

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Morfologia

**AVALIAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DOS TESTÍCULOS DE  
CAMUNDONGOS ADULTOS CONTROLES E DEFICIENTES PARA  
iNOS, TRATADOS OU NÃO COM PROPIL-TIOURACIL  
DURANTE O PERÍODO PÓS-NATAL**

Nathália de Lima e Martins Lara

Belo Horizonte  
2014

Nathália de Lima e Martins Lara

**AVALIAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DOS TESTÍCULOS DE  
CAMUNDONGOS ADULTOS CONTROLES E DEFICIENTES PARA  
VÍCIOS, TRATADOS OU NÃO COM PROPIL-TIOURACIL  
DURANTE O PERÍODO PÓS-NATAL**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Renato de França

Belo Horizonte  
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG  
2014

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

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

“Para ser grande, sê inteiro; nada teu exagera ou exclui; sê todo em cada coisa; põe quanto és no mínimo que fazes; assim, em cada lago a lua toda brilha, porque alta vive.”

*(Fernando Pessoa)*

“Têm sido freqüente e enfaticamente afirmado que a origem do homem nunca será conhecida; mas a ignorância freqüentemente desperta mais confiança que a sabedoria: são os que pouco sabem e não os que sabem muito, que afirmam categoricamente que este ou aquele problema jamais será solucionado pela ciência.”

*(Charles Darwin)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, principalmente, aos meus pais, pelo apoio, suporte, paciência, amor incondicional, compreensão e dedicação. Vocês são a base de tudo que sou hoje, meus exemplos de vida e valores. Muito obrigado por tudo. Amo vocês!

Ao professor Luiz Renato de França pela oportunidade, orientação, ensinamentos, incentivo e confiança depositada.

Ao Igor, pela presença, compreensão, apoio, amor, paciência e companheirismo. Você é parte deste trabalho junto comigo.

A todos das famílias Martins, Castro e Lara, pelo amor, carinho, apoio e momentos de descontração. E também à família do Igor, que sempre me acolheu com muito carinho.

À todos os meus amigos, aos presentes e àqueles que em algum momento passaram pela minha vida, que me ensinaram e me deram forças, me divertiram e me apoiaram, e, especialmente agora, aguentaram minha ausência e falta de vida social.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular, pela companhia, pelos momentos de alegria e diversão, aprendizado e troca de conhecimentos, cooperação, disponibilidade de ensinar e ajudar: Carol, Gleide, Gui, Tânia, Paulo, Luiz Henrique, Michelle, Mariana, Roberto, Marcela, André, Bárbara, Thaís, Camila, Mara. Especialmente à Samyra, por ter me ajudado tanto neste mundo da biologia molecular, e à Sarah, pelos anos que trabalhamos juntas e por todos os ensinamentos e apoio.

Ao professor Rodrigo Resende, por ter disponibilizado a estrutura do seu laboratório e colaborado neste trabalho, assim como aos seus alunos, especialmente à Bruna, à Fernanda e ao Anderson.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite e pela disponibilidade de análise e avaliação do trabalho.

Aos amigos, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

À CAPES pela bolsa concedida.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada!

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Peso testicular e índice gonadossomático em camundongos selvagens e  $iNOS^{-/-}$ , tratados ou não com PTU .....34
- Figura 2:** Secções histológicas ilustrando o parênquima testicular de camundongos selvagens, selvagens tratados com PTU,  $iNOS^{-/-}$  e  $iNOS^{-/-}$  tratados com PTU .....35
- Figura 3:** Diâmetro tubular e comprimento dos túbulos seminíferos por testículo em camundongos selvagens e  $iNOS^{-/-}$ , tratados ou não com PTU .....36
- Figura 4:** Frequência de estádios do ciclo do epitélio seminífero em camundongos selvagens, selvagens tratados com PTU,  $iNOS^{-/-}$  e  $iNOS^{-/-}$  tratados com PTU .....37
- Figura 5:** Número total de células de Sertoli por testículo, índice de células de Sertoli, Produção Espermática Diária por testículo e por grama de testículo, em camundongos selvagens e  $iNOS^{-/-}$ , tratados ou não com PTU .....38
- Figura 6:** Volume celular e número total de células de Leydig por testículo em camundongos selvagens e  $iNOS^{-/-}$ , tratados ou não com PTU .....39
- Figura 7:** Quantificação da expressão do mRNA do gene Sox9 no testículo de camundongos selvagens e  $iNOS^{-/-}$  .....40
- Figura 8:** Expressão do receptor de andrógeno no testículo de camundongos selvagens e  $iNOS^{-/-}$  .....41
- Figura 9:** Expressão do receptor de andrógeno por estágio do ciclo do epitélio seminífero no testículo de camundongos selvagens e  $iNOS^{-/-}$  .....42
- Figura 10:** Quantificação da expressão do mRNA das enzimas StAR e  $3\beta$ -HSD no testículo de camundongos selvagens e  $iNOS^{-/-}$  .....43

**Figura 11:** Expressão de aromatase no testículo de camundongos selvagens e  $iNOS^{-/-}$  .....44

**Figura 12:** Quantificação da expressão do mRNA dos receptores de estrógeno  $ER\alpha$  e  $ER\beta$  no testículo de camundongos selvagens e  $iNOS^{-/-}$  .....45

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Sequência e concentração dos *primers* utilizados para os estudos de expressão gênica .....46

**Tabela 2:** Programa de qPCR utilizado para quantificação da expressão gênica .....47

**Tabela 3:** Peso corporal e dados biométricos e morfométricos do testículo de camundongos selvagens e  $iNOS^{-/-}$ , tratados ou não com PTU .....48

**Tabela 4:** Números corrigidos e razões celulares obtidos através de contagens celulares de secções transversais de túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero em camundongos selvagens e  $iNOS^{-/-}$ , tratados ou não com PTU .....49

**Tabela 5:** Morfometria das células de Leydig em camundongos selvagen e  $iNOS^{-/-}$ , tratados ou não com PTU .....50

## RESUMO

Em camundongos e ratos o período de proliferação pós-natal das células de Sertoli encerra-se com duas a três semanas de idade. Na literatura já está bem estabelecido que o FSH e os hormônios tireoidianos (T3 e T4) são responsáveis, respectivamente, pela proliferação e diferenciação das células de Sertoli. Nestes roedores, o hipotireoidismo induzido pelo tratamento com PTU (propil-tiouracil) durante o período pré-púbere estende a atividade mitótica destas células por cerca de uma a duas semanas, levando ao aumento no número de células de Sertoli por testículo, no peso testicular e na produção espermática diária. O óxido nítrico (NO) é um importante mediador de processos intra e extracelulares e a expressão constitutiva de iNOS (óxido nítrico sintase induzível) ocorre nas células de Leydig, Sertoli e germinativas, sugerindo assim importante papel regulatório desta enzima na espermatogênese e esteroidogênese. Estudos recentes do nosso laboratório mostraram que camundongos deficientes em iNOS também apresentam maior proliferação das células de Sertoli e menor índice de apoptoses de células germinativas, levando a maior produção espermática nestes animais. Ainda nestes estudos, maior número e menor volume individual das células de Leydig foram observados. No presente estudo tivemos como objetivos avaliar através de histomorfometria se a associação do hipotireoidismo neonatal com a deficiência em iNOS causa efeito aditivo no número de células de Sertoli por testículo. Além disso, tivemos também o objetivo caracterizar, através de imunohistoquímica e qPCR, o padrão de expressão de importantes marcadores da função testicular em camundongos adultos selvagens e iNOS<sup>-/-</sup>. Conforme esperado, os resultados por nós encontrados mostraram que maiores números de células de Sertoli por testículo foram observados nos grupos controle + PTU e no iNOS<sup>-/-</sup>. No entanto, surpreendentemente, efeito aditivo no número destas células não foi encontrado nos animais deficientes em iNOS tratados com PTU. Na segunda parte de nosso estudo, sugerindo que as células de Sertoli podem estar funcionalmente mais ativas, aumentos nos níveis de Sox9 e de receptor de andrógeno nestas células foram observados em camundongos iNOS<sup>-/-</sup>, o que provavelmente explicaria os menores índices de apoptoses de células germinativas já citados na literatura para estes animais. Quanto à via esteroidogênica, correlacionando com o menor volume citoplasmático das células de Leydig, os camundongos iNOS deficientes apresentaram menores níveis de StAR e de 3β-HSD. Finalmente, a expressão da enzima aromatase não se mostrou alterada nos animais iNOS<sup>-/-</sup>, enquanto aumento significativo foi observado somente nos níveis de receptores de estrógeno do tipo α. Em síntese, nossos resultados sugerem a existência de um possível mecanismo compensatório capaz de contrabalancear as alterações fisiológicas causadas pela deficiência de iNOS em camundongos. Ainda, uma provável interação entre estrógenos e óxido nítrico na regulação funcional no testículo de camundongos não pode ser descartada.

**Palavras-chave:** Camundongo; propiltiouracil (PTU); hipotireoidismo; iNOS; óxido nítrico; testículo; espermatogênese; célula de Sertoli; célula de Leydig; esteroidogênese.



## ABSTRACT

In rodents (mice and rats), Sertoli cells proliferate until 2 to 3 weeks after birth and it is well established in the literature that FSH and thyroid hormones (T3 and T4) are responsible, respectively, for Sertoli cells proliferation and differentiation. It is also known that transient hypothyroidism induced by PTU (propylthiouracil) treatment during the postnatal period extends the mitotic activity of Sertoli cells, leading to higher numbers of these cells per testis, as well as higher testis weight and daily sperm production. The nitric oxide (NO) is an important mediator of intra and extra cellular processes, playing therefore a crucial role in several physiological and pathological conditions, and some studies have shown that NO reduces testosterone production *in vitro* and *in vivo*. In the testis, constitutive expression of iNOS (inducible nitric oxide synthase) occurs in Leydig, Sertoli and germ cells, suggesting a regulatory function of this enzyme in spermatogenesis and steroidogenesis. In this context, recent studies from our laboratory showed that iNOS deficient mice presents higher Sertoli cell proliferation and lower germ cell apoptosis, leading also to higher daily sperm production. In these mice a higher number and lower individual volume of Leydig cell is observed. Our aims in the present study were to evaluate if the association between the neonatal hypothyroidism and the iNOS deficiency is able to promote additive effect in the total number of Sertoli cell per testis. We also aimed at characterizing, by immunohistochemistry and qPCR, the expression of important markers of testis function in adult wild type and iNOS<sup>-/-</sup> mice. As expected, our results showed higher numbers of Sertoli cell per testis in the wild type mice treated with PTU and in the iNOS<sup>-/-</sup> mice. However, surprisingly, no additive effect was observed for the number of these cells in the iNOS deficient mice treated with PTU. Suggesting that Sertoli cells could be functionally more active, in the second part of this study we observed higher expression of Sox9 and androgen receptor in these cells in the testis of iNOS<sup>-/-</sup> mice; and these findings could explain, at least in part, the lower germ cell apoptosis described in the literature for iNOS deficient mice. Regarding the steroidogenic pathway, the iNOS<sup>-/-</sup> mice showed lower levels of StAR and 3β-HSD, and this could be related with the smaller individual volume of the Leydig cells. Finally, the aromatase expression showed no difference between wild type and iNOS<sup>-/-</sup>, whereas the mRNA levels of estrogen receptor α were increased in the testis of iNOS deficient mice. In summary, our data suggest the existence of a possible compensatory mechanism to counterbalance the physiological changes caused by iNOS deficiency in mice. Furthermore, a possible interaction between estrogens and nitric oxide in the functional regulation of mice testis cannot be ruled out.

**Palavras-chave:** Mouse; propylthiouracil (PTU); hypothyroidism; iNOS; nitric oxide; testis; spermatogenesis; Sertoli cell; Leydig cell; steroidogenesis.

# SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	1
1.1 – Estrutura do testículo em mamíferos .....	1
1.2 – Diferenciação e desenvolvimento pós-natal do testículo .....	1
1.3 – Proliferação, maturação e função das células de Sertoli .....	3
1.4 – Espermatogênese .....	6
1.5 – Células de Leydig .....	8
1.6 – Óxido nítrico e espermatogênese .....	9
<b>2 – JUSTIFICATIVA</b> .....	11
<b>3 - OBJETIVOS</b> .....	12
3.1 – Objetivos Gerais .....	12
3.2 – Objetivos Específicos .....	12
<b>4 - MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	13
4.1 – Animais .....	13
4.2 – Hipotireoidismo experimental .....	13
4.3 – Avaliação histomorfométrica .....	14
4.3.1 – Coleta e processamento dos testículos .....	14
4.3.2 – Proporção volumétrica (%) e volume dos componentes do testículo..	14
4.3.3 – Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos .....	15
4.3.4 – Frequência de estádios do ciclo do epitélio seminífero .....	15
4.3.5 – Volume de células de Leydig e do núcleo de células de Sertoli .....	16
4.3.6 – Número de células de Leydig e de Sertoli por testículo .....	16
4.3.7 – Contagens e razões celulares .....	16
4.3.8 – Produção espermática diária (PED) .....	17
4.4 – Avaliação da expressão gênica por qPCR .....	17
4.5 – Imunohistoquímica .....	18
4.6 – Análises Estatísticas .....	20
<b>5 – RESULTADOS</b> .....	21
5.1 – Pesos corporal e testicular e índice gonadossomático .....	21
5.2 – Análise histomorfométrica .....	21
5.2.1 – Histologia testicular .....	21

5.2.2 – Proporção volumétrica dos componentes testiculares .....	21
5.2.3 – Diâmetro tubular e comprimento dos túbulos seminíferos .....	21
5.2.4 – Frequência de estádios do ciclo do epitélio seminífero .....	22
5.2.5 – Números de células germinativas e razões celulares .....	22
5.2.6 – Células de Sertoli e Produção Espermática Diária .....	22
5.2.7 – Células de Leydig .....	23
5.3 – Análises de expressão gênica e proteica .....	23
5.3.1 – Sox9 .....	23
5.3.2 – Receptor de Andrógeno .....	23
5.3.3 – Enzimas esteroidogênicas (StAR e 3 $\beta$ -HSD) .....	24
5.3.4 – Aromatase .....	24
5.3.5 – Receptores de Estrógeno .....	24
<b>6 – DISCUSSÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>7 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>33</b>
<b>8 – ANEXOS (FIGURAS E TABELAS) .....</b>	<b>34</b>
<b>9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>

# 1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 Estrutura do testículo de mamíferos

O testículo dos mamíferos é um órgão de forma arredondada ou ovóide, com funções exócrina e endócrina e que está localizado no escroto na maioria das espécies. Este órgão é envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, a túnica albugínea, que envia septos para o seu interior, formando os lóbulos testiculares. Seu parênquima pode ser morfofuncionalmente dividido em dois compartimentos: o compartimento intersticial (intertubular) e o compartimento dos túbulos seminíferos (tubular). No primeiro estão localizadas as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células e fibras do tecido conjuntivo, além de outras células como macrófagos, fibroblastos e mastócitos (RUSSELL et al., 1990). O compartimento tubular compreende os túbulos seminíferos, que, na maioria dos mamíferos, ocupam de 70 a 90% do parênquima testicular e se estendem numa rede de alças convolutas que se conectam com a *rete testis*, localizada na região do mediastino testicular (FRANÇA & RUSSELL, 1998; FRANÇA et al., 2005; HESS & FRANÇA, 2007). Os túbulos seminíferos são compostos por túnica própria, epitélio seminífero e lume tubular. A túnica própria reveste os túbulos externamente, e é constituída de matriz extracelular e células peritubulares mióides, que são contráteis e auxiliam na propulsão dos espermatozoides e do fluido tubular (RUSSELL et al., 1990). O epitélio seminífero é composto pelas células de Sertoli e pelas células germinativas em diferentes estágios do processo espermatogênico (RUSSELL et al., 1990). A região central dos túbulos é chamada de lume, e é resultante do acúmulo de fluido secretado pelas células de Sertoli sob influência de andrógenos, principalmente (WRIGHT et al., 1981; JEGOU et al., 1983; SHARPE et al., 1994; DE GENDT et al., 2004; WELSH et al., 2009). Este fluido tubular possui substâncias importantes para a função epididimária e é responsável por carrear os espermatozoides ainda imóveis através dos ductos excurrentes até o epidídimo, onde estes gametas sofrerão maturação funcional (RUSSELL et al., 1990; COOPER & YEUNG, 2006; SULLIVAN et al., 2007).

## 1.2 Diferenciação e desenvolvimento pós-natal do testículo

Os dois tipos celulares que formam o epitélio seminífero têm origem embriológica distinta: as células germinativas são procedentes do epiblasto adjacente ao mesoderma extra-embrionário, enquanto as células de Sertoli são originadas do epitélio celomático

(KARL & CAPEL, 1998; CAPEL, 2000). Em camundongos, a crista urogenital origina-se do mesoderma intermediário por volta de 9,5 dias pós-coito (dpc) e as gônadas começam a se desenvolver a partir da superfície ventromedial do mesonévro aos 10 dpc (TILMANN & CAPEL, 2002). As células germinativas primordiais (PGC) se originam do epiblasto adjacente ao mesoderma extra-embriônico cerca de 7,5 dpc (BENDEL-STENZEL et al., 1998; ROSS & CAPEL, 2005) e migram da base do alantóide ao longo do intestino posterior, enquanto proliferam ativamente. Ao atingir a crista gonadal, entre 10 a 11 dpc (ROSS & CAPEL, 2005), as PGCs passam a ser chamadas de gonócitos quando são envolvidas pelas células de Sertoli, formando os cordões seminíferos. O surgimento desses cordões é considerado o primeiro indicador morfológico da diferenciação sexual (FRANÇA & CHIARINI-GARCIA, 2005).

A célula de Sertoli é o primeiro elemento somático a se diferenciar no testículo e suas precursoras expressam o gene determinante sexual *Sry* no braço curto do cromossomo Y (KARL & CAPEL, 1998; CAPEL, 2000). Este gene é responsável por iniciar uma cascata de ativação de genes específicos do testículo e/ou repressão de genes envolvidos no desenvolvimento ovariano. Portanto, na ausência de expressão de *Sry*, o desenvolvimento gonadal ocorre ao longo da via ovariana (MARTINEAU et al., 1997; TILMANN & CAPEL, 2002; ROSS & CAPEL, 2005). Dessa maneira, as células de Sertoli possuem papel crucial na diferenciação e no desenvolvimento testicular, que ocorre cerca de 11,5 dpc em camundongos (CAPEL, 2000). Outro gene crucial nesta fase do desenvolvimento gonadal é o *Sox9*, cuja proteína de mesmo nome regula a transcrição do hormônio anti-mülleriano (AMH) e que parece ter importante atuação na diferenciação e função das células de Sertoli, sendo expresso nestas células desde o período fetal até a fase adulta (KENT et al., 1996; HARLEY et al., 2003; WILHELM et al., 2007). Após a formação do testículo, a masculinização é direcionada por três hormônios: o AMH, fator de insulina do tipo 3 (INSL3) e testosterona (SHARPE, 2006). Dessa forma, a diferenciação do sistema reprodutor masculino envolve dois principais eventos: a formação do testículo, controlada por componentes genéticos, iniciando pela expressão de *Sry*; e a manutenção e diferenciação dos ductos mesonévrícos (ductos de Wolffian), regulado, em parte, por andrógenos (WELSH et al., 2006, 2009).

À semelhança do observado na maioria das espécies de mamíferos, o desenvolvimento pós-natal do testículo de camundongos e ratos pode ser dividido em duas fases distintas (ORTH, 1993; FRANÇA et al., 2000). Na primeira, com duração aproximada de

duas semanas após o nascimento, pode-se observar extensiva proliferação de espermatogônias e de células de Sertoli, promovendo crescimento em comprimento dos cordões testiculares. Já na segunda fase, que ocorre de quinze dias a várias semanas após o nascimento, acentuado aumento no número de células germinativas e na população de células de Leydig adultas é observado (ORTH, 1993; FRANÇA et al., 2000; MENDIS-HANDAGAMA & ARIYARATNE, 2001). Evidente crescimento no tamanho do testículo e no diâmetro tubular, além de secreção de fluido pelas células de Sertoli, também ocorrem nesta fase. Essas duas fases são reguladas por diferentes hormônios e fatores de crescimento específicos, como o FSH, hormônios tireoidianos, andrógenos, AMH, PDGF $\alpha$ , GATA-4, entre outros (ORTH, 1993; FRANÇA et al., 1995; SINGH & HANDELSMAN, 1996; MARAN et al., 1999; MENDIS-HANDAGAMA & ARIYARATNE, 2001; ALLAN et al., 2004).

### **1.3 Proliferação, maturação e função das células de Sertoli**

Em mamíferos, sabe-se que as células de Sertoli proliferam mais ativamente durante a fase fetal, após a diferenciação sexual, tendo um pico de proliferação antes do nascimento (ORTH, 1984; ORTH et al., 1988; ORTH, 1993). Contudo, após o nascimento, sua proliferação se estende, diminuindo de forma constante, por 2 semanas em camundongos e ratos (STEINBERGER & STEINBERGER, 1971; ORTH, 1982; VERGOUWEN et al., 1991; JOYCE et al., 1993; AUHAREK & FRANÇA, 2010). Os mecanismos que regulam essa proliferação ainda são pouco conhecidos, mas é fortemente sugerido pela literatura que no período neonatal o hormônio folículo estimulante (FSH) é o principal fator responsável pela proliferação das células de Sertoli (ORTH, 1984, 1993; HECKERT & GRISWOLD, 2002) e o crescimento testicular parece acompanhar o aumento nos níveis de FSH durante o desenvolvimento (OJEDA & RAMÍREZ, 1972; DÖHLER & WUTTKE, 1974). Alguns estudos mostram ainda que os andrógenos também são importantes na proliferação das células de Sertoli na fase fetal (SHARPE et al., 2003; SCOTT et al., 2007, 2008; AUHAREK et al., 2012) e no período pós-natal (SHARPE et al., 2003; JOHNSTON et al., 2004; ATANASSOVA et al., 2005; AUHAREK & FRANÇA, 2010; AUHAREK et al., 2012), assim como os estrógenos produzidos pela aromatização de andrógenos sob a influência de FSH (ORTH, 1984, 1993).

