

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

**Avaliação morfofuncional das espermatogônias de camundongos
mutantes $Utp14b^{jsd}$ sob condições normais de temperatura
testicular e após criptorquidismo experimental.**

Mestranda: Renata Cadete Zallio

Orientador: Hélio Chiarini-Garcia

Belo Horizonte
2009

RENATA CADETE ZALLIO

**Avaliação morfofuncional das espermatogônias de camundongos
mutantes $Utp14b^{jsd}$ sob condições normais de temperatura
testicular e após criptorquidismo experimental.**

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

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Hélio Chiarini-Garcia

Belo Horizonte
2009

Dedico esta etapa importante da minha vida ao meu Pai,
à minha Mãe e aos meus irmãos Lucas e Samuel,
por sempre terem me amado, apoiado,
incentivado e acreditado em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial:

Ao meu pai e à minha mãe por fazerem dos meus sonhos os seus e por tudo que fizeram e sempre fazem por mim. Amo vocês!

Aos meus irmãos Lucas e Samuel, que sempre me apoiaram e contribuíram para meu crescimento pessoal, sendo exemplos de luta, de coragem e de vida.

Às minhas queridas afilhadas, Fernandinha e Sofia, por alegrarem ainda mais a minha vida e torná-la mais especial!

A Gaby e Yanna pelo companheirismo de sempre e à fiel amizade.

Às minhas queridas avós, tias, tios, primas, primos, pela torcida e por estarem sempre por perto quando preciso de uma mão amiga.

A todos os meus amigos e amigas pelo companheirismo de todas as horas e de todos os momentos e por sempre me acompanharem em minhas novas empreitadas.

Ao professor e orientador Hélio-Chiarini, por ter aberto as portas do LABER para mim. Pela sua confiança, apoio e pela orientação brilhante desses anos.

A todos os outros integrantes do LABER, Fernanda, Gleydes, Amanda, Marildinha, Paula, Fabiana, Letícia, Michelle, Ana Luisa, Gisele, Débora, Chico (Geraldo), principalmente ao Felipe, Daniel e Carol pelas companhias em congressos e pelas ótimas risadas no fim de tarde na salinha e em especial à Aninha pela sincera amizade!

À Maria Luiza, técnica do LABER, pelo seu trabalho que foi de fundamental importância para o desenvolvimento do meu trabalho.

Aos demais professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e funcionários do Departamento de Morfologia.

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

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG

National Institute of Health - NIH

... É a vida, é bonita e é bonita!...
... Viver, e não ter a vergonha de ser feliz.
Cantar e cantar e cantar
a beleza de ser um eterno aprendiz.

Gonzaguinha

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Números de identificação e dados biométricos individuais dos camundongos Utp14b^{isd+/-} antes e depois do criptorquidismo experimental por 7 dias..... 16
- Tabela 2** - Números de identificação e dados biométricos individuais dos camundongos Utp14b^{isd+/-} antes e depois do criptorquidismo experimental por 7 dias..... 16
- Tabela 3** – Dados biométricos dos camundongos Utp14b^{isd+/-} e Utp14b^{isd+/-} antes e depois do criptorquidismo experimental por 7 dias..... 20

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Diagrama mostrando as associações celulares durante os XII estádios do ciclo do epitélio seminífero de camundongos (adaptado de Rooij, 1998)..... 7
- Figura 2** - Divisões mitóticas de cada um dos diferentes tipos de espermatogônias da fase proliferativa ou espermatogonial de camundongos..... 8
- Figura 3** - Detalhes morfológicos, sob MLAR, dos núcleos das diferentes gerações de espermatogônias de golden hamsters (adaptado de Nascimento et al., 2008)..... 9
- Figura 4** - Peso corporal dos camundongos heterozigotos $Utp14b^{j^{sd+/-}}$ e homozigotos $Utp14b^{j^{sd-/-}}$ antes e depois do criptorquidismo experimental por 7 dias..... 20
- Figura 5** - Peso testicular dos camundongos heterozigotos $Utp14b^{j^{sd+/-}}$ e homozigotos $Utp14b^{j^{sd-/-}}$ antes e depois do criptorquidismo experimental por 7 dias..... 21
- Figura 6** - Fotomicrografias em MLAR do epitélio seminífero de camundongos $Utp14b^{j^{sd+/-}}$ sob condições normais de temperatura testicular e após 7 dias de criptorquidismo experimental, no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero..... 21
- Figura 7** - Fotomicrografias em MLAR do epitélio seminífero de camundongos $Utp14b^{j^{sd-/-}}$ sob condições normais e após 7 dias de criptorquidismo experimental..... 22
- Figura 8** - Fotomicrografias em MLAR de espermatogônias normais de camundongos $Utp14b^{j^{sd+/-}}$ sob condições normais de temperatura testicular..... 23
- Figura 9** - Fotomicrografias em MLAR de espermatogônias de camundongos $Utp14b^{j^{sd+/-}}$ depois de 7 dias de criptorquidismo experimental mostrando alterações espermatogoniais devido ao efeito da temperatura elevada..... 25

Figura 10 – Fotomicrografias em MLAR, de espermatogônias anormais de camundongos Utp14b ^{jsd^{-/-}} com testículo no escroto e após 7 dias de criptorquidismo experimental.....	26
Figura 11 – Número total de espermatogônias normais e anormais em testículos de camundongos Utp14b ^{jsd^{+/-}} e Utp14b ^{jsd^{-/-}} no escroto e submetidos à alta temperatura na cavidade abdominal.....	27
Figura 12 – Número relativo de cada tipo espermatogonial em testículos de camundongos Utp14b ^{jsd^{+/-}} e Utp14b ^{jsd^{-/-}} no escroto e experimentalmente colocado na cavidade abdominal por 7 dias.....	28
Figura 13 – Número relativo das espermatogônias A _{ind} sem vacúolos e com vacúolos nos camundongos Utp14b ^{jsd^{+/-}} e Utp14b ^{jsd^{-/-}} com testículos no escroto e na cavidade abdominal.....	29
Figura 14 – Número de espermatogônias A _{ind} sem vacúolos e com vacúolos por estágio do ciclo do epitélio seminífero nos camundongos heterozigotos Utp14b ^{jsd^{+/-}}	30
Figura 15 – Número relativo de mitoses e apoptoses das espermatogônias nos camundongos Utp14b ^{jsd^{+/-}} com testículos no escroto e na cavidade abdominal por estágio do ciclo do epitélio seminífero.....	31
Figura 16 – Número relativo de mitoses e apoptoses das espermatogônias nos camundongos Utp14b ^{jsd^{+/-}} e Utp14b ^{jsd^{-/-}} com testículos no escroto e na cavidade abdominal.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

1. A_{ind} – espermatogônia do tipo A indiferenciada;
2. A_{is} – espermatogônia do tipo A isolada.
3. A_{pr} – espermatogônia do tipo A pareada;
4. A_{al} – espermatogônia do tipo A alinhada;
5. A_1 – espermatogônia diferenciada do tipo A_1 ;
6. A_2 – espermatogônia diferenciada do tipo A_2 ;
7. A_3 – espermatogônia diferenciada do tipo A_3 ;
8. A_4 – espermatogônia diferenciada do tipo A_4 ;
9. I_n – espermatogônia diferenciada do tipo intermediária;
10. B – espermatogônia diferenciada do tipo B.
11. Jsd – depleção juvenil das espermatogônias;
12. MLAR – microscopia de luz de alta resolução.
13. NuCS – Nucléolo de Célula de Sertoli.

SUMÁRIO

1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. Estrutura testicular.....	5
3.2. Fases do processo cíclico espermatogênico.....	6
3.3. Morfofisiologia espermatogonial	7
3.4. Cinética espermatogonial	9
3.5. Mutação <i>jsd – juvenile spermatogonial depletion</i>	10
3.6. Efeitos da temperatura sobre o testículo	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1. Animais	15
4.2. Grupos experimentais e criptorquidismo	15
4.3. Coleta e fixação dos testículos	16
4.4. Preparo dos fragmentos testiculares para estudos morfológicos	17
4.5. Análise da morfologia espermatogonial	17
4.6. Cinética espermatogonial	18
4.7. Análises estatísticas	19
5. RESULTADOS	20
5.1 Dados Biométricos.....	20
5.2 Efeito da temperatura no epitélio seminífero	21
5.2.1 Camundongos heterozigotos <i>Utp14b^{jsd+/-}</i>	21

5.2.2 Camundongos mutantes Utp14b ^{jsd^{-/-}}	22
5.3 Morfologia espermatogonial	22
5.3.1 Espermatogônias morfológicamente normais.....	22
5.3.2 Espermatogônias morfológicamente alteradas.....	24
5.3.2.1 Camundongos heterozigotos Utp14b ^{jsd^{+/-}}	24
5.3.2.2 Camundongos mutantes Utp14b ^{jsd^{+/-}}	25
5.3.2.3 Número de espermatogônias normais e anormais.....	27
5.4 Cinética Espermatogonial	28
5.5 Vacúolos nucleares em espermatogônias Aind de camundongos <i>jsd^{+/-}</i>	29
5.6 Mitoses e apoptoses.....	30
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÕES	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar parâmetros da biologia espermatogonial de camundongos empregando animais mutantes $Utp14b^{jsd^{-/-}}$. Estes animais possuem período de puberdade com espermatogênese normal, mas, na idade adulta, apresentam falha no processo de diferenciação espermatogonial, tornando-se azoospérmicos. Além disso, é sabido que quando os testículos azoospérmicos destes animais são experimentalmente posicionados na cavidade abdominal, o aumento da temperatura reestabelece a diferenciação espermatogonial. Utilizando este animal como modelo experimental, estudou-se, no presente trabalho, as alterações da cinética espermatogonial, tais como (a) número de espermatogônias e de suas (b) mitoses e (c) apoptoses, bem como a (d) morfologia destas células, de forma comparativa entre animais heterozigotos e mutantes jsd em relação aos efeitos da temperatura, após um período de criptorquidismo experimental de sete dias. Estes parâmetros foram avaliados utilizando a técnica de microscopia de luz de alta resolução onde os testículos foram fixados com glutaraldeído/ósmio, incluídos em resina alraldite, cortados com $1\mu\text{m}$ de espessura e corados com azul de toluidina-borato de sódio. Verificou-se que o criptorquidismo experimental provocou alterações morfológicas nucleares nas espermatogônias dos camundongos heterozigotos $jsd^{+/-}$, que são fenotipicamente normais, e acentua as alterações dos animais mutantes $jsd^{-/-}$. Observou-se também que o criptorquidismo experimental por sete dias afetou principalmente as espermatogônias indiferenciadas visto que em relação à cinética dos outros tipos espermatogoniais (A_1 a B) o número foi proporcionalmente reduzido. O criptorquidismo atuou de forma diferente sobre a proliferação das espermatogônias nos camundongos estudados, enquanto nos $jsd^{+/-}$ inibiu, nos $jsd^{-/-}$ estimulou as mitoses espermatogoniais, sendo capaz de restaurar o processo espermatogênico. Neste último caso, detectou-se um aumento do número de espermatogônias indiferenciadas nos testículos de animais $jsd^{-/-}$, com um progressivo aumento do número de espermatogônias a partir daquelas do tipo A_3 . Verificou-se que existem duas populações de espermatogônias A_{ind} nos camundongos heterozigotos que são sensíveis, de forma diferente, ao aumento da temperatura pelo criptorquidismo: aquelas sem vacúolos nucleares, que reduzem seu número após o criptorquidismo, e aquelas com vacúolos nucleares que mantêm o mesmo número mesmo quando o testículo é colocado dentro da cavidade abdominal. Isto sugere que nos camundongos heterozigotos as espermatogônias A_{ind} com vacúolo nucleares são células numa fase do ciclo celular refratária aos efeitos da temperatura ou uma população espermatogonial diferente daquela sem vacúolo.

ABSTRACT

This study evaluated parameters of the spermatogonial biology in *Utp14b^{jsd^{-/-}}* mutant mice. Up puberty the spermatogenic process is normal but in adulthood spermatogonial differentiation fail becoming the mice azoospermic. Moreover, it is known that when the testicles of azoospermic animals are experimentally placed in the abdominal cavity, the temperature increases and restore spermatogonial differentiation. Using this mutant mouse as an experimental model, we evaluated in the present study changes in spermatogonial kinetic such as (a) number of spermatogonia and their (b) mitosis and (c) apoptosis, as well as (d) morphology of cells, comparing heterozygous and *jsd* mutant mice and the effects of temperature, after 7 days of experimental cryptorchidism. These morphological and morphometric evaluations were taken using high resolution light microscopy method, where the testes were fixed with glutaraldehyde / osmium, embedded in alraldite resin cut with 1µm of thickness and stained with toluidine blue-sodium borate. It was observed that experimental cryptorchidism causes nuclear morphological changes in spermatogonia of *jsd^{+/-}*, mice, which are phenotypically normal, and emphasizes the morphological alteration in *jsd* mutant mice. It was also observed that the experimental cryptorchidism for 7 days mainly affected undifferentiated spermatogonia as compared to the kinetics of other spermatogonial types (from A1 to B) in which their number was proportionally reduced. It was seen that the cryptorchidism acted differently on the spermatogonial proliferation, that is, whereas in *jsd^{+/-}* inhibited in *jsd^{-/-}* mutant mice stimulated spermatogonial mitosis, being able to restore the spermatogenic process. In *jsd* mutant mice, the higher testicular temperature increases the number of undifferentiated spermatogonia with a progressive increases of the spermatogonial number from type A₃ spermatogonia. It was observed in heterozygous mice the presence of two type A_{ind} spermatogonia populations concern their sensitive to the testicular temperature, caused by cryptorchidism: those without nuclear vacuoles that reduce their number after cryptorchidism and those with nuclear vacuoles that maintains the same number even when the testicle is placed inside the abdominal cavity. This found suggests that in heterozygous mice type A_{ind} spermatogonia with nuclear vacuole either are in a phase of cell cycle refractory for the temperature effects or they are a spermatogonial population different from those without nuclear vacuoles.

2. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Os camundongos machos mutantes *Utp14b^{jsd/-}* são azoospermicos ou estéreis (Ohta, et al., 2001, Shetty, et al., 2001 e Shetty & Weng, 2004). A primeira onda espermatogênica desses animais é normal, com formação de espermatozoides em torno dos 40 dias de idade, ocorrendo após esse período falha no processo de diferenciação das espermatogônias do tipo A (de Rooij et al., 1999). Portanto, este animal vem sendo utilizado em estudos pelo fato de ser um sistema azoospermico geneticamente determinado, sendo útil para o entendimento de mecanismos do processo espermatogênico. (Ohta, et al., 2001).

Atualmente, tem sido utilizada com sucesso pelo nosso grupo de pesquisa, em vários estudos, a técnica de microscopia de luz de alta resolução (MLAR), que torna possível a identificação morfológica com precisão dos diferentes tipos espermatogoniais, permitindo estudos morfológicos confiáveis de vários parâmetros de sua biologia, mesmo quando feito por diferentes observadores (Chiarini-Garcia & Russell, 2001; Chiarini-Garcia et al., 2003; Drummond et al., 2006; Bolden-Tiller et al., 2007; Chiarini-Garcia & Meistrich, 2008; Nascimento et al., 2008; Chiarini-Garcia et al., 2009).

Foram vários os estudos desenvolvidos até o momento que utilizaram o camundongo *jsd* como modelo. Dentre eles, pode-se citar aquele que descreveu esta mutação (Beamer et al., 1988), outros que estudaram a capacidade dos túbulos seminíferos *jsd* de suportarem a espermatogênese de células transplantadas (Boettger-Tong et al., 2000; Ohta et al., 2001), aqueles que avaliaram os efeitos da testosterona na diferenciação espermatogonial no animal mutante *jsd* (Shetty et al., 2001; Tohda et al., 2001), os que estudaram os efeitos do criptorquidismo experimental nesta mutação (de Rooij et al., 1999; Shinohara et al., 2000; Shetty & Weng, 2004) e, finalmente, um trabalho que avalia os efeitos desta mutação sobre a cinética das espermatogônias de camundongos de diferentes linhagens (Bolden-Tiller et al., 2007). No entanto, nenhum destes estudos teve como objetivo avaliar detalhadamente parâmetros sobre a biologia espermatogonial nesta condição de mutação. Diante do exposto, propusemos neste trabalho estudar, de forma comparativa e utilizando a MLAR como método de avaliação, a biologia espermatogonial dos camundongos heterozigotos

(Utp14b^{jsd+/-}), fenotipicamente normais, com a de camundongos mutantes (Utp14b^{jsd-/-}) sob condições normais de temperatura testicular e após o criptorquidismo experimental.

