teve como principal objetivo fornecer dados para se investigar quantitativamente a evolução do processo espermatogênico através de índices ou razões celulares, na idade de 100 dias. As contagens dos diferentes tipos celulares investigados foram obtidas em 10 (raramente 5) secções transversais de túbulos seminíferos, com perfis o mais arredondado possíveis no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero no aumento de 1000x. Os seguintes tipos celulares foram avaliados:

- Espermatogônias do tipo A
- Espermatócitos primários em pré-leptóteno
- Espermatócitos primários em paquíteno
- Espermátides arredondadas
- Nucléolo de célula de Sertoli

Todas as contagens celulares da linhagem espermatogênica obtidas foram corrigidas para o diâmetro nuclear ou nucleolar (célula de Sertoli) e espessura do corte histológico, utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann & Almquist (1962), conforme segue:

$$\text{Número corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{Espessura do corte}}{\text{Espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{\text{DM}}{2}\right)^2 - \left(\frac{\text{DM}}{4}\right)^2}}$$

O diâmetro nuclear médio (DM) representou a média dos diâmetros de 10 núcleos de células germinativas por estágio e por animal. Estes diâmetros foram medidos com o auxílio de ocular micrométrica de 10x, acoplada à objetiva de 100x, propiciando aumento final de 1000x.

As contagens de células de Sertoli foram corrigidas para o diâmetro nucleolar e espessura dos cortes histológicos, utilizando-se a mesma metodologia empregada para a correção do número de células germinativas. Desta forma, foram quantificados somente células de Sertoli com nucléolo visível, os quais tiveram seus diâmetros medidos da mesma forma citada para as células germinativas.

3.4.9 - Razões entre números celulares

Para se estimar a eficiência do processo espermatogênico e da célula de Sertoli foram calculadas as razões entre os números corrigidos de células espermatogênicas e entre estas últimas e as células de Sertoli. As seguintes razões baseadas nas contagens feitas no estágio VII foram obtidas:

- Espermatócitos primários em pré-leptóteno/espermatogônias do tipo A (coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais)
- Espermátides arredondadas/espermatogônias do tipo A (rendimento geral da espermatogênese)
- Espermatócitos primários em paquíteno/espermatócitos primários em pré-leptóteno
- Espermátides arredondadas/espermatócitos primários em paquíteno (índice meiótico)
- Espermátides arredondadas/nucléolos de célula de Sertoli (eficiência da célula de Sertoli)

3.4.10 - Cálculo da produção espermática diária por testículo e por grama de testículo

Esta estimativa foi feita de acordo com França (1992), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$PED = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de células de Sertoli por Testículo} \times \text{ICS} \times \text{frequência do estágio VII (\%)}}{\text{Duração do estágio VII (dias)}}$$

onde: PED = produção espermática diária;

ICS = número de espermátides arredondadas por célula de Sertoli no estágio VII.

Para se obter a PED por grama de testículo, a PED foi dividida pelo peso líquido do testículo. A duração do estágio VII foi baseada na duração do ciclo do epitélio seminífero estimada para camundongos C57BL/6J (Avelar et al., 2003).

3.5- Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados com auxílio do programa “Excel for Windows”, sendo estimadas as médias, desvios padrões e erros padrões da média. Os dados

obtidos foram expressos como média erro padrão da média (EPM). As médias para os diversos parâmetros avaliados, nos três diferentes grupos experimentais investigados, foram analisadas através de ANOVA, utilizando-se o teste Student-Newman-Keuls do programa STATISTICA 3.11 (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA, 1995). O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 - Pesos corporal, testicular e índice gonadossomático

Os dados referentes ao peso corporal dos camundongos controle e tratados com PTU e T3 estão ilustrados na Figura 3A. Conforme pode ser observado nesta figura, o peso corporal foi semelhante entre os tratamentos ($p>0,05$) nos animais sacrificados nas idades de 5 a 15 dias. Aos 20 dias, somente o tratamento com T3 foi capaz de diminuir ($p<0,05$) o peso corporal. Contudo, a partir de 28 dias de idade, o peso corporal dos animais controle foi sempre maior ($p<0,05$) do que o dos animais submetidos aos diferentes tratamentos.

Os valores médios obtidos para o peso testicular e índice gonadossomático (IGS) estão também ilustrados na Figura 3. Conforme pode ser observado na Figura 3B, em comparação com o grupo controle os animais tratados com PTU apresentaram maior peso testicular (~30%) na idade de 10 dias ($p<0,05$), o qual apresentou-se reduzido ($p<0,05$) nas idades de 20 e 28 dias. No entanto, esta tendência foi oposta nos animais adultos (70 e 100 dias) tratados com PTU, que apresentaram maior peso para este órgão ($p<0,05$). Já os animais tratados com T3, quando comparados com os dois outros grupos experimentais, apresentaram peso testicular sempre menor ($p<0,05$) partir de 15 dias de idade.

Em comparação com os grupos controle e tratado com T3, o índice gonadossomático (Figura 3C) dos animais que receberam PTU foi maior ($p<0,05$) entre 5 e 15 dias de idade e nos animais adultos. Por outro lado, seguindo tendência semelhante ao observado para o peso testicular, nos camundongos tratados com T3 o IGS foi sempre menor ($p<0,05$) a partir de 20 dias de idade.

4.2 - Análise histomorfométrica do testículo

4.2.1 - Diâmetro tubular, formação do lume e presença de apoptoses

A partir de 10 dias de idade o diâmetro dos túbulos seminíferos dos animais tratados com PTU mostrou-se sempre menor ($p<0,05$) do que o dos animais controle e tratados com T3 (Figuras 4, 6-8). Em contraste, nos animais tratados com T3, os valores observados para o diâmetro tubular foram maiores ($p<0,05$) nas idades entre 5 e 15 dias e aos 37 dias quando o processo espermatogênico já está completo em todos os grupos (Figura 8A-C), e espermátides maduras em processo de espermiacão são observadas. De maneira interessante, na idade de 100 dias há uma equiparação ($p>0,05$) entre os diâmetros tubulares nos três grupos experimentais investigados.

Quanto à formação do lume, que é um importante marcador funcional que retrata o grau de diferenciação e secreção de fluido pelas células de Sertoli, nenhum cordão seminífero apresentava processo de luminação até os 5 dias de idade (Figuras 6A-D e 9A). Aos 10 dias de idade, somente os camundongos tratados com T3 apresentavam luminação, que foi evidenciada, em diferentes graus, em cerca de 70% dos cordões/túbulos avaliados (Figs. 6G e 9B). Já nos animais sacrificados aos 15 dias, aqueles hipotireóides continuavam sem luminação aparente, enquanto nos controles cerca de 15% de túbulos possuíam lume (Figs. 7A-B e 9C). Surpreendentemente, nos camundongos hipertireóides houve uma redução de cerca de 20% dentre aqueles túbulos que haviam apresentado luminação (Figs. 7C e 9C), redução esta drasticamente acentuada aos 20 dias, quando somente 15% dos túbulos apresentavam lume (Figs. 7F e 9D). Conforme será visto adiante, esta tendência foi revertida aos 28 dias. Ainda aos 20 dias, os cordões seminíferos dos animais hipotireóides permaneceram sem lume. Por outro lado, aumento significativo no percentual dos mesmos (~15% para ~60%) ocorreu nos controles (Figs. 7D-E e Fig. 9D). Aos 28 dias, período que antecede a instalação completa do processo espermatogênico, ocorreu pela primeira vez o aparecimento de lume nos animais tratados com PTU, apesar do percentual observado (~30%) ter sido significativamente menor ($p < 0,05$) se comparado com a presença de lume (~60%) nos de túbulos seminíferos dos animais controles e tratados com T3 (Figs. 7G-I e 9E). Finalmente, aos 37 dias, quando espermatozóides já são formados nos três grupos experimentais investigados, praticamente todos os túbulos mostraram lume (Figs. 8A-C e 9F), ainda que o mesmo tenha apresentado tamanhos diferentes, sendo notadamente menor nos animais tratados com PTU. O total de túbulos seminíferos apresentando lume, nas diferentes idades e nos três grupos experimentais investigados, está sumarizado na Fig. 10.

Os resultados encontrados para túbulos/cordões seminíferos com apoptoses mostraram que pouco mais de 20% destes túbulos/cordões apresentam células germinativas em degeneração, enquanto este percentual é cerca de 32% e 35% nos animais tratados com T3 e PTU, respectivamente. Merece ser ressaltado que somente foi avaliado a presença ou não de apoptoses e não o número das mesmas por seção transversal de túbulos/cordões.

4.2.2 - Morfometria das células de Sertoli

O tamanho do núcleo das células de Sertoli reflete o grau de diferenciação e a atividade funcional destas células. Os dados referentes ao volume nuclear destas células, obtidos a partir da mensuração do diâmetro nuclear, estão mostrados na Figura 11. Conforme

pode ser evidenciado, nas idades de 10 e 15 dias, os animais hipertireóides apresentaram maiores ($p < 0,05$) volumes nucleares em comparação com os demais grupos experimentais. Aos 20 dias, os valores observados para este parâmetro encontraram-se intermediários ($p < 0,05$) entre àqueles obtidos para os grupos controle e hipotireóideo. Seguindo esta tendência de diminuição gradual, nos camundongos tratados com T3 e avaliados nas duas idades subsequentes (28 e 37 dias), o volume do núcleo da célula de Sertoli foi menor ($p < 0,05$) do que o dos controles e dos animais tratados com PTU (somente aos 37 dias). Aos 100 dias, os valores obtidos para os dois grupos tratados apresentaram-se reduzidos ($p < 0,05$), em comparação com o de camundongos controles. De forma interessante, houve um certo paralelismo entre os resultados obtidos para o processo de luminação dos cordões seminíferos e volume do núcleo da célula de Sertoli. Desta forma, entre 10 e 20 dias, época em que não apresentavam lume, o volume nuclear foi menor nos camundongos hipotireóides, particularmente aos 20 dias ($p < 0,05$).

O número total de células de Sertoli por testículo não mostrou diferenças significativas ($p > 0,05$) nas três condições experimentais avaliadas, aos 5 dias de idade (Figura 12). No entanto, a partir de 10 dias, o número destas células permaneceu sempre maior ($p < 0,05$) nos animais tratados com PTU e menor ($p < 0,05$) naqueles que receberam T3. Provavelmente pelo fato de ter sido tratado com doses menores de T3, merece ser ressaltado que aos 37 dias nos camundongos deste grupo valores mais elevados para o número total de células de Sertoli por testículo.

De maneira geral, após aumentos significativos ($p < 0,05$) nas idades anteriores avaliadas (1, 5 e 10 dias) a partir de 15 dias de idade observa-se tendência forte de estabilização no número de células de Sertoli por testículo nos três diferentes grupos experimentais. No entanto, merece ser ressaltado que nos camundongos tratados com T3 não houve diferença entre 5 e 10 dias após o tratamento ($p > 0,05$) e que, em comparação com 100 dias, o número de células de Sertoli foi menor ($p < 0,05$) na idade de 20 dias. Conforme já foi salientado, neste tratamento o número de células de Sertoli foi significativamente maior ($p < 0,05$) aos 37 dias, em comparação com as demais idades.

4.2.3 - Morfologia dos gonócitos e espermatogônias e tipo celular mais avançado nas diferentes idades avaliadas

A análise histológica dos testículos mostrou que com 1 dia de idade somente gonócitos foram observados no epitélio seminífero. Estas células germinativas apresentavam morfologia

clássica com núcleo grande (ver Tab. 1) e claro (sem heterocromatina) e até três nucléolos (Fig. 5) e com citoplasma também mais claro (Figura 6A). Os gonócitos encontravam-se preferencialmente no centro dos cordões seminíferos ou migrando em direção a base dos mesmos, sendo este aspecto denotado através da observação da emissão de prolongamentos destes gonócitos em direção à membrana basal.

A morfologia das espermatogônias (Fig. 5), tanto nos animais jovens quanto nos adultos e nos diferentes grupos experimentais investigados, não divergiu do observado por Chiarini-Garcia & Russell (2001) em animal adulto. Desta forma, não nos deteremos no presente estudo na descrição detalhada das mesmas. É importante ressaltar, no entanto, que um tipo de espermatogônia em particular, designada de vacuolada (Fig. 5), foi observado nos animais investigados a partir de 5 dias de idade nos três grupos experimentais. Por apresentarem características semelhantes as espermatogônias alinhadas descritas por Chiarini-Garcia & Russell (2001) e também por apresentar de maneira geral tamanho próximo àquele das espermatogônias mais iniciais, no presente trabalho estas células foram agrupadas como espermatogônias indiferenciadas.

Com 5 dias de idade, nos animais controle e tratados, as células germinativas mais avançadas foram as espermatogônias diferenciadas com características morfológicas semelhantes àquelas do tipo A₃, descritas por Chiarini-Garcia & Russell (2001), (Figura 6B-D). Aos 10 dias de idade, células espermatogênicas na fase inicial da prófase meiótica I (espermatócitos-primário em pré-leptóteno) já eram observados nos três grupos experimentais. Vale ressaltar que nesta idade já se tem indícios da organização dos diferentes tipos de células germinativas em associações celulares ou estádios característicos do CES de camundongos (Figura 6E-G). Conforme pode ser notado na Figura 7A-C, nos animais controle e tratados com 15 dias de idade as células germinativas mais avançadas foram os espermatócitos primários em paquíteno. Este tipo celular é o que apresenta a duração nitidamente mais longa durante a prófase meiótica, perfazendo ~82% de um CES (8,7 dias) em camundongos C57 (Avelar et al.,2003), ocorrendo um grande aumento no diâmetro nuclear destas células. Neste contexto, o diâmetro nuclear destes espermatócitos foi semelhante ($p>0,05$) nos animais controle e tratados com PTU, apresentando maior diâmetro nuclear ($p<0,05$) naqueles que receberam T3. Este dado sugere que o processo espermatogênico destes animais sofreu uma ligeira aceleração, se comparado com os animais controles e tratados com PTU da mesma idade. No entanto, conforme será mostrado adiante, os tratamentos podem eventualmente alterar o tamanho das células germinativas. De maneira

geral, principalmente nas primeiras semanas, em uma análise qualitativa, os camundongos hipotireóideos apresentavam mais apoptoses, como por exemplo na Figura 7B.

Com exceção dos camundongos hipotireóideos, cujas células continuavam ainda na fase de paquíteno aos 20 dias de idade tanto nos animais controle quanto naqueles tratados com T3 as células germinativas mais avançadas foram as espermatídes arredondadas na fase 1, que se encontravam no estágio I do CES (Figura 7D-F). Com quatro semanas de idade, quase todos animais controle (5 em 6) apresentaram como célula germinativa mais avançada as espermatídes em alongamento na fase 9-10, e, à semelhança dos animais que receberam T3, somente um animal controle apresentou espermatíde em alongamento na fase 13. Por outro lado, nos camundongos tratados PTU, denotando perceptível atraso na evolução do processo espermatogênico, as espermatídes na fase 7-8 foram observadas (Figura 7G-I). De maneira interessante, aos 28 dias de idade não foi fato incomum observar nos animais controle e tratados com T3 assincronia no ciclo do epitélio seminífero como, por exemplo, figuras de meiose associadas com espermatídes em alongamento na fase 9, bem como espermatócitos secundários associados a espermatídes alongadas na fase 10. A partir de 37 dias de idade, todos os tipo celulares, incluindo-se aí espermatozóides, estavam presentes nos túbulos seminíferos dos animais controles e tratados (Figura 8A-H), valendo salientar que aqueles tratados com PTU apresentavam ainda poucos túbulos seminíferos com espermiacção.

4.2.4 - Morfometria dos gonócitos, das espermatogônias e de espermatócitos primários em pré-leptóteno

4.2.4.1 - Volumes celular, nuclear e citoplasmático

Os dados inerentes ao tamanho das espermatogônias e dos espermatócitos primários em pré-leptótenos, nas diferentes idades e grupos experimentais investigados, estão ilustrados na Figura 13 e 14. Já as Tabelas 1-8 mostram, além do volume celular, os diâmetros nucleares, tamanhos do núcleo e do citoplasma dos gonócitos e das espermatogônias/espermatócitos. Devido o grande número de dados, neste item específico procuraremos nos ater a tendência predominante dos resultados obtidos para as diferentes idades e grupos experimentais. Por outro lado, o número das células investigadas, também mostrado nas Tabelas 1-8, será contemplado em item subsequente.

Conforme já foi salientado, aos 5 dias de idade o tipo celular mais avançado nos três grupos estudados foi a espermatogônia do tipo A₃. A Figura 13A mostra que o volume das espermatogônias indiferenciadas ($A_{ind} + A_{vac}$) foi diferente ($p < 0,05$) nos três grupos

investigados, sendo maior nos controles e menor nos camundongos tratados com T3 que também apresentaram menor ($p < 0,05$) volume celular das espermatogônias diferenciadas (A_{1-3}). A mesma tendência encontrada para o volume celular dos diversos tipos de espermatogônias foi observada para o volume nuclear e citoplasmático.

Conforme mostrado na Figura 13, a curva de volume dos diferentes tipos celulares investigados mostra tendência bastante semelhante para as diferentes idades avaliadas e também para os diferentes grupos experimentais, incluindo-se aí a idade de 5 dias na qual, conforme já salientado, o tipo celular mais avançado foi a A_3 . Desta forma, considerando-se a média obtida para os diferentes grupos experimentais e as várias idades investigadas, ocorreu crescimento gradual de cerca de 25%, de espermatogônias indiferenciadas até espermatogônia do tipo A_2 (de $\sim 400\mu\text{m}^3$ a $\sim 500\mu\text{m}^3$). A partir daí até espermatogônias do tipo B, decréscimo de pouco mais de 30% foi observado (de $\sim 500\mu\text{m}^3$ a $\sim 330\mu\text{m}^3$). Posterior diminuição, com semelhante magnitude ($\sim 30\%$), ocorreu de espermatogônia do tipo B para espermatócitos primários (pré-leptótenos) na fase inicial da meiose (de $\sim 330\mu\text{m}^3$ a $\sim 230\mu\text{m}^3$). De maneira geral, tendência semelhante foi observada para os valores referentes aos volumes nucleares e citoplasmáticos (Tabs. 1 a 8), conforme ilustrado para os volumes nucleares de espermatogônias indiferenciadas para espermatogônias do tipo A_2 (de $\sim 300\mu\text{m}^3$ a $\sim 370\mu\text{m}^3$). Deve ser ressaltado que para estes tipos celulares em particular o volume nuclear foi proporcionalmente bastante elevado e compreendeu cerca de 75% do volume celular total. Este mesmo raciocínio é válido para espermatogônia do tipo A_4 , cujo volume nuclear também representou $\frac{3}{4}$ do volume celular ($\sim 310\mu\text{m}^3$ de $\sim 420\mu\text{m}^3$). Estes resultados sugerem fortemente que esta elevada proporção se aplica a todas as espermatogônias de camundongos. Por outro lado, mostrando uma tendência diferente para a meiose, o núcleo dos espermatócitos primários em pré-leptóteno representa cerca de $\frac{2}{3}$ do volume celular ($\sim 155\mu\text{m}^3$ de $\sim 230\mu\text{m}^3$).