De forma contrária, principalmente via p27 e p21, os hormônios tireoidianos são responsáveis pela transição do estado mitótico para o não-mitótico

(maturação/diferenciação) das células de Sertoli que ocorre antes da puberdade (COOKE et al., 1994; FRANÇA et al., 1995; COOKE et al., 2005; HOLSBERGER et al., 2005). Assim, altas concentrações de T3 durante o período neonatal levam a uma redução do número de células de Sertoli, da produção espermática e do peso testicular nos animais adultos, devido à diminuição do período de proliferação e à aceleração do processo de maturação destas células (VAN HAASTER, et al., 1992, 1993; COOKE et al., 1994; FRANÇA et al., 1995; COOKE, 1996; AUHAREK & FRANÇA, 2010). De maneira antagônica, a redução na concentração dos hormônios tireoidianos torna mais lenta a transição da fase proliferativa para a fase madura/não-mitogênica da célula de Sertoli, resultando em prolongamento da fase mitogênica e consequente aumento da população adulta de células de Sertoli, produção espermática e peso do testículo (VAN HAASTER, et al., 1992; JOYCE et al., 1993; FRANÇA et al., 1995; COOKE, 1996).

Os hormônios tireoidianos agem nos órgãos alvo através dos seus receptores, codificados por dois genes, TR $\alpha$  e TR $\beta$  (COOKE, 1996; HOLSBERGER & COOKE, 2005). Diferentes isoformas de ambos são expressas no testículo, mas a expressão de TR $\alpha$ 1 parece ser a mais abundante, ocorrendo em células de Leydig e germinativas na fase adulta e, principalmente, no núcleo de células de Sertoli em proliferação, diminuindo sua expressão à medida que esta célula sofre maturação (COOKE, 1996; BUZZARD et al., 2000; HOLSBERGER et al., 2005; FUMEL et al., 2012). Por inibir a síntese dos hormônios tireoidianos e a conversão da tiroxina (T4) em triiodotironina (T3), o PTU (6-propil-2-tiouracil) é uma droga bociogênica, comumente utilizada para tratar casos de hipertireoidismo (COOKE & MEISAMI, 1991). Assim, esta droga tem sido muito utilizada em estudos envolvendo os efeitos do hipotireoidismo na espermatogênese em várias espécies de mamíferos (COOKE, 1991; COOKE & MEISAMI, 1991; COOKE et al., 1992, 1993; JOYCE et al., 1993; HESS et al., 1993; COOKE et al., 1994; FRANÇA et al., 1995; KIRBY et al., 1996; JANSEN et al., 2007; AUHAREK & FRANÇA, 2010). Particularmente em ratos, durante o tratamento com PTU os níveis de gonadotrofinas (FSH e LH) encontram-se reduzidos, indicando que a maior proliferação observada para as células de Sertoli ocorre mesmo com baixos níveis de FSH (KIRBY et al., 1992; VAN HAASTER et al., 1992) sabidamente considerado o principal fator mitogênico destas células (ORTH, 1984, 1993; HECKERT & GRISWOLD, 2002). No entanto, sugerindo fortemente que o FSH ainda exerce importante papel na proliferação das células de Sertoli

em ratos hipotireóidicos, estudos em nosso laboratório demonstraram que, enquanto antagonistas de GnRH diminuíram significativamente a atividade mitótica destas células (MIRANDA, 2006), o tratamento com FSH propiciou marcante efeito aditivo no número final das células de Sertoli (MIRANDA, 2002).

Durante a fase de maturação das células de Sertoli, no período que antecede a puberdade, ocorre a formação da barreira de células de Sertoli (barreira hemato-testicular), secreção e transporte do fluido tubular (formação do lume tubular), desenvolvimento do citoesqueleto de actina, além de extensa proliferação de espermatócitos primários (GONDOS & BERNDSTON, 1993; FRANÇA et al., 2000). Embora existam controvérsias, especialmente em relação à espécies de reprodução sazonal (THOMPSON & BERNDTSON, 1993; MEACHEM et al., 2005; TARULLI et al., 2012), é considerado que em mamíferos as células de Sertoli não se dividem após a puberdade (RUSSELL et al., 1990; FRANÇA & RUSSELL, 1998). Portanto, em condições fisiológicas, no testículo de animais sexualmente maduros as células de Sertoli estão completamente diferenciadas e sua população permanece estável, não se observando apoptose destas células, provavelmente devido a sua proteção pela proteína anti-apoptótica *Bcl/w* (RUSSELL et al., 2001; ROSS et al., 2001).

Cada célula de Sertoli é capaz de suportar um número relativamente fixo de células germinativas, de maneira espécie-específica (ORTH et al., 1988; FRANÇA & RUSSELL, 1998; HESS & FRANÇA, 2007). Neste contexto, o aumento da população de células de Sertoli propicia maior disponibilidade de nichos espermatogoniais, resultando em maior proliferação das células germinativas, bem como de outros tipos celulares do testículo tais como células de Leydig e peritubulares mióides (HESS et al., 1993; FRANÇA et al., 1995; AUHAREK & FRANÇA, 2010; AUHAREK et al., 2012). Portanto, o número de células de Sertoli estabelecido durante o período que antecede a puberdade determina, em última análise, o tamanho do testículo e a magnitude da produção espermática no indivíduo adulto (HESS et al., 1993; SHARPE, 1994; FRANÇA & RUSSELL, 1998; HESS & FRANÇA, 2007).

A variação considerável na forma e estrutura da célula de Sertoli durante o ciclo do epitélio seminífero demonstra o alto grau de plasticidade desta célula e reflete as alterações morfológicas e funcionais que ocorrem nas células germinativas (RUSSELL et al., 1993). Além da formação da barreira de célula de Sertoli, cuja base funcional são as junções de oclusão entre células de Sertoli adjacentes, estas células desempenham outras funções essenciais



para o desenvolvimento das células germinativas tais como: fornecimento de nutrientes e outros fatores importantes para as células espermatogênicas; suporte físico (sustentação) para as células germinativas; participação ativa no processo de liberação (espermição) das espermátides para o lume tubular; secreção de fluido em direção ao lume tubular; fagocitose do excesso de citoplasma (corpos residuais) resultante da diferenciação das espermátides e fagocitose de células germinativas que sofrem apoptose. Pelo fato de apresentar receptores para FSH, andrógenos, estrógenos e hormônios tireoidianos, a célula de Sertoli faz também a intermediação hormonal do processo espermatogênico (RUSSELL et al., 1990; SHARPE, 1994; FRANÇA & RUSSELL, 1998; HESS & FRANÇA, 2007; NÓBREGA et al., 2009; SCHULZ et al., 2010).

#### **1.4 Espermatogênese**

A espermatogênese é um processo cíclico, complexo, bem organizado e coordenado, que ocorre no interior dos túbulos seminíferos, no qual as espermatogônias diplóides se dividem e se diferenciam para formar o gameta masculino haplóide, denominado de espermatozóide. Baseado em características morfológicas e funcionais, o processo espermatogênico nos mamíferos pode ser dividido em três fases: fase proliferativa ou espermatogonial; fase meiótica ou espermatocitária; e fase de diferenciação ou espermiogênica (RUSSELL et al., 1990). A fase espermatogonial é caracterizada por sucessivas divisões mitóticas das espermatogônias, quando ocorre sua auto-renovação ou diferenciação, podendo gerar espermatogônias-tronco ou células comprometidas com o processo espermatogênico. Após uma série de divisões celulares, cujo número depende da espécie e é filogeneticamente determinado, as espermatogônias originarão os espermatócitos primários, dando assim início à fase espermatocitária ou meiótica (DE ROOIJ & RUSSELL, 2000). Nesta fase, ocorre a duplicação do DNA, a recombinação gênica e a segregação dos cromossomos homólogos. Após a segunda divisão meiótica, os espermatócitos secundários darão origem a células haplóides, denominadas espermátides (HESS & FRANÇA, 2007). Na terceira fase, espermiogênica, acontece um complexo processo de diferenciação, que inclui a formação do acromossoma e do flagelo e a compactação do DNA, através da substituição das histonas por protaminas, quando as espermátides arredondadas se alongam progressivamente para originar células altamente especializadas, os espermatozoides. Estes últimos, após passarem pelo processo de maturação no

epidídimo, estarão aptos a fertilizar o ovócito (RUSSELL et al., 1990; SHARPE, 1994; EDDY, 1999; HESS & FRANÇA, 2007).

As células germinativas não estão aleatoriamente distribuídas no epitélio seminífero, mas se organizam em associações celulares denominadas estádios, que se sucedem de maneira ordenada, formando o ciclo do epitélio seminífero (CES) (RUSSELL et al., 1990). Estes estádios podem ser classificados através de dois métodos. O método da morfologia tubular, que considera a morfologia e a localização dos núcleos das espermatídes, além da associação das mesmas com outros tipos de células germinativas e a presença de figuras de meiose, e oito estádios do CES são sempre caracterizados por esse método (AMANN & ALMQUIST, 1962; COUROT et al., 1970; ORTAVANT et al., 1977; BERNDTSON, 1977; FRANÇA & RUSSELL, 1998; FRANÇA et al., 2005). Já no método do sistema acrossômico, que classifica os estádios de acordo com o desenvolvimento do acrossoma nas espermatídes e as características morfológicas dos seus núcleos, a quantidade de estádios varia de forma espécie-específica (LEBLOND & CLERMONT, 1952; RUSSELL et al., 1990; FRANÇA et al., 2005; HESS & FRANÇA, 2007); em camundongos, 12 estádios são caracterizados (RUSSELL et al., 1990; HESS & FRANÇA, 2007). A duração total do processo espermatogênico, desde espermatogônia do tipo A até a espermição, abrange 4,5 ciclos e varia de 30 a 75 dias nos mamíferos já estudados (RUSSELL et al., 1990; FRANÇA & RUSSELL, 1998; FRANÇA et al., 2005). A duração de cada CES é uma constante biológica espécie-específica (CLERMONT, 1972) e está sob o controle do genótipo da célula germinativa (FRANÇA et al., 1998).

Comparado com outros sistemas bem conhecidos de auto-renovação, a espermatogênese é um dos que apresenta maior número de divisões celulares. Em várias espécies de mamíferos, como roedores, ovino e suíno, uma espermatogônia passa por aproximadamente 10 divisões celulares até se tornar um espermatócito, o qual ainda sofre duas divisões meióticas. Assim, teoricamente, uma espermatogônia isolada é capaz de formar até 4096 espermatozoides, levando a produção diária de cerca de 4 a 80 milhões de espermatozoides por grama de testículo nas diferentes espécies de mamíferos investigadas (SHARPE, 1994; FRANÇA & RUSSELL, 1998; DE ROOIJ & RUSSELL, 2000; HESS & FRANÇA, 2007; CORDEIRO-JÚNIOR et al., 2010). Outro aspecto que merece ser ressaltado é o fato do desenvolvimento e função do epitélio seminífero estarem intimamente relacionados com o desenvolvimento das células somáticas do testículo (FRANÇA et al., 2000; AUHAREK et al.,

2012), sendo a célula de Sertoli considerada fundamental para o desenvolvimento das células germinativas, devido à todas as suas funções já citadas (HESS et al., 1993; FRANÇA et al., 1995; SHARPE et al., 2003; HESS & FRANÇA, 2007).

### 1.5 Células de Leydig

De forma geral, a célula de Leydig é o principal componente do compartimento intertubular (RUSSELL et al., 1990), sendo a fonte de andrógenos, principalmente testosterona, e outros esteróides no testículo. Sua função esteroidogênica, estimulada pelo LH, é evidenciada pela sua ultraestrutura, onde são observados abundante retículo endoplasmático liso, numerosas gotículas lipídicas e mitocôndrias com cristas tubulares contendo enzimas associadas à síntese de esteróides (RUSSELL et al., 1990, 1996).

A síntese da testosterona ocorre a partir do colesterol, que é captado e translocado para a membrana interna da mitocôndria pela proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR) (BARDIN, 1996; MILLER & BOSE, 2011). Esta enzima é expressa nas adrenais e gônadas, e sua produção é induzida pelo LH (MILLER & BOSE, 2011; FAN & PAPADOPOULOS, 2013). A via esteroidogênica se inicia então na mitocôndria, com a conversão do colesterol em pregnenolona, pelo citocromo p450<sub>scc</sub> (*side chain cleavage*; Cyp11a1). A pregnenolona é transportada ao retículo endoplasmático liso, onde ocorrem sucessivas reações, através das enzimas 3 $\beta$ -HSD e p450<sub>c17</sub> (Cyp17a1), até a formação da androstenediona, que é convertida em testosterona pela enzima 17 $\beta$ -HSD. Após sua síntese, a testosterona age no próprio testículo ou é liberada na corrente sanguínea. Na maioria das células-alvo, esta molécula é convertida em diidrotestosterona (DHT) pela enzima 5 $\alpha$ -redutase, uma vez que a DHT apresenta maior afinidade pelo receptor (AR), sendo portanto um potente andrógeno (RUSSELL & WILSON, 1994; JIN & PENNING, 2001).

Os andrógenos atuam na diferenciação do trato genital masculino e da genitália externa na fase fetal (PELLINIEMI et al., 1996), nas células de Sertoli e peritubulares mióides, estimulando a produção de numerosos fatores importantes para as células germinativas. Além disso, os andrógenos são responsáveis pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários e manutenção quantitativa da espermatogênese (SHARPE, 1994; ZIRKIN et al., 1994; DE GENDT et al., 2004), embora já tenha sido mostrado que o FSH também participa na manutenção da espermatogênese (RUSSELL et al., 1993; MEACHEM et al., 1999).

Ainda na célula de Leydig ocorre a produção de estrógenos, a partir da testosterona ou do seu precursor androstenediona, pela ação da enzima aromatase (p450arom) (COLLETA & CARVALHO, 2005), que também parece estar presente no acrossoma em células germinativas e em células de Sertoli imaturas (PAPADOPOULOS et al., 1986; CARREAU et al., 1988; NITTA et al., 1993). Estes estrógenos agem via seus receptores nucleares, do tipo alfa (ER $\alpha$ ) ou beta (ER $\beta$ ), que estão presentes nas células testiculares, mostrando que estes hormônios desempenham importantes funções no testículo (HESS et al., 1997; CARREAU & HESS, 2010; JOSEPH et al., 2011).

### 1.7 Óxido nítrico e espermatogênese

O óxido nítrico (NO) é um importante mediador de processos intra e extracelulares e é produzido via oxidação de L-arginina em L-citrulina, através de enzimas conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS), que existem em três isoformas: eNOS (endotelial), iNOS (induzível) e nNOS (neuronal) (LAUBACH et al., 1995; THOMAS et al., 2008). Diferentemente de nNOS e eNOS, a atividade biológica de iNOS é independente de mudanças na concentração de cálcio intracelular (NATHAN; XIE, 1994) e sua regulação parece ocorrer ao nível de indução gênica, refletindo sua nomenclatura de enzima induzível (GUO et al., 1995). As três isoformas de NOS mencionadas estão presentes nos testículos de mamíferos (LEE & CHENG, 2008) e a expressão constitutiva de iNOS ocorre nas células de Leydig, Sertoli e germinativas em ratos e camundongos, sugerindo assim importante papel regulatório desta enzima na espermatogênese (STÉPHAN et al., 1995; TATSUMI et al., 1997; O'BRYAN et al., 2000; KON et al., 2002). Neste contexto, a produção de óxido nítrico por essa isoforma parece ser um mediador das diferentes etapas que ocorrem durante o processo espermatogênico e o NO pode assim estar envolvido em processos de regulação das células de Sertoli (O'BRYAN et al., 2000; AUHAREK et al., 2011, 2012).

Ainda, a produção de NO pela enzima iNOS tem sido proposta como modulador da produção de testosterona pelas células de Leydig (O'BRYAN et al., 2000), e já foi mostrado que o NO reduz a produção deste hormônio *in vivo* (ADAMS et al., 1992, 1994) e *in vitro* (DEL PUNTA et al., 1996; WEISSMAN et al., 2005; NEE PATHAK & LAL, 2008; LAL & DUBEY, 2013). Essa ação inibitória do óxido nítrico sobre as células de Leydig parece ocorrer através da inibição das enzimas esteroideogênicas p450sc (Cyp11a1) (DREWETT et al., 2002) e P450c17 (Cyp17a1) (POMERANTZ & PITELKA, 1998). Quando em baixas concentrações, o NO parece

estimular a esteroidogênese, através da ativação da via de sinalização sGC/cGMP (VALENTI et al., 1999; ANDRIC et al., 2007). Em termos funcionais, dados da literatura, inclusive de nosso laboratório, mostram que camundongos iNOS deficientes apresentam maiores números de células de Sertoli e de Leydig e menor índice de apoptoses de células germinativas e, conseqüentemente, maior produção espermática (LUE et al., 2003; AUHAREK et al., 2011, 2012). Possivelmente, pelo menos em parte, estas alterações estão relacionadas a maiores níveis de andrógenos devido à deficiência de NO nestes animais.

## 2 - JUSTIFICATIVA

Conforme já foi salientado, a enzima iNOS é constitutivamente expressa na maioria dos tipos celulares presentes no testículo e estudos recentemente desenvolvidos em nosso laboratório com camundongos  $iNOS^{-/-}$  sugerem que, possivelmente devido à sua ação inibitória da esteroidogênese nas células de Leydig (ADAMS et al., 1994; O'BRYAN et al., 2000), o óxido nítrico pode ser um importante fator regulatório da proliferação de células de Sertoli (AUHAREK et al., 2011, 2012). Neste contexto, a deficiência de NO parece aumentar a atividade mitótica das células de Sertoli, além de reduzir a apoptose de células germinativas (LUE et al., 2003; AUHAREK et al., 2011, 2012). Pelo fato do hipotireoidismo neonatal transitório aumentar o período de proliferação das células de Sertoli (VAN HAASTER et al., 1992; COOKE et al., 1994; FRANÇA et al., 1995; COOKE, 1996; AUHAREK & FRANÇA, 2010), torna-se importante verificar se esta abordagem pode resultar em efeito aditivo na atividade mitótica destas células em camundongos  $iNOS^{-/-}$ . Este efeito já foi observado em estudos desenvolvidos em nosso laboratório utilizando ratos hipotireóidicos tratados com FSH (MIRANDA, 2002). Além deste importante aspecto, pretendemos obter ainda melhor entendimento acerca do papel do óxido nítrico na regulação morfofuncional do testículo, avaliando a expressão de importantes marcadores da função testicular de camundongos  $iNOS^{-/-}$  na idade adulta, através de análises de expressão protéica e gênica, utilizando-se imunohistoquímica e qPCR.

## 3 - OBJETIVOS

### 3.1 – Objetivos Gerais

O objetivo do presente estudo é o de avaliar os efeitos do hipotireoidismo experimental transitório nos testículos de camundongos deficientes para a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Além disso, temos também como objetivo caracterizar o padrão de expressão de diferentes genes e proteínas nos testículos de camundongos adultos selvagens e iNOS deficientes.

### 3.2 – Objetivos Específicos

I- Avaliar através de histomorfometria o testículo de camundongos adultos sexualmente maduros selvagens e iNOS<sup>-/-</sup>, tratados ou não com propiltiouracil (PTU), com ênfase nos seguintes parâmetros:

- a) Determinação da proporção volumétrica e do volume líquido ocupado pelos diferentes componentes do parênquima testicular;
- b) Cálculo do diâmetro tubular e comprimento total dos túbulos seminíferos;
- c) Determinação da frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero;
- d) Obtenção do volume e número de células de Sertoli e de Leydig;
- e) Estimativa dos índices meiótico e de célula de Sertoli;
- f) Cálculo da produção espermática diária.

II- Investigar, através de imunohistoquímica e qPCR, a expressão das seguintes proteínas nos testículos de camundongos selvagens e iNOS<sup>-/-</sup>: Sox9; Receptor de andrógeno (AR); StAR; 3β-HSD; Aromatase; Receptor de estrógeno α (ERα); e Receptor de estrógeno β (ERβ).

## 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 – Animais

No presente estudo foram utilizados camundongos selvagens da linhagem C57BL6/J procedentes do Centro de Bioterismo (Cebio) do ICB/UFMG e camundongos deficientes em iNOS (iNOS<sup>-/-</sup>; B6.129P2 – Nos2tm1Lau/J, stock number 002609), procedentes do *The Jackson Laboratory*. Estes camundongos foram mantidos no biotério do Laboratório de Biologia Celular, sob ciclo claro/escuro de 12:12 horas, recebendo água e ração *ad libitum*. Conforme será detalhado posteriormente, estes animais foram divididos em diferentes grupos, que foram submetidos ao hipotireoidismo experimental ou a análises imunohistoquímicas e de expressão gênica. O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da UFMG (CETEA) sob o número de protocolo 48/2010.

### 4.2 – Hipotireoidismo experimental

O PTU (6-propil-2-tiouracil; P-3755, Sigma) foi a droga utilizada para induzir o hipotireoidismo neonatal transitório nos camundongos selvagens e iNOS deficientes. Esta droga foi adicionada à água de beber das mães lactantes desde o nascimento da ninhada até vinte dias pós-parto, nas concentrações de 0,006%, 0,012% a 0,036% (p/v) (COOKE et al., 1993). Desta forma, a droga ingerida pela mãe é transferida para os filhotes recém-nascidos através do leite materno, promovendo o hipotireoidismo nesses animais (KIRBY et al., 1992). Para melhorar a palatabilidade da solução contendo PTU, que tem sabor amargo, cerca de 10 gotas de adoçante comercial foram adicionadas por litro desta solução. As mães do grupo controle receberam apenas água e ração. Após o desmame, os camundongos machos receberam água pura e ração *ad libitum* até os 70 dias de idade, quando foram então sacrificados e seus testículos coletados. Nesta parte do nosso estudo quatro grupos foram estabelecidos, conforme mostrado a seguir: (I) selvagem eutireoideo (WT, n = 20); (II) selvagem tratado com PTU (WT + PTU, n = 15); (III) iNOS<sup>-/-</sup> eutireoideo (iNOS<sup>-/-</sup>, n = 16); e (IV) iNOS<sup>-/-</sup> tratado com PTU (iNOS<sup>-/-</sup> + PTU, n = 16). No total, 67 camundongos foram utilizados.



## **4.3 - Avaliação histomorfométrica**

### **4.3.1 Coleta e processamento dos testículos**

Aos 70 dias de idade, os camundongos dos quatro grupos já citados foram pesados e seus testículos fixados por perfusão intraventricular. Aproximadamente 15 minutos antes da perfusão os animais receberam injeção intraperitoneal de heparina (Liquemine, Roche; 125 UI/kg de peso corporal). O plano anestésico foi obtido através da injeção intraperitoneal de tiopental sódico (Thiopentax; 50mg/kg de peso corporal). Procedeu-se então a laparotomia e posterior toracotomia. Após cateter de 22G ser introduzido no ventrículo esquerdo, um pique foi feito no átrio direito e o leito vascular lavado com solução salina 0,9% a uma pressão de aproximadamente 80mmHg. Imediatamente após a retirada do sangue, iniciou-se a perfusão com o fixador glutaraldeído a 4% em tampão fosfato (0,05M, pH 7,3). Esta etapa de fixação durou aproximadamente 25-30 minutos e os testículos foram então retirados, pesados, seccionados e re-fixados por imersão por mais 12-24 horas no mesmo fixador, a 4°C. Em seguida, os fragmentos de testículo foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (70°, 80°, 90°, 95°, 95°), com trocas a cada 30 minutos. Estes fragmentos foram então incluídos em glicol metacrilato (Leica Historessin Embedding Kit) e posteriormente seccionados a 4µm em micrótomo JB-4 Sorvall com navalha de vidro. As secções histológicas obtidas foram coradas com azul de toluidina-borato de sódio a 1%, montadas com Entellan (Merck) e observadas em microscópio óptico. Em cada um dos quatro grupos avaliados, 6 camundongos foram escolhidos ao acaso para as análises histomorfométricas, tomando-se o cuidado de se selecionar dois animais tratados com cada uma das três doses de PTU utilizadas (0,006%, 0,012% e 0,036%).