2.1 Objetivo Geral

Comparar, sob condições normais de temperatura testicular e após criptorquidismo experimental, a morfologia e a cinética dos diferentes tipos de espermatogônias indiferenciadas e diferenciadas de camundongos heterozigotos Utp14b^{jsd+/-} com a morfologia e cinética das espermatogônias de camundongos mutantes Utp14b^{jsd-/-}, como modelo experimental na tentativa de melhor entender processos morfofisiológicos relacionados com a biologia espermatogonial.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos, sempre comparando os camundongos Utp14b^{jsd+/-} com os camundongos mutantes Utp14b^{jsd-/-}, foram os seguintes:

1. Determinar, sob MLAR, a morfologia dos diversos tipos espermatogoniais presentes nos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero destes camundongos, quando sob condições normais de temperatura testicular e após o criptorquidismo experimental.
2. Determinar a cinética dos diferentes tipos espermatogoniais quanto ao seu número e o de suas mitoses e apoptoses nos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero destes camundongos, em condições normais de temperatura testicular e após criptorquidismo experimental.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Estrutura testicular

O testículo é um órgão com funções exócrinas e endócrinas, revestido externamente por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea, de onde partem septos de tecido conjuntivo frouxo para o interior do mesmo. Estes septos se convergem numa região denominada mediastino e dividem os testículos em lóbulos. Os lóbulos testiculares são constituídos por dois compartimentos: o intertubular e o tubular (Russell et al., 1990).

No **compartimento intertubular**, encontramos vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos, além de células de Leydig e células do tecido conjuntivo, dentre as quais destacam-se os macrófagos e os mastócitos. As células de Leydig localizam-se nos espaços angulosos entre os túbulos seminíferos e, com freqüência, encontram-se associadas a vasos sanguíneos. Estas células, normalmente de forma poliédrica, possuem grande quantidade de retículo endoplasmático liso que está relacionada com a sua capacidade de produzir hormônios esteróides, principalmente a testosterona, que atua no aparecimento de caracteres sexuais secundários e manutenção da espermatogênese nos animais sexualmente maduros (Sharpe, 1994).

Os túbulos seminíferos, que constituem o **compartimento tubular**, são formados pela túnica própria, epitélio seminífero e lúmen. Internamente à túnica própria encontra-se um epitélio estratificado altamente complexo e especializado, denominado epitélio seminífero. Este epitélio é constituído por duas populações celulares: (1) uma população de células somáticas, as células de Sertoli; e (2) uma população de células germinativas, que se multiplicam e se diferenciam migrando progressivamente da base do epitélio em direção ao lúmen (Russell et al., 1990).

As células de Sertoli são colunares e associam-se extensivamente umas às outras, através de junções de oclusão, compartimentalizando o epitélio seminífero e constituindo a base morfológica e funcional da barreira de célula de Sertoli ou hematotesticular. Esta barreira forma dois compartimentos no epitélio seminífero, (a) o compartimento basal e (b) o

compartimento adluminal. Desta forma, as células de Sertoli desenvolvem um microambiente com funções de sustentação, secreção, absorção, fagocitose, que controlam a diferenciação das células germinativas (França & Chiarini-Garcia, 2005).

As células germinativas constituem-se de gerações sucessivas de células, dispostas em camadas concêntricas bem definidas no epitélio seminífero que sofrem mitose, meiose, apoptose e diferenciação celulares constituindo um evento biológico altamente eficiente denominado **espermatogênese**. As células germinativas mais jovens são as espermatogônias, localizadas no compartimento basal do epitélio seminífero. Logo acima, no compartimento adluminal, estão presentes os espermátócitos primários, em várias fases de evolução da meiose e por fim, as espermátides arredondadas e alongadas (Russell et al., 1990).

3.2. Fases do processo espermatogênico

A espermatogênese é um processo cíclico altamente organizado que ocorre nos túbulos seminíferos, onde as espermatogônias diplóides, após uma série de eventos, dão origem as células haplóides maduras, denominadas espermatozóides. A formação desta célula marca o início da puberdade masculina e é muito variável entre as espécies. Por exemplo, enquanto os camundongos e ratos entram na puberdade com 37 e 50 dias, respectivamente, o homem demora de 12 a 13 anos.

Baseado em considerações funcionais, a espermatogênese pode ser dividida em três fases (Russell et al., 1990): (1) **fase proliferativa ou espermatogonial**, na qual as espermatogônias passam por sucessivas e rápidas divisões mitóticas; (2) **fase meiótica ou espermatocitogênica**, onde o material genético é duplicado, recombinado e segregado, sendo esta fase muito importante para a diversidade genética entre os membros da mesma espécie; (3) **fase espermiogênica ou de diferenciação**, na qual células haplóides, as espermátides, se transformam em células altamente especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os ovócitos.

Embora a organização geral da espermatogênese seja essencialmente a mesma em todos os mamíferos, existem características particulares relacionadas com o número de gerações espermatogoniais e os aspectos morfológicos das células germinativas presentes nas várias fases do processo espermatogênico entre as diferentes espécies.

Nos túbulos seminíferos de animais sexualmente maduros, as células germinativas não estão distribuídas ao acaso, mas organizadas numa série bem definida de associações celulares, denominadas estádios, ordenados de modo espécie-específico (Russell et al., 1990) e constituindo o ciclo do epitélio seminífero. O critério mais comumente utilizado para separar as associações celulares utiliza a evolução do núcleo da espermátide e de sua

vesícula acrossômica desde a formação destas células haplóides até a espermiacção (Russell et al., 1990). O número de estádios que constituem o ciclo do epitélio seminífero é variado para cada espécie sendo que, por exemplo, para camundongos o ciclo do epitélio seminífero é dividido em XII estádios (Fig. 1) enquanto para os ratos o mesmo possui XIV estádios (Leblond & Clermont, 1952; Russell et al., 1990) e para o homem VI estádios (Clermont, 1963).

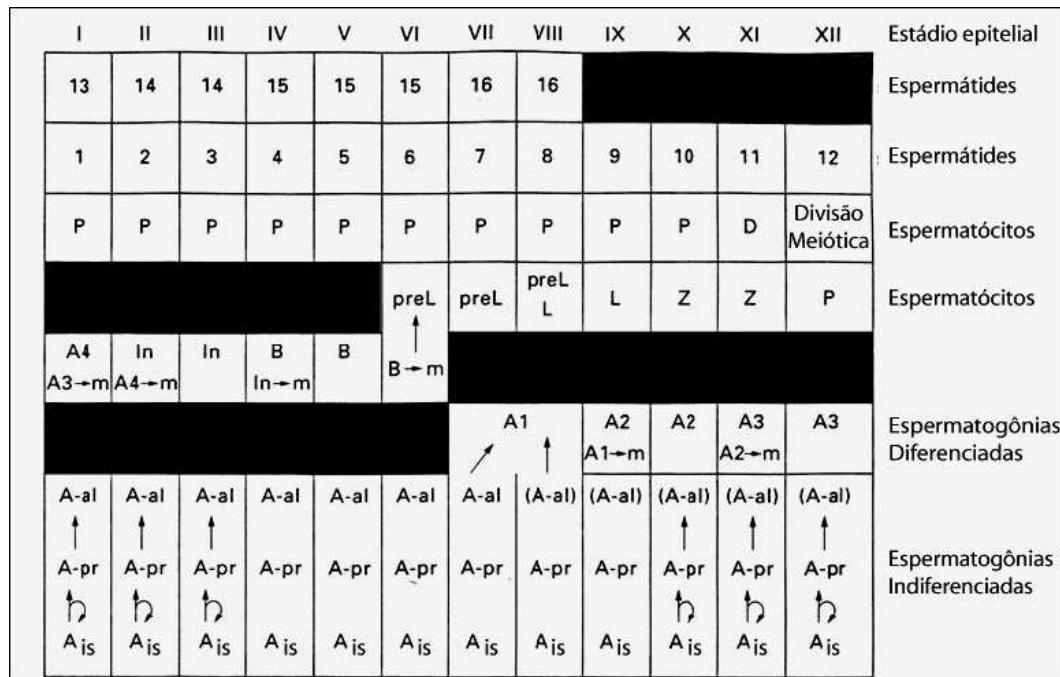


Figura 1. Diagrama mostrando as associações celulares durante os XII estádios do ciclo do epitélio seminífero de camundongos. As espermatogônias *A*_{isoladas} (*A_{is}*), *A*_{pareadas} (*A_{pr}*) e *A*_{alinhadas} (*A_{al}*) são aquelas consideradas indiferenciadas, que estão presentes em todos os estádios do ciclo e que se dividem entre os estádios X e III (setas entre as células). As espermatogônias do tipo *A* diferenciadas (*A*₁, *A*₂, *A*₃ e *A*₄) estão presentes e se dividem (*m*, mitose) em estádios específicos do ciclo. Os espermatócitos formados vão passar pelas fases da meiose (*preL*, pre-leptóteno; *L*, leptóteno; *Z*, zigóteno; *P*, paquíteno; *D*, diplóteno) e pelas 16 etapas de diferenciação das espermátides (números arábicos). Os tipos celulares presentes na mesma coluna são sempre encontrados juntos e constituem um estádio do ciclo (adaptado de Rooij, 1998).

3.3. Morfofisiologia Espermatogonial

A espermatogênese tem início com a divisão das espermatogônias-tronco. Em média, uma espermatogônia passa por uma série de nove a onze divisões mitóticas antes de se diferenciar em espermatócitos. Estes, por sua vez, sofrem duas divisões meióticas para formar as espermátides. Desta forma, a partir de apenas uma espermatogônia-tronco pode-se formar, teoricamente, até 4.096 espermatozóides (Russell et al., 1990). Nos animais sexualmente maduros, as espermatogônias podem ser classificadas em dois grupos: espermatogônias indiferenciadas (imaturas) e diferenciadas (maduras) (de Rooij, 1998; de Rooij & Grootegoed, 1998; de Rooij & Russell, 2000). No primeiro grupo encontram-se as espermatogônias *A* isoladas (*A_{is}*) também denominadas de

espermatogônias-tronco, as espermatogônias A pareadas (A_{pr}) e as espermatogônias A alinhadas (A_{al}). No segundo grupo são observadas as espermatogônias do tipo A diferenciadas (A_1 , A_2 , A_3 e A_4), intermediárias (In) e espermatogônias do tipo B. O esquema a seguir (Fig. 2) ilustra a possível constituição de diferentes clones no camundongo desde a espermatogônia A isolada (A_{is}) até a última geração de espermatogônia, do tipo B (de Rooij & Russell, 2000; de Rooij, 2001). O número de gerações de espermatogônias diferenciadas varia nas diversas espécies de mamíferos. Entretanto, este número geralmente não ultrapassa seis gerações (Russell et al., 1990; de Rooij & Grootegoed, 1998; França & Russell, 1998).

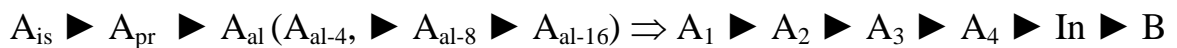


Figura 2. Divisões mitóticas (cabeças-de-seta preta) de cada um dos diferentes tipos de espermatogônias da fase proliferativa ou espermatogonial de camundongos. São aproximadamente 9 divisões que vão formar, a partir de uma A_{is} , em torno de 1024 espermatogônias do tipo B. As espermatogônias A_{is} são as células-tronco do processo espermatogênico e, desta forma, têm a capacidade de se auto-renovarem (seta curva). Entre as A_{al} e A_1 (seta clara) não ocorre divisão e sim diferenciação celular.

A caracterização morfológica das espermatogônias A até pouco tempo atrás era bastante precária (Clermont & Bustos-Obregon, 1968; Oakberg, 1971; Huckins & Oakberg, 1978), devido à baixa resolução das ilustrações e à não adequada preservação dos tecidos. Estes fatores dificultavam a diferenciação com precisão de detalhes morfológicos das espermatogônias, principalmente daquelas do tipo A_1 - A_4 , mostrando que as mesmas possuíam particularidades. No entanto, estudos recentes em camundongos (Chiarini-Garcia & Russell, 2001), ratos (Chiarini-Garcia et al., 2003), hamsters (Nascimento et al., 2008) e jumentos (Chiarini-Garcia et al., 2009) demonstraram ser possível caracterizar morfológicamente e com segurança, os vários tipos de espermatogônias A (Fig. 3), através de uma técnica conhecida como microscopia de luz de alta resolução (Chiarini-Garcia & Meistrich, 2008). Esta técnica consiste na alta qualidade de fixação e inclusão dos testículos, aliado à pequena espessura das secções histológicas (1 μ m). A possibilidade de diferenciar morfológicamente estes tipos celulares entre si permitiu o estudo do posicionamento destas células no perímetro dos túbulos seminíferos. Estudos neste sentido demonstraram, pela primeira vez, que as espermatogônias indiferenciadas estão posicionadas em locais específicos nos túbulos seminíferos denominados de nichos espermatogoniais. Estes nichos foram identificados em camundongos (Chiarini-Garcia et al., 2001), ratos (Chiarini-Garcia et al., 2003), hamsters (Nascimento et al., 2008) e jumentos (Chiarini-Garcia et al., 2009).

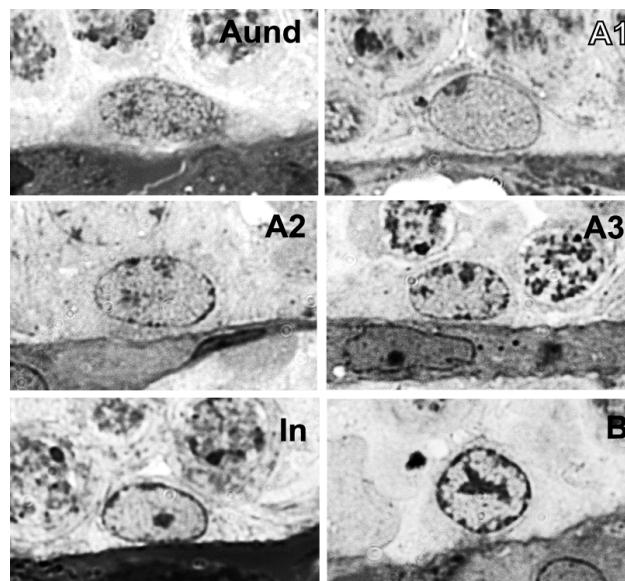


Figura 3. Detalhes morfológicos, sob microscopia de luz de alta resolução, dos núcleos das diferentes gerações de espermatogônias de *golden hamsters*. A_{und} , espermatogônias do tipo A indiferenciadas; A_1 , A_2 e A_3 , espermatogônias do tipo A diferenciadas; In, espermatogônias intermediárias; B, espermatogônias do tipo B. (adaptado de Nascimento et al., 2008).

3.4. Cinética espermatogonial

O uso dos estádios do ciclo do epitélio seminífero é de grande valia para o estudo da cinética das células germinativas, inclusive das espermatogônias, pois permite investigar dentro de determinadas áreas, a dinâmica, a progressão e a expansão destas células em um determinado tempo. Em camundongos, por exemplo, as divisões de A_{is} - A_{al} ocorrem em qualquer estádio do ciclo do epitélio seminífero enquanto na formação de A_1 não ocorre divisão mitótica e sim diferenciação celular das espermatogônias do tipo A_{al} para A_1 , em estádio específico do ciclo espermático. Uma vez que as espermatogônias do tipo A_1 tenham sido formadas, as divisões subseqüentes das mesmas são sincronizadas, ocorrendo em estádios específicos do ciclo do epitélio seminífero. Por exemplo, as espermatogônias A_1 dividem-se para formar A_2 no estádio IX, estas por sua vez formam as espermatogônias A_3 no estádio XI, sendo finalmente as espermatogônias A_4 formadas no estádio I do próximo ciclo. Estas últimas se dividem em espermatogônias intermediárias (In) nos estádios II-III, dando origem as espermatogônias do tipo B no estádio IV (de Rooij, 1998).