Em relação aos diferentes tratamentos foi possível observar que, nas idades de 10 e 15 dias (Figura 13), com raras exceções, os volumes das células espermatogênicas avaliadas foram bastante próximos ($p > 0,05$). Por outro lado, nas demais idades investigadas, de maneira geral, em contraste com os animais controles, os camundongos tratados com T3 apresentaram os menores ($p < 0,05$) volumes celulares, enquanto os animais que receberam PTU apresentaram volume celular semelhante ou inferior aos controles, exceto pra 20 dias, em que nestes animais hipotireóidicos alguns tipos celulares apresentaram o maior volume (Figuras

13 e 14). Desnecessário seria comentar que os volumes nucleares e citoplasmáticos seguiram praticamente as mesmas tendências (Tabs. 1 a 8).

Exceto para as idades de 5 e 10 dias, um resultado que merece ser comentado foi o fato das espermatogônias do tipo A indiferenciadas terem tendência muito forte de apresentarem menores volumes celular e nuclear, em comparação com as outras espermatogônias do tipo A (A_1 - A_4), nos três grupos experimentais investigados.

4.2.4.2 - Número total de espermatogônias e de espermátócitos primários em pré-leptóteno por testículo

Os valores obtidos para o número de células germinativas estão mostrados nas Figuras 15 e 16 e nas Tabelas de 1 a 8. Conforme pode ser observado, aos 5 dias, exceto para espermatogônias do tipo A_{ind} e A_3 , o número dos outros tipos celulares presentes nesta idade (A_1 e A_2) foi maior ($p < 0,05$) nos camundongos hipotireóideos em comparação com os animais controles (Fig. 15A). Apesar de normalmente não apresentarem significância estatística, os valores encontrados para os animais hipertireóideos ficaram num patamar intermediário entre àqueles de camundongos tratados com PTU e os controles. Particularmente para o grupo controle, o número de gonócitos por testículo, obtido ao nascimento, foi praticamente o dobro ($0,5 \times 10^5$ vs. $0,24 \times 10^5$) do valor encontrado para espermatogônias indiferenciadas e semelhante ($0,5 \times 10^5$ vs. $0,6 \times 10^5$) ao número total de espermatogônias do tipo A, nos animais com 5 dias de idade (Tab. 1). Estes resultados sugerem que parte dos gonócitos se diferenciou em espermatogônias enquanto outros provavelmente sofreram apoptose.

Vale ressaltar, que exceto para as idades de 1 e 5 dias, nas demais idades avaliadas o número total de espermatogônias indiferenciadas foi dividido por 8,7 dias que é a duração de um CES em camundongos C57 (Avelar et al., 2003). Este divisor arbitrariamente escolhido partiu do conhecimento de que estas espermatogônias estão presentes, em menor ou maior número, em todos os estádios do CES (ver Fig. 2). Portanto, os números obtidos para este tipo espermatogonial devem ser considerados como valores relativos. Já o divisor utilizado para os demais tipos de células germinativas (A_1 a PI) foi o da duração específica do (s) estádio (s) no qual (is) estes tipos aparecem. Neste caso específico, os valores encontrados são mais próximos daqueles que seriam reais.

À semelhança do item anterior, devido o grande número de dados, neste item também descreveremos a tendência predominante dos resultados obtidos para as diferentes idades e

grupos experimentais. Neste sentido, particularmente na idade de 10 dias, de maneira geral os animais hipotireóideos apresentaram maior ($p < 0,05$) número de células germinativas do que os outros dois grupos experimentais (Fig. 15B). É importante salientar que o número total de espermatogônias do tipo A, incluindo-se aí as indiferenciadas, é significativamente maior nos animais tratados com PTU (Tab. 2). Quanto as demais idades investigadas, de maneira geral os animais hipotireóideos apresentaram número de células germinativas maior ou igual aos controles, contrastando com os camundongos hipertireóideos que mostraram menor ($p < 0,05$) número destas células (Figs. 15 e 16). É interessante ressaltar que após a puberdade ocorreu uma tendência muito forte dos animais tratados com PTU apresentarem maior número de espermatogônias do tipo B e de pré-leptótenos, tendência esta mais nítida nos animais adultos.

Quanto ao número total de espermatogônias do tipo A nas diferentes idades e grupos experimentais, os valores encontrados estão mostrados na Figura 17. Em comparação com o grupo controle, em quatro das oito idades investigadas, os animais tratados com PTU apresentaram maior número de espermatogônias do tipo A ($p < 0,05$), particularmente, aos 10 dias de idade a diferença observada foi de quase 100%. Já os camundongos tratados com T3 só não mostraram menor número ($p > 0,05$) de espermatogônias aos 5 e 37 dias de idade, provavelmente devido ao maior número de células germinativas por área (ver diâmetro tubular aos 5 dias de idade; Figs. 6B-D e 8A-C) e a menor dose de T3 para os animais sacrificados aos 37 dias. Em contraste com os outros dois grupos, cujos números totais de espermatogônias mostraram uma curva nitidamente ascendente até o estabelecimento da puberdade (37 dias), nos animais tratados com T3 estes valores permaneceram relativamente estáveis entre 5 e 15 dias ($p > 0,05$), diminuindo aos 20 dias ($p < 0,05$). No entanto, em relação às idades anteriores, maior número total de espermatogônias ($p < 0,05$) foi observado aos 28 dias de idade.

4.3 - Índices celulares e produção espermática diária

Conforme já salientado, os índices celulares foram estimados a partir de números corrigidos obtidos de contagens nucleares e nucleolares de células germinativas e somáticas presentes nos estágio VII do CES. Desta forma, pode se observar na Tabela 9 que tanto a eficiência da célula de Sertoli quanto o índice meiótico foram semelhantes ($p > 0,05$) nos três grupos experimentais investigados. Estes índices mostram que aproximadamente 10 espermátides são suportadas por célula de Sertoli e que 25 a 30% de perdas celulares ocorrem durante a prófase meiótica, considerando que quatro espermátides são formadas para cada

espermatócito primário. Por outro lado, a partir dos resultados obtidos para o peso testicular e número de células de Sertoli por testículo, em comparação com o grupo controle, a produção espermática diária por testículo foi significativamente maior ($p < 0,05$) e menor ($p < 0,05$) nos grupos tratados com PTU e T3, respectivamente. Já a produção espermática por grama de parênquima testicular foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos animais tratados com T3.

5. DISCUSSÃO

5.1- Peso corporal

Embora as dosagens hormonais de T3, T4 e TSH não tenham sido feitas no presente trabalho, a evolução do peso corporal dos camundongos investigados neste estudo permitiu inferir que os tratamentos com T3 e PTU causaram efeitos no desenvolvimento deste parâmetro que se apresentou sistematicamente menor a partir de três (T3) e quatro (PTU) semanas após o início do tratamento. Em relação ao PTU, diferente de nossos resultados, camundongos Swiss mostraram peso corporal significativamente reduzido já duas semanas após o início do tratamento (Joyce et al., 1993). Enquanto uma semana após o final do mesmo está redução chegou a quase 60%, valor este bem maior do que ~20% encontrado para camundongos C57BL/6J por nós investigados. No entanto, na idade adulta ocorreu uma inversão desta tendência, pois os camundongos C57BL/6J apresentaram quase 30% de redução deste parâmetro e os Swiss somente cerca de 20%. Pelo fato da concentração da droga utilizada ter sido a mesma (0,1%) em nosso estudo e naquele desenvolvido por Joyce e colaboradores, resta inferir que os valores encontrados para o peso corporal devem-se as diferenças entre linhagens de camundongos utilizadas e possíveis respostas destas linhagens ao tratamento. Para ilustrar este aspecto, o peso corporal de camundongos Swiss adultos é cerca de 50% maior do que o de C57BL/6J (Avelar et al., 2007). No nosso conhecimento, não existem dados na literatura a respeito do peso corporal em camundongos tratados com T3. Comparado ao observado para ratos, cujo peso corporal pode apresentar redução de até 46% (Van Haaster et al., 1993), nos camundongos investigados no presente estudo esta redução nos animais adultos atingiu o patamar de 32%.

Pelo fato dos animais tratados com hormônios tireoidianos (T3, T4) ou tireoidectomizados apresentarem redução da hipófise, quando comparados aos controles eutireóideos (Solomon & Greep, 1959; Coulombe et al., 1978), o menor peso corporal observado nestes animais após os tratamentos com PTU e T3 pode ser atribuído, pelo menos em parte, aos reduzidos níveis de hormônio do crescimento na hipófise (Van Haaster et al., 1993).

5.2- Peso testicular

Demonstrando ainda a eficiência dos tratamentos com a droga bociogênica PTU e com o hormônio T3, no presente estudo os animais submetidos aos tratamentos apresentaram

alterações no peso testicular. O fato dos camundongos hipotireóideos terem apresentado maior peso testicular aos 10 dias de idade provavelmente deveu-se a maior proliferação das células de Sertoli e disponibilidade de nichos espermatogoniais, raciocínio este corroborado pelo maior IGS nas idades de 5 a 15 dias de idade, enquanto o oposto ocorreu aos 15 dias de idade nos animais hipertireóideos, conforme será discutido posteriormente. Já nas idades de 20 e 28 dias a significativa redução do peso testicular dos animais tratados com PTU, semelhante ao observado para ratos (Simorangkir, et al., 1997), provavelmente está relacionado com o atraso no desenvolvimento deste órgão devido ao atraso na diferenciação dos elementos somáticos do testículo (França et al., 1995), o que é confirmado pelo maior peso testicular observado para estes animais na idade adulta (Hess et al., 1993; Joyce et al., 1993; Cooke et al., 1994). É importante ressaltar que a magnitude do aumento do peso testicular induzido pelo PTU é bem menos pronunciada em camundongos do que em ratos, conforme observado no presente estudo e por Joyce et al (1993). Contrastando com os resultados encontrados para o PTU, nos animais tratados com T3, o peso testicular foi sempre reduzido a partir de 15 dias de idade, o que provavelmente retratou uma aceleração no processo de maturação das células somáticas do testículo, conforme observado em ratos por Van Haaster e colaboradores (1993).

5.3- Análise histomorfométrica do testículo

5.3.1- Diâmetro tubular e formação do lume

O diâmetro tubular é o parâmetro que melhor reflete a evolução do processo espermatogênico e o grau de maturação das células de Sertoli, durante o desenvolvimento pós-natal do testículo de mamíferos de reprodução não sazonal. Semelhante ao observado na literatura para ratos (Simorangkir et al., 1997; Miranda, 2002 e 2006), o diâmetro dos cordões/túbulos seminíferos dos animais tratados com PTU mostrou-se sempre menor do que o dos animais controle, havendo uma estabilização destes diâmetros aos 100 dias de idade. Tal resultado está provavelmente relacionado ao atraso no estabelecimento do processo espermatogênico que ocorre devido à maturação/diferenciação mais lenta dos elementos somáticos do testículo (França et al., 1995; Simorangkir et al., 1997). Já nos animais tratados com T3, os maiores valores observados para o diâmetro tubular, durante o período de tratamento, deveram-se a maior secreção de fluido pelas células de Sertoli, conforme será visto logo a seguir (Van Haaster et al., 1993).

A secreção de fluido testicular através das células de Sertoli, com conseqüente formação do lume tubular, é um processo considerado andrógeno-dependente (Sharpe, 2005). Desta forma, camundongos adultos *knockouts* para receptores de andrógenos nas células de Sertoli (SCARKO) não apresentam lume tubular (De Gendt et al., 2004). Em condições normais, a formação do lume tubular é o melhor indicador morfofuncional do *status* maturacional das células de Sertoli (Russell et al., 1989), e nos camundongos controles por nós investigados a instalação deste processo já era evidenciada com duas semanas de idade.

Embora não tenhamos feito dosagens hormonais, no presente estudo foi demonstrado significativo atraso na formação do lume tubular nos animais submetidos ao tratamento com PTU, nos quais o aparecimento do mesmo só foi notado aos 28 dias de idade. Por outro lado, aos 10 dias os animais tratados com T3 já apresentavam processo de luminação em cerca de 2/3 dos cordões/túbulos seminíferos, indicando um nítido adiantamento deste processo, em comparação com os controles. Conforme esperado, estes resultados confirmam que os tratamentos com PTU e T3 são capazes de alterar o processo de maturação/diferenciação das células de Sertoli e conseqüentemente a secreção de fluido por estas células (Van Haaster et al., 1993; Bunick et al., 1994; França et al., 1995; Simorangkir et al., 1997; Palmero et al., 1989). Tal fato pode ser resultado dos menores níveis de gonadotrofinas observados nos animais tratados com PTU e T3 (Kirby et al., 1992; Van Haaster et al., 1993). Como o mRNA para o receptor do hormônio tireoidiano está presente nas células de Sertoli (Palmero et al., 1989; Jannini et al., 1990), a ação direta da tiroxina não pode ser excluída.

Um fato intrigante e inesperado foi o drástico decréscimo no lume tubular observado nos camundongos tratados com T3 e sacrificados aos 15 e 20 dias de idade. Não temos nenhuma explicação plausível para este achado que demonstra exaustão da capacidade de secreção de fluido por parte das células de Sertoli, que apresentam menor tamanho nuclear neste período conforme será ainda discutido.

5.3.2- Morfometria das células de Sertoli

O retardamento na maturação das células de Sertoli parece ser a provável causa do significativo atraso do crescimento tubular e evolução do processo espermatogênico nos ratos e camundongos hipotireóides (Van Haaster et al., 1992; Joyce et al., 1993; França et al., 1995). Estes estudos demonstraram que tanto a diferenciação quanto o período de proliferação das células de Sertoli foram estendidos, resultando em acentuado aumento no número total dessas células, no tamanho do testículo e da produção espermática (Hess et al., 1993; Cooke

et al., 1994), conforme será discutido adiante. Em contraste, o tratamento com T3 causa efeitos antagônicos aos observados para o PTU (Van Haaster et al., 1993), agindo provavelmente no ciclo celular através da inibição da síntese de DNA e do aumento da expressão de p27^{Kip} e p21^{Cip1} e da a atividade de Skp2 nas células de Sertoli, resultando em menor proliferação das mesmas (Palmero et al., 1992; Holsberger et al., 2003; Holsberger et al., 2005b; Holsberger et al., 2005c).

No presente estudo, embora com magnitude diferente da relatada na literatura para ratos (Hess et al., 1993; Miranda, 2002 e 2006), foi verificado aumento de cerca de 45% no número de células de Sertoli por testículo dos animais tratados com PTU e diminuição de ~50% nos animais que receberam altas doses de T3. Reforçando a ação dos hormônios tireoidianos na diferenciação/maturação das células de Sertoli, deve ser ressaltado que o tratamento com a menor dose de T3 resultou em redução de somente ~25% no número destas células por testículo, nos camundongos sacrificados aos 37 dias de idade. O fato do número de células de Sertoli ter permanecido constante em todos os três grupos experimentais, a partir de 15 dias de idade, indica que o prolongamento do período de proliferação das células de Sertoli nos animais tratados com PTU não foi evidente conforme ocorre em ratos (Van Haaster et al., 1992; França et al., 1995; Miranda, 2006), e mesmo em camundongos Swiss (Joyce et al., 1993). Neste sentido, talvez o intervalo de 5 dias por nós investigado neste período do desenvolvimento testicular tenha sido relativamente longo.

À semelhança do observado por Van Haaster et al (1993), cerca de duas semanas após o início do tratamento os animais que receberam T3 apresentaram aumento significativo no volume nuclear das células de Sertoli. Este resultado confirma a aceleração do processo de maturação destas células, o que também é ilustrado através do processo de luminação dos túbulos seminíferos, o qual, em contraste com os camundongos hipotireóides, é mais precoce naqueles tratados com T3. Pelo fato do volume nuclear das células de Sertoli ser sempre menor após o término dos tratamentos com PTU e T3, pode se sugerir que as alterações nos hormônios tireoidianos causaram modificações funcionais nestas células, pelo menos em grande parte do período experimental investigado. Por exemplo, ratos tratados com PTU até 20-25 dias de idade retornam ao estado eutireóide cerca de quatro semanas mais tarde. No entanto, no nosso conhecimento não existem dados conclusivos a este respeito na literatura.

Um resultado de certa forma inesperado no presente trabalho foi o fato de não ocorrer avanços nem atrasos nítidos em relação ao tipo de célula germinativa mais avançada no processo espermatogênico em decorrência dos tratamentos com PTU e T3. Pelo menos em

parte, estes achados podem ser justificados pelo fato dos eventos que ocorrem durante o desenvolvimento pós-natal do testículo de camundongos serem relativamente rápidos, quando se considera que a liberação dos primeiros espermatozóides já ocorre cerca de cinco semanas após o nascimento. Portanto, conforme já comentado para a proliferação das células de Sertoli, talvez devêssemos utilizar intervalos de tempo mais curtos (ex; 2-3 dias) para este tipo de investigação, neste período específico do experimento. Outro aspecto a se considerar, seria a análise detalhada da função de outros elementos somáticos importantes do testículo tais como células de Leydig e peritubulares mióides, além das células de Sertoli.