### **4.3.2 Proporções volumétricas (%) e volume dos componentes do testículo**

As proporções volumétricas foram estimadas através de análises de imagens com a utilização do software *ImageJ* v1.47. Todas as imagens utilizadas foram capturadas em microscópio Olympus BX60 acoplado a câmera fotográfica em objetiva de 40X, adquiridas com resolução de 2576 X 1932 pixels (300 dpi). Em seguida, foi realizada a padronização da área de 9232 pixels por quadrado do retículo, conferindo um total de 540 pontos por imagem. Foram utilizadas 15 imagens por animal, perfazendo um total de 8100 pontos por animal. Dentre os diversos componentes testiculares avaliados foram contados pontos sobre

a túnica própria, epitélio seminífero, lume, célula de Sertoli, célula de Leydig, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, tecido conjuntivo e artefatos. O volume ( $\mu\text{L}$ ) de cada componente testicular avaliado foi estimado a partir do conhecimento do volume líquido do testículo, obtido subtraindo-se do peso bruto do testículo o peso da túnica albugínea (3,5% do peso testicular). Como a densidade do testículo é muito próxima de 1 (1,03 a 1,04; FRANÇA, 1991), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume. O volume de cada um destes componentes foi calculado conforme fórmula abaixo:

$$V = (V_T \cdot X) / 100$$

onde: V = volume do componente no testículo ( $\mu\text{L}$ )

$V_T$  = volume total do parênquima testicular ( $\mu\text{L}$ )

X = percentual (%) ocupado pelo componente no testículo

#### **4.3.3 Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos**

O diâmetro tubular médio ( $\mu\text{m}$ ) e a altura do epitélio seminífero foram obtidos a partir da mensuração ao acaso de 30 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentaram contorno o mais circular possível, utilizando-se ocular micrométrica de 10x e objetiva de 40x, com aumento final de 400x. O comprimento total dos túbulos seminíferos (CT), expresso em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal, através da fórmula abaixo (ATTAL & COUROT, 1963):

$$CT = VTS / \pi R^2$$

onde: VTS = volume líquido dos túbulos seminíferos no testículo

R = diâmetro tubular/2

#### **4.3.4 Frequência de estádios do ciclo do epitélio seminífero**

A frequência de cada estágio do ciclo do epitélio seminífero, caracterizados de acordo com o método do sistema acrossômico (RUSSELL et al., 1990), foi obtida a partir da contagem de pelo menos 200 secções transversais de túbulos seminíferos, que apresentavam formato o mais circular possível, por animal.

#### 4.3.5 Volume de células de Leydig e do núcleo de células de Sertoli

O cálculo do volume individual das células de Leydig foi feito utilizando-se retículo com 441 intersecções (pontos), em aumento de 1000x. Mil pontos sobre o núcleo ou o citoplasma das células de Leydig foram contados por animal, com a finalidade de se determinar a proporção (%) entre núcleo e citoplasma. Em outra etapa, o diâmetro nuclear médio destas células foi obtido, também em aumento de 1000x, medindo-se trinta núcleos para cada animal. Os núcleos medidos foram aqueles com forma mais arredondada possível, cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. A partir destes dados e aplicando-se as fórmulas abaixo, foram calculados o volume nuclear, o volume do citoplasma e, conseqüentemente, o volume total da célula de Leydig por animal.

- Volume nuclear =  $4/3\pi R^3$                       onde: R = raio nuclear (diâmetro nuclear/2)
- Volume citoplasmático = % citoplasma x volume nuclear / % núcleo
- Volume celular = volume nuclear + volume citoplasmático

Com relação às células de Sertoli, trinta núcleos com nucléolo evidente foram medidos em seus diâmetros maior e menor, em aumento de 1000x. Seu volume nuclear foi obtido da mesma forma já citada para o núcleo das células de Leydig.

#### 4.3.6 Número de células de Leydig e de Sertoli por testículo

A partir do volume individual da célula de Leydig e nuclear da célula de Sertoli, bem como do volume líquido ocupado pelos mesmos no parênquima testicular, o número destas células por testículo foi estimado, conforme fórmula abaixo:

$$NC = (V/V_n)$$

onde: NC = número total de cada tipo celular ( $\times 10^6$ )

V = volume líquido ocupado pela célula de Leydig ou núcleo da célula de Sertoli no parênquima testicular ( $\mu\text{L}$ )

$V_n$  = volume celular ou nuclear do tipo celular considerado ( $\mu\text{m}^3$ )

#### 4.3.7 Contagens e razões celulares

As contagens celulares foram obtidas em 10 secções transversais de túbulos seminíferos, com perfil arredondado, no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero, em aumento de 1000x. Os seguintes tipos celulares foram avaliados:

- Nucléolo de células de Sertoli
- Espermatócito primário em paquíteno
- Espermátides arredondadas

O diâmetro nuclear médio (DM) foi obtido através da média do diâmetro de 10 núcleos/nucléolos de cada tipo celular considerado, em aumento de 1000x. Todas as contagens celulares foram corrigidas para o diâmetro nuclear/nucleolar e espessura do corte histológico, utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann & Almquist (1962):

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

Para se estimar a eficiência da espermatogênese e da célula de Sertoli foram calculadas as seguintes razões entre as células:

- Índice Meiótico = Espermátides arredondadas/espermatócitos primários em paquíteno
- Índice (eficiência) da célula de Sertoli (ICS) = Espermátides arredondadas/nucléolo de célula de Sertoli

#### 4.3.8 Produção espermática diária (PED)

Esta estimativa foi feita através da seguinte fórmula (FRANÇA, 1992):

$$\text{PED} = \frac{\text{Nº total de células de Sertoli por testículo} \times \text{ICS} \times \text{frequência do estágio VII (\%)}}{\text{Duração do estágio VII (dias)}}$$

A duração do estágio VII foi baseada na frequência obtida pra este estágio e na duração do ciclo do epitélio seminífero estimada para camundongos C57BL/6J (AVELAR et al., 2003) e iNOS<sup>-/-</sup> (AUHAREK et al., 2011).

#### 4.4 – Avaliação da expressão gênica por qPCR

Aos 70 dias de idade, 3 camundongos selvagens e 4 iNOS<sup>-/-</sup> foram sacrificados por sobredose de anestésico (tiopental sódico, 50mg/kg), e tiveram seus testículos coletados, pesados e congelados em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído através de homogeneização dos testículos em Trizol (15596-018, Life Technologies). Em seguida, adicionou-se clorofórmio, agitando vigorosamente em vórtex e incubando por 3 minutos à

temperatura ambiente. O homogenato assim obtido foi centrifugado por 12000g durante 15 minutos a 4°C e o sobrenadante aquoso incolor removido cuidadosamente e transferido para um eppendorf com isopropanol. O tubo foi invertido por 3 vezes e deixado em repouso por 15 minutos para que ocorresse a precipitação do RNA, procedendo-se então nova centrifugação a 12000g, durante 15 minutos a 4°C. Em seguida, removeu-se novamente o sobrenadante e o pellet de RNA foi lavado duas vezes com etanol 75%, sendo agitado e centrifugado a 7500g por 3 minutos, a 4°C. Após a última lavagem e evaporação do etanol, o RNA foi ressuspensionado em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e sua concentração foi determinada por espectrofotometria.

O RNA obtido foi submetido à transcrição reversa, seguida de reação em cadeia de polimerase. Para tal finalidade, 10 µg de RNA foi tratado com DNase (AM1906, DNA-free Kit, Life Technologies), em banho-maria à 37°C, por 30 minutos. Ao final deste processo adicionou-se o inibidor de reação de DNase, homogeneizando-se a solução em vórtex a temperatura ambiente por 2 minutos, e centrifugando-se a mesma a 10000g, por 90 segundos. O sobrenadante foi removido para proceder-se a síntese de cDNA (4368814, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Life Technologies), adicionando-se ao RNA tratado com DNase os seguintes reagentes: inibidor de RNase; solução tampão; dNTP Mix; Oligo dT; transcriptase reversa Multiscribe MuLV; e água DEPC. Os eppendorfs foram levados ao termociclador para a síntese do cDNA, na seguinte sequência: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, e 85°C por 5 minutos.

A partir do cDNA já sintetizado o ensaio de qPCR foi realizado. Para cada amostra de cDNA adicionou-se *Power SYBR Green* (4367659, Life Technologies), os *primers forward* ou *reverse* e água DEPC. A sequência dos *primers* utilizados e suas concentrações estão contidos na tabela 1. O volume final foi homogeneizado e dividido numa duplicata, e cada reação foi repetida quatro vezes, sendo os resultados normalizados pela expressão de  $\beta$ -actina. A reação de PCR quantitativo foi realizada no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR System (Life Technologies) utilizando-se o programa mostrado na tabela 2.

#### 4.5 - Imunohistoquímica

Neste estudo, 10 camundongos selvagens e 9 iNOS<sup>-/-</sup> foram sacrificados aos 70 dias de idade com injeção intraperitoneal de tiopental sódico (50mg/kg de peso corporal) e

tiveram seus testículos coletados, pesados e fixados por imersão em solução de bouin, por 24 horas. Este material foi desidratado, incluído em Paraplast (P-3558, Sigma) e secções histológicas com 5µm de espessura foram aderidas a lâminas tratadas com poli-L-lisina. As lâminas foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em concentrações decrescentes de etanol e água destilada. Em seguida, a recuperação antigênica foi realizada utilizando tampão citrato (pH 6,0), em microondas com potência máxima, por cinco minutos, contados a partir da ebulição. Após o resfriamento, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, utilizando-se peróxido de hidrogênio a 30%, por 30 minutos. As lâminas histológicas foram incubadas com soro fetal de cabra (G 9023, Sigma) a 10%, por 30 minutos, e, em seguida, com o anticorpo primário “*overnight*” a 4°C. Anticorpos para o receptor de andrógeno (AR; N-20, SC-816, Santa Cruz Biotechnology) e aromatase (PA5-19633, Thermo Scientific), foram utilizados, respectivamente, nas diluições de 1:150 e 1:300, enquanto o controle negativo foi obtido através da omissão do anticorpo primário, substituindo-o pelo soro fetal de cabra. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado (ab6720, Abcam), por 1 hora, seguido pelo complexo estreptavidina-peroxidase (Peroxidase Dual Link System-Dako Envision, ab64269, Abcam), por 30 minutos, à temperatura ambiente. A reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB; D5637-5G, Sigma) e os cortes histológicos contra-corados com Hematoxilina de Mayer.

Com a finalidade de quantificar a expressão do AR e da aromatase nas células testiculares, imagens aleatórias do parênquima testicular foram obtidas em microscópio Olympus BX60, acoplado a câmera fotográfica e adquiridas com resolução de 2576 X 1932 pixels (300dpi). Utilizando-se o programa *Photoshop CS3 v10.0*, as imagens foram convertidas em escala de cinza e, em seguida, as cores foram invertidas. Após esta etapa, estas imagens foram analisadas no programa *Image J*, mensurando-se pelo menos 30 células para cada animal. O núcleo ou uma região do citoplasma expressando a proteína de interesse foram demarcados e a intensidade de pixels foi determinada de acordo com o histograma. Para se excluir a variação de *background* mediu-se uma região sem células (lume de túbulo seminífero ou vaso sanguíneo) em cada imagem e esse valor foi subtraído do valor obtido para cada célula da mesma imagem. A expressão do AR nas células de Sertoli foi analisada por estádios do ciclo do epitélio seminífero, que foram agrupados da seguinte maneira: I-IV (estádios contendo espermatogônias do tipo A ou Intermediária), V-VI

(estádios contendo espermatogônias do tipo B), VII-VIII (estádios próximo à espermição), IX-XI (estádios após a espermição) e XII (estádio com presença de figuras de divisões meióticas).

#### **4.6 – Análises Estatísticas**

Os resultados obtidos estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão. A análise estatística foi feita utilizando-se o programa *GraphPad Prism 5* e aplicando-se o teste *One-way ANOVA*, seguido de *Newman-Keuls* para as análises histomorfométricas. Já o teste “t” de *Student* foi utilizado para as análises de expressão gênica e protéica. O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 - Pesos corporal e testicular e índice gonadossomático

Os dados biométricos encontram-se na tabela 3 e figura 1. Conforme pode ser observado, quando comparado com os demais grupos experimentais, o peso corporal no dia da eutanásia apresentou-se significativamente reduzido apenas no grupo selvagem/controle (WT) tratado com PTU. Com relação ao peso testicular, em comparação aos animais controle este importante parâmetro mostrou-se aumentado ( $p < 0,05$ ) em todos os outros grupos. Ainda, o peso testicular dos animais  $iNOS^{-/-}$  tratados ou não com PTU foi significativamente maior que aquele observado no grupo WT + PTU (Fig. 1A). Padrão semelhante foi notado para o índice gonadossomático, que expressa a relação percentual entre o peso das gônadas e o peso corporal (Fig. 1B).

### 5.2 - Análise histomorfométrica

#### 5.2.1 Histologia testicular

Através da figura 2 pode ser observado que tanto o compartimento tubular quanto o intertubular encontram-se aparentemente normais do ponto de vista estrutural em todos os grupos analisados.

#### 5.2.2 Proporção volumétrica dos componentes testiculares

Os resultados referentes à proporção volumétrica (%) encontram-se na tabela 3, onde pode ser notado que para a grande maioria dos parâmetros avaliados não foram encontradas diferenças significativas. Ainda nesta tabela observa-se que o volume ocupado pelo lume tubular apresentou-se aumentado ( $p < 0,05$ ) no grupo  $iNOS^{-/-}$  apenas quando o mesmo foi comparado ao grupo WT+PTU. Já o percentual de túnica própria teve aumento significativo apenas nos animais selvagens tratados com PTU. Com relação ao parâmetro "outros", que compreende células e fibras do tecido conjuntivo, seu percentual mostrou-se significativamente diferente quando os grupos WT+PTU e  $iNOS^{-/-}$  foram comparados entre si.

#### 5.2.3 Diâmetro tubular e comprimento dos túbulos seminíferos

O diâmetro dos túbulos seminíferos (Tabela 3 e Fig. 3A) não apresentou diferença ( $p > 0,05$ ) entre os grupos WT e  $iNOS^{-/-}$  + PTU. No entanto, em comparação com estes dois



grupos experimentais mencionados, os valores encontrados para este parâmetro sofreram redução significativa (~12%) no grupo selvagem tratado com PTU e aumento (~5%;  $p < 0,05$ ) nos animais  $iNOS^{-/-}$ . Com relação ao comprimento tubular total observou-se que, em comparação com o grupo WT, o mesmo foi maior ( $p < 0,05$ ) nos outros três grupos e aqueles tratados com PTU foram diferentes entre si (Fig. 3B). O comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo apresentou a mesma tendência encontrada para a túnica própria, sendo maior no grupo WT + PTU, enquanto a altura do epitélio seminífero não apresentou alteração significativa (Tabela 3).

#### **5.2.4 Frequência de estádios do ciclo do epitélio seminífero**

Conforme pode ser observado na figura 4, nenhuma variação significativa foi encontrada para a frequência dos estádios nos quatro grupos analisados.

#### **5.2.5 Números de células germinativas e razões celulares**

Os valores encontrados para os números corrigidos e índices obtidos através da contagem celular no estágio VII estão listados na tabela 4, onde pode-se notar inicialmente que o número de nucléolos de células de Sertoli não apresentou alterações significativas em nenhum dos quatro grupos analisados. Já o número de espermatócitos em paquíteno foi menor ( $p < 0,05$ ) nos animais WT + PTU quando comparado aos dois grupos  $iNOS^{-/-}$ . Em relação aos outros dois grupos avaliados, o número de espermátides arredondadas foi respectivamente menor e maior nos grupos WT+PTU e  $iNOS^{-/-}$ .

Quanto ao índice de células de Sertoli, que representa a capacidade de suporte/eficiência desta célula, seu valor mostrou-se reduzido ( $p < 0,05$ ) nos animais selvagens tratados com PTU (Tabela 4 e Fig. 5B). Por outro lado, o índice meiótico não apresentou alterações significativas entre os grupos investigados (Tabela 4).

#### **5.2.6 Células de Sertoli e Produção Espermática Diária**

Na avaliação dos quatro grupos estudados pôde ser notado que o número total de células de Sertoli por testículo foi significativamente maior (Tabela 4 e Fig. 5A) nos animais  $iNOS^{-/-}$  tratados ou não com PTU, enquanto nos camundongos WT + PTU o número destas células situou-se num patamar intermediário ( $p < 0,05$ ) entre estes dois grupos e o grupo WT. Já o número destas células por grama de testículo apresentou valores mais elevados

( $p < 0,05$ ) nos camundongos controles tratados com PTU, seguido pelo grupo  $iNOS^{-/-}$  + PTU (Tabela 4).

À semelhança do observado para o peso testicular e o índice gonadossomático, a produção espermática diária por testículo, que pode ser considerado um dos parâmetros nobres do presente estudo, seguiu exatamente o mesmo padrão encontrado para o número de células de Sertoli por testículo (Tabela 4 e Fig. 5C). Quanto à produção espermática diária por grama de testículo, nenhuma diferença significativa foi observada (Tabela 4 e Fig. 5D).

### **5.2.7 Células de Leydig**

Os parâmetros relacionados à morfometria das células de Leydig estão compilados na tabela 5, onde pode ser observado que tanto o diâmetro quanto o volume nuclear destas células não sofreram alteração significativa em nenhum dos grupos analisados. Já o volume citoplasmático das mesmas mostrou-se menor no grupo  $iNOS^{-/-}$ , sendo no entanto esta redução significativa apenas quando comparado ao grupo selvagem; padrão semelhante foi notado para o volume celular (Tabela 5 e Fig. 6A).

Por outro lado, em comparação com o grupo WT, o número de células de Leydig por testículo apresentou aumento significativo somente nos camundongos  $iNOS^{-/-}$  (Tabela 5 e Fig. 6B); enquanto nenhuma alteração de seu número por grama de testículo foi encontrada (Tabela 5).

## **5.3 – Análises de expressão gênica e proteica**

### **5.3.1 Sox9**

A figura 7 mostra que, em comparação com os camundongos selvagens, a expressão do mRNA de Sox9 foi significativamente maior (cerca de 3 vezes) nos animais  $iNOS$  deficientes.

### **5.3.2 Receptor de Andrógeno**

Conforme esperado, a expressão do receptor de andrógeno nos testículos, representada nas figuras 8 e 9 (A e B), foi encontrada no núcleo das células de Leydig, Sertoli e peritubulares mióides. No testículo como um todo, pode-se observar que a expressão do mRNA de AR foi quase quatro vezes maior ( $p < 0,05$ ) nos animais  $iNOS^{-/-}$  (Fig. 8C). A quantificação da marcação por imunohistoquímica, avaliada através da intensidade de

pixels, revelou que a expressão deste receptor foi significativamente maior nas células de Sertoli dos animais  $iNOS^{-/-}$  (Fig. 8D), apesar de forte tendência de aumento ter sido observada nas células de Leydig ( $p=0,07$ ). A expressão de AR nas células peritubulares mióides foi semelhante entre os dois grupos avaliados (Fig. 8D).

A expressão do receptor de andrógeno nas células de Sertoli também foi avaliada ao longo dos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero. Conforme pode ser observado na figura 9, em todos os agrupamentos feitos para os estádios, os camundongos  $iNOS^{-/-}$  apresentaram aumento significativo na expressão de AR nas células de Sertoli.

### **5.3.3 Enzimas esteroidogênicas (StAR e 3 $\beta$ -HSD)**

A expressão das enzimas esteroidogênicas StAR e 3 $\beta$ -HSD foi analisada através de qPCR, onde pode ser observado que ambas as enzimas apresentaram menores ( $p<0,05$ ) níveis de expressão nos camundongos  $iNOS$  deficientes (Fig. 10).

### **5.3.4 Aromatase**

Com relação à enzima aromatase, marcação para a mesma foi encontrada no citoplasma das células de Leydig. No entanto, não foi observada diferença significativa na quantificação da sua expressão por qPCR ou mesmo por intensidade de pixels entre os grupos WT e  $iNOS^{-/-}$  (Fig. 11).

### **5.3.5 Receptores de Estrógeno**

A quantificação da expressão dos receptores de estrógeno ER $\alpha$  e ER $\beta$  foi realizada através de qPCR. Nesta avaliação, diferença significativa foi observada somente para a expressão do receptor do tipo alfa (ER $\alpha$ ), que apresentou-se aumentado nos animais  $iNOS$  deficientes (Fig. 12).

## 6 - DISCUSSÃO

Já está bem estabelecido na literatura que o hipotireoidismo transitório neonatal estende o período de proliferação das células de Sertoli, aumentando significativamente o número destas células, o peso testicular e a magnitude da produção espermática, particularmente em roedores comumente utilizados em laboratório (ratos, camundongos e hamsteres). Da mesma forma, estudos na literatura têm demonstrado que camundongos *iNOS*<sup>-/-</sup> apresentam aumento significativo no número de células de Sertoli, no peso testicular e na produção espermática. Neste contexto, a partir de estudos desenvolvidos recentemente em nosso laboratório com camundongos envolvendo estes dois modelos experimentais (AUHAREK & FRANÇA, 2010; AUHAREK et al., 2011, 2012), procuramos no presente estudo investigar, através de métodos quantitativos, se o hipotireoidismo transitório neonatal resultaria em efeito aditivo na atividade mitótica das células de Sertoli de camundongos *iNOS*<sup>-/-</sup>. Numa outra vertente deste nosso trabalho, investigamos ainda o papel do óxido nítrico na regulação morfofuncional do testículo, avaliando-se particularmente o padrão de expressão de importantes marcadores da função testicular de camundongos selvagens e *iNOS*<sup>-/-</sup> sexualmente maduros, através de imunohistoquímica e qPCR. Portanto, na discussão que se segue serão abordados inicialmente os resultados obtidos com o hipotireoidismo e, posteriormente, àqueles referentes aos estudos envolvendo a expressão gênica e protéica.