No passado, os diferentes tipos de espermatogônias de camundongos não eram facilmente caracterizados morfológicamente, tampouco existiam marcadores específicos para estas células. No entanto, sabendo que os diferentes tipos de espermatogônias A estavam presentes em estádios específicos, os mesmos podiam ser identificados de forma indireta. Por exemplo, numa secção transversal de túbulo seminífero de camundongos no estádio XII podem ser observadas as espermatogônias do tipo A_{is} , A_{pr} A_{al} (presentes em

todos os estádios, embora em número pequeno) e as espermatogônias do tipo A₃. Hoje, com o uso de MLAR (Chiarini-Garcia e Meistrich, 2008), é possível identificar essas células independente dos estádios onde não existe espermatogênese completa ou onde os estádios do ciclo do epitélio seminífero não podem ser identificados, como em animais pré-puberes (Drumond et al., 2006) e em animais mutantes *jsd* (Bolden-Tiller et al., 2007).

A produção espermática de uma espécie depende de vários fatores. O número total de espermatozoides por dia é resultado de um balanço entre produção clonal de espermatogônias através de mitoses e das espermatídes através da meiose em relação às mortes celulares por apoptoses. Desta forma, para que a produção espermática seja a esperada para uma determinada espécie, é necessário um balanço fisiologicamente controlado entre produção e morte celular, conhecido como controle da regulação dependente da densidade espermatogonial (de Rooij & Janseen, 1987; de Rooij & Lok, 1987). Este controle é coordenado por genes da família Bcl-2 onde, dentre eles, o gene Bax que é conhecidamente pró-apotótico, enquanto o Bcl-x_L é anti-apotótico. De fato, em camundongos transgênicos com ausência do gene Bax (*Bax-knockout*), as espermatogônias diferenciadas dos tipos A₂ e A₃ não sofrem apoptose quando deveriam, levando a uma superpopulação destes tipos espermatogoniais. Este fato provoca alterações funcionais na barreira de células de Sertoli, pois estas células se tornam incapazes de dar suporte a esta superpopulação de espermatogônias levando à morte dessas células, independente do gene Bax, causando expressiva atrofia testicular em camundongos adultos deficientes em Bax (Russell et al., 2002).

3.5. Mutação *jsd* – *Juvenile Spermatogonial Depletion*

O modelo infértil de camundongo, conhecido como *juvenile spermatogonial depletion* (depleção juvenil das espermatogônias) – *jsd*, possui uma mutação gênica (Utp14b) no cromossomo 1 e foi estabelecido, inicialmente, pelo cruzamento das linhagens C3H x B6-HB129, gerando um híbrido C3H-B6-HB129, no Jackson Laboratory em 1985. Os machos heterozigotos e as fêmeas heterozigotas e homozigotas são férteis, porém machos adultos homozigotos para o gene mutante Utp14b^{*jsd*} são azoospérmicos ou estéreis (Beamer et al. 1988; Ohta, et al., 2001, Shetty, et al., 2001 e Shetty & Weng, 2004). Estudo recente demonstrou que a gravidade desta mutação é dependente da linhagem do camundongo. Na linhagem B6 os efeitos foram mais severos que naqueles da linhagem C3H (Bolden-Tiller et al., 2007).

A mutação *jsd* no camundongo, foi mapeada na região 0.4-cM do cromossomo 1 onde são encontrados apenas 2 genes em camundongos e humanos: *Acs13* e *Kcne4*. A diferença na sequência genômica entre o tipo selvagem e o animal mutante, onde a

mutação ocorre espontaneamente, é na sequência ORF2.3, nos nucleotídeos 306-307, onde o dinucleotídeo GC no cromossomo selvagem foi substituído pelo hexanucleotídeo CTTTTTC no mutante. A ausência de outras diferenças substanciais no restante da sequência gênica indica que a mutação GC→CTTTTTTC em ORF2.3 causa a falha observada no processo espermatogênico *jsd/jsd* em camundongos do sexo masculino. Desta forma, transplante de espermatogônias do tipo selvagem em testículos de camundongos mutantes *jsd* é capaz de restaurar a espermatogênese pois, ORF2.3 é transcrita nos testículos mutantes pelas células selvagens. A análise comparativa da sequência do cDNA contendo ORF2.3 e a sequência de DNA genômico, identificou dois exons 5' não traduzida em *Acs13*. O gene que contém ambos ORF2.3 e exons 5' não traduzidos são chamados de *Utp14b*. (Bradley et al., 2004).

Análise de expressão do mUtp14b mostra que ele é ativo nas células germinativas do testículo, do zigóteno até espermatídes arredondadas, enquanto que o mUtp14a é ativo normalmente em tecidos somáticos e pode ser expresso em espermatídes arredondadas. A depleção das proteínas UTP impede a produção de 18S rRNA, o que leva à morte celular. Em homozigotos *jsd*, onde falta uma cópia funcional do *Utp14b*, a produção insuficiente de rRNA rapidamente leva à cessação da espermatogênese. (Rohozinski & Bishop, 2004).

Os animais *Utp14b^{jsd/-}* têm sua primeira onda espermatogênica normal, com formação de espermatozoides em torno dos 40 dias de idade, ocorrendo após esse período, falha no processo de diferenciação das espermatogônias do tipo A (Beamer et al. 1988; de Rooij et al., 1999). Em consequência disso, com 8 semanas de idade são encontradas apenas espermatogônias indiferenciadas (Kojima et al., 1997) (cerca de 80% do total) *c-kit* negativas (Ohta et al., 2001) e células de Sertoli nos túbulos seminíferos (Kojima et al., 1997). O processo espermatogênico não ocorre nos animais adultos, de forma que nos túbulos seminíferos desses animais existem, dentre as células germinativas, apenas as espermatogônias (de Rooij et al., 1999).

Em testículos de camundongos imaturos (cerca de 10-20 dias de idade), o nível de testosterona é muito baixo, aumentando gradualmente após a migração dos testículos para o escroto, que ocorre entre a 2ª e 3ª semanas nesta espécie. A elevação nos níveis de testosterona inibe a diferenciação espermatogonial em camundongos *Utp14b^{jsd/-}* acarretando a degeneração espermatogonial após a chegada do testículo no escroto. Quando os camundongos fenotipicamente mutantes *Utp14b^{jsd/-}* são submetidos à supressão total de andrógenos (Shetty et al., 2001 e Tohda et al., 2001) ou ao criptorquidismo (Shetty & Weng, 2004), o processo espermatogênico é inesperadamente restaurado.

A técnica de transplante nos permite avaliar a capacidade de proliferação e diferenciação das espermatogônias. Os componentes somáticos e o ambiente hormonal do

túbulo seminífero de animais mutantes $Utp14b^{isd-/-}$ são capazes de suportar o processo espermatogênico de espermatogônias transplantadas de indivíduos normais (Boettger et al., 2000 e Ohta et al., 2001). Porém, espermatogônias de indivíduos $Utp14b^{isd-/-}$ continuam sendo incapazes de prosseguir no processo espermatogênico quando transplantadas para túbulos seminíferos de animais normais. Estes estudos comprovam que a mutação afeta apenas as espermatogônias em seu processo de diferenciação (de A_1 a B), não afetando, porém o processo de proliferação das espermatogônias indiferenciadas e a capacidade do microambiente destes animais de suportar o desenvolvimento das células germinativas (Ohta, et al., 2001).

Podemos encontrar nos túbulos seminíferos de indivíduos $Utp14b^{isd-/-}$, população normal de células de Sertoli e espermatogônias indiferenciadas do tipo A ($A_{ind} = A_s, A_{pr}$ e A_{ai}). Aproximadamente 65% destas espermatogônias A_{ind} apresentam nos animais mutantes vacúolos nucleares, maiores e mais numerosos se comparados ao animal normal, constituídos por uma área de baixa densidade de ácidos nucléicos e proteínas, não delimitada por membrana (Bolden-Tiller et al., 2007). Em camundongos $Utp14b^{isd+/-}$, os vacúolos só são encontrados em espermatogônias indiferenciadas tipo A, assim como em camundongos adultos normais (Chiarini-Garcia & Russel, 2001), enquanto nos $Utp14b^{isd-/-}$ pode-se observar que vários núcleos com vacúolos têm um nucléolo típico de espermatogônias dos tipos A_2 - A_4 , em contraste ao nucléolo compacto da espermatogônia indiferenciada tipo A. Algumas dessas células possuem um núcleo grande com vacúolo, muita heterocromatina e aparentemente encontra-se em processo degenerativo (Bolden-Tiller et al., 2007).

3.6. Efeitos da temperatura sobre o testículo

O aumento da temperatura testicular pode ser causado pela elevação da temperatura ambiente ou pelo reposicionamento dos testículos na cavidade abdominal (criptorquidismo experimental). As alterações histológicas produzidas no epitélio seminífero pelo criptorquidismo experimental são similares às produzidas pelo aquecimento natural do ambiente (Meistrich et al., 1973).

Mudanças morfológicas após o criptorquidismo experimental têm sido extensivamente estudadas (Clegg, 1961; Leeson & Leeson, 1970; Damber et al., 1978; Keer et al., 1979a, 1979b), relatando alterações do epitélio seminífero, tais como: degeneração das células germinativas, acúmulo de lipídeos nas células de Sertoli (devido ao aumento da atividade fagocítica), dilatações nos espaços intercelulares entre junções de células de Sertoli, além de modificações no tecido intertubular e aumento do lume dos túbulos seminíferos, resultando na perda de peso testicular (Kerr et al., 1979b). O fluxo sanguíneo

em testículos criptorquídicos é reduzido por ter uma maior resistência contra o influxo do fluido apesar de ter uma porcentagem maior de vasos quando comparado com um testículo no escroto (Damber et al., 1978). Devido ao aumento da temperatura também ocorre hipertrofia e hiperplasia das células de Leydig acompanhada do aumento de organelas citoplasmáticas envolvidas na esteroidogênese, como o retículo endoplasmático liso (REL) e mitocôndrias (Kerr et al., 1979a). Após 14 dias de criptorquidismo não são mais encontradas espermatídes em sua morfologia normal e até o 28º dia ocorre uma progressiva perda de espermatócitos e uma redução de 50% do túbulo seminífero (Mendis-Handagama et al., 1990).

Análises histológicas de camundongos criptorquídicos mantidos em ambientes com temperaturas de 23, 26, 30 e 35°C por 35 dias e com temperaturas de 18, 26, 30 e 32°C por 11 dias, demonstram que temperaturas entre 18 e 30°C não produzem alterações histológicas no tecido intersticial ou no epitélio seminífero (Meistrich et al., 1973).

A histologia testicular dos camundongos mantidos à temperatura de 32°C por 11 dias apresenta degeneração do epitélio seminífero, perda das espermatídes maduras, núcleos anormais das espermatídes nas fases 11-16 e desorganização generalizada. Os estádios I-III são os mais afetados, mostrando redução significativa no número de espermatídes arredondadas e espermatócitos em paquíteno inicial (Meistrich et al., 1973). A desorganização é muito evidente nesta condição de temperatura, sendo comum encontrar associações celulares não contíguas em uma mesma secção transversal de túbulo seminífero (Oakberg, 1956).

Sob a temperatura de 35°C, os testículos apresentam alterações histológicas evidentes. Após 4 dias de tratamento sob esta temperatura, nota-se a ausência de espermatócitos em paquíteno nos estádios III-IV, redução do número de paquítenos nos estádios IX-XII e de espermatídes arredondadas no estágio I e formas anormais dos núcleos de espermatídes nas fases 11-13 do CES. Em geral camundongos sacrificados com 21-30 dias de criptorquidismo na temperatura de 35°C, apresentam menos alterações nos núcleos de espermatídes alongadas sugerindo uma adaptação do testículo à temperatura elevada, podendo ser encontrados túbulos histologicamente normais. Contudo, o número de espermatozoides nos ductos deferentes de camundongos criptorquídicos é menor e com uma porcentagem maior de alterações se comparado ao grupo controle (Meistrich et al., 1973).

Surpreendentemente, o criptorquidismo em camundongos $Utp14b^{jsd/-}$ tem sido capaz de manter e restaurar a diferenciação espermatogonial e a espermatogênese, tornando-a semelhante à dos animais $Utp14b^{jsd+/-}$ (Shetty & Weng, 2004). Nos animais heterozigotos $Utp14b^{jsd+/-}$, o criptorquidismo não reduz a porcentagem dos túbulos em diferenciação, embora ocorra perda no peso testicular devido à perda de células nos estágios mais

avançados da espermatogênese. Ao contrário, nos animais homocigotos *Utp14b^{jsd/-}*, nos testículos não criptorquídicos, apenas 14% dos túbulos seminíferos encontram-se em processo de diferenciação, enquanto nos testículos criptorquídicos com 12 semanas cerca de 98% dos túbulos seminíferos encontram-se em diferenciação. Neste caso, a espermatogênese é praticamente restaurada, sendo encontrados no epitélio seminífero espermátocitos e espermátides arredondadas e alongadas (Shetty & Weng, 2004).

Foi observado que a testosterona inibe a diferenciação espermatogonial e que o criptorquidismo por sua vez é capaz de estimular a diferenciação espermatogonial por diminuir a ação e os níveis de testosterona no testículo. A reversão do fenótipo *Utp14b^{jsd/-}* pelo criptorquidismo nestes animais sugere que o gene envolvido na manutenção e diferenciação espermatogonial não é funcional na temperatura escrotal (32°C), tornando-se ativo na temperatura abdominal (35-37°C). Outras explicações para a reversão do fenótipo *Utp14b^{jsd/-}* podem ser: (1) devido a genes das células de Sertoli, responsáveis pela sobrevivência e diferenciação das espermatogônias no mutante *Utp14b^{jsd/-}*, que se tornariam inativos na presença de testosterona à temperatura de 32°C e ativos à temperatura de 35-37°C mesmo na presença de níveis menores de testosterona ou (2) que genes das células de Sertoli responsáveis por desencadear a apoptose das espermatogônias no mutante *Utp14b^{jsd/-}* dependa da testosterona à temperatura de 32°C para sua atividade e que, possivelmente, ele seja reprimido à temperatura de 35-37°C (Shetty & Weng, 2004).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados seis camundongos machos adultos, fenotipicamente normais, heterozigotos $Utp14b^{jsd+/-}$, férteis, com idades entre 70 e 84 dias e cinco machos adultos, mutantes $Utp14b^{jsd-/-}$, azoospérmicos ou estéreis, com idades entre 59 e 105 dias. Estes camundongos são híbridos devido ao cruzamento entre machos da linhagem *Fshb-null* (129-B6 *background*) (Kumar et al., 1997) com fêmeas da linhagem C₃H. Da progênesse oriunda deste cruzamento foram selecionados aqueles com o haplótipo no loco $Utp14b^{jsd}$ (Shetty et al., 2006). Estes camundongos foram acasalados entre si e os animais resultantes cruzados com fêmeas mutantes $Utp14b^{jsd}$ híbridas do *background* BH (Shetty et al., 2001). Estes animais foram mantidos em cruzamentos entre si em colônia no Laboratório de Radiação Experimental Oncológica (ERO), do Centro de Estudos do Câncer MD Anderson, da Universidade do Texas, em Houston/Texas, EUA. Desta colônia foram selecionados os animais $Utp14b^{jsd+/-}$ e $Utp14b^{jsd-/-}$, que tiveram sua genotipagem checada por PCR.

Estes camundongos foram mantidos em biotérios sob condições aprovadas pela Associação Americana para Cuidado com Animais de Laboratório, de acordo com a regulamentação da USDA e DHHS da NIH, em fotoperíodo de 12 horas claro por 12 horas escuro e recebendo ração e água à vontade.

4.2. Grupos Experimentais e Criptorquidismo

Os camundongos machos adultos $Utp14b^{jsd+/-}$ e $Utp14b^{jsd-/-}$ foram submetidos ao criptorquidismo unilateral (lado direito). Para isso, foram anestesiados com uma injeção de 1,6 mL/kg de uma mistura de quetamina (37,5 mg/mL), xilazina (1,9 mg/mL) e acepromazina (0,39 mg/mL). Foi feito um corte na região inferior do abdômen, o testículo direito foi puxado para a cavidade abdominal e o tecido adiposo da cabeça do epidídimo direito foi suturado no interior da parede abdominal para manter o testículo dentro da cavidade e evitar o seu

retorno para a bolsa escrotal. O testículo ficou situado acima da bexiga urinária, sem que o gubernáculo fosse cortado. O testículo esquerdo continuou na bolsa escrotal, servindo de controle. Após 7 dias, os camundongos foram sacrificados e perfundidos com glutaraldeído conforme descrito abaixo.