5.3.3- Morfometria das células germinativas

Classicamente na literatura (França, 1991; França et al., 1995; Neves, 2001) é mostrado que o volume do núcleo das espermatogônias decresce gradualmente daquelas do tipo A até espermatogônias do tipo B. Mesmo em peixes, tais como tilápias (Schulz et al., 2005) e *zebrafish* (Cardoso, 2007), esta tendência é também evidenciada. No entanto, nos estudos desenvolvidos em mamíferos não foram avaliados o volume celular total nem tampouco o volume dos diferentes tipos de espermatogônias A. Particularmente em roedores, a não ser em ratos nos quais os volumes nuclear e celular das espermatogônias do tipo A (indiferenciadas + diferenciadas), intermediárias e B foram obtidos (França et al., 1995), no nosso conhecimento, não existem dados publicados a respeito do tamanho e número dos diferentes tipos espermatogoniais ($A_{ind.}$ até A_4) de camundongos. Portanto, os resultados por nós encontrados, mostrando que tanto o volume nuclear quanto o celular aumenta gradualmente de $A_{ind.}$ até A_2 , decrescendo gradativamente até espermatogônias do tipo B em todos os grupos e idades avaliadas, são inéditos. Estes resultados podem eventualmente ser úteis no auxílio da caracterização e identificação das espermatogônias indiferenciadas, particularmente das espermatogônias tronco, através de outras abordagens ou metodologias de estudo tais como microscopias confocal e de varredura e programas de análises de imagens. Pois, conforme foi mostrado no item de resultados, as espermatogônias do tipo A indiferenciadas quase sempre apresentam menor volume nuclear e celular.

Merece ser ressaltado que Nakagawa et al. (2007) observaram que as espermatogônias indiferenciadas podem ser funcionalmente divididas em células tronco reais e potenciais. Portanto, o sistema de célula tronco não seria exclusivamente dependente da auto-renovação intrínseca da espermatogônia isolada ou tronco real, mas envolveria ampla população com potencial de auto-renovação, denominada de células tronco potenciais. Caso ocorra perda da

célula tronco real, espermatogônias tronco potenciais assumiriam o papel de regular a homeostase testicular (Nakagawa et al. 2007).

Quanto as espermatogônias com núcleo vacuolado e por nós consideradas indiferenciadas, que foram observadas nos três grupos estudados a partir de 5 dias de idade, não temos nenhuma explicação aparente para este achado. A literatura cita que as células de Sertoli de ruminantes possuem nucléolo vacuolado ou multivesiculado (Azmi et al., 1990; Hess & França, 2005). É especulado que nestas células estes vacúolos, preenchidos por material considerado floculento, são margeados por estruturas semelhantes a ribossomos, os quais estão freqüentemente associados com os poros do envoltório nuclear e citoplasma, sugerindo os autores que os mesmos podem estar envolvidos na síntese e transporte de substâncias importantes para a diferenciação das células germinativas (Azmi et al., 1990). Certamente, este aspecto observado nas espermatogônias merece uma investigação detalhada com a finalidade de se encontrar um significado funcional para o mesmo.

De forma intrigante, embora mostrando as mesmas tendências observadas para os outros dois grupos experimentais, de maneira geral os valores encontrados para os volumes nucleares e celulares foram menores nos camundongos tratados com T3. A interpretação destes achados é bastante complexa, uma vez que é difícil inferir se os efeitos do tratamento com T3 foram diretos nas células germinativas, pois as mesmas apresentam receptores para hormônios tireoidianos (Mu & Liu, 1998; Buzzard et al., 2000), ou indiretos via elementos somáticos do testículo, particularmente células de Sertoli. Pois, conforme discutido no item 5.3.2, os tratamentos com PTU e principalmente com T3 pareceram exercer efeitos deletérios sobre a função das células de Sertoli.

Considerando que a célula de Sertoli é o principal elemento regulador do nicho espermatogonial (Li & Xie, 2005), o maior número deste importante elemento somático resulta, em última análise, em maior disponibilidade de nichos espermatogoniais (Cooke et al., 1994c). Desta forma, um dos objetivos principais do presente estudo foi investigar a correlação entre o número de células de Sertoli e o número/nichos de espermatogônias indiferenciadas nos diferentes grupos experimentais avaliados em diferentes idades.

Neste contexto, de maneira geral, em contraste com os camundongos tratados com T3, os animais que receberam PTU apresentaram maior número de células germinativas. Particularmente, nos animais tratados com PTU maior número de espermatogônias indiferenciadas foi observado nas idades de 10 dias e 100 dias. Estes resultados sugerem que nessas idades e condição experimental, estes camundongos podem ser potencialmente

utilizados como doadores de espermatogônias, otimizando assim a eficiência de transplante de espermatogônias.

Baseado no conhecimento recente de que as espermatogônias indiferenciadas possuem localização preferencial adjacente ao interstício, mais especificamente dos vasos sanguíneos (Yoshida et al., 2007), e que na idade de 10 dias o número total de espermatogônias indiferenciadas foi maior nos animais hipotireóideos, fizemos uma investigação preliminar quanto aos componentes vasculares do testículo nos três grupos experimentais, nesta idade específica. Esta análise não foi feita levando-se em conta a proximidade direta das espermatogônias indiferenciadas com os capilares ou vasos sanguíneos porque, dependendo do plano de secção histológica que é em duas dimensões, esta proximidade não necessariamente seria observada. Corroborando os achados de Yoshida et al. (2007) que utilizaram principalmente técnicas que envolvem análises em três dimensões, nossos resultados (Tab. 10) mostraram uma forte tendência de maior percentual e volume absoluto dos componentes vasculares nos camundongos hipotireóideos. Da mesma forma, Miranda (2002), observou maior valor percentual de vasos sanguíneos nos ratos tratados com PTU e sacrificados aos 160 dias de idade. Estes resultados indicam que os capilares ou vasos sanguíneos são componentes importantes dos nichos espermatogoniais (Yoshida et al. 2007).

A análise preliminar dos testículos de camundongos hipotireóideos feita aos 15 dias de idade mostrou que maior número de apoptoses foi observada nos animais tratados com PTU e T3. No caso dos camundongos hipotireóideos esta maior degeneração celular deveu-se provavelmente ao *status* mais imaturo das células de Sertoli (França et al., 1995), apesar da ação direta dos hormônios tireoidianos nas células germinativas não poder ser descartada (Buzzard et al., 2000; Miranda, 2006), uma vez que as mesmas também apresentam receptores para estes hormônios (Buzzard et al., 2000). Efeitos diretos dos hormônios tireoidianos nas células de Sertoli e em outros elementos do testículo, que resultariam em apoptoses das células germinativas, também não podem ser descartados (França et al., 1995; Mendis-Handagama & Ariyaratine, 2004; Miranda, 2006). Pois, por exemplo, conforme foi salientado anteriormente, as células de Sertoli de animais tratados com T3 parecem apresentar alterações funcionais e, em idades posteriores e principalmente na fase adulta, estas alterações provavelmente são, de certa forma, revertidas pelo fato das apoptoses serem pouco observadas (Hess et al., 1993; Simorangkir et al., 1997; Miranda, 2002 e 2006).

5.3.4 – Índices celulares e produção espermática diária

A recuperação total dos efeitos dos tratamentos utilizados, sobre a espermatogênese dos camundongos C57BL/6J, só foi observada aos 100 dias de idade. Essa inferência baseou-se principalmente na avaliação de parâmetros considerados muito importantes tais como diâmetro tubular e eficiência da célula de Sertoli. Conforme foi demonstrado nesta idade, os valores obtidos para estes parâmetros foram semelhantes nos três grupos experimentais avaliados. Em ratos, nos quais a puberdade e a maturidade sexual ocorrem em torno de 50 e 100 dias respectivamente, enquanto em camundongos estes eventos podem ser observados nas idades de 37 e 70 dias, a estabilização ou recuperação total dos animais ao tratamento com PTU também ocorre mais tardiamente e somente em torno de 160 dias de idade (Miranda, 2002).

Conforme citado na literatura e observado no presente estudo para os camundongos tratados com PTU, o maior ou menor número de células de Sertoli no testículo em decorrência de tratamentos com PTU ou drogas antagonistas de GnRH (hormônio liberador de gonadotropina) resulta respectivamente em tendência de diminuição e aumento da eficiência destas células (Hess et al., 1993; Miranda 2002 e 2006). Estes resultados devem-se, provavelmente, à maior densidade de células de Sertoli no epitélio seminífero e não ao comprometimento funcional das mesmas devido ao tratamento infligido (Hess et al., 1993; Miranda 2002 e 2006).

A alteração no número de células de Sertoli e a manutenção em determinado grau da eficiência das mesmas resultaram em maiores e menores peso testicular e produção espermática diária, nos camundongos tratados com PTU e T3, respectivamente. Resultado semelhante foi obtido para camundongos tratados com PTU (Joyce et al., 1993). No nosso conhecimento, não existem dados na literatura a respeito da eficiência das células de Sertoli e produção espermática em roedores tratados com T3.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

O FSH e os hormônios tireoidianos (T3 e T4) são responsáveis respectivamente pela proliferação e diferenciação das células de Sertoli e o período de atividade mitótica destas células é estendido por aproximadamente uma a duas semanas em camundongos e ratos tratados com PTU durante o período neonatal. Esta condição leva ao aumento no peso testicular, número de células de Sertoli por testículo, número de células germinativas e da produção espermática. De maneira antagônica, o hipertireoidismo neonatal induzido pelo T3 acelera o processo de maturação da célula de Sertoli, diminuindo seu período mitogênico, resultando em redução do peso testicular, número de células de Sertoli e produção espermática. Dados na literatura sugerem que a célula de Sertoli é o principal elemento somático responsável pelos nichos espermatogoniais, nos quais estariam localizadas as espermatogônias tronco. Desta forma, os objetivos do presente estudo foram os de se avaliar os efeitos do hipo e hipertireoidismo neonatal no desenvolvimento testicular e proliferação/diferenciação das células de Sertoli, bem como a correlação destes eventos na evolução do processo espermatogênico, produção espermática e número de espermatogônias indiferenciadas em camundongos C57BL/6J. Cento e cinquenta e dois camundongos foram utilizados (controle n=63; tratados com PTU n=57; e tratados com T3 n=32). Estes animais foram sacrificados nas idades de 1, 5, 10, 15, 28, 37, 70 e 100 dias e tiveram seus testículos removidos e fixados em glutaraldeído, incluídos e rotineiramente preparados para investigações histomorfométricas. Os camundongos que receberam T3 e PTU apresentaram menor peso corporal após o encerramento destes tratamentos. Entretanto, a partir de 10 dias de idade, o número de células de Sertoli por testículo foi maior e menor nos animais tratados com PTU e T3, respectivamente. Enquanto, provavelmente devido as modificações no número de células de Sertoli e manutenção relativa de sua eficiência, a produção espermática apresentou esta mesma tendência nos camundongos adultos. O número de espermatogônias, particularmente indiferenciadas, foi maior aos 10 e 100 dias de idade nos camundongos tratados com PTU, sugerindo que existe maior disponibilidade de nichos espermatogoniais, o que pode estar relacionado com o aumento observado para o percentual e volume de vasos sanguíneos encontrado aos 10 dias. Provavelmente devido à aceleração e atraso na diferenciação das células de Sertoli, o processo de luminação iniciou mais precocemente ou foi retardado nos camundongos tratados respectivamente com T3 e PTU. No entanto, as alterações observadas no volume nuclear destas células nos camundongos tratados e, particularmente a diminuição de cordões/túbulos seminíferos com lume tubular nos animais

tratados com T3 nas idades de 15 e 20 dias, sugerem que as funções das células de Sertoli podem estar comprometidas em grande parte do período experimental investigado. Talvez, estas alterações podem ter sido a causa do maior número de apoptoses das células germinativas que ocorrem por exemplo aos 15 dias de idade, pois estas degenerações raramente foram observadas em camundongos adultos tratados no período neonatal. Os volumes celulares e nucleares das espermatogônias aumentaram progressivamente das espermatogônias indiferenciadas até aquelas do tipo A₂, decrescendo gradualmente até espermatogônias do tipo B. Tendência esta semelhante nos três grupos experimentais investigados. Estes resultados podem, eventualmente, serem úteis na caracterização das espermatogônias tronco, uma vez que não existem ainda marcadores específicos para este tipo celular. Em conclusão, as investigações feitas no presente estudo, foram capazes de nos fornecer importantes dados a respeito da função deste órgão em camundongos C57BL/6J. Especificamente, foi possível quantificar o número e volume dos diferentes tipos espermatogoniais e sugerir uma maior disponibilidade de nichos de espermatogônias tronco nas idades de 10 e 100 dias, nos animais tratados com PTU. Idades estas que potencialmente podem ser utilizadas como ponto de referência para melhorar a eficiência do transplante de células germinativas.

7. ANEXOS (FIGURAS E TABELAS)

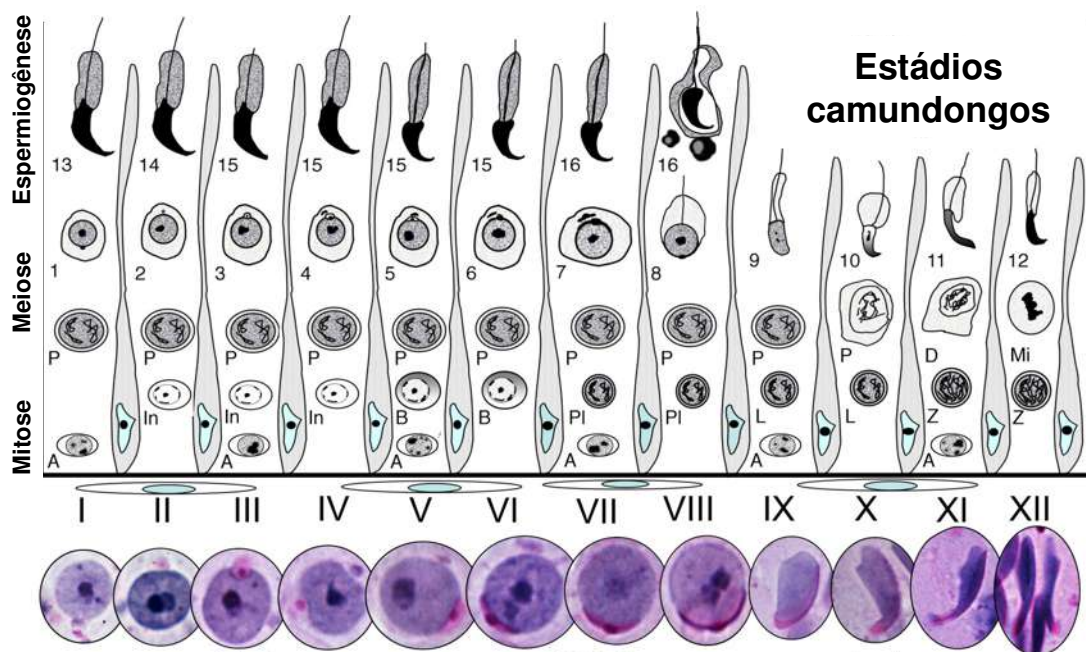


Figura 1- Estádios (I-XII) do ciclo do epitélio seminífero de camundongos. Na base são micrografias de núcleos de espermatídios em diferentes fases, coradas por PAS e contra-coradas com hematoxilina. Espermatogônias (A, In, B); espermatócitos (PI: pré-leptóteno, L: leptóteno, Z: zigóteno, P: paquíteno; D: diplóteno; Mi: divisão meiótica); espermatídios arredondados (1-8); espermatídios alongados (9-16) (Hess & França, 2007).

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
13	14	14	15	15	16	16					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	D	MEIOTIC DIVISION
					preL ↑	preL	preL L	L	Z	Z	P
A4 A3→m	In A4→m	In	B In→m	B	B→m						
						A1 ↙ ↘		A2 A1→m	A2	A3 A2→m	A3
A-al ↑	A-al ↑	A-al ↑	A-al	A-al	A-al	A-al	(A-al)	(A-al)	(A-al) ↑	(A-al) ↑	(A-al) ↑
A-pr h	A-pr h	A-pr h	A-pr	A-pr	A-pr	A-pr	A-pr	A-pr	A-pr h	A-pr h	A-pr h
A-s	A-s	A-s	A-s	A-s	A-s	A-s	A-s	A-s	A-s	A-s	A-s

Figura 2- Diagrama demonstrando as associações celulares (estádios) durante o ciclo do epitélio seminífero de camundongos. As espermatogônias indiferenciadas consistem de A isolada (A_s), A pareada (A_{pr}) e A alinhada (A_{al}), que dividem durante os estádios X-II como indicado por setas entre as células. Durante os estádios VIII a XI as A_{al} são raras como indicado por parêntesis. No grupo das espermatogônias diferenciadas as divisões são indicadas por m (De Rooij, 1998).

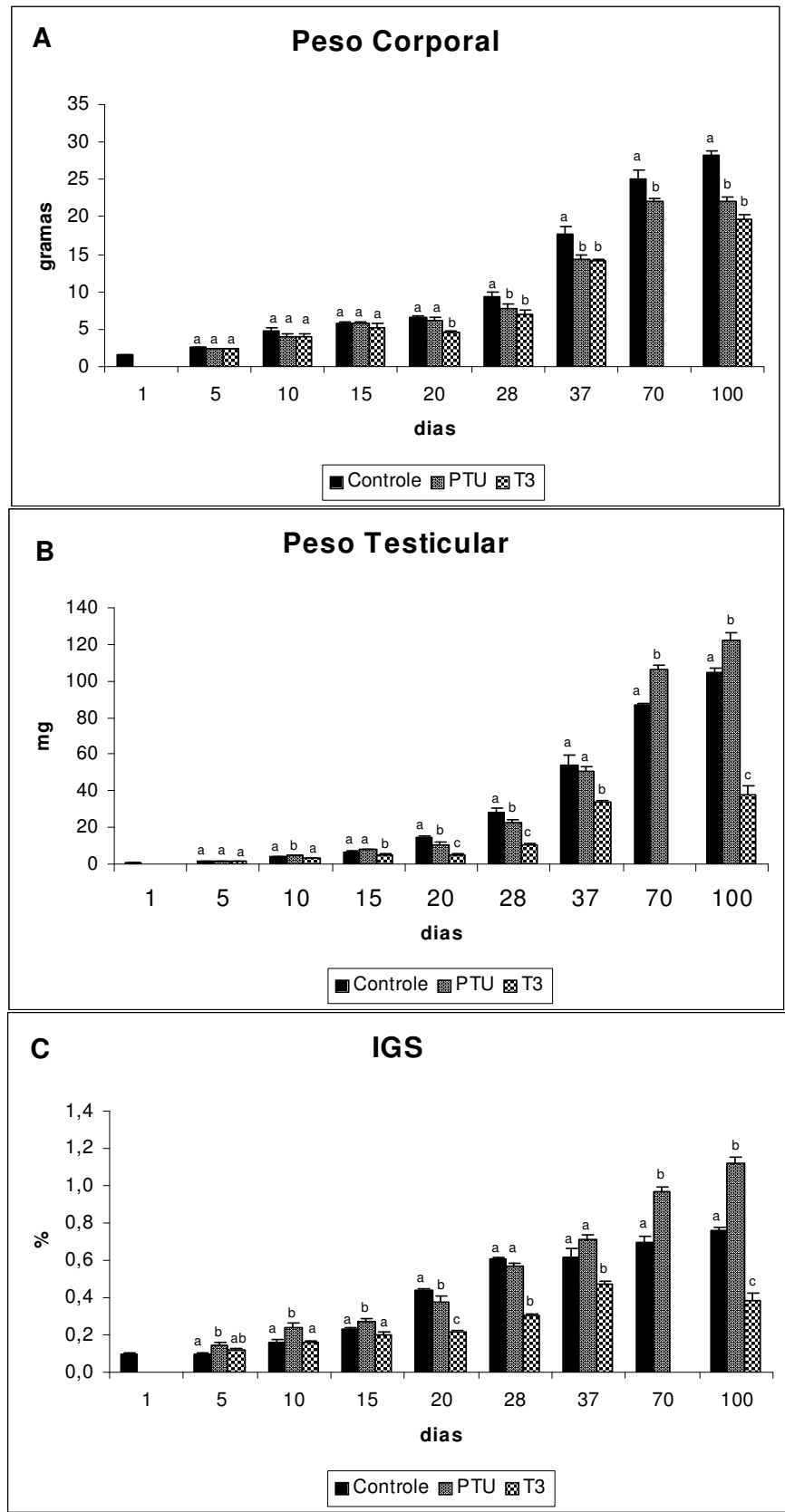


Figura 3 - Evolução dos pesos corporal (A), testicular (B) e índice gonadosomático (C; IGS) nos animais controles e tratados com PTU e T3, sacrificados em diferentes idades após o nascimento (média±EPM). Letras diferentes na mesma idade denotam diferenças significativas ($p < 0,05$).