Confirmando que o tratamento com PTU não modifica a citoarquitetura do testículo (JOYCE et al., 1993; COOKE et al., 2005; AUHAREK & FRANÇA, 2010), nenhum dos dois grupos experimentais tratados com esta droga bociogênica apresentaram alterações histológicas evidentes neste órgão, o que pode, de maneira geral, ser evidenciado pelos resultados referentes à proporção volumétrica. Com relação à frequência de estádios, que reflete o ritmo de progressão das associações celulares durante a espermatogênese, nenhuma alteração foi encontrada entre os diversos grupos analisados.

Quanto ao diâmetro tubular, que retrata a atividade espermatogênica, o mesmo apresentou-se nitidamente maior nos camundongos *iNOS*<sup>-/-</sup> (LUE et al., 2003; AUHAREK et al., 2011), o que pelo menos em parte deve-se ao maior percentual ocupado pelo lume tubular, resultante da secreção de fluido pelas células de Sertoli, sob influência de andrógenos (SHARPE et al., 1994; DE GENDT et al., 2004; WELSH et al., 2009). O papel dos

esteroides na função testicular de camundongos  $iNOS^{-/-}$  será discutido detalhadamente adiante. A diminuição observada no diâmetro tubular nos animais tratados com PTU, em relação aos respectivos controles, deveu-se provavelmente ao atraso que já foi observado no desenvolvimento de camundongos após o período de tratamento com esta droga (JOYCE et al., 1993; AUHAREK & FRANÇA, 2010). Neste sentido, apesar da idade (70 dias) dos camundongos avaliados ter sido adequada para se investigar o número de células de Sertoli, principal foco desta parte do presente trabalho, o diâmetro tubular provavelmente teria sido maior aos 100 dias de idade nos animais tratados com PTU (AUHAREK & FRANÇA, 2010).

O comprimento tubular total é um excelente indicador da magnitude da proliferação das células de Sertoli, que ocorre durante o período pré-púbere (HESS et al., 1993; SHARPE, 1994; REY, 1999; FRANÇA et al., 2000). Sugerindo fortemente que o número de células de Sertoli encontra-se aumentado, no presente trabalho foi observado que, em comparação com os animais controles, o comprimento total dos túbulos seminíferos foi maior nos camundongos  $iNOS$  deficientes e naqueles tratados com PTU.

Os números e razões celulares obtidos a partir de contagens realizadas em estádios específicos do CES representam uma maneira bastante acurada de analisar funcionalmente o processo espermatogênico e de se estimar a produção espermática, permitindo comparações entre diferentes espécies e grupos experimentais. Ainda, o equilíbrio entre proliferação e apoptose desempenha papel muito importante na regulação do número de células germinativas no epitélio seminífero (ROOSEN-RUNGE, 1973; BLANCO-RODRÍGUEZ, 1998; HESS & FRANÇA, 2007). Particularmente na fase espermatogonial, o mecanismo homeostático de regulação de apoptoses é considerado densidade-dependente, limitando a quantidade de células germinativas que entram na fase meiótica a um número que possa ser suportado pelas células de Sertoli disponíveis (HUCKINS, 1978; DE ROOIJ & LOK, 1987; SHARPE, 1994; DE ROOIJ, 1998; DE ROOIJ & RUSSELL, 2000; HESS & FRANÇA, 2007). De maneira geral, em vertebrados, as apoptoses ocorrem durante as divisões mitóticas e meióticas (devido a danos cromossomais), e mesmo em espécies com alta produção espermática as perdas celulares podem ser consideravelmente altas (ROOSEN-RUNGE, 1973; FRANÇA; RUSSELL, 1998; HESS; FRANÇA, 2007). No presente estudo, as contagens celulares feitas tiveram como principal objetivo estimar as eficiências espermatogênica e de célula de Sertoli, bem como as perdas celulares que ocorrem durante a meiose.

Ilustrando o que já foi mencionado acerca de um possível atraso na maturidade sexual completa dos camundongos tratados com PTU (JOYCE et al., 1993; AUHAREK & FRANÇA, 2010), os números de células germinativas obtidos por secção transversal de túbulos seminíferos no estágio VII do CES, particularmente de espermatídes arredondadas, mostraram-se reduzidos nos grupos tratados com PTU, em comparação com seus respectivos controles. Estes resultados refletiram diretamente no índice (eficiência) de célula de Sertoli, que também se mostrou reduzido nestes mesmos grupos. Quanto ao índice meiótico, que retrata a razão entre as espermatídes arredondadas recém-formadas e os espermatócitos primários em paquíteno, indicando as perdas celulares que usualmente ocorrem durante a prófase meiótica I, o mesmo não apresentou diferenças entre os quatro grupos investigados no presente trabalho, situando-se ainda em patamar semelhante (30 a 45% de perdas celulares) ao descrito na literatura para camundongos (CLERMONT; TROTT, 1969; AVELAR et al., 2004; HESS; FRANÇA, 2007).

No presente estudo, conforme esperado a partir da literatura e demonstrando a eficiência dos tratamentos utilizados, tanto o grupo selvagem tratado com PTU (JOYCE et al., 1993; AUHAREK & FRANÇA, 2010) quanto o grupo  $iNOS^{-/-}$  (LUE et al., 2003; AUHAREK et al., 2011, 2012) apresentaram marcante aumento no peso testicular. De forma inesperada, não foi observado efeito aditivo no peso testicular dos animais  $iNOS$  deficientes tratados com PTU. O mesmo padrão comentado acima foi encontrado para outros importantes parâmetros investigados nestes camundongos, tais como o índice gonadossomático, o número total de células de Sertoli e a produção espermiática por testículo. De qualquer forma, conforme já está estabelecido na literatura, em todos os quatro grupos investigados o número total de células de Sertoli foi o fator determinante da magnitude da produção espermiática diária por testículo (HESS et al., 1993; FRANÇA et al., 1995; FRANÇA & RUSSELL, 1998; ROCHA et al., 1999; SHARPE et al., 2003; HESS & FRANÇA, 2007).

No presente estudo, não temos ainda uma explicação plausível para o fato do efeito aditivo no número de células de Sertoli não ter ocorrido nos camundongos  $iNOS$  deficientes tratados com PTU, no entanto algumas hipóteses podem ser levantadas. Por exemplo, embora o tratamento com PTU estenda o período de proliferação destas células em camundongos Swiss-Webster (JOYCE et al., 1993), talvez o mesmo não ocorra na linhagem C57BL6/J (AUHAREK & FRANÇA, 2010), utilizada como *background* para os camundongos

iNOS<sup>-/-</sup>, que podem ainda ter a capacidade proliferativa das células de Sertoli esgotada neste período. Ademais, como as análises nestes animais foram feitas utilizando-se basicamente parâmetros histomorfométricos, torna-se mais complexo definir mecanismos funcionais que expliquem a não ocorrência deste efeito aditivo. Ainda, sabe-se que hormônios tireoidianos e o óxido nítrico estão conjuntamente envolvidos em mecanismos regulatórios em diversos órgãos em processos fisiológicos e patológicos como, por exemplo, sistema nervoso central (RODRÍGUEZ-ARNAO et al., 2003; XU et al., 2010), coração (FELLET et al., 2004, 2006; KISSO et al., 2008; SARATI et al., 2012), fígado (FERNÁNDEZ et al., 2005), sistema imune (BARREIRO ARCOS et al., 2006, 2011) e, principalmente, vasodilatação. Neste sentido, já foi demonstrado que tanto o hipotireoidismo quanto a redução nos níveis de óxido nítrico causam hipertensão e até mesmo insuficiência cardíaca, e ambos os fatores estão envolvidos na dilatação de vasos e secreção de substâncias pelas células endoteliais (GRIEVE et al., 1999; TADDEI et al., 2003; MCALLISTER et al., 2005; MCALLISTER et al., 2005; VIRDIS et al., 2009). No entanto, no nosso conhecimento, não existem estudos específicos relacionados a estas possíveis alterações no testículo ou mesmo no sistema reprodutor. A literatura mostra ainda que o hipotireoidismo causa redução nos níveis de todas as isoformas de NOS (eNOS, nNOS e iNOS), e que esta redução pode ser compensada pelo nitroprussiato de sódio (SNP), uma substância conhecida por elevar os níveis de óxido nítrico (RAGGINER et al., 2013). Assim, pode ser aventado que um mecanismo redundante ocorra quando se associa o hipotireoidismo com modelos animais deficientes em iNOS, conforme realizamos no presente estudo. Num outro aspecto, do ponto de vista hormonal, em vários períodos avaliados durante o desenvolvimento pós-natal o tratamento com PTU suprimiu os níveis de gonadotrofinas (FSH e LH) (KIRBY et al., 1992; VAN HAASTER et al., 1992), enquanto os níveis de testosterona pareceram não se alterar, a despeito de estudos *in vitro* com células de Leydig expostas ao PTU ou de ratos que receberam este tratamento, terem demonstrado alterações na esteroidogênese, com redução na secreção de testosterona (HARDY et al., 1993; CHIAO et al., 2002).

Além de seus efeitos sobre a população de células de Sertoli, em ratos o tratamento com PTU também influencia o número e a função das células de Leydig (HARDY et al., 1993; ANTONY et al., 1995; MENDIS-HANDAGAMA et al., 1998; TEERDS et al., 1998; MENDIS-HANDAGAMA & ARIYARATNE, 2004). Apesar de alguns dados de nosso laboratório serem

contrastantes (MIRANDA, 2006), o número destas células em animais tratados chega a ser 70% maior que nos animais controle. No entanto, tanto o volume quanto o número de receptores de LH, bem como o potencial esteroidogênico destas células, parecem ser reduzidos (HARDY et al., 1993; COOKE, 1996). De modo semelhante, estudos em ratos e camundongos sugerem que o óxido nítrico regula negativamente a esteroidogênese (ADAMS et al., 1994; POMERANTZ & PITELKA, 1998; WEISSMAN et al., 2005). Ademais, investigações estereológicas em nosso laboratório demonstraram que, comparados aos controles, nos animais iNOS deficientes ocorre aumento na proliferação e no número das células de Leydig, desde o período fetal até a idade adulta, enquanto o seu volume tende a ser menor nestes animais (AUHAREK et al., 2011, 2012). No presente trabalho, em nenhum grupo analisado foram observadas alterações no percentual e no volume nuclear das células de Leydig. Em contraste, com relação ao grupo controle, o volume citoplasmático e o volume total destas células apresentou-se reduzido em todos os grupos, sendo esta redução significativa apenas nos animais iNOS<sup>-/-</sup> que não receberam PTU, e tendência inversa foi observada para o número total destas células por testículo (AUHAREK et al., 2011). Portanto, com relação aos parâmetros referentes às células de Leydig pode ser inferido que o tratamento com PTU não exerceu efeitos evidentes nestas células esteroidogênicas.

Conforme já foi salientado, o segundo objetivo principal de nosso estudo foi caracterizar a expressão de algumas proteínas consideradas funcionalmente importantes nos testículos de camundongos selvagens e iNOS<sup>-/-</sup> sexualmente maduros (70 dias) através de técnicas de imunohistoquímica e PCR quantitativo (qPCR).

O Sox9 é um gene crucial para o desenvolvimento gonadal, regulando a expressão do hormônio anti-mulleriano (AMH), e sua expressão é detectada nas células de Sertoli desde o desenvolvimento testicular até a vida adulta (KENT et al., 1996; MORAIS DA SILVA et al., 1996; HARLEY et al., 2003; WILHELM et al., 2007). No entanto, a inativação deste gene após a diferenciação testicular somente causa prejuízos a espermatogênese/fertilidade a partir dos 5 meses de idade, possivelmente devido a problemas na interação funcional entre células de Sertoli e germinativas, mas as vias de atuação do Sox9 no testículo adulto ainda precisam ser melhor investigadas (CHABOISSIER et al., 2004; QIN & BISHOP, 2005; O'BRYAN et al., 2008; BARRIONUEVO et al., 2009; LAN et al., 2013). Os maiores níveis de mRNA deste gene observados no testículo de camundongos iNOS<sup>-/-</sup> sugerem que as células de Sertoli



podem estar funcionalmente mais ativas na regulação do processo espermatogênico, corroborando achados em nosso laboratório e da literatura mostrando que camundongos iNOS deficientes apresentam menores índices apoptóticos de células germinativas nos diferentes estádios do CES (LUE et al., 2003; AUHAREK et al., 2011).

No testículo, o receptor de andrógeno (AR) está presente no núcleo das células de Sertoli, Leydig, peritubulares mióides e endoteliais (SUÁREZ-QUIAN et al., 1999; ZHU et al., 2000; ZHOU et al., 2002). Dois principais hormônios esteróides possuem capacidade de se ligar ao AR, a testosterona e a diidrotestosterona (DHT), ativando inúmeras vias metabólicas, com importantes funções na regulação de fatores que mantêm um ambiente fisiológico propício ao desenvolvimento da espermatogênese (SUÁREZ-QUIAN et al., 1999; ZHU et al., 2000; ZHOU et al., 2002; CHANG et al., 2013). Particularmente, a intensidade da expressão deste receptor na célula de Sertoli adulta apresenta variações ao longo dos diferentes estádios do CES, sendo mais intensa nos estádios próximos à espermição, o que sugere importante ação dos andrógenos nesta etapa da espermatogênese (SHARPE et al., 1992; SHARPE, 1994; BREMNER et al., 1994; HILL et al., 2004). Neste contexto, já foi mostrado na literatura que camundongos *knockout* para o receptor de andrógeno no testículo (ARKO) são inférteis, apresentando distúrbios que vão desde o descenso incompleto do testículo (criptorquidismo) até substanciais alterações na espermatogênese. Ainda, nestes camundongos *knockout*, redução no número de células de Sertoli e de Leydig, bem como várias camadas de células peritubulares mióides na túnica própria são observadas (ROBERTSON et al., 2001; O'SHAUGHNESSY et al., 2002; CHANG et al., 2013). Já em camundongos *knockouts* para AR especificamente nas células de Sertoli (SCARKO), a espermatogênese não avança além da meiose, além de ausência de lume tubular, devido à menor secreção de fluido pelas células de Sertoli, e alterações na formação da barreira hematotesticular também serem observados (DE GENDT et al., 2004, 2005; WILLEMS et al., 2010; CHANG et al., 2013). Portanto, todos estes achados demonstram que, principalmente através de andrógenos, as células de Sertoli regulam a espermatogênese e, em última análise, a fertilidade.

Corroborando a literatura, tanto no testículo de camundongos selvagens quanto nos iNOS<sup>-/-</sup>, expressão de AR foi observada em todas as células somáticas testiculares anteriormente citadas. A quantificação total desta expressão mostrou maiores níveis de

mRNA de AR nos testículos dos animais iNOS deficientes e, quando a intensidade de pixels foi analisada individualmente para cada tipo celular, aumento significativo foi observado apenas nas células de Sertoli. Novamente, estes resultados nos permite inferir que estas células estão funcionalmente mais ativas nos camundongos iNOS. Ademais, o fato das células de Sertoli terem apresentado maior expressão de AR nos animais iNOS<sup>-/-</sup> em todos os agrupamentos de estádios considerados vai de encontro ao que já discutimos acerca destas camundongos apresentarem menores perdas de células espermatogênicas, ao longo dos diferentes estádios do CES (LUE et al., 2003; AUHAREK et al., 2011). De maneira geral, pode ser considerado que o aumento na expressão deste receptor também está relacionado aos maiores níveis de andrógenos propostos para os animais iNOS<sup>-/-</sup> (AUHAREK et al., 2011), uma vez que a produção de NO pela enzima iNOS tem sido proposta como modulador negativo da produção de testosterona pelas células de Leydig *in vivo* e *in vitro* (ADAMS et al., 1992, 1994; DEL PUNTA et al., 1996; POMERANTZ & PITELKA, 1998; O'BRYAN et al., 2000; DREWETT et al., 2002; WEISSMAN et al., 2005; NEE PATHAK & LAL, 2008; LAL & DUBEY, 2013). No entanto, paradoxalmente, os poucos estudos desenvolvidos até o presente momento com estes camundongos iNOS deficientes, incluindo resultados preliminares do nosso laboratório, não mostraram diferenças nos níveis plasmáticos e testiculares de testosterona (LAUBACH et al., 1998; LUE et al., 2003; WEISSMAN et al., 2005).

Com relação à via esteroidogênica, os níveis relativos de mRNA das duas enzimas desta via (StAR e 3 $\beta$ -HSD) investigadas apresentaram expressão marcadamente reduzida nos animais iNOS<sup>-/-</sup>, o que pode estar correlacionado com o menor volume citoplasmático encontrado nas células de Leydig, tanto no presente trabalho quanto em estudos anteriormente por nós desenvolvidos nestes animais (AUHAREK et al., 2011, 2012). Assim, os resultados encontrados para o maior número e o menor volume da célula de Leydig, associados a menor expressão das enzimas esteroidogênicas investigadas no presente estudo nos camundongos iNOS<sup>-/-</sup>, nos permite sugerir a existência de um possível mecanismo compensatório capaz de contrabalancear as prováveis alterações fisiológicas causadas pela deficiência de iNOS. Portanto, mais estudos são necessários para se elucidar os mecanismos envolvidos na regulação da função testicular deste modelo experimental, principalmente quando se infere, a partir da grande maioria de nossos resultados e também

da literatura, que a elevação dos níveis de andrógenos parece não ser o fator predominante nesta regulação em camundongos *iNOS*<sup>-/-</sup>.

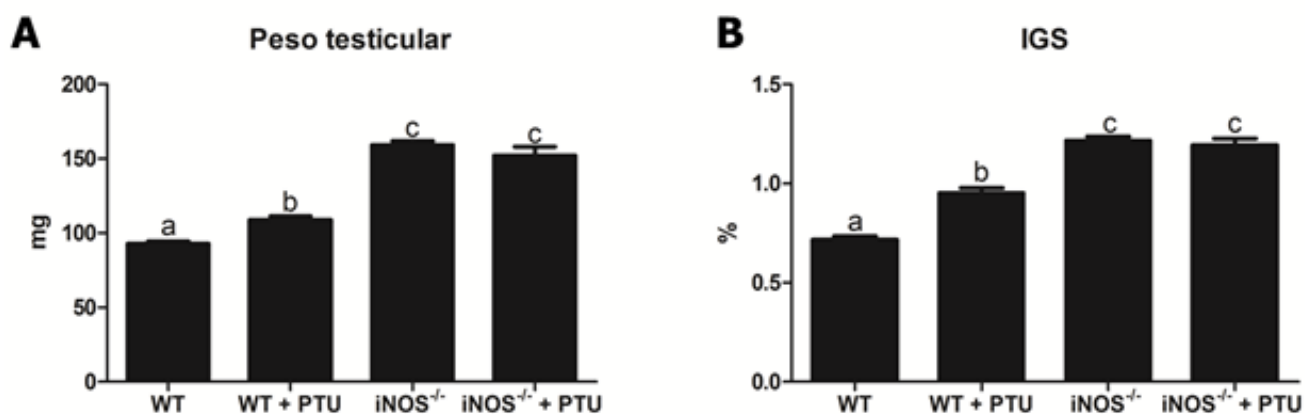
Finalmente, no presente estudo analisamos ainda a expressão da enzima aromatase (p450arom), responsável pela conversão de androstenediona/testosterona em estrógenos, bem como dos receptores de estrógenos (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ). De acordo com literatura a enzima aromatase é expressa principalmente no citoplasma das células de Leydig e germinativas, no testículo (NITTA et al., 1993; CARREAU et al., 1999, 2011; CARPINO et al., 2001; LAMBARD et al., 2005; CARREAU & HESS, 2010). Alguns estudos sugerem ainda que células de Sertoli imaturas apresentam atividade aromatase (CARPINO et al., 2001). Quanto aos estrógenos, embora seja ainda motivo de controvérsias, a expressão de seus receptores no testículo ocorre de forma mais ampla, dependendo ainda do tipo de receptor ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) (ROSENFELD et al., 1998; JEFFERSON et al., 2000; SHIBAYAMA et al., 2001; ZHOU et al., 2002; TAKAO et al., 2003; CARREAU & HESS, 2010). As importantes funções da aromatase e dos estrógenos para a fisiologia do testículo, bem como para o trato reprodutivo, estão claramente evidenciadas a partir de diversos estudos e da disponibilidade de modelos animais *knockouts* (EDDY et al., 1996; COUSE et al., 1997; HESS et al., 2000; DUPONT et al., 2000; AKINGBEMI et al., 2003; CARREAU et al., 2011). Na presente investigação, a expressão de aromatase foi encontrada no citoplasma das células de Leydig e no acrossoma das espermátides, o que vai de acordo com a literatura, que já demonstrou a presença desta proteína nestes tipos celulares (LAMBARD et al., 2005). Ainda, não encontramos alterações no nível de expressão da aromatase, enquanto os níveis de mRNA dos receptores de estrógeno ER $\alpha$  se mostraram aumentados nos camundongos *iNOS* deficientes. Dados da literatura mostram que os estrógenos podem induzir a formação de óxido nítrico, especialmente em vasos sanguíneos (CHEN et al., 1999; PEDRAM et al., 2002; TOWNSEND et al., 2011; SHEN et al., 2014). Assim, pode ser sugerido que a interação entre os estrógenos e as enzimas (*iNOS*, *nNOS* e *eNOS*) relacionadas com a síntese do óxido nítrico represente uma interessante via de regulação da função testicular.