Desta forma, o trabalho apresenta quatro grupos experimentais:

- (1) camundongos Utp14b^{isd+/-} com testículo direito na cavidade abdominal por 7 dias (Tab.1);
- (2) camundongos Utp14b^{isd+/-} com testículo esquerdo na bolsa escrotal (Tab.1);
- (3) camundongos Utp14b^{isd-/-} com testículo direito na cavidade abdominal por 7 dias (Tab. 2);
- (4) camundongos Utp14b^{isd-/-} com testículo esquerdo no escroto (Tab. 2).

Tabela 1 - Dados biométricos dos camundongos Utp14b^{isd +/-}; peso corporal antes e depois do criptorquidismo experimental; peso do testículo direito criptorquídico por 7 dias e esquerdo na bolsa escrotal e idade.

Nº do animal	Idade (dias)	Peso Corporal antes (g)	Peso Corporal depois (g)	Testículo Criptorquídico (mg)	Testículo no Escroto (mg)
001-4	70	30,03	30,76	59,9	64,8
001-5	70	29,32	33,31	65,6	68,0
001-6	70	27,20	28,91	61,6	64,8
021-4	84	36,30	35,81	61,0	63,1
021-5	77	33,79	33,66	69,7	67,5
021-7	70	28,68	28,73	51,0	57,1

Tabela 2 - Dados biométricos dos camundongos Utp14b^{isd -/-}; peso corporal antes e depois do criptorquidismo experimental; peso do testículo direito criptorquídico por 7 dias e esquerdo na bolsa escrotal e idade.

Nº do animal	Idade (dias)	Peso Corporal antes (g)	Peso Corporal depois (g)	Testículo Criptorquídico (mg)	Testículo no Escroto (mg)
001-1	59	28,50	31,00	19,8	15,8
001-2	59	28,24	31,12	17,8	15,3
001-3	59	27,20	30,62	12,3	12,1
021-1	105	27,18	26,13	15,7	16,7
021-3	84	32,03	31,00	16,8	17,9

4.3. Coleta e Fixação dos Testículos

Após o período de 7 dias de criptorquidismo direito experimental, os animais foram sacrificados, sendo submetidos à fixação por perfusão intravascular. Aproximadamente 15 minutos antes do procedimento de perfusão, injetou-se, por via intraperitoneal, heparina (Liquemine Roche) na dosagem de 125 UI/kg de peso corporal. No momento da fixação, os

camundongos foram anestesiados com Tiopental (pentobarbital sódico), também por injeção intraperitoneal, na proporção de 30 mg/kg de peso corporal. Uma vez anestesiados, procedeu-se a abertura da cavidade torácica com o objetivo de expor o coração. Um cateter (20G - 1,1mm) foi introduzido no ventrículo esquerdo e o leito vascular lavado com solução salina 0,9%, a uma pressão de aproximadamente 80 mmHg. Após a retirada do sangue com a solução salina, procedimento que durou de 5 a 10 minutos, iniciou-se o procedimento de fixação através da perfusão com glutaraldeído a 5% em tampão cacodilato 0,05M (pH 7,3), por um período de aproximadamente 25 minutos. Em seguida, os testículos foram retirados, pesados e recortados em pequenos fragmentos de 1 a 2 mm de espessura. Estes fragmentos foram então imersos no mesmo tipo de fixador por mais 12 a 24 horas, a 4°C. Este procedimento baseia-se no método já descrito por Sprando (1990) e Chiarini-Garcia & Meistrich (2008). As etapas descritas até este momento ocorreram no laboratório ERO-UT, em Houston/Texas, EUA.

4.4. Preparo dos fragmentos testiculares para estudos morfológicos

Os fragmentos de tecido obtidos foram enviados para o Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (LABER) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), onde foram pós-fixados com ósmio reduzido (tetróxido de ósmio a 1% em ferrocianeto de potássio a 1,5%) por 90 minutos (Russell & Burguet, 1977). Sendo posteriormente desidratados, em concentrações crescentes de etanol (35°, 50°, 70°, 85°, 2 x 95° e 2 x 100°), banhados com acetona e incluídos em resina Araldite 502 (EMS, Fort Washington, PA).

Para os estudos sob microscopia de luz de alta resolução (MLAR), os tecidos incluídos em blocos foram cortados em micrótomo rotativo Reichert Jung (mod. 1140/autocut). Com o uso de navalhas de vidro, preparadas com *knife-maker* da LKB (modelo 7880B), foram obtidos cortes histológicos de 1 µm de espessura. Estes cortes foram corados com azul de toluidina-borato de sódio a 1%, montadas com Entellan (Merck) e analisados sob microscópio de luz Olympus BX-41, para o desenvolvimento dos estudos histológicos e morfométricos.

4.5. Análise da morfologia espermatogonial

Os diferentes tipos espermatogoniais presentes nos quatro grupos experimentais foram caracterizados sob microscopia de luz de alta resolução, de acordo com parâmetros nucleares tais como: a forma do núcleo; presença e o arranjo da heterocromatina; granulação da eucromatina e morfologia e grau de compactação nucleolar baseando-se em

estudos prévios, desenvolvidos por Chiarini-Garcia & Russell (2001) e Chiarini-Garcia et al. (2003). Para os estudos sob MLAR, imagens digitais dos diferentes tipos de espermatogônias foram fotografadas utilizando a câmera digital Q-Color 3 da Olympus acoplada ao fotomicroscópio Olympus BX-41. As imagens digitais foram posteriormente ajustadas quanto à resolução (600 dpi), foco, contraste e escala de cinza (curva sigmóide) utilizando o programa Adobe Photoshop. Estas imagens foram comparadas entre si, de acordo com suas características morfológicas, com o objetivo de descrever suas alterações, agrupando as espermatogônias anormais e identificando as espermatogônias normais em cada um dos quatro grupos de camundongos estudados, que levam em consideração a mutação (Utp14b^{jsd+/-} - Utp14b^{jsd-/-}) e o criptorquidismo experimental do testículo direito.

4.6. Cinética Espermatogonial

Com a finalidade de se conhecer a cinética espermatogonial, foram determinados os números dos diferentes tipos de espermatogônias (A_{ind} , A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , In e B), bem como o número de espermatogônias que estão em mitose ou apoptose, tanto nos animais Utp14b^{jsd+/-} quanto naqueles Utp14b^{jsd-/-}, com os testículos no escroto e após o criptorquidismo experimental. Para isto, contou-se os diferentes tipos espermatogoniais e de nucléolo de célula de Sertoli em 20 a 50 secções transversais de túbulos seminíferos selecionadas aleatoriamente em cada animal. Os dados obtidos foram normalizados por 100 nucléolos de célula de Sertoli, utilizando a razão: número de cada tipo espermatogonial / 100 nucléolos de célula de Sertoli. As médias destas razões, para cada tipo espermatogonial, nos animais Utp14b^{jsd+/-} e Utp14b^{jsd-/-} com testículo no escroto e na cavidade abdominal, foram comparadas estatisticamente.

Para determinar o número de A_{ind} com vacúolos e sem vacúolos intranucleares e de mitose e apoptoses nos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero nos camundongos Utp14b^{jsd+/-} contou-se o número destas células e o de nucléolos de células Sertoli em 10 secções transversais de túbulos seminíferos, em cada um dos XII estádios do ciclo do epitélio seminífero. Os dados obtidos foram normalizados dividindo-se o número de cada tipo espermatogonial encontrado dentro do mesmo estádio do ciclo do epitélio seminífero por 100 nucléolos de célula de Sertoli, determinando a razão: número de células germinativas/100 nucléolos de célula de Sertoli. As médias destas razões para cada estádio e tipo celular foram comparadas estatisticamente. Nos animais Utp14b^{jsd-/-} estes parâmetros não foram avaliados visto que neles não foi possível determinar com precisão os estádios do ciclo do epitélio seminífero.

A contagem de todos os grupos experimentais foi realizada em microscópio Olympus BX-41 em aumento final de 1000x e os resultados obtidos foram demonstrados em gráficos para melhor visualização da cinética espermatogonial.

4.7. Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram apresentados como média \pm erro padrão. Os grupos foram comparados usando o teste ANOVA, seguido por Student Newman-Keuls. Em todas as situações analisadas, o nível de significância considerado foi de $p < 0,05$. Todas as análises foram feitas utilizando o software SPSS 15.0 (SPSS Inc. Chicago/USA).

5. RESULTADOS

5.1 Dados biométricos

Foram analisados os pesos corporal e testicular obtidos dos camundongos heterozigotos ($Utp14b^{jsd+/-}$) e mutantes ($Utp14b^{jsd-/-}$) com testículos normais situados no escroto e com criptorquidismo experimental de 7 dias. Observou-se que não houve diferença entre o peso corporal dos grupos $Utp14b^{jsd+/-}$ e $Utp14b^{jsd-/-}$ ($p>0,05$) (Tab. 3 e Fig. 4).

Ao analisar nesses animais o peso dos testículos normais e criptorquídicos, observou-se que nos animais $Utp14b^{jsd+/-}$ este peso foi maior ($p<0,05$) quando comparado com o peso testicular dos animais $Utp14b^{jsd-/-}$ (Tab. 3 e Fig. 5).

Tabela 3 – Dados biométricos dos camundongos $jsd^{+/-}$ e $jsd^{-/-}$ (média +/- erro padrão) antes e depois do criptorquidismo experimental por 7 dias. Diferentes letras (a, b) indicam diferença significativa ($p<0,05$) entre os pesos testiculares (comparação horizontal e vertical).

	Peso corporal (g)	Peso corporal criptorquídico (g)	Peso testicular normal (mg)	Peso testicular criptorquídico (mg)
$Utp14b^{jsd+/-}$	30,89 (+/-1,31) ^a	31,86 (+/-1,08) ^a	64,22 (+/-1,49) ^a	61,47 (+/-2,38) ^a
$Utp14b^{jsd-/-}$	28,68 (+/-0,81) ^a	29,98 (+/-0,88) ^a	15,56 (+/-0,89) ^b	16,48 (+/-1,14) ^b

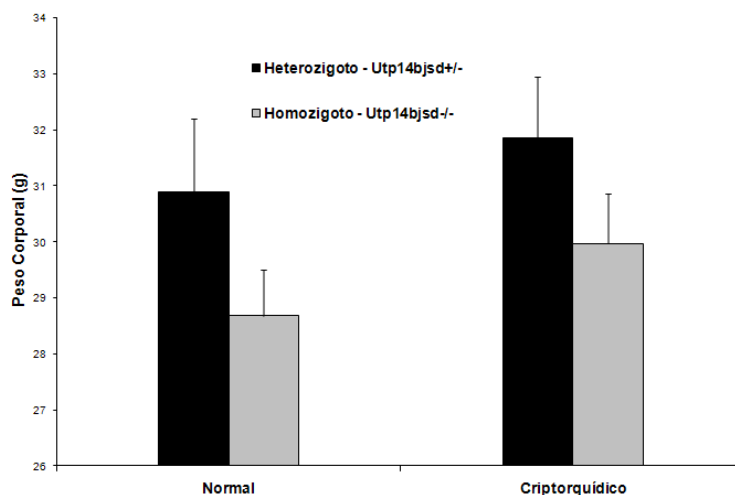


Figura 4 – Peso corporal (média +/- erro padrão) dos camundongos heterozigotos e mutantes, com testículos normais (no escroto) e criptorquídico (na cavidade abdominal) por 7 dias. Os quatro grupos foram comparados entre si e não apresentaram diferenças estatísticas ($p<0,05$).

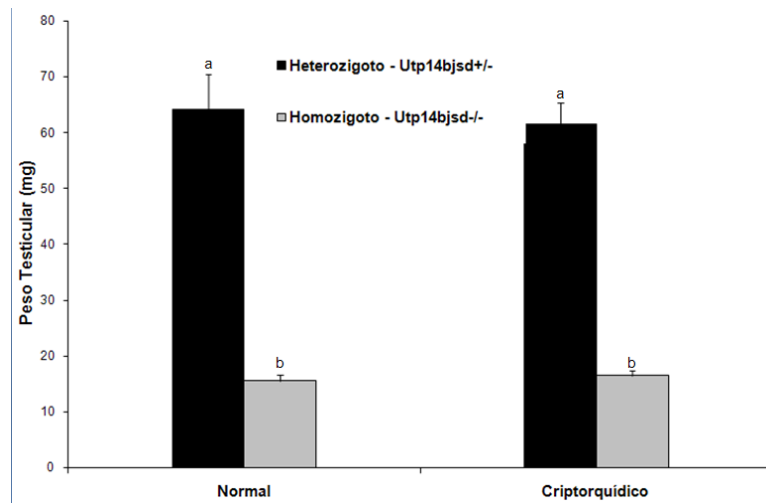


Figura 5 – Peso testicular (média +/- erro padrão) dos camundongos heterozigotos e mutantes com testículos normais (no escroto) e criptorquídico (na cavidade abdominal) por 7 dias. Os quatro grupos foram comparados entre si e as letras diferentes (a,b) indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

5.2 Efeitos da temperatura no epitélio seminífero

5.2.1 Animais heterozigotos Utp14b^{jsd}±/±

Observa-se nos testículos criptorquídicos dos animais heterozigotos, uma diminuição da altura do epitélio seminífero, devido a uma redução da quantidade de células germinativas principalmente dos espermatócitos e das espermátides arredondadas e alongadas (Figs. 6A,B). Nos testículos criptorquídicos foi encontrada uma vacuolização anormal (Fig. 6B) do epitélio seminífero.

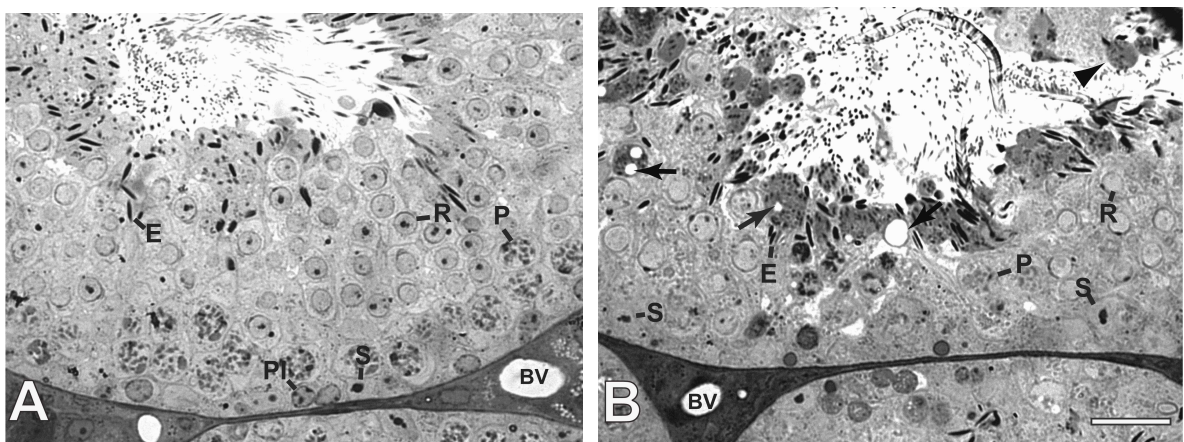


Figura 6 – Fotomicrografias em MLAR do epitélio seminífero de camundongos Utp14b^{jsd}±/± sob condições normais de temperatura testicular (A) e após 7 dias de criptorquidismo experimental (B), ambas no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero. A Figura B mostra redução da altura do epitélio e do número de células germinativas, bem como a vacuolização do epitélio seminífero (seta) e células germinativas no lúmen (cabeça de seta). Barra equivale a 25µm.

5.2.2 Animais mutantes *Utp14b^{isd/-}*

Nos camundongos mutantes, o peso dos testículos no escroto e dos testículos criptorquídicos foram semelhantes. Observou-se nestes animais um aumento da quantidade de espermatogônias e de células germinativas espermatocitárias (Fig. 7).