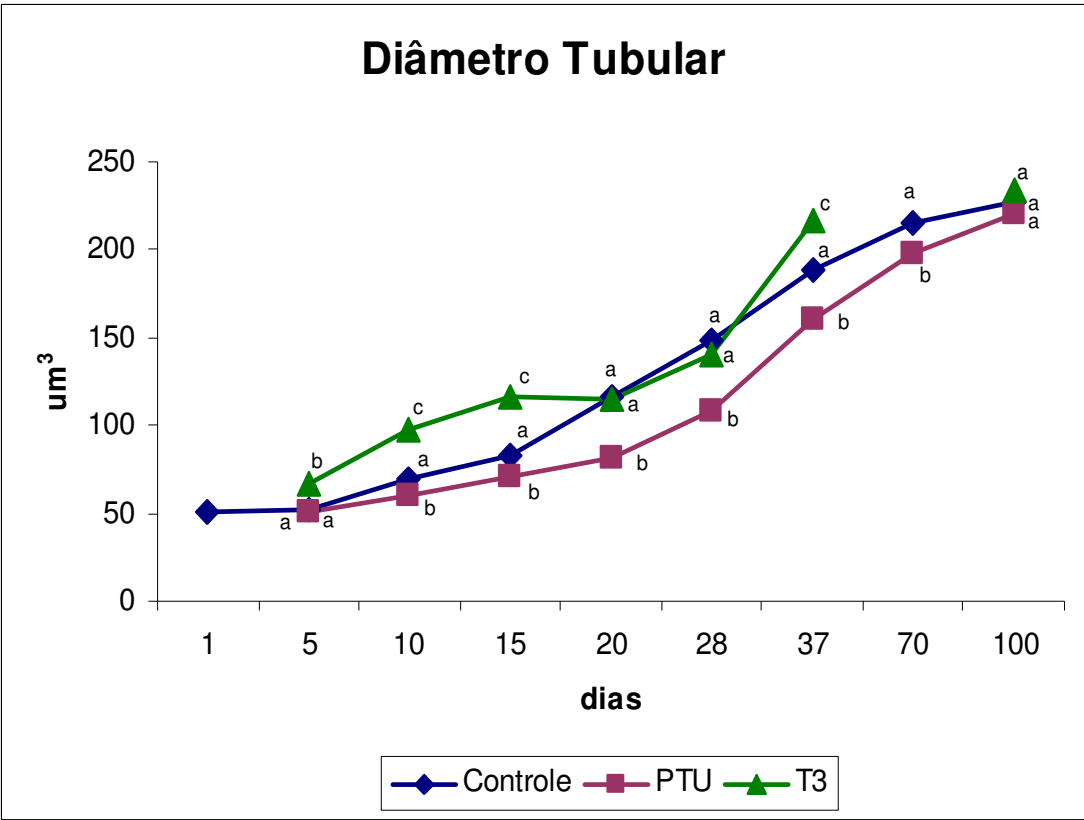


Figura 4 - Evolução do diâmetro tubular dos camundongos controles e tratados com PTU e T3 e sacrificados em diferentes idades (média±EPM). Letras diferentes na mesma idade denotam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Morfologia dos gonócitos e das espermatogônias de camundongos C57BL/6J

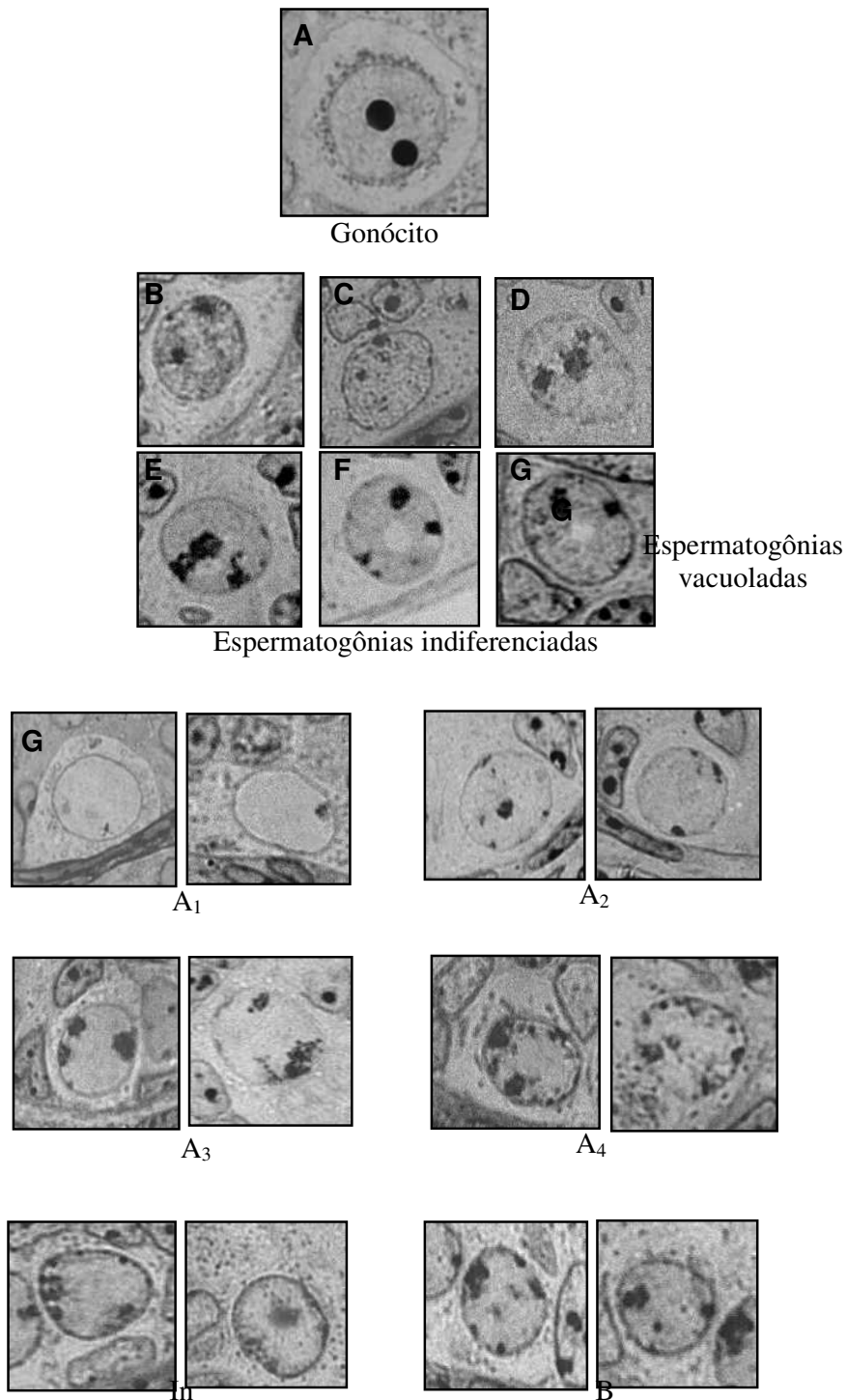
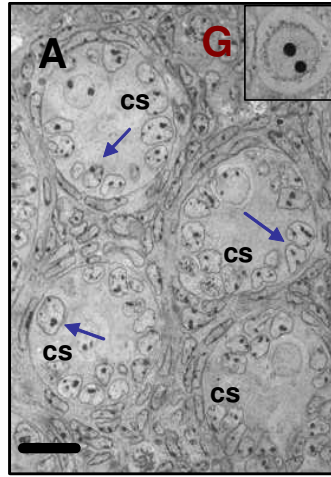


Figura 5 - A morfologia dos gonócitos e dos diferentes tipos de espermatogônias de camundongos C57BL/6J seguiu o padrão já descrito na literatura, de acordo com Vergouwen et al., 1991 e Chiarini-Garcia & Russell, 2001; respectivamente.

Figura 6 - Secções transversais de cordões (cs)/ túbulos seminíferos (ts) de camundongos controles (A, B,E), tratados com PTU (C,F) e T3 (D,G), e sacrificados entre 1 e 10 dias de idade. Observe que nos animais de 1 dia (A), existem somente gonócitos (encarte, canto superior a direita) e células de Sertoli (setas azuis) nos cordões seminíferos. Com 5 dias de idade (B, C, D), o tipo celular mais avançado foi a espermatogônia diferenciada do tipo A₃ (encarte). Nesta idade, os animais tratados com T3 apresentaram diâmetro do cordão seminífero nitidamente maior. Aos 10 dias de idade (E, F, G), o tipo celular mais avançado foi o espermatócito primário em pré-leptóteno (Pl no encarte). O lume (*) já estava presente nos túbulos seminíferos dos animais tratados com T3. Barra = 20µm.

Controle

1 dia

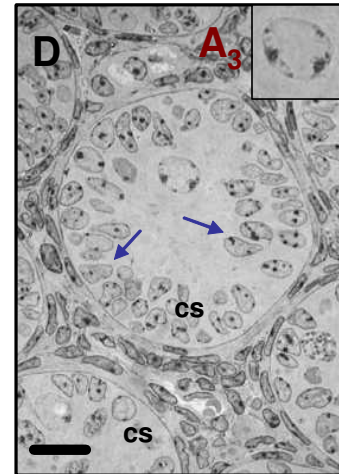
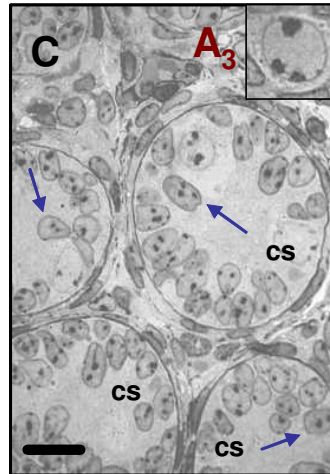
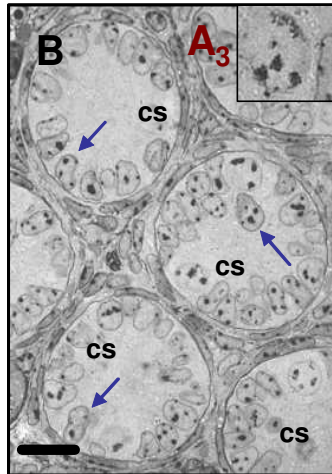


Controle

PTU

T3

5 dias



10 dias

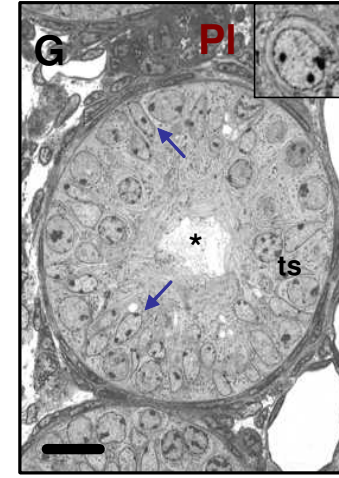
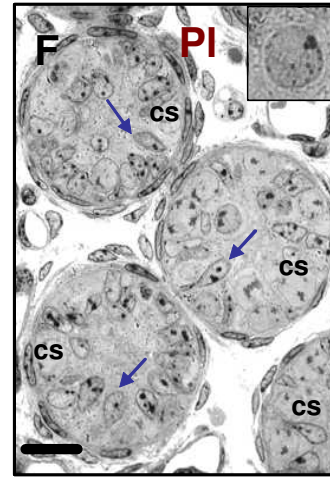
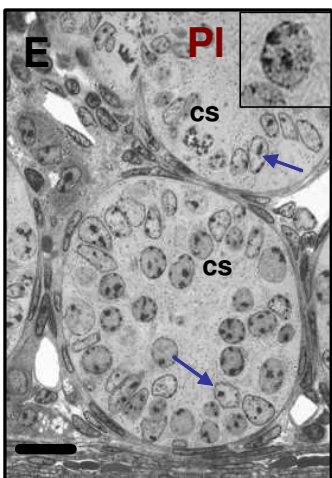


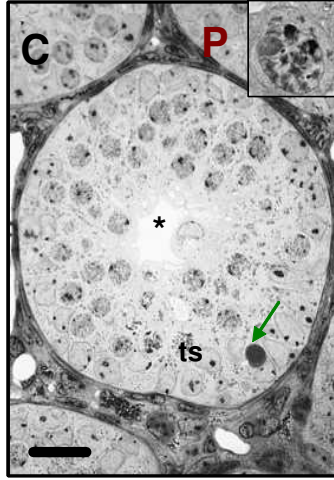
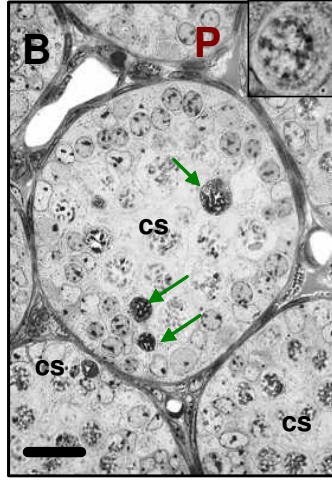
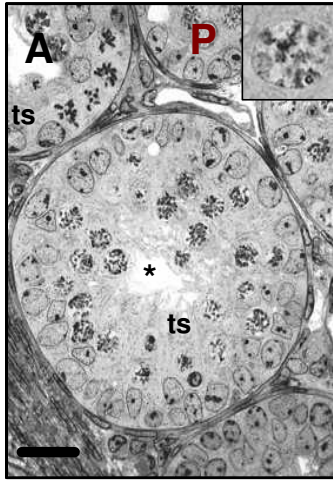
Figura 7 - Secções transversais de cordões seminíferos (cs) e túbulos seminíferos (ts) de camundongos controle (A, D e G), tratados com PTU (B, E, H) e T3 (C, F, I), e sacrificados entre 15 e 28 dias de idade. Observe que nos animais com 15 dias de idade (A-C), o tipo celular mais avançado foi o espermatócito em paquíteno (encarte). Nesta idade e aos 20 dias, os animais hipotireóideos apresentaram diâmetro dos cordões seminíferos com tamanho intermediário entre os camundongos controles e hipertireóideos. Particularmente aos 15 dias, os animais hipotireóideos apresentaram quantidade razoável de células germinativas em apoptose (setas verdes). Aos 20 dias de idade (D -F), o tipo celular mais avançado foi a espermátide arredondada na fase 1 (encarte) nos controles e animais tratados com T3, no entanto, os animais que receberam PTU apresentaram atraso no processo espermatogênico e somente espermatócitos primários em paquíteno (encarte) foram observados. Com 28 dias de idade (G-I), o tipo celular mais avançado foi a espermátide alongada na fase 13 nos controles e tratados com T3, enquanto nos animais que receberam PTU o tipo celular mais adiantado foi a espermátide em alongamento na fase 7-8 (encarte) e, pela primeira vez, a luminação (*) tubular foi observada neste grupo experimental. Barra = 20µm (A-C) e 40µm (D-I).