## 7 - CONCLUSÕES

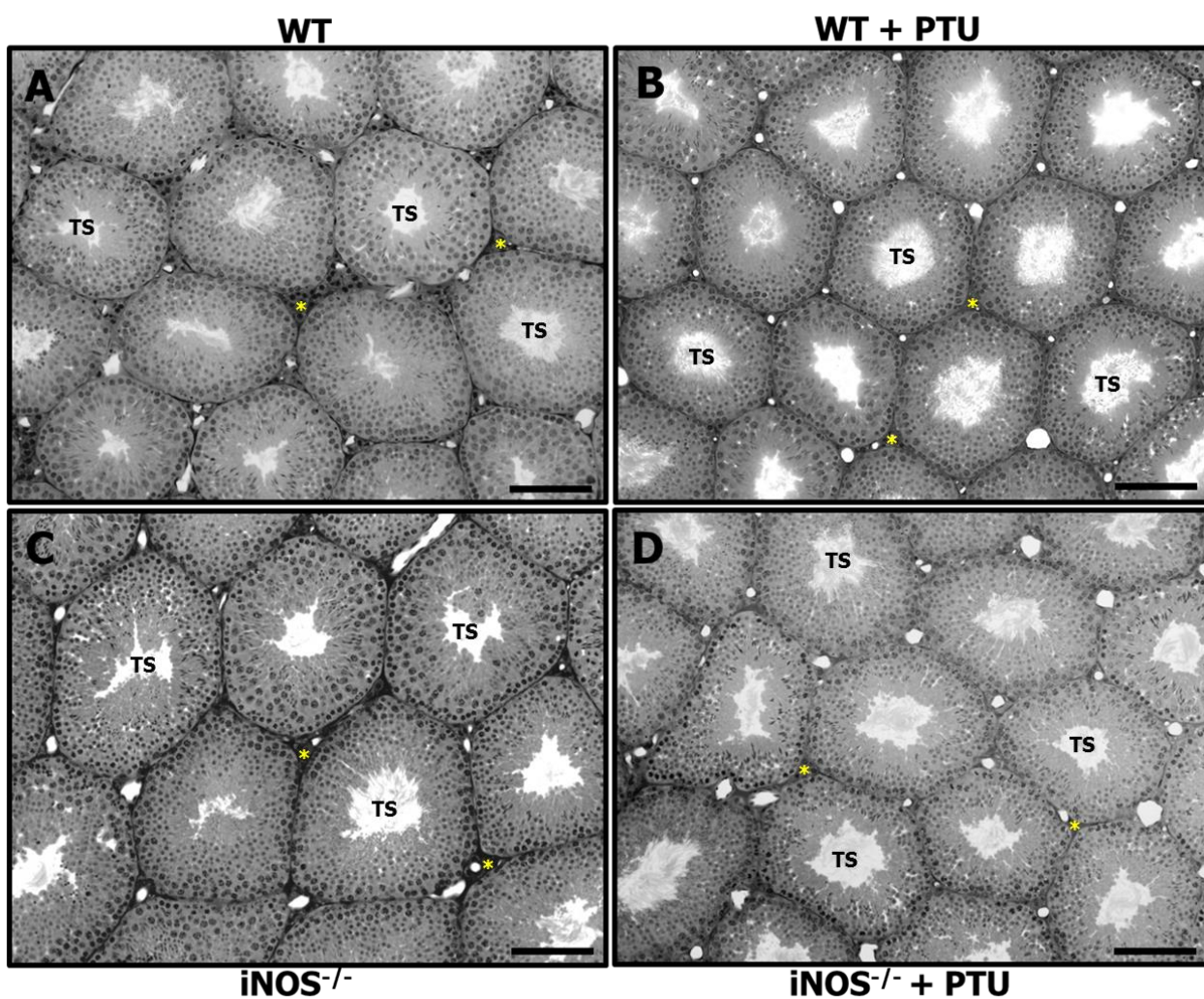
A partir dos resultados por nós obtidos no presente estudo investigando camundongos iNOS deficientes e o tratamento com PTU, bem como importantes marcadores da função testicular nestes animais na idade adulta, as seguintes conclusões principais podem ser feitas:

- De forma inesperada e por mecanismo por nós ainda desconhecido, os camundongos iNOS deficientes tratados com PTU não apresentaram efeito aditivo no número de células de Sertoli por testículo e na produção espermática. Da mesma forma, este tratamento não exerceu efeitos evidentes nas células de Leydig, nos levando a hipotetizar que um mecanismo de contrabalanceamento ocorra quando se associa o hipotireoidismo com modelos deficientes em iNOS;
- Quanto aos estudos de expressão gênica e proteica, sugerindo que as células de Sertoli podem estar funcionalmente mais ativas em camundongos iNOS<sup>-/-</sup>, sua expressão de Sox9 e de receptor de andrógeno apresentou-se mais elevada nestes animais. Já o fato dos níveis de mRNA de duas importantes enzimas da via esteroidogênica (StAR e 3β-HSD) estarem reduzidos nos camundongos iNOS deficientes, parece estar relacionado com o menor volume citoplasmático encontrado para as células de Leydig destes animais. Ainda neste sentido, o menor volume aliado talvez ao maior número destas células podem estar associados a existência de possível mecanismo compensatório para as alterações fisiológicas causadas pela deficiência de iNOS no testículo. Também observamos que enquanto a expressão da enzima aromatase não se mostrou alterada nos testículos de camundongos iNOS deficientes, o mRNA do receptor de estrógeno ERα apresentou-se elevado. O que nos permite sugerir que a interação entre os estrógenos e a produção de óxido nítrico represente uma importante via de regulação da função testicular em camundongos.

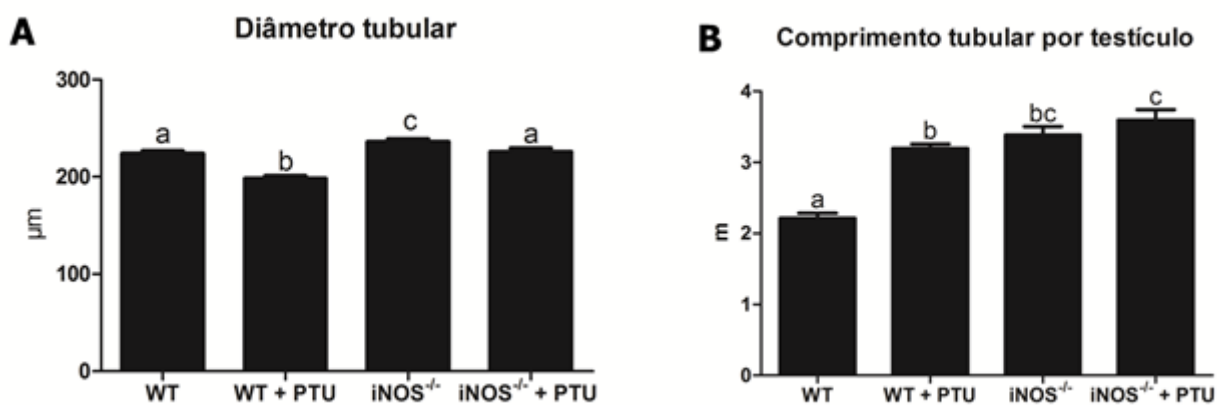
## 8 - ANEXOS (Figuras e Tabelas)



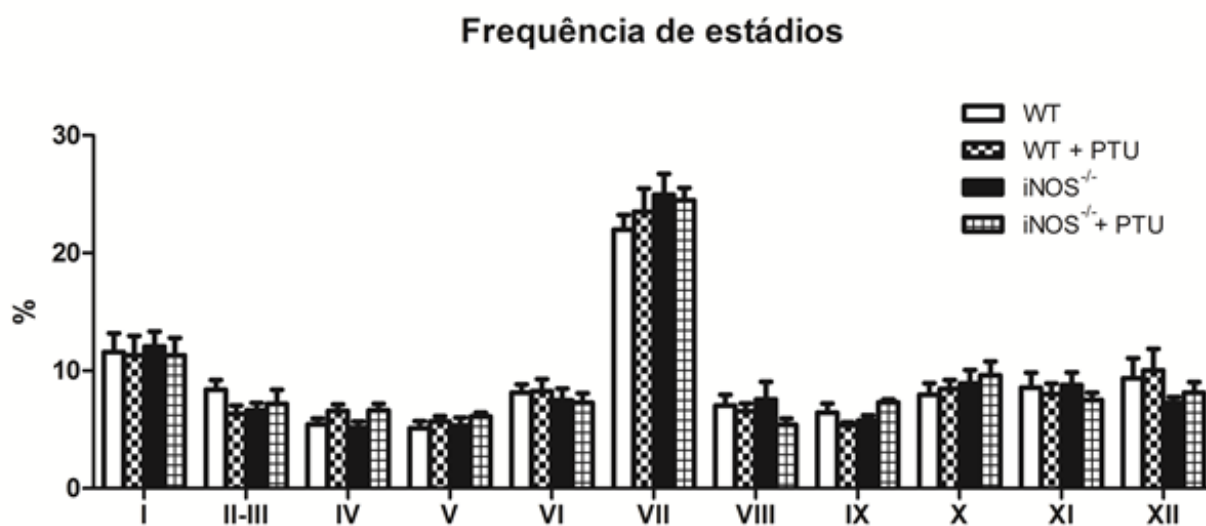
**Figura 1:** Peso testicular (A) e índice gonadosomático (B; IGS) em camundongos selvagens (WT) e iNOS deficientes (<sup>-/-</sup>), tratados ou não com PTU. Note que os valores encontrados para esses dois parâmetros foram significativamente maiores nos grupos iNOS<sup>-/-</sup>, enquanto o grupo controle tratado com PTU situou-se em um patamar intermediário entre os grupos controle e iNOS<sup>-/-</sup>. Letras diferentes denotam diferenças significativas (p<0,05).



**Figura 2:** Secções histológicas ilustrando o parênquima testicular de camundongos selvagens (WT; A), selvagens tratados com PTU (B), iNOS deficientes ( $iNOS^{-/-}$ ; C) e  $iNOS^{-/-}$  tratados com PTU (D). Observe que tanto os túbulos seminíferos (TS) quanto o compartimento intertubular (\*) apresentam-se aparentemente normais em todos os grupos analisados. Barra = 150  $\mu$ m.

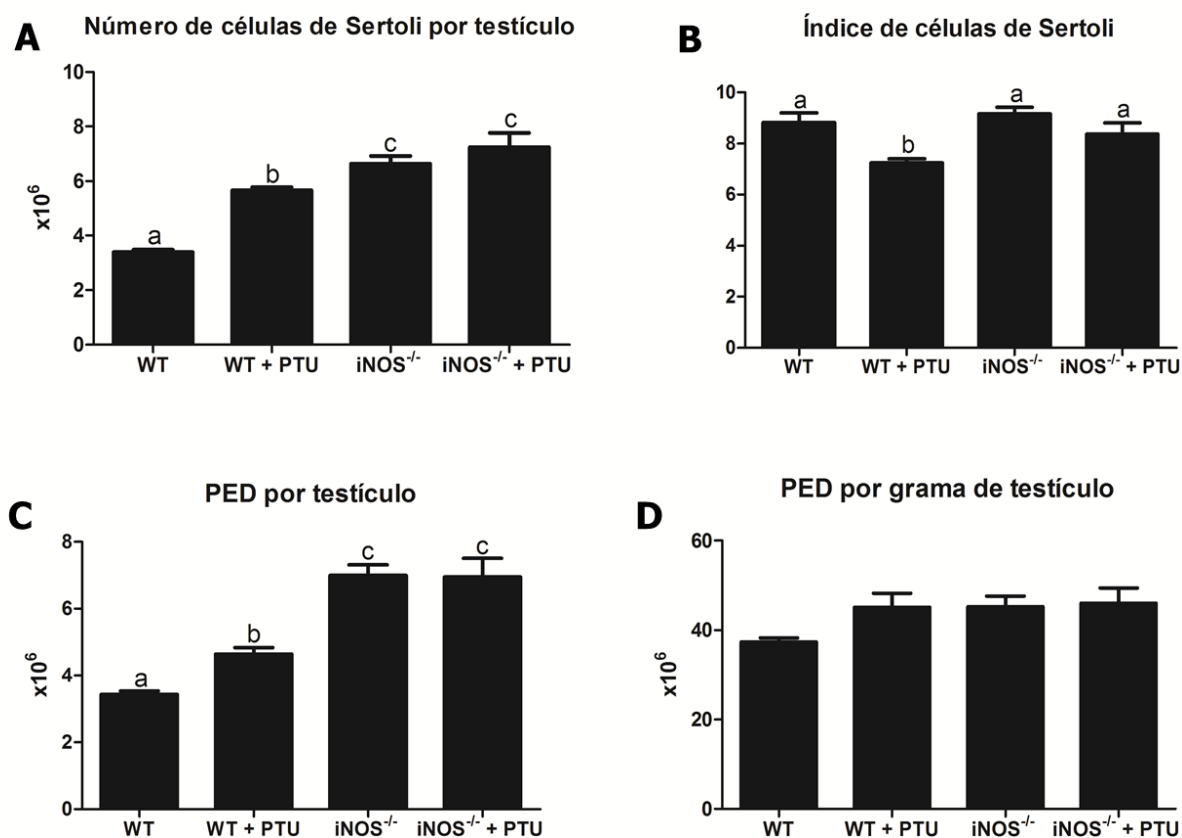


**Figura 3:** Diâmetro tubular (A) e comprimento dos túbulos seminíferos por testículo (B) em camundongos selvagens (WT) e iNOS deficientes (<sup>-/-</sup>), tratados ou não com PTU. Observe que os valores encontrados para o diâmetro tubular nos grupos controle tratado com PTU e iNOS<sup>-/-</sup> foram menor e maior, respectivamente, quando comparados aos outros dois grupos. Por outro lado, em comparação com os demais grupos, o comprimento tubular do grupo controle foi significativamente menor, enquanto os dois grupos tratados com PTU foram diferentes entre si. Letras diferentes denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

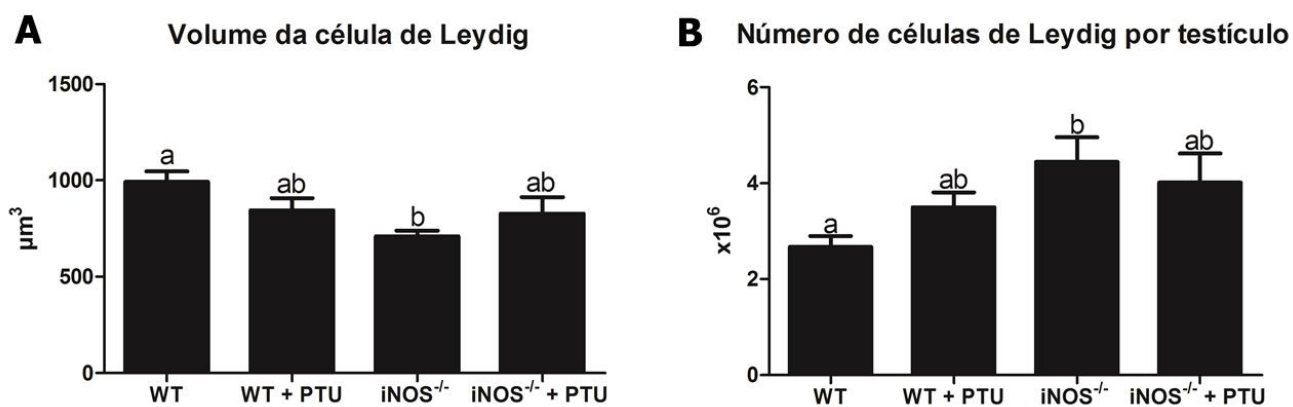


**Figura 4:** Frequência de estádios do ciclo do epitélio seminífero em camundongos selvagens (WT), selvagens tratados com PTU (WT + PTU), iNOS deficientes (<sup>-/-</sup>) e iNOS<sup>-/-</sup> tratados com PTU (iNOS<sup>-/-</sup> + PTU). Observe que não foram encontradas diferenças significativas na frequência dos estádios entre os grupos analisados.

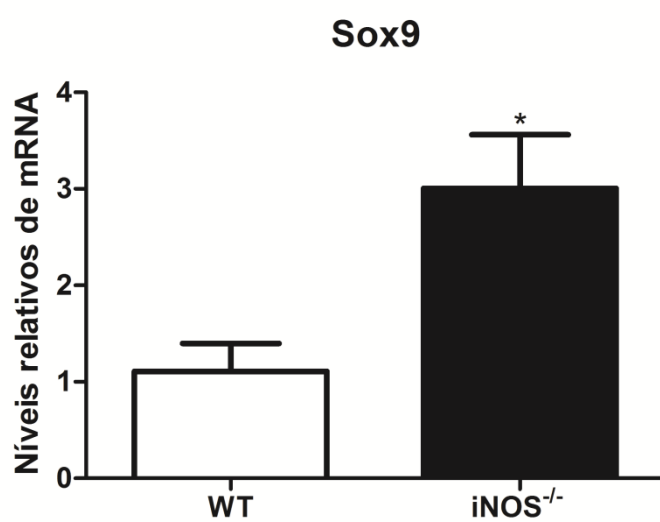




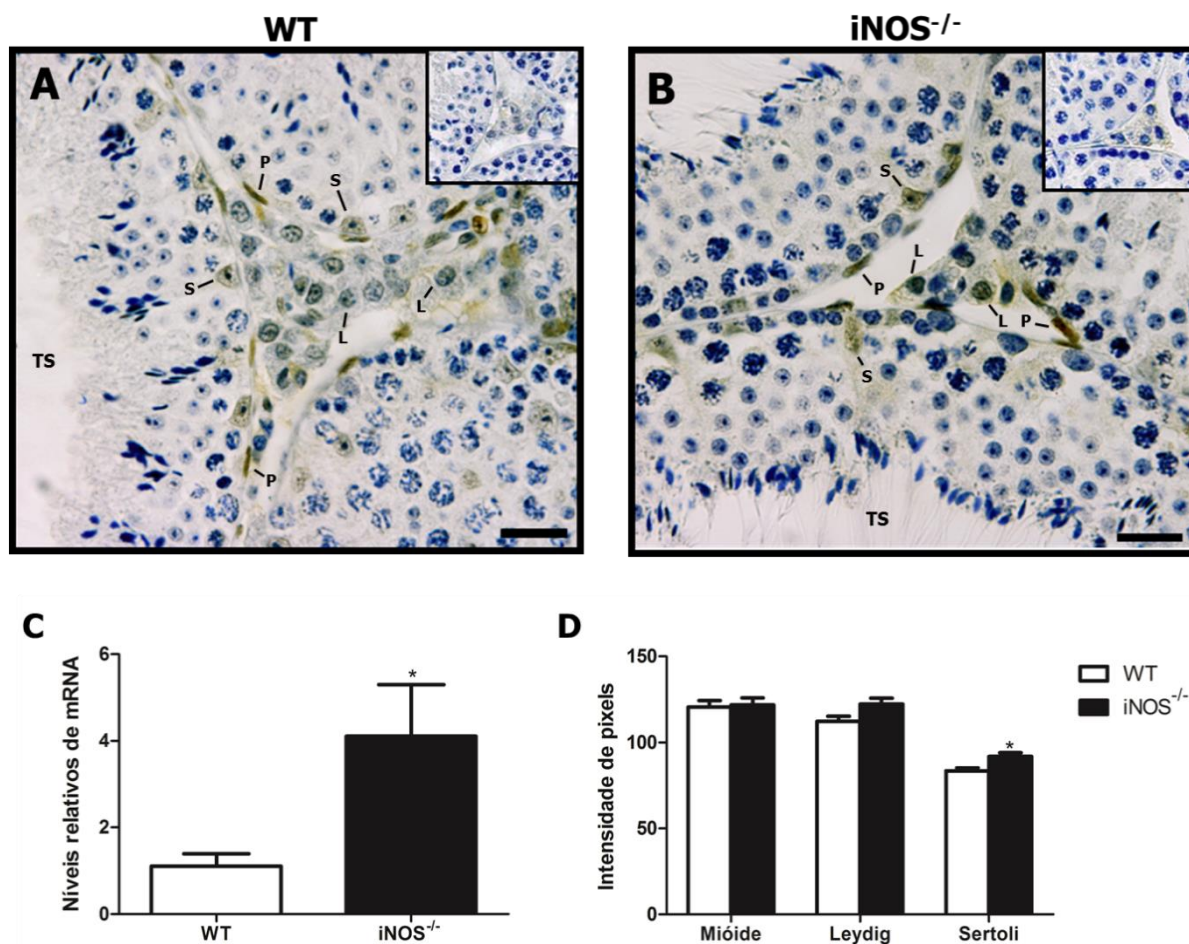
**Figura 5:** Número total de células de Sertoli por testículo (A), índice de células de Sertoli (B), Produção Espermática Diária (PED) por testículo (C) e por grama de testículo (D), em camundongos selvagens (WT) e iNOS deficientes (<sup>-/-</sup>), tratados ou não com PTU. Note que tanto o número de células de Sertoli por testículo quanto a PED por testículo seguiram a mesma tendência observada para o peso testicular, onde os valores dos grupos iNOS<sup>-/-</sup> foram significativamente maiores. Com relação ao índice de células de Sertoli, o mesmo foi significativamente menor no grupo controle tratado com PTU. Letras diferentes denotam diferenças significativas (p<0,05).



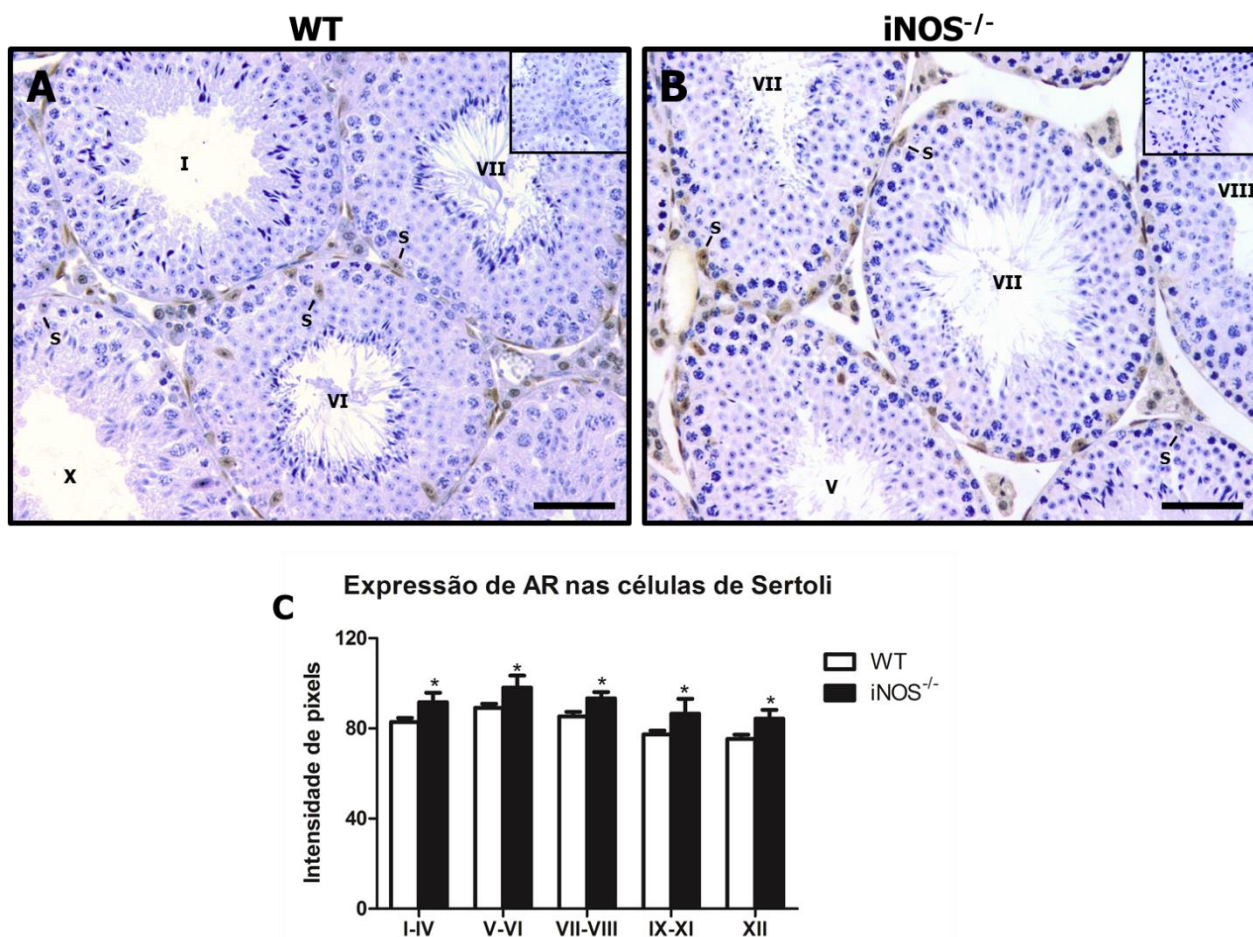
**Figura 6:** Volume celular (A) e número total de células de Leydig por testículo (B) em camundongos selvagens (WT) e iNOS deficientes (<sup>-/-</sup>), tratados ou não com PTU. Os dois parâmetros avaliados somente apresentaram diferença significativa quando o grupo controle foi comparado com o iNOS<sup>-/-</sup>. Letras diferentes denotam diferenças significativas (p<0,05).