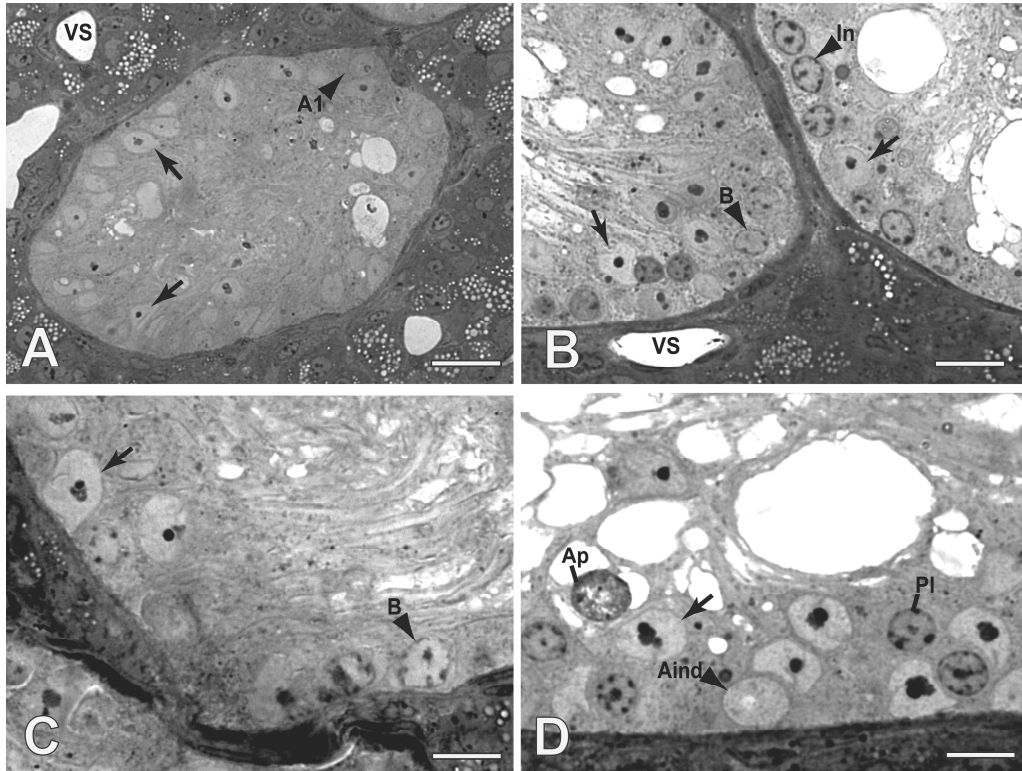


Figura 7 – Fotomicrografias em MLAR do epitélio seminífero de camundongos *jsd^{-/-}* sob condições normais (A,C) e após 7 dias de criptorquidismo experimental (B,D). Células de Sertoli (setas) e espermatogônias (cabeça de seta). (B,D) visualiza-se uma maior quantidade de células no epitélio seminífero. *A_{ind}*, espermatogônia A indiferenciada; *A₁*, espermatogônia diferenciada do tipo *A₁*; *In*, espermatogônia diferenciada do tipo intermediária; *B*, espermatogônia diferenciada do tipo B; *PI*, Pré-leptóteno; *Ap*, Apoptose; *VS*, vaso sanguíneo. A e B, barras equivalem a 25µm. C e D, barras equivalem a 10µm.

5.3 Morfologia Espermatogonial

5.3.1 Espermatogônias morfologicamente normais

Para estudar o comportamento e a cinética dos diferentes tipos de espermatogônias numa espermatogênese anormal, seria necessário primeiro caracterizá-las e diferenciá-las numa situação normal (Fig.8).

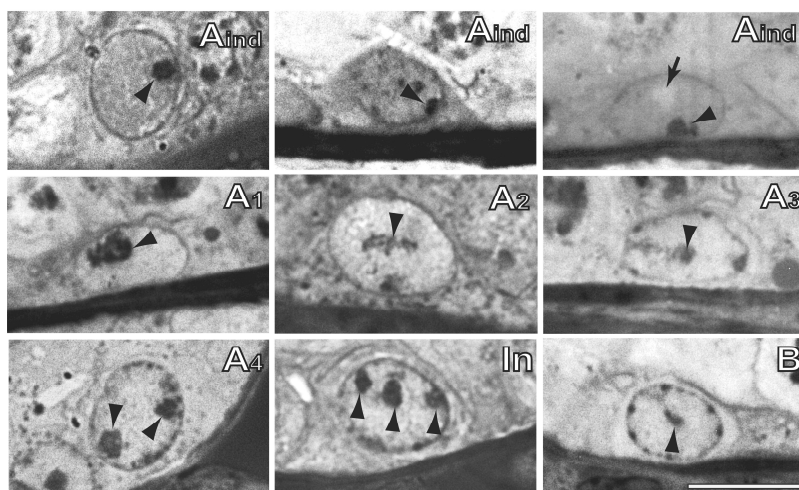


Figura 8 – Fotomicrografias em MLAR de espermatogônias normais de camundongos *jsd^{+/+}* sob condições normais de temperatura testicular. *A_{ind}*, espermatogônia indiferenciada; *A₁*, espermatogônia diferenciada do tipo *A₁*; *A₂*, espermatogônia diferenciada do tipo *A₂*; *A₃*, espermatogônia diferenciada do tipo *A₃*; *A₄*, espermatogônia diferenciada do tipo *A₄*; *In*, espermatogônia diferenciada do tipo intermediária; *B*, espermatogônia diferenciada do tipo *B*. Setas, vacúolo nuclear; cabeça de seta, nucléolos. Barras equivalem a 10 μ m.

Constatamos que a morfologia das espermatogônias observadas foi semelhante àquela descrita anteriormente por Chiarini-Garcia e Russell (2001), utilizando a MLAR. Este método possibilita avaliar de forma mais precisa a citologia espermatogonial, permitindo distinguir os seus diferentes subtipos. Os subtipos espermatogoniais foram basicamente diferenciados por suas características nucleares e nucleolares e, abaixo, descreveremos sucintamente as características morfológicas individuais de cada uma delas.

As espermatogônias *A_{ind}* em camundongos, compostas pelas espermatogônias *A_s*, *A_{pr}*, e *A_{al}*, foram encontradas em todos os estádios do ciclo do epitélio seminífero e foram diferenciadas morfológicamente com base na eucromatina que se apresenta em grumos pouco corados por todo o núcleo e presença de heterocromatina de baixa densidade. Possuíam o núcleo oval com um ou dois nucléolos irregulares, usualmente apresentando um vacúolo nuclear.

Em relação às espermatogônias do tipo *A* diferenciadas (*A₁*, *A₂*, *A₃* e *A₄*), Intermediária e *B*, observamos que elas estavam presentes em estádios específicos do ciclo do epitélio seminífero e possuíam características morfológicas peculiares.

As espermatogônias *A₁* possuíam um grande núcleo oval, ligeiramente mais esféricos do que o núcleo das *A_{ind}*. A eucromatina apresentava finamente granulada, com raros grumos ao longo do envelope nuclear apresentando uma coloração pálida. A heterocromatina não foi detectada devido à quase completa ausência de grumos em torno do envelope nuclear. Possuíam de 2 a 3 nucléolos proeminentes, bem circunscrito, reticulados, fortemente corados e periféricamente localizados. Os vacúolos nucleares não foram vistos neste tipo celular e nem em tipos espermatogoniais mais avançados.

As espermatogônias **A2** possuíam núcleo oval, similar a A1 e pequenos grumos de heterocromatina margeavam menos que 10% a porção intranuclear do envelope nuclear. A eucromatina se apresentou em pequenos grumos no interior do núcleo. Os nucléolos foram menores, pouco mais alongados, menos compacto, mais irregulares e mais bem demarcados do nucleoplasma do que os das células A1.

Nas espermatogônias **A3** os núcleos foram mais arredondados do que os das espermatogônias A2 embora possam ser encontradas também formas ovais. Cerca de 10% a 25% do envelope nuclear é margeado com heterocromatina, fazendo com que o envelope nuclear fique mais proeminente. A eucromatina se apresentou em pequenos grumos, em quantidade pouco maior que a encontrada nas células A2. O nucléolo foi grande, geralmente reticulado e não muito bem definido se estendendo profundamente para o interior do núcleo. Puderam ser vistos até 3 nucléolos nessas células.

O núcleo das espermatogônias **A4 mostrou-se** oval a ligeiramente redondo, semelhante às células A3. Possui um pouco mais de grumos de heterocromatina, em tamanho aumentado, sobre o envelope nuclear (cerca de 30% a 70% do envelope nuclear foi margeado por heterocromatina), e uma quantidade aumentada de heterocromatina mosqueada no núcleo quando comparadas com as células A3. A eucromatina foi semelhante à encontrada nas células A3. Podiam ser visualizados mais de 3 nucléolos que podem atravessar todo o núcleo.

Os núcleos das espermatogônias **Intermediárias** foram similares aos das células A4, de oval a ligeiramente redondo. A heterocromatina margeava superficialmente de 70% a 100% do envelope nuclear. A heterocromatina mosqueada do núcleo é proeminente. A eucromatina apresenta pequenos grumos em quantidade maior do que foi visto nas células A4. Podem ser vistos 1 ou 3 nucléolos compactos.

Nas espermatogônias **B** os núcleos são mais fortemente corados e redondos ligeiramente ovais. O nucléolo foi pequeno, compacto e fortemente corado, sendo visto um por célula. A eucromatina é corada mais homoganeamente em comparação às células In. Essas células possuem uma quantidade menor de heterocromatina do que é visto na espermatogônia In. Pequenas condensações de heterocromatina ficam anexadas no envelope nuclear.

5.3.2 Espermatogônias morfologicamente alteradas

5.3.2.1 Camundongos heterozigotos *Utp14b^{jsd^{+/-}}*

Nos testículos dos camundongos *jsd^{+/-}*, localizados na no escroto e onde o ciclo espermatogênico foi normal, foram encontradas células de Sertoli e espermatogônias do tipo

A indiferenciadas e espermatogônias diferenciadas (A_1 a B), com morfologia normal, tal como descrito anteriormente (Fig. 8).

Já nos testículos criptorquídicos destes animais heterozigotos, os quais foram colocados cirurgicamente dentro da cavidade abdominal, apesar das células de Sertoli aparentemente apresentarem sua morfologia normal, algumas poucas espermatogônias indiferenciadas e outras em diferenciação apresentaram alterações morfológicas (Fig. 9). As principais alterações observadas nessas células foram: (a) uma distribuição peculiar da heterocromatina, aparentemente mais difusa (menos delimitada) e mais espalhada por todo núcleo espermatogonial; (b) os nucléolos se apresentaram mais difusos pelo nucleoplasma; e (c) observou-se uma intensa e bem evidente vacuolização do núcleo das espermatogônias do tipo A diferenciadas (A_1 a A_4). Normalmente, a presença de vacúolos nucleares está relacionada a condições normais das espermatogônias tipo A_{ind} (indiferenciadas) de camundongos, no entanto, após o criptorquidismo, vacúolos nucleares são também observados em células que são morfológicamente similares às espermatogônias em diferenciação. É possível observar também, como alteração, uma maior granulação do nucleoplasma das espermatogônias tanto indiferenciadas quanto diferenciadas.

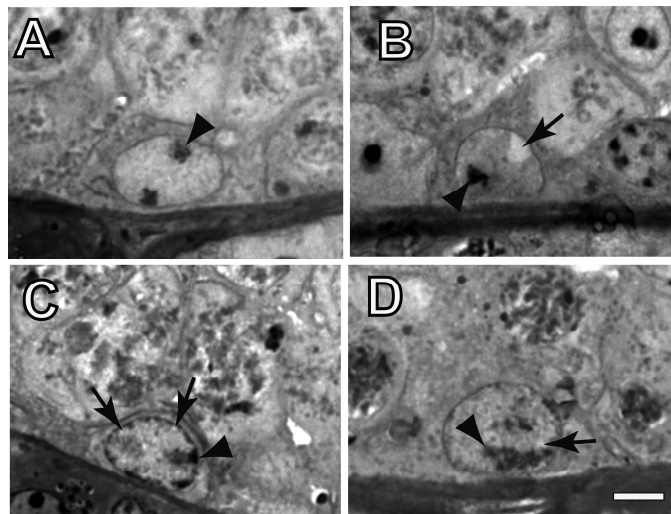


Figura 9 – Fotomicrografias em MLAR, de espermatogônias de camundongos $jsd^{+/-}$ depois de 7 dias de criptorquidismo experimental mostrando alterações espermatogoniais devido ao efeito da temperatura elevada. Observe a espermatogônia normal A_{ind} sem vacúolos (A) e com vacúolos (B). Note as células germinativas similares a espermatogônias diferenciadas com um nucléolo anormal e presença de vacúolos nucleares (C,D). Setas, vacúolo e cabeça de seta, nucléolo. Barra equivale a $5\mu m$.

5.3.2.2 Camundongos mutantes $Utp14b^{jsd^{-/-}}$

Na condição de homozigose, foram freqüentes as espermatogônias do tipo A indiferenciadas e diferenciadas que apresentaram alterações morfológicas evidentes. Estas alterações estavam relacionadas com intensa vacuolização do núcleo, presença de

granulação no núcleo e citoplasma e uma distribuição peculiar da heterocromatina e dos nucléolos. Esta peculiaridade se caracteriza pela presença de grumos de heterocromática mais densos e com número maior de condensações em torno do envelope nuclear, quando comparada com às espermatogônias normais. O diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero desses animais foi visivelmente menor quando comparados aos animais heterozigotos, devido a uma menor quantidade de células germinativas (Fig. 10).

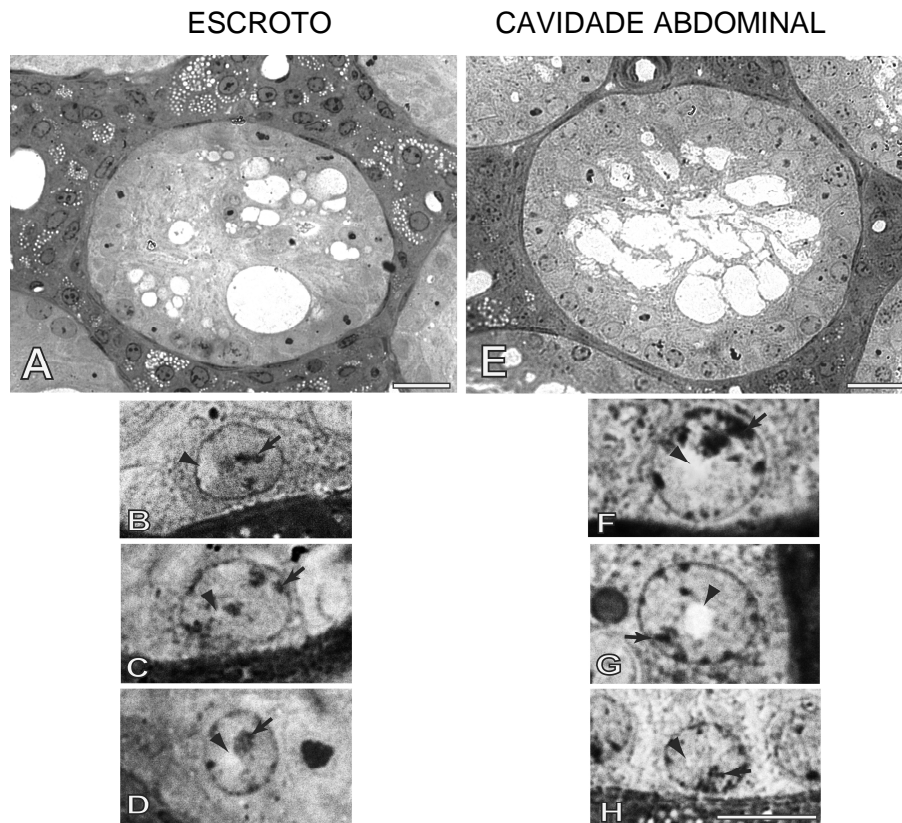


Figura 10 – Fotomicrografias em MLAR, de espermatogônias anormais de camundongos mutantes com testículo no escroto e após 7 dias de criptorquidismo experimental. A e E visão panorâmica do epitélio dos túbulos seminíferos. Setas, nucléolo e cabeça de seta, vacúolos. Barras: A, E, equivale a 50 μ m. B-D, F-H, equivale a 10 μ m.

Nos camundongos mutantes com o testículo na cavidade abdominal, devido ao criptorquidismo experimental, foram encontradas células de Sertoli com morfologia aparentemente normal e espermatogônias alteradas em maior número que quando encontradas no escroto. Estas alterações morfológicas foram semelhantes àquelas descritas acima, para os animais heterozigotos. Além disto, verificou-se que o número de espermatogônias indiferenciadas e diferenciadas foi maior quando o testículo estava em temperatura mais elevada.