Controle

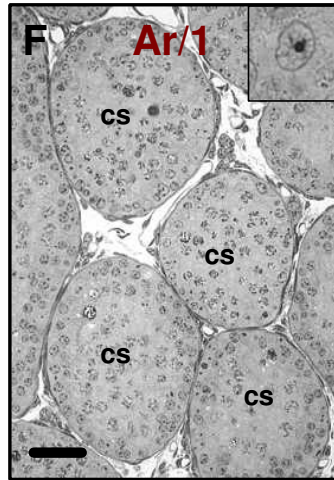
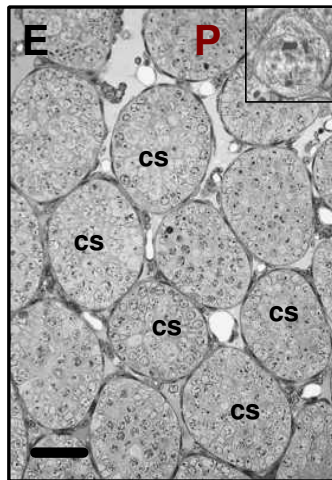
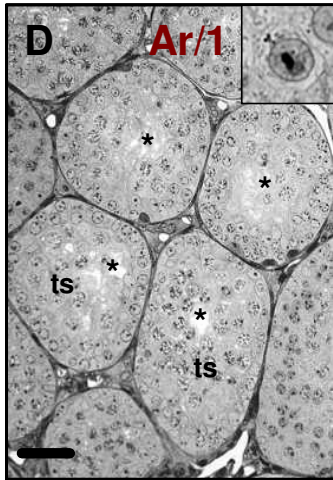
PTU

T3

15 dias



20 dias



28 dias

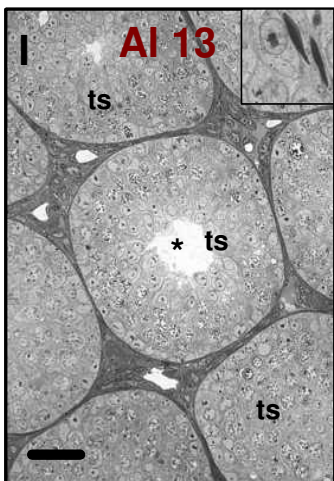
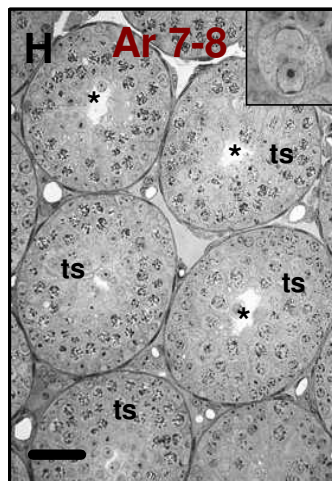
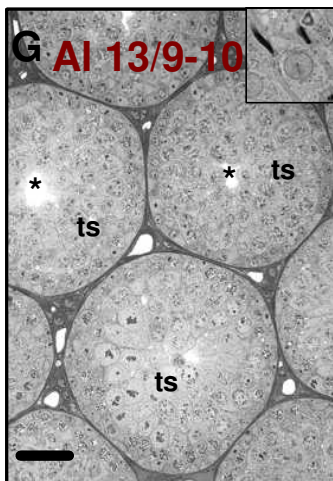


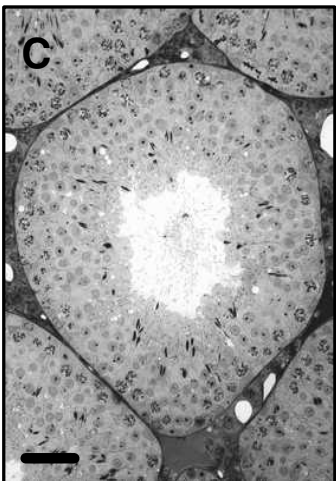
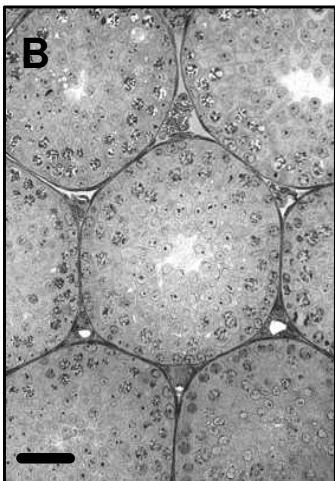
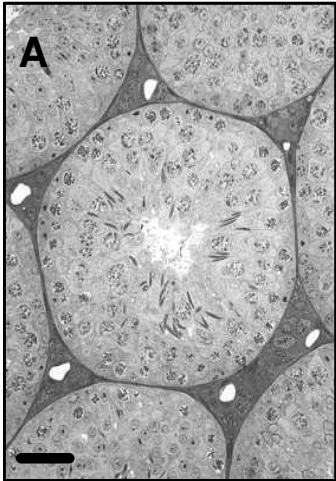
Figura 8 - Secções transversais de túbulos seminíferos de camundongos controles (A, D, F), tratados com PTU (B, E, G) e com T3 (C, H), e sacrificados entre 37 e 100 dias de idade. Em todas as idades e grupos experimentais, o processo espermatogênico estava completo. No entanto, aos 37 dias (A-C), em contraste com tratados com T3, nos naqueles tratados com PTU o diâmetro tubular apresentou-se nitidamente menor. O mesmo ocorreu em relação ao grupo controle e tratado com PTU nas idades de 37 e 70 dias. Por outro lado, nos animais investigados com 100 dias de idade, o diâmetro tubular não mostrou variação significativa. Barra = 40µm.

Controle

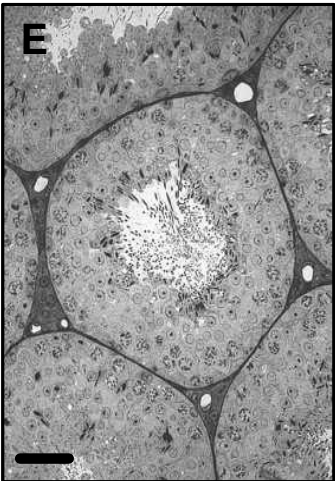
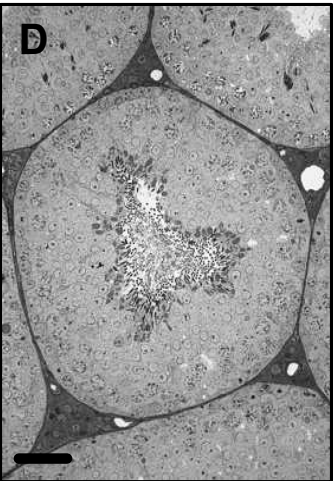
PTU

T3

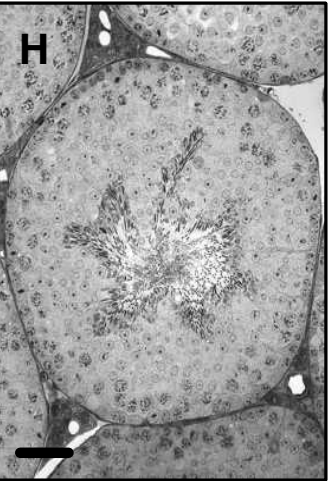
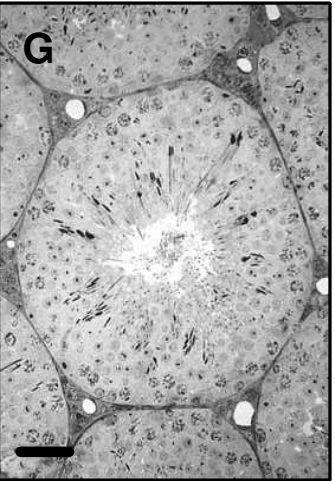
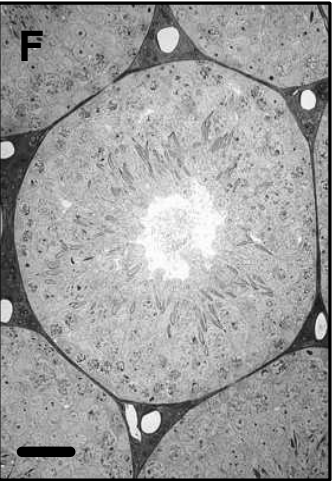
37 dias



70 dias



100 dias



Formação do Lume

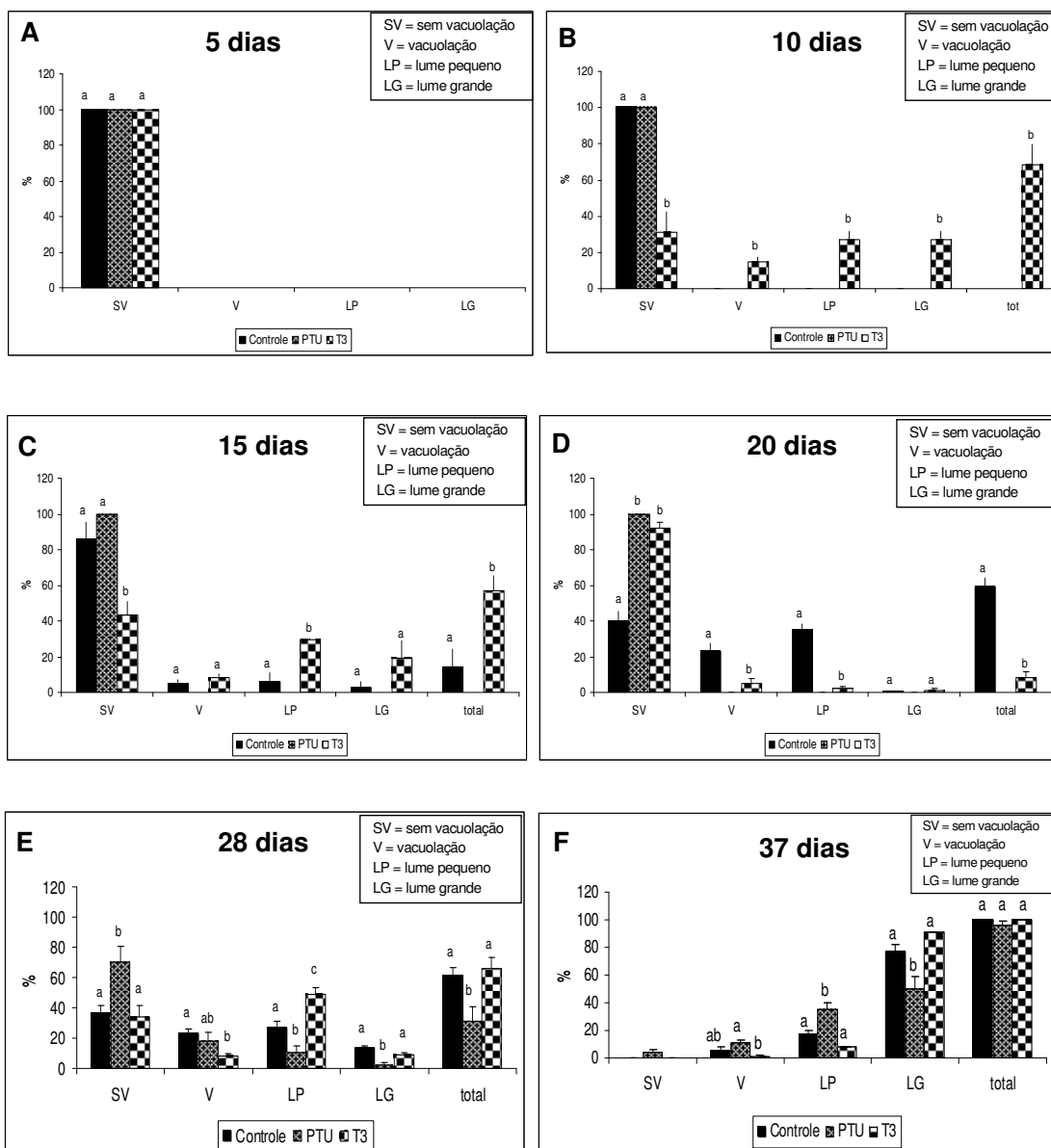


Figura 9 - Evolução do processo de formação do lume, nos cordões seminíferos, dos camundongos sacrificados nas idades de 5 a 37 dias. Observe que na idade de 5 dias não existem túbulos com lume, enquanto aos 37 dias praticamente todos os túbulos já apresentam luminação. Letras diferentes no mesmo parâmetro considerado denotam diferenças significativas ($p < 0,05$).

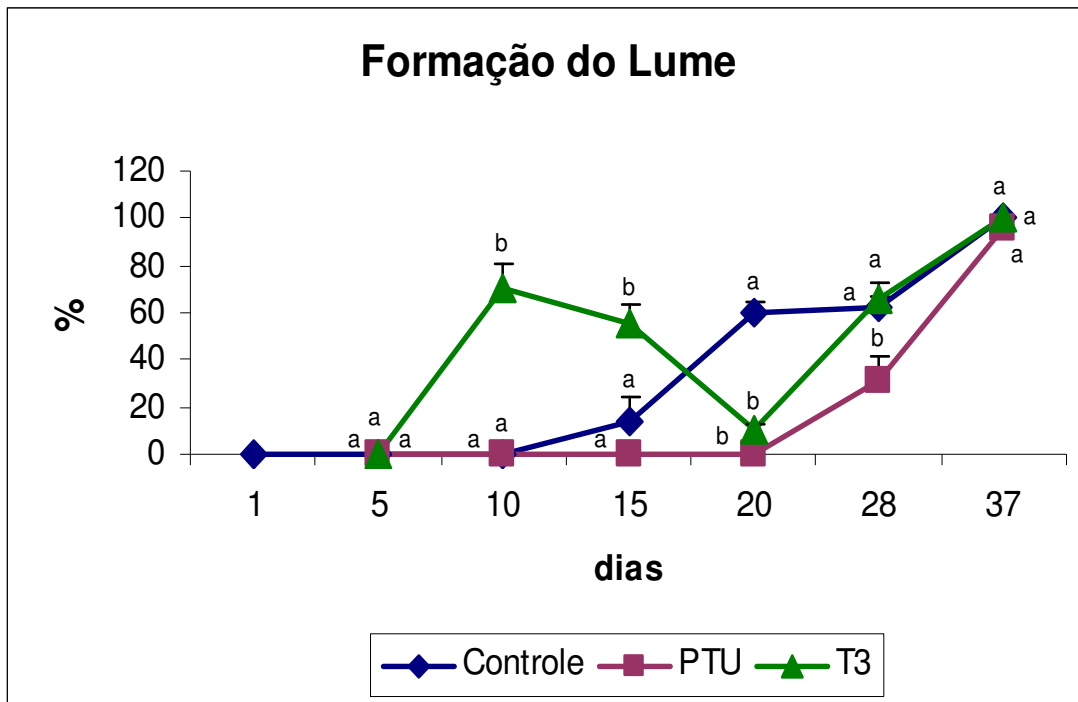


Figura 10 – Síntese da evolução do processo de formação do lume em camundongos C57BL/6J sacrificados entre 5 e 37 dias de idade. Observe o adiantamento e atraso de ocorrência deste processo nos animais tratados com T3 e PTU, respectivamente. Letras diferentes para a mesma idade denotam diferenças significativas ($p < 0,05$).

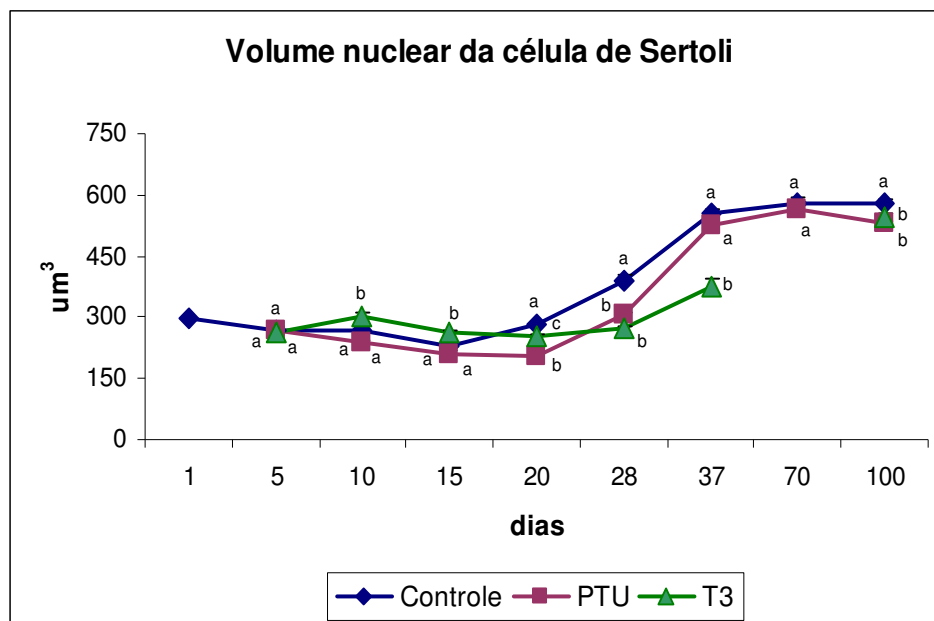


Figura 11 – Evolução do volume nuclear das células de Sertoli em camundongos controles e tratados com PTU e T3 e sacrificados em diferentes idades. Letras diferentes para a mesma idade denotam diferenças significativas ($p < 0,05$).

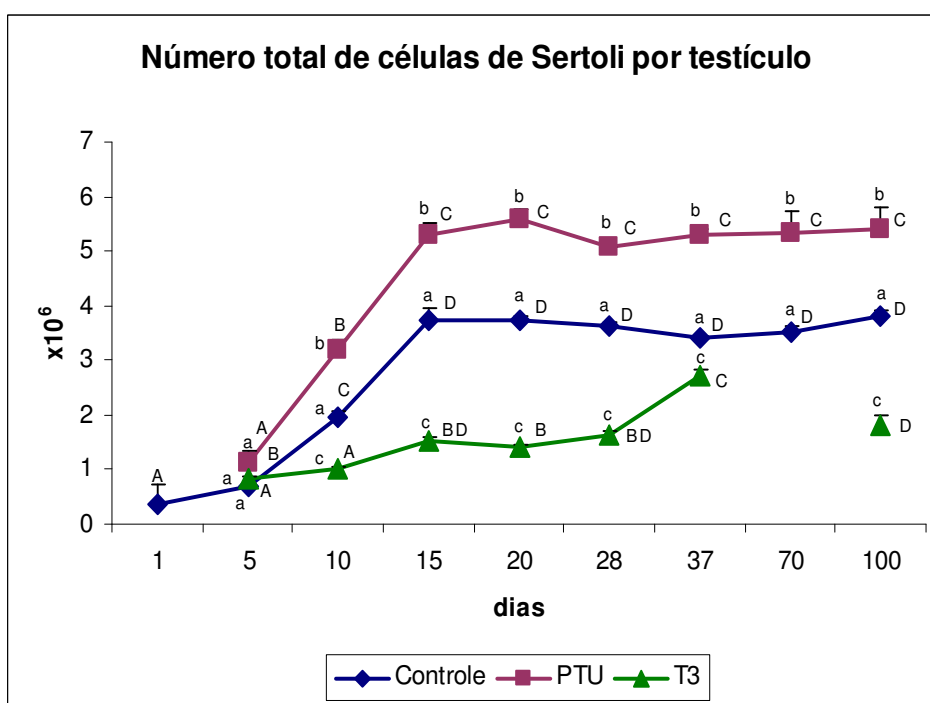


Figura 12 – Evolução do número total de células de Sertoli por testículo em camundongos controles e tratados com PTU e T3 e sacrificados em diferentes idades. Letras diferentes para a mesma idade denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre idades (letras minúsculas) e condição experimental (letras maiúsculas).

Figura 13 – Evolução do volume das células germinativas de camundongos controles e tratados com PTU e T3 e sacrificados entre 5 e 20 dias de idade. Letras diferentes para a mesma idade denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais. Espermatogônias do tipo A indiferenciadas (A_{ind}), diferenciadas (A_{1-4}), intermediárias (In), do tipo B (B) e espermatócitos primários em pré-leptóteno (Pl).