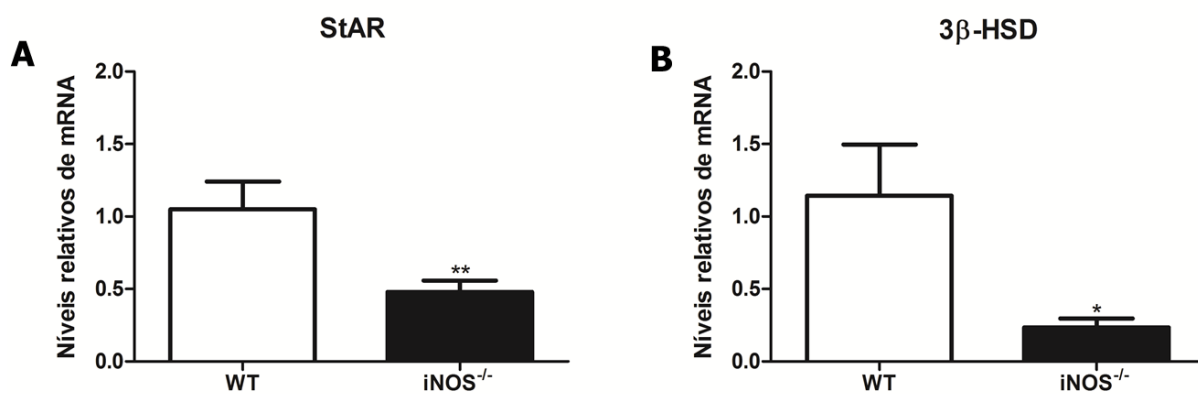
**Figura 7:** Quantificação da expressão do mRNA do gene Sox9 no testículo de camundongos selvagens (WT) e iNOS deficientes (<sup>-/-</sup>), mostrando que os valores encontrados foram significativamente maiores nos camundongos iNOS<sup>-/-</sup>. \* = p<0,05



**Figura 8:** Expressão do receptor de andrógeno (AR). Imunohistoquímica para AR nos testículos de camundongos selvagens (WT; A) e iNOS<sup>-/-</sup> (B), evidenciando a marcação nuclear nas células de Leydig (L), Sertoli (S) e peritubulares mióides (P). Quantificação da expressão do mRNA de AR nos testículos por qPCR (C) e intensidade de pixels da imunohistoquímica nos três tipos celulares somáticos avaliados (D). Os inserts no canto superior direito das figuras representam os controles negativos. Barra = 30µm. \* = p<0,05.

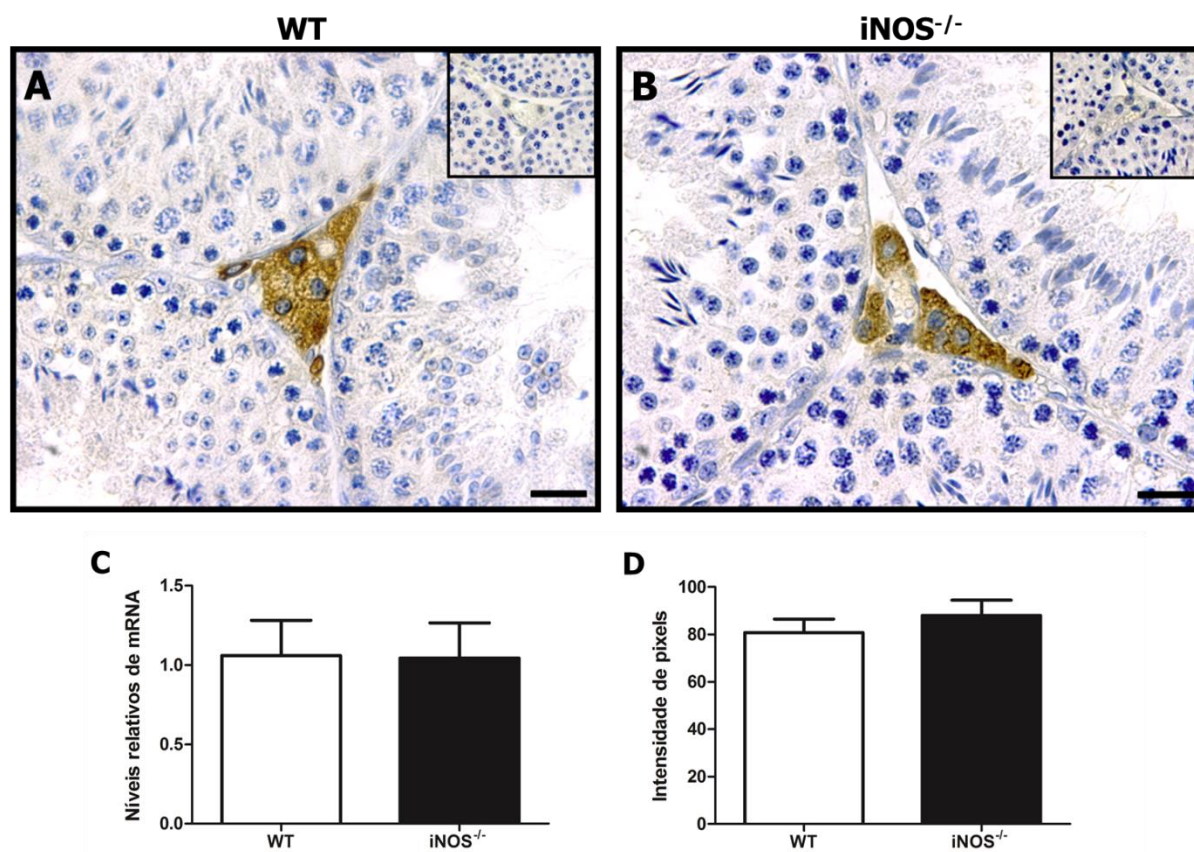


**Figura 9:** Expressão do receptor de andrógeno (AR). Imunohistoquímica para AR nas células de Sertoli (S) em camundongos selvagens (WT; A) e iNOS<sup>-/-</sup> (B), ilustrando a marcação em diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero (CES). Quantificação da intensidade de pixels da imunohistoquímica nas células de Sertoli por grupo de estádios do CES (C). Observe que em todos os grupos de estádios considerados a expressão mais intensa foi encontrada nos camundongos iNOS deficientes. Os insertos representam os controles negativos. Barra = 120 $\mu$ m. \* =  $p < 0,05$ .

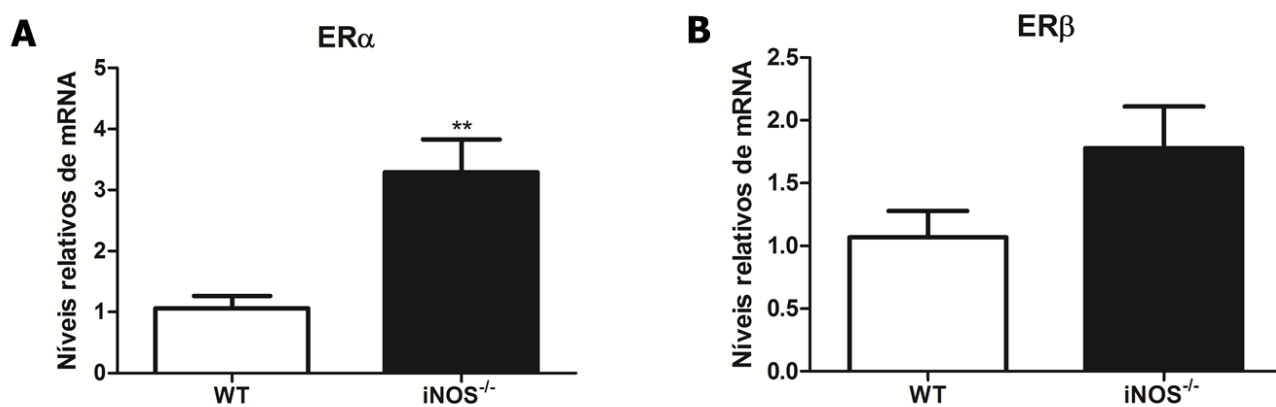


**Figura 10:** Quantificação da expressão do mRNA das enzimas StAR e 3β-HSD no testículo de camundongos selvagens (WT) e iNOS deficientes (<sup>-/-</sup>), onde se observa que sua expressão foi significativamente reduzida nos iNOS<sup>-/-</sup>. \* = p<0,05 e \*\* = p<0,01.





**Figura 11:** Expressão da enzima aromatase. Imunohistoquímica para aromatase nos testículos de camundongos selvagens (WT; A) e *iNOS*<sup>-/-</sup> (B), evidenciando a marcação citoplasmática desta enzima nas células de Leydig. Quantificação da expressão do mRNA da aromatase nos testículos por qPCR (C) e intensidade de pixels da imunohistoquímica (D). Conforme pode ser notado, não houve diferença significativa na expressão de aromatase. Os insertos representam os controles negativos. Barra = 30µm.



**Figura 12:** Quantificação da expressão do mRNA dos receptores de estrógeno ERα (A) e ERβ (B) no testículo de camundongos selvagens (WT) e iNOS<sup>-/-</sup> onde aumento significativo foi observado apenas para a expressão de ERα. \*\* = p<0,01.



**Tabela 1:** Sequência e concentração dos *primers* utilizados para os estudos de expressão gênica.

<b>Primer</b>	<b>Concentração</b>	<b>Sequência</b>
<i>Sox9 forward</i>	200 nM	5' – GAGCCGGATCTGAAGAGGGA – 3'
<i>Sox9 reverse</i>	200 nM	5' – GCTTGCGTGTGGCTTGTC – 3'
<i>AR forward</i>	800 nM	5' - CTGGGAAGGGTCTACCCAC - 3'
<i>AR reverse</i>	800 nM	5' - GGTGCTATGTTAGCGGCCTC - 3'
<i>StAR forward</i>	200 nM	5' – ATGTTCTCGCTACGTTCAAG – 3'
<i>StAR reverse</i>	200 nM	5' – CCCAGTGCTCTCCAGTTGAG – 3'
<i>3β-HSD forward</i>	200 nM	5' - TGGACAAAGTATTCCGACCAGA - 3'
<i>3β-HSD reverse</i>	200 nM	5' - GGCACACTTGCTTGAACACAG - 3'
<i>Aromatase forward</i>	200 nM	5' - ATGTTCTTGAAATGCTGAACCC - 3'
<i>Aromatase reverse</i>	200 nM	5' - AGGACCTGGTATTGAAGACGAG - 3'
<i>ERα forward</i>	200 nM	5' – CCTCCCGCCTTCTACAGGT – 3'
<i>ERα reverse</i>	200 nM	5' – CACACGGCACAGTAGCGAG – 3'
<i>ERβ forward</i>	200 nM	5' – GACTGTAGAACGGTGTGGTCATCAA – 3'
<i>ERβ reverse</i>	200 nM	5' – CCTGTGAGGTAGGAATGCGAAAC – 3'
<i>β-actina forward</i>	200 nM	5' - GGCTGTATTCCCCTCCATCG - 3'
<i>β-actina reverse</i>	200 nM	5' - CCAGTTGGTAACAATGCCATGT - 3'

**Tabela 2:** Programa de qPCR utilizado para quantificação da expressão gênica.

	<b>Passo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
<i> Holding stage</i>	1	95°C	10 minutos
<i> Cycling stage (45x)</i>	2	95°C	15 segundos
	3	60°C	1 minuto
	4	95°C	15 segundos
<i> Melt Curve Stage</i>	5	60°C	1 minuto
	6	95°C	15 segundos

**Tabela 3:** Peso corporal e dados biométricos e morfométricos do testículo de camundongos selvagens (WT) e iNOS deficientes ( $^{-/-}$ ), tratados ou não com PTU (média  $\pm$  EP).

	WT	WT + PTU	iNOS $^{-/-}$	iNOS $^{-/-}$ + PTU
Peso corporal (g)	26 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	23 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	26 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	26 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>
Peso testicular (mg)	93 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	109 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	159 $\pm$ 3 <sup>c</sup>	152 $\pm$ 6 <sup>c</sup>
IGS (%)	0,72 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,95 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	1,22 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	1,19 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>
Proporção volumétrica (%)				
Compartimento tubular	94,8 $\pm$ 0,4	94,9 $\pm$ 0,3	95,5 $\pm$ 0,5	95,3 $\pm$ 0,4
Túnica própria	3 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	4,1 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	3,1 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	3,4 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
Epitélio seminífero	84,8 $\pm$ 0,9	84,6 $\pm$ 0,8	80,8 $\pm$ 1,1	83,2 $\pm$ 1,4
Lume	7 $\pm$ 0,9 <sup>ab</sup>	6,1 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	11,6 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>	8,7 $\pm$ 1,9 <sup>ab</sup>
Compartimento intertubular	5,1 $\pm$ 0,4	4,9 $\pm$ 0,3	4,5 $\pm$ 0,5	4,7 $\pm$ 0,4
Célula de Leydig	3 $\pm$ 0,3	2,8 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,3
Vasos sanguíneos	1,6 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,3
Espaço linfático	0,23 $\pm$ 0,07	0,28 $\pm$ 0,09	0,27 $\pm$ 0,08	0,32 $\pm$ 0,05
Outros	0,22 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	0,51 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,13 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	0,4 $\pm$ 0,14 <sup>ab</sup>
Diâmetro tubular ( $\mu$ m)	224 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	198 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	236 $\pm$ 3 <sup>c</sup>	226 $\pm$ 4 <sup>a</sup>
Altura do epitélio seminífero ( $\mu$ m)	83 $\pm$ 2	75 $\pm$ 3	77 $\pm$ 2	76 $\pm$ 4
Comprimento tubular/testículo (m)	2,2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	3,2 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	3,4 $\pm$ 0,1 <sup>bc</sup>	3,6 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>
Comprimento tubular/g/testículo (m)	24,1 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	30,8 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	21,8 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	23,8 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>

Na mesma linha, letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 4:** Números corrigidos e razões celulares obtidos através de contagens celulares de secções transversais de túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero em camundongos selvagens (WT) e iNOS deficientes ( $^{-/-}$ ), tratados ou não com PTU (média  $\pm$  EP).

	WT	WT + PTU	iNOS $^{-/-}$	iNOS $^{-/-}$ + PTU
Núcleo de célula de Sertoli	7,2 $\pm$ 0,3	7,5 $\pm$ 0,2	7,7 $\pm$ 0,2	7,7 $\pm$ 0,5
Espermatócito em paquíteno	27 $\pm$ 0,9 <sup>ab</sup>	25 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	29 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	28 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>
Espermátide arredondada	63 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	54 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	71 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>	64 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>
Índice de células de Sertoli	8,8 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	7,2 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	9,2 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	8,4 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>
Índice meiótico	2,3 $\pm$ 0,04	2,2 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,04	2,3 $\pm$ 0,05
Número de células de Sertoli/testículo ( $\times 10^6$ )	3,4 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	5,7 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	6,6 $\pm$ 0,3 <sup>c</sup>	7,2 $\pm$ 0,5 <sup>c</sup>
Número de células de Sertoli/g/testículo ( $\times 10^6$ )	37,1 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	54,9 $\pm$ 2,7 <sup>b</sup>	43,1 $\pm$ 2,4 <sup>ac</sup>	47,9 $\pm$ 2,4 <sup>c</sup>
Produção espermática diária/testículo ( $\times 10^6$ )	3,4 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	4,6 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	7 $\pm$ 0,3 <sup>c</sup>	6,9 $\pm$ 0,5 <sup>c</sup>
Produção espermática diária/g/testículo ( $\times 10^6$ )	37,3 $\pm$ 0,9	45,1 $\pm$ 3,2	45,2 $\pm$ 2,4	46 $\pm$ 3,4

Na mesma linha, letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5:** Morfometria das células de Leydig em camundongos selvagens (WT) e iNOS deficientes ( $^{-/-}$ ), tratados ou não com PTU (média  $\pm$  EP).

	WT	WT + PTU	iNOS $^{-/-}$	iNOS $^{-/-}$ + PTU
Diâmetro Nuclear	7,3 $\pm$ 0,1	7,3 $\pm$ 0,1	7,1 $\pm$ 0,1	7,4 $\pm$ 0,2
Volume Celular	993 $\pm$ 53 <sup>a</sup>	845 $\pm$ 62 <sup>ab</sup>	710 $\pm$ 20 <sup>b</sup>	828 $\pm$ 85 <sup>ab</sup>
Volume Nuclear	205 $\pm$ 4	208 $\pm$ 13	190 $\pm$ 5	218 $\pm$ 19
Volume Citoplasmático	787 $\pm$ 52 <sup>a</sup>	636 $\pm$ 49 <sup>ab</sup>	519 $\pm$ 24 <sup>b</sup>	610 $\pm$ 80 <sup>ab</sup>
Número de células de Leydig/testículo ( $\times 10^6$ )	2,7 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	3,5 $\pm$ 0,3 <sup>ab</sup>	4,4 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	4,1 $\pm$ 0,6 <sup>ab</sup>
Número de células de Leydig/g/testículo ( $\times 10^6$ )	28,9 $\pm$ 2,1	33,9 $\pm$ 3,5	28,7 $\pm$ 3,1	26,7 $\pm$ 4,1

Na mesma linha, letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

## 9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear population from microtome sections. **The Anatomical Record**, v. 94, n. 2, p. 239–247, 1946. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ar.1090940210>>. Acesso em: 2/3/2014.
- ADAMS, M. L.; MEYER, E. R.; SEWING, B. N.; CICERO, T. J. Effects of nitric oxide-related agents on rat testicular function. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 269, n. 1, p. 230–7, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7513358>>. Acesso em: 1/3/2014.
- ADAMS, M. L.; NOCK, B.; TRUONG, R.; CICERO, T. J. Nitric oxide control of steroidogenesis: endocrine effects of NG-nitro-L-arginine and comparisons to alcohol. **Life sciences**, v. 50, n. 6, p. PL35–40, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1734158>>. Acesso em: 2/3/2014.
- AKINGBEMI, B. T.; GE, R.; ROSENFELD, C. S.; et al. Estrogen receptor-alpha gene deficiency enhances androgen biosynthesis in the mouse Leydig cell. **Endocrinology**, v. 144, n. 1, p. 84–93, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12488333>>. Acesso em: 28/2/2014.
- ALLAN, C. M.; GARCIA, A.; SPALIVIERO, J.; et al. Complete Sertoli cell proliferation induced by follicle-stimulating hormone (FSH) independently of luteinizing hormone activity: evidence from genetic models of isolated FSH action. **Endocrinology**, v. 145, n. 4, p. 1587–93, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14726449>>. Acesso em: 1/3/2014.
- AMANN, R. P.; ALMQUIST, J. O. Reproductive capacity of dairy bulls. VI. Effect of unilateral vasectomy and ejaculation frequency on sperm reserves; aspects of epididymal physiology. **Journal of reproduction and fertility**, v. 3, p. 260–8, 1962. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13860858>>. Acesso em: 2/3/2014.
- ANDRIC, S. A.; JANJIC, M. M.; STOJKOV, N. J.; KOSTIC, T. S. Protein kinase G-mediated stimulation of basal Leydig cell steroidogenesis. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 293, n. 5, p. E1399–408, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17848628>>. Acesso em: 28/2/2014.
- ANTONY, F. F.; ARULDHAS, M. M.; UDHAYAKUMAR, R. C.; MARAN, R. R.; GOVINDARAJULU, P. Inhibition of Leydig cell activity in vivo and in vitro in hypothyroid rats. **The Journal of endocrinology**, v. 144, n. 2, p. 293–300, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7706982>>. Acesso em: 12/3/2014.
- ATANASSOVA, N. N.; WALKER, M.; MCKINNELL, C.; FISHER, J. S.; SHARPE, R. M. Evidence that androgens and oestrogens, as well as follicle-stimulating hormone, can alter Sertoli cell number in the neonatal rat. **The Journal of endocrinology**, v. 184, n. 1, p. 107–17, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15642788>>. Acesso em: 1/3/2014.

ATTAL, J.; COUROT, M. Développement testiculaire et établissement de la spermatogenèse chez le taureau. **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, v. 3, n. 3, p. 219–241, 1963. Disponível em: <<http://www.edpsciences.org/10.1051/rnd:19630302>>. Acesso em: 10/3/2014.

AUHAREK, S. A.; AVELAR, G. F.; LARA, N. L. M.; SHARPE, R. M.; FRANÇA, L. R. Sertoli cell numbers and spermatogenic efficiency are increased in inducible nitric oxide synthase mutant mice. **International journal of andrology**, v. 34, n. 6 Pt 2, p. e621–9, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21831234>>. Acesso em: 28/2/2014.

AUHAREK, S. A.; FRANÇA, L. R. Postnatal testis development, Sertoli cell proliferation and number of different spermatogonial types in C57BL/6J mice made transiently hypo- and hyperthyroidic during the neonatal period. **Journal of anatomy**, v. 216, n. 5, p. 577–88, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2871994&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 28/2/2014.

AUHAREK, S. A.; LARA, N. L. M.; AVELAR, G. F.; SHARPE, R. M.; FRANÇA, L. R. Effects of inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficiency in mice on Sertoli cell proliferation and perinatal testis development. **International journal of andrology**, v. 35, n. 5, p. 741–51, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22420564>>. Acesso em: 22/2/2014.

AVELAR, G. F.; LEAL, M. C.; FRANÇA, L. R. Avaliação morfofuncional do testículo, duração do ciclo do epitélio seminífero e produção espermática diária em três diferentes linhagens de camundongos. Anais do 2º Congresso de Integração em Biologia da Reprodução. **Anais...**, 2003. Ribeirão Preto.