5.3.2.2 Número de espermatogônias normais e anormais

Ao calcular e comparar os valores do número relativo de espermatogônias normais e anormais, por 100 nucléolos de célula de Sertoli, encontradas em testículos de camundongos $jsd^{+/-}$ e $jsd^{-/-}$, em ambas as condições experimentais (escroto e cavidade abdominal), foram observadas algumas diferenças.

Nos camundongos heterozigotos foram encontradas apenas espermatogônias com morfologia normal quando o testículo estava presente no escroto enquanto no testículo criptorquídico foram observadas poucas espermatogônias com morfologia alterada ($p < 0,05$). No testículo criptorquídico encontrou-se um número significativamente menor de espermatogônias normais, indicando que o aumento de temperatura interferiu na morfologia celular.

Contudo, nos camundongos mutantes encontrou-se espermatogônias normais e anormais em ambos os testículos, naqueles localizados no escroto e naqueles posicionados na cavidade abdominal. Apesar do número de espermatogônias anormais encontrado na cavidade abdominal ter sido maior, não foi observada diferença ($p > 0,05$) em relação ao número daquelas anormais encontradas na bolsa escrotal.

Em relação ao número de espermatogônias anormais, todos os grupos experimentais são semelhantes entre si, com exceção dos animais heterozigotos com testículo na bolsa escrotal, onde não foi encontrada nenhuma célula anormal ($p < 0,05$) diferenciando-se dos outros grupos (Fig. 11).

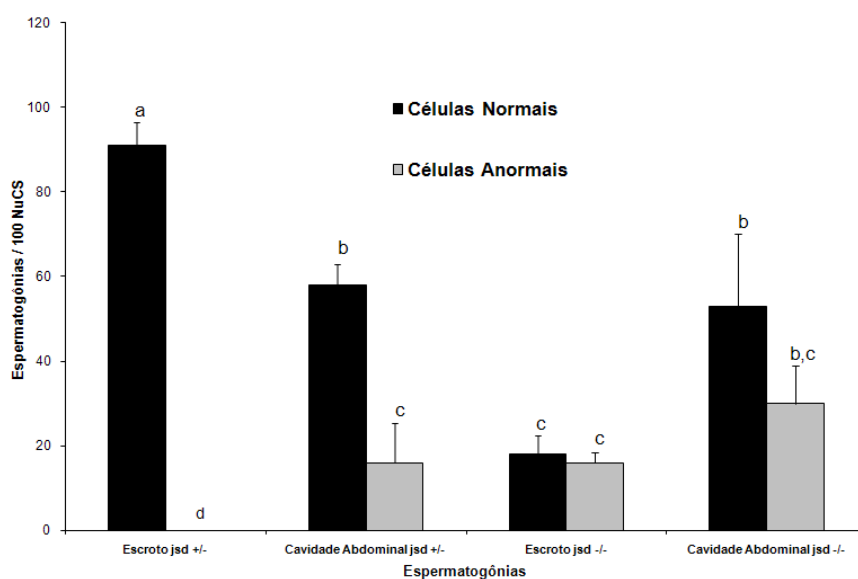


Figura 11 – Número total de espermatogônias normais e anormais (média +/- erro padrão) em testículos de camundongos $Utp14b^{jsd^{+/-}}$ e $Utp14b^{jsd^{-/-}}$ no escroto e submetidos à alta temperatura na cavidade abdominal. Cada valor foi comparado entre si e diferentes letras (a,b,c) indicam diferença estatística ($p < 0,05$). NuCS, nucléolo da célula de Sertoli.

5.4 Cinética Espermatogonial

Ao comparar o número relativo de cada tipo espermatogonial (A_{ind} , A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , In e B) entre os quatro grupos experimentais, camundongos heterozigotos $jsd^{+/-}$ com testículos no escroto e na cavidade abdominal com o de animais mutantes $jsd^{-/-}$ com testículos no escroto e na cavidade abdominal, detectou-se que o número de alguns tipos espermatogoniais variou em relação à localização.

O número de espermatogônias do tipo A_{ind} foi maior ($p < 0,05$) nos animais heterozigotos com o testículo localizado na bolsa escrotal quando comparados aos demais grupos. Contudo, valores semelhantes de A_{ind} foram encontrados nos grupos heterozigoto e homozigoto com testículos na cavidade abdominal. Sendo que, os testículos dos animais mutantes posicionados na bolsa escrotal também mostraram valores diferentes ($p < 0,05$) de espermatogônias A_{ind} quando comparadas aos camundongos heterozigotos (Fig. 12).

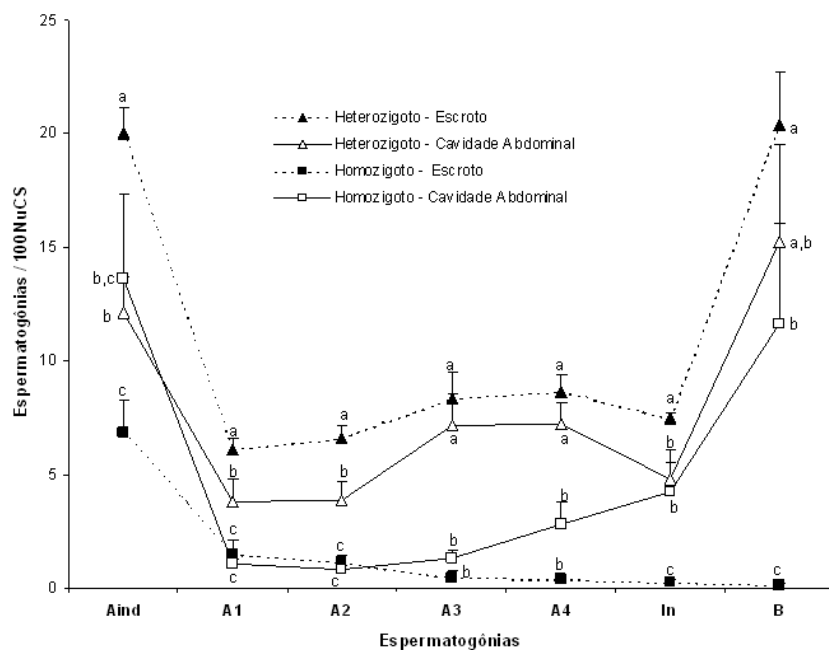


Figura 12 – Número relativo de cada tipo espermatogonial em testículos de camundongos $jsd^{+/-}$ e $jsd^{-/-}$ no escroto e experimentalmente colocado na cavidade abdominal por 7 dias. Diferentes letras (a, b, c) indicam diferença estatística ($p < 0,05$). Valores comparados apenas na vertical entre o mesmo tipo celular. NuCS, nucléolo de célula de Sertoli.

Nos camundongos heterozigotos observou-se que após uma semana de criptorquidismo o número de espermatogônias reduziu ($p < 0,05$) em relação ao número destas mesmas células no animal com o testículo na bolsa escrotal. Determinou-se que apenas as espermatogônias A_3 e A_4 tiveram seu número semelhante quando comparadas entre os dois grupos..

Nos animais mutantes, determinou-se que na maioria das espermatogônias seu número foi semelhante à exceção das espermatogônias In e B, onde o número delas foi maior ($p < 0,05$) quando o testículo estava posicionado na cavidade abdominal.

Ao comparar a cinética espermatogonial entre os quatro grupos experimentais, foi observado que o grupo $Utp14b^{jsd/-}$, com testículos no escroto, não segue a tendência normal da curva de diferenciação das espermatogônias quando comparado aos outros grupos, sendo maior ($p < 0,05$) à partir da espermatogônia do tipo In.

5.5. Vacúolos nucleares em espermatogônias A_{ind}

Nos camundongos heterozigotos $Utp14b^{jsd+/-}$ com os testículos no escroto, ou seja, em condições normais de temperatura testicular, foi observado que o número de A_{ind} sem vacúolos foi maior ($p < 0,05$) que o número das A_{ind} com vacúolo. Nos outros grupos experimentais, o número relativo de espermatogônias A_{ind} sem e com vacúolos foi aproximadamente semelhante (Fig. 13).

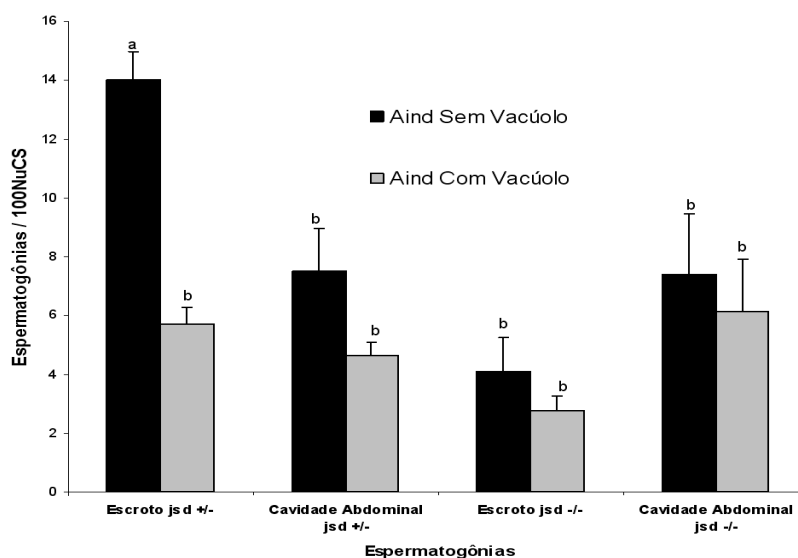


Figura 13 – Número relativo das espermatogônias A_{ind} sem vacúolos e com vacúolos nucleares nos camundongos $Utp14b^{jsd+/-}$ e $Utp14b^{jsd-/-}$ com testículos no escroto e na cavidade abdominal. Diferentes letras (a,b) indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). NuCS, nucléolo de célula de Sertoli.

Ao analisar nos camundongos $jsd^{+/-}$ a cinética das espermatogônias A_{ind} , com vacúolos e sem vacúolos nucleares por estágio do ciclo do epitélio seminífero, foi observado que, de uma forma geral, não existem diferenças entre estes tipos celulares nos testículos localizados na bolsa escrotal e na cavidade abdominal (Fig. 14).

Nos grupos dos camundongos mutantes não foi feita a análise das espermatogônias A_{ind} sem e com vacúolos por estágio do ciclo do epitélio seminífero, pois, devido à depleção

de células que estes animais sofreram não foi possível determinar de forma precisa os estádios do ciclo do epitélio seminífero.

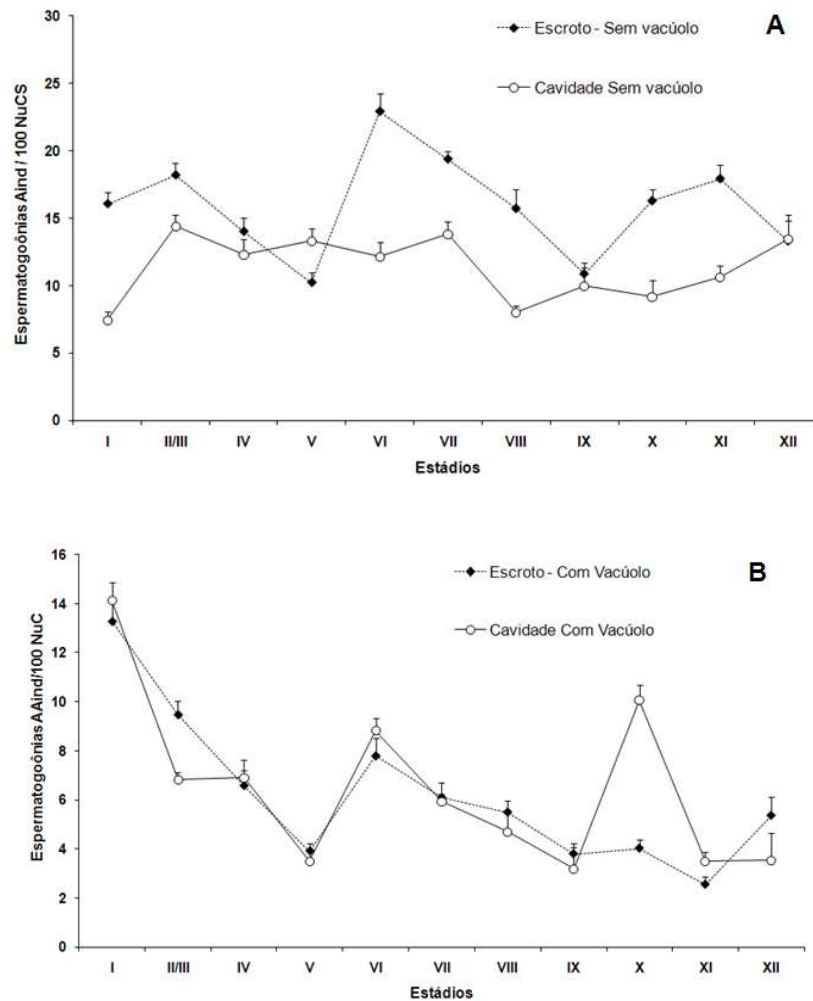


Figura 14 – Número de espermatogônias A_{ind} sem vacúolos (A) e com vacúolos (B) por estágio do ciclo do epitélio seminífero nos camundongos heterozigotos $Utp14b^{jsd+/-}$. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os diferentes estádios dentro do mesmo grupo comparado horizontalmente

5.6 Mitoses e apoptoses

Foi verificado, nos camundongos $jsd^{+/-}$, o efeito da temperatura no número de mitoses e apoptoses por estágio do ciclo do epitélio seminífero. Não foi observado diferenças significativas no número relativo de mitoses espermatogoniais quando os testículos estavam localizados no escroto e na cavidade abdominal. (Fig.15A). O número de apoptoses ao longo do ciclo do epitélio seminífero foi praticamente constante nos diferentes estádios (Fig. 15B).

Nos camundongos mutantes não foi feita a análise das espermatogônias em mitoses e apoptoses por estágio do ciclo do epitélio seminífero, pois, devido à depleção de células

que estes animais sofreram não foi possível determinar com precisão os estádios do ciclo do epitélio seminífero.

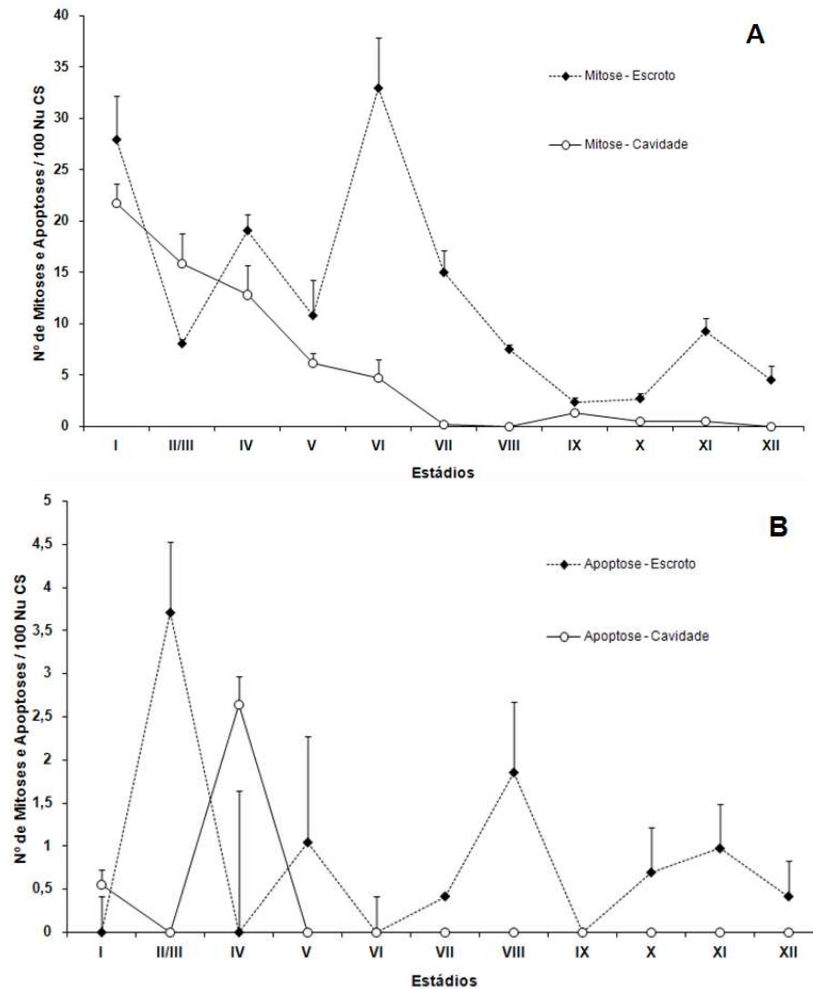


Figura 15 – Número relativo de mitoses e apoptoses das espermatogônias nos camundongos *Utp14b^{isd+/-}* com testículos no escroto e na cavidade abdominal por estágio do ciclo do epitélio seminífero. A comparação estatística foi feita na vertical entre os diferentes grupos no mesmo estágio do ciclo do epitélio seminífero. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os diferentes estádios dentro do mesmo grupo comparado horizontalmente.