Volume Celular

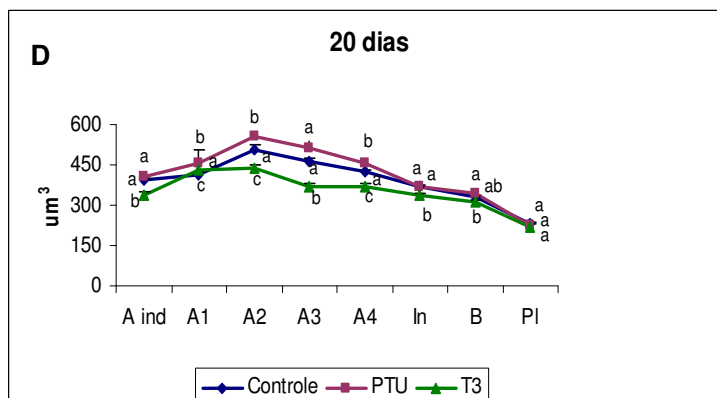
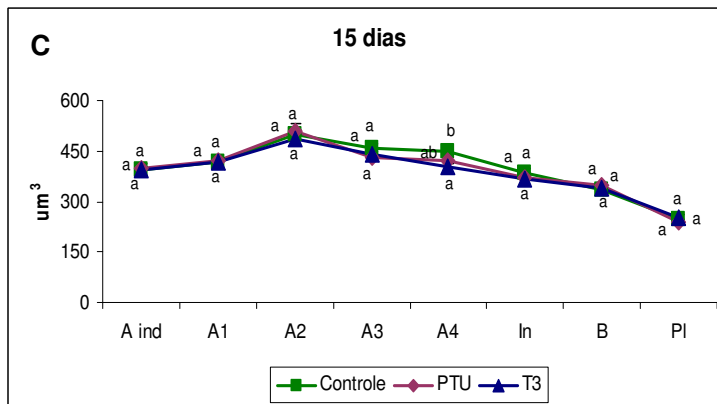
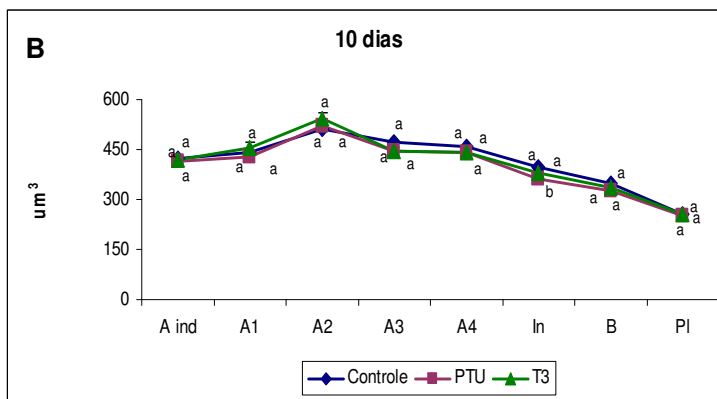
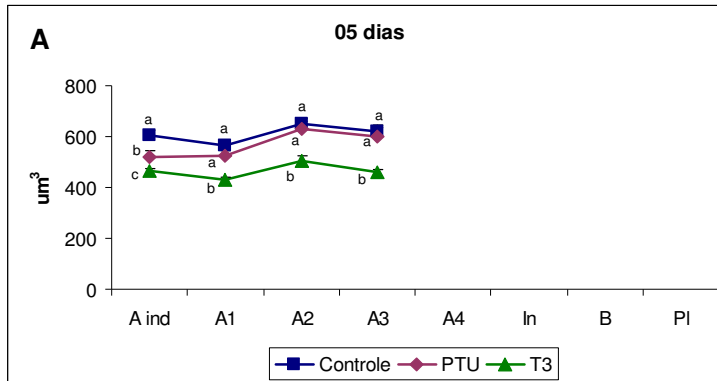


Figura 14 – Evolução do volume das células germinativas de camundongos controles e tratados com PTU e T3 e sacrificados entre 28 e 100 dias de idade. Letras diferentes para a mesma idade denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais. Espermatogônias do tipo A indiferenciadas (A_{ind}), diferenciadas (A_{1-4}), intermediárias (In), do tipo B (B) e espermatócitos primários em pré-leptóteno (Pl).

Volume Celular

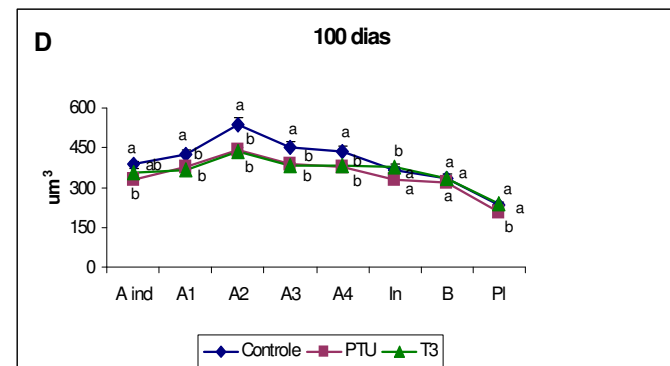
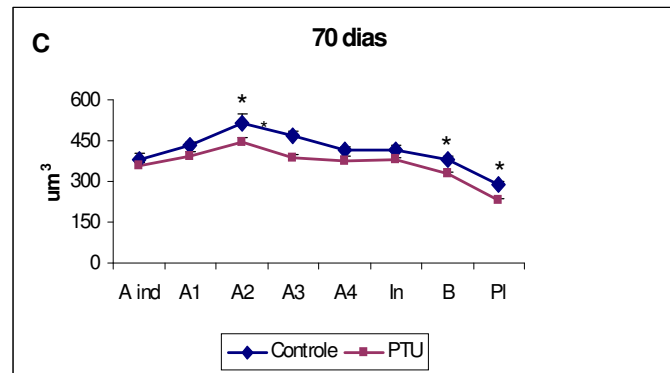
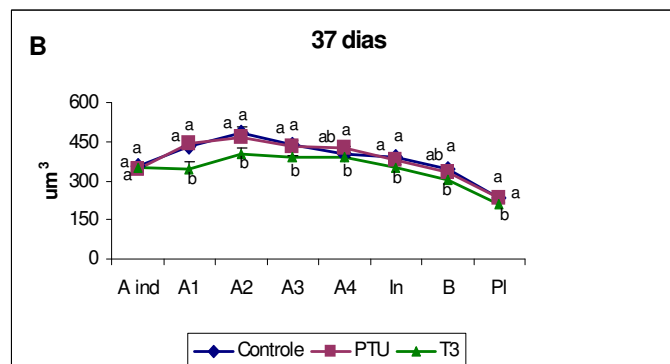
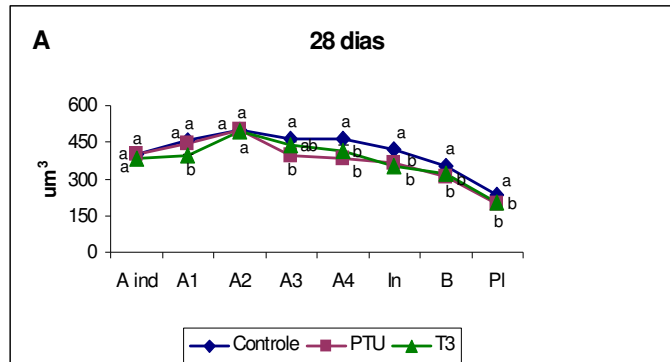


Figura 15 – Evolução do número de células germinativas de camundongos controles e tratados com PTU e T3 e sacrificados entre 05 e 20 dias de idade. Letras diferentes para a mesma idade denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais. Espermatogônias do tipo A indiferenciadas (A_{ind}), diferenciadas (A_{1-4}), intermediárias (In), do tipo B (B) e espermatócitos primários em pré-leptóteno (Pl).

Número de células germinativas

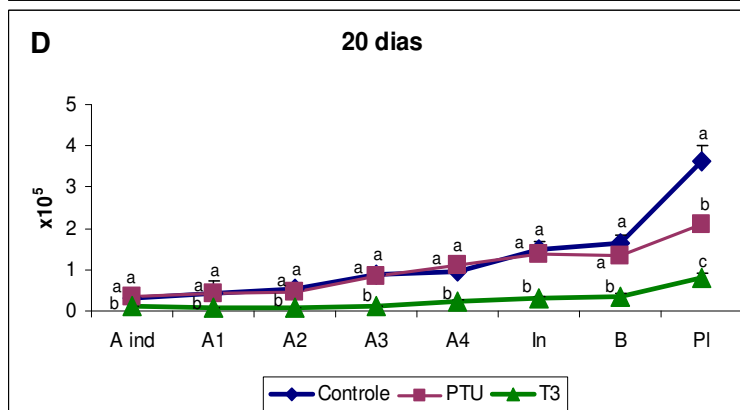
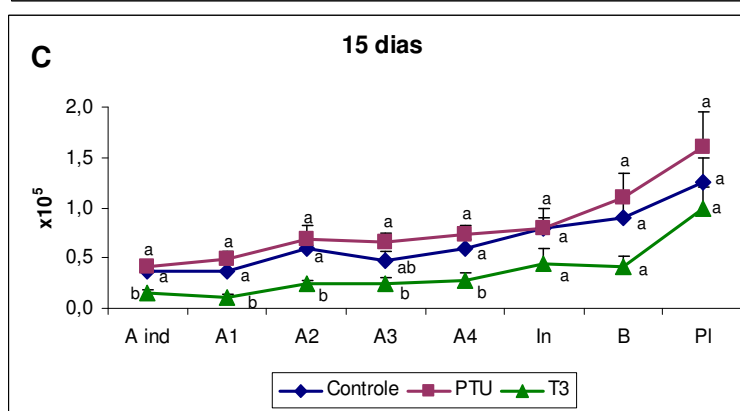
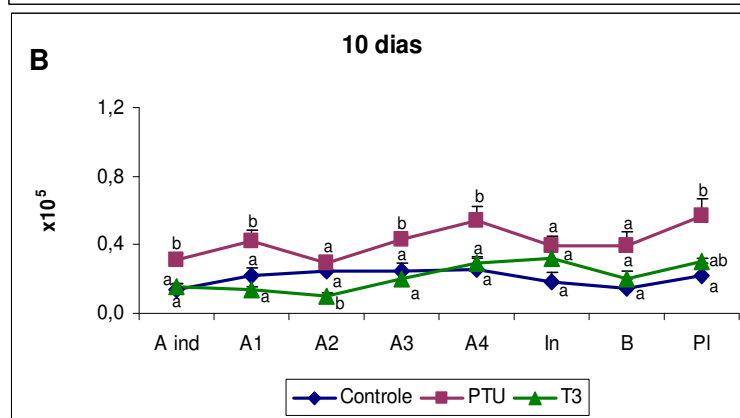
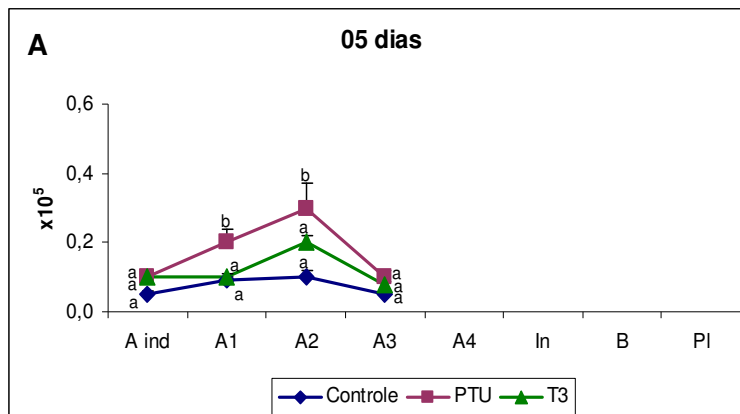
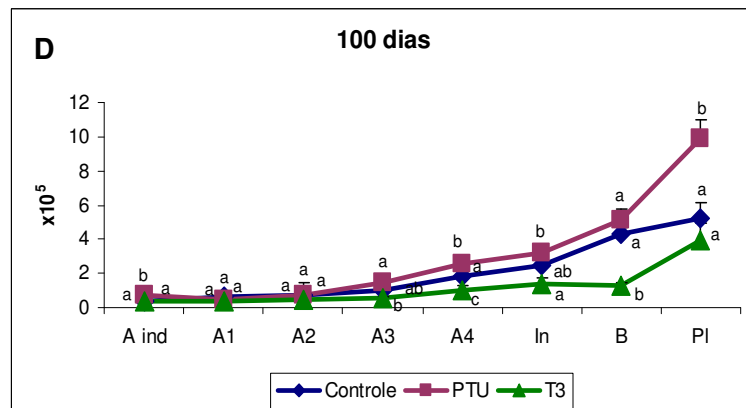
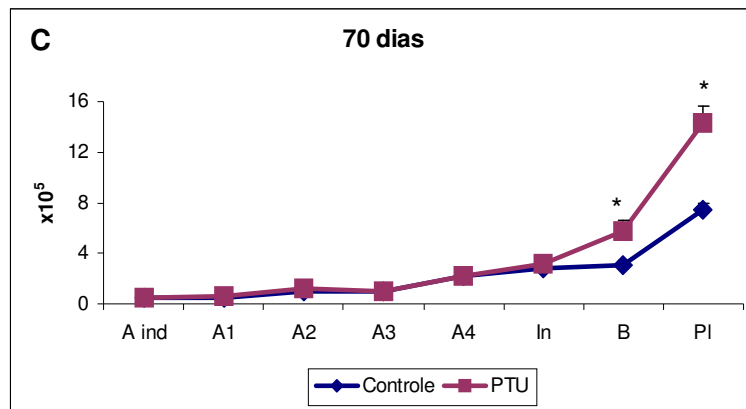
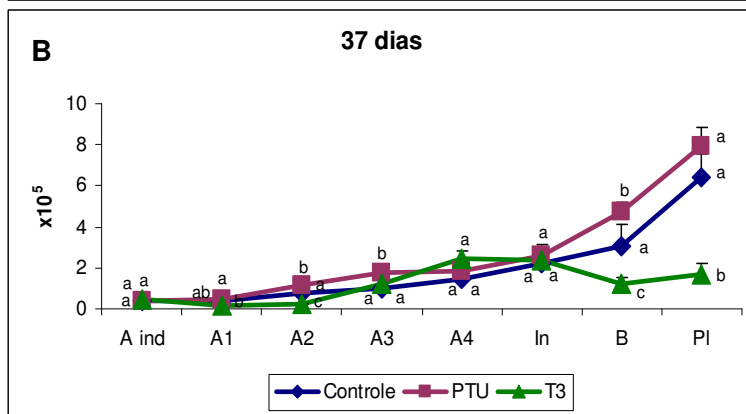
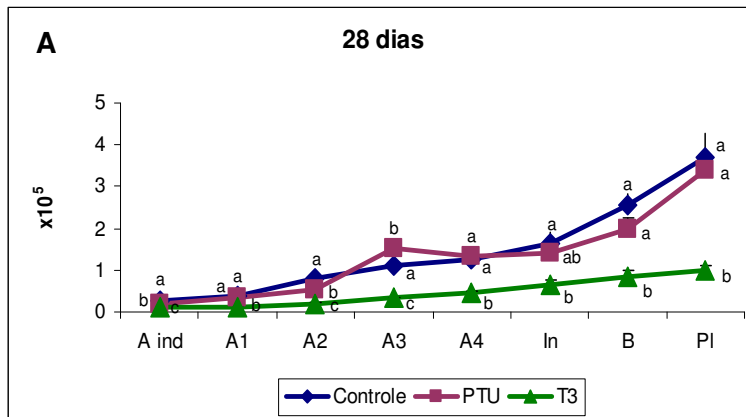


Figura 16 – Evolução do número de células germinativas de camundongos controles e tratados com PTU e T3 e sacrificados entre 28 e 100 dias de idade. Letras diferentes para a mesma idade denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais. Espermatogônias do tipo A indiferenciadas (A_{ind}), diferenciada (A_{1-4}), intermediárias (In), do tipo B (B) e espermatócitos primários em pré-leptóteno (Pl).

Número de células germinativas



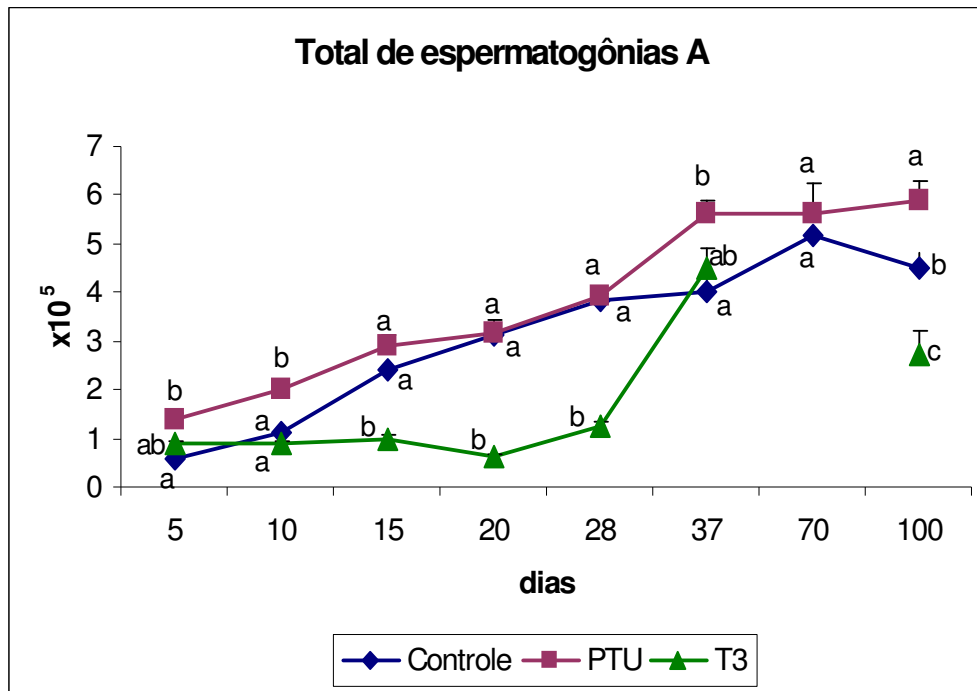


Figura 17 – Evolução do número total de espermatogônias A de camundongos controles e tratados com PTU e T3 e sacrificados entre 05 e 100 dias de idade. Letras diferentes para a mesma idade denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERCROMBIE M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat Rec* 1946; 94(2):238-248.