AVELAR, G. F.; LEAL, M. C.; FRANÇA, L. R. Sertoli and Leydig cells number per testis and daily sperm production in different mice strains. 13th european workshop on molecular & cellular endocrinology of the testis - programme & miniposters. **Anais...**, 2004. Dunblane.

BARDIN, C. W. The anabolic action of testosterone. **The New England journal of medicine**, v. 335, n. 1, p. 52–3, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8637543>>. Acesso em: 11/3/2014.

BARREIRO ARCOS, M. L.; GORELIK, G.; KLECHA, A.; GENARO, A. M.; CREMASCHI, G. A. Thyroid hormones increase inducible nitric oxide synthase gene expression downstream from PKC-zeta in murine tumor T lymphocytes. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 291, n. 2, p. C327–36, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16495371>>. Acesso em: 5/3/2014.

BARREIRO ARCOS, M. L.; STERLE, H. A.; PAULAZO, M. A.; et al. Cooperative nongenomic and genomic actions on thyroid hormone mediated-modulation of T cell proliferation involve up-regulation of thyroid hormone receptor and inducible nitric oxide synthase expression. **Journal of cellular physiology**, v. 226, n. 12, p. 3208–18, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21344381>>. Acesso em: 28/2/2014.

BARRIONUEVO, F.; GEORG, I.; SCHERTHAN, H.; et al. Testis cord differentiation after the sex determination stage is independent of Sox9 but fails in the combined absence of Sox9 and Sox8. **Developmental biology**, v. 327, n. 2, p. 301–12, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19124014>>. Acesso em: 22/2/2014.

BENDEL-STENZEL, M.; ANDERSON, R.; HEASMAN, J.; WYLIE, C. The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 9, n. 4, p. 393–400, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9813186>>. Acesso em: 1/3/2014.

BERNDTSON, W. E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. **Journal of animal science**, v. 44, n. 5, p. 818–33, 1977. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/324963>>. Acesso em: 1/3/2014.

BLANCO-RODRÍGUEZ, J. A matter of death and life: the significance of germ cell death during spermatogenesis. **International journal of andrology**, v. 21, n. 5, p. 236–48, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9805237>>. Acesso em: 3/3/2014.

BREMNER, W. J.; MILLAR, M. R.; SHARPE, R. M.; SAUNDERS, P. T. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. **Endocrinology**, v. 135, n. 3, p. 1227–34, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8070367>>. Acesso em: 5/3/2014.

BUZZARD, J. J.; MORRISON, J. R.; O'BRYAN, M. K.; SONG, Q.; WREFORD, N. G. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 3, p. 664–9, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10684808>>. Acesso em: 1/3/2014.

CAPEL, B. The battle of the sexes. **Mechanisms of development**, v. 92, n. 1, p. 89–103, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10704890>>. Acesso em: 1/3/2014.

CARPINO, A.; PEZZI, V.; RAGO, V.; BILINSKA, B.; ANDO', S. Immunolocalization of cytochrome P450 aromatase in rat testis during postnatal development. **Tissue and Cell**, v. 33, n. 4, p. 349–353, 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040816601901867>>. Acesso em: 28/2/2014.

CARREAU, S.; BOIS, C.; ZANATTA, L.; et al. Estrogen signaling in testicular cells. **Life sciences**, v. 89, n. 15-16, p. 584–7, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21703280>>. Acesso em: 20/1/2014.

CARREAU, S.; GENISSEL, C.; BILINSKA, B.; LEVALLET, J. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. **International journal of andrology**, v. 22, n. 4, p. 211–23, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10442293>>. Acesso em: 1/3/2014.

CARREAU, S.; HESS, R. A. Oestrogens and spermatogenesis. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 365, n. 1546, p. 1517–35, 2010. Disponível em:



<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2871919&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 29/1/2014.

CARREAU, S.; PAPDOPOULOS, V.; DROSDOWSKY, M. A. [Paracrine regulation of Leydig cell aromatase in the rat: development with age]. **Pathologie-biologie**, v. 36, n. 8, p. 1002–6, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3059282>>. Acesso em: 2/3/2014.

CHABOISSIER, M.-C.; KOBAYASHI, A.; VIDAL, V. I. P.; et al. Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. **Development (Cambridge, England)**, v. 131, n. 9, p. 1891–901, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15056615>>. Acesso em: 22/2/2014.

CHANG, C.; LEE, S. O.; WANG, R.-S.; YEH, S.; CHANG, T.-M. Androgen receptor (AR) physiological roles in male and female reproductive systems: lessons learned from AR-knockout mice lacking AR in selective cells. **Biology of reproduction**, v. 89, n. 1, p. 21, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23782840>>. Acesso em: 17/2/2014.

CHEN, Z.; YUHANNA, I. S.; GALCHEVA-GARGOVA, Z.; et al. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. **The Journal of clinical investigation**, v. 103, n. 3, p. 401–6, 1999. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=407904&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 6/3/2014.

CHIAO, Y.-C.; CHO, W.-L.; WANG, P. S. Inhibition of testosterone production by propylthiouracil in rat Leydig cells. **Biology of reproduction**, v. 67, n. 2, p. 416–22, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12135875>>. .

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiological reviews**, v. 52, n. 1, p. 198–236, 1972. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4621362>>. Acesso em: 10/2/2014.

CLERMONT, Y.; TROTT, M. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of 3H-thymidine and radioautography. **Fertility and sterility**, v. 20, n. 5, p. 805–17, 1969. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5822863>>. Acesso em: 3/3/2014.

COLLETA, H. H. M. D.; CARVALHO, H. F. Célula de Sertoli. In: H. F. Carvalho; C. B. Collares-Buzaro (Eds.); **Células: uma abordagem multidisciplinar**. p.325–334, 2005. Barueri: Manole.

COOKE, P. S. Thyroid hormones and testis development: a model system for increasing testis growth and sperm production. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 637, p. 122–32, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1785766>>. Acesso em: 1/3/2014.

COOKE, P. S. Thyroid hormone and the regulation of testicular development. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1-4, p. 333–341, 1996. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432096014893>>. Acesso em: 1/3/2014.

COOKE, P. S.; HESS, R. A.; KIRBY, J. D. A model system for increasing testis size and sperm production: Potential application to animal science. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 3, p. 43–54, 1994.

COOKE, P. S.; HOLSBERGER, D. R.; FRANÇA, L. R. Thyroid hormone regulation of Sertoli cell development. In: M. K. Skinner; M. D. Griswold (Eds.); **The Sertoli cell biology**. p.217–226, 2005. Elsevier Science.

COOKE, P. S.; KIRBY, J. D.; PORCELLI, J. Increased testis growth and sperm production in adult rats following transient neonatal goitrogen treatment: optimization of the propylthiouracil dose and effects of methimazole. **Journal of reproduction and fertility**, v. 97, n. 2, p. 493–9, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8501721>>. .

COOKE, P. S.; MEISAMI, E. Early hypothyroidism in rats causes increased adult testis and reproductive organ size but does not change testosterone levels. **Endocrinology**, v. 129, n. 1, p. 237–43, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2055186>>. Acesso em: 1/3/2014.

COOKE, P. S.; PORCELLI, J.; HESS, R. A. Induction of increased testis growth and sperm production in adult rats by neonatal administration of the goitrogen propylthiouracil (PTU): the critical period. **Biology of reproduction**, v. 46, n. 1, p. 146–54, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1547312>>. Acesso em: 1/3/2014.

COOKE, P. S.; ZHAO, Y. D.; BUNICK, D. Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. **Biology of reproduction**, v. 51, n. 5, p. 1000–5, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7531505>>. Acesso em: 1/3/2014.

COOPER, T. G.; YEUNG, C.-H. Computer-aided evaluation of assessment of “grade a” spermatozoa by experienced technicians. **Fertility and sterility**, v. 85, n. 1, p. 220–4, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16412757>>. Acesso em: 1/3/2014.

CORDEIRO-JÚNIOR, D. A; COSTA, G. M. J.; TALAMONI, S. A; FRANÇA, L. R. Spermatogenic efficiency in the spiny rat, *Trinomys moojeni* (Rodentia: Echimyidae). **Animal reproduction science**, v. 119, n. 1-2, p. 97–105, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20018466>>. Acesso em: 11/3/2014.

COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M. T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: A. D. Johnson; W. R. Gomes; N. L. Vandemark (Eds.); **The testis**. p.339–432, 1970. New York: Academic Press.

COUSE, J. F.; LINDZEY, J.; GRANDIEN, K.; GUSTAFSSON, J. A.; KORACH, K. S. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse.

**Endocrinology**, v. 138, n. 11, p. 4613–21, 1997. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9348186>>. Acesso em: 5/2/2014.

DÖHLER, K. D.; WUTTKE, W. Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. **Endocrinology**, v. 94, n. 4, p. 1003–8, 1974. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4818764>>. Acesso em: 1/3/2014.

DREWETT, J. G.; ADAMS-HAYS, R. L.; HO, B. Y.; HEGGE, D. J. Nitric oxide potently inhibits the rate-limiting enzymatic step in steroidogenesis. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 194, n. 1-2, p. 39–50, 2002. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12242026>>. .

DUPONT, S.; KRUST, A.; GANSMULLER, A.; et al. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes.

**Development (Cambridge, England)**, v. 127, n. 19, p. 4277–91, 2000. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10976058>>. Acesso em: 6/3/2014.

EDDY, E. M. Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. **Reviews of reproduction**, v. 4, n. 1, p. 23–30, 1999. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10051099>>. Acesso em: 2/3/2014.

EDDY, E. M.; WASHBURN, T. F.; BUNCH, D. O.; et al. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility.

**Endocrinology**, v. 137, n. 11, p. 4796–805, 1996. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8895349>>. Acesso em: 24/2/2014.

FAN, J.; PAPADOPOULOS, V. Evolutionary origin of the mitochondrial cholesterol transport machinery reveals a universal mechanism of steroid hormone biosynthesis in animals. **PLoS one**, v. 8, n. 10, p. e76701, 2013. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3790746&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 28/2/2014.

FELLET, A. L.; ARZA, P.; ARRECHE, N.; ARRANZ, C.; BALASZCZUK, A. M. Nitric oxide and thyroid gland: modulation of cardiovascular function in autonomic-blocked anaesthetized rats. **Experimental physiology**, v. 89, n. 3, p. 303–12, 2004. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15123566>>. Acesso em: 4/3/2014.

FELLET, A. L.; BALASZCZUK, A. M.; ARRANZ, C.; et al. Autonomic regulation of pacemaker activity: role of heart nitric oxide synthases. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 291, n. 3, p. H1246–54, 2006. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16617132>>. Acesso em: 4/3/2014.

FERNÁNDEZ, V.; TAPIA, G.; VARELA, P.; VIDELA, L. A. Redox regulation of thyroid hormone-induced Kupffer cell-dependent I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation in relation to inducible nitric oxide synthase expression. **Free radical research**, v. 39, n. 4, p. 411–8, 2005. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16028366>>. Acesso em: 5/3/2014.

FRANÇA, L. R. **Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau**, 1991. UFMG.

FRANÇA, L. R. Daily sperm production in Piau boars estimated from Sertoli cell population and Sertoli cell index. International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. **Anais...** p.1716–1718, 1992. Netherlands.

FRANÇA, L. R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA, F. F. L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 300–18, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15626401>>. Acesso em: 29/1/2014.

FRANÇA, L. R.; CHIARINI-GARCIA, H. Célula de Sertoli. In: H. F. Carvalho; C. B. Collares-Buzato (Eds.); **Células. uma abordagem multidisciplinar**. p.302–324, 2005. Barueri: Manole.

FRANÇA, L. R.; HESS, R. A.; COOKE, P. S.; RUSSELL, L. D. Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. **The Anatomical record**, v. 242, n. 1, p. 57–69, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7604982>>. Acesso em: 1/3/2014.

FRANÇA, L. R.; OGAWA, T.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L.; RUSSELL, L. D. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. **Biology of reproduction**, v. 59, n. 6, p. 1371–7, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9828180>>. Acesso em: 2/3/2014.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic animals. In: F. Martinez; J. Regadera (Eds.); **Male Reproduction: a multidisciplinary overview**. p.197–219, 1998. Churchill.

FRANÇA, L. R.; SILVA, V. A.; CHIARINI-GARCIA, H.; GARCIA, S. K.; DEBELJUK, L. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. **Biology of reproduction**, v. 63, n. 6, p. 1629–36, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11090429>>. Acesso em: 1/3/2014.

FUMEL, B.; GUERQUIN, M.-J.; LIVERA, G.; et al. Thyroid hormone limits postnatal Sertoli cell proliferation in vivo by activation of its alpha1 isoform receptor (TRalpha1) present in these cells and by regulation of Cdk4/JunD/c-myc mRNA levels in mice. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 1, p. 16, 1–9, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22539677>>. Acesso em: 28/2/2014.

GENDT, K. DE; ATANASSOVA, N.; TAN, K. A. L.; et al. Development and function of the adult generation of Leydig cells in mice with Sertoli cell-selective or total ablation of the androgen receptor. **Endocrinology**, v. 146, n. 9, p. 4117–26, 2005. Endocrine Society. Disponível em: <[http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/en.2005-0300?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub=pubmed](http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/en.2005-0300?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub=pubmed)>. Acesso em: 20/1/2014.

GENDT, K. DE; SWINNEN, J. V.; SAUNDERS, P. T. K.; et al. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 5, p. 1327–32, 2004.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=337052&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1/3/2014.

GONDOS, B.; BERNDSTON, W. E. Postnatal and pubertal development. In: L. D. Russell; M. D. Griswold (Eds.); **The Sertoli cell**. p.115–154, 1993. Clearwater: Cache River Press.

GRIEVE, D. J.; FLETCHER, S.; PITSILLIDES, A. A.; BOTHAM, K. M.; ELLIOTT, J. Effects of oral propylthiouracil treatment on nitric oxide production in rat aorta. **British journal of pharmacology**, v. 127, n. 1, p. 1–8, 1999. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1565988&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1/3/2014.

GUO, F. H.; RAEVE, H. R. DE; RICE, T. W.; et al. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 17, p. 7809–13, 1995. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=41235&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2/3/2014.

HAASTER, L. H. VAN; JONG, F. H. DE; DOCTER, R.; ROOIJ, D. G. DE. The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. **Endocrinology**, v. 131, n. 3, p. 1574–6, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1505485>>. Acesso em: 1/3/2014.

HAASTER, L. H. VAN; JONG, F. H. DE; DOCTER, R.; ROOIJ, D. G. DE. High neonatal triiodothyronine levels reduce the period of Sertoli cell proliferation and accelerate tubular lumen formation in the rat testis, and increase serum inhibin levels. **Endocrinology**, v. 133, n. 2, p. 755–60, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8344214>>. Acesso em: 1/3/2014.

HARDY, M. P.; KIRBY, J. D.; HESS, R. A.; COOKE, P. S. Leydig cells increase their numbers but decline in steroidogenic function in the adult rat after neonatal hypothyroidism.

**Endocrinology**, v. 132, n. 6, p. 2417–20, 1993. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8504746>>. Acesso em: 4/3/2014.

HARLEY, V. R.; CLARKSON, M. J.; ARGENTARO, A. The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9]. **Endocrine reviews**, v. 24, n. 4, p. 466–87, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12920151>>. Acesso em: 22/2/2014.

HECKERT, L. L.; GRISWOLD, M. D. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. **Recent progress in hormone research**, v. 57, p. 129–48, 2002. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1496959&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1/3/2014.

HESS, R. A.; BUNICK, D.; LEE, K. H.; et al. A role for oestrogens in the male reproductive system. **Nature**, v. 390, n. 6659, p. 509–12, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9393999>>. Acesso em: 24/2/2014.

HESS, R. A.; BUNICK, D.; LUBAHN, D. B.; ZHOU, Q.; BOUMA, J. Morphologic Changes in Efferent Ductules and Epididymis in Estrogen Receptor- $\alpha$  Knockout Mice. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 1, p. 107–121, 2000. Blackwell Publishing Ltd. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03282.x/abstract>>. Acesso em: 6/3/2014.

HESS, R. A.; COOKE, P. S.; BUNICK, D.; KIRBY, J. D. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. **Endocrinology**, v. 132, n. 6, p. 2607–13, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8504761>>. Acesso em: 1/3/2014.

HESS, R. A.; FRANÇA, L. R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: C. Y. Cheng (Ed.); **Molecular Mechanisms in Spermatogenesis**. v. 636, p.1–15, 2007. Springer New York. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19856159>>. .

HILL, C. M.; ANWAY, M. D.; ZIRKIN, B. R.; BROWN, T. R. Intratesticular androgen levels, androgen receptor localization, and androgen receptor expression in adult rat Sertoli cells. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 4, p. 1348–58, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15215201>>. Acesso em: 28/2/2014.

HOLSBERGER, D. R.; BUCHOLD, G. M.; LEAL, M. C.; et al. Cell-cycle inhibitors p27Kip1 and p21Cip1 regulate murine Sertoli cell proliferation. **Biology of reproduction**, v. 72, n. 6, p. 1429–36, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15728790>>. Acesso em: 1/3/2014.

HOLSBERGER, D. R.; COOKE, P. S. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. **Cell and tissue research**, v. 322, n. 1, p. 133–40, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15856309>>. Acesso em: 1/3/2014.

HOLSBERGER, D. R.; KIESEWETTER, S. E.; COOKE, P. S. Regulation of neonatal Sertoli cell development by thyroid hormone receptor alpha1. **Biology of reproduction**, v. 73, n. 3, p. 396–403, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15858214>>. Acesso em: 1/3/2014.

HUCKINS, C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. **The Anatomical record**, v. 190, n. 4, p. 905–26, 1978. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/637327>>. Acesso em: 3/3/2014.

JANSEN, H. T.; KIRBY, J. D.; COOKE, P. S.; ARAMBEPOLA, N.; IWAMOTO, G. A. Impact of neonatal hypothyroidism on reproduction in the male hamster, *Mesocricetus auratus*. **Physiology & behavior**, v. 90, n. 5, p. 771–81, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17291550>>. Acesso em: 1/3/2014.

- JEFFERSON, W. N.; COUSE, J. F.; BANKS, E. P.; KORACH, K. S.; NEWBOLD, R. R. Expression of estrogen receptor beta is developmentally regulated in reproductive tissues of male and female mice. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 2, p. 310–7, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10642567>>. Acesso em: 6/3/2014.
- JEGOU, B.; RISBRIDGER, G. P.; KRETZER, D. M. DE. Effects of experimental cryptorchidism on testicular function in adult rats. **Journal of andrology**, v. 4, n. 1, p. 88–94, 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6132907>>. Acesso em: 1/3/2014.
- JIN, Y.; PENNING, T. M. Steroid 5alpha-reductases and 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in androgen metabolism. **Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism**, v. 15, n. 1, p. 79–94, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11469812>>. Acesso em: 2/3/2014.
- JOHNSTON, H.; BAKER, P. J.; ABEL, M.; et al. Regulation of Sertoli cell number and activity by follicle-stimulating hormone and androgen during postnatal development in the mouse. **Endocrinology**, v. 145, n. 1, p. 318–29, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14551232>>. Acesso em: 1/3/2014.
- JOSEPH, A.; SHUR, B. D.; HESS, R. A. Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. **Biology of reproduction**, v. 84, n. 2, p. 207–17, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3071263&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2/3/2014.
- JOYCE, K. L.; PORCELLI, J.; COOKE, P. S. Neonatal goitrogen treatment increases adult testis size and sperm production in the mouse. **Journal of andrology**, v. 14, n. 6, p. 448–55, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8294229>>. Acesso em: 1/3/2014.
- KARL, J.; CAPEL, B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. **Developmental biology**, v. 203, n. 2, p. 323–33, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9808783>>. Acesso em: 28/1/2014.
- KENT, J.; WHEATLEY, S. C.; ANDREWS, J. E.; SINCLAIR, A. H.; KOOPMAN, P. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. **Development (Cambridge, England)**, v. 122, n. 9, p. 2813–22, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8787755>>. Acesso em: 1/3/2014.
- KIRBY, J. D.; JETTON, A. E.; COOKE, P. S.; et al. Developmental hormonal profiles accompanying the neonatal hypothyroidism-induced increase in adult testicular size and sperm production in the rat. **Endocrinology**, v. 131, n. 2, p. 559–65, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1639007>>. Acesso em: 2/3/2014.
- KIRBY, J. D.; MANKAR, M. V.; HARDESTY, D.; KREIDER, D. L. Effects of transient prepubertal 6-N-propyl-2-thiouracil treatment on testis development and function in the domestic fowl. **Biology of reproduction**, v. 55, n. 4, p. 910–6, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8879508>>. Acesso em: 1/3/2014.

KISSO, B.; PATEL, A.; REDETZKE, R.; GERDES, A. M. Effect of low thyroid function on cardiac structure and function in spontaneously hypertensive heart failure rats. **Journal of cardiac failure**, v. 14, n. 2, p. 167–71, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2292454&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1/3/2014.

KON, Y.; NAMIKI, Y.; ENDOH, D. Expression and distribution of inducible nitric oxide synthase in mouse testis. **The Japanese journal of veterinary research**, v. 50, n. 2-3, p. 115–23, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12619303>>. .

LAL, B.; DUBEY, N. Existence of a nitric oxide synthase/nitric oxide system in fish testis and its role in modulation of androgenesis. **Fish physiology and biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 65–9, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22565666>>. Acesso em: 28/2/2014.

LAMBARD, S.; SILANDRE, D.; DELALANDE, C.; et al. Aromatase in testis: expression and role in male reproduction. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 95, n. 1-5, p. 63–9, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16019206>>. Acesso em: 28/2/2014.

LAN, K.-C.; CHEN, Y.-T.; CHANG, C.; et al. Up-regulation of SOX9 in sertoli cells from testiculopathic patients accounts for increasing anti-mullerian hormone expression via impaired androgen receptor signaling. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e76303, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3788123&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 5/3/2014.

LAUBACH, V. E.; FOLEY, P. L.; SHOCKEY, K. S.; TRIBBLE, C. G.; KRON, I. L. Protective roles of nitric oxide and testosterone in endotoxemia: evidence from NOS-2-deficient mice. **The American journal of physiology**, v. 275, n. 6 Pt 2, p. H2211–8, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9843821>>. .

LAUBACH, V. E.; SHESELY, E. G.; SMITHIES, O.; SHERMAN, P. A. Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 23, p. 10688–92, 1995. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=40677&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

LEBLOND, C. P.; CLERMONT, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 55, n. 4, p. 548–73, 1952. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13139144>>. Acesso em: 2/3/2014.