Verificamos também o efeito da temperatura nas mitoses e apoptoses entre os animais *jsd^{+/-}* e *jsd^{-/-}* com testículos em diferentes posições anatômicas, no escroto e na cavidade abdominal. Foi observado que o número de mitoses entre o grupo heterozigoto com testículo na bolsa escrotal e mutante com testículo na cavidade abdominal foram semelhantes entre si, sendo diferentes do grupo heterozigoto com testículo na cavidade abdominal e mutante com testículo no escroto (Fig. 16).

Entre os números de apoptoses nos diferentes grupos não foi encontrada diferença significativa (Fig. 16).

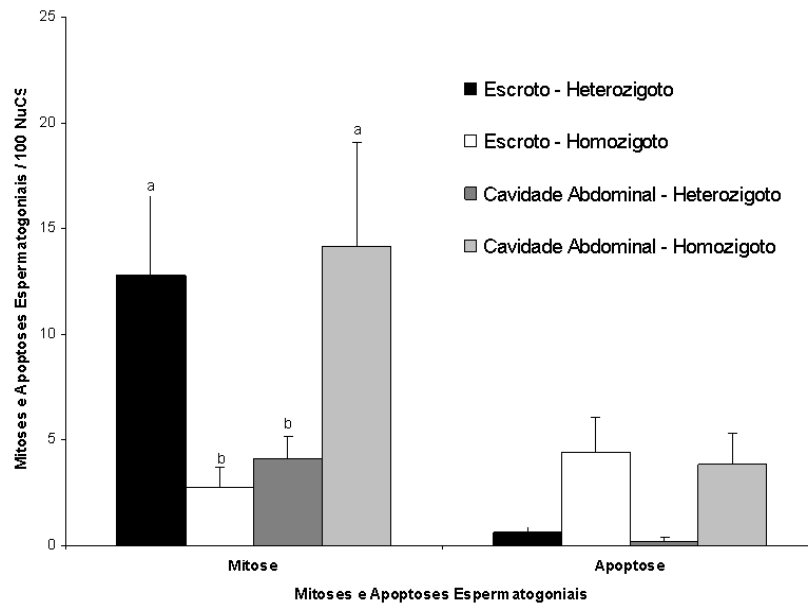


Figura 16 – Número relativo de mitoses e apoptoses das espermatogônias nos camundongos $Utp14b^{jsd+/-}$ (heterozigoto) e $Utp14b^{jsd-/-}$ (homozigoto) com testículos no escroto e na cavidade abdominal. Diferentes letras (a,b) indicam diferença estatística ($p < 0,05$). Os valores foram comparados estatisticamente entre mitoses e apoptoses separadamente.

6. DISCUSSÃO

Este trabalho utilizou como modelo experimental camundongos mutantes $Utp14b^{jsd/-}$ para estudar alguns parâmetros da biologia espermatogonial que não puderam ser esclarecidos quando avaliados em camundongos normais. Esta mutação não afeta o processo espermatogênico nas primeiras ondas da espermatogênese, porém, falha logo após a puberdade justamente no processo de diferenciação das espermatogônias do tipo A (de Rooij et al., 1999). Devido à depleção progressiva no processo espermatogênico ocasionada por esta mutação, quando o animal atinge 8 semanas de idade, apenas espermatogônias e células de Sertoli podem ser visualizadas nos túbulos seminíferos (de Rooij et al., 1999). Desta forma, estes animais se tornam azoospérmicos e estéreis. Neste modelo, e utilizando o animal heterozigoto ($Utp14b^{jsd+/-}$) como controle, avaliou-se os efeitos da temperatura sobre a biologia espermatogonial. Esta temperatura foi elevada para aquela intraperitoneal através de cirurgia, fazendo-se criptorquidismo experimental unilateral. Nesta condição, em um mesmo animal um testículo seria o controle do outro, em relação à temperatura testicular. Desta forma, todos os parâmetros por nós avaliados em relação à biologia espermatogonial levaram em consideração quatro fatores: o fato do animal ser (1) heterozigoto ou (2) mutante e se a temperatura era mais (3) baixa (escroto) ou (4) elevada (abdômen).

O período necessário para que o criptorquidismo pudesse afetar a produção espermática seria aquele relacionado à duração da espermatogênese. Este período tem duração variável entre as espécies. Por exemplo, enquanto no homem a duração da espermatogênese é de ~74 dias (Heller et al., 1964), em camundongos é de ~38.7 dias (Kluin et al., 1982). Quando o tempo de criptorquidismo coincide com o da duração da espermatogênese de uma determinada espécie, o resultado encontrado é de uma redução drástica do peso testicular com perda expressiva das células germinativas. Normalmente são encontradas nesta situação apenas células de Sertoli, espermatogônias indiferenciadas e algumas em diferenciação (de Rooij et al., 1999). Como o objetivo deste trabalho foi o de estudar apenas a cinética espermatogonial, decidiu-se por um período de criptorquidismo

mais curto, somente por sete dias. Partimos do pressuposto que durante este período de temperatura elevada às alterações que pudessem acontecer nas células da linhagem espermatogonial já seriam perceptíveis morfologicamente. De fato, verificou-se, no presente trabalho, que neste período de sete dias de temperatura elevada houve realmente alteração da cinética espermatogonial, tanto nos animais mutantes quanto nos heterozigoto, alterações estas que discutiremos a seguir. A escolha do período de criptorquidismo mostrou-se adequada para nossos propósitos visto que os efeitos provocados no processo espermatogênico, obtidos no presente trabalho, coincidem com aquele descrito por Kluin et al. (1982) os quais determinaram que um ciclo do epitélio seminífero em camundongos dura ~8,6 dias e que este período é o necessário para o desenvolvimento espermatogonial completo, até as espermatogônias do tipo B.

O efeito da temperatura em relação ao número de espermatogônias na cinética espermatogonial foi pela primeira vez avaliada utilizando a técnica histológica de MLAR. Esta técnica, sabidamente, permite a distinção dos diferentes tipos espermatogoniais de camundongos utilizando apenas a morfologia nuclear como parâmetro (Chiarini-Garcia & Russell, 2001). Neste trabalho, a distinção entre estes tipos celulares permitiu verificar que a alteração da temperatura interferiu na cinética espermatogonial, tanto nos animais heterozigotos ($Utp14b^{jsd+/-}$) como nos mutantes ($Utp14b^{jsd-/-}$).

Segundo Meistrich et al. (1973), temperaturas entre 18 e 30°C não produzem alterações histológicas aparentes na estrutura testicular (interstício e epitélio seminífero). Porém, eles demonstraram que a histologia de testículos mantidos acima de 32°C apresenta anormalidades. Trabalho mais recente (Shetty & Weng, 2004) também demonstrou que a temperatura corporal, isto é acima de 37°C, é capaz de causar severas alterações morfológicas no epitélio seminífero. Ao analisarmos morfologicamente os testículos criptorquídicos dos animais heterozigotos foi possível observar também a degeneração do epitélio seminífero, no entanto, devido ao curto tempo de exposição à temperatura mais elevada, as alterações das células germinativas foram menos severas, sendo mais evidentes apenas nas células da linhagem espermatogonial. Resultados semelhantes, porém usando um tempo maior de criptorquidismo experimental, foram observados por diferentes autores (Payne, 1956; Golbderg & Hawtrey, 1968; Meistrich et al., 1973, Shetty & Weng, 2004).

Segundo Hua et al. (2000) a temperatura influencia o desenvolvimento das células germinativas e o ciclo celular, sendo que a temperatura testicular mais baixa que a temperatura corporal, no escroto dos mamíferos, é em grande parte favorável à espermatogênese gerando novas células germinativas e favorecendo o processo de maturação das mesmas. Então, o aumento da temperatura de forma induzida, por exemplo, pelo criptorquidismo, pode causar um bloqueio ou anormalidades no processo

espermatogênico (Thonneau et al., 1998) apesar das espermatogônias serem até certo ponto resistentes ao aumento da temperatura (Hua et al., 2000). É sabido que as divisões celulares são ativadas por fatores promotores de maturação que depende da subunidade catalítica p34^{cdc2} (indutor de START, ou seja, o comprometimento com o início da duplicação do DNA) e da subunidade regulatória ciclina B1 (participa da indução da mitose ativando a proteína-quinase). Estes componentes são peças chaves na maquinaria de controle do ciclo celular, desempenhando um papel fundamental na gametogênese (Mejer et al., 1991). Tem sido demonstrado que índices elevados de p34^{cdc2} e de ciclina B1 em testículos de ratos e camundongos desempenham importante papel na espermatogênese e maturação espermática. Hua et al. (2000) comprovam que a temperatura abdominal não interfere na transcrição das proteínas p34^{cdc2} e ciclina B1 nas espermatogônias e espermatócitos primários em paquíteno/diplóteno, porém, bloqueia a tradução dessas proteínas específicas. Com a deficiência desses dois tipos proteicos devido à elevação da temperatura, as espermatogônias e os espermatócitos primários paquíteno/diplóteno são incapazes de produzirem fator promotor de maturação, uma vez que não sofrem cariocinese.

De acordo com Shetty et al. (2001) e Tohda et al. (2001), o aumento anormal da testosterona intratesticular observada nos animais mutantes *jsd* inibe diretamente a diferenciação espermatogonial através da ação do receptor-mediador de andrógenos, permitindo visualizar nesses testículos presentes na bolsa escrotal (temperaturas mais baixas) apenas espermatogônias do tipo A e células de Sertoli (Shetty & Weng, 2004 e Bolden-Tiller et al., 2007). Quando esses testículos de animais mutantes foram submetidos ao tratamento com flutamida (competidor de receptor de andrógenos) ou ao aumento de temperatura (devido ao criptorquidismo), a taxa de testosterona intratesticular diminuiu aumentando a taxa de diferenciação celular, ou seja, restaurando a espermatogênese nos animais mutantes. Estes autores demonstraram que nesta mutação houve uma inversão dos efeitos da temperatura sobre o processo espermatogênico. No entanto, até o momento, não há explicação para este fenômeno. Uma possibilidade do efeito da testosterona sobre a espermatogênese foi proposta por Hua et al. (2000) que demonstrou que a testosterona pode ser capaz de regular a expressão da ciclina B1 ao nível traducional nas células espermatogoniais.

Segundo de Rooij et al (1999), nos animais *jsd* mutantes a diferenciação das espermatogônias A_{al} em A_1 é prejudicada. Eles demonstraram que este processo é um passo vulnerável no processo espermatogênico e que também sofre influência da deficiência de vitaminas A, da mutação W/W e do aumento da temperatura testicular, bloqueando a divisão espermatogonial nesta etapa entre A_{al} e A_1 . No entanto, empregando o método de MLAR pudemos observar nos animais *jsd* mutantes que este bloqueio não foi

absoluto, visto que espermatogônias em fases mais avançadas de diferenciação (espermatogônias do tipo B), espermatócitos e espermatídes puderam ser encontradas no epitélio seminífero destes animais.

Quanto à cinética espermatogonial, isto é, as alterações morfológicas e morfométricas das células da linhagem espermatogonial durante o ciclo do epitélio seminífero, incluindo o número de espermatogônias com suas mitoses e apoptoses, o presente trabalho mostrou várias alterações em relação à mutação/temperatura. O número de espermatogônias já foi discutido anteriormente e, de forma resumida, verificou-se que nos animais heterozigotos o criptorquidismo por uma semana reduziu o número espermatogonial que se manteve proporcionalmente reduzido por todo o processo de diferenciação, desde as espermatogônias A_{ind} até as espermatogônias do tipo B. Já nos camundongos mutantes, o criptorquidismo estimulou a diferenciação espermatogonial, que foi mais evidente, e de forma progressivamente maior, a partir das espermatogônias do tipo A_3 .

Em relação às mitoses e apoptoses espermatogoniais, por estádios do ciclo do epitélio seminífero, não foram avaliadas nos animais mutantes visto que neles os estádios não puderam ser identificados. Desta forma, estes dados foram avaliados apenas nos camundongos normais $jsd^{+/}$. Em relação às mitoses espermatogoniais, verificou-se nos animais heterozigotos $jsd^{+/}$ que nos testículos posicionados no escroto elas foram encontradas distribuídas ao longo do ciclo do epitélio seminífero nos estádios onde deveriam ser encontradas, conforme descrito anteriormente por de Rooij (1998) em camundongos normais. Os picos de divisão mitótica ocorreram em estágios específicos onde conhecidamente as espermatogônias diferenciadas (A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , In e B) dividem umas nas outras. Cinética semelhante foi encontrada em hamsters (Nascimento et al., 2008) e jumentos (Chiarini-Garcia et al., 2009), utilizando também o método da MLAR. Mas no entanto, quando o testículo dos animais jsd mutantes foi colocado experimentalmente na cavidade abdominal, o número relativo de mitoses reduziu expressivamente. Já em relação às apoptoses, observamos que o seu número relativo não foi alterado pelo criptorquidismo experimental de 7 dias. Estes achados mostram que a temperatura pode, de forma direta ou indireta, afetar principalmente o ciclo celular e, por consequência, a cinética espermatogonial. De fato, como discutido anteriormente, as proteínas $p34^{cdc2}$ e ciclinas B1 que participam do ciclo celular, atuam diretamente no processo espermatogonial (Hua et al., 2000). Adicionalmente, este dado sugere que um dos principais impactos do criptorquidismo sobre a processo espermatogênico seria devido à redução das mitoses espermatogoniais, com pouco ou nenhum efeito das apoptoses espermatogoniais.

Ao avaliar a morfologia das espermatogônias dos camundongos heterozigotos com o testículo no escroto, verificou-se que apresentavam a mesma morfologia já descrita por

Chiarini-Garcia & Russell (2001) e Bolden-Tiller et al. (2007). Estas espermatogônias foram, assim, consideradas morfológicamente normais. Mas, quando este testículo foi colocado experimentalmente na cavidade abdominal, algumas alterações morfológicas foram observadas no núcleo das espermatogônias. Este achado sugere que mesmo num animal fenotipicamente normal, como é o caso do camundongo *Utp14b^{jsd+/-}*, o aumento da temperatura pode afetar a morfologia nuclear das espermatogônias. Estudo sobre o desenvolvimento ontogenético de espermatogônias de camundongos normais (Drumond, 2007), desde o nascimento até a idade adulta, demonstrou que nos animais jovens, com idade entre 4 e 11 dias podiam ser encontradas alterações morfológicas nas espermatogônias semelhantes àquelas encontradas por nós nos animais *jsd^{+/-}*. A alteração mais comumente encontrada foi a de células com fenótipo de espermatogônias A diferenciadas (A_1 , A_2 , A_3 e A_4), mas com a presença de vacúolo nuclear, que numa cinética normal são apenas encontradas na espermatogônias do tipo A_{ind} .

Nos animais normais, quando os testículos criptorquídicos retornam para o escroto, a espermatogênese também é completamente restaurada, indicando que as espermatogônias mantêm, pelo menos em parte, sua funcionalidade quando submetidas ao aumento da temperatura (Nishimune et al., 1978). A menos que a temperatura da cavidade abdominal cause danos nas células troncos, frações celulares coletadas de testículos de camundongos criptorquídicos são ricas em células tronco germinativas, uma vez que a maioria das células em diferenciação foram eliminadas do epitélio seminífero (Shinohara et al., 2000). Experimento recente realizado pelo nosso grupo de pesquisa comprova que as espermatogônias-tronco de animais criptorquídicos são eficientes em colonizar testículos de animais irradiados, após o transplante de células germinativas (dados não publicados).