ALLAN CM, GARCIA A, SPALIVIERO J, ZHANG FP, JIMENEZ M, HUHTANIEMI I, HANDELSMAN DJ. Complete Sertoli cell proliferation induced by follicle-stimulating hormone (FSH) independently of luteinizing hormone activity: evidence from genetic models of isolated FSH action. *Endocrinol* 2004; 145(4):1587-1593.

ALMEIDA FF, LEAL MC, FRANÇA LR. Testis morphometry, duration of spermatogenesis and spermatogenic efficiency in the Wild Boar (*Sus crofa scrofa*). *Biol Reprod* 2006; 75(5): 792-799.

AMANN RP & ALMQUIST JO. Reproductive capacity of dairy bulls. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *J Dairy Sci* 1962; 45:774-781.

ANTONY FF, ARULDHAS MM, UDHAYAKUMAR RC, MARAN RR, GOVINDARAJULU P. Inhibition of Leydig cell activity *in vivo* and *in vitro* in hypothyroid rats. *J Endocrinol* 1995;144(2):293-300.

ARAMBEPOLA NK, BUNICK D, COOKE PS. Thyroid hormone effects on androgen receptor messenger RNA expression in rat Sertoli and peritubular cells. *J Endocrinol* 1998; 156(1):43-50.

ATTAL J & COUROT M. Developement testiculaire et etablissement de la spermatogenese chez le taureau. *Ann. Biol. Anim Bioch Biophys* 1963; 8(3):219-241.

AVELAR GF, LEAL MC, FRANÇA LR. Avaliação morfofuncional do testículo, duração do ciclo do epitélio seminífero e produção espermática diária em três diferentes linhagens de camundongos. 2003. In: *Anais do 2º Congresso de Integração em Biologia da Reprodução*, Ribeirão Preto.

AVELAR GF, LEAL MC, FRANÇA LR. Morfofuncional evaluation of the testis seminiferum epithelium cycle length and daily sperm production in three different mice strain. 2007 (in preparation).

AZMI TI, BONGSO TA, HARISAH M, BASRUR PK. The Sertoli cell of the water buffalo-na electron microscopic study. *Can J Vet Res* 1990; 54:93-98.

BELLVÉ AR, CAVICCHIA JC, MILLETTE CF, O'BRIEN DA, BHATNAGA YM, DYM M. Spermatogenic cells of the prepubertal mouse. *J Cell Biol* 1977; 74:68-85.

BENDEL-STENZEL M, ANDERSON R, HEASMAN J, WYLIE C. The origin and migration of primordial cells in the mouse. *Sem Cell & Develop Biol* 1998; 9:393-400.

BERNDTSON WE. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J Ani Sci* 1977; 44:818-833.

BERRY LW, WESTLUND B, SCHEDL T. Germ-line tumor formation caused by activation of glp-1, a *Caenorhabditis elegans* member of the Notch family of receptors. *Develop* 1997; 124:925-936.

BJERKNES M & CHENG H. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroent* 1999; 116:7-14.

BOUSSOUAR F & BENAHMED M. Lactate and energy metabolism in male germ cells. *Tren Endocrinol. Metab* 2004; 15:345-350.

BRINSTER, RL. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science* 2002; 296: 2174-2176.

BRINSTER RL & AVARBOCK MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:11303-11307.

BRINSTER RL & ZIMMERMANN JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:1298-11330.

BUAAS FW, KIRSH AL, SHARMA M, MACLEAN DJ, MORRIS JL, GRISWOLD MD, DE ROOIJ DG, BRAUN RE. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet* 2004; 36:647-652.

BUNICK D, KIRBY J, HESS RA, COOKE PS. Developmental expression of testis messenger ribonucleic acids in the rat following propylthiouracil-induced neonatal hypothyroidism. *Biol Reprod* 1994; 51(4):706-713.

BUZZARD JJ, MORRISON JR, O'BRYAN MK, SONG Q, WREFORD NG. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biol Reprod* 2000; 62(3):664-669.

CAPEL, B. The battle of the sexes. *Mech Dev* 2000; 92(1):89-103.

CARDOSO ER. *Cinética espermatogonial, duração da espermatogênese e eficiência das células de Sertoli em zebrafish (Danio rerio) adulto*. 2007. 82p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular)- Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Belo Horizonte, Brasil.

CELEBI C, AUVRA Y, BENVENU T, PLUSQUELLEC D, JÉGOU B, GUILLAUMEUX, T. Transient transmission of a transgene in mouse offspring following *in vivo* transfection of male germ cells. *Mol Reprod Dev* 2002; 62:477-482.

CHEN C, OUYANG W, GRIGURA V, ZHOU Q, CARNES K, LIM H, ZHAO GQ, ARBER S, KURPIOS N, MURPHY TL, CHENG AM, HASSELL JA, CHANDRASHEKAR V, HOFMANN MC, HESS RA, MURPHY KM. ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature* 2005; 436:1030-1034.

CHIARINI-GARCIA H, FREITAS DA, BARBOSA IS, FRANCA LR. Characterizing of spermatogonial types in donkeys and determination of their kinetics and topographic position in niches. 2006 (in preparation).

- CHIARINI-GARCIA H, HORNICK JR, GRSWOLD MD, RUSSELL LD. The distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random. *Biol Reprod* 2001; 65:1179-1185.
- CHIARINI-GARCIA H, RAYMER AM, RUSSELL LD. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence for niches in the seminiferous tubules. *Reprod* 2003; 126:669-680.
- CHIARINI-GARCIA H & RUSSELL LD. Characterization of mouse spermatogonia by transmission electron microscopy. *Reprod* 2002; 123: 567-577.
- CHIARINI-GARCIA H & RUSSELL LD. High resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biol Reprod* 2001; 65:1170-1178.
- CLERMONT Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 1972; 52(1):198-236.
- CLOUTHIER DE, AVARBOCK MR, MAIKA SD, HAMMER RE, BRINSTER RL. Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature* 1996; 381:418-421.
- COOKE PS. Thyroid hormones and testis development: a model system for increasing testis growth and sperm production. *Ann NY Acad Sci* 1991; 122-132.
- COOKE PS. Thyroid hormone and the regulation of testicular development. *Anim Reprod Sci* 1996; 42(1-4):333-341.
- COOKE PS, HESS RA, KIRBY JD. A model system for increasing testis size and sperm production : potential application to animal science. *J Anim Sci* 1994; 72:43-54.
- COOKE PS, HESS RA, KIRBY JD, BUNICK D, HARDY MP. Neonatal propylthiouracil treatment as model system for studying factors controlling testis growth and sperm production. 1994. In: Andrzej Bartke. *Function of somatic cells in the testis*. Norwell: Springer-Verlag, 400-407.
- COOKE PS, HESS RA, PORCELLI J, MEISAMI E. Increased sperm production in the adult rats after transient neonatal hypothyroidism. *Endocrinol* 1991;129(1):244-248.
- COOKE PS, HOLSBERGER DR, FRANÇA LR. Thyroid hormone regulation of Sertoli Cell Development. In: Skinner MK, Griswold MD (eds) *The Sertoli cell biology*, 2005. Elsevier Science (USA):217-226.
- COOKE PS, KIRBY JD, PORCELLI J. Increased testis growth and sperm production in adult rats following transient neonatal goitrogen treatment: optimization of the propylthiouracil dose and effects of methimazole. *J Reprod Fertil* 1993; 97(2):493-499.
- COOKE PS & MEISAMI E. Early hypothyroidism in rats causes increased adult testis and reproductive organ size but does not change testosterone levels. *Endocrinol* 1991; 129: p237-243.

COOKE PS, PORCELLI J, HESS RA. Induction of increased testis growth and sperm production in adult rats by neonatal administration of the goitrogen propylthiouracil (PTU): the critical period. *Biol Reprod* 1992; 46(1):146-154.

COOKE PS, ZHAO YD, BUNICK D. Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. *Biol Reprod* 1994;51: 1000-1005.

COSTANZO LS. Fisiologia. *Fisiologia Endócrina*, 2004. Elsevier Science, Rio de Janeiro (Brasil):359-421.

COSTOYA JA, HOBBS RM, BARNA M, CATTORETTI G, MANOVA M, SUKHWANI M, ORWING KE, WOLGEMUTH D, PANDOLFI PP. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Gene* 2004; 36:653-659.

COULOMBE P, SCHWARTZ HL, OPPENHEIMER JH. Relationship between the accumulation of pituitary growth hormone and nuclear occupancy by triiodothyronine in the rat. *J Clin Invest* 1978; 62:1020-1028.

COUROT M, HOCHEREAU-DE REVIERS MT, ORTAVANT R. Spermatogenesis. In: JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R.; VANDEMARK, N.L. (Eds.) *The testis*. New York, CL: Academic Press,1970; 1:339-432.

DE GENDT K, ATANASSOVA N, TAN KA, FRANÇA LR, PARREIRA GG, McKINNELL C, SHARPE RM, SAUNDERS PT, MASON JI, HARTUNG S, IVELL R, DENOLET E, VERHOEVEN G. Development and function of the adult generation of Leydig cells in mice with Sertoli cell-selective or total ablation of the androgen receptor. *Endocrinol* 2005;146(9):4117-4126.

DE ROOIJ DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reprod* 2001; 121:347-354.

DE ROOIJ DG. Stem cells in the testis. *Int. J. Path* 1998, 79:67-80.

DE ROOIJ DG & GROOTEGOED JA. Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10(6):694-701.

DE ROOIJ DG & RUSSELL LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 2000; 21(6):776-798.

DE ROOIJ DG & VAN DISSEL-EMILIANI FMF. Regulation of proliferation and differentiation of stem cells in the male germ line. *Stem Cells* 1997, 283-312.

DE ROOIJ DG & VAN PELT AMM. Spermatogonial stem cell biology. *Annu Rev Biomed Sci* 2003; 5:105-114.

DIRAMI G, RAVINDRANATH N, ACHI MV, DYM M. Expression of Notch pathway components in spermatogonia and Sertoli cells of neonatal mice. *J Androl* 2001; 22:944-952.

DOBRINSKI I. Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic animals. *Anim Reprod Sci* 2005; 89:137-145.

DOBRINSKI I. Transplantation. In: Skinner MK, Griswold MD (eds) *The Sertoli cell biology*, 2005. Elsevier Science (USA):471-485.

DOLCI S, PELLEGRINI M, DI AGOSTINO S, GEREMIA R, ROSSI P. Signaling through extracellular signal-regulated kinase is required for spermatogonial proliferative response to stem cell factor. *J Biol Chem* 2001; 276:40225-40233.

DÖHLER KD & WUTTKE W. Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. *Endocrinol* 1974, 94:1003-1008.

DONOVAN PJ, STOTT D, CAIRNS LA, HEASMAN J, WYLIE CC. Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell* 1986; 44:831-838.

DORST VJ, SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchungen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. *Monaths Vet Med* 1974; 29:650-652.

DYM M. Spermatogonial stem cells of the testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:11287-11289.

DYM M & FAWCETT DW. The blood-testis barrier in the rat and physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 1970; 3:308-326.

DYM M & FENG L. The role of the Sertoli cell in spermatogonial stem cell fate. In: Skinner MK, Griswold MD (eds). *The Sertoli cell biology*, 2005. Elsevier Science (USA):303-342.

FAWCETT DW, NEAVES WB, FLORES MN. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod* 1973; 9(5):500-532.

FRANÇA LR. *Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau*. 1991.185p.Tese (Doutorado em Ciências)- Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Belo Horizonte, Brasil.

FRANÇA LR. Daily sperm production in Piau boars estimated from Sertoli cell population and Sertoli cell index. In: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 12, Netherlands. *Proceed* 1992; 1716-1718.

FRANÇA LR, AVELAR GF, ALMEIDA FFL. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriog* 2005; 63:300-318.

FRANÇA L & CHIARI-GARCIA H. Célula de Sertoli. *Células- Uma abordagem multidisciplinar*, 2005. Manole, Barueri (Brasil):302-324.

FRANÇA LR & GODINHO CL. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod* 2003; 68(5):1554-1561.

FRANÇA LR, HESS RA, COOKE PS, RUSSELL LD. Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. *Anat Rec* 1995; 242(1):57-69.

FRANÇA LR, OGAWA T, AVARBOCK MR, BRINSTER RL, RUSSELL LD. Germ cell genotype control cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol Reprod* 1998; 59:1371-1377.

FRANÇA LR & RUSSELL LD. Spermatogonial transplantation in mammals. *ARBS Ann Rev Biomed Sci* 2000;2:61-76.

FRANÇA LR & RUSSELL LD. The testis of domestic animals. In: Martinez F, Regadera J (eds). *Male Reproduction: a multidisciplinary overview*, 1998. Madrid: Churchill Livingstone: 197-219.

FRANÇA LR, SILVA JR. VA, CHIARINI-GARCIA H, GARCIA SK, DEBELJUK L. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biol Reprod* 2000;63:1629-1636.

GREENSPAN FS. The thyroid gland. In: Greenspan FS, Baxter JD. (eds) *Basic & clinical endocrinology*, 1994. Norwalk: Appleton & Lange:160-226.

GRISWOLD MD, MCLEAN D, RUSSELL LD. Promise and limitations of germ cell transplantation in the testis. *J Androl* 2001; 22:713-717.

GUILLAUDEUX T, CELEBI C, AUVRA YP, JÉGOU B. Genetic manipulation and transplantation of male germ cells. In: Jégou B, Pineau C, Saez J, (eds) *Testis, epididymis and technologies in the year*, 2000. Springer, Berlin:59-68.

HADLEY MA, BYERS SW, SUAREZ-QUIAN CA, KLEINMAN HK, DYM M. Extracellular matrix regulates Sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development *in vitro*. *J Cell Biol* 1985;101:1511-1522.

HAMRA FK, CHAPMAN KM, NGUYEN D, GARBERS DL. Identification of neuregulin as a factor required for formation of aligned spermatogonia. *J Biol Chem* 2007; 282:721-730.

HARDY MP, KIRBY JD, HESS RA, COOKE PS. Leydig cells increase their numbers but decline in steroidogenic function in the adult rat after neonatal hypothyroidism. *Endocrinol* 1993;132(6):2417-2420.

HARDY MP, SHARMA RS, ARAMBEPOLA NK, SOTTAS CM, RUSSELL LD, BUNICK D, HESS RA. Increased proliferation of Leydig cells induced by neonatal hypothyroidism in the rat. *J Androl* 1996; 17(3):231-238.

HASTHORPE S, BARBIC S, FARMER PJ, HUTSON JM. Neonatal mouse gonocyte proliferation assayed by an *in vitro* clonogenic method. *J Reprod Fertil* 1999; 116(2):335-344.

HAUSLER CL & RUSSELL LD. Prospects for spermatogonial transplantation in livestock and endangered species. In: Gagnon C (ed) *The male gamete: from basic science to clinical applications*, 1999. Cache River Press, Vienna:37-45.

HAYASHI T, KAGEYAMA Y, ISHIZAKA XG, KIHARA KK, OSHIMA H. Requirement of Notch 1 and its ligand jagged 2 expressions for spermatogenesis in rat and human testes. *J Androl* 2001;22:999-1011.

HE Z, JIANG J, HOFMANN MC, DYM M. GFRA1 silencing in mouse spermatogonial stem cells results in their differentiation via the inactivation of Ret tyrosine kinase. *Biol Reprod* 2007; 107062513.

HESS RA, COOKE PS, BUNICK D, KIRBY JD. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. *Endocrinol* 1993; 132:2607-2613.

HESS HA, COOKE PS, HOFMANN MC, MURPHY KM. Mechanistic insights into the regulation of spermatogonial stem cell niche. *Cell Cycle* 2006; 5:1164-1170.

HESS RA & FRANÇA LR. Spermatogenesis and cycle of the Seminiferous epithelium. In: Cheng CY (ed) *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, 2007. Landes Biosciencie:1-15.

HESS RA & FRANÇA LR. Structure of the Sertoli cell. In: Skinner MK, Griswold MD (eds). *The Sertoli cell biology*, 2005. Elsevier Science (USA):19-39.

HOFMANN MC & DYM, M. Long-Term cultures of mammalian spermatogonia. In: Skinner MK, Griswold MD (eds). *The Sertoli cell biology*, 2005. Elsevier Science(USA):449-469.

HOLSBERGER DR, BUCHOLD GM, LEAL MC, KIESEWETTER SE, O'BRIEN DA, HESS RA, FRANÇA LR, KIYOKAWA H, COOKE, P. S. Cell-cycle inhibitors p27^{Kip1} e p21^{Cip1} regulate murine Sertoli cell proliferation. *Biol. Reprod* 2005b; 72:1429-1436.

HOLSBERGER DR & COOKE PS. Understanding the role of thyroid hormones in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell Tissue Res* 2005c; 322:133-140.

HOLSBERGER DR, JIRAWATNOTAI S, KIYOKAWA H, COOKE PS. Thyroid hormone regulates the cell cycle inhibitor p27^{Kip1} in postnatal murine Sertoli cells. *Endocrinol* 2003; 144(9):3732-3738.

HOLSBERGER DR, KIESEWETTER SE, COOKE PS. Regulation of neonatal Sertoli cell development by thyroid hormone receptor $\alpha 1$. *Biol Reprod* 2005a; 73:396-403.

IZADYAR F, CREEMER LB, VAN DISSEL-EMIIANI FMF, VAN PELT A.M.M, DE ROOIJ DG. Spermatogonial stem cell transplantation. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169:21-26.

JANNINI EA, OLIVIERI M, FRANCAVILLA S, GULINO A, ZIPARO E, D'ARMIENTO M. Ontogenesis of the nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptor in the rat testis. *Endocrinology* 1990; 132:2521-2526.

JANNINI EA, ULISSE S, D'ARMIENTO, M. Thyroid hormone and male gonadal function. *Endocr Rev* 1995; 16(4):443- 459.

JANSEN HT, KIRBY JJ, COOKE PS, ARAMBEPOLA N, IWAMOTO G. A. Impact of neonatal hypothyroidism on reproduction in the male hamster, *Mesocricetus auratus*. *Physiol & Behav* 2007; 90:771-781.

JOYCE KL, PORCELLI J, COOKE PS. Neonatal goitrogen treatment increases adult testis size and sperm production in the mouse. *J Androl* 1993;14(6):448-455.

KANATSU-SHINOHARA M, TOYOKUNI S, SHINOHARA T. Genetic selection of mouse male germline stem cell *in vitro*: offspring from single stem cells. *Biol Reprod* 2005; 72: 236-240.

KARL J, CAPEL B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev Biol* 1998; 202(2):323-333.