LEE, N. P. Y.; CHENG, C. Y. Nitric oxide and cyclic nucleotides: their roles in junction dynamics and spermatogenesis. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 636, n. December, p. 172–85, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19856168>>. Acesso em: 2/3/2014.



LUE, Y.; SINHA HIKIM, A. P.; WANG, C.; LEUNG, A.; SWERDLOFF, R. S. Functional role of inducible nitric oxide synthase in the induction of male germ cell apoptosis, regulation of sperm number, and determination of testes size: evidence from null mutant mice.

**Endocrinology**, v. 144, n. 7, p. 3092–100, 2003. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12810565>>. Acesso em: 22/2/2014.

MARAN, R. R.; SIVAKUMAR, R.; ARUNAKARAN, J.; et al. Duration-dependent effect of transient neonatal hypothyroidism on sertoli and germ cell number, and plasma and testicular interstitial fluid androgen binding protein concentration. **Endocrine research**, v. 25, n. 3-4, p. 323–40, 1999. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10596726>>. Acesso em: 1/3/2014.

MARTINEAU, J.; NORDQVIST, K.; TILMANN, C.; LOVELL-BADGE, R.; CAPEL, B. Male-specific cell migration into the developing gonad. **Current biology : CB**, v. 7, n. 12, p. 958–68, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9382843>>. Acesso em: 1/3/2014.

MCALLISTER, R. M.; ALBARRACIN, I.; JASPERSE, J. L.; PRICE, E. M. Thyroid status and endothelium-dependent vasodilation in skeletal muscle. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 288, n. 1, p. R284–91, 2005.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15374816>>. Acesso em: 28/2/2014.

MCALLISTER, R. M.; ALBARRACIN, I.; PRICE, E. M.; et al. Thyroid status and nitric oxide in rat arterial vessels. **The Journal of endocrinology**, v. 185, n. 1, p. 111–9, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15817832>>. Acesso em: 28/2/2014.

MEACHEM, S. J.; MCLACHLAN, R. I.; STANTON, P. G.; ROBERTSON, D. M.; WREFORD, N. G. FSH immunoneutralization acutely impairs spermatogonial development in normal adult rats. **Journal of andrology**, v. 20, n. 6, p. 756–62; discussion 755, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10591615>>. Acesso em: 2/3/2014.

MEACHEM, S. J.; STANTON, P. G.; SCHLATT, S. Follicle-stimulating hormone regulates both Sertoli cell and spermatogonial populations in the adult photoinhibited Djungarian hamster testis. **Biology of reproduction**, v. 72, n. 5, p. 1187–93, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15659702>>. Acesso em: 12/3/2014.

MENDIS-HANDAGAMA, C.; ARIYARATNE, S. Prolonged and transient neonatal hypothyroidism on Leydig cell differentiation in the postnatal rat testis. **Archives of andrology**, v. 50, n. 5, p. 347–57, 2004. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15551749>>. Acesso em: 4/3/2014.

MENDIS-HANDAGAMA, S. M.; ARIYARATNE, H. B. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 3, p. 660–71, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11514326>>. Acesso em: 1/3/2014.

MENDIS-HANDAGAMA, S. M.; ARIYARATNE, H. B.; TEUNISSEN VAN MANEN, K. R.; HAUPT, R. L. Differentiation of adult Leydig cells in the neonatal rat testis is arrested by hypothyroidism. **Biology of reproduction**, v. 59, n. 2, p. 351–7, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9687307>>. Acesso em: 12/3/2014.

MILLER, W. L.; BOSE, H. S. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. **Journal of lipid research**, v. 52, n. 12, p. 2111–35, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3283258&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2/3/2014.

MIRANDA, J. **Efeitos do tratamento neonatal com 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) e FSH na proliferação das células de Sertoli e função testicular em ratos Wistar adultos**, 2002. UFMG.

MIRANDA, J. **Regulação da proliferação pós-natal das células de Sertoli em ratos**, 2006. UFMG.

MORAIS DA SILVA, S.; HACKER, A.; HARLEY, V.; et al. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. **Nature genetics**, v. 14, n. 1, p. 62–8, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8782821>>. Acesso em: 22/2/2014.

NATHAN, C.; XIE, Q. W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 19, p. 13725–8, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7514592>>. Acesso em: 2/3/2014.

NEE PATHAK, N. D.; LAL, B. Nitric oxide: An autocrine regulator of Leydig cell steroidogenesis in the Asian catfish, *Clarias batrachus*. **General and comparative endocrinology**, v. 158, n. 2, p. 161–7, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18667163>>. Acesso em: 28/2/2014.

NITTA, H.; BUNICK, D.; HESS, R. A.; et al. Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. **Endocrinology**, v. 132, n. 3, p. 1396–401, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8440194>>. Acesso em: 24/2/2014.

NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. **Fish physiology and biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 197–206, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18716890>>. Acesso em: 1/3/2014.

O'BRYAN, M. K.; SCHLATT, S.; GERDPRASERT, O.; et al. Inducible nitric oxide synthase in the rat testis: evidence for potential roles in both normal function and inflammation-mediated infertility. **Biology of reproduction**, v. 63, n. 5, p. 1285–93, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11058531>> .

O'BRYAN, M. K.; TAKADA, S.; KENNEDY, C. L.; et al. Sox8 is a critical regulator of adult Sertoli cell function and male fertility. **Developmental biology**, v. 316, n. 2, p. 359–70, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2375044&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22/2/2014.

O'SHAUGHNESSY, P. J.; JOHNSTON, H.; WILLERTON, L.; BAKER, P. J. Failure of normal adult Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice. **Journal of cell science**, v. 115,

n. Pt 17, p. 3491–6, 2002. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12154079>>. Acesso em: 5/3/2014.

OJEDA, S. R.; RAMÍREZ, V. D. Plasma level of LH and FSH in maturing rats: response to hemigonadectomy. **Endocrinology**, v. 90, n. 2, p. 466–72, 1972. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5009330>>. Acesso em: 1/3/2014.

ORTAVANT, R.; COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M. T. Spermatogenesis in domestic mammals. In: H. H. Cole; P. T. Cupps (Eds.); **Reproduction in domestic mammals**. p.203–227, 1977. New York: Academic Press.

ORTH, J. M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative

autoradiographic study. **The Anatomical record**, v. 203, n. 4, p. 485–92, 1982. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7137603>>. Acesso em: 1/3/2014.

ORTH, J. M. The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in

testes of fetal rats. **Endocrinology**, v. 115, n. 4, p. 1248–55, 1984. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6090096>>. Acesso em: 1/3/2014.

ORTH, J. M. Cell biology of testicular development in the fetus and neonate. In: C.

Desjardins; L. L. Ewing (Eds.); **Cell and molecular biology of the testis**. p.3–42, 1993. New

York: Oxford University Press.

ORTH, J. M.; GUNSALUS, G. L.; LAMPERTI, A. A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats

indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced

during perinatal development. **Endocrinology**, v. 122, n. 3, p. 787–94, 1988. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3125042>>. Acesso em: 1/3/2014.

PAPADOPOULOS, V.; CARREAU, S.; SZERMAN-JOLY, E.; et al. Rat testis 17 $\beta$ -estradiol:

Identification by gas chromatography-mass spectrometry and age related cellular

distribution. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 24, n. 6, p. 1211–1216, 1986. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022473186903857>>. Acesso em:

2/3/2014.

PEDRAM, A.; RAZANDI, M.; AITKENHEAD, M.; HUGHES, C. C. W.; LEVIN, E. R. Integration of

the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid

to transcription and cell biology. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 52, p. 50768–

75, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12372818>>. Acesso em:

6/3/2014.

PELLINIEMI, L. J.; KUOPIO, T.; FROJDMAN, K. The cell biology and function of the fetal Leydig

cells. In: A. H. Payne; M. P. Hardy; L. D. Russell (Eds.); **The Leydig Cell**. p.143–158, 1996.

Cache River Press.

POMERANTZ, D. K.; PITELKA, V. Nitric oxide is a mediator of the inhibitory effect of activated

macrophages on production of androgen by the Leydig cell of the mouse. **Endocrinology**, v.

139, n. 3, p. 922–31, 1998. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9492021>>. .

- PUNTA, K. DEL; CHARREAU, E. H.; PIGNATARO, O. P. Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. **Endocrinology**, v. 137, n. 12, p. 5337–43, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8940355>>. Acesso em: 1/3/2014.
- QIN, Y.; BISHOP, C. E. Sox9 is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of Sry. **Human molecular genetics**, v. 14, n. 9, p. 1221–9, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15790596>>. Acesso em: 5/3/2014.
- RAGGINER, C.; BERNECKER, C.; AINOEDHOFER, H.; et al. Treatment with the nitric oxide donor SNP increases triiodothyronine levels in hyper- and hypothyroid Sprague-Dawley rats. **Hormone and metabolic research**, v. 45, n. 11, p. 808–12, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23918691>>. Acesso em: 4/3/2014.
- REY, R. The prepubertal testis: a quiescent or a silently active organ? **Histology and histopathology**, v. 14, n. 3, p. 991–1000, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10425566>>. Acesso em: 2/3/2014.
- ROBERTSON, K. M.; SIMPSON, E. R.; LACHAM-KAPLAN, O.; JONES, M. E. Characterization of the fertility of male aromatase knockout mice. **Journal of andrology**, v. 22, n. 5, p. 825–30, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11545296>>. .
- ROCHA, D. C.; DEBELJUK, L.; FRANÇA, L. R. Exposure to constant light during testis development increases daily sperm production in adult Wistar rats. **Tissue & cell**, v. 31, n. 3, p. 372–9, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10481308>>. Acesso em: 4/3/2014.
- RODRÍGUEZ-ARNAO, M. D.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, A; RODRÍGUEZ-ARNAO, J.; et al. Undetectable levels of tumor necrosis factor-alpha, nitric oxide and inadequate expression of inducible nitric oxide synthase in congenital hypothyroidism. **European cytokine network**, v. 14, n. 1, p. 65–8, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12799216>>. .
- ROOIJ, D. G. DE. Stem cells in the testis. **International journal of experimental pathology**, v. 79, n. 2, p. 67–80, 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3230838&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3/3/2014.
- ROOIJ, D. G. DE; LOK, D. Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the Chinese hamster: II. Differentiating spermatogonia. **The Anatomical record**, v. 217, n. 2, p. 131–6, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3578833>>. Acesso em: 3/3/2014.
- ROOIJ, D. G. DE; RUSSELL, L. D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. **Journal of andrology**, v. 21, n. 6, p. 776–98, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11105904>>. .

- ROOSEN-RUNGE, E. C. Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. **Journal of reproduction and fertility**, v. 35, n. 2, p. 339–48, 1973. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4584655>>. Acesso em: 3/3/2014.
- ROSENFELD, C. S.; GANJAM, V. K.; TAYLOR, J. A.; et al. Transcription and translation of estrogen receptor-beta in the male reproductive tract of estrogen receptor-alpha knock-out and wild-type mice. **Endocrinology**, v. 139, n. 6, p. 2982–7, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9607809>>. Acesso em: 6/3/2014.
- ROSS, A. J.; AMY, S. P.; MAHAR, P. L.; et al. BCLW mediates survival of postmitotic Sertoli cells by regulating BAX activity. **Developmental biology**, v. 239, n. 2, p. 295–308, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11784036>>. Acesso em: 1/3/2014.
- ROSS, A. J.; CAPEL, B. Signaling at the crossroads of gonad development. **Trends in endocrinology and metabolism**, v. 16, n. 1, p. 19–25, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15620545>>. Acesso em: 1/3/2014.
- RUSSELL, D. W.; WILSON, J. D. Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. **Annual review of biochemistry**, v. 63, p. 25–61, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7979239>>. .
- RUSSELL, L. D.; CORBIN, T. J.; BORG, K. E.; et al. Recombinant human follicle-stimulating hormone is capable of exerting a biological effect in the adult hypophysectomized rat by reducing the numbers of degenerating germ cells. **Endocrinology**, v. 133, n. 5, p. 2062–70, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8404654>>. Acesso em: 1/3/2014.
- RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Clearwater, Fl: Cache River Press, 1990.
- RUSSELL, L. D.; FRANÇA, L. R.; BRINSTER, R. L. Ultrastructural observations of spermatogenesis in mice resulting from transplantation of mouse spermatogonia. **Journal of andrology**, v. 17, n. 6, p. 603–14, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9016390>>. Acesso em: 2/3/2014.
- RUSSELL, L. D.; WARREN, J.; DEBELJUK, L.; et al. Spermatogenesis in Bclw-deficient mice. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 1, p. 318–32, 2001. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3049812&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1/3/2014.
- SARATI, L. I.; MARTINEZ, C. R.; ARTÉS, N.; et al. Hypothyroidism: age-related influence on cardiovascular nitric oxide system in rats. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 61, n. 9, p. 1301–11, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22424823>>. Acesso em: 4/2/2014.
- SCHULZ, R. W.; FRANÇA, L. R.; LAREYRE, J.-J.; et al. Spermatogenesis in fish. **General and comparative endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 390–411, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19348807>>. Acesso em: 20/1/2014.

SCOTT, H. M.; HUTCHISON, G. R.; JOBLING, M. S.; et al. Relationship between androgen action in the “male programming window,” fetal sertoli cell number, and adult testis size in the rat. **Endocrinology**, v. 149, n. 10, p. 5280–7, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18566125>>. Acesso em: 28/2/2014.

SCOTT, H. M.; HUTCHISON, G. R.; MAHOOD, I. K.; et al. Role of androgens in fetal testis development and dysgenesis. **Endocrinology**, v. 148, n. 5, p. 2027–36, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17289843>>. Acesso em: 1/3/2014.

SHARPE, R. M. Regulation of Spermatogenesis. In: E. Knobil; J. D. Neil (Eds.); **The physiology of reproduction**. p.1363–1434, 1994. New York: Raven Press.

SHARPE, R. M. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. **Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism**, v. 20, n. 1, p. 91–110, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16522522>>. Acesso em: 1/3/2014.

SHARPE, R. M.; KERR, J. B.; MCKINNELL, C.; MILLAR, M. Temporal relationship between androgen-dependent changes in the volume of seminiferous tubule fluid, lumen size and seminiferous tubule protein secretion in rats. **Journal of reproduction and fertility**, v. 101, n. 1, p. 193–8, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8064681>>. Acesso em: 11/3/2014.

SHARPE, R. M.; MADDOCKS, S.; MILLAR, M.; et al. Testosterone and spermatogenesis. Identification of stage-specific, androgen-regulated proteins secreted by adult rat seminiferous tubules. **Journal of andrology**, v. 13, n. 2, p. 172–184, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1317835>>. Acesso em: 5/3/2014.

SHARPE, R. M.; MCKINNELL, C.; KIVLIN, C.; FISHER, J. S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 125, n. 6, p. 769–84, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12773099>>. Acesso em: 1/3/2014.

SHEN, K.; LEUNG, S. W. S.; JI, L.; et al. Notoginsenoside Ft1 activates both glucocorticoid and estrogen receptors to induce endothelium-dependent, nitric oxide-mediated relaxations in rat mesenteric arteries. **Biochemical pharmacology**, v. 88, n. 1, p. 66–74, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24440742>>. Acesso em: 6/3/2014.

SHIBAYAMA, T.; FUKATA, H.; SAKURAI, K.; et al. Neonatal exposure to genistein reduces expression of estrogen receptor alpha and androgen receptor in testes of adult mice. **Endocrine journal**, v. 48, n. 6, p. 655–63, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11873863>>. Acesso em: 6/3/2014.

SINGH, J.; HANDELSMAN, D. J. Neonatal administration of FSH increases Sertoli cell numbers and spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice. **The Journal of endocrinology**, v. 151, n. 1, p. 37–48, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8943767>>. Acesso em: 1/3/2014.

STEINBERGER, A.; STEINBERGER, E. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. **Biology of reproduction**, v. 4, n. 1, p. 84–7, 1971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5110903>>. Acesso em: 1/3/2014.

STÉPHAN, J. P.; GUILLEMOIS, C.; JÉGOU, B.; BAUCHÉ, F. Nitric oxide production by Sertoli cells in response to cytokines and lipopolysaccharide. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 213, n. 1, p. 218–24, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7543752>>. Acesso em: 2/3/2014.

SUÁREZ-QUIAN, C. A.; MARTÍNEZ-GARCÍA, F.; NISTAL, M.; REGADERA, J. Androgen receptor distribution in adult human testis. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 84, n. 1, p. 350–8, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9920106>>. Acesso em: 5/3/2014.

SULLIVAN, R.; FRENETTE, G.; GIROUARD, J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. **Asian journal of andrology**, v. 9, n. 4, p. 483–91, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17589785>>. Acesso em: 1/3/2014.

TADDEI, S.; CARACCIO, N.; VIRDIS, A.; et al. Impaired endothelium-dependent vasodilatation in subclinical hypothyroidism: beneficial effect of levothyroxine therapy. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 88, n. 8, p. 3731–7, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12915662>>. Acesso em: 25/2/2014.

TAKAO, T.; NANAMIYA, W.; NAZARLOO, H. P.; et al. Exposure to the environmental estrogen bisphenol A differentially modulated estrogen receptor-alpha and -beta immunoreactivity and mRNA in male mouse testis. **Life sciences**, v. 72, n. 10, p. 1159–69, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12505546>>. Acesso em: 6/3/2014.

TARULLI, G. A.; STANTON, P. G.; MEACHEM, S. J. Is the adult Sertoli cell terminally differentiated? **Biology of reproduction**, v. 87, n. 1, p. 13, 1–11, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22492971>>. Acesso em: 12/3/2014.

TATSUMI, N.; FUJISAWA, M.; KANZAKI, M.; et al. Nitric oxide production by cultured rat Leydig cells. **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 994–8, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9048600>>. .

TEERDS, K. J.; ROOIJ, D. G. DE; JONG, F. H. DE; HAASTER, L. H. VAN. Development of the adult-type Leydig cell population in the rat is affected by neonatal thyroid hormone levels. **Biology of reproduction**, v. 59, n. 2, p. 344–50, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9687306>>. Acesso em: 12/3/2014.

THOMAS, D. D.; RIDNOUR, L. A.; ISENBERG, J. S.; et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. **Free radical biology & medicine**, v. 45, n. 1, p. 18–31, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2572721&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 28/2/2014.

THOMPSON, T. L.; BERNDTSON, W. E. Testicular weight, Sertoli cell number, daily sperm production, and sperm output of sexually mature rabbits after neonatal or prepubertal hemicastration. **Biology of reproduction**, v. 48, n. 5, p. 952–7, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8481481>>. Acesso em: 12/3/2014.

TILMANN, C.; CAPEL, B. Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. **Recent progress in hormone research**, v. 57, p. 1–18, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12017538>>. Acesso em: 1/3/2014.

TOWNSEND, E. A.; MEUCHEL, L. W.; THOMPSON, M. A.; PABELICK, C. M.; PRAKASH, Y. S. Estrogen increases nitric-oxide production in human bronchial epithelium. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 339, n. 3, p. 815–24, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3226369&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 6/3/2014.

VALENTI, S.; CUTTICA, C. M.; FAZZUOLI, L.; GIORDANO, G.; GIUSTI, M. Biphasic effect of nitric oxide on testosterone and cyclic GMP production by purified rat Leydig cells cultured in vitro. **International journal of andrology**, v. 22, n. 5, p. 336–41, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10509235>>. Acesso em: 2/3/2014.

VERGOUWEN, R. P.; JACOBS, S. G.; HUISKAMP, R.; DAVIDS, J. A.; ROOIJ, D. G. DE. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. **Journal of reproduction and fertility**, v. 93, n. 1, p. 233–43, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1920294>>. .

VIRDIS, A.; COLUCCI, R.; FORNAI, M.; et al. Inducible nitric oxide synthase is involved in endothelial dysfunction of mesenteric small arteries from hypothyroid rats. **Endocrinology**, v. 150, n. 2, p. 1033–42, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18927216>>. Acesso em: 12/2/2014.

WEISSMAN, B. A.; NIU, E.; GE, R.; et al. Paracrine modulation of androgen synthesis in rat leydig cells by nitric oxide. **Journal of andrology**, v. 26, n. 3, p. 369–78, 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1351298&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 28/2/2014.

WELSH, M.; SAUNDERS, P. T. K.; ATANASSOVA, N.; SHARPE, R. M.; SMITH, L. B. Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. **FASEB journal**, v. 23, n. 12, p. 4218–4230, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2812048&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1/3/2014.

WELSH, M.; SAUNDERS, P. T. K.; MARCHETTI, N. I.; SHARPE, R. M. Androgen-dependent mechanisms of Wolffian duct development and their perturbation by flutamide. **Endocrinology**, v. 147, n. 10, p. 4820–30, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16809447>>. Acesso em: 7/3/2014.

WELSH, M.; SHARPE, R. M.; WALKER, M.; SMITH, L. B.; SAUNDERS, P. T. K. New insights into the role of androgens in wolffian duct stabilization in male and female rodents.



**Endocrinology**, v. 150, n. 5, p. 2472–80, 2009. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19131576>>. Acesso em: 7/3/2014.

WILHELM, D.; HIRAMATSU, R.; MIZUSAKI, H.; et al. SOX9 regulates prostaglandin D synthase gene transcription in vivo to ensure testis development. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 14, p. 10553–60, 2007. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17277314>>. Acesso em: 1/3/2014.

WILLEMS, A.; BATLOUNI, S. R.; ESNAL, A.; et al. Selective ablation of the androgen receptor in mouse sertoli cells affects sertoli cell maturation, barrier formation and cytoskeletal development. **PloS one**, v. 5, n. 11, p. e14168, 2010. Disponível em:  
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2994754&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 28/2/2014.

WRIGHT, W. W.; MUSTO, N. A.; MATHER, J. P.; BARDIN, C. W. Sertoli cells secrete both testis-specific and serum proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 12, p. 7565–9, 1981. Disponível em:  
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=349309&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1/3/2014.

XU, J.; XU, Q.; CHEN, X.; ZOU, C.; ZHAO, Z. Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase in hypothyroid rat. **Neuro endocrinology letters**, v. 31, n. 6, p. 848–51, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21196918>>. .

ZHOU, Q.; NIE, R.; PRINS, G. S.; et al. Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. **Journal of andrology**, v. 23, n. 6, p. 870–81, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12399534>>. .

ZHU, L. J.; HARDY, M. P.; INIGO, I. V; et al. Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study. **Biology of reproduction**, v. 63, n. 2, p. 368–76, 2000. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10906039>>. Acesso em: 5/3/2014.

ZIRKIN, B. R.; AWONIYI, C.; GRISWOLD, M. D.; RUSSELL, L. D.; SHARPE, R. Is FSH required for adult spermatogenesis? **Journal of andrology**, v. 15, n. 4, p. 273–6, 1994. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7982794>>. Acesso em: 2/3/2014.