Já nos camundongos mutantes, foram freqüentes as alterações morfológicas das espermatogônias presentes nos testículos posicionados no escroto, mas estas alterações foram encontradas com mais freqüência nos testículos criptorquídicos. Estes achados em conjunto sugerem que as alterações morfológicas das espermatogônias não estão obrigatoriamente relacionadas com a mutação, mas sim com processos de ativação/inativação espermatogonial, possivelmente relacionadas com o ciclo celular. Estudos complementares fazem-se necessários para desvendar esta questão.

A presença de vacúolos nucleares foi descrita em condições normais apenas nas espermatogônias do tipo A_{ind} de camundongos (Chiarini-Garcia & Russel, 2001). No entanto, após criptorquidismo experimental por uma semana e nos camundongos mutantes *jsd*, (independente da localização do testículo) os vacúolos nucleares foram também observados em células que eram morfológicamente similares as espermatogônias do tipo A em diferenciação. Portanto, acredita-se que nos camundongos heterozigotos as espermatogônias A_{ind} com vacúolo, por não sofrerem efeito da temperatura (ao contrário do

que acontece com as espermatogônias normais e sem vacúolo), seriam células numa fase do ciclo celular refratária aos efeitos do aumento da temperatura ou seriam uma população espermatogonial diferente daquela sem vacúolo.

No presente trabalho, chamou-nos a atenção o número relativo de espermatogônias indiferenciadas - A_{ind} - (A_{is} , A_{pr} e A_{al}) sem vacúolo e com vacúolo nos animais heterozigotos $Utp14b^{jsd+/-}$, quando os testículos estavam em localizações diferentes. Nestes animais fenotipicamente normais, as espermatogônias A_{ind} apresentavam uma cinética semelhante àquela descrita por de Rooij (1998) para camundongos normais. No entanto, quando o testículo foi colocado na cavidade abdominal o número de espermatogônias A_{ind} sem vacúolo reduziu mostrando que o criptorquidismo interferiu no número de espermatogônias A_{ind} sem vacúolo. Mas, para nossa surpresa, fazendo-se a mesma comparação entre as espermatogônias A_{ind} com vacúolos, observou-se que o seu número foi praticamente idêntico independente da posição do testículo no escroto ou na cavidade abdominal. Este achado é intrigante, pois nos mostra que neste tipo de célula não ocorreram os efeitos causados pelo criptorquidismo por uma semana. Desta forma, acreditamos que as espermatogônias A_{ind} com vacúolo possam estar numa fase do ciclo celular refratária aos efeitos da temperatura ou mesmo que seja uma população celular diferente daquela sem vacúolo. Para confirmar estas hipóteses, novos delineamentos experimentais fazem-se necessários.

7. CONCLUSÕES

Do presente trabalho foi possível obter as seguintes conclusões:

1. O período de uma semana de criptorquidismo foi suficiente para alterar a morfologia das células da linhagem espermatogonial, principalmente do núcleo, tanto nos camundongos heterozigotos quanto nos mutantes.
2. Nos camundongos heterozigotos o número da maioria dos diferentes tipos espermatogoniais reduziu significativamente após o criptorquidismo experimental enquanto nos homozigotos, de uma forma antagônica, as espermatogônias do tipo In e B tiveram seu número aumentado.
3. Confirmou-se que o criptorquidismo de animais *jsd* mutantes foi capaz de estimular a diferenciação espermatogonial restaurando o processo espermatogênico.
4. Existem duas populações de espermatogônias A_{ind} nos camundongos heterozigotos que são sensíveis, de forma diferente, ao aumento da temperatura pelo criptorquidismo. Aquelas sem vacúolos nucleares que reduzem seu número após o criptorquidismo e aquelas com vacúolos que mantém o mesmo número mesmo quando o testículo é colocado dentro da cavidade abdominal.
5. O criptorquidismo atua de forma diferente sobre a proliferação das espermatogônias nos camundongos estudados. Enquanto nos *jsd^{+/-}* inibe, nos *jsd^{-/-}* estimula as mitoses espermatogoniais.
6. Nos camundongos heterozigotos as espermatogônias A_{ind} com vacúolo, são células numa fase do ciclo celular refratária aos efeitos do aumento da temperatura ou são uma população espermatogonial diferente daquela sem vacúolo.
7. O aumento da temperatura testicular provoca alterações morfológicas das espermatogônias nos camundongos heterozigotos.
8. Nos camundongos mutantes o número de espermatogônias A_{ind} com vacúolo nuclear alterada com a mudança da temperatura testicular.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beamer W. G.; Cunliffe-Beamer T. L.; Shultz K. L.; Langley S. H.; Roderick T. H. Juvenile spermatogonial depletion (jsd): a genetic defect of germ cell proliferations of male mice. *Biology of Reproduction*, v.38, p.899-908, 1988.
- Boettger-Tong H. L.; Johnston D. S.; Russell L. D.; Griswold M. D.; Bishop C. E. Juvenile spermatogonial depletion (jsd) mutant seminiferous tubules are capable of supporting transplanted spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, v.63, p.1185-1191, 2000.
- Bolden-Tiller O. U.; Chiarini-Garcia H.; Poirier C.; Alves-Freitas D.; Weng C. C.; Shetty G.; Meistrich M. L. Genetic Factors Contributing to Abnormal Spermatogonial Differentiation in Juvenile Spermatogonial Depletion (jsd) Mice. *Biology of Reproduction*, v. 77, p.237-246, 2007.
- Bradley J.; Baltus A.; Skaletsk H.; Royce-Tolland M.; Dewar K.; Page D. C. An X-to-autosome retrogene is required for spermatogenesis in mice. *Nature Genetics*, v.36, p.872-876, 2004.
- Chiarini-Garcia H.; Russel, L. D. High resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biology of Reproduction*, v.65, p.1170-1178, 2001.
- Chiarini-Garcia H.; Hornick J. R.; Griswold M. D.; Russell L. D. Distribution of Type A Spermatogonia in the Mouse Is Not Random. *Biology of Reproduction*, v.65, p.1179-1185, 2001.
- Chiarini-Garcia H.; Russell L. D. Characterization of mouse spermatogonial types by electron microscopy. *Reproduction*, v.123, p.567-577, 2002.
- Chiarini-Garcia H.; Raymer, A. M.; Russel, L. D. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction*, v.126, p.669-680, 2003.
- Chiarini-Garcia H.; Meistrich, M. L. High resolution light microscopic characterization of spermatogonia. In: *Germline Stem Cell*. Ed. S. X. Hou and S. R. Singh, ed, Totowa NJ, USA: Humana Press. v.450, p.95-107, 2008.

- Chiarini-Garcia H.; Alves-Freitas D.; Barbosa I. S.; Almeida F. R. L. C. Evaluation of the seminiferous epithelial cycle, spermatogonial kinetics and niche in donkeys (*Equus asinus*). *Animal Reproduction Science*, v.116, p.139-154, 2009.
- Clegg R. V. Further studies on artificial cryptorchidism: quantitative changes in the interstitial cells of the rat testis. *Journal of Endocrinology*, v.21, p.433-441, 1961.
- Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *American Journal of Anatomy*, v.112, p.35-51, 1963.
- Clermont Y.; Bustos-Obregon, E. Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto". *American Journal of Anatomy*, v.122, p.237-248, 1968.
- Damber J. E.; Bergh A.; Janson P. O., Testicular blood flow and testosterone concentrations in the epermatic venous blood in rats with experimental cryptorchidism. *Acta Endocrinol (Copenh)*, v. 88, p. 611-618, 1978.
- de Rooij D. G. & Janseen J. M. The regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the Chinese hamster I: Undifferentiated spermatogonia. *The Anatomical Record*, v.217, p.124-130, 1987.
- de Rooij D. G. & Lok D. The regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the Chinese hamster II: Differentiating spermatogonia. *The Anatomical Record*, v.17, p.131-136, 1987.
- de Rooij, D. G. Stem cells in the testis. *International Journal of Experimental Pathology*, v.79, p.67-80, 1998.
- de Rooij, D. G.; Grootegoed, J. A. Spermatogonial stem cell. *Current Opinion in Cell Biology*, v.10, p.694-701, 1998.
- de Rooij, D. G.; Okabe M.; Nishimune Y. Arrest of epermatogonial differentiation in jsd/jsd, SI17H/SI17H, and cryptorchid mice. *Biology of Reproduction*, v.61, p.842-847, 1999.
- de Rooij, D. G.; Russel, L. D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of Andrology*, v.21, p.776-798, 2000.
- de Rooij D. G. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction*, v.121, p.347-354, 2001.
- Drumond A. L.; França L. R.; Chiarini-Garcia H. High Resolution light microscopy identification of different spermatogonial types, during the testis development in mice. *Animal Reproduction*, v.3, p.189, 2006.
- Drumond A. L. Ontogenia e cinética espermatogoniais em camundongos. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, 2007.

- França, L. R.; Russel L. D. The testis of domestic animals. *In Reproduction a multidisciplinary overview*, Martinez, F. e Regadera, J. (eds.). Churchill Livingstone, Madrid, p.197-219, 1998.
- França L. R.; Chiarini-Garcia H. Célula de Sertoli. *In: Células. Uma abordagem multidisciplinar*, Carvalho HF, Collares-Buzato CB eds., Barueri, SP: Manole, cap.24, p.302-324, 2005.
- Goldberg, E. & Hawtrey, C. The effect of experimental cryptorchidism on the isozymes of lactate dehydrogenase in mouse testes. *The journal of Experimental Zoology*. v.167, p.411. 1968.
- Heller C.G.; Matson L.J.; Moore D.J. Rate of spermatogenesis in man determined by incorporating tritiated thymidine into testes. In: Carlson WD, Gassner FX, eds. *Effects of Ionizing Radiation on the Reproductive System*. New York, NY: Macmillian, p.263 –267, 1964.
- Hua K. W.; Gu Z.; Lu J. N.; Tso J. K. Temperature dependent expression of cdc2 and cyclinB1 in spermatogenic cells during spermatogenesis. *Cell Research*, v.10, p.289-302, 2000.
- Huckins C.; Oakberg, E. F. Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules, I. The normal testes. *The Anatomical Record*, v.192, p.519-28, 1978.
- Kerr J B, Rich K A, de Kretser D M. Alteration of the fine structure and androgen secretion of the Interstitial Cells in the Experimentally Cryptorchid Rat Testis. *Biology of Reproduction*, v.20, p.409-422, 1979(a).
- Kerr J. B.; Rich K. A.; de Kretser D. M. Effects of experimental cryptorchidism on the ultrastructure and function of the Sertoli cell and peritubular tissue of the rat testis. *Biology of Reproduction*, v.21, p.823-838, 1979(b).
- Kluin, P. M.; Kramer, M. F.; de Rooij, D. G. Spermatogenesis in the immature mouse proceeds faster than in the adult. *Internacional Journal of Andrology*, v.5, p.282-294, 1982.
- Kojima Y.; Kominami K.; Dohmae K.; Nonomura N.; Miki T.; Okuyama A.; Nishimune Y.; Okabe M. Cessation of spermatogenesis in juvenile spermatogonial depletion (*jsd/jsd*) mice. *Internacional Journal of Urology*, v.38, p.500-507, 1997.
- Kumar T. R.; Wang Y.; Lu N.; Matzuk M. M. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature Genetics*, vol.15, p.201-204, 1997.
- Leblond C. P.; Clermont Y. Definitions of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.55, p.548-573, 1952.

- Leeson T. S.; Leeson C. R. Experimental cryptorchidism in the rat. A light and electron microscopic study. *Investigative Urology*, v.8, p.127-144, 1970.
- McLachlan, R. I., Mallidis, C., Ma, K., Bhasin, S., de Kretser, D. M. Genetic disorders and spermatogenesis. *Reproduction Fertility and Development*. V.10, p.97-104, 1998.
- Meijer L.; Azzi L.; Wang J. Y.; Cyclin B targets p34cdc2 for tyrosine phosphorylation. *The EMBO Journal*, v.10, p.1545-1554, 1991.
- Meistrich M. L.; Eng V. W. S.; Loir M. Temperature effects on the kinetics of spermatogenesis in the mouse. *Cell Tissue Kinet*, v.6, p.379-393, 1973.
- Mendis- Handagama S. M. L. C.; Keer J. B.; Kretser D. M. Experimental cryptorchidism in adult mouse: I. Qualitative and quantitative light microscopic morphology. *Journal of Andrology*, v.11, p.539-547, 1990.
- Nascimento, H.F., Drumond A. L.; França, L.R., Chiarini-Garcia H. Spermatogonial morphology, kinetics and niches in golden hamsters exposed to short- and long- photoperiod. *International Journal of Andrology*, v. 32, p.486-497, 2008.
- Nishimune, Y., Aizawa, S., Komatsu, T. Testicular germ cell differentiation in vivo. *Fertility and Sterility*. V.29, p.95-102, 1978.
- Oakberg E. F. A descriptions of spermatogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *The American Journal of Anatomy*, v.99, p.391-413, 1956.
- Oakberg E.F. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anatomical Record*, v.169, p.515-532, 1971.
- Ohta H.; Yomogida K.; Tadokoro Y.; Tohda A.; Dohmae K.; Nishimune Y. Defect in germ cell, not in supporting cells, is the cause of male infertility in the *jsd* mutante mouse: proliferation of spermatogonial ítem cells without differentiation. *Internacional Journal of Andrology*, v.24, p.15-23, 2001.
- Payne, J. M. The degenerative changes in the adult mouse testis returned to the abdominal cavity. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, V.71, p.117, 1956.
- Rohozinski J.; Bishop C. E. The mouse juvenile spermatogonial depletion (*jsd*) phenotype is due to a mutation in the X-derived retrogene, mUtp14b. *PNAS*, v.101, p.11695-11700, 2004.
- Russel L. D.; Ettlín R. A.; Sinha Hikim A. P.; Clegg E. D. Histological and histopathological evaluation of the testis. *Vienna, IL, Cache River Press*, 280 p., 1990.
- Russell L.R.; Burguet S. Ultrastructure of Leydig cells as revealed by secondary tissue treatment with ferrocyanide-osmium mixture. *Tissue and Cell*, v.9, p.751-766, 1977.
- Russel L. D.; Chiarini-Garcia H. Korsmeyer, S. J.; Knudson, C. M.; Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, v.66, p.950-958, 2002.

- Sharpe R. M. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill, JD. (Eds.) *The Physiology of Reproduction*. 2nd. Ed. Raven Press, Ltd. New York, v.1363, 1434 p., 1994.
- Shetty G.; Wilson G.; Huhtaniemi I.; Boettger-Tong H.; and Meistrich M. L. Testosterone inhibits spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion mice. *Endocrinology*, v.142, p.2789-2795, 2001.
- Shetty G.; Weng C. C. Y. Cryptorchidism rescues spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion (jsd) mice. *Endocrinology*, v.145, p.126-133, 2004.
- Shetty G.; Weng C. C. Y.; Porter K. L.; Zhang Z.; Pakirinen P.; Kumar T. R.; Meistrich M. L. Spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion (jsd) mice with androgen receptor or follicle-stimulating hormone mutations. *Endocrinology*, v.147, p. 3563-3570, 2006.
- Shinohara T., Avarbock M. R., Brinster R. L. Functional Analyses os Spermatogonial Stem Cells in Steel and Cryptorchid Infertile Mouse Models. *Developmental Biology*, v.220, p.401-411, 2000.
- Sprando R. L.; Perfusion of the rats tetis through the heat using heparin. In. *Histological and Histopathological Evaluation of the testis*. (ed. Russel L. D.; Ettlín R. A.; Sinha Hikin A. P.; Clegg E. D.) Cache River Press: Vienna, USA, p.277-280, 1990.
- Thonneau P. Bujan L.; Multigner L.; Mieuxset R. Occupational heat exposure and male fertility: a rewiew. *Human Reproduction*, v.13, p.2122-2125, 1998.
- Tohda A.; Matsumiya K.; Tadokoro Y.; Yomogida K.; Miyagawa Y.; Dohmae K.; Okuyama A.; Nishimune Y. Testosterone suppress spermatogenesis in juvenile spermatogonial depletion (jsd) mice. *Biology of Reproduction*, v.65, p.532-537, 2001.