KHAIRA H, MCLEAN D, OHL DA, SMITH GD. Spermatogonial stem cell isolation, storage, and transplantation. *J Androl* 2005; 26(4):442-450.

KIRBY JD, JETTON AE, COOKE PS, HESS RA, BUNICK D, ACKLAND J, TUREK F, SCHWARTZ NB. Developmental hormonal profiles accompanying the neonatal hypothyroidism-induced increase in adult testicular size and sperm production in the rat. *Endocrinol* 1992;131:559-565.

KIRBY JD, MANKAR MV, HARDESTY D, KREIDER DL. Effects of transient prepubertal 6- n-propyl-2-thiouracil treatment on testis development and function in the domestic fowl. *Biol Reprod* 1996;55:910-916.

LACERDA SMSN, BATLOUNI SR, SILVA SBG, HOMEN CSP, FRANÇA LR. Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model. *Ani Reprod* 2006;3(2):146-159.

LASLETT AL, LI LH, JESTER JR WF, ORTH JM. Thyroid hormone down- regulates neural cell adhesion molecule expression and affects attachment of gonocytes in Sertoli cell-gonocyte cocultures. *Endocrinol* 2000; 141(5):1633-1641.

LEAL MC, BECKER-SILVA SC, CHIARINI-GARCIA H, FRANÇA LR. Sertoli cell efficiency and daily sperm production in goats (*Capra hircus*). *Anim Reprod* 2004; 1(1):122-128.

LEAL MC & FRANÇA LR. The seminiferous epithelium cycle in the black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) is similar to humans. *Biol Reprod* 2006; 74 (4):616-624.

LEBLOND CP & CLERMONT Y. Definition of stages of the cycle of seminiferous epithelium in the rat. *Annls NY Acad Sci* 1952;55:548-573.

LI L & XIE T. Stem cell niche: structure and function. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2005; 21:605-631.

LOVELAND K, SCHLATT S, SASAKI T, CHU M-L, TIMPL R, DZIADEK M. Developmental changes in the basement membrane of the normal and hypothyroid postnatal

- rat testis: segmental localization of fibulin-2 and fibronectin. *Biol Reprod* 1998; 58:1123-1130.
- MACCHIA PE, TAKEUCHI Y, KAWAI T, CUA K, GAUTHIER K, CHASSANDE O, SEO H, HAYASHI Y, SAMARUT J, MURATA Y, WEISS RE, REFETOFF S. Increased sensitivity to thyroid hormone in mice with complete deficiency of thyroid hormone receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98:349-354.
- MARAN RR, SIVAKUMAR R, ARUNAKARAN J, RAVISANKAR B, RAVICHANDRAN K, SIDHARTHAN V, JEYARAJ DA, ARULDHAS MM. Duration-dependent effect of transient neonatal hypothyroidism on Sertoli and germ cell number, and plasma and testicular interstitial fluid androgen binding protein concentration. *Endocr Res* 1999; 25: 323-340.
- MARTINEAU J, NORDQVIST K, TILMANN C, BADGE-LOVELL R, CAPEL B. Male-specific cell migration into the developing gonad. *Cur Biol* 1997; 7:958-968.
- MASSAGUE J & CHEN YG. Controlling TGF- beta signaling. *Genes Dev* 2000; 14:627-644.
- MATTA SL, VILELA DA, GODINHO HP, FRANCA LR. The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Endocrinol* 2002; 143(3):970-978.
- MCGUINNESS MP & ORTH JM. Reinitiation of gonocyte mitosis and movement of gonocytes to the basement membrane in the testes of newborn rats *in vivo e in vitro*. *Anat Rec* 1992; 233(4):527- 537.
- MCLEAN D. Spermatogonial stem cell transplantation and testicular function. *Cell Tissue Res* 2005;.322(1):21-31.
- MCLEAN D, JOHNSTON DS, RUSSELL LD, GRISWOLD MD. Germ cell transplantation and the study of testicular function. *Trends Endocrinol Met* 2001;12:16-21.
- MCLEAN D, RUSSELL LD, GRISWOLD MD. Biological activity and enrichment of spermatogonial stem cells in vitamin A-deficient and hyperthermia-exposed testes from mice based on colonization following germ cell transplantation. *Biol Reprod* 2002; 66:1374-1379.
- MEACHEM S, VON SCHÖNFELDT V, SCHLATT S. Spermatogonia: stem cell with a great perspective. *Reprod* 2001; 121:825-834.
- MEISAMI E, NAJAFI A, TIMIRAS PS. Enhancement of seminiferous tubular growth and spermatogenesis in testes of rats recovering from early hypothyroidism: a quantitative study. *Cell Tissue Res* 1994; 275:503-511.
- MENDIS-HANDAGAMA SM & ARIYARATNE HB. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod* 2001; 65:660-671.
- MENDIS-HANDAGAMA SM & ARIYARATNE HB. Prolonged and transient neonatal hypothyroidism on Leydig cell differentiation in the postnatal rat testis. *Arch Androl* 2004; 50 (5):347-57.

MENDIS-HANDAGAMA SM, ARIYARATNE HB, TEUNISSEN VAN MANEN KR, HAUPT RL. Differentiation of adult Leydig cells in the neonatal rat testis is arrested by hypothyroidism. *Biol Reprod* 1998;59(2):351-357.

MENG X, LINDAHL M, HYVONEN ME, PARVINEN M, DE ROOIJ DG, HESS W, RAATIKAINEN-AHOKAS A, SAINIO K, RAUVALA H, LAKSO M, PICHEL JG, WESTPHAL H, SAARMA M, SARIOLA H. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 2000; 287:1489-1493.

MILLER SJ, LAVKER RM, SUN TT. Keratinocyte stem cell of cornea, skin and hair follicles. In: POTTEN CS (ed). *Stem cells*, 1997. Academic Press, Londres:331-362.

MIRANDA JF. *Efeitos do tratamento neonatal com 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) e FSH na proliferação das células de Sertoli e função testicular em ratos Wistar adultos*. 2002. 47p. Dissertação (Mestrado em Ciência)- Escola de Veterinária, UFMG. Belo Horizonte, Brasil.

MIRANDA JR. *Regulação da proliferação pós-natal das células de Sertoli em ratos*. 2006.125p. Tese (Doutorado em Ciências)- Escola de Veterinária, UFMG. Belo Horizonte, Brasil.

MOORE KA & LEMISKA, IR. Stem cells and their niches. *Science* 2006; 311:1880-1882.

MU XM & LIU YX. Localization and expression of TR3 orphan receptor in mouse testis. *Sheng Li Xue Bao* 1998; 50(4):439-443, abstract.

NAGANO M, BRINSTER CJ, ORWIG KE, RYU BY, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:13090-13095.

NAKAGAWA T, NABESHIMA Y, YOSHIDA S. Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Develop Cell* 2007; 12:195-206.

NASCIMENTO, H.F. *Morfologia, cinética e distribuição topográfica dos diferentes tipos de espermatogônias de golden hamsters submetidos a fotoperíodo curto e longo*. 2004. 120p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular)- Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Belo Horizonte, Brasil.

NEVES, ES. *Estudo comparativo da estrutura do testículo e do processo espermatogênico em jumentos (Equus asinus) e burros (Equus mulus mulus)*. 2001.135p. Tese (Doutorado em Biologia Celular)- Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Belo Horizonte, Brasil.

NEVES ES, CHIARINI-GARCIA H, FRANÇA LR. Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. *Biol Reprod* 2002; 67(1):247-255.

OGAWA T, ARÉCHAGA JM, AVARBOCK MR, BRINSTER R. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol* 1997; 41:111-122.

OGAWA T, OHMURA M, OHBO K. The niche for spermatogonial stem cells in the mammalian testis. *Int J Hem* 2005; 381-388.

- OHTA H, YOMOGIDA K, DOHMAE K, NISHIMUNE Y. Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: The role of c-kit and its ligand SCF. *Develop* 2000;127:2125-2131.
- OJEDA SR & RAMIREZ VD. Plasma levels of LH and FSH in maturing rats: response to hemigonadectomy. *Endocrinol* 1972; 90:466-72.
- ORTAVANT R, COUROT M, HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T. Spermatogenesis in domestic mammals. In: Cole HH, Cupps PT(ed.) *Reproduction in domestic mammals*, 1977. Academic Press, New York (USA):203-227.
- ORTH JM. Cell biology of testicular development in fetus and neonate. In: Desjardins C, Ewing LL (eds). *Cell and molecular biology of the testis*, 1993. Oxford University Press, New York:3-42.
- ORTH JM. Proliferation of sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec* 1982; 203(4):485-492.
- ORWIG KE, RYU BY, AVARBOCK MR, BRINSTER R. Male germ-line stem cell potential is predicted by morphology of cells in neonatal testes. *PNAS* 2002; 99:11706-11711.
- PALMERO S, DE MARCHIS M, GALLO G, FUGASSA E. Thyroid hormone affects the development of Sertoli cell function in the rat. *J Endocrinol* 1989; 123:105-111.
- PALMERO S, PRATI M., DE MARCO P, TRUCCHI P, FUGASSA E. Developmental regulation of Sertoli cell metabolism by thyroid hormones.1992.In: *European Workshop on Molecular & Cellular Endocrinology of the Testis*. Castle Elmau, Germany, n 5, abstract.
- PARREIRA GG, OGAWA T, AVARBOCK MR, FRANÇA LR, BRINSTER RL, RUSSELL LD. Development of germ cell transplants in mice. *Biol Reprod* 1998; 59:1360-1370.
- PARREIRA GG, OGAWA T, AVARBOCK MR, FRANÇA LR, HAUSLER C, BRINSTER RL, RUSSELL LD. Development of germ cell transplantation: morphometric and ultrastructural studies. *Tiss Cell* 1999; 31:242-254.
- PELLEGRINI M, GRIMALDI P, ROSSI P, GEREMIA R, DOLCI S. Developmental expression of BMP4/ ALK3/ SMAD5 signaling pathway in the mouse testis: A potential role of BMP4 in spermatogonia differentiation. *J Cell Sci* 2003; 116:3363-3372.
- RAO JN, LIANG JY, CHAKRABORTI P, FENG P. Effect of thyroid hormone on the development and gene expression of hormone receptors in rat testes *in vivo*. *J Endocrinol Invest* 2003; 26: 435-443.
- RAVEROT G, WEISS J, PARK SY, HURLEY L, JAMESON L. Sox3 expression in undifferentiated spermatogonia is required for the progression of spermatogenesis. *Develop Biol* 2005; 283:215-225.
- RISBRIDGER GP & TAYLOR RA. Physiology of the male accessory sex structures: the prostate gland, seminal vesicles, and bulbourethral glands. In: Neill JD (ed) Knobil and Neill's. *Physiology of Reproduction*, 2006. Elsevier, St. Louis, USA :1149-1172.

ROBAIRE B, HINTON BT, ORGEBIN-CRIST, MC. The epididymis. In: Neill JD (ed) Knobil and Neill's. *Physiology of Reproduction*, 2006. Elsevier, St. Louis, USA:1071-1148.

ROOSEN-RUNGE EC & GIESEL Jr LO. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *Am J Anat* 1950; 87:1-30.

ROSS AJ & CAPEL B. Signaling at the crossroads of gonad development. *Tren Endocrinol Metab* 2005;16:19-25.

RUSSELL LD, ALGER L, NEQUIN LG. Hormonal control of pubertal spermatogenesis. *Endocrinol* 1987; 120:1615-1632.

RUSSELL LD, BARTKE A, GOH JC. Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular limen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *Ame J Anat* 1989;184:179-189.

RUSSELL LD, ETTLIN RA, SINHA HAP.; CLEGG, ED. *Histological and histopatological evaluation of the testis*, 1990. Cache River Press, Clearwater (USA):286p.

SALVATORE U, RUCCI N, PIERSANTI D, CAROSA E, GRAZIANO FM, PAVAN A, CEDDIA P, ARIZZI M, MUZI P, CIRONI L, GNESSI L, D'ARMIENTO M, JANNINI EA. Regulation by thyroid hormone of the expression of basement membrane components in the rat prepubertal Sertoli cells. *Endocrinol* 1998; 139(2):741-747.

SAXENA DK, YOSHINAGA IT, TOSHIMORI K. Are germ cell factors essential in the testicular enlargement after neonatal hypothyroidism recovery? A study using W/ W^v mutant mice model. *Internat J Androl* 2002; 25:11-18.

SCHOFIELD, R. The relationship between the spleen colony- forming cell and the hamatopoietic stem cell. A hypothesis. *Blood Cells* 1978; 4:7-25.

SCHULZ RW, MENTING S, BOGERD J, FRANÇA LR, VILELA DA, GODINHO HP. Sertoli cell proliferation in the adult testis - evidence from two fish species belonging to different orders. *Biol Reprod* 2005; 73(5):891-898.

SETTE C, SUSANNA D, GEREMIA R, ROSSI P. The role of stem cell factor and of alternative c-kit gene products in the establishment, maintenance and function of germ cells. *Int J Dev Biol* 2000; 44:599-608.

SHARPE, RM. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E. & Neil, J. D. (eds). *The physiology of reproduction*, 1994. Raven Press, New York:1363-1434.

SHARPE, RM. Sertoli cell endocrinology and signal transduction: androgen regulation. In: Skinner MK, Griswold MD (eds). *The Sertoli cell biology*, 2005. Elsevier Science (USA):199-216..

SHARPE RM, MCKINNELL C, KIVLIN C, FISHER JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reprod* 2003; 125:769-784.

SHINOHARA T, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. β 1 and α 6 integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:5504-5509.

SHINOHARA T, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Functional analysis of spermatogonial stem cells in steel and cryptorchid infertile mouse models. *Dev Biol* 2000; 220:401-411.

SHOSEI Y, SUKENO M, NAKAGAWA T, OHBO K, NAGAMATSU G, SUDA T, NABESHIMA Y. The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Develop* 2006;133:1495-1505.

SILVA JR VA. *Efeitos da indução do hipotireoidismo e hipertireoidismo pós-natal na proliferação das células de Sertoli e na função testicular em suínos*. 2000. 191p. Tese (Doutorado em Biologia Celular)-Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Belo Horizonte, Brasil.

SIMORANGKIR DR, KRETSER DM, WREFORD NGM. Increased numbers of Sertoli and germ cells in adult rat testes induced by synergistic action of transient neonatal hypothyroidism and neonatal hemicastration. *J Reprod Fert* 1995;104:207-213.

SIMORANGKIR DR, WREFORD NG, KRETSER DM. Impaired germ cell development in the testes of immature rats with neonatal hypothyroidism. *J Androl* 1997; 18(2):186-193.

SINGH J & HANDELSMAN DJ. Neonatal administration of FSH increases Sertoli cell numbers and spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *J Endocrinol* 1996;151 (1):37-48.

SOLOMON J & GREEP RO. The effect of alterations in thyroid function on the pituitary growth hormone content and acidophil cytology. *Endocrinol* 1959; 65:158-164.

SPANGRUDE GS, HEIMFELD S, WEISSMAN, IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988; 241:58-62.

SPRADLING A, DRUMMOND- BARBOSA D, KAI T. Stem cells find their niche. *Nature* 2001; 414:98-104.

STEINBERGER A & STEINBERGER E. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis *in vivo* and organ culture. *Biol Reprod* 1971; 4(1):84-87.

SUZUKI H & CHENG SY. Compensatory role of thyroid hormone receptor (TR) α 1 in resistance to thyroid hormone: study in mice with a targeted mutation in the TR β gene and deficient in TR α 1. *Mol Endocrinol* 2003; 17:1647-1655.

TAGAMI T, NAKAMURA H, SASAKI S, MIYOSHI Y, IMURA H. Estimation of the protein content of thyroid hormone receptor α 1 e β 1 in rat tissues by Western blotting. *Endocrinol* 1993;132:275-279.

TEERDS KT, DE ROOIJ DG, DE JONG HF, VAN HAASTER LH. Development of the adult-type Leydig cell population in the rat is affected by neonatal thyroid hormone levels. *Biol Reprod* 1998;59:344-350.

TILMANN C, CAPEL B. Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57:1-18.

TOKUDA M, KADOKA Y, KURAHASHI H, MARUNOUCHI T. CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. *Biol Reprod* 2007; 76:130-141.

TUMMERS M & THESLEFF, I. Root or crown: A developmental choice orchestrated by the differential regulation of the epithelial stem cell niche in the tooth of two rodent species. *Develop* 2003; 130:1049-1057.

ULISSE S, RUCCI N, PIERSANTI D, CAROSA E, GRAZIANO FM, PAVAN A, CEDDIA P, ARIZZI M, MUZI P, CIRONI L, GNESSI L, D'ARMIENTO M, JANNINI EA. Regulation by thyroid hormone of the expression of basement membrane components in rat prepubertal Sertoli cells. *Endocrinol* 1998; 139(2):741-747.

VAN HAASTER LH, DE JONG FH, DOCTER R, DE ROOIJ DG. High neonatal triiodothyronine levels reduce the period of Sertoli cell proliferation and accelerate tubular lumen formation in the rat testis, and increase serum inhibin levels. *Endocrinol* 1993;133(2):755-760.

VAN HAASTER LH, DE JONG FH, DOCTER R, DE ROOIJ DG. The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. *Endocrinol* 1992; 131(3):1574-1576.

VAN HAASTER LH & DE ROOIJ DG. Spermatogenesis is accelerated in the immature Djungarian and Chinese hamster and rat. *Biol Reprod* 1993; 49(6):1229-1235.

VERGOUWEN RPA, JACOBS SGPM, HUISKAMP R, DAVIDS JAG, DE ROOIJ DG. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod Fert* 1991; 93:233-243.

VITALE R, FAWCETT DW, DYM M. The normal development of the blood testis barrier and the effects of clomiphene and estrogen treatment. *Anat Rec* 1973; 176:333-334.

WATT FM & HOGAN BL. Stem cells and their niches. *Science* 2000; 28(5457):1427-1430.

YOSHIDA S, SUKENO M, NABESHIMA YI. A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Scienceexpress* 2007; 1144885.

YOSHIDA S, TAKAKURA A, OBHO K, ABE K, WAKABAYASHI J, YAMAMOYO M, SUDA T, NABESHIMA Y. Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. *Develop Biol* 2004; 269:447-458.

YOSHINAGA K, NISHIKAWA S, OGAWA M, HAYASHI S, KUNISADA T, FUJIMOTO T, NISHIKAWA S. Role of c-kit in mouse spermatogenesis: Identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Develop* 1991; 113:689-699.

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](#)